

XLIX MSKN

**50. Międzynarodowe Seminarium
Kół Naukowych w Olsztynie**

„Seminarium Obrazowania Studenckiej
Myśli Naukowej”

TOM 1

**AKTUALNE PROBLEMY BADAWCZE
NAUKI BIOMEDYCZNE I TECHNICZNE**

nauki biologiczne | nauki medyczne | nauki o zdrowiu | nauki o żywności
nauki rolnicze, leśne i ochrony środowiska | nauki techniczne
nauki weterynaryjne | nauki zootechniczne i rybactwa

**Aktualne problemy badawcze.
Tom 1.
Nauki biomedyczne i techniczne**

Korekta i redakcja:
Aneta Cierechowicz
Aleksandra Cichowska
Marta Chelińska

Projekt okładki:
Kaja Żabińska

© Copyright by Wydawnictwo Naukowe FNCE
© Copyright by texts Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydawnictwo Naukowe FNCE



**ISBN: 9788366800717
Poznań 2021**

SPIS TREŚCI

Wstęp	9
Recenzenci.....	11

SEKCJA NAUK BIOLOGICZNYCH

Martyna Buta

Wpływ nawożenia obornikiem zwierzęcym na występowanie genów antybiotykooporności w glebie	15
---	----

Jakub Hubeny

Występowanie genów oporności na antybiotyki ostatniej szansy w oczyszczalni ścieków.....	26
--	----

Olga Katarzyna Sierawska, Monika Agnieszka Wysokińska

Ekspresja genów kodujących α -defensynę np-5 (kortykostatyna-6) w wątrobie królików (<i>Oryctolagus cuniculus</i>).....	34
--	----

Klaudyna Spychała, Aleksandra Przetacznik, Weronika Salwińska

Torf jako źródło bakterii produkujących metabolity wtórne o charakterze antybiotycznym.....	43
---	----

SEKCJA NAUK MEDYCZNYCH

Magdalena Fadrowska©, Karol Szeleper©, Aleksandra Sejda

Extranodal manifestation of ALK+ Anaplastic Large Cell Lymphoma in children: case report	55
--	----

Jan Herzyk, Krzysztof Jakimów

Analiza przypadków klinicznych z punktu widzenia radiologii pacjentów z COVID-19 poddanych respiratoroterapii.....	66
--	----

SEKCJA NAUK O ZDROWIU

Paulina Cwalińska-Gwiazda Pandemia COVID-19 a depresja.....	83
Marta Kaczmarczyk, Karolina Łukasiewicz Wpływ spożycia kawy na organizm człowieka.....	92
Karolina Kańciak, Natalia Lewandowska Sensoryczna ocena jakości kremów rozgrzewających przeznaczonych do pielęgnacji rąk.....	102
Karolina Lisińska, Wiktoria Stepnowska Orzechy jako źródło nienasyconych kwasów tłuszczowych – wpływ na funkcje poznawcze organizmu	115
Krzysztof Sikora Ocena poziomu lęku, gniewu i depresji u pracowników ochrony zdrowia w związku z pandemią COVID-19.....	123

SEKCJA NAUK O ŻYWNOŚCI

Joanna Browarek, Kamil Foss, Piotr Jakuc Charakterystyka pradawnych zbóż stosowanych w piekarstwie.....	137
Kamil Foss, Joanna Browarek Kawa typu <i>cold brew</i> – otrzymywanie, właściwości i akceptowalność konsumenta.....	149
Bartosz Gąsiniak, Szymon Andrzejewski	
Piotr Jakuc Porównanie wrażliwości sensorycznej młodzieży z wybranych szkół średnich	163
Wpływ alternatyw cukru białego na jakość czekoladek deserowych	172
Marcelina Kreczman, Kacper Biernat, Artur Kowalicki Zafałszowania miodów dostępnych na rynku.....	183
Zuzanna Mstowska Próba wykorzystania antybakteryjnych właściwości wasabi w redukcji zanieczyszczenia mikrobiologicznego sushi	193

Anna Polakowska, Aleksandra Rzymska Matcha jako cenny dodatek do produktów spożywczych – możliwość wykorzystania w produkcji ciastek kruchych.....	204
Jolanta Remiszewska Oświadczenia żywieniowe i zdrowotne – praktyka rynku a wiedza konsumentów	213
Aleksandra Rzymska, Anna Polakowska Wody roślinne dostępne na rynku – rodzaje i właściwości	225
Paula Sadowska Przegląd głównych zafałszowań żywności w Polsce na podstawie danych z urzędowej kontroli żywności.....	250
Julia Ziajka Napoje roślinne – wartościowe substytuty mleka?	261
SEKCJA NAUK ROLNICZYCH, LEŚNYCH I OCHRONY ŚRODOWISKA	
Marta Czaja, Klaudia Stefaniak Analiza wpływu eksploatacji statku typu pasażerskiego na zanieczyszczenia atmosfery w aspekcie przestrzegania Konwencji MARPOL.....	279
mgr inż. Mateusz Dawid Analiza alternatywnych zastosowań nasion łubinu	295
Joanna Agnieszka Dąbrowska, Grzegorz Dzienis Reakcja wybranych odmian soi na infekcję wywołaną przez <i>Fusarium graminearum</i>	305
Joanna Agnieszka Dąbrowska, Aleksandra Karpiesiuk, Kinga Karwacka Występowanie grzybów toksynotwórczych w orzechach z produkcji własnej oraz komercyjnej.....	317
Aleksandra Karpiesiuk, Kinga Karwacka, Karol Rapita Grzyby toksynotwórcze w krajowych i importowanych śrutach sojowych.....	333
Olga Kosewska Rozwój wołka ryżowego (<i>Sitophilus Oryzae</i>) na różnych odmianach zbóż.....	344
Fabian Miszewski Ogrody działkowe jako istotny element ekosystemu miasta	357

Kinga Pałatyńska, Bartłomiej Wysoczański Analiza genu PAO1 żyta – poszukiwanie markerów PCR-SCAR i ustalenie lokalizacji na mapie genetycznej.....	367
--	-----

SEKCJA NAUK TECHNICZNYCH

Paulina Biała Budowa modelu 3D obiektu małej architektury metodą fotogrametryczną.....	383
--	-----

Daria Darznik, Adam Bieszk Analiza możliwości regeneracji płyt sterów strumieniowych za pomocą kompozytów.....	393
--	-----

Amanda Grylewicz, Łukasz Sałaciński Wpływ modyfikowanych HNT na właściwości ultrafiltracyjnych membran z polieterosulfonu	405
---	-----

Alicja Hołowiecka Zastosowanie modeli mieszanych w analizie rozwoju pandemii COVID-19 na świecie.....	418
---	-----

Martyna Jurkiewicz, Barbara Hanna Roman Effect of modification of the adsorbent with organic compounds on the adsorption of multicomponent mixtures from the gas phase.....	434
---	-----

inż. Damian Kołos, inż. Tomasz Łodziński Projekt układu turbodoładowania do silnika wolnossącego pojazdu biorącego udział w zawodach Formuła Student.....	444
---	-----

mgr inż. Tomasz Kruszewski Wpływ stężenia kwasu fluorowodorowego HF na odporność korozyjną materiału AW-2017A	474
---	-----

Łukasz Łobko Konstrukcja niwelatora hydrostatycznego wspomaganego minikomputerem Raspberry PI	487
---	-----

Magdalena Piłat Przewidywanie cen nieruchomości za pomocą zaawansowanych technik regresji	497
---	-----

Bartosz Pszczółkowski Wpływ temperatury przetwórstwa na właściwości fizyko-chemiczne polilaktydu kształtowanego w technologii FDM	510
---	-----

Bernadetta Ryba

Analiza wpływu braku serwisu urządzeń na działanie instalacji wentylacyjno-
-klimatyzacyjnych 522

inż. Mateusz Zachariasz, Szymon Sakowicz

Obliczenia numeryczne struktur kompozytowych stosowanych w konstrukcjach
nośnych pojazdów klasy Formuła Student..... 536

Małgorzata Zontek

Wykorzystanie rozszerzonej rzeczywistości w multitemporalnej prezentacji za-
bytków Bielska-Białej 553

SEKCJA NAUK WETERYNARYJNYCH**Anna Dowżenko, Nikola Chojnowska, Ewa Kaczmar**

Ocena przydatności wybranych technik obrazowania w diagnostyce ektopowych
moczowodów u psów..... 567

Małgorzata Gugolek, Ewa Kaczmar

Ocena przydatności wybranych technik obrazowania w diagnostyce chorób zę-
bów u szynszyli 575

Jakub Jasiak

Wpływ działania zearalenonu na aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) w jelicie
biodrowym świń 585

Magdalena Morawska-Kozłowska

Przydatność wybranych technik obrazowania w diagnostyce chorób zębów psów
i kotów..... 594

Jakub Osypiuk

Wpływ niskich poziomów zearalenonu na aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP)
w trzustce świń..... 605

Jakub Osypiuk, Jakub Jasiak, Szymon Pokrzywka

Zmiany aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP) w okrężnicy zstępującej świń
narażonych na niski poziom zearalenonu..... 613

Urszula Ozga

Aktywność peroksydazowa w okrężnicy zstępującej świń traktowanych zearale-
nonem 622

Miłosz Pawlak, Ewa Kaczmar

Zastosowanie chromoendoskopii (obrazowania w wąskim paśmie) w wykrywaniu zmian patologicznych w żołądku u psów 630

Dominika Pływacz

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (sod) w okrężnicy zstępującej świń traktowanych zearalenonem 641

Szymon Pokrzywka

Wpływ podawania zearalenonu na aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) jelita środkowego pszczoły..... 649

Zuzanna Polak, Milena Kupa

Analiza lekowrażliwości najczęściej izolowanych bakterii z próbek mleka ćwiartkowego od krów z klinicznym mastitis 658

Julia Wielka, Antonina Galicka, Ewa Kaczmar

Ocena przydatności tomografii komputerowej oraz badania endoskopowego w diagnostyce aspergilozy jamy nosowej u psów..... 667

Aleksandra Wilkosz, Ewa Kaczmar

Ciała obce w przelyku i żołądku u psów: występowanie, czynniki ryzyka – przegląd przypadków 676

SEKCJA NAUK ZOOTECHNICZNYCH I RYBACTWA**Nikodem Choszcz**

Wybrane metody fizjoterapii koni..... 689

Zuzanna Kulawik

Wybrane zioła i ich zastosowanie w lecznictwie koni 698

Kamila Lutkiewicz

Wpływ dodatku hemoglobiny do mieszanki pełnoporcjowej typu prestarter na wyniki odchowu prosiąt ssących 706

Julia Matusiak

Wpływ płodności rzeczywistej i kolejnego cyklu rozplodowego lochy na długość okresu jałowienia..... 716

WSTĘP

Szanowni Państwo,

Mam zaszczyt i przyjemność przedstawić Państwu monografię, będącą zbiorem artykułów przygotowanych przez Uczestników 50 Międzynarodowego Seminarium Kół Naukowych w Olsztynie „Seminarium Obrazowania Studenckiej Myśli Naukowej”, które odbyło się na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie w dniach 15–16 września 2021 roku. Tomy niniejszej publikacji zawierają najlepsze prace z zakresu nauk humanistycznych, prawniczych, biologicznych, medycznych, nauk o żywności i o zdrowiu, nauk weterynaryjnych i zootechnicznych. Twórcami tych prac są Studenci i Doktoranci uczestniczący w 50. MSKN. Ta wyjątkowa edycja powstała w trudnym czasie pandemii koronawirusa COVID-19, która od marca 2020 roku do chwili obecnej uniemożliwia lub bardzo utrudnia pracę naukową i badawczą w placówkach naukowych. Jako organizatorzy musieliśmy zmierzyć się już po raz drugi z przeprowadzeniem tego projektu w formie zdalnej, co było dla wszystkich uczestników konferencji dużym wyzwaniem. W tegorocznej edycji projektu wzięło udział 260 studentów i doktorantów z 15 uczelni wyższych i ośrodków badawczych w Polsce i za granicą. Zdalne obrady odbywały się w 15 sekcjach tematycznych, obejmujących swoim zakresem niemal wszystkie dyscypliny naukowe UWM w Olsztynie.

Organizatorem 50 Międzynarodowego Seminarium Kół Naukowych było Naukowe Koło Technik Obrazowania w Diagnostyce Chorób Małych Zwierząt z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie pod opieką prof. dr. hab. Andrzeja Rychlika, zaś organizatorem wspomagającym było Studenckie Koło Naukowe Ustrojów Politycznych „Casus” z Wydziału Prawa i Administracji pod opieką dr. Moniki Giżyńskiej.

Jako organizatorzy jesteśmy zaszczytzeni i dumni, że wydarzenie zostało objęte patronatem honorowym J. M. Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie dr. hab. Jerzego Przyborowskiego, prof. UWM, Marszałka Województwa Warmińsko-Mazurskiego mgr. inż. Gustawa Marka Brzezina oraz Prezydenta Miasta Olsztyna dr. in. Piotra Grzymowicza. Serdecznie dziękujemy Patronom Honorowym za wsparcie i ufundowanie nagród.

Dziękujemy Pełnomocnikowi Rektora ds. Kół Naukowych dr. hab. Adamowi Okorskiemu, prof. UWM za zaangażowanie w organizację tego projektu. Serdeczne podziękowania składamy Nauczycielom Akademickim UWM w Olsztynie, którzy pomagali w realizacji Konferencji; Wszystkim Koordynatorom Sekcji, Członkom Komisji Kon-

kursowych, Recenzentom nadesłanych prac oraz Pełnomocnikom Dziekanów ds. Kół Naukowych.

Dziękujemy Wszystkim Uczestnikom 50 MSKN, którzy w trudnych warunkach pandemii wytrwale pracowali naukowo. W imieniu Organizatorów pragnę wyrazić przekonanie, że mimo braku spotkań osobistych, wykorzystaliśmy narzędzia do pracy zdalnej, by nawiązać kontakty naukowe, wymienić doświadczenia i zawiązać nowe przyjaźnie.

Mam nadzieję, że monografia, którą Państwu przekazujemy, będzie nie tylko materialnym śladem zrealizowanego projektu, lecz także ciekawą i inspirującą lekturą.

prof. dr hab. Andrzej Rychlik

Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego
50 Międzynarodowego Seminarium Kół Naukowych

RECENZENCI

Sekcja Nauk Biologicznych

dr hab. inż. Grzegorz Panasiewicz, prof. UWM
dr hab. Dorota Górniak, prof. UWM
dr hab. inż. Justyna Mozejko-Ciesielska, prof. UWM
dr Iwona Jeleń

Sekcja Nauk Medycznych

dr n med. Wojciech Zdanowski
dr Martyna Kobuszewska-Bieniek
dr Izabela Małysz-Cymborska
dr hab. Anna Kozłowska, prof. UWM
dr Paweł Wojtacha
dr hab. n. med. Anna Kowalczyk, prof. UWM
dr n med. Katarzyna Jezierska-Woźniak

Sekcja Nauk o Zdrowiu

dr Olga Bielan
dr Katarzyna Kubiak
dr Ewa Kupcewicz
dr Joanna Korycińska
dr Bartłomiej Kraziński
dr Jolanta Kiewisz

Sekcja Nauk o Żywności

dr inż. Marta Czarnowska-Kujawska
dr inż. Justyna Bojarska
dr inż. Dorota Ogrodowska
dr hab. inż. Małgorzata Tańska, prof. UWM
dr inż. Joanna Klepacka
dr inż. Anna Gątorska
dr inż. Joanna Ciborska
dr inż. Beata Paszczyk
dr hab. inż. Renata Pietrzak-Fiećko, prof. UWM

dr inż. Aneta Dąbrowska
dr hab. inż. Katarzyna Kielczewska, prof. UWM
dr n. wet. inż. Magdalena Polak-Śliwińska
dr inż. Iwona Szerszunowicz
dr hab. inż. Marzena Danowska-Oziewicz
dr inż. Lucyna Kłębukowska

Sekcja Nauk Rolniczych, Leśnych i Ochrony Środowiska

prof. dr hab. inż. Urszula Wachowska
prof. dr hab. inż. Bożena Kordan
dr hab. inż. Emilia Marks
dr hab. inż. Arkadiusz Stępień, prof. UWM
dr hab. Marta Damszel
dr hab. inż. Elżbieta Suchowilska, prof. UWM
dr hab. inż. Stanisław Bielski, prof. UWM

Sekcja Nauk Technicznych

dr hab.inż. Maciej Neugebauer
dr inż. Wiesław Komar
dr inż. Wojciech Miąskowski
dr inż. Paweł Pietkiewicz

Sekcja Nauk Weterynaryjnych

dr hab. Michał Załęcki
dr hab. Zenon Pidsudko, prof. UWM
prof. dr hab. Andrzej Rychlik

Sekcja Nauk Zootechnicznych i Rybactwa

prof. dr hab. Anna Wójcik, prof. zw.
dr hab. Wojciech Kozera, prof. UWM
dr inż. Janusz Wejer

**SEKCJA NAUK
BIOLOGICZNYCH**

Martyna Buta

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Geoinżynierii

Naukowe Koło Mikrobiologów Molekularnych „Coccus”

Opiekun koła: dr hab. inż. Monika Harnisz, prof. UWM

WPŁYW NAWOŻENIA OBORNIKIEM ZWIERZĘCYM NA WYSTĘPOWANIE GENÓW ANTYBIOTYKOOPORNOŚCI W GLEBIE

Wstęp

Nawozy pochodzenia zwierzęcego stosowane są powszechnie na całym świecie jako skuteczna metoda poprawy żyzności gleby użytkowanej rolniczo (Lin i in. 2019). Obornik zwierzęcy zawdzięcza swoją użyteczność agrokulturową głównie zawartym w nim substancjom mineralnym, które stanowią substrat niezbędny do wzrostu i rozwoju roślin uprawnych (Tyrrell i in. 2019). Ponadto wysoka zawartość pierwiastków biogenych obecnych w nawozie zwierzęcym wpływa na kształtowanie mikrobioty glebowej, której skład ilościowy i jakościowy jest jednym z kluczowych czynników stanowiących o żyzności gleby (Nölvak i in. 2016). Badaniami obejmowane są najczęściej nawozy pochodzenia bydłowego i drobiowego oraz obornik owczy bądź pochodzący od trzody chlewnej. W zależności od gatunku zwierząt, od których pochodzi wykorzystywany rolniczo obornik, charakteryzuje się on w mniejszym lub większym stopniu obecnością mikroorganizmów wskaźnikowych, m.in. *faecal coliforms*, *faecal streptococci*, *Escherichia coli* oraz niektórych drobnoustrojów patogennych, m.in. *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter*, *Listeria* czy *Salmonella* (Van den Meersche i in. 2019).

Współczesne rolnictwo, pomimo obostrzeń dotyczących wykorzystywania antybiotyków, które wprowadzono w niektórych krajach na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat, wciąż zmagają się z problemem obecności antybiotyków oraz ich produktów rozkładu w glebie (Pikkemaat i in. 2016). Leki przeciwdrobnoustrojowe dostają się do gleby za pośrednictwem obornika pochodzącego od zwierząt hodowlanych, którym

są podawane (regularnie w niskich stężeniach) w postaci środków weterynaryjnych (Sharma i in. 2016) w celu prewencji i promowania wzrostu (nie dotyczy UE) lub leczenia (podawane doraźnie) infekcji pasożytniczych, bakteryjnych czy grzybowych (Nebot i in. 2014). Najbardziej popularnymi antybiotykami wykorzystywanymi w hodowli zwierząt są tetracykliny, β -laktamy, sulfonamidy, aminoglikozydy oraz makrolidy (Spielmeyer 2018). Wciąż występują także przypadki nielegalnego dodawania antybiotyków do pasz. Środki te, po wprowadzeniu do organizmu zwierzęcia, zostają zmetabolizowane tylko w części, co skutkuje ich ogromnymi ilościami odprowadzanymi wraz ze zwierzęcymi wydalaminami, wykorzystywanymi później jako nawóz. Obecność związków przeciwdrobnoustrojowych w nawożonej glebie niesie ze sobą ryzyko eliminacji mikroorganizmów glebowych pożytecznych w procesie użyźniania gleby oraz ryzyko powstawania drobnoustrojów lekoopornych lub wielolekoopornych (Gao i in. 2020).

Bytując w środowisku charakteryzującym się obecnością antybiotyków i produktów ich rozkładu, bakterie szybko adaptują się do niesprzyjających warunków, przekazując między sobą geny oporności na antybiotyki drogą horyzontalnego transferu genów (HTG) (Felden, Cattoira 2018). Sprzyja temu wysoka liczebność mikroorganizmów zasiedlających glebę oraz obornik. Wysoki odsetek mikrobiomu gleby i obornika stanowią drobnoustroje Gram-ujemne (Frey i in. 2013) of which two had CD and two had free-draining (FD, u których często obserwuje się obecność integronów (Gillings 2014), elementów, które dodatkowo promują włączanie obcych genów lub kaset genowych do macierzystego DNA komórek bakteryjnych (Domingues i in. 2015). Szczególną rolę w aktywności integronów odgrywa gen integrazy odpowiedzialny za katalizę procesu włączania do integronu egzogennych kaset genowych (Domínguez i in. 2019) sul and dfr, and their association with integrons among bacteria associated to Chilean salmon farming. For this purpose, 91 Gram-negative strains resistant to sulfisoxazole and/or trimethoprim recovered from various sources of seven Chilean salmonid farms and mainly identified as belonging to the *Pseudomonas* genus (81.0%. W ich skład mogą wchodzić zarówno pojedyncze geny, jak i zbiory genów o różnych funkcjach, poznanych dotąd w mniejszym lub większym stopniu, jednak na szczególną uwagę zasługują zawarte w nich geny oporności na antybiotyki. Mobilne elementy genetyczne, jakimi są integrony, znane są w literaturze jako jeden z głównych czynników szerzenia antybiotykooporności wśród szczepów środowiskowych (Ghaly i in. 2019), ale również szczepów komensalnych czy szczepów o znaczeniu klinicznym (Gillings 2014). Na przestrzeni lat obecność integronów zanotowano w szeregu badanych środowisk, m.in. w wodzie zbiorników słodkowodnych i słonowodnych, w wodzie rzecznej, glebie, ściekach i osadach ściekowych, czy też w mikrobiomie zwierząt i roślin (Abella i in. 2015; Buta i in. 2019; Ghaly i in. 2019; Gillings i in. 2009). Spośród wszystkich zsekwencjonowanych dotąd mikroorganizmów, których sekwencje zdeponowane zostały w dostępnych bazach danych, około 17% ma w swoim genomie integrony. Literatura informuje, że w obrębie grupy integronów klasy pierwszej poznano już 130 kaset genowych, w strukturze których zanotowano obecność genów oporno-

ści na leki przeciwdrobnoustrojowe należące do niemal wszystkich poznanych dotąd klas (Escudero i in. 2018).

Głównym celem prowadzonych badań była ocena ilościowa i jakościowa wpływu nawożenia gleby obornikiem drobiowym oraz bydłęcym na występowanie genów antybiotykooporności w glebie. Próbkę wybranego do badań obornika oraz gleby analizowano pod kątem obecności genów integrazy integronów klasy 1 i 2 (*intI1*, *intI2*) oraz genów oporności na antybiotyki z klasy β -laktamów: (*bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV}), tetracyklin (*tetA*, *tetM*), sulfonamidów (*sul1*, *sul2*), chinolonów (*aac(6)-Ib*, *qepA*), polimyksyn (*mcr-1*), makrolidów (*ermC*), aminoglikozydów (*aadA9*) oraz genu oporności na trimetoprim (*dfrA1*).

2. Materiały i metody

2.1. Charakterystyka i przygotowanie obszaru badawczego

Badania prowadzono w Stacji Doświadczalnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego zlokalizowanej w miejscowości Tomaszkowo, Polska (53°42'35.6"N 20°26'05.0"E). Stacja Doświadczalna zajmuje 64,56 ha powierzchni, z czego 41 ha to grunty orne. Wybrany do badań obszar stanowiła gleba brunatna o frakcji granulometrycznej piasku lekkiego i średniego. Przez ostatnie dziesięć lat na wyznaczonym obszarze badawczym nie stosowano nawożenia obornikiem ani suplementacji antybiotykami. Realizacja badań polegała na założeniu doświadczenia polowego, podczas którego wyznaczono sześć poletek badawczych, każde o powierzchni 4 m². Wybrane poletka suplementowane były jednym z oborników (drobiowy – 1,5 kg/m² lub bydłęcy – 4 kg/m²). Rodzaje i ilości aplikowanego obornika zostały dobrane na podstawie danych literaturowych (McKinney i in. 2018).

2.2. Pobieranie i przygotowanie próbek do izolacji genomowego DNA (gDNA)

W celu pozyskania próbek gleby do jałowych moczówek o pojemności 100 ml pobrano materiał glebowy z głębokości 0–20 cm z pięciu różnych miejsc wyznaczonych na każdym z sześciu poletek eksperymentalnych, wykorzystując w tym celu łaskę glebową Egnera. Jednocześnie pobrano po pięć próbek każdego z dwóch typów obornika (drobiowy i bydłęcy). Materiał glebowy został pobrany w czterech powtórzeniach: jednokrotnie przed suplementacją poletek przed sezonem wegetacyjnym (dzień 0) oraz trzykrotnie po suplementacji poletek wybranym nawozem lub nawozem i antybiotykami w odstępach: jeden dzień (dzień 1.), dwa tygodnie (dzień 14.) oraz cztery

miesiące po suplementacji – pod koniec okresu wegetacyjnego, w dniu przed zbiorem upraw (dzień 133.). W czasie pobierania próbek gleby pomiędzy kolejnymi poletkami każdorazowo sterylizowano łaskę glebową przy pomocy alkoholu etylowego. Wszystkie próbki przetransportowano w warunkach chłodniczych do laboratorium, po czym przygotowano próbki kompozytowe – wszystkie próbki pochodzące z jednoimiennych poletek (po pięć z każdego z dwóch poletek kontrolnych – CP, dwóch poletek suplementowanych obornikiem drobiowym – PMP, lub bydłowym – BMP) dokładnie wymieszano oraz zamrożono w temperaturze -20°C do czasu dalszych etapów badań.

2.3. Izolacja genomowego DNA z próbek środowiskowych

W celu pozyskania genomowego DNA z próbek obornika oraz gleby zastosowano gotowe zestawy do izolacji, odpowiednio FASTDNA™ Spin Kit for Feces (MP Biomedicals) dla próbek obu typów obornika oraz FASTDNA™ Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) dla próbek gleby. Przed ekstrakcją odważono po 500 mg każdej z badanych próbek kompozytowych. Kolejne etapy izolacji przebiegały zgodnie z zaleceniami producenta. Ekstrakcję genomowego DNA wykonano w trzech powtórzeniach w przypadku każdej z próbek kompozytowych. Ilość i jakość uzyskanego gDNA zmierzono metodą spektrofotometryczną (Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific). Wszystkie próbki gDNA przechowywane były w temperaturze -20°C .

2.4. Ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy

Próbki genomowego DNA pochodzące ze wszystkich wybranych do badań środowisk zostały przeanalizowane ilościowo pod kątem występowania drobnoustrojów z wykorzystaniem wiedzy na temat konserwatywnego u *Prokaryota* regionu 16S rRNA – komponentu małej podjednostki (30S) rybosomów tych organizmów. W tych samych próbkach gDNA oznaczono także liczbę kopii genów integrazy (*intI1*, *intI2*) należących odpowiednio do integronów klasy 1 oraz 2, a także geny warunkujące oporność na antybiotyki z klasy: β -laktamów (*bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV}), tetracyklin (*tetA* i *tetM*); sulfonamidów (*sul1* i *sul2*); chinolonów (*aac(6')*-*Ib* i *qepA*); polimyksyn (*mcr-1*); makrolidów (*ermC*), oraz dwa geny wchodzące w skład kaset genowych pojawiających się u mikroorganizmów środowiskowych: *aadA9* – gen oporności na aminoglikozydy, *dfrA1* – gen oporności na trimetoprim. Pojedyncza mieszanina reakcyjna o objętości 15 μl składała się z 3,75 μl SYBR GREEN (Roche Diagnostics), 0,375 μl każdego z indywidualnie dobranych pod kątem każdego oznaczanego genu starterów, 9,75 μl jałowej wody High Pure SYBR GREEN (Roche Diagnostics) oraz 0,75 μl matrycowego DNA. Reakcje prowadzono z wykorzystaniem termocyklera LightCycler® 480 (Roche Diagnostics). Po uzyskaniu wyników wykonano analizę absolutnej kwantyfikacji oraz krzywej topnienia uzyskanych amplikonów dzięki zastosowaniu LightCycler software

(version 1.5.0). Wyniki odnoszono do krzywej standardowej przygotowanej w oparciu o szereg rozcieńczeń otrzymanego DNA plazmidowego zawierającego sekwencję analizowanego genu. Uzyskane ilości kopii poszczególnych genów znormalizowano względem ilości kopii genu 16S rRNA w celu przedstawienia frekwencji oznaczanych genów w stosunku do całkowitej populacji drobnoustrojów występujących w danym środowisku.

2.5. Analiza statystyczna i wizualizacja danych

Istotnie statystycznie różnice między próbkami wykazano, stosując nieparametryczny test Kruskala-Wallisa, zaś korelacje z pomocą testu Spearmana (Statistica ver. 13.3.). Wyniki testów uznano za istotne statystycznie, gdy poziom istotności wynosił $p < 0,05$. Różnice i korelacje zobrazowano, wykorzystując pakietu corrplot oraz gplot (R Studio ver. 1.2) oraz programu Gephi ver. 0.9.2.

3. Wyniki i dyskusja

3.2. Występowanie genów integrazy i antybiotykooporności

3.1.1. Występowanie genów w próbkach obornika

Według Frey i in. (2015), obornik wykorzystywany rolniczo oprócz antybiotyków, które przyczyniać się mogą do szerzenia antybiotykooporności w populacji bakterii środowiskowych, zawierać może również geny oporności na antybiotyki, które mogą być wprowadzane wraz z obornikiem do gleby. Najczęściej wykonuje się monitoring liczebności genów oporności na te antybiotyki, które popularnie stosowane są w danej grupie zwierząt, od których pochodzi później wykorzystywany obornik. W próbkach pochodzących z obu typów obornika stwierdzano obecność zarówno genu *intI1*, jak i genu *intI2*. Ponadto w oborniku pochodzenia drobiowego (PM) stwierdzano również obecność ośmiu spośród trzynastu badanych genów antybiotykooporności, zaś w oborniku pochodzenia bydłowego (BM) odnotowano sześć spośród trzynastu badanych genów determinujących antybiotykooporność (fig. 1). W przypadku wszystkich obserwowanych ARGs wyższą ich koncentrację odnotowano w materiale genetycznym pochodzącym z próbek obornika drobiowego (PM) w stosunku do koncentracji tych genów w gDNA wyizolowanym z obornika bydłowego (BM). Najwyższe koncentracje ARGs (copies g_{dm}^{-1}) w próbkach PM stwierdzano w przypadku genów *sul2* ($6,54 \times 10^{11}$), *tetA* ($1,94 \times 10^{11}$) i *tetM* ($2,80 \times 10^{10}$) zaś w próbkach BM w przypadku genów *tetA* ($8,52 \times 10^{10}$), *sul2* ($1,35 \times 10^{10}$) oraz *sul1* ($3,10 \times 10^9$). Biorąc pod uwagę dostępne dane literaturowe (Spielmeyer 2018) < 5% up to 90% of the active ingredient were found to be excreted

by the treated organisms leading to antibiotic residues in animal waste. As manure is utilized as substrate in biogas plants, antibiotics can enter this process and might have an effect on biogas and methane yield. This crucial point was subject of several anaerobic digestion studies giving variable results from increased biogas production in only one case (+ 14%, uzyskane w niniejszych badaniach wyniki potwierdzają zależność pomiędzy występowaniem wysokich koncentracji tych genów w badanych próbkach obornika a ilością najpopularniej stosowanych w hodowli zwierząt antybiotyków, do których należą tetracykliny oraz sulfonamidy. Nie odnotowano w nich genów odpowiedzialnych za oporność na chinolony (*aac(6³)-Ib-cr*, *qepA*). Przedstawione na fig. 1 dane dotyczące koncentracji genów w próbkach obornika wskazują, że próbki BM były wolne od genów *tetM* oraz *mcr-1* w przeciwieństwie do próbek PM. Zarówno w próbkach PM, jak i BM najniższe liczebności stwierdzano w przypadku genu *aadA9* (PM: $1,95 \times 10^5$ copies g_{dm}^{-1} ; BM: $9,60 \times 10^3$ copies g_{dm}^{-1}) kodującego oporność na aminoglikozydy. Obserwując liczebności genów integrazy integronów klasy 1 i 2 w próbkach pochodzących z obornika, stwierdzić można, iż występują one w koncentracji zbliżonej do ARGs, które występowały w tych próbkach w największych ilościach. Istotnym rezultatem prowadzonych badań była detekcja wysokich liczebności genu *intI2* zbliżonych do koncentracji genu *intI1* lub nieznacznie je przewyższających. Podobne wyniki uzyskano wcześniej w badaniach własnych dotyczących obecności genów integrazy w ściekach po różnych etapach oczyszczania (Buta i in. 2019). Wysoka liczba kopii genu

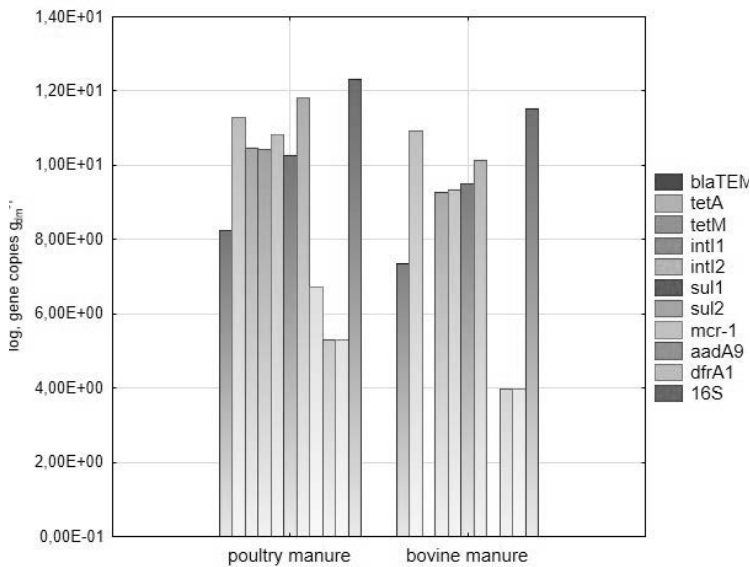


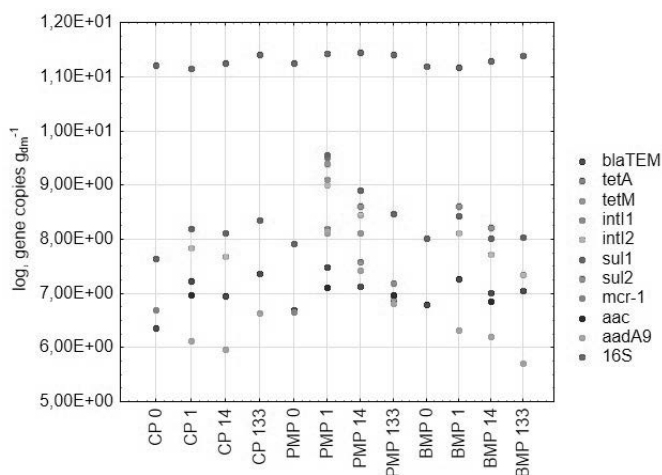
Fig. 1. Koncentracja odnotowanych genów (log gene copies/g_{dry mass}) w próbkach obornika drobiowego i bydlęcego

Źródło: opracowanie własne.

intI2 w próbkach obornika może być związana z wysoką liczebnością mikroorganizmów charakterystycznych dla zwierzęcych odchodów, ponieważ spośród wszystkich znanych klas integronów, to właśnie integrony klasy 2 pojawiają się najczęściej w genomie tej grupy drobnoustrojów (Uyaguari i in. 2013). Analiza kwantyfikacji metodą qPCR pozwoliła także na zaobserwowanie obecności genów *dfrA1* i *aadA9* warunkujących odpowiednio oporność na trimetoprim oraz aminoglikozydy. Istotę oznaczania tych genów stanowi fakt, iż są one powiązane z kasetami genowymi – mobilnymi elementami integronów (Suhartono i in. 2018) mobilization (mob). Detekcja ARGs z równoległym stwierdzeniem wysokich koncentracji genów integrazy w próbkach obornika potwierdza tezę, iż obornik pochodzenia zwierzęcego może stanowić pierwotne źródło ARGs w środowisku. Obecność w oborniku genów *aadA9*, *dfrA1* i *sul1*, które znane są w literaturze jako geny związane z integronami klasy 1, podkreśla dodatkowo mobilny charakter genów oporności na antybiotyki, co sprzyja szybkiemu rozprzestrzenianiu zjawiska lekooporności w środowisku.

3.1.2. Występowanie genów w próbkach gleby nawożonej i nienawożonej

Analizując próbki gleby pod kątem występowania genów integrazy oraz genów antybiotykoodporności, nie stwierdzono obecności genów *tetA*, *tetM*, *intI1* oraz *sul2* w gDNA wyizolowanym z próbek pochodzących z poletek kontrolnych (CP). W tych samych próbkach odnotowano jednak wysoką koncentrację genów *bla_{TEM}*, *sul1* oraz *aadA9*



CP – gleba kontrolna bez dodatku obornika, PMP – gleba z dodatkiem obornika drobiowego, BMP – gleba z dodatkiem obornika bydłowego. 0 – próbka przed suplementacją obornikiem, 1 – jeden dzień po suplementacji, 14 – czternaście dni po suplementacji, 133 – sto trzydzieści trzy dni po suplementacji

Fig. 2. Koncentracja odnotowanych genów (log gene copies/g_{dry mass}) w próbkach gleby

Źródło: opracowanie własne.

utrzymującą się w tych próbkach podczas całego okresu trwania eksperymentu poletkowego. W materiale genetycznym pochodzącym z próbek gleby z CP jednostkowo notowano także występowanie genów *intI2*, *mcr-1* oraz *aac(6')-Ib* (fig. 2).

Zważywszy na fakt, iż omawiane obecnie poletka CP nie były suplementowane przez cały okres prowadzenia badań, obecność wybranych genów oporności może świadczyć o prawdopodobnym odległym w czasie zanieczyszczeniu badanej gleby antybiotykami z grupy betalaktamów, sulfonamidów oraz aminoglikozydów. Pod uwagę można wziąć także migracje drobnoustrojów obarczonych genami antybiooporności pochodzącymi z poletek suplementowanych obornikiem w kierunku poletek kontrolnych wraz z wodą gruntową. Jednakże z uwagi na stwierdzenie występowania wybranych ARGs w gDNA pochodzącym z materiału glebowego CP przed suplementacją teoria ta wydaje się mało prawdopodobna. Na odległe w czasie zanieczyszczenie badanej gleby lekami przeciwdrobnoustrojowymi wskazują również wyniki dotyczące koncentracji genów w materiale glebowym pochodzącym z PMP oraz BMP. W próbkach tych zaobserwowano obecność genów *bla_{TEM}* (PMP: $5,04 \times 10^6$ copies g_{dm}^{-1} ; BMP: $6,15 \times 10^6$ copies g_{dm}^{-1}) oraz *sul1* (PMP: $8,36 \times 10^7$ copies g_{dm}^{-1} ; BMP: $1,07 \times 10^8$ copies g_{dm}^{-1}) jeszcze przed suplementacją gleby obornikiem. Wysoką liczebność genów oporności na sulfonamidy oraz β -laktamy w glebie obserwowano także w wielu badaniach prowadzonych przez innych autorów (Lin i in. 2019; Peng i in. 2017) the occurrence of 38 ARGs and the abundance of seven ARGs (tetL, tetB(P. Analiza ilościowa gDNA pochodzącego z poletek glebowych po suplementacji obornikiem drobiowym potwierdziła obecność również genów *tetM*, *intI1*, *intI2*, *sul2*, *mcr-1*, *aac(6')-Ib* oraz *aadA9*, których wysoka koncentracja bez-

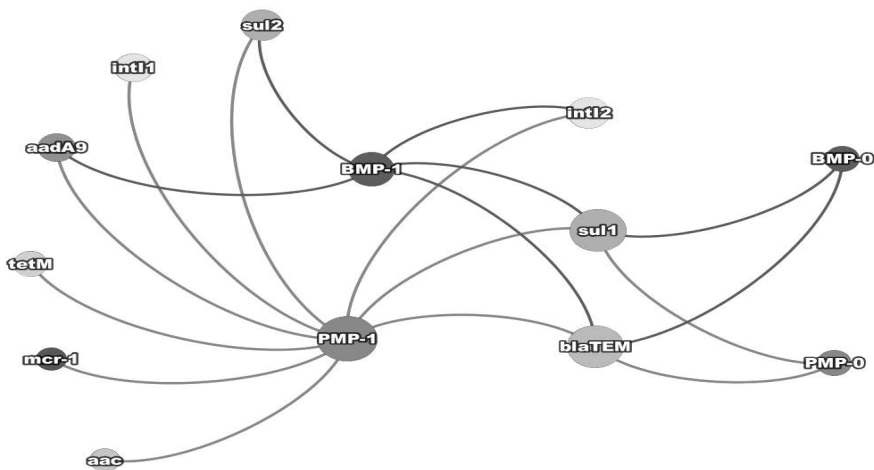


Fig. 3. Network analysis showing shared genes among soil samples before (0) and after the supplementation (1). PMP – soil plot supplemented with poultry manure, BMP – soil plot supplemented with bovine manure

Źródło: opracowanie własne.

pośrednio po suplementacji spadała nieznacznie w trakcie prowadzenia eksperymentu poletkowego. Podobną tendencję zaobserwowano w przypadku genów *intf12*, *sul2* oraz *aadA9* w próbkach po suplementacji obornikiem bydłowym. Na podstawie zestawienia obserwowanych genów w próbkach suplementowanych obornikiem (fig. 3) zauważyć można, które z nich związane są z poszczególnymi typami obornika oraz które są wszechobecne i związane mogą być z odległym w czasie zanieczyszczeniem antybiotykami.

Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej uzyskanych wyników badań stwierdzono występowanie istotnych statystycznie różnic w koncentracji genów *bla*_{TEM} i *sul1* pomiędzy próbkami sprzed suplementacji (dzień 0) oraz bezpośrednio po niej (dzień 1). Koncentracja genu *sul1* w przypadku próbek pochodzących z wybranych poletek wzrosła nawet o 2 rzędy wielkości. Istotne statystycznie różnice w koncentracji genów *intf11* oraz *aadA9* stwierdzano również w zależności od czasu poboru próbek i trwania eksperymentu (dzień 0, dzień 1, dzień 14). Zależności takich nie odnotowano w przypadku pozostałych genów badanych, których obecność stwierdzano w glebie. Nie stwierdzano istotnie statystycznych różnic pomiędzy liczbą kopii genów w próbkach gleby w zależności od rodzaju zastosowanego nawożenia poletek badawczych.

W próbkach gleby pochodzącej ze wszystkich suplementowanych poletek badawczych widać wyraźny sukcesywny wzrost koncentracji genu 16S rRNA wraz z kolejnymi etapami badań (fig. 2). Wskazuje to na regularny przyrost liczby drobnoustrojów. Bardzo prawdopodobnym jest, że wskazany przyrost liczby drobnoustrojów może wynikać z dużej ilości pierwiastków biogennych wprowadzonych do gleby wraz z obornikiem (Tyrrel i in. 2019). Koncentracja niemal wszystkich badanych ARGs wyraźnie wzrosła w próbkach bezpośrednio po suplementacji poletek (dzień 1), co świadczyć może o przenikaniu tych genów z obornika do środowiska glebowego, jak też o intensyfikacji zachodzenia procesu horyzontalnego transferu genów w tym ekosystemie. W próbkach gleby pochodzących z suplementowanych poletek często powtarza się także zależność dotycząca genów integrazy, która wskazuje na pojawianie się tych genów dopiero po suplementacji w ogromnych ilościach rzędu 10^6 – 10^9 copies g_{dm}^{-1} , które wraz z genami oporności na sulfonamidy charakteryzują się najwyższą koncentracją.

Podsumowanie i wnioski

Gleba nawożona obornikiem pochodzenia zwierzęcego staje się środowiskiem o silnej presji selekcyjnej, co wpływa na rearanżacje w genomie mikroorganizmów zachodzące w tym ekosystemie, skutkując nabywaniem ARGs przez rodzime drobnoustroje bytujące w tym środowisku. Wyniki badań przedstawiają transfer genów integrazy i ARGs z obornika zwierzęcego do środowiska glebowego. Stwierdzone dodatnie korelacje ARGs z genami integrazy wskazują na możliwości szybkiego rozprzestrzeniania w środowisku oporności na leki przeciwdrobnoustrojowe popularnie stosowane w we-

teryrii i medycynie. Pod znakiem zapytania stawia się zatem zdrowie ludzi i zwierząt związane ze spożywaniem upraw pochodzących z gleby bogatej w mikrozanieczyszczenia, które mogą być akumulowane przez te rośliny. Niebezpieczeństwo stanowią także doniesienia o przenikaniu ARGs do wód gruntowych z gleby nawożonej obornikiem zwierzęcym z uwagi na ich możliwy transfer do wód powierzchniowych i głębinowych.

Bibliografia

- Abella J., Fahy A., Duran R., Cagnon C. 2015. Integron diversity in bacterial communities of freshwater sediments at different contamination levels. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91, 1–11.
- Buta M., Hubeny J., Zieliński W., Korzeniewska E., Harnisz M., Nowrotek M., Płaza G. 2019. The occurrence of integrase genes in different stages of wastewater treatment. *J. Ecol. Eng.* 20, 39–45.
- Domingues S., Da Silva G.J., Nielsen K.M. 2015. Global dissemination patterns of common gene cassette arrays in class 1 integrons. *Microbiol. (United Kingdom)* 161, 1313–1337.
- Domínguez M., Miranda C.D., Fuentes O., De La Fuente M., Godoy F.A., Bello-Toledo H., González-Rocha G. 2019. Occurrence of transferable integrons and suland dfrgenes among sulfonamide-and/or trimethoprim-resistant bacteria isolated from chilean salmonid farms. *Front. Microbiol.* 10, 1–14.
- Escudero J.A., Loot C., Mazel D. 2018. Integrons as Adaptive Devices.
- Felden B., Cattoira V. 2018. Bacterial Adaptation to Antibiotics through Regulatory RNAs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62, 1–11.
- Frey S.K., Topp E., Ball B.R., Edwards M., Gottschall N., Sunohara M., Zoski E., Lapen D.R. 2013. Tile Drainage Management Influences on Surface-Water and Groundwater Quality following Liquid Manure Application. *J. Environ. Qual.* 42, 881–892.
- Frey S.K., Topp E., Khan I.U.H., Ball B.R., Edwards M., Gottschall N., Sunohara M., Lapen D.R. 2015. Quantitative *Campylobacter* spp., antibiotic resistance genes, and veterinary antibiotics in surface and ground water following manure application: Influence of tile drainage control. *Sci. Total Environ.* 532, 138–153.
- Gao F.Z., Zou H.Y., Wu D.L., Chen S., He L.Y., Zhang M., Bai H., Ying G.G. 2020. Swine farming elevated the proliferation of *Acinetobacter* with the prevalence of antibiotic resistance genes in the groundwater. *Environ. Int.* 136, 105484.
- Ghaly T.M., Geoghegan J.L., Alroy J., Gillings M.R. 2019. High diversity and rapid spatial turnover of integron gene cassettes in soil. *Environ. Microbiol.* 21, 1567–1574.
- Gillings M.R. 2014. Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 257–277.
- Gillings M.R., Holley M.P., Stokes H.W. 2009. Evidence for dynamic exchange of qac gene cassettes between class 1 integrons and other integrons in freshwater biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* 296, 282–288.
- Lin H., Chapman S.J., Freitag T.E., Kyle C., Ma J., Yang Y., Zhang Z. 2019. Fate of tetracycline and sulfonamide resistance genes in a grassland soil amended with different organic fertilizers. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 170, 39–46.
- McKinney C.W., Dungan R.S., Moore A., Leytem A.B. 2018. Occurrence and abundance of antibiotic resistance genes in agricultural soil receiving dairy manure. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94.
- Nebot C., Guarddon M., Seco F., Iglesias A., Miranda J.M., Franco C.M., Cepeda A. 2014. Monitoring the presence of residues of tetracyclines in baby food samples by HPLC-MS/MS. *Food Control* 46, 495–501.

- Nölvak H., Truu M., Kanger K., Tampere M., Espenberg M., Loit E., Raave H., Truu J. 2016. Inorganic and organic fertilizers impact the abundance and proportion of antibiotic resistance and integron-integrase genes in agricultural grassland soil. *Sci. Total Environ.* 562, 678–689.
- Peng S., Feng Y., Wang Y., Guo X., Chu H., Lin X. 2017. Prevalence of antibiotic resistance genes in soils after continually applied with different manure for 30 years. *J. Hazard. Mater.* 340, 16–25.
- Pikkemaat M.G., Yassin H., van der Fels-Klerx H.J., Berendsen B.J.A. 2016. Antibiotic Residues and Resistance in the Environment. RIKILT Rep. 2016.009. 32.
- Sharma V.K., Johnson N., Cizmas L., McDonald T.J., Kim H. 2016. A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Chemosphere* 150, 702–714.
- Spielmeier A. 2018. Occurrence and fate of antibiotics in manure during manure treatments: A short review. *Sustain. Chem. Pharm.* 9, 76–86.
- Suhartono S., Savin M.C., Gbur E.E. 2018. Transmissible Plasmids and Integrons Shift *Escherichia coli* Population Toward Larger Multiple Drug Resistance Numbers. *Microb. Drug Resist.* 24, 244–252.
- Tyrrell C., Burgess C.M., Brennan F.P., Walsh F. 2019. Antibiotic resistance in grass and soil. *Biochem. Soc. Trans.* 47, 477–486.
- Uyaguari M.I., Scott G.I., Norman R.S. 2013. Abundance of class 1-3 integrons in South Carolina estuarine ecosystems under high and low levels of anthropogenic influence. *Mar. Pollut. Bull.* 76, 77–84.
- Van den Meersche T., Rasschaert G., Haesebrouck F., Van Coillie E., Herman L., Van Weyenberg S., Daeseleire E., Heyndrickx M. 2019. Presence and fate of antibiotic residues, antibiotic resistance genes and zoonotic bacteria during biological swine manure treatment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 175, 29–38.

Abstract

EFFECT OF FERTILIZATION WITH ANIMAL MANURE ON THE OCCURRENCE OF ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES IN SOIL

Despite restrictions on the use of antimicrobial drugs in animal husbandry, the presence of antibiotics in farmed soils is still a problem in modern agriculture. Such substances in soil may have a direct effect on the increased spread of drug resistance in soil microbiota. This study determined the impact of poultry and bovine manure fertilisation on the quantitative and qualitative composition of integrase genes and antibiotic resistance genes (ARGs) in soil. Integrase genes and ARGs were quantified using Real-Time PCR (qPCR). A high abundance of integrase genes was noted in samples of manure (10^9 – 10^{10} copies $\text{g}_{\text{dm}}^{-1}$) and soil (10^7 – 10^8 copies $\text{g}_{\text{dm}}^{-1}$). Among all the analysed genes, *sul1*, *sul2*, *bla*_{TEM} and integrase genes were the most common. Moreover, the high abundance of integrase genes and ARGs and their mutual correlations pose a serious risk of the rapid spread of antibiotic resistance in the environment.

Keywords: antibiotic resistance genes, integrase genes, animal manure, soil

Słowa kluczowe: geny antybiotykooporności, geny integrazy, obornik zwierzęcy, gleba

Dane do kontaktu z autorem: martyna.but@uwm.edu.pl

Jakub Hubeny

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Naukowe Koło Mikrobiologów Molekularnych „Coccus”

WYSTĘPOWANIE GENÓW OPORNOŚCI NA ANTYBIOTYKI OSTATNIEJ SZANSY W OCZYSZCZALNI ŚCIEKÓW

1. Wstęp

Antybiotykooporność uznawana jest za jedno z najważniejszych wyzwań współczesnej medycyny i poważny problem zdrowia publicznego. Jest to niezwykle groźne zjawisko, które w konsekwencji uniemożliwia skuteczne leczenie zakażeń bakteryjnych i może być przyczyną zagrożeń epidemicznych oraz wysokiej śmiertelności (Pazda i in. 2019). W środowisku antybiotyki są nie tylko zanieczyszczeniami chemicznymi, które mogą wywierać działanie toksyczne, ale przede wszystkim są zdolne do wywoływania presji selekcyjnej. Zjawisko to polega na eliminacji mikroorganizmów (wrażliwych na antybiotyki) i przeżyciu komórek opornych, których cechy pozwalają im przezwyciężyć niekorzystne działanie antybiotyków (Birošová i in. 2014).

Ogólnoświatowy wzrost liczby bakterii opornych na antybiotyki jest uznawany przez Światową Organizację Zdrowia za poważne wyzwanie (World Health Organisation 2014). Aby zminimalizować przedostawanie się antybiotyków lub bakterii antybiotkoopornych do środowiska, należy ograniczyć stosowanie antybiotyków w medycynie i weterynarii (Hembach i in. 2017). Biorąc pod uwagę wyjątkowo powolny rozwój nowych klas antybiotyków, szczególnie w leczeniu zakażeń bakteriami Gram-ujemnymi, coraz częściej sięgamy po antybiotyki z grupy ostatniej szansy (Queenan i Bush 2007).

Kolistyna, należąca do antybiotyków ostatniej szansy, stała się jednym z najczęściej wybieranych antybiotyków w leczeniu zakażeń wyżej wspomnianych bakterii, samodzielnie lub w połączeniu z innymi lekami (Falagas i in. 2014). Oporność na kolistynę jest głównie warunkowana przez mutację genu związanego z produkcją lipopolisacharydu (LPS) (Thi Khanh Nhu i in. 2016). Jednakże określenie genu *mcr-1* warunkują-

cego oporność na kolistynę, zlokalizowanego w strukturze plazmidu, spowodowało skupienie większej uwagi na występowaniu tego genu na świecie (Skov, Monnet 2016).

Kolejnym antybiotykiem należącym do grupy ostatniej szansy jest fosfomycyna (IV) wykorzystywana najczęściej przy infekcjach układu moczowego powodowanych przez bakterie Gram-ujemne (Ito i in. 2017). U bakterii Gram-ujemnych, występujących najliczniej w ściekach, oporność na fosfomycynę może być powodowana posiadaniem genów z grupy *fosA* warunkujących ekspresję enzymu dezaktywującego ten antybiotyk (Falagas i in. 2016).

Zarówno ścieki komunalne, jak i ścieki szpitalne mogą zawierać geny oporności na takie antybiotyki ostatniej szansy. W przypadku, gdy ścieki nie są odpowiednio oczyszczane, przewiduje się, że bakterie niosące te geny przedostaną się do środowiska, zwiększając ryzyko przeniesienia ich z powrotem na ludzi (Rizzo i in. 2013).

Celem pracy było określenie występowania genów oporności na antybiotyki ostatniej szansy w ściekach komunalnych z oczyszczalni ścieków w województwie warmińsko-mazurskim oraz wodzie rzecznej stanowiącej odbiornik ścieków oczyszczonych.

2. Materiały i metody

2.1. Pobór próbek

Próbki ścieków, osadu ściekowego oraz wody rzecznej zostały uzyskane z oczyszczalni ścieków zlokalizowanej w województwie warmińsko-mazurskim z trzech sezonów: czerwiec (lato 2018), listopad (jesień 2018) oraz marzec (wiosna 2019). Ścieki oraz osad ściekowy zostały pobrane z kolejnych etapów procesu oczyszczania ścieków. Opis uzyskanych próbek znajduje się w tabeli 1.

Tabela 1. Szczegółowy opis pobranych próbek

Symbol	Próbka
WM1	Ścieki dopływające
WM2	Ścieki po osadniku wstępnym
WM3	Ścieki po komorze biologicznej
WM4	Ścieki po reaktorze wielofunkcyjnym
WM5	Ścieki oczyszczone
WM6	Woda rzeczna przed odpływem ścieków
WM7	Woda rzeczna po odpływie ścieków
WM8	Osad ściekowy po otwartym zbiorniku fermentacyjnym
WM9	Odwodniony osad ściekowy

Źródło: opracowanie własne.

Próbki ścieków zostały pobrane do sterylnych butelek o pojemności 500 ml (SI-MAX), natomiast osad ściekowy z użyciem sterylnych 100-mililitrowych plastikowych pojemników. Próbki ścieków i osadu ściekowego pobierano w trzech powtórzeniach. Aby uzyskać próbkę kompozytową ścieki pobierano przez jedną dobę co godzinę.

2.2. Izolacja DNA oraz proces sekwencjonowania

Metagenomiczne DNA z próbek ścieków oraz wody rzecznej uzyskano z wykorzystaniem zestawu Power Water Kit (MoBio Laboratories Inc., CA, USA), natomiast z osadu ściekowego – za pomocą Power Soil Kit (MoBio Laboratories Inc., CA, USA) zgodnie z dołączoną instrukcją producenta. Biblioteka Illumina TruSeq DNA PCR-Free została wykonana za pomocą protokołu producenta TruSeq DNA PCR-Free Sample Preparation Guide, Part #15036187 Rev. D (Illumina, San Diego, CA, USA).

2.3. Analiza bioinformatyczna

Do analizy metagenomicznej zostało wykorzystanych 27 próbek z trzech sezonów. Sekwencje Fastq wstępnie zostały przefiltrowane jakościowo z wykorzystaniem adapterów trzymających Trimmomatic v 0.39 (Bolger i in. 2014). Sparowane sekwencje były łączone przy użyciu PANDAseq (Masella i in. 2012). Następnie uzyskane sekwencje zostały poddane kontroli jakości z wykorzystaniem narzędzia fastx 0.0.14-5 (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) wraz z narzędziem fastq_quality_filter. Filtracja danych wykluczyła z analiz wszystkie odczyty, które nie osiągnęły minimum 80% wyniku jakości $q=20$. Przy użyciu narzędzia Seqtk (<https://github.com/lh3/seqtk>) pliki fastq zostały przekonwertowane do plików fasta.

Następnie sekwencje metagenomiczne przeanalizowano za pomocą wyszukiwania typu BLASTx względem bazy danych Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) (<https://card.mcmaster.ca>; październik 2019 3.0.7). Dane metagenomiczne zostały zdeponowane w bazie NCBI Sequence Read Archive (SRA) z numerem dostępu NCBI SRA SRP286056.

Do celów dalszych analiz wyniki otrzymane z próbek pobranych z trzech sezonów badawczych (lato, jesień 2018 oraz wiosna 2019) zostały uśrednione.

2.7. Opracowanie graficzne

Do przedstawienia frekwencji występowania badanych genów oporności w badanych próbach zastosowano oprogramowanie GraphPad Prism 8.4.3.

3. Wyniki

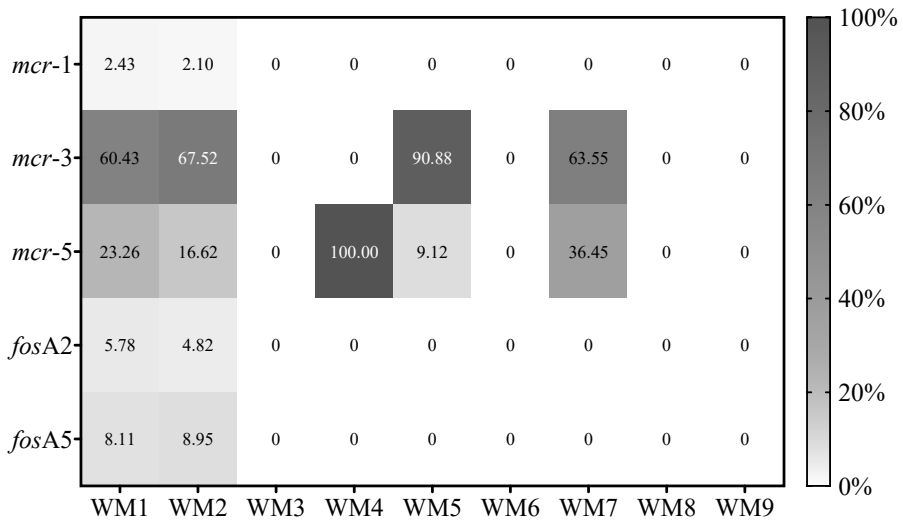
W badanych próbkach stwierdzono obecność genów warunkujących oporność na antybiotyki z grupy ostatniej szansy: trzy geny z grupy *mcr* (*mcr-1*, *mcr-3* oraz *mcr-5*) oraz dwa geny z grupy *fosA* (*fosA2* oraz *fosA5*). Wyniki stwierdzonej ilości kopii oraz procentowe występowanie badanych genów w oczyszczalni ścieków zostały przedstawione w tabeli 2 oraz na rycinie 1. Dominującymi genami były *mcr-3* oraz *mcr-5* występujące w zakresach: odpowiednio 0,24–6,53 oraz 0,11–2,31 kopii genów/1M odczytów. Pozostałe oznaczone geny antybiotykooporności występowały tylko w dwóch pierwszych próbkach (WM1 oraz WM2), charakteryzując się ilością w zakresach: 0,2–0,24, 0,47–0,57 oraz 0,81–0,87 kopii genów/1M odczytów, odpowiednio *mcr-1*, *fosA2* oraz *fosA5*. Nie oznaczono występowania żadnych z genów badanych w próbkach osadu ściekowego (tabela 2).

Tabela 2. Ilość badanych genów w próbkach z oczyszczalni ścieków (kopie genu/1M odczytów)

Gen		WM1	WM2	WM3	WM4	WM5	WM6	WM7	WM8	WM9
<i>mcr-1</i>	śr.	0.24	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	os	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>mcr-3</i>	śr.	6.00	6.53	0.00	0.00	1.10	0.00	0.24	0.00	0.00
	os	4.35	3.08	0.00	0.00	0.68	0.00	0.03	0.00	0.00
<i>mcr-5</i>	śr.	2.31	1.61	0.00	0.22	0.11	0.22	0.14	0.00	0.00
	os	1.39	1.54	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>fosA2</i>	śr.	0.57	0.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	os	0.30	0.24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>fosA5</i>	śr.	0.81	0.87	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	os	0.44	0.42	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Źródło: opracowanie własne.

Wartym uwagi wynikiem jest występowanie tylko dwóch genów *mcr-3* oraz *mcr-5* w ściekach po etapie oczyszczania z wykorzystaniem osadu czynnego (WM4) oraz w ściekach oczyszczonych (ryc. 1). Dodatkowo porównując próbki wody rzecznej, obserwujemy obecność genów oporności po odpływie ścieków oczyszczonych: geny *mcr-3* oraz *mcr-5* w stosunku 63,6%:36,5% (ryc. 1).



Rycina 1. Procentowe występowanie badanych genów oporności w oczyszczalni ścieków

Źródło: opracowanie własne.

4. Dyskusja

Pojawienie się i rozprzestrzenianie genów oporności na antybiotyki (ARGs) wśród bakterii patogennych i niepatogennych stanowi rosnące zagrożenie w ostatnich dziesięcioleciach. Jednym z najbardziej prawdopodobnych miejsc przenoszenia oporności są oczyszczalnie ścieków (WWTP), gdzie ścieki z różnych źródeł, w tym komunalnych, szpitalnych i przemysłowych, są mieszane i oczyszczane w wieloetapowym procesie oczyszczania. Ponieważ mikroorganizmy z różnych źródeł są w bliskim kontakcie podczas procesu oczyszczania, sugerowano, że oczyszczalnie ścieków są punktami zapalnymi dla pojawienia się i rozprzestrzeniania bakterii opornych na antybiotyki (Rizzo i in. 2013). Proces oczyszczania ścieków stwarza warunki, które mogą sprzyjać horizontalnemu transferowi genów przy wysokim zagęszczeniu bakterii, stresie wywołanym przez zanieczyszczenia, takie jak: metale ciężkie i antybiotyki, oraz biofilmy tworzące się podczas procesu oczyszczania (Karkman i in. 2018).

Infekcje powodowane przez drobnoustroje odporne na antybiotyki ostatniej szansy stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia pacjentów, dlatego występowanie w środowisku genów warunkujących oporność na te antybiotyki powinno być skrupulatnie monitorowane.

Obecnie opisano dziesięć typów genów z grupy *mcr* (Anyanwu i in. 2021) a last-line antibiotic used in treating deadly infections. For more than six decades, COL is used in livestock around the globe, including Africa. The use of critically important

antimicrobial agents, like COL, is largely unregulated in Africa, and many other factors militate against effective antimicrobial stewardship in the continent. Currently, ten *mcr* genes (*mcr-1* to *mcr-10* oraz sześć typów genów z grupy *fosA* (Ma i in. 2015). Obie grupy genów są związane z Gram-ujemnymi bakteriami a zwłaszcza z rodziną *Enterobacteriaceae* oraz występowaniem w strukturze plasmidu (Falagas i in. 2019). Li i in. (2017), charakteryzując strukturę plazmidów wyizolowanych z bakterii *Escherichia coli*, określili występowanie genu *mcr-1* razem z *fosA*.

Wyniki badań własnych wskazują na dominujące występowanie genów z grupy *mcr* względem genów z grupy *fosA*. Literatura wskazuje na częste występowanie genów *mcr* w ściekach (Hassen i in. 2021) integrons, and plasmid types, as well as the genetic relatedness of enterobacterial isolates in the wastewater treatment plant (WWTP. Ponadto Kneis i in. (2019) podkreślili występowanie genu *mcr-1* w niższych ilościach w porównaniu do wariantu *mcr-3*, występującego w dużo wyższej liczebności, co również potwierdzają wyniki przedstawione w badaniach własnych. Istnieje mało doniesień określających występowanie determinantów oporności na fosfomicynę w ściekach. Może się to wiązać z tym, że stosowanie tego antybiotyku nie jest tak rozpowszechnione w porównaniu do innych substancji bakteriobójczych, dlatego oporność na fosfomicynę nie była obserwowana w badaniach, w których nie uwzględniano użycia tego antybiotyku (Takahata i in. 2010).

5. Podsumowanie

Antybiotyki ostatniej szansy stanowią ostateczny ratunek przy leczeniu poważnych infekcji. Rozprzestrzeniające się w środowisku determinanty umożliwiające drobnoustrojom nabywanie oporności na leki bakteriobójcze stanowią istotny problem w sektorze medycznym. Oczyszczalnie ścieków, pomimo swojego przeznaczenia, mogą działać jako źródło wprowadzające geny oporności do środowiska naturalnego. Narastający problem oporności przybiera bardziej niebezpieczny wymiar, gdy weźmiemy pod uwagę rozprzestrzenianie się genów (takich jak *mcr* czy *fosA*) związanych bardzo mocno z mobilnymi elementami genetycznymi. Horyzontalny transfer genów może przyczynić się do bardziej dynamicznego rozprowadzania determinantów oporności wśród drobnoustrojów.

Bibliografia

- Anyanwu M.U., Okpala C.O.R., Chah K.F., Shoyinka V.S. 2021. Prevalence and Traits of Mobile Colistin Resistance Gene Harbouring Isolates from Different Ecosystems in Africa. *Biomed Res. Int.* 2021, 1–20.
- Birošová L., Mackulák T., Bodík I., Ryba J., Škubák J., Grabic R. 2014. Pilot study of seasonal occurrence and distribution of antibiotics and drug resistant bacteria in wastewater treatment plants in Slovakia. *Sci. Total Environ.* 490, 440–444.
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120.
- Falagas M.E., Athanasaki F., Voulgaris G.L., Triarides N.A., Vardakas K.Z. 2019. Resistance to fosfomycin: Mechanisms, Frequency and Clinical Consequences. *Int. J. Antimicrob. Agents* 53, 22–28.
- Falagas M.E., Lourida P., Poulidakos P., Rafailidis P.I., Tansarli G.S. 2014. Antibiotic Treatment of Infections Due to Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: Systematic Evaluation of the Available Evidence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 654–663.
- Falagas M.E., Vouloumanou E.K., Samonis G., Vardakas K.Z. 2016. Fosfomycin. *Clin. Microbiol. Rev.* 29, 321–347.
- Hassen B., Abbassi M.S., Ruiz-Ripa L., Mama O.M., Ibrahim C., Benlabidi S., Hassen A., Torres C., Hammami S. 2021. Genetic characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae from a biological industrial wastewater treatment plant in Tunisia with detection of the colistin-resistance *mcr-1* gene. *FEMS Microbiol. Ecol.* 97.
- Hembach N., Schmid F., Alexander J., Hiller C., Rogall E.T., Schwartz T. 2017. Occurrence of the *mcr-1* Colistin Resistance Gene and other Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in Microbial Populations at Different Municipal Wastewater Treatment Plants in Germany. *Front. Microbiol.* 8.
- Ito R., Mustapha M.M., Tomich A.D., Callaghan J.D., McElheny C.L., Mettus R.T., Shanks R.M.Q., Sluis-Cremer N., Doi Y. 2017. Widespread Fosfomycin Resistance in Gram-Negative Bacteria Attributable to the Chromosomal *fosA5* Gene. *MBio* 8.
- Karkman A., Do T.T., Walsh F., Virta M.P.J. 2018. Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. *Trends Microbiol.* 26, 220–228.
- Kneis D., Berendonk T.U., Heß S. 2019. High prevalence of colistin resistance genes in German municipal wastewater. *Sci. Total Environ.* 694, 133454.
- Genetic characterization of *mcr-1*-bearing plasmids to depict molecular mechanisms underlying dissemination of the colistin resistance determinant. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 393–401.
- Ma Y., Xu X., Guo Q., Wang P., Wang W., Wang M. 2015. Characterization of *fosA5*, a new plasmid-mediated fosfomycin resistance gene in *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 60, 259–264.
- Masella A.P., Bartram A.K., Truszkowski J.M., Brown D.G., Neufeld J.D. 2012. PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. *BMC Bioinformatics* 13, 31.
- Olaitan A.O., Morand S., Rolain J.-M. 2014. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front. Microbiol.* 5.
- Pazda M., Kumirska J., Stepnowski P., Mulkiewicz E. 2019. Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems – A review. *Sci. Total Environ.* 697, 134023.
- Queenan A.M., Bush K. 2007. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 440–458.

- Rizzo L., Manaia C., Merlin C., Schwartz T., Dagot C., Ploy M.C., Michael I., Fatta-Kassinos D. 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Sci. Total Environ.* 447, 345–360.
- Skov R.L., Monnet D.L. 2016. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): Three months later, the story unfolds. *Eurosurveillance* 21.
- Takahata S., Ida T., Hiraishi T., Sakakibara S., Maebashi K., Terada S., Muratani T., Matsumoto T., Nakahama C., Tomono K. 2010. Molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35, 333–337.
- Thi Khanh Nhu N., Riordan D.W., Do Hoang Nhu T., Thanh D.P., Thwaites G., Huong Lan N.P., Wren B.W., Baker S., Stabler R.A. 2016. The induction and identification of novel Colistin resistance mutations in *Acinetobacter baumannii* and their implications. *Sci. Rep.* 6, 28291.
- World Health Organisation 2014. Antimicrobial resistance global report on surveillance : 2014 summary WHO/HSE/PED/AIP/2014.2. World Heal. Organ. 1–8.

Abstract

THE OCCURRENCE OF GENES OF RESISTANCE ON LAST-RESORT ANTIBIOTICS IN WASTEWATER TREATMENT PLANT

High consumption of antibiotics is recorded worldwide. The antibiotics delivered to the human body are metabolised and excreted into wastewater. Wastewater is a pathway for the spread of both antibiotics and antibiotic-resistant bacteria and becomes an incubator for the genetic exchange of antibiotic resistance genes, including those responsible for resistance to antibiotics of last-resort. According to the World Health Organisation, this group includes 22 antibiotics, including colistin, fosfomycin (IV) or aztreonam. The aim of this study was to determine the occurrence of resistance genes to last-resort antibiotics in municipal wastewater from wastewater treatment plants in the Warmia and Mazury region and in river water receiving treated wastewater. The study used Illumina deep sequencing to identify *mcr-1*, *mcr-3*, *mcr-5*, *fosA2* and *fosA5* genes in samples of wastewater, sewage sludge and river water.

The genes studied were present in the highest amounts only in the initial stages of treatment (mechanical methods). *FosA2* and *fosA5* genes were present only in the first two stages of mechanical treatment. Metagenomic analysis showed a low frequency of the *mcr-1* gene, in contrast to other *mcr* gene variants such as *mcr-3* and *mcr-5*. It is worth noting that the study recorded the appearance of *mcr-3* and *mcr-5* genes in river water after discharge of treated sewage. The results obtained confirm the importance of treatment systems in the spread of antibiotic resistance genes in the environment, especially genes that determine resistance to drugs of last resort.

The presented research was funded by a grant from the National Science Centre (2017/M/NZ9/00071).

Słowa kluczowe: antybiotykooporność, antybiotyki ostatniej szansy, oczyszczalnia ścieków, geny antybiotykooporności

Keywords: antibiotic resistance, last resort antibiotics, wastewater treatment plant, antibiotic resistance genes

Olga Katarzyna Sierawska, Monika Agnieszka Wysokińska

Uniwersytet Szczeciński, Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych

Neutrofil – Studenckie Koło Naukowe Immunobiologii Chorób Zakaźnych
i Nowotworowych

Opiekun: dr hab. Paulina Niedźwiedzka-Rystwej, prof. US

EKSPRESJA GENÓW KODUJĄCYCH A-DEFENSYNĘ NP-5 (KORTYKOSTATYNA-6) W WĄTROBIE KRÓLIKÓW (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*)

Wstęp

Peptydy antydrobnoustrojowe (ang. *antimicrobial peptides*, AMP) to krótkie sekwencje aminokwasowe odpowiedzialne za podstawową ochronę przeciwko szerokiemu zakresowi patogenów (Raheem i in. 2019). Są to dobrze zachowane ewolucyjnie małe molekuly reprezentujące system odporności wrodzonej u roślin, bezkręgowców i kręgowców (Zhang i in. 2019; Kunda 2020). Pomimo rozwoju odporności adaptacyjnej, ssaki wytwarzają wiele klas AMP będących kluczowymi elementami naturalnej odpowiedzi immunologicznej (Holly i in. 2017). Ich cechy wspólne to łańcuchy bogate w argininę i lizynę, ładunek dodatni od +2 do +9 w neutralnym pH, rozmiar od 1 do 10 kDa czy obecność od 12 do 50 L-aminokwasów (Tornesello i in. 2020). U strukturalnych podstaw tej klasy peptydów leży zdolność przyjmowania kształtu amfipatycznego (Diamond i in. 2009). Wraz z ich kationową naturą pozwala im to na wiązanie się z negatywnie naładowanymi błonami bakterii i wchodzenie w interakcje z wieloma różnymi komponentami hydrofilowymi i hydrofobowymi. AMP zostały podzielone na cztery klasy pod względem ich struktury (α -helikalne, β -harmonijki, nieustrukturyzowane, cykliczne; Tornesello i in. 2020).

Defensyny tworzą jedną z klas AMP. Są to kationowe (ładunek od +2 do +11), amfipatyczne białka (18–45 aminokwasów) tworzące struktury III-rzędowe składające się głównie z β -harmonijek stabilizowanych mostkami disiarczkowymi. Poza swoim działaniem przeciwbakteryjnym, przeciwgrzybiczym i przeciwwirusowym, niektóre defensyny są zdolne do promowania dojrzewania komórek dendrytycz-

nych i spermatocytów, indukowania wydzielania cytokin chlorkowych i prozapalnych oraz chemicznego przyciągania komórek immunologicznych i zapalnych (Patil i in. 2004). Biorąc pod uwagę ich budowę u kręgowców wyróżnia się defensyny α , β i θ (Holly i in. 2017).

Dowodzono, że α -defensyny są aktywne zarówno przeciw bakteriom (Gram-dodatnim i Gram-ujemnym), wirusom, jak i grzybom. Peptydy te odpowiadają również za zachowanie równowagi między limfocytami T regulatorowymi i pomocniczymi (Salzmann i in. 2009; Żyłowska i in. 2011). Zbudowane z reszt kationowych i hydrofobowych α -defensyny są zdolne do przerywania błon komórkowych drobnoustrojów patogennych. Dodatkowo, neutralizacja bakterii Gram-dodatnich (np. *Staphylococcus aureus*) odbywa się poprzez izolowanie lipidu II będącego prekursorem ścian komórkowych bakterii, co prowadzi do inhibicji jej syntezy (Zhao i in. 2014). W przeciwieństwie do większości konwencjonalnych antybiotyków, które zabijają drobnoustroje przez określone mechanizmy biochemiczne; inicjowanie interakcji elektrostatycznych z fosfolipidami błon bakterii sprawia, że defensyny mają szerokie spektrum działania antydnoustrojowego przeciwko szczepom odpornym na antybiotyki. To specyficzne działanie defensyn, które redukuje ryzyko rozwinięcia oporności stanowi podstawę badań pod kątem użyteczności tych peptydów w walce z patogenami antybiotykkoopornymi (Patil i in. 2004).

Najszerzej opisaną aktywnością defensyn jest ich aktywność antibakteryjna, jednak działanie przeciwwirusowe również odgrywa istotną rolę w zapewnianiu odporności organizmu. Defensyny działają na wirusy poprzez procesy metaboliczne indukujące apoptozę komórek zakażonych, co pozwala na zahamowanie replikacji cząstek wirusa, np. wirusa HIV (Niedźwiedzka-Rystwej i in. 2013; Deptuła i in. 2019)

Defensyny występujące u królików należą do grupy α -defensyn i są to odpowiednio defensyny NP-1, NP-2, NP-3 α , NP-3 β , NP-4 i NP-5 (Selsted i in. 1985) oraz kryptodyna-3 i -4 (Tunzi i in. 2000). Defensyna NP-5 (kortykostatyna-6) jest białkiem zbudowanym z 33 reszt aminokwasowych, które wzmacnia właściwości bakteriobójcze defensyny NP-1 oraz działa antibakteryjnie na drobnoustroje takie jak *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* czy *Pseudomonas aeruginosa* (Rossen i in. 2004). Jej obecność została potwierdzona u królików m.in. w szpiku kostnym, śledzionie i grasicy (Sadro i in. 1993).

Cel pracy

Celem pracy była weryfikacja hipotezy badawczej mówiącej, że ekspresja genu α -defensyny NP-5 (kortykostatyna-6) zachodzi w wątrobie królika (*Oryctolagus cuniculus*).

Material i metody

Badania przeprowadzono na próbkach wątroby pobranych od królików ($n=3$), mieszańców polskich (*Oryctolagus cuniculus*). Zwierzęta charakteryzowały się dobrym stanem zdrowia oraz nie wykazywały żadnych objawów chorobowych. Badania przeprowadzono za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu (nr licencji 1/2009).

RNA wyizolowano z fragmentów wątroby za pomocą komercyjnego zestawu do izolacji RNA z tkanek zwierzęcych (ExtractMe® Total RNA Kit, BLIRT S.A. Polska) i przeprowadzono odwrotną transkrypcję (synteza komplementarnego DNA; cDNA) przy użyciu komercyjnego zestawu Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Basel, Szwajcaria). Mieszaniny reakcyjne wykonano zgodnie z protokołem producenta. Skład mieszanin reakcyjnych wchodziło 5 μ l poszczególnych izolatów mRNA, 7 μ l wody sterylnej oraz 1 μ l Anchored-oligo(dT)18 Primer. Tak przygotowane próby wirowano i inkubowano w termocyklerze firmy Eppendorf w temperaturze 65°C przez 10 min, po czym schłodzono je do temperatury -3°C zgodnie z protokołem producenta. Następnie do każdej próby dodano: 4 μ l Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5x conc., 0,5 μ l Protector RNase Inhibitor, 2 μ l Deoxynucleotide Mix, 0,5 μ l Transcriptor Reverse Transcriptase. Próby zwirowano i inkubowano w termocyklerze firmy Eppendorf w temperaturze 55°C przez 30 min, a następnie w temperaturze 85°C przez 5 min w celu inaktywacji enzymu.

Otrzymane w ten sposób cDNA poddano badaniom jakościowym z zastosowaniem techniki Real-Time PCR (RT-PCR). Metoda RT-PCR jest modyfikacją klasycznej reakcji PCR, w której stosuje się barwnik fluorescencyjny. Umożliwia to analizę logarytmicznego wzrostu produktu PCR na podstawie ilościowego pomiaru wzbudzonej fluorescencji w czasie rzeczywistym. Metoda ta umożliwia wykrycie nawet niewielkich ilości amplitfikowanego produktu, co jest czasami problematyczne bądź wręcz niemożliwe do uzyskania klasyczną metodą PCR (Bębnowska i in. 2021). W skład mieszaniny reakcyjnej wchodził komercyjny zestaw LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche, Szwajcaria), specyficzne startery (NP-5F 5'-AGGCAGGCGTGTCTGTACT-3'; NP-5R 3'-GGTCTCCACGCAAATAAGGA-5'; Guo i in. 2017) oraz 2 μ l uzyskanych poszczególnych cDNA. Przygotowano również próby kontrolne, w których matrycę

Tabela 1. Profil temperaturowo-czasowy reakcji RT-PCR

Etap	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95 °C	10 min	1
Denaturacja	95 °C	10 s	45
Przylączenie starterów	53 °C	10 s	
Elongacja	72 °C	7 s	

cDNA zastąpiono sterylną wodą. Wszystkie reakcje PCR przygotowano w trzech powtórzeniach i amplifikowano w termocyklerze LightCycler® 1.5 (Roche, Szwajcaria) w zoptymalizowanych warunkach termicznych (Tabela 1).

Natomiast warunki termiczne krzywej topnienia (T_m ; ang. *temperature melting*) zamplifikowanych fragmentów genu α -defensyny NP-5 (kortykostatyna-6) zostały przedstawione w Tabeli 2.

Tabela 2. Warunki termiczne krzywej topnienia

Etap	Temperatura	Czas
Denaturacja	95 °C	5 s
Przylączenie starterów	65 °C	15 s
Topnienie	95 °C	5 s
Chłodzenie	40 °C	30 s

Uzyskane podczas amplifikacji zmiany fluorescencji w poszczególnych próbach uzyskanych z wątrób króliczych analizowano pod kątem obecności fragmentów genu α -defensyny NP-5 (kortykostatyna-6) oraz specyficzności reakcji PCR (krzywa topnienia).

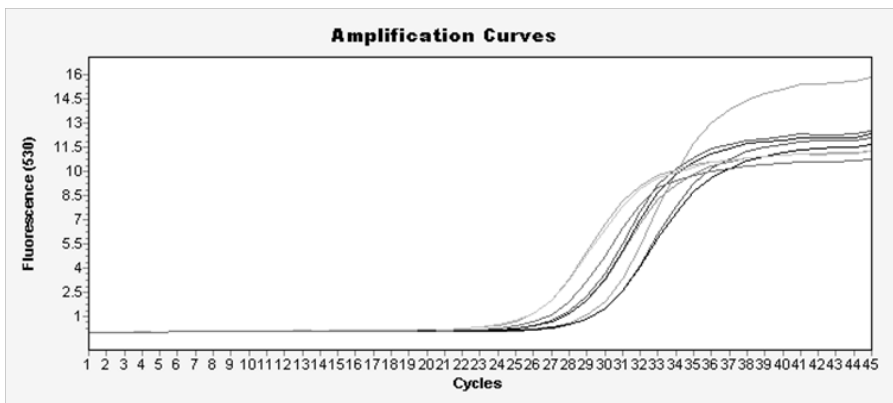
Wyniki badań

Stwierdzony w poszczególnych próbach badanych wzrost wartości fluorescencji wskazuje na prawidłowy i pozytywny wynik przeprowadzonej reakcji jakościowej RT-PCR (Tabela 3, Rycina 1), w której otrzymano spodziewany produkt amplifikacji o długości

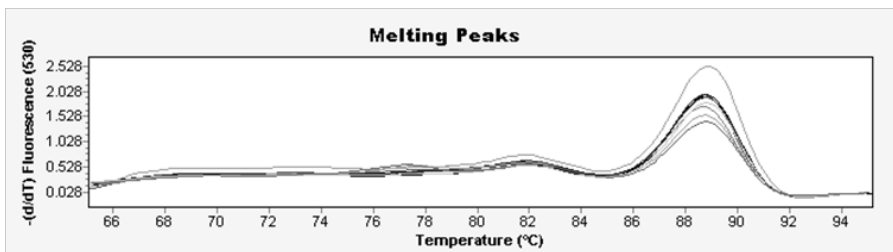
Tabela 3. Wartości T_m i CT dla króliczej α -defensyny NP-5 (kortykostatyna-6)

Próba	Powtórzenie	Wynik	T_m (°C)	Średnia T_m (°C)	CT	Średnia CT
#1	1	+	88,21	88,23	27,56	27,94
	2	+	88,24		28,02	
	3	+	88,25		28,23	
#2	1	+	88,30	88,31	26,56	26,55
	2	+	88,30		26,60	
	3	+	88,32		26,49	
#3	1	+	88,39	88,37	24,73	24,82
	2	+	88,36		24,82	
	3	+	88,35		24,92	

152 pz. Na podstawie uzyskanych wartości CT, wskazujących cykl reakcji, w którym poziom emitowanej fluorescencji wszedł w fazę logarytmicznego wzrostu, stwierdzono, że dla próby oznaczonej jako „#1” średnia wartość CT wyniosła 27,94, dla próby „#2” 26,55, natomiast dla próby „#3” 24,82. Specyficzność otrzymanych produktów amplifikacji fragmentu genu króliczej α -defensyny NP-5 (kortykostatyna-6) określono na podstawie temperatur topnienia dla poszczególnych prób (Tabela 3, Rycina 2). Uzyskane wartości T_m dla poszczególnych prób badanych były bardzo zbliżone i mieściły się w przedziale od 88,23°C do 88,37°C (Rycina 1 Tabela 3), co wskazuje że uzyskane produkty PCR są podobne i reprezentują fragment genu króliczej α -defensyny NP-5 (kortykostatyna-6). Poza tym, bardzo zbliżone wartości T_m dla wszystkich prób jednoznacznie potwierdzają specyficzność amplifikacji uzyskanych produktów PCR.



Rycina 1. Krzywe amplifikacji metodą RT-PCR fragmentów genu króliczej α -defensyny NP-5 (kortykostatyna-6)



Rycina 2. Krzywe topnienia dla króliczej α -defensyny NP-5 (kortykostatyna-6) u *Oryctolagus cuniculus*

Dyskusja

Celem niniejszej pracy była weryfikacja hipotezy badawczej mówiącej, że ekspresja genu α -defensyny NP-5 (kortykostatyna-6) zachodzi w wątrobie królika (*Oryctolagus cuniculus*). Procedury opisane w poprzednich rozdziałach pozwoliły na uzyskanie wyników potwierdzających powyższą hipotezę. Wykazano, że ekspresja α -defensyny NP-5 zachodzi w wątrobie królików. Podobne wyniki uzyskano u innych gatunków ssaków w komórkach wielu narządów wewnętrznych. U królików (*Oryctolagus cuniculus*) obecność defensyn wykazano m.in. w otrzewnej, płucach oraz łożach (Selsted i in. 1993, 1985; Zhou i in. 2007). W przypadku króliczej α -defensyny NP-5 (kortykostatyny-6), jej wysoki poziom ekspresji stwierdzono w szpiku kostnym, niższy był w śledzionie, a najniższy w grasicy (Sadro i in. 1993).

AMP stanowią pierwszą linię obrony organizmu przed patogenami. Pierwszym sklasyfikowanym jako AMP białkiem był lizozym, odkryty w 1922 r. przez Alexandra Fleminga w białku jaja kurzego (Tornesello i in. 2020). U ssaków natomiast, jako pierwsze wyizolowane zostały leukiny oraz fagocytyny. Miało to miejsce w 1956 r., a materiałem badawczym były królicze leukocyty (Hirsch 1956). Następnie doszło do wyizolowania trzech peptydów z ludzkich neutrofilów, określonych mianem defensyn. Były to odpowiednio HNP-1, HNP-2 i HNP-3 (ang. *Human Neutrophil Peptide*; Ganz i in. 1985). Zaobserwowano, że poza aktywnością przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą i przeciw-wirusową, ludzkie defensyny wykazują także aktywność przeciwnowotworową, m.in. przeciw komórkom mieloidowej ludzkiej białaczki pro-monocytovej czy komórkom erytroleukemii (Szyk i in. 2006). Co więcej, podwyższone poziomy HNP-1 prowadzą do indukcji apoptozy komórek guzów nowotworowych. Odbyna się to na dwa sposoby: na drodze cytoplazmatycznej lub mitochondrialnej. W pierwszym przypadku dochodzi do zaangażowania receptora śmierci komórek Fas, należącego do nadrodziny receptorów TNF (ang. *Tumor Necrosis Factor*). Natomiast na drodze mitochondrialnej mamy do czynienia z uwalnianiem przez te organella cząsteczek cytochromu c i aktywację odpowiednich szlaków sygnałowych śmierci komórki (Tornesello i in. 2020).

Jak do tej pory, najlepiej poznanym mechanizmem działania AMP jest ich zdolność do neutralizacji mikroorganizmów. Na poziomie molekularnym najprawdopodobniej odbywa się to na zasadzie destrukcji błony komórkowej poprzez zewnątrzkomórkowe oddziaływanie peptydów zależne od specyficznych sekwencji aminokwasów, ich struktury, ładunku, amfipatyczności oraz składu błony lub poprzez interferencję białek w szlaki wewnątrzkomórkowe, co wiąże się z ich wiązaniem/internalizacją z nienaruszonymi błonami (Baxter i in. 2017).

Interakcje białek AMP z błonami komórkowymi mikroorganizmów były badane z wykorzystaniem krystalografii rentgenowskiej, magnetycznego rezonansu jądrowego, powierzchniowego rezonansu plazmonowego oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (Ebenhan i in. 2014).

Defensyny wykazują się wysokim stopniem aktywności oraz wielostopniowym mechanizmem działania. Wśród mechanizmów aktywizacji układu odpornościowego wyróżnia się m.in. zwiększanie chemotaksji monocytów, makrofagów, limfocytów T, niedojrzałych komórek dendrytycznych oraz mastocytów. Związane jest to z charakterystyczną budową defensyn. Białka te potrafią także regulować aktywność komórek odpornościowych wykorzystując różne receptory np. Toll-podobne, TLR (ang. *Toll-Like Receptor*). Natomiast jelitowe i mieloidalne α -defensyny funkcjonują prawdopodobnie poprzez wspólny receptor, sprzężony z białkami G. Poza bezpośrednim odgrywaniem roli chemokin, defensyny zmieniają także ekspresję klasycznych cytokin i chemokin (Niedźwiedzka-Rystwej i in. 2008; Holly i in. 2017). Defensyny mogą także promować procesy zapalne i oddziaływać stymulująco na adaptacyjne odpowiedzi układu immunologicznego. Jest to związane z efektywnym łączeniem odporności wrodzonej i nabytej. Odbywa się to głównie poprzez stymulację migracji komórek odpornościowych, promowanie uwalniania cytokin prozapalnych oraz pobudzanie wytwarzania komórek prezentujących antygen, APC (ang. *Antigen-Presenting Cells*) (Suarez-Carmona i in. 2015)

Technika RT-PCR jest metodą szeroko stosowaną w badaniach naukowych i medycynie, np. do diagnostyki zakażeń bakteryjnych i wirusowych. Ze względu na swoje liczne odmiany i modyfikacje pozwala na przeprowadzanie wielokierunkowych badań na dużą skalę. Jednakże, jak każda metoda, oprócz zalet ma również wady i ograniczenia. Jest to metoda wymagająca specjalistycznego sprzętu i odczynników, co znacząco wpływa na podniesienie kosztów jej stosowania. Należy również zwrócić uwagę na sam proces przygotowania prób, który może sprawiać pewne problemy. Ze względu na wysoką czułość metody, nietrudno jest o uzyskanie fałszywie pozytywnych wyników, spowodowanych m.in. z winy eksperymentatora. Co więcej, logarytmiczne zwiększenie ilości produktu wraz ze wzrastającą liczbą cykli mogą zaburzać odczyt wyników, co może być także związane z nakładaniem się na siebie widm fluorescencji (Klein 2002). Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, iż mimo trudności i ograniczeń, technika RT-PCR jest narzędziem diagnostycznym o wystarczającej czułości i możliwościach detekcyjnych. Pozwala to na zastosowanie jej z powodzeniem do wykrywania ekspresji genów kodujących peptydy antydrobnoustrojowe, w tym przypadku króliczej α -defensyny NP-5 (kortykostatyna-6).

Podsumowanie

Wykrycie genu kodującego α -defensynę NP-5 (kortykostatyna-6) w wątrobie zdrowego królika (*Oryctolagus cuniculus*) wskazuje na udział α -defensyny w procesach odporności lokalnej zachodzących w tym narządzie. Przedstawione wyniki wskazują na stosunkowo wysoki poziom ekspresji α -defensyny u poszczególnych osobników. Ze

względu na to, że białka należące do klasy AMP stanowią pierwszą linię obrony przed patogenami, należy przypuszczać, że w przypadku osobników chorych poziom ekspresji α -defensyny będzie zdecydowanie wyższy w stosunku do osobników zdrowych. Jednakże udział tych białek w procesach odpornościowych zachodzących w wątrobie królików zdrowych i chorych wymaga dalszych badań.

Literatura

- Baxter A.A., Lay F.T., Poon I.K.H., Kvensakul M., Hulett M.D. 2017. Tumor cell membrane-targeting cationic antimicrobial peptides: Novel insights into mechanisms of action and therapeutic prospects. *Cell. Mol. Life Sci.*, 74: 3809-3825.
- Bębnowska D., Hrynkiewicz R., Niedźwiedzka-Rystwej P. 2021. Real-Time PCR Confirms Infection with Lagovirus europaeus. *Applied Sci.*, 11(2): 656.
- Deptuła, J. Tokarz-Deptuła B., Deptuła W. 2019. Defensyny u ludzi i zwierząt. *Postępy High Med. Dosw.*, 73: 152-158.
- Diamond G., Beckloff N., Weinberg A., Kisich K.O. 2009. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr. Pharm. Des.*, 15(21): 2377-2392.
- Ebenhan T., Gheysens O., Kruger H.G., Zeevaart J.R., Sathekge M.M. 2014. Antimicrobial peptides: Their role as infection-selective tracers for molecular imaging. *BioMed Res. Int.*, 867381.
- Ganz T., Selsted M.E., Szklarek D., Harwig S.S., Daher K., Bainton D.F., Lehrer R.I. 1985. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Investig.*, 76: 1427-1435.
- Guo M., Wu F., Hao G., Qi Q., Li R., Li N., Wei L., Chai T. 2017. *Bacillus subtilis* Improves Immunity and Disease Resistance in Rabbits. *Front. Immunol.*, 8: 354.
- Hirsch J.G. 1956. Phagocytin: A bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.*, 103: 589-611.
- Holly M.K., Diaz K., Smith J.G. 2017. Defensins in Viral Infection and Pathogenesis. *Annu. Rev. Virol.*, 4(1): 369-391.
- Klein D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations. *Trends Mol. Med.*, 8: 257-260.
- Kunda N.K. 2020. Antimicrobial peptides as novel therapeutics for non-small cell lung cancer. *Drug Discov. Today*, 25: 238-247.
- Niedźwiedzka-Rystwej P., Deptuła W. 2008. Defensyny – ważny wrodzony element układu odpornościowego u ssaków. *Postępy Hig Med. Dosw.*, 62: 524-529.
- Patil A., Hughes A.L., Zhang G. 2004. Rapid evolution and diversification of mammalian α -defensins as revealed by comparative analysis of rodent and primate genes. *Physiol. Genomics*, 20: 1-11.
- Raheem N., Straus S.K. 2019. Mechanisms of action for antimicrobial peptides with antibacterial and antibiofilm functions. *Front. Microbiol.*, 10: 2866.
- Roosen S., Exner K., Paul S., Schröder J.M., Kalm E., Looft C. 2004. Bovine β -defensins: identification and characterization of novel bovine β -defensin genes and their expression in mammary gland tissue. *Mamm. Genome*, 15: 834-842.
- Sadro L.C., Tremblay A., Solomon S., Palfree R.G.E. 1993. Differential expression of corticosteroids/defensins: higher levels of CS-4 (NP-2) transcripts compared with CS-6 (NP-5) in rabbit lung. *Biochemical and biophysical research communications*. 190(3): 1009-1016.

- Salzman N.H., Hung K., Haribhai D., Chu H., Karlsson-Sjöber J., Amir E., Tegatz P., Barman, M., Hayward M., Eastwood D., Stoel M., Zhou Y., Sodergren E., Weinstock G.M., Bevins C.L., Williams C.B., Bos N.A. 2009. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat. Immunol.*, 11: 76-83.
- Selsted M.E., Brown D.M., DeLange R.J., Lehrer R.I. 1983. Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. *J. Biol. Chem.*, 258(23): 14485-14489.
- Selsted M.E., Brown D.M., DeLange R.J., Harwig S.S., Lehrer R.I. 1985. Primary structures of six antimicrobial peptides of rabbit peritoneal neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 260(8): 4579-4584.
- Suarez-Carmona M., Hubert P., Delvenne P., Herfs M. 2015. Defensins: „Simple” antimicrobial peptides or broad-spectrum molecules? *Cytokine Growth Factor Rev.*, 26(3): 361-370.
- Szyk A., Wu Z., Tucker K., Yang D., Lu W., Lubkowski J. 2006. Crystal structures of human alpha-defensins hnp4, hd5, and hd6. *Protein Sci.*, 15: 2749-2760.
- Tornesello A.L., Borrelli A., Buonaguro L., Buonaguro F.M., Tornesello M.L. 2020. Antimicrobial Peptides as Anticancer Agents: Functional Properties and Biological Activities. *Molecules*, 25(12): 2850.
- Tunzi C.R., Harper P.A., Bar-Oz B., Valore E.V., Semple J.L., Watson-MacDonell J., Ganz T., Ito S. 2000. Beta-defensin expression in human mammary gland epithelia. *Pediatr. Res.*, 48: 30-35.
- Zhang C., Yang M., Ericsson A.C. 2019. Antimicrobial peptides: Potential application in liver cancer. *Front. Microbiol.*, 10: 1257.
- Zhao L., Lu W. 2014. Defensins in innate immunity. *Curr. Opin. Hematol.*, 21(1): 37-42.
- Zhou L., Beuerman R.W., Huang L., Barathi A., Foo Y.H., Li S.F., Chew F.T., Tan D. 2007. Proteomic analysis of rabbit tear fluid: Defensin levels after an experimental corneal wound are correlated to wound closure. *Proteomics*, 7(17): 3194-3206.
- Żyłowska M., Wyszynska A., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2011. Defensyny - Peptydy o aktywności przeciwbakteryjnej. *Post. Mikrobiol.*, 50 (3): 223-234.

Abstract

EXPRESSION OF GENES CODING A-DEFENSIN NP-5 (CORTICOSTATIN-6) IN LIVER OF RABBITS (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*)

This work presents the results of research on α -defensin NP-5 (corticostatin-6) occurring in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). So far, the occurrence of a rabbit α -defensin NP-5 (corticostatin-6) in bone marrow, spleen, thymus, peritoneum and tears has been described, but no data on the liver was found. The aim of the research was to confirm the expression of genes coding α -defensin NP-5 (corticostatin-6) in the liver. The research was carried out on samples taken from specimens in good health and showed no disease symptoms. RNA was isolated and cDNA was synthesized from it followed by qualitative RT-PCR analysis on a LightCycler® 1.5 instrument with the use of specific primers and LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche, Basel, Switzerland). An increase in fluorescence was observed during the reaction which meant that the results were positive. Rabbit α -defensin NP-5 (corticostatin-6) gene expression is present in the liver of the rabbit of the species *Oryctolagus cuniculus*.

Słowa kluczowe: królik, defensyna NP-5, odporność naturalna, α -defensyna, RT-PCR

Key words: rabbit, NP-5 defensine, natural resistance, α -defensine, RT-PCR

Klaudyna Spychała
Aleksandra Przetacznik
Weronika Salwińska
Uniwersytet Wrocławski
Międzywydziałowe Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów

TORF JAKO ŹRÓDŁO BAKTERII PRODUKUJĄCYCH METABOLITY WTÓRNE O CHARAKTERZE ANTYBIOTYCZNYM

1. Wstęp

Powszechne stosowanie, nadużywanie oraz niewłaściwe zażywanie antybiotyków przyczyniło się do globalnego wzrostu populacji bakterii wielolekoopornych (Bogaard i in. 2000). W związku z tym znane dotychczas antybiotyki stają się nieskuteczne w walce z chorobami zakaźnymi. Z tego względu niezbędne jest poszukiwanie alternatywnych odmian leków (Odonkor, Addo 2011). Bakterie wytwarzają związki przeciwdrobnoustrojowe w środowisku naturalnym, aby uzyskać przewagę w rywalizacji o zasoby i kolonizację nowych siedlisk, stosując zabijanie lub hamowanie wzrostu konkurentów (Hibbing i in. 2010). Warto więc przyjrzeć się wyjątkowej niszy ekologicznej, jaką jest torfowisko.

Torfowiska są unikalnymi ekosystemami mokradłowymi, składającymi się z częściowo rozłożonej materii organicznej o głębokości do 25 m. Charakteryzują się niskim pH (pH 2,9–4,0), niewielką ilością składników odżywczych i niskim poziomem rozpuszczonego tlenu. Są to warunki mało sprzyjające, dlatego mikroorganizmy muszą konkurować o przetrwanie (Yule 2010). Wzrost w ekstremalnych i wyjątkowych warunkach prowadzi do rozwijania mechanizmów adaptacyjnych i wytwarzania unikalnych związków, takich jak wtórne metabolity (Pettit 2011). Duża część badań dotyczących mikroorganizmów pochodzących z torfowisk skupia się na bakteriach związanych z obiegiem materii, takich jak metanotrofy i acidobakterie (Jauhainen i in. 2005; Kluber i in. 2020; Dom i in. 2021). Mikroorganizmy torfowe wykorzystywane są również do oczyszczania ścieków kopalnianych zanieczyszczonych arsenem (Kujala i in. 2020).

Istnieją także doniesienia o bakteriach izolowanych z torfu wytwarzających metabolity wtórne o charakterze antybiotycznym (Mahdiyah i in. 2020; Nurulita i in. 2019; Ong i in. 2015; Yuliar i in. 2011). W Malezji wyizolowano nowy szczep *Paenibacillus tyrfis* MSt1^T hamujący wzrost bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych (Aw i in. 2016). Ong i wsp. (2016) opisali szczep *Burkholderia* spp., również izolowany z gleb torfowych o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, wobec bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych oraz grzybów drożdżopodobnych (Ong i in. 2016). Yuliar i wsp. (2011) poszukiwali w próbkach torfu mikroorganizmów hamujących wzrost fitopatogenicznego grzyba *Rhizoctonia solani*, powodującego ogromne straty w rolnictwie w Kalimantanie. W próbkach torfu odkryli mikroorganizmy, które produkowały grzybobójczą substancję zwaną ituryną A (Yuliar i in. 2011). Podobne właściwości zaobserwowano w przypadku pozyskanego z torfowiska *Penicillium* spp., którego poddano inkubacji z *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* stymulował grzyb do tworzenia aktywnego ekstraktu, w którym wykryto m.in. substancje hamujące wzrost bakterii takich, jak: *Bacillus subtilis* oraz *Staphylococcus epidermidis*. Substancje te okazały się skuteczniejsze nawet od amoksyliny (Nurulita i in. 2019). Natomiast w badaniu Mahdiyah i wsp. (2020) związki przeciwdrobnoustrojowe wyprodukowane przez izolaty z torfu z południowej Indonezji wykazywały silne działanie nawet przeciw *Escherichia coli* z mechanizmem oporności typu ESBL oraz metycylinoopornym szczepom *S. aureus* MRSA, w tym szczepom referencyjnym. Szczepy bakteryjne wytwarzające β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL) są zdolne do hydrolizy antybiotyków takich, jak: penicyliny, cefalosporyny (z wyjątkiem cefamycyn, np. cefoksytyny) i monobaktamy (oprócz aztreonamu) (Gniadkowski i in. 2009). Natomiast *S. aureus* MRSA to gronkowiec złocisty oporny na metycylinę, czyli organiczny związek chemiczny będący pół-syntetycznym antybiotykiem beta-laktamowym. Szczepy MRSA wykazują oporność na wszystkie antybiotyki β -laktamowe, m.in. na: penicyliny, cefalosporyny, monobaktamy oraz karbapenemy. Szczepy bakteryjne zdolne do wytwarzania mechanizmu ESBL oraz MRSA zalicza się do bakterii wielolekoopornych, które stanowią duże zagrożenie dla ludzi, szczególnie w środowisku szpitalnym (Köck i in. 2010). Wszystkie te dane przemawiają za stwierdzeniem, że torf może być dobrym źródłem bakterii wytwarzających środki przeciwdrobnoustrojowe. Z tego powodu, zainspirowani światowymi badaniami, przetestowaliśmy trzy próbki torfu z rezerwatu przyrody Żurawie Bagno na obecność bakterii zdolnych do produkcji związków o charakterze antybiotycznym.

Celem naszych badań było wyizolowanie bakterii z torfu pochodzącego z rezerwatu przyrody Żurawie Bagno oraz sprawdzenie, czy posiadają one zdolność antybiozy względem wybranych grup bakterii środowiskowych i referencyjnych.

2. Materiały i metody

2.1. Materiał środowiskowy

W eksperymencie wykorzystano trzy próby torfu: 1.1, 2.1, 2.3. Materiał środowiskowy, pobrany z torfowiska Żurawie Bagno (za zgodą Reg. Dyr. Ochrony Środ. w Gorzowie Wielkopolskim nr Decyzji WPN-1.6205.4.2017.AZ), pochodził z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego.

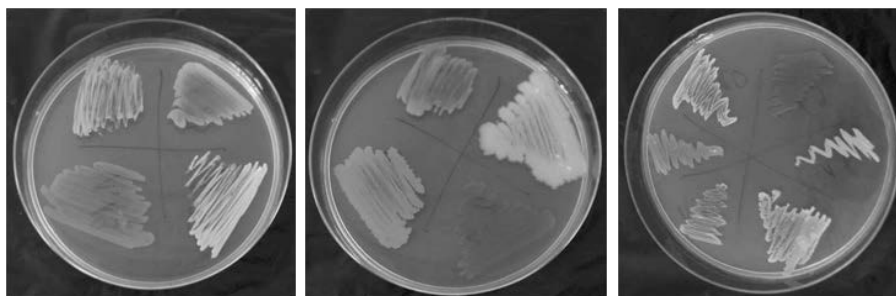
2.2. Izolacja bakterii torfowych metodą płytek mazanych

Każde 10 g torfu przenoszono do osobnych butelek Fishera zawierających po 90 ml jałowego płynu fizjologicznego, a następnie próby wytrząsano przy 250 obrotach na minutę przez 30 minut na orbitalnej wytrząsarce laboratoryjnej. Każdą zawiesinę torfu rozcieńczono 100 razy i posiewano po 100 µl na szalki Petriego z agarem odżywczym (AO). Zarówno rozcieńczone, jak i nierozcieńczone próby torfu były posiewane w 20 powtórzeniach. Płytki AO inkubowano w temp. 28°C przez 4 dni. Po tym czasie z hodowli izolowano bakterie i grzyby, uwzględniając ich różnice w makroskopowej morfologii kolonii.

2.3. Testy antybiozy *in vitro*

Spośród 25 izolatów bakteryjnych do testów oddziaływań wyselekcjonowano 14 szczepów, w tym 12 wytwarzających naturalne barwniki: czerwony (IL3), intensywnie żółty (IL2, 9), różne odcienie pomarańczowego (IL7, 8, 11, 13), seledynowy (IL5), niebiesko-szary (IL12), kremowy (IL4, 6, 10) (fot. 1).

W badaniu tym zastosowano metodę nakropień prehodowli izolatów torfowych na posiane podłoża AO szczepami bakteryjnymi o gęstości 1,0 w skali McFarlanda (McF).



Fotografia 1. Izolaty bakterii torfowych na agarze odżywczym AO

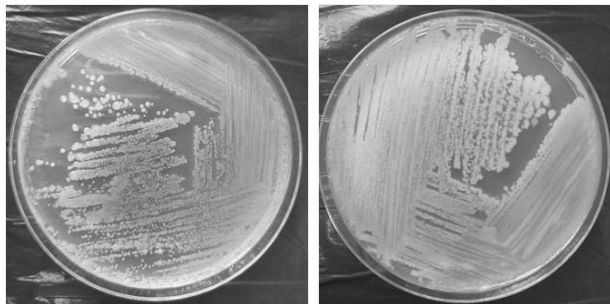
Źródło: opracowanie własne.

Sprawdzano w ten sposób działanie szczepów torfowych względem pozostałych izolatów i przedstawicieli bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych, tj. *Staphylococcus aureus* oraz *Escherichia coli*. W przypadku szczepów referencyjnych użyto ich zawiesin w jałowym płynie fizjologicznym o gęstości 0,5 McF. Prehodowle izolatów torfowych przygotowano, zaszczepiając jałowy bulion odżywczy i inkubując ok. 72 godzin w temperaturze pokojowej. Po tym czasie na świeżo przygotowane murawy bakteryjne na AO nakrapiano po 10 μ l z każdego izolatu torfowego w trzech powtórzeniach. Tak nastawione testy antybiozy inkubowano przez 4 dni w temperaturze 28°C, a następnie mierzono w milimetrach powstałe strefy zahamowania wzrostu wokół nakropień prehodowli izolatów torfowych. Strefy zahamowanego wzrostu (inhibicji) testowanych szczepów bakteryjnych określano na podstawie różnicy wielkości średnic stref zahamowanego wzrostu badanych szczepów bakteryjnych w stosunku do wielkości średnic kolonii izolatów torfowych w miejscach nakropień na AO.

3. Wyniki i dyskusja

W eksperymencie przeprowadzono odziaływanie 14 z 25 izolatów torfowych względem testowanych szczepów bakteryjnych IL1-IL14 oraz *E. coli* i *S. aureus*, stosując metody hodowlane. Spośród 14 izolatów torfowych aż 7 (50%) posiadało aktywność przeciwbakteryjną względem przynajmniej jednego testowanego szczepu bakteryjnego (tabela 1). Im dłuższy odcinek strefy zahamowania między szczepem testowanym a izolatem torfowym, tym silniejsze działanie związku antybiotycznego produkowanego przez izolat torfowy. Dwa szczepy spośród 14 izolatów (IL1 i IL14) (fot. 2) posiadały szerokie spektrum aktywności wobec bakterii, w szczególności gram-dodatnich.

Szczep IL1 wykazywał szerokie spektrum aktywności przeciwbakteryjnej, ponieważ hamował wzrost aż 13 izolatów torfowych (93%) i referencyjnego szczepu *S. aureus*.



Fotografia 2. Izolaty torfowe o największym potencjale antybiotycznym: IL1 (po lewej stronie) i IL14 (po prawej stronie)

Źródło: opracowanie własne.

Z kolei nie miał on wpływu na wzrost izolatu IL8 i *E. coli*. Jego inhibicyjna aktywność względem bakterii mieściła się w zakresie od 4 do 24 mm. Izolat IL1 jako jedyny miał hamujący wpływ na szczep referencyjny *S. aureus* ze strefą zahamowanego wzrostu wynoszącą 24 mm. Sam zaś był odporny na prehodowie pozostałych badanych izolatów torfowych. Antybakteryjna aktywność izolatu IL14 była nieco węższa, ponieważ hamował on wzrost tylko 5 szczepów bakteryjnych: IL 2, 3, 5, 7 i 9 (ok. 36%), ze strefą zahamowanego wzrostu w zakresie od 8 mm do 20 mm. Natomiast IL10 hamował jedynie 3 izolaty torfowe: IL 2, 3 i 11 (21%), poziomem zahamowania wzrostu od 2 mm do 12 mm. Oba izolaty nie hamowały wzrostu szczepów referencyjnych: *E. coli* i *S. aureus*, a same były hamowane przez szczep IL1. Cztery spośród 14 wyizolowanych bakterii (IL3, 5, 6, 8) nieznacznie hamowały wzrost pozostałych izolatów – wielkość zahamowania wynosiła w zakresie od 2 mm do 10 mm. Najbardziej wrażliwym izolatem torfowym okazał się IL2, którego wzrost był ograniczany aż przez 5 szczepów torfowych. IL2 z kolei nie wykazywał aktywności przeciwbakteryjnej wobec innych testowanych szczepów, w tym *E. coli* i *S. aureus*. Wielkości stref zahamowanego wzrostu wahały się w dość szerokim zakresie od 2 mm do 24 mm. Największe zahamowanie (24 mm) odnotowano w przypadku izolatu IL1 względem gram-dodatniej bakterii *S. aureus*. Natomiast żaden z badanych izolatów torfowych nie miał hamującego wpływu na wzrost gram-ujemnej pałeczki *E. coli*. Dla izolatów IL 2, 4, 7, 9, 11, 12 i 13 nie stwierdzono antybakteryjnej aktywności względem testowanych bakterii w teście antybiozy.

Tabela 1. Wielkości stref zahamowanego wzrostu w interakcji bakteria – bakteria w milimetrach [mm]

szczep testowy \ izolat torfowy	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
1	-	10	10	10	6	8	14	0	8	4	22	6	4	4	0	24
2	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	2	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	4	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	10	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	-	8	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0
10	0	12	2	0	0	0	0	0	0	-	12	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0
14	0	10	20	0	8	0	10	0	14	0	0	0	0	-	0	0

Źródło: opracowanie własne.

Co ciekawe, kolonie izolatów o największym potencjale antybakteryjnym: IL1, 14, 10, były białe (IL1, 14) i kremowe (IL10) – nie były intensywnie zabarwione. Dwa izolaty, które wytwarzały charakterystyczne intensywnie żółte barwniki (IL2, 9), nie hamowały ani jednego szczepu, były wręcz jednymi z najbardziej wrażliwych. Jedyny izolat wytwarzający czerwony barwnik (IL3) hamował wzrost tylko jednego szczepu IL2 ze strefą inhibicji na poziomie 2 mm, a sam był hamowany przez aż 4 inne szczepy. Izolaty wytwarzające barwniki w odcieniach: pomarańczowych (IL7, 11, 13, 8), niebiesko-szarym (IL12) i seledynowym (IL5) nie miały wpływu na wzrost innych lub hamowały jeden inny szczep. Jednak dwa pozostałe delikatnie zabarwione, kremowe izolaty (IL4, 6) odpowiednio nie hamowały żadnego szczepu lub hamowały tylko najwrażliwszy IL2. Wytwarzanie barwników u badanych izolatów torfowych nie wpływa więc na wykazywane przez nie działanie antybakteryjne.

Antybiotykooporność staje się coraz poważniejszym problemem na całym świecie. Bakterie przestają reagować na konwencjonalne terapie polegające na stosowaniu podczas leczenia powszechnie dostępnych leków, co przyczynia się do wydłużonego czasu trwania choroby i wyższego ryzyka zgonu. Główną przyczyną antybiotykooporności u bakterii jest HGT (*ang. horizontal gene transfer*) (Lerminiaux, Cameron 2018), ale również mutacje genetyczne (Laxminarayan 2003). Niewłaściwe i nieracjonalne stosowanie leków przeciwdrobnoustrojowych stwarza dogodne warunki do pojawienia się, rozprzestrzeniania i utrzymywania się w środowisku drobnoustrojów opornych na znane i szeroko wykorzystywane antybiotyki i chemioterapeutyki. Im dłuższy czas ekspozycji na antybiotyki, tym większe ryzyko rozwoju oporności. Ponieważ zmniejszona wrażliwość na antybiotyki staje się coraz powszechniejsza, pojawia się konieczność stosowania alternatywnych metod leczenia. Jednakże, pomimo dążenia do opracowania innowacyjnych terapii antybiotykowych, liczba nowo zatwierdzonych leków stale spada (Dromigny, Perrier-Gros-Claude 2003; Zuccato i in. 2005).

Metabolity wtórne to związki, które nie są niezbędne do wzrostu lub rozmnażania drobnoustrojów, ale zapewniają przeżycie w różnych warunkach naturalnych, takich jak: zmienna kwasowość, zasolenie, dostępność tlenu oraz składników odżywczych czy temperatura środowiska (Martín in. 2005). Częstymi producentami antybiotyków są gatunki z rodzaju *Streptomyces* spp. (Bérdy 2005). Bakterie pozyskane na przykład z torfowisk zdolne do wytwarzania środków przeciwdrobnoustrojowych mogą okazać się lepszym rozwiązaniem. Czas ich inkubacji bowiem jest znacznie krótszy niż wolno rosnących *Streptomyces* czy grzybów, dlatego związki przeciwdrobnoustrojowe można otrzymywać szybciej (Mahdiyah in. 2020).

Test przesiewowy dotyczący działania wszystkich wyizolowanych szczepów bakterii z trzech próbek torfu z rezerwatu przyrody Żurawie Bagno wykazał, że 7 izolatów (IL2, 4, 7, 9, 11, 12, 13) (50%) nie wykazywało żadnego hamującego wpływu na wzrost pozostałych izolatów torfowych oraz referencyjnych szczepów *S. aureus* i *E. coli*. Cztery izolaty (IL3, 5, 6, 8) nieznacznie hamowały wzrost pozostałych szczepów. W szczególności jednak to trzy szczepy silnie ograniczyły wzrost innych bakterii: IL1,

IL14 i IL10. Kolejno hamowały one wzrost: 13, 5 i 3 izolatów torfowych. Dodatkowo szczep IL1 działał inhibicyjnie nawet w stosunku do *S. aureus*. Badania te wskazują na wysoki potencjał szczepów torfowych w zakresie produkcji związków o charakterze antybiotycznym.

W badaniach dotyczących bakterii torfowych wykryto drobnoustroje zakwalifikowane do rodzaju *Burkholderia* spp., które były w stanie wytwarzać środki antybiotyczne przeciwko bakteriom gram-ujemnym i gram-dodatnim, a także drożdżakom (Ong i in. 2015). W naszych badaniach zaobserwowaliśmy działanie izolatów torfowych względem bakterii gram-dodatnich. Strefy zahamowanego wzrostu szczepów bakteryjnych wyizolowanych z torfowiska Żurawie Bagno mieściły się w dość szerokich zakresach od 2 mm do 24mm. Podobne wielkości stref zahamowanego wzrostu zaobserwowano w badaniu Onga i wsp. (2015), które wynosiły od 1,7 mm do 13,3 mm. Ich badania sugerują, że wytwarzany związek przeciwdrobnoustrojowy należy do grupy lipidów – poliketydów (a nie jak to jest zazwyczaj – białek). Poliketydy wytwarzane przez *Burkholderia* spp. są, jak wiadomo, odporne na działanie enzymów proteolitycznych, a przez to trudniej rozkładane przez bakterie (Ong in. 2015). W badaniu Mahdiyahi i wsp. (2020) z próbek torfu z Indonezji wyizolowano 28 szczepów. Trzy izolaty wykazywały szczególną aktywność bakteriobójczą, nie tylko w stosunku do szczepów kontrolnych (*E. coli* nie wytwarzająca ESBL oraz *S. aureus* wrażliwy na metycylinę), ale też w stosunku do *E. coli* z mechanizmem oporności typu ESBL i *S. aureus* opornego na metycylinę (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – MRSA). Strefa zahamowania wzrostu wahała się od 10,3 do 20 mm, przy czym większe zakresy odnotowywano dla gram-ujemnych pałeczek *E. coli*. Między szczepami opornymi a referencyjnymi nie zaobserwowano wyraźnych różnic. Uważa się, że za inhibicyjny wpływ na wzrost większości badanych bakterii odpowiada grupa niezidentyfikowanych białek wtórnego metabolizmu u bakterii torfowych (Mahdiyahi in. 2020). W przeciwieństwie do badania Mahdiyahi i wsp. w naszej pracy badawczej zaobserwowaliśmy, że metabolity wtórne wytworzone przez wyizolowane bakterie torfowe wykazują silniejsze działanie w stosunku do bakterii gram-dodatnich. Yuliar i wsp. (2011) udało się wyizolować z gleb torfowych mikroorganizmy, które wytwarzają iturynę A – grzybobójczą substancję należącą do antybiotyków polipeptydowych. Odkrycie to było bardzo istotne, ponieważ wykryta substancja ma działanie inhibicyjne w stosunku do fitopatogennego grzyba *Rhizoctonia solani*, przynoszącego poważne straty w rolnictwie w Kalimantanie w Indonezji. Odkrycie to dało perspektywy dalszego jej użycia jako naturalnego środka w ochronie roślin i biokontroli fitopatogenów (Yuliar i in. 2011). Obiecujące wyniki uzyskali również Nurulita i wsp. (2019), którzy po wyizolowaniu z torfu *Penicillium* spp. LBKURCC34 sporządzili ekstrakt, który wykazywał aktywność antibakteryjną na poziomie 50–70%. Podczas badań kontrolę pozytywną stanowiła amoksycylina, wykazująca stuprocentową aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec badanych szczepów. W wyniku analiz zmodyfikowano metodę produkcji antybiotyku na bardziej korzystną i wydajną. Do pożywki izolatu *Penicillium* sp. LBKURCC34

dodawano *Staphylococcus aureus*, a następnie po 14 dniach inkubacji pożywkę ekstrahowano octanem etylu. Dodatek patogenu był swego rodzaju czynnikiem stresującym i stymulującym wytwarzanie metabolitów. Działanie ekstraktów sprawdzano na dwóch gatunkach bakterii gram-dodatnich, tj. *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus epidermidis*. Okazało się, że tak przygotowany ekstrakt był nie tylko bardziej skuteczny niż przed inkubacją z *S. aureus*, ale też 10% bardziej skuteczny niż amoksycylina o tym samym stężeniu. W innym badaniu Aw i wsp. (2016) wyizolowali z tropikalnych malezyjskich torfowisk bakterię wykazującą szerokie spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego. Po analizie filogenetycznej zaklasyfikowano ją jako *Paenibacillus tyrfis* MSt1^T. Ekstrakt z tego szczepu wykazywał silne działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec *Escherichia coli*, *S. aureus* MRSA i *Candida albicans* (Aw i in. 2016). Wyizolowane przez nas szczepy torfowe z rezerwatu przyrody Żurawie Bagno również mogą wytwarzać metabolity wtórne o potencjalnym charakterze antybiotycznym. Z pewnością dalsze badania pozwolą odpowiedzieć na pytanie, czy są w stanie oddziaływać na inne patogeny, w tym grzyby drożdżopodobne.

4. Podsumowanie

Niniejsze badania pokazały, że unikalne, słabo dotąd poznane ekosystemy, takie jak torfowiska, mogą być źródłem mikroorganizmów produkujących związki o charakterze antybiotycznym. Ze względu na mało korzystne warunki do wzrostu bakterii tereny te sprzyjają rozwojowi licznych mechanizmów adaptacyjnych drobnoustrojów. Dwa spośród 14 wyizolowanych szczepów (IL1, IL14) posiadały szerokie spektrum aktywności wobec bakterii, w szczególności gram-dodatnich. Jeden z wyizolowanych szczepów (IL1) wykazywał działanie inhibicyjne także wobec szczepu referencyjnego *Staphylococcus aureus*.

Podziękowania

Badania wykonano w ramach dotacji z Funduszu Aktywności Studenckiej Wrocławskiego Centrum Akademickiego przy Urzędzie Miasta Wrocławia, 2020 roku, nr umowy dotacyjnej BWU-26/2020/F2.

Serdeczne podziękowania dla dr Katarzyny Guz-Regner, opiekunki Międzywydziałowego Koła Naukowego Mikrobiologów, za udostępnienie materiału do badań oraz merytoryczną pomoc podczas realizacji projektu.

Bibliografia

- Aw, Y.K., Ong, K.S., Lee, L.H., Cheow, Y.L., Yule, C.M., Lee, S.M. (2016). Newly Isolated *Paenibacillus tyrfis* sp. nov., from Malaysian Tropical Peat Swamp Soil with Broad Spectrum Antimicrobial Activity. *Front Microbiol.* 7, 219. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00219>.
- Bérdy J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot.* 58(1), 1–26.
- Bogaard, A., E., Van Den, Stobberingh, E., E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics Links between animals and humans. *Inter J Antimicrob Agents.* 14, 327–335.
- Dom, S.P., Ikenaga, M., Lau, S., Radu, S., Midot, F., Yap, M.L., Chin, M.Y., Lo, M.L., Jee, M.S., Maie, N., Melling, L. (2021). Linking prokaryotic community composition to carbon biogeochemical cycling across a tropical peat dome in Sarawak, Malaysia. *Sci Rep.* 11(1), 6416. doi: 10.1038/s41598-021-81865-6.
- Dromigny J.A., Perrier-Gros-Claude J.D. (2003). Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serotype Typhi in Dakar, Senegal. *Clin Infect Dis.* 37, 465–466.
- Gniadkowski, M., Żabicka, D., Hryniewicz, W. (2009). Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki 2009. Oznaczanie wrażliwości pałeczek Gram-ujemnych. *KORDL.* 18–23.
- Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R., Peterson, S.B. (2010). Bacterial competition: Surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol.* 8, 15–25.
- Jauhainen, J., Takahashi, H., Heikkinen, J.E.P., Martikainen, P.J., Vasanders, H. (2005). Carbon fluxes from a tropical peat swamp forest floor. *Glob Change Biol.* 11, 1788–1797.
- Kluber, L.A., Johnston, E.R., Allen, S.A., Hendershot, J.N., Hanson, P.J., Schadt, C.W. (2020). Constraints on microbial communities, decomposition and methane production in deep peat deposits. *PLoS one.* 15(2), e0223744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223744>.
- Köck, R., Becker, K., Cookson, B., van Gemert-Pijnen, J.E., Harbarth, S., Kluytmans, J.A.J. W., Mielke, M., Peters, G., Skov, R.L., Struelens, M.J., Tacconelli, E., Navarro Torné, A., Witte, W., Friedrich, A.W. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill.* 15(41), 19688. doi: 10.2807/ese.15.41.19688-en.
- Kujala, K., Besold, J., Mikkonen, A., Tiirola, M., Planer-Friedrich, B. (2020). Abundant and diverse arsenic-metabolizing microorganisms in peatlands treating arsenic-contaminated mining wastewaters. *Environ Microbiol.* 22(4), 1572–1587.
- Laxminarayan, R. (2003). Battling resistance to antibiotics and pesticides: an economic approach. Washington DC: Resources for the Future. 20036-1400. 375 p.
- Lerminiaux N., Cameron A. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can J Microbiol.* 65(1), 34–44.
- Mahdiyah, D., Farida, H., Riwanto, I., Mustofa, M., Wahjono, H., Laksana Nugroho, T., Reki, W. (2020). Screening of Indonesian peat soil bacteria producing antimicrobial compounds. *Saudi J Biol Sci.* 27(10), 2604–2611.
- Martín, J.F., Casqueiro, J., Liras, P. (2005). Secretion systems for secondary metabolites: how producer cells send out messages of intercellular communication. *Curr Opin Microbiol.* 8(3), 282–293.
- Nurulita, Y., Herdiyanti, C., Nugroho, T.T. (2019). Gram positive antibacterial activity of ethyl acetate extract of *Penicillium* sp. LBKURCC34's growth media stimulated by *Staphylococcus aureus*. *J Phys. Conference Series* (1351, 012043). IOP Publishing.
- Odonkor T.S., Addo K.K. (2011). Bacteria resistance to antibiotics: recent trends and challenge. *Inter J Biol Med Res.* 2(4), 1204–1210.

- Ong, K., S., Catherine, M., and Lee, M., S. (2015). Antimicrobial producing bacteria isolated from tropical peat swamp soil. *Malay J Microbiol.* 11(2), 170–175.
- Pettit R. (2011). Culturability and secondary metabolite diversity of extreme microbes: expanding contribution of deep sea and deep-sea vent microbes to natural product discovery. *Marine Biotechnol.* 13(1), 1–11.
- Yule, C.M. (2010). Loss of biodiversity and ecosystem functioning in Indo-Malayan peat swamp forests. *Biodivers. Conserv.* 19, 393–409.
- Yuliar, Y., Abidin, Z., Mangunwardoyo, W. (2011). Potency of biocontrol agents isolated from compost and peat soil of tropical peat swamp forest in Kalamangan zone, central Kalimantan. *Indones J For Res.* 8(2), 144–157.
- Zuccato E, Castiglioni S, Fanelli R. (2005). Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *J Hazard Mater.* 122 (3), 205–209.

Abstract

PEAT AS A SOURCE OF BACTERIAL STRAINS PRODUCING SECONDARY METABOLITES OF AN ANTIBIOTIC NATURE.

Due to increasing antibiotic resistance among bacteria, it is necessary to search for alternative therapeutics. Many investigations of poorly known places like peatland could provide promising results. The aim of our study was to isolate bacteria with potential antibacterial activity from three peat samples from Żurawie Bagno Nature Reserve (Poland). Out of 25 isolates, 14 bacterial strains were selected for antagonistic test *in vitro*. The method consisted of spotting pre-culture of isolates from peat samples onto AO media spread with bacterial strains at 1,0 McFarland density. Two strains had exhibited a broad spectrum of activity against bacteria, particularly gram-positive bacteria. The IL1 strain showed inhibitory activity against 13 bacterial isolates originating from peatland and *S. aureus*. The antibacterial activity of the IL14 isolate was high against 5 out of 14 bacterial strains. These results suggest that peatlands may be a source of bacteria with antimicrobial activity.

Słowa kluczowe: torfowiska, bakterie, aktywność przeciwbakteryjna, antybiotykooporność

Keywords: peatland, bacteria, antibacterial activity, antibiotic resistance

**SEKCJA NAUK
MEDYCZNYCH**

Magdalena Fadrowska[®], Karol Szleper[®], Aleksandra Sejda
University of Warmia and Mazury in Olsztyn
Student Pathomorphology Science Club

EXTRANODAL MANIFESTATION OF ALK+ ANAPLASTIC LARGE CELL LYMPHOMA IN CHILDREN: CASE REPORT

Introduction

Lymphomas represent a heterogeneous group of haematological malignancies originating from clonal proliferation of lymphocytes. Tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues stand together for a half of all paediatric malignancies. Anaplastic Large Cell Lymphoma (ALCL) is a rare malignant non-Hodgkin pleomorphic T-cell lymphoma. ALCL accounts for 5% of all non-Hodgkin lymphomas and up to 30% of all childhood lymphomas [Alessandri et al. 2002]. Clinical features among ALCL patients consist of nodal and extranodal symptoms. Whereas peripheral or abdominal lymphadenopathy is found in 70% of advanced stage patients, extranodal manifestations such as bone or skin involvement are much rarer and may be the reason for misdiagnosis [Falini et al. 1999]. Isolated skin presentation of systemic ALCL is very rare. In this report we present a clinical case of a 9-year-old boy admitted to a surgical department with inflamed abscess-like single skin lesion.

Aim of the study

We aim to highlight the significance of differential diagnosis in paediatric diseases not responding to treatment, especially intensive antibiotic therapy.

Material and methods

We have performed retrospective studies of a clinical case, with histomorphologic and immunophenotypic studies basing on the scientific literature.

Results

A 9-year-old boy was admitted to a Surgical Department of Regional Specialised Children's Hospital in Olsztyn with an inflamed abscess-like single skin lesion on left eyebrow, which was present a month from the admission. Lesion was gradually expanding, closing the eyelid, with swelling of the buccal region. The boy was previously treated with broad-spectrum antibiotics, without any improvement.

A deep skin punch biopsy was performed. The examined specimen was rich in cells, with a necrotic field and infiltration with large polymorphic cells (kidney-shaped nuclei also named hallmark cells) [Fig. 1.]. The immunophenotype of the cells included CD30 and ALK1 (cytoplasmic and nuclear) [Figures 2 and 3]. Atypical cells were stained positive for CD43, LCA, CD3. Proliferative index stain Ki-67 was present in approximately 90% of cells, [Fig. 4.]. Cells lacked antigens CD20, Desmin, MyoD1, Myogenin, CD34, CD1a and S-100. In order to confirm diagnosis and perform further stainings the specimen was forwarded to the reference center. Cells showed positivity for EMA, granzyme B, CD4, CD8, yet stainings for bcl2, EBV, CD15 were negative. Based on the morphological features and immunostaining, the tumor was determined to be Anaplastic Large Cell Lymphoma ALK-positive.

Magnetic resonance imaging (MRI) of head and neck was performed (T1- and T2-weighted). MRI showed two pathological masses: first one located medially in the left eyebrow region, infiltrating the upper lid and eye corner (transverse dimension 49x12mm). Second lesion was located laterally in the frontal part of epicranial aponeurosis (transverse dimension 14x10mm). Moreover, proximally to the tumor and caudally, at the level of infratemporal fossa, swelling with intensive contrast enhancement and diffusion restriction within soft tissue were present.

In addition, the tumor was infiltrating the left parotid gland, causing swelling – intensive gadolinium enhancement was present in the MRI. Also, lymph nodes packages were noted in the left submandibular region and upper cervical area. No pathological tissue was found within the orbit. MRI of the central nervous system was performed, no additional lesions were found. Thorax CT scan showed no metastases.

Scanning with fluorodeoxyglucose (FDG) positron emission tomography-computed tomography (PET-CT) showed abnormally increased FDG uptake in lesions described in MRI, as well as in slightly enlarged pharyngeal and palatine tonsils, suggesting involvement of lymphoma cells.

In addition to diagnostic imaging, trepanobiopsy was performed in order to confirm or rule out bone marrow involvement. Marrow was collected from anterior and posterior superior iliac spines, however, analysis of the material showed neither myelogram abnormalities nor bone marrow structural changes.

These findings led to diagnosis of stage II ALK+ Anaplastic Large Cell Lymphoma.

Patient was qualified for chemotherapy by the ALCL 99 protocol in a group of standard risk.

Combined chemotherapy consisting of Cyclophosphamide, Methotrexate, Ifosfamide, ARA-C, Etoposide and Doxorubicin was initiated in the Department of Pediatric Hematology. In addition, the patient was treated with Dexamethasone and Folinic Acid in doses varying throughout the therapy. Following this treatment, skin lesion was progressively decreasing, as well as eyelid edema.

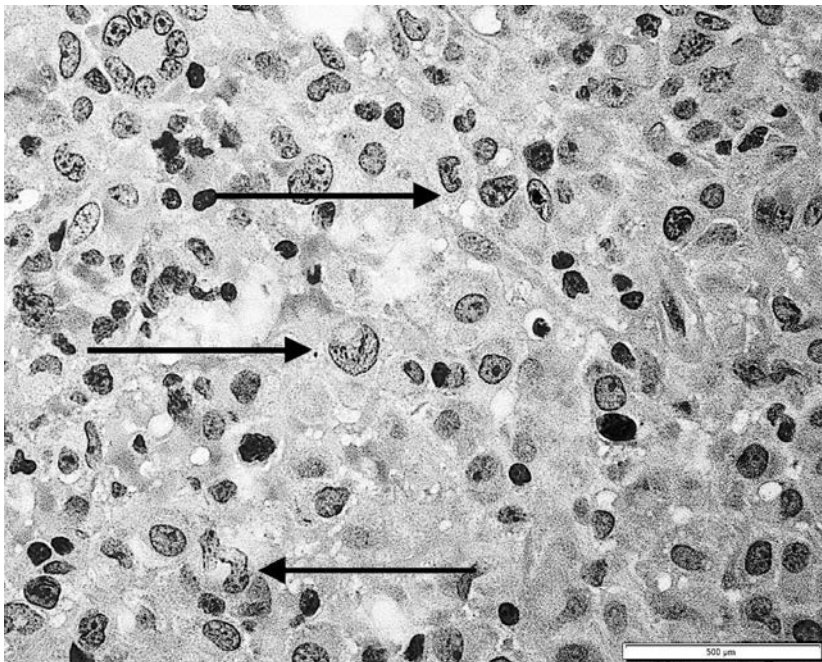


Fig. 1. Large cells with pleomorphic, multilobed nuclei. Also present kidney or horseshoe-shaped "hallmark cells" (arrows) H&E

Source: Department of Histopathology of Developmental Age with a Section Laboratory, WSSD Olsztyn, own study

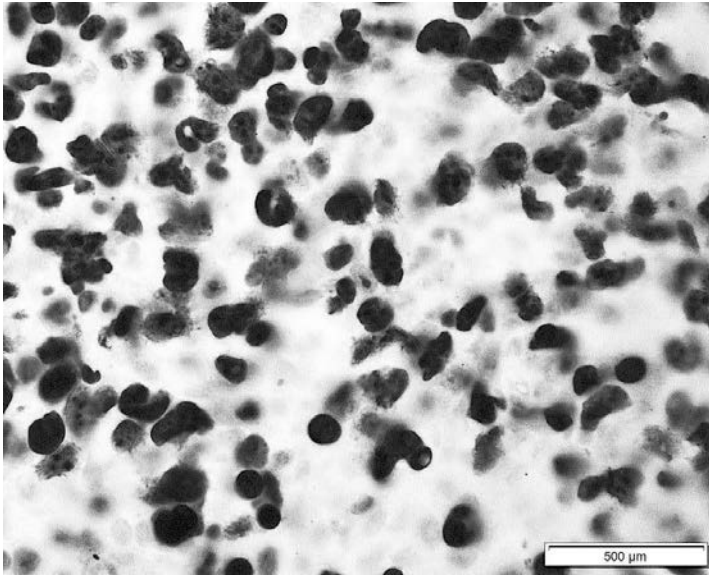


Fig. 2. Marker of cell proliferation - immunohistochemical Ki-67 staining shows >90% positivity

Source: Department of Histopathology of Developmental Age with a Section Laboratory, WSSD Olsztyn, own study

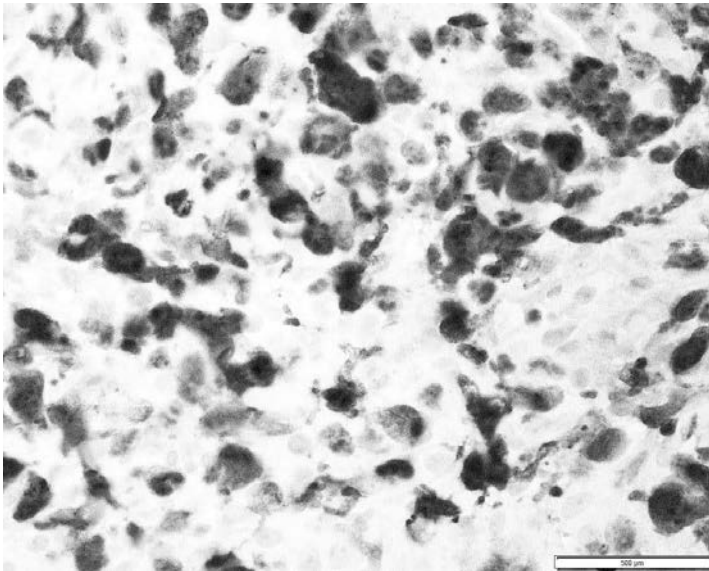


Fig. 3. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) present in cytoplasm of neoplastic cells

Source: Department of Histopathology of Developmental Age with a Section Laboratory, WSSD Olsztyn, own study.

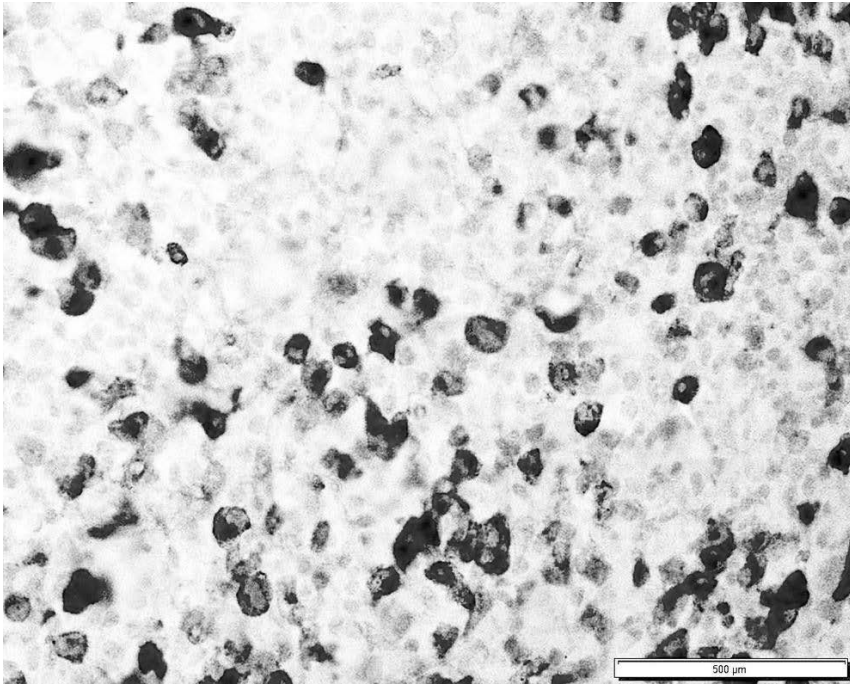


Fig. 4. Strongly positive staining for CD30 in neoplastic cells

Source: Department of Histopathology of Developmental Age with a Section Laboratory, WSSD Olsztyn, own study.

Discussion

Anaplastic Large Cell Lymphoma (ALCL) is a T-cell lymphoma, which has a strong CD30 positive phenotype. ALK-positive ALCL features large cells, rich in cytoplasm with pleomorphic nuclei, often horseshoe- or kidney-shaped nucleus (hallmark cells) [WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 2017]. Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) is a gene product of t(2;5)(p23;q35) translocation. Translocation in the ALK gene results in distinctive ALK protein expression [Shustov, Soma 2019]. Presence or absence of ALK expression led to a current WHO classification which divides Anaplastic Large Cell Lymphoma into ALK+ and ALK- types [Lynch et al. 2017]. Among ALCL stands up a significantly different tumor – Breast Implant-associated Anaplastic Large Cell Lymphoma (BIALCL) which was observed in patients with silicon and saline prosthesis. In all reported cases BIALCL was ALK-negative and positive ALK staining would suggest systemic disease. [Irshaid, Xu 2020].

ALCL accounts for 10-30% of all paediatric non-Hodgkin lymphoma with approximate annual incidence 1,2 per million in children under 15 years and 2 per million in patients aged between 25 and 34 years [Alessandri et al. 2002]. ALK+ ALCL mostly occurs in the first three decades of life, mostly with males (male: female ratio is approximately 3:2). ALK+ ALCL carries a better prognosis than other T-cell lymphomas, with a 5-year survival ratio 75-80%. ALK-negative ALCL typically affects older patients, with disease peak in 40 to 65 years, with no clear sex predominance [Hematopathology 2016]. Generally, ALK(-) ALCL is associated with worse prognosis, patients often are diagnosed while presenting B symptoms (fever, sweats, weight loss) and in an advanced stage [Lu et al. 2009]. Extranodal involvement is less common compared to ALK+ ALCL [Atlas of Differential Diagnosis in Neoplastic Hematopathology 2014].

Diagnosis is based on the clinical presentation, pathomorphological findings, immunostaining and genetic features. ALK+ ALCL mostly involves lymph nodes, however extranodal sites are observed in 60% of cases. Extranodal sites include skin, soft tissues, lung, bone, and less often gastrointestinal tract. CNS localisation is very uncommon. Bone marrow involvement can be spotted in up to 30% of the cases, depending on the method (HE staining or immunohistochemistry) [Falini et al. 1999]

ALCL ALK+ demonstrates wide range of cells, five morphological variants have been described: common/classic (60%), lymphohistiocytic (10%), small cell (5–10%), Hodgkin-like (3%) and composite (15%) patterns. Classic variant is composed of large polymorphic cells with kidney-shaped nuclei (named hallmark cells). In this variant, when the lymph node is only partially effaced, pathological cells grow within sinuses, thus, the lymph node may resemble a metastatic tumor. Lymphohistiocytic pattern is characterised by tumor cells surrounded by active histiocytes, which may mask malignant cells. Immunostaining using antibodies to CD30 and ALK may be helpful to highlight tumor cells. Small cell pattern displays small-sized lymphocytes with irregular nuclei, both “hallmark” cells and cells with irregular nuclei, and may be admixed with infrequent large cells. Hodgkin-like type has a nodular pattern and is characterized by morphological features mimicking nodular sclerosing Hodgkin’s lymphoma [Ferreri et al. 2012]. More than one pattern may be seen in lymph node biopsy (15% of cases) [Irshaid, Xu 2020].

Tumor cells are positive for CD30 in a membrane and in the Golgi region and are positive for ALK. In the majority of cases with the t(2;5)/NPM-ALK translocation, ALK stains the large cells in a nuclear and cytoplasmic pattern. ALK staining may be restricted only to the nucleus, especially in small cell pattern. In cases with variant translocations, the subcellular distribution of ALK staining differs (membranous or cytoplasmic), depending on the translocation. In most cases, malignant cells are positive for EMA, clusterin, and cytotoxic markers and present one or more T-cell antigens, less commonly, ALK+ ALCLs are of null cell lineage and negative for all T-cell markers [Montes-Mojarro et al. 2018].

The differential diagnosis of ALK+ ALCL includes hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms. Due to its unusual features, diagnosis requires combining morphological findings with immunocytochemistry performed on dissected material. Other methods, such as flow cytometry, PCR and cytogenetic studies help to make a final diagnosis [Iqbal et al. 2010; Bogdanic et al. 2017; Muzzafar et al. 2009]. ALK(-) ALCL morphologically mimics ALK+ ALCL, yet distinction is crucial as ALK(-) ALCL shows an unfavourable prognosis, usually worse than in systemic ALK+ ALCL. PTCL-NOS is typically not as anaplastic, unlike ALCL is commonly CD3+, CD5+, TCR+, ALK-, EMA- and cytotoxic markers -, moreover, does not show prominent sinusoidal involvement. Sinusoidal involvement is a shared feature of ALK+ ALCL and some metastatic lymph nodes. Additionally, both can express CD30 (for example embryonal carcinoma) and ALK (lung adenocarcinoma). Studies of T-cell gene rearrangement and extended immunochemical markers may be required to make the final diagnosis. Primary cutaneous ALCL can look identical morphologically, yet do not express ALK and EMA [Moodley et al. 2019]. Reed-Sternberg cells, distinctive for classic Hodgkin lymphoma (CHL) can mimic “hallmark” cells, although CHL-cells are CD15+, PAX-5+, ALK -, CD45- and EMA-. B-cell lymphomas may also be CD30+ or ALK+. However, these cells do not express T-cell antigens [Irshaid, Xu 2020]. Small cell pattern often causes diagnostic challenges, as it can simulate subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma (SPTCL) [Papalas, Wang 2016] or even inflammatory lesions [Lee et al. 2019].

The majority of cases with skin involvement of ALK+ ALCL present with a solitary nodule or papule with ulceration. Usually, the lesion is singular. Multifocal presentation only applies to 20% of patients. Partial or complete spontaneous regression can occur, but relapses are common. Patients may present B symptoms (especially high fever), anaemia, pancytopenia, high lactate dehydrogenase (LDH) [Falini et al. 1999; Savage et al. 2008]. Differential diagnosis should include multiple neoplastic and non-neoplastic diseases [Wolff et al. 2016]. Similar findings emerge in lymphomatoid papulosis, CD30+ large-cell transformation of mycosis fungoides, cutaneous NK/T-cell lymphoma, Cutaneous B-cell lymphomas with immunoblastic or large-cell features, Langerhans cell histiocytosis, pityriasis lichenoides, arthropod bites, scabies and tuberculosis [Sneha et al. 2019; Torres-Cabala et al. 2020].

Treatment varies depending on staging. For paediatric patients first line therapy includes Cyclophosphamide, Methotrexate, Ifosfamide, ARA-C, Etoposide and Doxorubicin [European Intergroup for Childhood Non-Hodgkin-Lymphoma, 2001]. However, there are numerous targeted agents showing promising results in clinical studies and therapy guidelines may transform rapidly. As many authors suggest, the immune system plays a major role in pathogenesis of ALK+ ALCL, therefore immunotherapy may have a leading role in future treatment strategies [Sandlund et al. 2015; Prokoph et al. 2018]. What's more, a traditional Maya plant, *Neurolaena lobata* was proved to have a decreasing effect on expression of ALK [Unger et al. 2012], which may lead to discovering new ways of treatment. Good response for doxorubicin-containing

chemotherapy has approximately 90% of response rate, a 5-year relapse-free survival of 60%, and a 5-year overall survival of 70% [Ferreri et al. 2012]. Unfavorable factors affecting ALCL prognosis include CD56+, lack of ALK expression, B symptoms (fever, nocturnal hyperhidrosis and weight loss), extranodal disease in more than two sites, leukemic blood involvement, increased LDH and lack of NPM-ALK fusion [Gallamini et al. 2004].

For making a gross prognosis, the International Prognostic Index may be applied, a clinical tool for patients with aggressive non-Hodgkin lymphoma. Risk factors taken under consideration are: age greater than 60 years, stage III or IV disease, elevated serum LDH, ECOG/Zubrod performance status of 2, 3, or 4 and more than 1 extranodal site. The sum of occurring factors correlates with the following risk groups: low risk (0-1 points) - 5-year survival of 73%, low-intermediate risk (2 points) - 5-year survival of 51%, high-intermediate risk (3 points) - 5-year survival of 43%, high risk (4-5 points) - 5-year survival of 26%.

Also, epithelial membrane antigen (EMA) status can provide prognostic information in ALCL patients. EMA-positive lymphomas had been linked with poorer chemotherapy outcome, despite good response in skin lesions. It was observed that 5-year survival rate was 70.7% for patients with EMA-positive tumours and 93.8% for patients with EMA-negative tumours [George et al. 1999]

Conclusions

This case stresses the importance of awareness about ALCL among paediatricians, general physicians, oncologists and dermatologists. Abscess is a common finding in the paediatric population and patients with presented above clinical symptoms may seek medical help among a variety of specialists. Chronic cutaneous lesions not responding to conventional treatment should alert physicians and neoplastic processes should be taken under consideration. Clinicians should not hesitate to perform a biopsy which often leads to diagnosis, especially with such easy access to pathological tissue.

References

- Alessandri A.J., Pritchard S.L., Schultz K.R., Massing B.G. 2002. A population-based study of pediatric anaplastic large cell lymphoma. *Cancer*, 94(6):1830-1835. doi: 10.1002/cncr.10396.
- Bogdanic M., Ostojic Kolonic S., Kaic G., Kardum Paro M.M., Lasan Trcic R., Kardum-Skelin I. 2017. Fine-needle aspiration cytology yield as a basis for morphological, molecular, and cytogenetic diagnosis in alk-positive anaplastic large cell lymphoma with atypical clinical presentation. *Diagn Cytopathol.*, 45(1): 51-54. doi: 10.1002/dc.23542.

- European Intergroup for Childhood Non-Hodgkin-Lymphoma, ALCL 99 International Protocol for the Treatment of Childhood Anaplastic Large Cell Lymphoma.
- Falini B., Pileri S., Zinzani P.L., Carbone A., Zagonel V., Wolf-Peeters C., Verhoef G., Menestrina F., Todeschini G., Paulli M., Lazzarino M., Giardini R., Aiello A., Foss H.D., Araujo I., Fiz-zotti M., Pelicci P.G., Flenghi L., Martelli M.F., Santucci A. 1999. ALK+ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome. *Blood*, 93(8): 2697-706.
- Ferreri A.J., Govi S., Pileri S.A., Savage K.J. 2012. Anaplastic large cell lymphoma, ALK-positive. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 83(2): 293-302. doi: 10.1016/j.critrevonc.2012.02.005.
- Gallamini A., Stelitano C., Calvi R., Bellei M., Mattei D., Vitolo U., Morabito F., Martelli M., Brusamolino E., Iannitto E., Zaja F., Cortelazzo S., Rigacci L., Devizzi L., Todeschini G., Santini G., Brugiattelli M., Federico M., Intergruppo Italiano Linfomi. 2004. Peripheral T-cell lymphoma unspecified (PTCL-U): a new prognostic model from a retrospective multicentric clinical study. *Blood*, 103(7): 2474-2479. doi: 10.1182/blood-2003-09-3080.
- George R., Bhuvana S., Nair S., Lakshmanan J. 1999. Clinicopathological profile of cutaneous lymphomas--a 10 year retrospective study from south India. *Indian J. Cancer*, 36(2-4):109-119.
- Gorczyca W. 2014. Atlas of Differential Diagnosis in Neoplastic Hematopathology. CRC Press, p. 447-461.
- Iqbal J., Weisenburger D.D., Greiner T.C., Vose J.M., McKeithan T., Kucuk C., Geng H., Def-fenbacher K., Smith L., Dybkaer K., Nakamura S., Seto M., Delabie J., Berger F., Loong F., Au W.Y., Ko Y.H., Sng I., Armitage J.O., Chan W.C. 2010. Molecular signatures to improve diagnosis in peripheral T-cell lymphoma and prognostication in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*, 115(5): 1026-1036. doi: 10.1182/blood-2009-06-227579.
- Irshaid L., Xu M.L. 2020. ALCL by any other name: the many facets of anaplastic large cell lymphoma. *Pathology*, 52(1): 100-110. doi: 10.1016/j.pathol.2019.09.007.
- Jaffé E., Arber D., Campo E., Quintanilla-Martinez L., Attilio Orazi A. 2016. Hematopathology. 2nd Ed., Elsevier, p. 673-691.
- Lee J.S., Choi S.J., Kim L., Park I.S., Han J.Y., Kim J.M., Chu Y.C. 2019. ALK-positive anaplastic large cell lymphoma with a monomorphic small-cell pattern masquerading as inflammatory gastric lesions. *Malays J. Pathol.*, 41(2): 213-222.
- Lu Y., Zhao X., Wang E., Chen W., Huang Q. 2010. ALK-negative anaplastic large cell lymphoma with extensive peripheral blood and bone marrow involvements manifested as "leukemic phase". *Leuk. Res.*, 34(4): 475-482. doi: 10.1016/j.leukres.2009.07.034.
- Lynch R.C., Gratzinger D., Advani R.H. 2017. Clinical Impact of the 2016 Update to the WHO Lymphoma Classification. *Curr. Treat Options Oncol.*, 18(7): 45. doi: 10.1007/s11864-017-0483-z.
- Montes-Mojarro I.A., Steinhilber J., Bonzheim I., Quintanilla-Martinez L., Fend F. 2018. The Pathological Spectrum of Systemic Anaplastic Large Cell Lymphoma (ALCL). *Cancers (Basel)*, 10(4): 107. doi: 10.3390/cancers10040107.
- Moodley N., Nombona P., Mosam A. 2019. Primary Cutaneous Anaplastic Large-Cell Lymphoma. *Dermatopathology (Basel)*, 6(2): 163-169. doi: 10.1159/000500259.
- Muzzafar T., Wei E.X., Lin P., Medeiros L.J., Jorgensen J.L. 2009. Flow cytometric immunophenotyping of anaplastic large cell lymphoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 133(1): 49-56. doi: 10.5858/133.1.49.
- Papalas J.A., Wang E. 2016. Clinical and histopathologic overlap between subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma with systemic features and small cell CD8+ ALK+ systemic anaplastic large cell lymphoma with cutaneous involvement. *J. Cutan. Pathol.*, 43(5): 480-481. doi: 10.1111/cup.12710.

- Prokoph N., Larose H., Lim M.S., Burke G.A.A., Turner S.D. 2018. Treatment Options for Paediatric Anaplastic Large Cell Lymphoma (ALCL): Current Standard and beyond. *Cancers (Basel)*, 10(4): 99. doi: 10.3390/cancers10040099.
- Sandlund J.T. 2015. Non-Hodgkin Lymphoma in Children. *Curr. Hematol. Malig. Rep.*, 10(3): 237-243. doi: 10.1007/s11899-015-0277-y.
- Savage K.J., Harris N.L., Vose J.M., Ullrich F., Jaffe E.S., Connors J.M., Rimsza L., Pileri S.A., Chhanabhai M., Gascoyne R.D., Armitage J.O., Weisenburger D.D. 2008. ALK- anaplastic large-cell lymphoma is clinically and immunophenotypically different from both ALK+ ALCL and peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: report from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. *Blood*, 111(12): 5496-5504. doi: 10.1182/blood-2008-01-134270.
- Shustov A., Soma L. 2019. Anaplastic Large Cell Lymphoma: Contemporary Concepts and Optimal Management. *Cancer Treat Res.*, 176: 127-144. doi: 10.1007/978-3-319-99716-2_6.
- Sneha L.M., Ramaswamy S., Shalini S., Scott J. 2019. Cutaneous Abscess: An Isolated Manifestation of Disseminated Anaplastic Large-cell Lymphoma in a Child. *Indian J. Dermatol.*, 64(1): 83-84. doi: 10.4103/ij.d.IJD_514_16.
- Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, WHO Classification of Tumours. vol. 2, p. 413-421.
- Torres-Cabala C.A. 2020. Diagnosis of T-cell lymphoid proliferations of the skin: putting all the pieces together. *Mod. Pathol.*, 33(Suppl 1): 83-95. doi: 10.1038/s41379-019-0397-3.
- Tsuyama N., Sakamoto K., Sakata S., Dobashi A., Takeuchi K. 2017. Anaplastic large cell lymphoma: pathology, genetics, and clinical aspects. *J. Clin. Exp. Hematop.*, 57(3): 120-142. doi: 10.3960/jslrt.17023.
- Unger C., Popescu R., Giessrigl B., Laimer D., Heider S., Seelinger M., Diaz R., Wallnöfer B., Egger G., Hassler M., Knöfler M., Saleh L., Sahin E., Grusch M., Fritzer-Szekeres M., Dolznig H., Frisch R., Kenner L., Kopp B., Krupitza G. 2013. The dichloromethane extract of the ethnomedicinal plant *Neurolaena lobata* inhibits NPM/ALK expression which is causal for anaplastic large cell lymphomagenesis. *Int. J. Oncol.*, 42(1): 338-348. doi: 10.3892/ijo.2012.1690.
- Wolff J., Saratzis A. 2016. Seeing Shouldn't Always be Believing: Cutaneous Anaplastic Large Cell Lymphoma Masquerading as an Arterial Ulcer. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 51(2): 267. doi: 10.1016/j.ejvs.2015.11.005.

Abstract

EXTRANODAL MANIFESTATION OF ALK+ ANAPLASTIC LARGE CELL LYMPHOMA IN CHILDREN: A CASE REPORT

Lymphomas represent a heterogenous group of haematological malignancies originating from clonal proliferation of lymphocytes. Tumours of the hematopoietic and lymphoid tissues stand together for a half of all paediatric malignancies. Anaplastic large cell lymphoma (ALCL) is a pleomorphic T-cell lymphoma characterised by CD30 expression. Expression of Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) divides ALCL into two subtypes: ALK-positive (with predominance in children), and ALK-negative, mostly to be found in older patients. ALCL accounts for 5% of all non-Hodgkin lymphomas and up to 30% of all childhood lymphomas. We present a clinical case of a 9-year-old boy admitted to a surgical department with inflamed abscess-like single skin

lesion. After an insufficient conventional antibiotic treatment, histopathological examination stated the diagnosis of ALK+ anaplastic large cell lymphoma. We aim to highlight the significance of differential diagnosis in paediatric diseases not responding to treatment, especially intensive antibiotic therapy. In such cases, a systemic disease and neoplastic process should be taken into consideration. Moreover, in diagnostics of skin lesions the clinician should not hesitate to perform a biopsy, which may shorten the time of mistreatment.

Key words: ALCL (anaplastic large cell lymphoma), ALK (anaplastic lymphoma kinase), lymphoma, paediatric oncology

Słowa kluczowe: ALCL (anaplastic large cell lymphoma), ALK (anaplastic lymphoma kinase), chłoniak, onkologia dziecięca

Corresponding authors: magdalena.fadrowska@student.uwm.edu.pl (M. Fadrowska) karol.szleper@student.uwm.edu.pl (K. Szleper)

Jan Herzyk

Krzysztof Jakimów

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach,

Wydział Nauk Medycznych w Katowicach

Studenckie Koło Naukowe Zakładu Radiodiagnostyki, Radiologii Zabiegowej
i Medycyny Nuklearnej

Opiekun: dr hab. n. med. Joanna Pilch-Kowalczyk

ANALIZA PRZYPADKÓW KLINICZNYCH Z PUNKTU WIDZENIA RADIOLOGII PACJENTÓW Z COVID-19 PODDANYCH RESPIRATOROTERAPII

Wstęp

W grudniu 2019 roku w chińskim mieście Wuhan rozpoczęła się epidemia wywołana przez nowego koronawirusa – SARS-CoV-2 (Jin i in. 2020; Li i in. 2020; Pontone i in. 2021; Sidor, Rzymski 2020). Szybko narastająca fala zachorowań na całym świecie doprowadziła do ewolucji w pandemię ogłoszoną oficjalnie 11 marca 2020 roku przez Światową Organizację Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) (Jin i in. 2020), a pierwszy przypadek w Polsce odnotowano już 4 marca 2020 roku (Sidor, Rzymski 2020). Na 1 maja 2021 roku, według danych Ministerstwa Zdrowia, hospitalizacji poddanych było 22 415 osób, z czego 2 723 pacjentów wymagało respiratoroterapii (Raport zakażeń koronawirusem (SARS-CoV-2)). Dziedziną medycyny niezbędą do pełnej diagnostyki pacjentów pulmonologicznych jest radiologia, która umożliwia ocenę stopnia zaawansowania zmian w organizmie podczas przebiegu choroby COVID-19 będącej następstwem infekcji SARS-CoV-2, m.in. dzięki tomografii komputerowej (TK) klatki piersiowej (Alvin i in. 2020; Chan i in. 2020; Jin i in. 2020).

Główne objawy COVID-19 obejmują: gorączkę, dreszcze, kaszel, duszności, bóle mięśni czy zmęczenie (Burke i in. 2020; Jin i in. 2020), a wśród prawie połowy pacjentów prezentujących objawy COVID-19 może wystąpić zespół ostrej niewydolności oddechowej (ARDS, *acute respiratory distress syndrome*) (Gibson i in. 2020). (Jin i in. 2020; Li i in. 2020; Pontone i in. 2021; Sidor, Rzymski 2020).

Tomografia komputerowa w diagnostyce COVID-19

TK jest badaniem, które pozwala na zobrazowanie zdrowych organów oraz tkanek patologicznych z niezwykle dokładnością (Scatliff, Morris 2014). Od kiedy w lutym 2020 roku zespół Huang i in. zaprezentował jako pierwszy raport z badania TK klatki piersiowej bez użycia kontrastu, zmieniło się sporo, a kliniczne wskazania do przeprowadzania badań TK ciągle się zmieniają (Pontone i in. 2021). Obecnie TK jest narzędziem pomocniczym w diagnostyce COVID-19, gdyż do ostatecznego potwierdzenia używa się reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR, *reverse transcription polymerase chain reaction*), cechującą się mniejszą liczbą wyników fałszywie dodatnich (Pontone i in. 2021; Wan i in. 2020). Wśród heterogennego obrazu płuc w badaniu TK wyróżniamy zmiany o charakterze (Huang i in. 2020; Pontone i in. 2021; Wan i in. 2020):

- mleczej szyby,
- konsolidacji,
- zmian wieloogniskowych,
- zacień linijnych,
- kostki brukowej,
- odwróconego halo.

Zmiany najczęściej powstają w tylnych regionach obu płuc (Huang i in. 2020; Jin i in. 2020; Pontone i in. 2021; Shi i in. 2020; Wan i in. 2020). Ponadto dodatkowo korelujące z zaawansowaniem choroby zmiany konsolidacyjne rzadko występują same, lecz raczej towarzyszą im te o charakterze mleczej szyby (Pontone i in. 2021).

Cel

Celem pracy naukowej jest analiza obrazów tomografii komputerowej w powiązaniu z danymi klinicznymi u pacjentów chorujących na COVID-19 i poddanych respiratoroterapii.

Materiał i metody

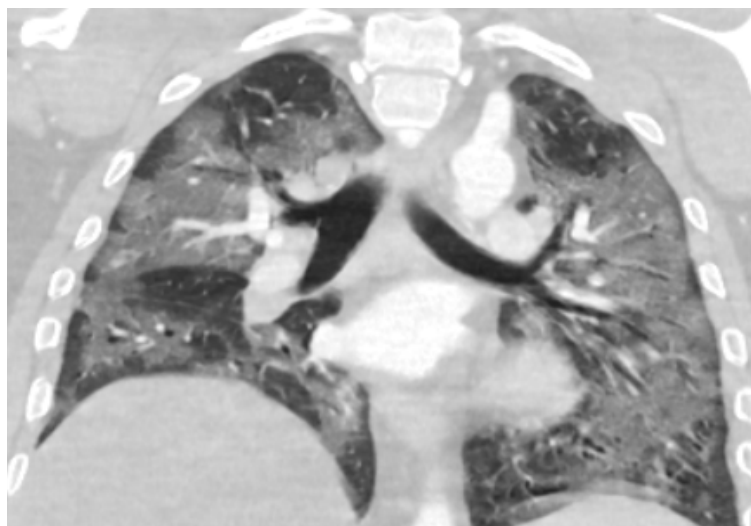
Analiza obejmuje historie choroby trzech pacjentów hospitalizowanych w Oddziale Anestezjologii i Intensywnej Terapii Szpitala Wojewódzkiego w Bielsku-Białej z powodu zespołu ostrej niewydolności oddechowej w przebiegu zapalenia płuc wywołanych przez SARS-CoV-2. U dwóch z nich zostało wykonane badanie tomografii kompute-

rowej klatki piersiowej bez kontrastu zarówno przed, jak i w trakcie respiratoroterapii, u jednego zostały wykonane badania angio-TK tętnic płucnych. W pracy uwzględniono ogólny opis hospitalizacji pacjentów. Każdego z pacjentów poddano sedacji, intubacji dotchawiczej prowadzących do inwazyjnej wentylacji mechanicznej – respiratoroterapii w protokole BiPAP (*bilevel positive airway pressure*).

Pacjent nr 1

Trzydziestopięcioletni mężczyzna przyjęty do Oddziału Anestezjologii i Intensywnej Terapii (OAiT) z ARDS, hipoksemią, tachypnoë oraz zaburzeniami świadomości. Uzyskano ujemny wywiad w kierunku chorób przewlekłych. Tego samego dnia uzyskano dodatni wynik badania PCR w kierunku SARS-CoV-2. W Szpitalnym Oddziale Ratunkowym (SOR) chory w stanie krytycznie ciężkim został poddany sedacji, intubacji dotchawiczej celem wprowadzenia inwazyjnej wentylacji mechanicznej przy użyciu respiratora z FiO₂ 1,0. Zostało wykonane wkłucie centralne oraz założono kaniulę dotętniczą. Wykonano badanie angio-TK tętnic płucnych warstwami 0,625 mm po dożylnym podaniu środka cieniującego ze strzykawki automatycznej w izolatorze. Liczne artefakty ruchowe i oddechowe oraz elementy izolatora utrudniały ocenę badania. Stwierdzono:

- pień płucny, tętnice płucne główne płątowe oraz segmentowe prawidłowej szerokości, z zachowanym przepływem, bez obecności materiału zakrzepowo-zatorowego, co wyklucza cechy zatorowości płucnej,



Rycina 1. Angio-TK tętnic płucnych

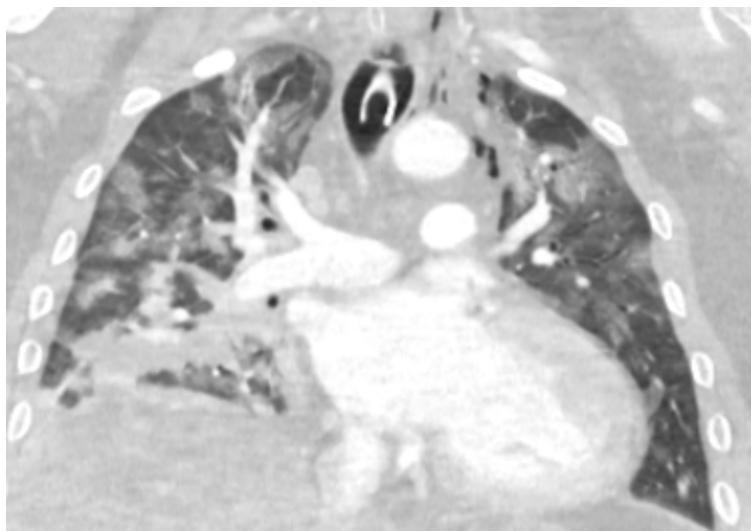
Źródło: opracowanie własne.

- w obu płatach płuc masywne zmiany śródmiąższowe z pogrubieniem przegród między- i śródzrazikowych oraz zagęszczenia typu mlecznej szyby zajmujące ok. 90% tkanki płucnej najprawdopodobniej w przebiegu COVID-19,
- w obszarze opisywanych zmian bronchogram powietrzny,
- jamy opłucnowe wolne,
- wysokie ustawienie przepony po stronie prawej,
- nie uwidoczniono w śródpiersiu powiększonych węzłów chłonnych,
- narządy śródpiersia w badaniu TK prawidłowe,
- obecne cechy stłuszczenia wątroby.

W trakcie przyjęcia pacjenta na OAiIT stwierdzono stan krytycznie ciężki, kontynuowano sedację złożoną oraz wentylację mechaniczną w pozycji odwróconej. Pobrano materiały do badań laboratoryjnych i mikrobiologicznych. Kontynuowano farmakoterapię remdesiwirem, ceftriaksonem, ciprofloksacyną, metronidazolem i metyloprednizolonem. Wdrożono wlew amin katecholowych ze względu na niestabilność hemodynamiczną. W trzeciej dobie po redukcji sedacji zaobserwowano powrót przytomności bez kontaktu logicznego. Usunięto rurkę dotchawiczą i kontynuowano nieinwazyjną wentylację mechaniczną. Uzyskano stopniową stabilizację hemodynamiczną, co pozwoliło na redukcję i zaprzestanie podaży katecholamin. W czwartym dniu hospitalizacji stan ogólny uległ pogorszeniu – doszło do progresji niewydolności oddechowej, a z uwagi na nieprawidłową mechanikę oddychania chory został ponownie zaintubowany dotchawiczo i poddany inwazyjnej wentylacji mechanicznej. Kolejnego dnia stwierdzono podwyższenie parametrów stanu zapalnego (PCT > 100 ng/ml, IL-6 > 5000 pg/ml). Włączono tocilizumab i zintensyfikowano antybiotykoterapię. Zaobserwowano ponadto anurię oraz cechy ostrego uszkodzenia nerek, dlatego założono pod kontrolą USG z lewego dostępu udowego kaniulę dializacyjną, rozpoczęto terapię nerkozastępczą z antykoagulacją regionalną oraz hemoperfuzję. Obserwowano narastające zaburzenia metaboliczne, wzrost poziomu mleczanów pomimo terapii nerkozastępczej, hipoglikemię oraz zaburzenia perfuzji obwodowej. Nastąpił incydent migotania komór z hipotensją. Elektroterapia okazała się być nieskuteczna, włączono podaż landiololu i zwolniono pracę serca. W związku z pogłębiającą się hipotensją, pomimo zwiększonej podaży płynów, zastosowano wlew argipresyny. U pacjenta nastąpiło nagle zatrzymanie krążenia (NZK) w mechanizmie aktywności elektrycznej bez tętna (PEA, *pulsless electrical activity*). Wdrożone procedury resuscytacyjne doprowadziły do powrotu spontanicznego krążenia. Wykonano pilną diagnostykę obrazową. W obrazie USG jamy brzusznej zaobserwowano odcinkową niedrożność jelita cienkiego, powiększoną i stłuszczoną wątrobę oraz zmiany niedokrwienne nerek. W badaniu angio-TK tętnic płucnych warstwami 0,625 mm stwierdzono:

- aorta piersiowa bez zmian, brak cech zatorowości centralnej,
- ½ grzbietowa płuc w skonsolidowanym nacieku niedodmowo-zapalnym,
- grzbietowo obszary zagęszczeń typu mlecznej szyby zajmujące ok. 90% tkanki płucnej,

- śladowa odma śródpiersia,
- rurka tracheostomijna w tchawicy, wklucie centralne z kocówką w żyłę główną górną (ŻGG).



Rycina 2. Angio-TK tętnic płucnych

Źródło: opracowanie własne.

Wyrównano zaburzenia gospodarki wodno-elektrolitowej. Pomimo zastosowanej procedury stwierdzono pogłębiającą się kwasicę metaboliczną. Ponadto utrzymywała się hipotensja niezależnie od wlewu amin presyjnych (argipresyny, noradrenaliny, a następnie adrenaliny) z zaburzeniami perfuzji obwodowej. Stan pacjenta określono jako krytycznie ciężki, z dynamicznym pogarszaniem się stanu ogólnego i nasilającymi się objawami niewydolności narządowej pomimo zastosowania plejotropowego leczenia. W szóstej dobie wystąpiło kolejne NZK w mechanizmie PEA. Czynności resuscytacyjne okazały się nieskuteczne, wobec czego stwierdzono zgon.

Pacjent nr 2

Pacjent w wieku 89 lat przyjęty do OAiIT z Oddziału Chorób Wewnętrznych o profilu COVID z powodu narastania objawów niewydolności oddechowej w przebiegu wirusowego zapalenia płuc o etiologii SARS-CoV-2. W wywiadzie gorączka od czterech dni poprzedzających przyjęcie do szpitala, kiedy chory zgłosił się na SOR z powodu krwimoczju. Wykonano badanie TK klatki piersiowej bez kontrastu warstwami o grubości 1,25mm:

- w obu jamach opłucnowych obecny płyn – po stronie prawej warstwa ok. 7 mm, po stronie lewej ok. 9 mm,
- w zakresie tkanki płucnej głównie obwodowo widoczne zagęszczenia typu mlecznej szyby zajmujące obszary o średnicy do 2,5 cm; zmiany na tle pogrubiąłego zrębu – obraz charakterystyczny dla infekcji wirusowej,
- niezbyt nasilone zagęszczenia nadprzeponowo,
- zajęte ok. 15% miąższu płucnego,
- drzewo oskrzelowe drożne,
- rozedma centrilobularna oraz podopłucnowa,
- sylwetka serca w normie, węzły chłonne niepowiększone,
- przepuklina rozworu przełykowego.



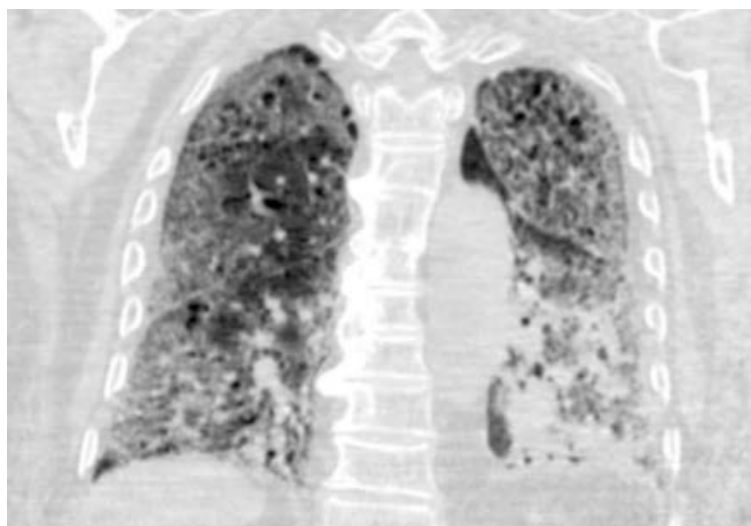
Rycina 3. Tomografia komputerowa klatki piersiowej bez kontrastu

Źródło: opracowanie własne.

W warunkach oddziału pacjenta zamonиторowano, zastosowano wysokoprzepływową tlenoterapię przez kaniulę nosową z przepływem 60l/min i wdechowym stężeniem tlenu równym 100%. Założono wkłucie centralne, pobrano materiał do badań laboratoryjnych i mikrobiologicznych. Kontynuowano antybiotykoterapię i leczenie remdesivirem, zastosowano sedację dexodrem, wdrożono sterydoterapię. Ze względu na progresję niewydolności oddechowej w dziewiątej dobie wdrożono wentylację nieinwazyjną z FiO_2 ok. 0,8. W dziesiątej dobie hospitalizacji nastąpiło znaczne pogorszenie parametrów wymiany gazowej pacjenta, w związku z czym wdrożono inwazyjną wentylację mechaniczną w protokole BiPAP z FiO_2 1,0. Zdiagnozowano migotanie przedsionków na zmianę z częstoskurczem komorowym przy nieskutecznej farmako-

i elektroterapii. Po modyfikacji leczenia antyarytmicznego (wlew lanidololu) uzyskano zwolnienie rytmu, układ krążenia wspierano wlewem noradrenaliny. Wykonano kontrolne TK klatki piersiowej bez kontrastu warstwami o grubości 1,25 mm:

- w obu płucach widoczne rozległe zmiany śródmiąższowe o charakterze mleczonej szyby, a w płatach górnych wyraźnym rysunkiem siateczki,
- w płacie dolnym płuca lewego widoczne obszary zmian konsolidacyjnych,
- w obszarze opisywanych zmian bronchogram powietrzny,
- w górnych partiach płuc zmiany rozedmowe, podopłucnowo drobne pęcherze rozedmowe – znaczna progresja w porównaniu ze wcześniejszym obrazem TK – zajęte ok. 80% miąższu płuc,
- węzły chłonne śródpiersiowe niepowiększone,
- zwapnienia miażdżycowe w aorcie piersiowej i t. wieńcowych,
- przepuklina rozworu przełykowego przepony,
- zgłębnik żołądkowy w przełyku,
- powiększona tarczyca z hyperdensyjnymi guzkami.



Rycina 4. Tomografia komputerowa klatki piersiowej bez kontrastu

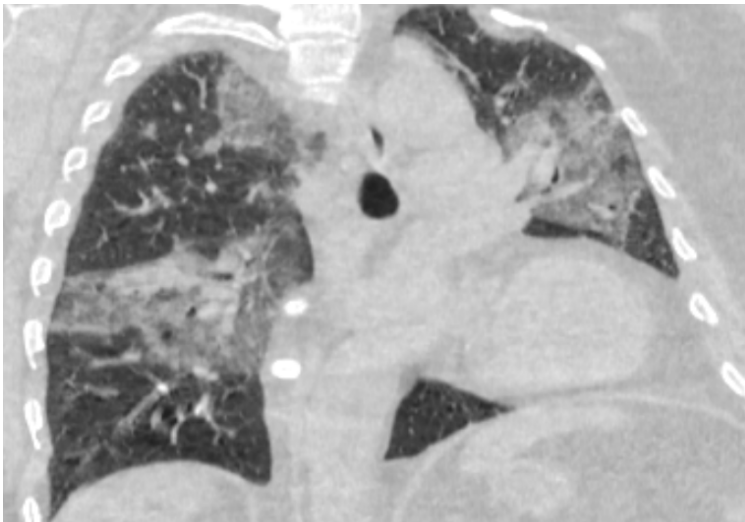
Źródło: opracowanie własne.

Pomimo wielokierunkowego leczenia stan pacjenta pozostawał krytycznie ciężki, narastały zaburzenia wymiany gazowej, utrzymywały się zaburzenia rytmu serca, cechy niewydolności krążenia oraz hipotensja pomimo stałego zwiększania dawki noradrenaliny. W 18. dniu doszło do zatrzymania krążenia w mechanizmie bradyasystolii, a wobec wyczerpania możliwości terapeutycznych stwierdzono zgon.

Pacjent nr 3

Sześćdziesięcioośmioletni pacjent z nadciśnieniem tętniczym, otyłością III stopnia i cukrzycą typu 2 został przyjęty na OAiIT z Oddziału Chorób Wewnętrznych z powodu całkowitej niewydolności oddechowej w przebiegu zapalenia płuc o etiologii SARS-CoV-2. Pomimo wdrożonego leczenia (tlen przez kaniulę nosową, sterydoterapia, podwójna antybiotykoterapia, próba stabilizacji hiperglikemii) narastały cechy niewydolności oddechowej. Wykonano obrazowanie TK klatki piersiowej bez kontrastu warstwami grubości 1,25 mm:

- obustronnie w płucach liczne rozlane zagęszczenia śródmiąższowe o charakterze mleczej szyby i kostki brukowej – odcinkowo zlewające się w większe zmiany zajmujące prawie cały górny płat płuca lewego i segment szósty płuca prawego,
- w pozostałych segmentach zmiany o charakterze rozlanym, mniej nasilonym,
- całość obrazu sugeruje zmiany zapalne w przebiegu COVID-19,
- wolnego płynu w jamach opłucnowych nie uwidoczniło,
- zmiany miażdżycowe tętnic wieńcowych,
- zmiany zwyrodnieniowo-wytwórcze kręgosłupa Th,
- poza tym narządy śródpiersia bez innych uchwytnych patologii,
- węzły chłonne śródpiersia niepowiększone.



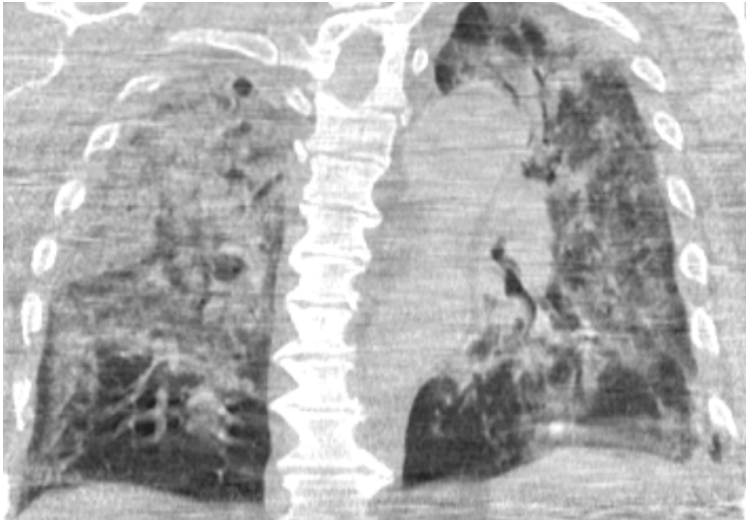
Rycina 5. Tomografia komputerowa klatki piersiowej bez kontrastu

Źródło: opracowanie własne.

W chwili przekazania do OAiIT chory niespokojny, z bardzo nasiloną dusznością, tachypnoe 50/min. Zastosowano wysokoprzepływową tlenoterapię przez kaniulę noso-

wą (przepływ 60l/mil). Włączono sedację wlewem dexmedetomidyny, kontynuowano antybiotykoterapię. Po ok. 2 godzinach nastąpiła poprawa kliniczna i gazometryczna pacjenta. Pojedyncze dodatkowe pobudzenia komorowe – stan układu krążenia względnie stabilny. Pojawiła się gorączka 39°C, więc włączono leki przeciwgorączkowe. W drugiej dobie hospitalizacji ze względu na pogorszenie się saturacji krwi zastosowano nieinwazyjną wentylację w protokole BiPAP. W piątej dobie wykonano kontrolne TK płuc bez kontrastu warstwami grubości 1,25 mm:

- w obu płucach dominujące zmiany typu mlecznej szyby z pogrubiętymi przegrodami międzyzrakowymi, które uległy wyraźnej progresji w płucu prawym i dolnym płacie płuca lewego w porównaniu ze wcześniejszym TK,
- w płacie górnym lewym, gdzie w poprzednim badaniu zmiany były najbardziej nasilone – regresja, poza szczytem płuc, gdzie widoczne świeże zmiany śródmiąższowe,
- jamy opłucnowe wolne,
- zmiany zwyrodnieniowo-wytwórcze kręgosłupa Th,
- poza tym narządy śródpiersia bez innych uchwytnych patologii.



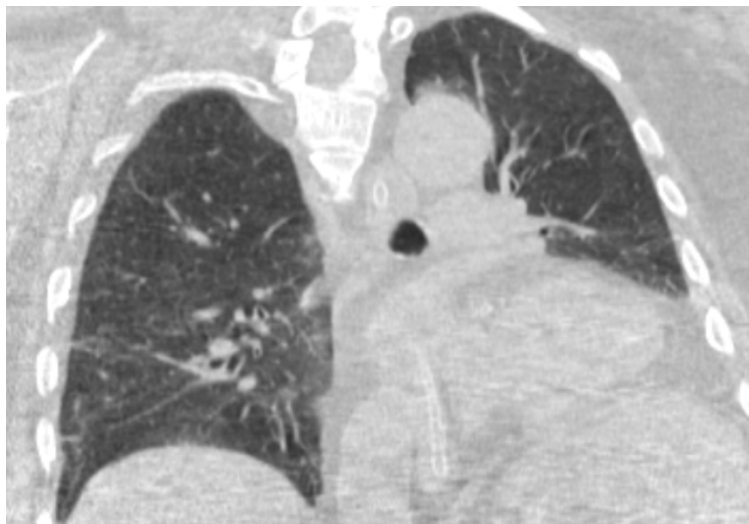
Rycina 6. Tomografia komputerowa klatki piersiowej bez kontrastu

Źródło: opracowanie własne.

W tym samym dniu nastąpiła progresja niewydolności oddechowej: zastosowano sedację, zwiotczenie oraz zaintubowano i wdrożono wentylację mechaniczną w protokole BiPAP. Siódmego dnia nastąpiła oliguria mimo podaży diuretyku pętlowego i mannitolu. Ze względu na ciężki stan ogólny i brak reakcji na zastosowane leczenie podano tocilizumab w dawce 800 mg jednorazowo. Następnego dnia ze względu na

utrzymującą się oligurię założono wkłucie dializacyjne z dostępu przez żyłę szyjną wewnętrzną prawą pod kontrolą USG i wdrożono zabieg nerkozastępczy z antykoagulacją ogólnoustrojową heparyną. Po uzyskaniu zgody komisji bioetycznej przetoczono jedną jednostkę zgodnego grupowo osocza ozdrowieńców zawierającą 1500 przeciwciał, przy czym nie odnotowano powikłań po tej procedurze. Ze względu na ponownie narastające poziomy stanu zapalnego przetoczono drugą dawkę tocilizumabu. W czternastej dobie wykonano kolejne TK klatki piersiowej bez kontrastu warstwami grubości 1,25 mm:

- w obu płucach nastąpiła prawie całkowita regresja zmian widocznych we wcześniejszych badaniach,
- pozostały niewielkie zagęszczenia u podstawy płuc (najpewniej ortostatyczne i niedodmowe w segmencie dziesiątym lewym),
- jamy opłucnowe wolne,
- narządy śródpiersia w badaniu TK bez uchwytnych zmian
- rurka intubacyjna w tchawicy.
- zmiany zwyrodnieniowe w kręgosłupie Th.



Rycina 7. Tomografia komputerowa klatki piersiowej bez kontrastu

Źródło: opracowanie własne.

Okresowo obserwowano migotanie przedsionków z szybką akcją komór (zastosowano doraźne leczenie farmakologiczne) oraz wykonano kardiowersję, przywracając zatokowy rytm serca zaburzony mnogimi pobudzeniami nad- i komorowymi. Odstawiono sedację, lecz nie obserwowano powrotu świadomości. Ze względu na przedłużającą się intubację w dziewiętnastym dniu przyłóżkowo wykonano zabieg tracheotomii przezskórnej w asyście bronchoskopii. Kontynuowano antykoagulację heparynową. Pomimo zastosowanego wieloprofilowego leczenia nie uzyskano poprawy stanu pacjen-

ta. Narastające zaburzenia układu krążenia leczono aminami presyjnymi na podstawie parametrów hemodynamicznych. Obserwowano narastające zaburzenia metaboliczne – cechy niewydolności wielonarządowej z dominującą niewydolnością krążenia i zaburzeniami perfuzji obwodowej. W 22. dobie hospitalizacji nastąpiła krytyczna bradykardia z hipotonią. Zastosowane leczenie okazało się bezskuteczne i stwierdzono zgon.

Wyniki

We wszystkich trzech analizowanych przypadkach obrazem dominującym w okresie sprzed respiratoroterapii jest obraz mleczej (matowej) szyby świadczący głównie o wypełnieniu płynem pęcherzyków płucnych, co powoduje w obrazie radiologicznym nieznaczne zacinienie i ujawnienie rysunku naczyniowego. Zaobserwowano również zmiany o charakterze kostki brukowej, czyli zmiany o charakterze mleczej szyby w połączeniu z pogrubieniem przegród międzyzrazikowych i śródzrazikowych jako wykładnik obrzęku ścian pęcherzykowych. Zmiany te obejmują oba płuca z różnym stopniem zaawansowania. W opisywanych zmianach we wszystkich przypadkach uwidoczniło się bronchogram powietrzny. U dwóch pacjentów stwierdzono jamy opłucnowe wolne od płynu, z kolei u trzeciego pacjenta płyn był obecny.

Nie uwidoczniło się również powiększonych węzłów chłonnych. U jednego z pacjentów opisywano także rozedmę centrilobularną i podopłucnową oraz przepuklinę rozworu przełykowego, a u innego zmiany miażdżycowe tętnic wieńcowych oraz zmiany zwyrodnieniowo-wytwórcze kręgosłupa w odcinku piersiowym. Pozostałe narządy śródpiersia opisywano bez zmian.

W kontrolnym TK w czasie respiratoroterapii u dwóch pacjentów zaobserwowano progresję nasilenia zmian o typie mleczej szyby oraz zmian konsolidacyjnych w wyniku całkowitego wypełnienia pęcherzyków płynem. Zaobserwowane zmiany występują w różnych segmentach płucnych, podobnie jak w pierwszym obrazowaniu. W jednym przypadku zaobserwowano zmiany o charakterze niedodmowym, z kolei w innym o charakterze rozedmowym. Z kolei u trzeciego pacjenta obserwowano postępującą regresję zmian widocznych we wcześniejszych badaniach. Pozostałe zobrazowane narządy opisywano bez istotnych klinicznie zmian.

Dyskusja

Widoczna progresja zmian w tkance płucnej spowodowana jest pogarszającym się stanem klinicznym każdego pacjenta. W wyniku gromadzenia się płynu wysiękowego jako wykładnika stanu zapalnego w obrębie pęcherzyków płucnych dochodzi do

powstawania zacienień obserwowanych jako obszary mlecznej szyby (Ptak i in. 2011). W przypadku zmian o charakterze konsolidacyjnym całe światło pęcherzyka jest wypełnione płynem. Zmiany o typie mlecznej szyby oraz konsolidacji dodatnio korelują z częstością stosowania respiratoroterapii oraz ryzykiem zgonu (Xu i in. 2020). Pojawiające się obszary niedodmy resorpcyjnej są skutkiem zatkania płynem wysiękowym. Powyższe obrazy oraz widoczny bronchogram powietrzny są zmianami charakterystycznymi dla ARDS (Mojoli i in. 2019; Ptak i in. 2011).

W związku z tym we wszystkich analizowanych przypadkach podjęto decyzję o zastosowaniu wentylacji mechanicznej, gdyż poprawia ona rokowanie pacjentów, lecz śmiertelność nadal osiąga ponad 80% w grupie osób wymagających wspomaganego oddychania (Wunsch 2020). Wskazane obrazy radiologiczne sugerują zapalenie płuc w przebiegu infekcji wirusowej, co zostało w każdym przypadku potwierdzone dodatnim wynikiem testu metodą RT-PCR na obecność SARS-CoV-2. Dodatkowo obrazowanie TK, umożliwia wykrycie przedklinicznej postaci miażdżycy naczyń wieńcowych, wpływającej na wzrost śmiertelności oraz potwierdza konieczność zastosowania intubacji dotchawiczej (Pontone i in. 2021).

Krytyczne zaburzenia hemodynamiki spowodowały zgon wszystkich pacjentów, pomimo zastosowania wieloprofilowego leczenia. W swojej pracy z 2021 roku Pontone i in. opisali pacjenta wymagającego podaży tlenu z zastosowaniem stałego dodatniego ciśnienia w drogach oddechowych, u którego zmiany w płucach widoczne w badaniu TK ustąpiły. Z kolei w 2020 roku Meng i in. zaobserwowali progresję zmian w płucach, pomimo zastosowania intubacji, lecz nie stwierdzili, czy miała ona na nie wpływ. Autorzy pracy uważają, że aby określić wpływ respiratoroterapii na miąższ płuczny potrzeba większej liczby badań oraz liczniejszej grupy badanych.

Warto dodać, że coraz większa liczba badań TK chorych na COVID-19 w połączeniu z odpowiednimi algorytmami oceny obrazów pozwalają nie tylko określić, czy pacjent może być chory z powodu infekcji koronawirusa (Jin i in. 2020), ale także z dokładnością sięgającą do 75% przewidzieć prawdopodobieństwo konieczności stosowania wentylacji mechanicznej (Chan i in. 2020). Jest to dobra informacja, gdyż lekarze klinicyści muszą precyzyjnie ustalić, czy pacjent wymaga respiratoroterapii czy jeszcze nie (Berlin i in. 2020).

Podsumowanie

Tomografia komputerowa jest obecnie bardzo miarodajną metodą weryfikacji efektów leczenia COVID-19 przy użyciu respiratoroterapii. Umożliwia ocenę miąższu płuc, a także innych narządów śródpiersia pod kątem powikłań infekcji SARS-CoV-2, co stanowi ważną pomoc w doborze odpowiedniego leczenia. Bez wykorzystania tej metody obrazowania ocena stanu klinicznego pacjenta pozostaje utrudniona. Z pew-

nością można stwierdzić, że potrzeba bardziej obszernych analiz dotyczących respiratoroterapii pacjentów chorujących na chorobę COVID-19, aby określić wpływ jej wpływ na miąższ płuczny, jednakże ze względu na bardzo wysoką śmiertelność, wynoszącą niemal 80% wśród pacjentów poddanych inwazyjnej wentylacji mechanicznej, jest to bardzo utrudnione.

Bibliografia

- Alvin M.D., George E., Deng F., Warhadpande S., Lee S. I. 2020. The Impact of COVID-19 on Radiology Trainees, *Radiology*, 296(2):246–248.
- Berlin D.A., Gulick R.M., Martinez F. J. 2020. Severe Covid-19, *N. Engl. J. Med.*, 383(25): 2451–2460.
- Burke R.M., i wsp. 2020. Symptom Profiles of a Convenience Sample of Patients with COVID-19 - United States, January-April 2020, *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 69(28).
- Chan J.C.X., Kwok K.Y., Ma J.K.F., Wong Y.C. 2020. Radiology and COVID-19, *Hong Kong Med. J.*, 26(4): 286–288.
- Gibson P.G., Qin L., Puah S.H. 2020. COVID-19 acute respiratory distress syndrome (ARDS): clinical features and differences from typical pre-COVID-19 ARDS, *Med. J. Aust.*, 213(2): 54–56.
- Huang C., i wsp. 2020. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China, *Lancet*, 395(10223): 497–506.
- Jin Y., Yang H., Ji W., Wu W., Chen S., Zhang W., Duan G. 2020. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of covid-19, *Viruses*. 12(4): 372.
- Li Q., Guan X. i wsp. 2020. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia, *N. Engl. J. Med.*, 382(13): 1199–1207.
- Meng L., Qiu H., Wan L., Ai Y., Xue Z., Guo Q., Deshpande R., Zhang L., Meng J., Tong C., Liu H., Xiong L. 2020. Intubation and Ventilation amid the COVID-19 Outbreak: Wuhan's Experience, *Anesthesiology*, 132(6): 1317–1332.
- Mojoli F., Bouhemad B., Mongodi S., Lichtenstein D. 2019. Lung ultrasound for critically ill patients, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 199(6): 701–714.
- Pontone G., i wsp. 2021. Role of computed tomography in COVID-19, *J. Cardiovasc. Comput. Tomogr.*, 5(1): 27–36.
- Ptak J., Pawłowski J., Bustry I. 2011. Badania obrazowe w zapaleniach płuc u dorosłych, *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 79(1).
- Raport zakażeń koronawirusem (SARS-CoV-2). <https://www.gov.pl/web/koronawirus/wykaz-zarazen-koronawirusem-sars-cov-2> (dostęp: 1.05.2021 r.).
- Scatliff J.H., Morris P.J. 2014. From Röntgen to Magnetic Resonance Imaging, *N. C. Med. J.*, 75(2): 111–3.
- Shi H., Han X., Jiang N., Cao Y., Alwalid O., Gu J., Fan Y., Zheng C. 2020. Radiological findings from 81 patients with COVID-19 pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study, *Lancet Infect. Dis.*, 20(4): 425–434.
- Sidor A., Rzymski P. 2020. Dietary choices and habits during COVID-19 lockdown: Experience from Poland, *Nutrients*, 12(6).
- Wan D.Y., Luo X.Y., Dong W., Zhang Z. W. 2020. Current practice and potential strategy in diagnosing COVID-19, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 24(8): 4548–4553.

- Wunsch H. 2020. Mechanical ventilation in COVID-19: Interpreting the current epidemiology, *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 202(1): 1–4.
- Xu Q., Zhan X., Zhou Z., Li Y., Xie P., Zhang S., Li X., Yu Y., Zhou C., Zhang L., Gevaert O., Lu G. 2020. CT-based Rapid Triage of COVID-19 Patients: Risk Prediction and Progression Estimation of ICU Admission, Mechanical Ventilation, and Death of Hospitalized Patients, medRxiv.

Abstract

COMPUTED TOMOGRAPHY IN PATIENTS WITH COVID-19 SUBJECT TO RESPIRATOR THERAPY – CASE ANALYSIS

The COVID-19 pandemic has been a huge challenge for modern medicine, especially for radiologist and intensive care doctors. Computed tomography (CT) of the thorax (and sometimes CT-Angi) is often performed in cases requiring respirator therapy. This paper presents the results of CT examinations and medical history of three patients hospitalized in the Department of Anaesthesiology and Intensive Therapy of the Provincial Hospital in Bielsko-Biała before and during the use of assisted invasive mechanical ventilation in order to assess its effect of changes in the lungs and other mediastinal organs caused by SARS-CoV- infection. CT of the thorax is recognized as a golden standard modality for assessment of lesions in lungs in patients with COVID-19 including patients with ARDS (acute respiratory distress syndrome). The results of this analysis are very important in the context of making therapeutic decisions. It is not possible to unequivocally demonstrate the relationship between ventilator therapy and the radiographic image of the lung parenchyma, but the necessity to use mechanical ventilation can be predicted with an accuracy of up to 75% of probability (Chan 2020). It is certain that this issue requires more studies, but high mortality - 80% (Wunsch 2020) among patients undergoing invasive mechanical ventilation makes this task difficult.

Słowa kluczowe: covid19, respiratoroterapia, TK

Keywords: covid19, respirator therapy, CT scan

**SEKCJA NAUK
O ZDROWIU**

Paulina Cwalińska-Gwiazda

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Koło Naukowe Psychiatrii Klinicznej „Psychotropieciele”

PANDEMIA COVID-19 A DEPRESJA

Wstęp

Pandemia według definicji PWN to nazwa epidemii o szczególnie dużych rozmiarach, obejmującej kraje, a nawet kontynenty (Encyklopedia internetowa PWN, <https://encyklopedia.pwn.pl/>, 10.04.2021).

Zgodnie z kwalifikacją DSM-5 depresja jest powszechnym i poważnym zaburzeniem nastroju. Osoby cierpiące na depresję doświadczają ciągłego uczucia smutku i beznadziejności oraz tracą zainteresowanie czynnościami, które kiedyś sprawiały im przyjemność. Oprócz problemów emocjonalnych spowodowanych depresją, osoby mogą również wykazywać fizyczne objawy, takie jak przewlekły ból lub problemy z trawieniem. Aby depresja mogła być zdiagnozowana, jej objawy muszą występować przez co najmniej dwa tygodnie (<https://www.psycom.net/>, 10.04.2021). Pandemia COVID-19 stawia człowieka w obliczu różnych trudności, takich jak: izolacja społeczna, stres związany z zagrożeniem chorobą oraz utratą bliskich, utrata zatrudnienia, problemy ekonomiczne i wiele innych (Shader 2020). Tak wiele aspektów może wpływać na zdrowie psychiczne populacji, w znaczącej ilości artykułów poruszono w związku z tym tematykę depresji (Vindegaard 2020).

Cel

Celem pracy jest zgromadzenie informacji dotyczących wpływu pandemii COVID-19 na zdrowie psychiczne, przede wszystkim występowanie zaburzeń depresyjnych, wśród pacjentów psychiatrycznych i ogółu społeczeństwa (efekt pośredni), dzięki wykorzystaniu literatury naukowej.

Materiały i metody

W pracy zostały wykorzystane materiały wtórne. Do wtórnych źródeł, które zastosowano w trakcie pisania pracy, należy literatura naukowa dotycząca tematu pracy, w tym artykuły naukowe opisujące:

- objawy psychiatryczne/zachorowalność na depresję pacjentów z obecną lub wcześniejszą infekcją SARS-CoV-2;
- badania mierzące objawy psychiatryczne/zachorowalność /zdrowie psychiczne podczas COVID-19 u badanych, podzielone na pracowników ochrony zdrowia, młodzież, kobiety w ciąży, osoby starsze;
- artykuły naukowe opisujące zachorowalność u chorych psychiatrycznych.

Źródła zgromadzono, przeszukując bazy danych PubMed oraz Google Scholar. Uwzględniono artykuły opublikowane w językach angielskim oraz polskim. Okres publikacji był nieograniczony. Poszukiwania przeprowadzono między 7 a 10 kwietnia 2021 roku.

Wyniki

Wpływ pandemii na istniejące przedpandemicznie problemy psychiatryczne

U pacjentów z występującymi już przed pandemią COVID-19 zaburzeniami depresyjnymi głównym zagrożeniem jest utrata normalnej, codziennej rutyny, rytmu społecznego, a tym samym zwiększający się poziom stresu, co jeszcze bardziej podnosi poziom kortyzolu, powodując zaostrzenie objawów depresyjnych (Chatterjee 2020). Kwarantanna może prowadzić do różnego rodzaju problemów. Mogą pojawić się uczucia strachu, złości, niepokoju i paniki z powodu trudnej sytuacji pandemicznej, poczucie samotności i winy z powodu braku rodziny. U osób z wcześniejszym zaburzeniem psychiatrycznym wszystkie te problemy mogą pojawiać się z nowym nasileniem, co prowadzi do zespołu stresu pourazowego, a nawet myśli samobójczych i próby samobójczej. Lęk może być tak przytłaczający, że może wywołać paranoję i nihilistyczne urojenia (Brooks i in. 2020).

W przypadku pacjentów z zaburzeniami związanymi z używaniem leków okres ten może okazać się śmiertelny, ponieważ może dojść do braku dostępności substancji lub leków, co wywoła poważne objawy odstawienia i nagłe stany, takie jak: majaczenie lub napady drgawek, które mogą zagrażać życiu z powodu ograniczonego dostępu do zmniejszonej liczby służb ratowniczych (Xiang i in. 2020).

Depresja u ozdrowieńców

Konsekwencje psychiatryczne zakażenia SARS-CoV-2 mogą być spowodowane zarówno przez odpowiedź immunologiczną na samego wirusa, jak i przez stresory psychologiczne, takie jak: izolacja społeczna, wpływ nowej, ciężkiej i potencjalnie śmiertelnej choroby, obawy przed zarażeniem innych. Odpowiedź immunologiczna na koronawirusy indukuje lokalną i ogólnoustrojową produkcję cytokin, chemokin i innych mediatorów zapalenia (Cameron i in. 2008). Pacjenci z COVID-19 wykazują wysoki poziom interleukin IL-1 β , IL-6, IL-4 i IL-10, interferonu (IFN)- γ , CXCL10 i CCL2, co sugeruje aktywację funkcji limfocytów Th1. Dysregulacja cytokin (zwłaszcza IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α i TGF- β) łączy się z czynnikami, które wiążą się z zaburzeniami psychicznymi (Kohler i in. 2017). Wyjściowe markery stanu zapalnego podczas ostrego COVID-19 to m.in.: CRP, NLR, MLR i ogólnoustrojowy wskaźnik immunozapalny (SII) (Feng i in. 2020). W pewnym badaniu wykazano związek między wyższym poziomem SII a wystąpieniem dużego zaburzenia depresyjnego (MDD) (Zhou i in. 2020), co sugeruje, że może to być marker zapalenia obserwowanego w zaburzeniach nastroju (Benedetti i in. 2020).

Wpływ pandemii na występowanie depresji u młodzieży

Pandemia COVID-19 wiąże się ze zmianą funkcjonowania młodzieży. Stresujące wydarzenia życiowe, przedłużone zamknięcie w domu, przemoc wewnątrzrodzinna, nadużywanie Internetu i mediów społecznościowych to czynniki, które mogą wpływać na zdrowie psychiczne nastolatków w trakcie tego okresu (Guessoum i in. 2020). Pandemia może spowodować nasilenie zaburzeń psychiatrycznych, takich jak zespół stresu pourazowego, zaburzenia depresyjne i lękowe. U młodzieży z zaburzeniami psychiatrycznymi istnieje ryzyko przerwy lub zmiany w opiece i leczeniu, co przełoży się na odczuwanie nasilonych objawów. Indywidualne, rodzinne i społeczne zdolności radzenia sobie są czynnikami związanymi ze zdrowiem psychicznym nastolatków w czasie kryzysu.

Podczas badania przeprowadzonego wśród 8079 chińskich nastolatków w wieku 12–18 lat zanotowano, że zgłaszali oni dużą częstość występowania objawów depresji (43%), lęku (37%) oraz połączenia depresji i lęku (31%) w okresie wybuchu COVID-19 (Zhou i in. 2020). Największym czynnikiem ryzyka wystąpienia tych objawów była płeć żeńska. Badania dotyczące zdrowia psychicznego nastolatków podczas pandemii COVID-19 potwierdzają hipotezę o ryzyku wystąpienia zespołu stresu pourazowego, depresji i lęku (Guessoum i in. 2020).

W przypadku niektórych nastolatków zgony wywołane przez pandemię COVID-19 są ich pierwszymi doświadczeniami ze śmiercią (Guessoum i in. 2020). Szczególnie śmierć rodziców jest czynnikiem ryzyka rozwoju depresji u nastolatków (Gray i in. 2011). Po-

nadto młodzież z historią depresji jest dodatkowo narażona na długotrwałe cierpienie psychiczne związane z nagłą utratą rodzica lub lękiem o ich utratę (Melhem i in. 2011).

Wpływ pandemii na występowanie zaburzeń depresyjnych u osób starszych

Częstość występowania depresji u osób starszych na całym świecie szacuje się na 20% (Górski i in. 2020). W jednym ze śląskich Zakładów Opiekuńczo-Lekarskich przeprowadzono badanie w celu określenia wpływu pandemii na występowanie depresji. Wykazano, iż w lutym 2020 roku (okres przed izolacją) na depresję cierpiało 12,1% rezydentów, natomiast w marcu 2020 roku po wprowadzeniu izolacji – już 27,6%. Z czasem, gdy umożliwiono rezydentom tego ośrodka spotkanie się w warunkach reżimu sanitarnego z bliskimi, odsetek ten spadł odpowiednio w kwietniu i maju do 22,4% oraz 13,8% (Górski i in. 2020). Odzwierciedleniem tego była również częstość interwencji psychiatrycznych i psychologicznych, która początkowo wzrosła, a następnie zmalała. W badaniu tym wykazano, że jednym z istotnych czynników wpływających na rozwój depresji jest poczucie osamotnienia i izolacji, szczególnie u osób starszych (Górski i in. 2020). Wpływ miało również poczucie silnego stresu związanego z pandemią COVID-19 (Górski i in. 2020). Z kolei inne badania wykazały, że poczucie samotności silnie koreluje ze wzrostem wartości GDS (Geriatryczna skala oceny depresji), co oznacza, że im wyższe jest poczucie samotności, tym bardziej wzrasta nasilenie zaburzeń depresyjnych (Taita i in. 2019).

Dodatkowym czynnikiem obciążającym, który wykazano w badaniach (Chapman i in. 2008), jest fakt, że wraz ze wzrostem natężenia występowania objawów depresyjnych wzrasta częstość występowania chorób somatycznych. Jedną z teorii wyjaśniających to zjawisko jest fakt, że zaburzenia depresyjne mogą się przyczyniać do upośledzenia funkcjonowania układu immunologicznego oraz sprzyjają występowaniu nasilonych procesów zapalnych (Hybels i in. 2009).

Wpływ pandemii na występowanie depresji u kobiet ciężarnych

Objawy lęku i depresji w ciąży zwykle dotyczą od 10 do 25% kobiet (Lebel i in. 2020). Podwyższone objawy depresji i lęku wiążą się ze zwiększonym ryzykiem porodu przedwczesnego, depresji poporodowej i trudności behawioralnych u dzieci. Obecna pandemia COVID-19 jest wyjątkowym stresorem o potencjalnie rozległych konsekwencjach dla ciąży. W swojej pracy Lebel (Lebel i in. 2020) wskazuje na niepokojąco podwyższone objawy lęku i depresji u ciężarnych podczas pandemii COVID-19 (37% badanych kobiet miało kliniczne objawy depresji), które mogą mieć długoterminowe skutki dla ich dzieci. Objawy te mogą być nasilane przez czynniki takie, jak: lęk o własne zdrowie i życie, zdrowie dziecka, niewystarczająca opieka prenatalna i izolacja społeczna (Lebel i in. 2020).

Istotnym czynnikiem stresowym wywołanym przez pandemię jest odebranie możliwości porodów rodzinnych. Jeśli ograniczy się przyszłym matkom możliwość porodu rodzinnego, poziom stresu wzrasta i częściej stosuje się cięcie cesarskie. Wzmaga to wystąpienie depresji poporodowej i utrudnia nawiązania więzi matki z dzieckiem, co z kolei prowadzi do depresji w całej rodzinie (Bielawska-Batorowicz, Kossakowska-Petrycka 2006). Potencjalne czynniki ochronne obejmują takie działania, jak: zwiększone wsparcie społeczne, ćwiczenia fizyczne (Lebel i in. 2020), większą ilość czasu spędzaną z partnerem z powodu izolacji, a także wspólne wypełnianie obowiązków domowych, zwolnienie tempa życia oraz wypoczynek (Studniczek, Kossakowska 2020). Takie postępowanie sprzyja zmniejszeniu negatywnych objawów i w ten sposób łagodzi długoterminowe ujemne skutki.

Wpływ pandemii na występowanie depresji u pracowników ochrony zdrowia

W przeglądzie literatury zaobserwowano ogólny wysoki wpływ pandemii COVID-19 na stan zdrowia psychicznego pracowników ochrony zdrowia i pacjentów z wcześniej istniejącymi chorobami lub COVID-19. Najczęstsze wskaźniki psychologiczne zgłaszane w badaniach to lęk i depresja, a odpowiednia częstość wynosiła: 33% (28%–38%) i 28% (23%–32%) (Lai i in. 2020). Pacjenci z wcześniej istniejącymi schorzeniami lub COVID-19 mieli znacząco wyższą częstość występowania lęku i depresji w porównaniu z pracownikami ochrony zdrowia i ogółu społeczeństwa (Lai i in. 2020).

Wśród pracowników ochrony zdrowia zawód pielęgniarki (Lai i in. 2020), czyli praca na pierwszej linii z bezpośrednim kontaktem z pacjentami z COVID-19 (Lai i in. 2020), praca w najbardziej dotkniętym pandemią obszarze, był dodatkowo związany z wyższym stresem psychicznym (Lai i in. 2020). Niemniej jednak do czynników chroniących przed większym stresem psychicznym należały: wsparcie rodziny (Cao i in. 2020), posiadanie wystarczających zasobów medycznych (Qiu i in. 2020), charakteryzujące się wysoką wydajnością zdrowotną systemy i skuteczne środki zapobiegania oraz kontroli epidemii (Qiu i in. 2020), dysponowanie aktualnymi i dokładnymi informacjami oraz podejmowanie środków ostrożności (Wang i in. 2020).

Trzy inne badania z Chin wykazały, że pracownicy ochrony zdrowia wykazywali większą częstość występowania lęku i depresji (Zhang i in. 2020; Huang and Zhao 2020). Jedno z badań przeprowadzonych wśród pracowników ochrony zdrowia w szpitalu wykazało, że pracownicy medyczni odczuwali większy stres psychiczny w porównaniu z personelem administracyjnym (Lu i in. 2020), podczas gdy inne badanie wykazało, że obciążenie psychiczne było wyższe wśród pracowników niemedycznych w szpitalach (Tan i in. 2020).

Dyskusja

W przeglądzie literatury udało się zidentyfikować populację wysokiego ryzyka i czynniki ryzyka zwiększające wystąpienie lub zaostrzenie depresji, które można wykorzystać do oceny ryzyka oraz projektowania skutecznych interwencji psychologicznych i psychiatrycznych.

Publikacje naukowe potwierdzają, że izolacja społeczna i samotność są silnie związane z występowaniem lęku i depresji, dodatkowo populacja o gorszym stanie zdrowia i osoby podatne na stres psychiczny są czynnikami ryzyka (Holmes i in. 2020). Odkrycia te podkreśliły znaczenie projektowania interwencji ukierunkowanych na kobiety, pielęgniarki, osoby z chorobami przewlekłymi lub w podeszłym wieku, osoby o niestabilnych dochodach, młodzież, kobiety ciężarne. Są to grupy mające wyższy poziom obciążenia psychologicznego (Zhou i in. 2020). Ponadto udało się ustalić, że niektóre czynniki, takie jak posiadanie wystarczających zasobów medycznych, aktualne i dokładne informacje dotyczące choroby COVID-19 i podjęcie środków ostrożności, wsparcie bliskich, pomagają zmniejszyć negatywny wpływ na stan psychiczny ogółu społeczeństwa.

Zgodnie z dotychczasowymi badaniami u młodzieży żeńskiej stwierdzono wyższe ryzyko wystąpienia depresji i lęku. Starsze nastolatki były bardziej przygnębione niż młodsze. Powszechnym zjawiskiem jest pozostawianie dzieci w domu w dni powszednie bez osoby towarzyszącej (Guessoum i in. 2020). Badania wskazują, że młodzież pozbawiona towarzystwa w dni robocze była bardziej narażona na depresję i lęk podczas COVID-19 (Guessoum i in. 2020). Ćwiczenia fizyczne korelują zarówno z depresją, jak i lękiem i ich stosowanie daje pewien efekt ochronny dla zdrowia psychicznego nastolatków podczas globalnego zagrożenia zdrowia publicznego (Chekroud 2018).

Biorąc pod uwagę alarmujący wpływ zakażenia COVID-19 na zdrowie psychiczne, warto poszerzyć ocenę psychopatologii osób, które przeżyły COVID-19, w celu diagnozowania i leczenia pojawiających się stanów psychiatrycznych, monitorowania ich zmian w czasie w celu zmniejszenia obciążenia chorobą, które, jak można wnioskować, będzie bardzo wysokie u pacjentów ze schorzeniami psychiatrycznymi (Williams 2016). Pozwoli to również na zbadanie, w jaki sposób odpowiedź immunologiczna przekłada się na choroby psychiatryczne, co poprawi naszą wiedzę w etiopatogenezie tych zaburzeń.

Obecnie większość krajów na świecie traktuje priorytetowo swoje zasoby medyczne do powstrzymania COVID-19 i leczenie pacjentów z COVID-19, dlatego zasoby na usługi psychologiczne i interwencje psychiatryczne mogą być ograniczone (Vindegard i in. 2020). Pogłębianie wiedzy i świadomości są bardzo istotne w obecnej sytuacji. Badania wykazały, że 50,4% badanych miało dostęp do zasobów psychologicznych poprzez książki lub media, a 17,5% szukało porady psychologicznej lub psychoterapii (Kang i in. 2020). Ponadto badania wykazały, że ludzie z łagodnymi zaburzeniami wo-

leli szukać wsparcia w źródłach medialnych, podczas gdy osoby o większym obciążeniu zgłaszały się bezpośrednio do profesjonalistów (psychologów, psychiatrów) (Kang i in. 2020). To odkrycie sugeruje, że psychologiczne badania przesiewowe mogą być przeprowadzane wśród ludzi, a także procedury triage mogą być stosowane u pacjentów z problemami psychiatrycznymi i psychologicznymi z różnym poziomem zaostrożenia zaburzeń, w celu podjęcia odpowiedniej interwencji.

Podsumowanie

Badania oceniające bezpośrednie konsekwencje neuropsychiatryczne oraz pośredni wpływ na zdrowie psychiczne są bardzo potrzebne dla poprawy leczenia, planowania opieki nad zdrowiem psychicznym oraz dla działań prewencyjnych podczas potencjalnych kolejnych pandemii.

Jeśli chodzi o problemy psychologiczne, zapobieganie i wczesna identyfikacja są ważniejsze od leczenia. Istotne jest, aby poświęcić więcej uwagi zdrowiu psychicznemu osób z grup ryzyka: nastolatkom, płci żeńskiej, osobom starszym, osobom chorującym na COVID-19 i choroby przewlekłe, kobietom w ciąży, osobom obciążonym zaburzeniami psychicznymi i psychiatrycznymi podczas COVID-19.

Sz szczególnie młodzież jest bezbronna i wymaga starannego dostosowania rozwiązań przez opiekunów oraz ochronę zdrowia, aby zapewnić jej wsparcie zdrowia psychicznego pomimo lockdownu (Guessoum i in. 2020). Również pacjentom geriatrycznym i osobom z zaburzeniami psychicznymi zarówno na co dzień, a przede wszystkim w czasie pandemii należy zapewnić stały dostęp do opieki lekarskiej i psychologicznej, szczególnie zachowując ciągłość leczenia bez względu na sytuację epidemiczną na świecie.

Bibliografia

- Benedetti F., Aggio V., Pratesi M. i in., 2020, Neuroinflammation in bipolar depression. *Front. Psychiatry* 11, 71.
- Bielawska-Batorowicz E., Kossakowska-Petrycka K., 2006, Depressive mood in men after the birth of their offspring in relation to a partner's depression, social support, fathers' personality and prenatal expectations, *J. Reprod. Infant Psychol.*, 24(1), 21–29.
- Brooks S., Webster R., Smith L., Woodland L., Wessely S., Greenberg N., Rubin G., 2020, The psychological impact of quarantine and how to reduce it: rapid review of the evidence, *Lancet* (February) 26, 15–17.
- Cameron M., Bermejo-Martin J., Danesh A. i in., 2008, Human immunopathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS), *Virus Res.* 133, 13–19.

- Cao W., Fang Z., Hou G., Han M., Xu X., Dong J., 2020, The psychological impact of the COVID-19 epidemic on college students in China, *Psychiatry Res.* 287, 112934. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2020.112934>.
- Chapman D., Perry G., 2008, Depression as a major component of public health for older adults, *Prev. Chronic Dis.*, 5(1), A22.
- Chatterjee S., Malathesh B., Mukherjee A., 2020, Impact of COVID-19 pandemic on pre existing mental health problems, *Asian J Psychiatr*, 51, 2–3.
- Chekroud A., 2019, A Mendelian Randomization Approach for Assessing the Relationship Between Physical Activity and Depression, *JAMA Psychiatr. Network*, 76, 361–362.
- Feng, X., Li, S., Sun, Q. i in., 2020, Immune-inflammatory parameters in COVID-19 cases: a systematic review and meta-analysis, *Front. Med.* 7, 301.
- Górski M., Garbicz J., Buczkowska M., Marsik G., Grajek M., Całynik B., Polaniak R., 2020, Zaburzenia depresyjne wśród pensjonariuszy ośrodka opieki długoterminowej w obliczu izolacji spowodowanej pandemią COVID-19, *Psychiatr. Pol. ONLINE FIRST* Nr 202, 1–14.
- Gray L., Weller R., Fristad M., Weller E., 2011, Depression in children and adolescents two months after the death of a parent., *J. Affect. Disord.*, 135 (1–3), 277–283.
- Guessoum S., Lachal J., Radjack R., Carretier E., Minassian S., Benoit L., Moro M., 2020, Adolescent psychiatric disorders during the COVID-19 pandemic and Lockdown, *Psychiatry Res.*, 291, 2–4.
- Holmes E., O'Connor R., Perry V., Tracey I., Wessely S., Arseneault L. i in., Multidisciplinary research priorities for the COVID-19 pandemic: a call for action for mental health science, *Lancet Psychiatry*, 7, 547–60.
- Huang Y., Zhao N., 2020a, Chinese mental health burden during the COVID-19 pandemic. *Asian J. Psychiatr.* 51, 102052.
- Huang Y., Zhao N., 2020b, Generalized anxiety disorder, depressive symptoms and sleep quality during COVID-19 outbreak in China: a web-based cross-sectional survey. *Psychiatry Res.* 288, 112954.
- Hybels C., Blazer D., Pieper C., Landerman L., Steffens D., 2009, Profiles of depressive symptoms in older adults diagnosed with major depression: Latent cluster analysis, *Am. J. Geriatr. Psychiatry.*, 17(5), 387–396.
- Kang, L. i in., 2020, Impact on mental health and perceptions of psychological care among medical and nursing staff in Wuhan during the 2019 novel coronavirus disease outbreak: a cross-sectional study, *Brain. Behav. Immun.*, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.03.028>.
- Kohler C., Freitas T., Maes M. i in., 2017, Peripheral cytokine and chemokine alterations in depression: a meta-analysis of 82 studies, *Acta Psychiatr. Scand*, 135, 373–387.
- Lai J., Ma S., Wang Y., Cai Z., Hu J., Wei N., 2020, Factors associated with mental health outcomes among health care workers exposed to coronavirus disease 2019. *JAMA Netw Open* 3 (3), e203976., <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.3976>.
- Lebel C., MacKinnon A., Bagshawe M., Tomfohr-Madsen L., Giesbrecht G., 2020, Elevated depression and anxiety symptoms among pregnant individuals during the COVID-19 pandemic, *J. Affect. Disord.*, 277, 5–13.
- Luo M., Guo L., Yu M., Jiang W., Wang H., 2020, The psychological and mental impact of coronavirus disease 2019 (COVID-19) on medical staff and general public – A systematic review and metaanalysis, *Psychiatry Res.*, 291, 2–8.
- Melhem N., Porta G., Shamseddeen W., Walker M., Brent D., 2011, Grief in children and adolescents bereaved by sudden parental death, *Archives of General Psychiatry* 68 (9), 911–919.
- Qiu J., Shen B., Zhao M., Wang Z., Xie B., Xu Y., 2020, A nationwide survey of psychological distress among Chinese people in the COVID-19 epidemic: implications and policy recommendations, *Gen. Psychiatr.* 33 (2), e100213. <https://doi.org/10.1136/gpsych-2020-100213>.

- Shader R., 2020, COVID-19 and Depression, *Clin. Ther.*, 42, 2–3.
- Studniczek A., Kossakowska K., 2020, Cięża i poród w czasach pandemii COVID-19: wybrane aspekty psychologiczne, *Kwartalnik naukowy fides et ratio* 3(43), 274-279.
- Tait Z, Stannard G, Challberg J, Wells A, Thompson S., 2019, Assessment of loneliness and depression in geriatric Parkinson's Disease clinics. Kraków: EUGMS Conference
- Tan B., Chew N., Lee G., Jing M., Goh Y., Yeo L., 2020, Psychological impact of the COVID-19 pandemic on Health Care workers in Singapore, *Ann Intern Med.*, <https://doi.org/10.7326/M20-1083>.
- Wang C., Pan R., Wan X., Tan Y., Xu L., McIntyre R., 2020, A longitudinal study on the mental health of general population during the COVID-19 epidemic in China, *Brain Behav. Immun.* S0889-1591(20), 30511-0, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.04.028>.
- Wang S., Xie L., Xu Y., Yu S., Yao B., Xiang D., 2020, Sleep disturbances among medical workers during the outbreak of COVID-2019, *Occup. Med. (Lond.)*. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqaa074>.
- Williams L, 2016, Precision psychiatry: a neural circuit taxonomy for depression and Anxiety, *Lancet Psychiatry* 3, 472–480.
- Vindegard N., Benros M., 2020, COVID-19 pandemic and mental health consequences: Systematic review of the current evidence, *Brain Behav. Immun.*, 89, 531–542.
- Xiang Y., Yang Y., Li W., Zhang L., Zhang Q., Cheung T., Ng C., 2020, Timely mental health care for the 2019 novel coronavirus outbreak is urgently needed, *Lancet Psychiatry* 7 (March (3)), 228–229.
- Zhang Y., Ma Z., 2020, Impact of the COVID-19 pandemic on mental health and quality of life among local residents in Liaoning province, China: a cross-sectional study. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 17 (7), 2381.
- Zhou S., Zhang L., Wang L., Guo Z., Wang J., Chen J., Liu M., Chen X., Chen J., 2020, Prevalence and socio-demographic correlates of psychological health problems in Chinese adolescents during the outbreak of COVID-19. *European Child & Adolescent Psych.*, <https://doi.org/10.1007/s00787-020-01541-4>.

Abstract

„COVID-19 PANDEMIC AND DEPRESSION”

The COVID-19 pandemic has had a huge impact on mental health around the world. The aim of this study is to analyze the impact of COVID-19 on the incidence of depression in the general population, health care workers, adolescents, the elderly, pregnant women, psychiatric patients, and convalescents. Literature research was conducted with the help of PubMed and Google Scholar. The overall incidence of depression was 28%. The incidence of depression was highest among patients with pre-existing medical conditions and COVID-19 infection (55%). Common risk factors: female gender, lower economic status, high risk of contracting COVID-19 and social isolation. Protective factors: included having sufficient medical resources, up-to-date and accurate information, and taking precautionary measures.

Słowa kluczowe: pandemia, COVID-19, depresja

Keywords: pandemic, COVID-19, depression

Marta Kaczmarczyk, Karolina Łukasiewicz

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Nauki o Żywności

Koło Naukowe Żywienia i Profilaktyki Żywnościowej

Opiekun: dr inż. Joanna Ciborska

WPŁYW SPOŻYCIA KAWY NA ORGANIZM CZŁOWIEKA

Wstęp

Postęp cywilizacji, życie w pośpiechu oraz niewielka ilość snu sprawiają, że człowiek coraz częściej sięga po stymulanty, takie jak napary z ziaren kawy i liści herbaty. Składniki w nich zawarte mają właściwości pobudzające, wspomagające funkcjonowanie organizmu i przebieg procesów myślowych. Najbardziej znane gatunki kawy to Arabika (*Coffea arabica* Linné), która cechuje się delikatnym, czasami owocowym smakiem, uprawiana jest głównie w Ameryce Środkowej oraz Robusta (*Coffea canephora* Pierre) – mocna o ożywym smaku, uprawiana głównie w Afryce Wschodniej i Środkowej (Kwiatkowska-Sienkiewicz 2005). Napar z ziaren kawy, ze względu na swój smak i aromat, należy obecnie do najpopularniejszych ze spożywanych napojów (Bojarowicz, Przygoda 2012). Zawiera między innymi kofeinę i kwas chlorogenowy, które odpowiadają za pozytywne oddziaływanie kawy na organizm człowieka. Na przestrzeni lat powstało wiele badań dotyczących działania naparu kawowego, niektóre z nich mówiły o negatywnych skutkach spożywania kawy, jednak obecnie udowodniono, że spożywana w umiarkowanych ilościach nie tylko wspomaga układ nerwowy, ale również może wspomagać profilaktykę chorób takich, jak cukrzyca typu 2.

Cel pracy

Celem pracy był przegląd piśmiennictwa naukowego na temat prozdrowotnego wpływu spożycia naparu z ziaren kawy na organizm człowieka oraz znaczenie bioaktywnych składników zawartych w kawie w profilaktyce chorób.

Kofeina – oddziaływanie na organizm i normy dziennego spożycia

Najważniejszym składnikiem aktywnym występującym w kawie jest kofeina, która oddziałuje na układ nerwowy (Gorzowska 2017). Badania dowodzą licznych korzyści wynikających ze spożycia tego składnika, takich jak lepsza koncentracja czy uważność. Spożycie kofeiny ma jednak również efekty uboczne, podawana w zbyt dużych ilościach oraz w zbyt małym odstępnie od czasu snu może zaburzać jego rytm oraz pogarszać jego jakość. Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. European Food Safety Authority, FDA) określił dopuszczalne dzienne spożycie kofeiny dla dorosłych i zdrowych ludzi w ilości 400 mg, jest to ilość kofeiny odpowiadająca około 4 do 5 filiżankom kawy, która nie prowadzi do niebezpiecznych i negatywnych skutków dla organizmu człowieka (EFSA 2015). Pamiętać jednak należy, że kofeina obecna jest nie tylko w kawie, ale również w napojach, takich jak herbata czy słodzone napoje gazowane. Nawet herbaty i kawy, na opakowaniach których znajduje się słowo „decaffeinated” lub „bezkofeinowy”, często także zawierają małe ilości kofeiny (8-15 mg) (McCusker i in. 2006). FDA nie określiła dopuszczalnego spożycia kofeiny przez dzieci i młodzież, jednak Amerykańska Akademia Psychiatrii Dzieci i Młodzieży (ang. American Academy of Child and Adolescent Psychiatry, AACAP) negatywnie opiniuje spożycie kofeiny i innych stymulantów przez tę grupę populacyjną (AACAP 2020). Nadmiar spożytej kofeiny może prowadzić do bezsenności, większej częstości akcji serca, bólów głowy, uczucia przygnębienia czy bólów brzucha.

Dopuszczalne spożycie zostało określone dla zdrowych ludzi, ponieważ metabolizm kawy w organizmie człowieka zależy między innymi od przyjmowanych leków (Mostofsky i in. 2012). Kawa oraz zawarta w niej kofeina wykazuje liczne interakcje z substancjami czynnymi i może wykazywać synergizm z lekiem, zniwelować jego działanie lub mieć szkodliwy wpływ na organizm. Napój kawowy wzmacnia na przykład działanie niesteroidowych leków przeciwbólowych (Wiela-Hojeńska, Łapiński 2010). Dopuszczalne 400 mg kofeiny to wartość średnia, jednak tolerancja organizmu zależy od wielu czynników, m.in. od masy ciała czy szybkości metabolizmu tego składnika. Pamiętać należy, że w okresie ciąży, karmienia piersią lub podczas planowania zajścia w ciążę należy ograniczyć spożycie kawy i innych napoi zawierających kofeinę – WHO zaleca nie przekraczanie spożycia 300 mg kofeiny na dzień (WHO 2016). Kobiety, które planują ciążę lub spodziewają się dziecka mogą rozważyć włączenie do diety kawy zbożowej, która kofeiny nie zawiera, ale za to może być źródłem witamin z grupy B, fosforu czy cynku.

FDA podkreśla, że najbardziej niebezpieczne jest spożycie około 1200 mg kofeiny i szczególną uwagę należy zwrócić na suplementy diety spożywane w celu pobudzenia, zwiększenia koncentracji i zawierające wysokie ilości kofeiny. W literaturze czasami przelicza się ilości spożytej kawy na zawartą w niej kofeinę i to na tej podstawie określa się jej dopuszczalne spożycie (EFSA 2015). Około 4 do 5 filiżanek kawy zapewnia

pokrycie maksymalnego dziennego spożycia kofeiny, jednak każdy organizm różnie toleruje tę substancję i należy obserwować jej działanie i indywidualnie dobierać ilość, która nie niesie ze sobą negatywnych skutków (Bojarowicz, Przygoda 2012). Gatunek kawy, sposób przygotowania, stopień uprażenia czy rozdrobnienia ziaren może mieć znaczny wpływ nie tylko na aktywność antyoksydacyjną kawy, ale również zawartość kofeiny w naparze. Najczęściej spożywana jest kawa espresso, filtrowana, gotowana oraz kawa rozpuszczalna, wszystkie różnią się metodą parzenia, ilością użytej wody, jej temperaturą, czasem parzenia. Badania wykazują, że im wyższe ciśnienie i wyższa temperatura wody użytej do zaparzania, tym kawa cechuje się wyższą zawartością związków bioaktywnych i jest bardziej esencjonalna (Chłopicka i in. 2015). Często od sposobu parzenia zależy końcowa objętość naparu i filiżanka nie jest równa filiżance. W przeliczeniu na 1 ml kawa typu „espresso”, ze względu na parzenie pod ciśnieniem, cechuje się największą zawartością kofeiny, jednak ze względu na małą objętość (40-50 ml) w filiżance znajdziemy około 80 do 120 mg kofeiny, a w kawie typu „americano”, która cechuje się dużo większą objętością (do 400 ml), nawet 350 mg (Caprioli i in. 2015). Mleko w proszku, cukier, oleje roślinne tworzą z polifenolami nierozpuszczalne kompleksy, co obniża właściwości przeciwutleniające kawy. Dodatkowo należy podkreślić fakt, że dodatek śmietanki czy cukru zwiększa wartość kaloryczną naparu, który sam w sobie zawiera około 2 kcal w 100 ml (Chłopicka i in. 2015).

Inne składniki aktywne kawy

Badania nad składem kawy oraz jej wpływem na organizm człowieka prowadzone są regularnie, jednak pierwsze z nich wprowadziły do obiegu wiele fałszywych informacji, miało to związek z nieprawidłową metodologią badań, zbyt małą grupą badanych oraz pominięciem wielu zmiennych np. palenia tytoniu przez badanych. Zaobserwowano obecnie rzetelne prowadzenie badań, co pozwala lepiej poznać skład kawy.

W kawie znajdują się grupy związków: metyloksantyny, kwasy chlorogenowe, laktony kwasów chlorogenowych, fenolokwasy, furany, garbniki, składniki mineralne, pirole, katechiny oraz niacyna (Caprioli i in. 2015). Działanie antyoksydacyjne kawy ma związek przede wszystkim z zawartym w niej kwasem chlorogenowym, kwasem ferulowym i chinowym. Wyniki badań wskazują na zmniejszenie stężenia transpeptydazy γ -glutamylowej, która uznawana jest za biomarker wczesnej fazy stresu oksydacyjnego (Chłopicka i in. 2015). Jednak zawartość antyoksydantów w naparze kawy zależy nie tylko od rodzaju użytych ziaren, sposobu uprawy, ale również od sposobu parzenia. Wykazano, że aktywność antyoksydacyjna kawy z gatunku Arabica była o 30% mniejsza od średniej wartości kawy z gatunku Robusta (Chłopicka i in. 2015). Zdolności redukcji jonów Fe III, podane jako wartości FRAP (ang. *ferric ion reducing antioxidant parameter*), otrzymane dla naparów z kawy rozpuszczalnej były wyższe od

wartości wyznaczonych dla kaw mielonych i ziarnistych. Napar przyrządzony przez zalanie wrzątkiem kawy gatunku Robusta wykazywał dwa razy wyższą aktywność antyoksydacyjną w porównaniu do naparu z tej samej kawy przyrządzonego w ekspresie ciśnieniowym. Oceniano również wpływ czasu parzenia na aktywność antyoksydacyjną naparu i nie wykazano, aby dłuższy niż pięć minut czas parzenia miał znaczny wpływ na ten parametr (Chłopicka i in. 2015). Obecnie obserwowany jest znaczny rozwój rynku kawy w Polsce, można kupić ziarna o różnym stopniu uprażenia, mieszankami różnych gatunków importowanych z różnych krajów od różnych producentów w związku z tym warto, aby informacje o aktywności antyoksydacyjnej naparów była aktualizowane (Caprioli i in. 2015).

Kolejnym składnikiem zawartym w kawie są diterpeny takie, jak kofestol oraz kahweol, które mają wpływ na stężenie cholesterolu całkowitego oraz frakcji LDL (ang. *low-density lipoprotein*) we krwi. Uregert i in. (1997) przeprowadzili badanie w grupie zdrowych ludzi bez zaburzeń lipidowych, którym podawano kawę, olej kawowy oraz diterpeny w okresie od 4 do 24 tygodni oraz monitorowano lipidogram. Autorzy wykazali, że w grupie, która spożywała od 5 do 6 filiżanek kawy dziennie, nastąpił spadek lipoprotein we krwi średnio o około 1,5 mg/dL po dwóch miesiącach, jednak po pół roku spadek ten wynosił już tylko 0,5 mg/dL. W grupie, która spożywała olej kawowy w ilości odpowiadającej około 10-20 filiżankom niefiltrowanej kawy, spadek poziomu lipoprotein był o około 5,5 mg/dL w dwóch oddzielnych okresach. Czysta mieszanina diterpenów, odpowiadająca około 2-3 filiżankom niefiltrowanej kawy, spowodowała spadek zawartości lipoprotein o około 0,5 mg/dL po czterech tygodniach. Pomimo obiecujących wyników badań należy podkreślić, że wykazano niewielki spadek poziomu lipoprotein we krwi względem codziennego spożywania kawy przez długi okres i napar ten nie może być stosowany jako swego rodzaju lek na zaburzenia lipidowe (Urgent i in. 1997).

W kawie znajdować się mogą również składniki, których pojawienie się zależy od stopnia przetworzenia oraz sposobu przechowywania kawy takie, jak ochratoksyna A, akrylamid oraz furan (EFSA 2015). Ochratoksyna A to mykotoksyna, której rozwój może nastąpić wskutek złego przechowywania ziaren i rozwoju pleśni. Regulacje Parlamentu Europejskiego wymagają na producentach obowiązek kontroli produktów pod względem obecności tej toksyny (EFSA 2015). Akrylamid to związek, który powstaje w skutek wypalania ziaren kawy. Uznaje się, że przyczyna się między innymi do powstawania nowotworów przewodu pokarmowego oraz uszkadza układ nerwowy poprzez hamowanie przekazywania impulsów nerwowych (Pingot i in. 2013). W 2017 Komisja Europejska przedstawiła regulację, której zadaniem jest zmniejszenie obecności akrylamidu w produktach spożywczych, również w kawie (Komisja Europejska 2017). W badaniach na szczurach ustalono, że dawką rakotwórczą akrylamidu jest 0,5 mg/kg masy ciała, jednakże w badaniach epidemiologicznych z udziałem ludzi nie wykazano korelacji pomiędzy dietą a zachorowalnością na nowotwory (Pingot i in. 2013). Co więcej, potencjalnie wyższe niż przeciętne spożycie akrylamidu wiązało się

z niższym występowaniem nowotworu jelita grubego (Pingot i in. 2013). Przeprowadzone badania wykazują, że ilość akrylamidu w ziarnach kawy waha się w granicach 45-374 ng/g ziarna, napar o objętości 300 ml z tych samych ziaren zawierał zaledwie 0,74-3,98 µg akrylamidu (Szczerbina 2005). Przyjmując za dawkę rakotwórczą 0,5 mg akrylamidu/kg masy ciała, przeciętny człowiek o masie 70 kg, może spożyć dziennie 35000 µg (35mg) akrylamidu, co oznacza, iż spożycie kawy musiało by być 2643 razy większe (10574 kubków), niż dzienna bezpieczna porcja, aby osiągnąć dawkę rakotwórczą (wyliczenia własne na podstawie Szczerbina 2005 i Pingot i in. 2013). Furan oraz metylofuran to związki, które powstają podczas ogrzewania lub gotowania i są obecne w wielu produktach spożywczych, takich jak płatki zbożowe czy kawa. EFSA w 2017 r. wydał orzeczenie, zgodnie z którym, pomimo wykazania toksycznego wpływu furanu na zdrowie zwierząt, istnieje potrzeba kolejnych badań, aby zdecydować, czy codzienne spożycie dopuszczalnej dawki kawy może być szkodliwe ze względu na zawartość furanu oraz jego metylowych pochodnych (<https://www.coffeeandhealth.org/topic-overview/compounds-in-coffee-2/>).

Znaczenie spożycia kawy w profilaktyce chorób

W 2004 r. wykazano wpływ spożycia kawy w dziennych dawkach uznawanych dziś za dozwolone, na podwyższenie ciśnienia krwi, co z kolei może przyczynić się do zwiększenia śmiertelności z przyczyn sercowo-naczyniowych (James 2004). Te same wnioski wykazała metaanaliza Grunewalda i Figueroa-Galveza (2014), którzy podali, że regularne spożycie kawy może mieć negatywny wpływ na prawidłową pracę układu krwionośnego, a poprzez spożycie kawy w ilości dostarczającej 250 mg kofeiny następuje m.in. wzrost sztywności ścian tętnic. Jednak kolejne duże metaanalizy nie potwierdziły jednak takiej zależności oraz wskazały, że regularne spożycie kawy w umiarkowanych ilościach zmniejsza ryzyko zapadalności na choroby układu krążenia, udar mózgu oraz zawał serca (Wu i in. 2009). Kofeina stosowana jest przy leczeniu migren, działa poprzez rozszerzenie naczyń krwionośnych, a także przy chorobach neurodegeneracyjnych, poprzez działanie ochronne w stosunku do receptorów dopaminergicznych.

Wpływ spożycia kawy na ryzyko powstania osteoporozy nie jest do końca jasny (Kim 2014). W 1982 r. ukazało się badanie sugerujące, że spożycie kofeiny ma negatywny wpływ na proces gojenia się kości i może przyczynić się do powstania złamań. Niektóre badania wskazują też, że wysokie spożycie kofeiny przez dorosłe kobiety powodowało zmiany w strukturze kości oraz obniżenie biodostępności wapnia (Massey, Wise 1984). Wszystkie te badania koncentrowały się jednak nie na spożyciu kawy a kofeiny. Badania przeprowadzone w latach 2008–2009 z udziałem ponad 1500 koreańskich kobietach przed menopauzą, nie wykazały związku pomiędzy spożyciem kawy a gęstością mineralną kości szyjki udowej ani kręgosłupa lędźwiowego. Te same

wnioski wysunięto w badaniu chińskich kobiet po menopauzie. Autorzy wykazali, że umiarkowane spożycie kawy może zapobiegać występowaniu osteoporozy, natomiast wysokie spożycie wiązało się ze zwiększonym wydalaniem wapnia z organizmu, jednakże ze względu na liczne badania przeciwstawne nie można wysunąć ostatecznych wniosków (Yang i in. 2015).

Spożycie kawy wpływa także na układ pokarmowy, m.in. zmniejsza napięcie zwieracza dolnego przełyku oraz zwiększa wydzielanie kwasu solnego, przez co osoby cierpiące na chorobę refluksową żołądka oraz wrzody żołądka, powinny pić ją w umiarkowanych ilościach (Bojarowicz i Przygoda 2012). Kawa wpływa także negatywnie na wystąpienie zespołu jelita drażliwego, zmniejsza jednak prawdopodobieństwo zachorowania na cukrzycę typu 2, rozszerza oskrzela, dzięki czemu jest pomocna przy atakach astmy, a ze względu na występowanie antyoksydantów spożycie kawy może zmniejszać występowanie nowotworów wątroby oraz surowiczego i jasnokomórkowego raka jajnika (Bojarowicz, Przygoda 2012).

Wpływ spożycia kawy na sen

FDA podkreśla, że kawa nie jest substytutem snu, dzięki któremu możliwa jest regeneracja organizmu. Kofeina zawarta w kawie oraz innych napojach, takich jak herbata, jest stymulantem, ale nie ma działania regenerującego, a nawet może pogarszać jakość snu i prowadzić do gorszego samopoczucia (Mednick i in. 2008). Badanie Drake'a i in. (2013) wykazało, że spożycie kawy najpóźniej sześć godzin przed snem nie ma wpływu na jego jakość oraz łatwość zaśnięcia. Badacze podawali wolontariuszom kawę na trzydzieści minut, trzy godziny oraz sześć godzin przed snem w dawce odpowiadającej około 400 mg kofeiny. Przyjęcie stymulanta na trzydzieści minut i trzy godziny przed udaniem się na spoczynek wyraźnie zaburzało długość i jakość snu. Zaobserwowano także silniejszy wpływ spożycia kofeiny z różnych źródeł na kobiety niż na mężczyzn (Deboer 2018). „Coffe-nap” inaczej nazywana również „power nap” jest bardzo popularnym ostatniego czasu sposobem na zmęczenie. Polega na wypiciu kawy bezpośrednio przed drzemką w ciągu dnia w celu wyeliminowania zmęczenia oraz poprawy koncentracji, w większym stopniu niż w przypadku samej drzemki (Hayashi i in. 2003). Za senność odpowiada adenozyzna, która jest produktem rozpadu ATP (adenozynotrójfosforan). Nagromadzenie adenozyzny, poprzez zużywanie ATP w ciągu dnia, oraz innych czynników sprzyjających zasypianiu, może zmniejszyć aktywność obszarów odpowiadających za czuwanie, tym samym zwiększając aktywność obszarów odpowiadających za sen poprzez przyłączenie się z odpowiednim receptorem. W trakcie snu ilość adenozyzny w organizmie zmniejsza się. Kofeina jest strukturalnie podobna do adenozyzny, dzięki czemu pełni rolę antagonisty receptora adenozynowego, natomiast w trakcie snu ilość adenozyzny w organizmie zmniejsza się (Bonnet i Arand

1994). Zastosowanie kofeinowej drzemki pozwala na usunięcie adenozyiny z mózgu, co pozwala na połączenie się kofeiny z receptorami komórek mózgowych, blokując je dla adenozyiny i pobudzając organizm do działania. Wykazano, że sen, poprzez zwiększenie dla kofeiny dostępności w mózgu receptorów, może wzmocnić działanie kawy (Reyner, Horne 1997). Pierwsze wzmianki o „coffee-nap” pochodzą z lat dziewięćdziesiątych. Badania wpływu kofeiny podawanej przed drzemką pokazały, że mężczyźni, którzy spożywali 200 mg kofeiny przed 30-minutową drzemką byli bardziej wypoczęci (ocena subiektywna) i skoncentrowani niż grupa, u której zastosowano tylko drzemkę (Luciano i in. 2007). Pozytywny wpływ drzemki połączonej z kawą (200 mg kofeiny) na senność potwierdziły także badania z 2003 r. (Hayashi 2003). Jednak inne badania (Mednick i in. 2008) pokazują wyniki sprzeczne z poprzednimi. Pacjentom podane zostało 200 mg kofeiny po 60-90 minutowej drzemce. Zaobserwowano wówczas upośledzenie zdolności motorycznych porównując wyniki z grupą, u której zastosowano jedynie drzemkę. Podkreślić należy, że wszystkie badania przeprowadzane były na osobach zdrowych, nie wzięto także pod uwagę różnych dawek kofeiny oraz różnego czasu drzemki. Z tego względu nie można jednoznacznie stwierdzić wpływu drzemki poprzedzonej wypiciem naparu z ziaren kawy na organizm człowieka.

Wpływ kawy na gospodarkę wodno-elektrolitową

Powszechnie panuje przekonanie o moczopędnym działaniu kawy, powodującym wypłukiwanie wody z organizmu, poprzez wzmoczoną filtracją nerek. Pierwsze badania dotyczące efektu moczopędnego kawy pojawiły się w roku 1928 (Killer 2014), w których sugerowano, że spożywanie tego płynu regularnie, zwiększa tolerancję na działanie moczopędne, ale już cztery dni po odstawieniu spożywania kofeiny tolerancja ta znacznie się zmniejszała. W późniejszych latach próbowano potwierdzić tę hipotezę u osób spożywających kofeinę w różnych postaciach regularnie, jak i tych nie spożywających jej wcale. Wyniki potwierdzają znaczny wzrost produkcji moczu u osób nie spożywających kofeiny, ale jej niskie lub umiarkowane spożycie nie wywołują efektu moczopędnego (Zhang 2015). Wszystkie powyższe badania skupiały się jedynie na spożyciu kofeiny, nie kawy konkretnie. Nowsze badania wskazują, że zarówno u zdrowych mężczyzn, jak i kobiet pijących kawę regularnie zaobserwowano niewielki wzrost produkcji moczu. Występował on bezpośrednio po spożyciu kawy i nie powodował utraty wody ogółem, co więcej badania na mężczyznach wykazało, że spożycie kawy ma podobne właściwości nawadniające do czystej wody (Killer i in. 2014). Jedna z metaanaliz sugeruje, że obawy dotyczące niepożądanego utraty płynów związanej ze spożywaniem kofeiny są nieuzasadnione, zwłaszcza gdy spożycie poprzedza wysiłek fizyczny (Zang i in. 2014). Spożycie kawy ma również ważne znaczenie w podaży magnezu. Dotychczasowe badania i opinie ekspertów przekonywały, że kawa przyczynia się

do jego niedoborów poprzez wyplukiwanie czy zmniejszanie jego wchłaniania (Killer 2014). Napar z ziaren kawy wypłukuje magnez z organizmu, lecz sama w sobie posiada ich duże ilości. Filiżanka kawy przyczynia się do niewielkiego wzrostu wydalania magnezu, jednocześnie dostarczając organizmowi 7 mg (Kynast-Gales 1994) (Verma 2018). EFSA w opinii naukowej dotyczącej referencyjnych wartości żywieniowych dla magnezu zaznacza, że kawa jest bogatym źródłem magnezu i przyczynia się do wzrostu jego ilości w organizmie. Należy jednak zaznaczyć, że zależność ta występuje przy spożyciu kawy nie większej niż 300 mg (EFSA 2015).

Podsumowanie

FSA określiła dopuszczalne spożycie kawy na ilość, która dostarcza około 400 mg kofeiny, co odpowiada około czterem filiżankom o pojemności 240 ml. Składniki biologicznie aktywne kawy to m.in. kofeina, kwas chlorogenowy, chinowy, garbniki oraz diterpeny, które pozytywnie oddziałują na organizm człowieka, ale również akrylamid i furany, których obecność budzi kontrowersje. Napar z ziaren kawy pozytywnie wpływa na układ krążenia, nowotwory wątroby czy cukrzycę typu 2, natomiast negatywnie na chorobę wrzodową żołądka, chorobę refluksową, czy zespół jelita drażliwego. Działanie kawy na powstawanie osteoporozy nie jest do końca poznane. Badacze określili, że spożycie kawy minimum sześć godzin przed udaniem się na spoczynek nie ma wpływu na długość i jakość snu. W celu wyeliminowania zmęczenia w ciągu dnia badacze potwierdzają skuteczność „coffee-nap”. Picie kawy w umiarkowanych ilościach nie powoduje zaburzeń gospodarki wodno-elektrolitowej.

Literatura

- AACAP, 2020. Caffeine and children, https://www.aacap.org/AACAP/Families_and_Youth/Facts_for_Families/FFF-Guide/Caffeine_and_Children-131.aspx (dostęp 31 lipca 2021 r.)
- Bojarowicz H., Przygoda M. 2012. Kofeina. Cz. I. Powszechność stosowania kofeiny oraz jej działanie na organizm. *Probl. Hig. Epidemiol.*, 93: 9-12.
- Bonnet A.H., Arand D.L. 1994. The use of prophylactic naps and caffeine to maintain performance during a continuous operation. *Ergonomics*, 37(6): 1009-1020.
- Caprioli G., Cortese M., Sagratini G., Vittori S. 2015. The influence of different types of preparation (espresso and brew) on coffee aroma and main bioactive constituents. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 66(5): 1-9.
- Chłopicka J., Niedziela A., Bartoń H. 2015. Aktywność antyoksydacyjna i całkowita zawartość polifenoli w naparach kawy w zależności od rodzaju kawy i sposobu jej przygotowania. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 3: 278-282.

- Coffee&Health. <https://www.coffeeandhealth.org/topic-overview/compounds-in-coffee-2/> (dostęp 4 czerwca 2021 r.).
- Deboer T. 2018 Sleep homeostasis and the circadian clock: Do the circadian pacemaker and the sleep homeostat influence each other's functioning? *Neurobiol. Sleep Circadian Rhythms*, 5: 68-77. Drake C., Roehrs T., Shambroom J., Roth T. 2013. Caffeine Effects on Sleep Taken 0, 3, or 6 Hours before Going to Bed. *J. Clin Sleep Med.*, 9(11): 1195-1200.
- European Commission. 2017. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32017R2158> (dostęp 31 lipca 2021 r.).
- European Food Safety Authority (EFSA). 2015. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for magnesium. *EFSA Journal*, 13(7): 1-16.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2015. Scientific opinion on the safety of caffeine. *EFSA Journal*, 13(5).
- Gorzowska A. 2017. Żywnienie w chorobie Parkinsona. *Aktualn. Neurol.*, 17(4): 199-207.
- Grunewald F., Figueroa-Galvez A. 2014. The Effects of Oral L-Citrulline and Caffeine Supplementation on Arterial Function in Healthy Males.
- Hayashi M., Masuda A., Hori T. 2003. The alerting effects of caffeine, bright light and face washing after a short daytime nap. *Clin. Neurophysiol.*, 114(12): 2268-2278.
- James J.E. 2004. Critical review of dietary caffeine and blood pressure: a relationship that should be taken more seriously. *Psychosom. Med.*, 66: 63-71.
- Killer S.C., Blannin A.K., Jeukendrup A.E. 2014. No Evidence of Dehydration with Moderate Daily Coffee Intake: A Counterbalanced Cross-Over Study in a Free-Living Population. *PLoS One*, 9(1): e84154.
- Kim S.Y. 2014. Coffee Consumption and Risk of Osteoporosis. *Korean J. Fam. Med.*, 35(1): 1.
- Kwiatkowska-Sienkiewicz K. 2005. Główne kryteria klasyfikacji kawy surowej. *Postępy techniki przetwórstwa spożywczego*, 2/2005: 80-81.
- Kynast-Gales S.A., Massey L.K. 1994. Effect of caffeine on circadian excretion of urinary calcium and magnesium. *J. Am. Coll. Nutr.*, 13(5): 467-472.
- Luciano M., Kirk K.M., Gordon S.D., Heath A.C., Montgomery G.W., Martin N.G. 2007. No Thanks, It Keeps Me Awake: The Genetics of Coffee-Attributed Sleep Disturbance. *Sleep*, 30(10): 1378-1386.
- Massey L.K., Wise J.K. 1984. The effect of dietary caffeine on urinary excretion of calcium, magnesium, sodium and potassium in healthy young females. *Nutr. Res.*, 4(1): 43-50.
- Mednick S.C., Cai D.J., Kanadt J., Drummond S.P.A. 2008. Comparing the benefits of caffeine, naps and placebo on verbal, motor and perceptual memory. *Behav. Brain Res.*, 193(1): 79-86.
- McCusker R.R., Fuehrlein B., Goldberger B.A., Gold M.S., Cone J. 2006. Caffeine Content of Decaffeinated Coffee. *J. Analytic. Toxicol.*, 30: 611-613.
- Mostofsky E., Rice M.S., Levitan E.B., Mittleman M.A. 2012. Habitual coffee consumption and risk of heart failure: a dose-response meta-analysis. *Circ. Heart Fail.*, 5: 401-405.
- Pingot D., Pyrzanowski E., Michałowicz J., Bukowska B. 2013. Toksyczność akrylamidu i jego metabolitu - glicydamid. *Medycyna Pracy*, 64(2): 259-271. Reyner L.A., Horne J.A. 1997. Suppression of sleepiness in drivers: combination of caffeine with a short nap. *Psychophysiology*, 34(6): 721-725.
- Szczerbina T. 2005. Akrylamid - potencjalnie rakotwórcza substancja występująca w żywności. *Kosmos*, 54(4): 367-732.
- Urgent R., Weusten-van der Wouw M.P., Hovenier R., Meyboom S., Beynen A.C., Katan M.B. 1997. Diterpenes from coffee beans decrease serum levels of lipoprotein(a) in humans: results from four randomised controlled trials. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 51(7): 431-436.
- Wielą-Hojeńska A., Łapiński Ł., 2010. Niepożądane działania leków – rodzaje, podział, przyczyny i skutki ekonomiczne. *Bezpieczeństwo Farmakoterapii*, 4: 275-288.

- Wu J.N., Ho S.C., Zhou C., Ling W., Chen W., Wang C., Chen Y. 2009. Coffee consumption and risk of coronary heart diseases: a meta-analysis of 21 prospective cohort studies. *Int. J. Cardiol.*, 137: 216-225.
- WHO. 2016. Restricting caffeine intake during pregnancy. <https://www.who.int/elena/titles/caffeine-pregnancy/en/> (dostęp 31 lipca 2021 r.).
- Verma K.D., Goyal M.R. 2018. Engineering interventions in foods and plants. Apple Academic Press Inc., s. 100-110.
- Yang P., Zhang X., Zhang K., Tang Z. 2015. Associations between frequency of coffee consumption and osteoporosis in Chinese postmenopausal women. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 8(9): 15958-15966.
- Zhang Y., Coca A., Casa D.J., Antonio J., Green J.M., Bishop P.A. 2015. Caffeine and diuresis during rest and exercise: A meta-analysis. *J. Sci. Med. Sport*, 18(5): 569-574.

Abstract

THE INFLUENCE OF COFFEE INTAKE ON HUMAN BODY

Coffee is one of the most popular stimulants. The aim of the study was to review the scientific literature on the impact of consumption of coffee on the human body and the importance of its bioactive ingredients in the prevention of diseases.. Coffee contains a lot of biological active compounds, like caffeine and chlorogenic acid, that have positive influence on human body and acrylamide that is controversial. According to Food and Drug Administration the maximal dose of caffeine is 400 mg, (4 cups of coffee). Drinking coffee can be helpful in cardiovascular disease or diabetes, but also can be harmful in gastroesophageal reflux. Coffee is not a substitution of sleep and it can have bad influence on quality and duration of resting. Studies show that this drink have no bad impact on the water and electrolyte management, and also can be source of magnesium.

Key words: coffee, caffeine, preventive healthcare

Słowa kluczowe: kawa, kofeina, profilaktyka zdrowotna

Dane do kontaktu z autorem: Marta Kaczmarczyk. E-mail: marta.kaczmarczyk.3@student.uwm.edu.pl.
Karolina Łukasiewicz: E-mail: karolina.lukasiewicz@student.uwm.edu.pl.

Karolina Kańciak

Natalia Lewandowska

Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu

Instytut Nauk o Jakości

Studenckie Koło Naukowe NEXUS przy Katedrze Przyrodniczych Podstaw Jakości

Opiekun: dr hab. Alfred Błaszczak, prof. UEP

SENSORYCZNA OCENA JAKOŚCI KREMÓW ROZGRZEWAJĄCYCH PRZEZNACZONYCH DO PIELĘGNACJI RĄK

Wstęp

Imbir lekarski (z łac. *Zingiber officinale* Rosc.) jest gatunkiem rośliny przyprawowej z rodziny imbirowatych (*Zingiberaceae*), która nie wydaje owoców (Mashhadi i in. 2013). Rozmnażany jest on przez podział kłaczy, które często nazywane są również korzeniem imbiru (White 2007). Jest to jego część jadalna, opisywana jako bogate źródło substancji biologicznie czynnych, które odpowiadają za jego właściwości przeciwutleniające (Danwilai i in. 2017). Imbir należy również do grupy cennych surowców używanych w medycynie konwencjonalnej i ziołolecznictwie. Przez tysiące lat stosowany był na całym świecie, szczególnie w Azji Wschodniej przy bólach brzucha głowy, zębów oraz jako środek przeciwzapalny, który działa łagodząco przy przeziębieniach (Newerli-Guz i Pych 2012; Lee i in. 2021). Od kilku lat imbir znajduje również zastosowanie jako dodatek do żywności w napojach, jak również kosmetykach pielęgnacyjnych jako składnik o właściwościach rozgrzewających (Sugimoto i in. 2018; Mahboubi 2019).

Cytryna zwyczajna (*Citrus limon*) jest jednym z najpopularniejszych gatunków rodzaju *Citrus* z rodziny rutowatych (*Rutaceae* Juss.). Rośnie na drzewach cytrynowych, które osiągają od 2,5 do 3 m wysokości (Klimek-Szczykutowicz i in. 2017). Najbardziej pożądane są jej owoce o jajowatym kształcie, intensywnym kolorze żółtym oraz grubej i chropowatej skórce. Roślinę tę uważa się za jeden z najzdrowszych produktów ze względu na wysoką zawartość: witaminy C, witaminy B6, wapnia, żelaza oraz potasu. Znalazła również szerokie zastosowanie przy zapobieganiu infekcjom, pomaga zwal-

czyć ból gardła, jak i również poprawia pracę systemu immunologicznego. Ekstrakt cytrynowy często wykorzystuje się przy produkcji kosmetyków. Rozjaśnia on przebarwienia na skórze, wzmacnia naczynia krwionośne oraz opóźnia procesy starzenia się skóry (Kościołek 2021).

Składnikami najbardziej pożądanymi w produktach kosmetycznych, których obecność jest wyraźnie podkreślana przez producentów, są substancje czynne, inaczej opisywane jako substancje aktywne. Są to substancje powodujące występowanie m.in. biochemicznych oraz fizykochemicznych efektów wpływających na funkcjonowanie skóry i błon śluzowych (Dylewska-Grzelakowska 1999). Z literatury wynika, że imbir znalazł zastosowanie w przemyśle kosmetycznym przede wszystkim ze względu na swoje właściwości przeciwmarszczkowe (Drużyńska i Wojda 2007). Jednakże warto zaznaczyć, że imbir może być również ciekawą alternatywą jako dodatek w rozgrzewających kremach pielęgnacyjnych do skóry dłoni, stóp czy też innych części ciała. Tego typu produkty po nałożeniu na skórę powodują przyspieszenie krążenia krwi, co daje uczucie przyjemnego ciepła i rozgrzania. Dodatkowo działanie rozgrzewające przypisuje się również cynamonowi, goździkom oraz ostrej papryce (Możdżeń i in. 2016). Ekstrakty i olejki eteryczne pozyskiwane z cytryn są cenionym składnikiem perfum, zarówno damskich, jak i męskich. Mają również szerokie zastosowanie w środkach aromatyzujących, które są dodatkiem do mydeł i żeli do kąpieli. Badania naukowe wykazały jednak, że cytryny posiadają silne działanie antyoksydacyjne, dzięki czemu wykorzystuje się je w kosmetykach przeciwstarzeniowych (Klimek-Szczykutowicz i in. 2017).

Celem przeprowadzonych badań było rozpoznanie zainteresowania konsumentów kremami rozgrzewającymi, a następnie opracowanie receptury oraz przeprowadzenie sensorycznej oceny jakości kremów rozgrzewających z dodatkiem ekstraktów z imbiru i cytryny.

Material i metody

Badania składały się z dwóch etapów. W pierwszym etapie przeprowadzono badania sondażowe przy pomocy autorskiego kwestionariusza elektronicznego sprawdzającego zainteresowanie konsumentów kremami rozgrzewającymi oraz konkretnym produktem, jakim jest krem z dodatkiem imbiru. W badaniu ankietowym wzięło udział 45 respondentów, w tym 84,4% kobiet oraz 15,6% mężczyzn w różnym przedziale wiekowym, przy czym niespełna połowę badanych stanowiły osoby w wieku 36–50 lat. Wśród ankietowanych 37,8% posiadało wykształcenie wyższe, 31,2% było w trakcie studiów, wykształcenie średnie deklarowało 24,4% ankietowanych, 4,4% – zasadnicze zawodowe, natomiast 2,2% respondentów – wykształcenie podstawowe. Większość respondentów zamieszkuje miasta do 100 tys. mieszkańców. Najmniej liczna grupa (11,1%) zamieszkuje miasta od 100 tys. do 500 tys. mieszkańców.

W drugim etapie badań przygotowano:

- trzy ekstrakty (ze świeżej skórki imbiru, ze świeżego miąższu imbiru, ze świeżej skórki cytryny),
- trzy próbki kremu.

Przygotowanie ekstraktów

Do ekstrakcji zastosowano siedem rozpuszczalników: etanol, metanol, aceton, wodę oraz mieszaniny: etanol i woda (50:50 V/V), metanol i woda (50:50 V/V) oraz aceton i woda (50:50 V/V). Przygotowano trzy naważki roślinne: dwie z imbiru (skórka i miąższ) oraz jedną ze skórki cytryny. 2,5g naważki materiału roślinnego zalewano 25 ml sześćdziesięcioprocentowego EtOH. Następnie ekstrakty dwukrotnie wytrząsano przy pomocy wytrząsarki laboratoryjnej przez 20 min. Tak przygotowane ekstrakty dwukrotnie ekstrahowano w temperaturze 80°C przez godzinę, stosując 30 ml rozpuszczalnika. Po każdej godzinie zawartość zlewki przesączano przez lejek Büchnera. Pozostały materiał roślinny zalewano świeżą porcją rozpuszczalnika. Następnie ekstrakty przeniesiono ilościowo do kolb miarowych (25 ml) i uzupełniono odpowiednio rozpuszczalnikami. Przygotowano równoległe po dwa ekstrakty z danego materiału roślinnego.

Przygotowanie kremów rozgrzewających

Każdą próbkę przygotowano w oparciu o tę samą bazową recepturę, którą stanowił odpowiednio zaprojektowany stosunek składników, takich jak: masło kakaowe, wosk pszczeli, masło shea, wynoszący 2:1:1. Do bazowej receptury zostały dodane także: witamina E oraz olej marchwiowy w ilości 15 kropli na porcję. Do tak przygotowanych próbek dodano odpowiednio przygotowane ekstrakty:

- próbka 1 – krem z dodatkiem ekstraktu ze skórki imbiru i skórki cytryny,
- próbka 2 – krem z dodatkiem ekstraktu z miąższu imbiru i skórki cytryny,
- próbka 3 – krem bazowy, bez dodatków.

Zaprojektowane próbki kremów porównano z komercyjnym kremem rozgrzewającym z dodatkiem imbiru zakupionym w drogerii. Tak przygotowane cztery próbki zostały poddane ocenie sensorycznej przez ekspertów z różnych dziedzin naukowych.

Ekspertcka ocena cech organoleptycznych kremów rozgrzewających

Przeprowadzono ocenę sensoryczną wybranych parametrów za pomocą metody punktowej zaliczanej do grupy metod skalowania. Wykorzystano pięciopunktową skalę łączącą zalety skali werbalnych i liczbowych. Według Szakiel i Turek (2019), metoda ta zakłada zastosowanie skali spełniającej łącznie następujące warunki:

- każdy stopień skali odpowiada odmiennemu poziomowi jakości uchwytnemu dla oceniających,
- każdy stopień jest ściśle zdefiniowany, a opis słowny jest jednoznaczny dla oceniających,
- liczba stopni skali musi być jednakowa dla wszystkich ocenianych cech (Szakiel i Turek, 2019).

Do badania wykorzystano kwestionariusz z pięciopunktową oceną czynników sensorycznych, które zaprezentowano w tabeli 1. Dzięki wprowadzeniu współczynników ważności odzwierciedlono różnicę wpływu ocen poszczególnych cech na końcową ocenę jakości produktu.

Tabela 1. Wyróżniki sensoryczne i odpowiadające im współczynniki ważności

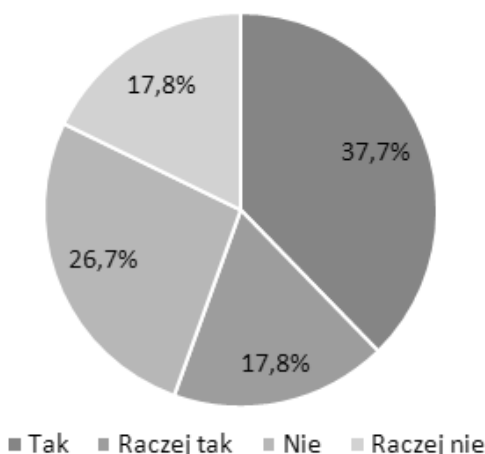
Cecha	Wyjaśnienie	Współczynnik ważności
Zapach	Pojęcie podstawowe	0,1
Konsystencja	Określa stopień gęstości oraz spójności substancji	0,15
Jednolitość	Określa jakość emulsji, która powinna być jednorodna pod względem budowy, o gładkiej powierzchni oraz bez widocznych pęcherzyków powietrza	0,05
Efekt poduszki	Określa ilość emulsji odczuwaną pomiędzy palcami (wskazującym i kciukiem) podczas pocierania ich o siebie	0,05
Rozprowadzanie	Określa łatwość rozprowadzania emulsji na powierzchni skóry	0,1
Tłustość	Określa na ile emulsja pozostawia na powierzchni skóry tłusty film bezpośrednio po aplikacji	0,1
Wchłanianie	Określa szybkość wchłaniania się emulsji w naskórek	0,2
Nadanie zapachu	Określa zdolność nadania skórze zapachu	0,05
Nawilżenie	Określa zdolności nawilżenia skóry	0,1
Efekt rozgrzewający	Określa zdolności rozgrzewające skóry	0,1

Źródło: opracowanie własne.

Wyniki

Z przeprowadzonego badania ankietowego na temat oceny zainteresowania konsumentów kremami rozgrzewającymi wynika, iż z problemem chłodnych dłoni zmaga się 36,4% respondentów. Negatywnej odpowiedzi udzieliło 43,2% ankietowanych, odpowiedź „raczej nie” wskazało 11,4%, natomiast odpowiedź „raczej tak” – 9%.

Na pytanie, czy badani słyszeli kiedykolwiek o pielęgnacyjnych kremach rozgrzewających, np. do rąk, ponad jedna trzecia ankietowanych wskazała odpowiedź „tak”, natomiast 26,7% odpowiedź „nie”. Jednakowa ilość osób (17,8%) udzieliła odpowiedzi „raczej tak” i „raczej nie” (wykres 1).



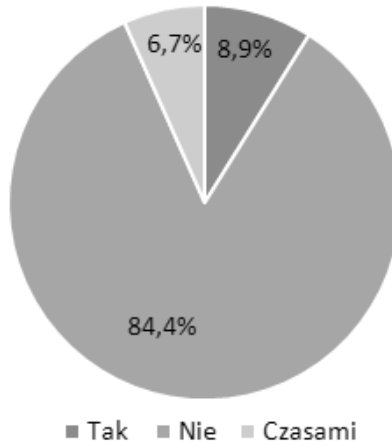
Wykres 1. Czy kiedykolwiek słyszał/a Pan/i o pielęgnacyjnych kremach rozgrzewających, np. do rąk?

Źródło: opracowanie własne.

Kanały komunikacyjne, dzięki którym respondenci usłyszeli o terminie „krem rozgrzewający”, to najczęściej: informacja od znajomych (24,4%), Internet (24,4%), telewizja/radio (8,9%), szkoła/uczelnia oraz prasa po 4,4%. Dodatkowo badani wskazywali inne źródła informacji, takie jak rodzina i praca (po 4,6%). 28,9% ankietowanych nigdy nie słyszało o terminie „krem rozgrzewający”.

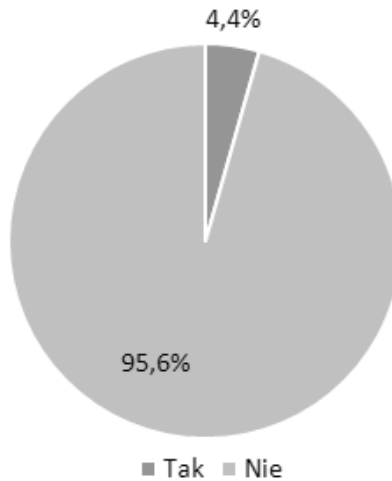
Zdecydowana większość, bo aż 84,4% badanych osób, nie używa pielęgnacyjnych kremów rozgrzewających, 6,7% wskazało, że używa ich „czasami”, natomiast zaledwie 8,9% udzieliło twierdzącej odpowiedzi na to pytanie (wykres 2). Wyniki te sugerują, że świadomość konsumentów w zakresie pozytywnego działania kremów rozgrzewających jest jeszcze zbyt niska.

Wyniki badań przedstawione na wykresie 3 wskazują, że zaledwie 4,4% ankietowanych posiadało już krem rozgrzewający, który zawierał m.in. imbir (wykres 3). Re-



Wykres 2. Czy używa Pan/i pielęgnacyjnych kremów rozgrzewających?

Źródło: opracowanie własne.

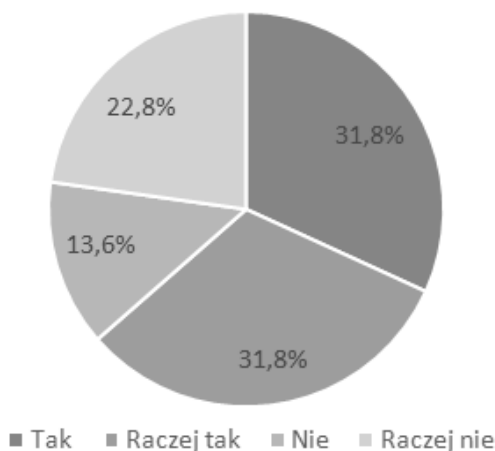


Wykres 3. Czy kiedykolwiek posiadał/a Pan/i krem rozgrzewający z dodatkiem imbiru?

Źródło: opracowanie własne.

spondenci podkreślili, że w składzie kremu rozgrzewającego, który stosowali, imbir występował w zestawieniu z innymi składnikami, takimi jak: goździki oraz cynamon.

Respondenci zostali również zapytani, czy byliby zainteresowani kupnem zaprojektowanego przez nas kremu z dodatkiem imbiru. Większość z nich wskazała odpowiedź „tak” lub „raczej tak”, 22,8% udzieliło odpowiedzi „raczej nie”, natomiast 13,6% wybrało odpowiedź „nie” (wykres 4).



Wykres 4. Czy byłby/aby Pan/i zainteresowany/a kupnem kremu rozgrzewającego z dodatkiem imbiru?

Źródło: opracowanie własne.

Zakres cen, jaki konsumenci byłiby w stanie przeznaczyć na zakup tego typu kremu rozgrzewającego, to najczęściej 11–20 zł (48,9%). 28,9% respondentów zaznaczyło przedział 21–30 zł, natomiast 17,8% przedział 0–10 zł. Tylko 4,4% ankietowanych udzieliło odpowiedzi „powyżej 30 zł”.

Kolejny etap badania przeprowadzony został na sześciu ekspertach z różnych dziedzin naukowych, którzy ocenili każdą z czterech próbek kremów, używając do tego papierowego kwestionariusza z pięciopunktową oceną czynników sensorycznych.

Na każdym z czterech badanych produktów przeprowadzona została ocena wyróżników zawartych w powyższej tabeli 1. Poniższe wykresy natomiast przedstawiają średnią ocenę otrzymanych wyników każdej z cech dla poszczególnych próbek. Aby jednak jak najlepiej zobrazować wpływ danej cechy na akceptację danej próbki, każda z ocen została przedstawiona na tle średniej ważonej oceny poszczególnych cech z wykorzystaniem do tego wartości współczynników ważności uzyskanych w badaniu. Wśród badanych kremów ocena najistotniejszego efektu rozgrzewającego kształtowała się na poziomie od 1,6 do 2,8 przy maksymalnej ocenie 5. Najwyższą ocenę uzyskano dla kremów z ekstraktem z miększu i ze skórki imbiru wraz ze skórą z cytryny, a najniższą dla kremu bez dodatku ekstraktu z imbiru i skórki cytryny – wyniosła 1,6. Na podstawie tych danych można przypuszczać, że ekstrakt z części imbiru otrzymany w warunkach laboratoryjnych w zauważalnym stopniu wpływa na odczucie efektu rozgrzania dłoni. Wartości oceny wszystkich wyróżników dla kremu z ekstraktem z miększu i ze skórki imbiru występują na bardzo podobnym poziomie z małymi odchyleniami +/- 0,3. Największą różnicę w ocenie pożądalności produktu obserwuje się w odniesieniu do wyższego stopnia lubienia kremu z dodatkiem ekstraktu ze skórki

imbiru i skórki cytryny pod względem wchłaniania, jak i również stopnia nawilżenia. Mimo to produkt komercyjny przy tych dwóch przedstawionych parametrach nadal posiada wyższą pożądalność.



Wykres 5. Wyniki sensorycznej oceny jakości kremu z dodatkiem ekstraktu ze skórki imbiru i skórki cytryny

Źródło: opracowanie własne.



Wykres 6. Wyniki sensorycznej oceny jakości kremu z dodatkiem ekstraktu z miąższu imbiru i skórki cytryny

Źródło: Opracowanie własne



Wykres 7. Wyniki sensorycznej oceny jakości kremu bez dodatku ekstraktów z imbiru i cytryny

Źródło: opracowanie własne.

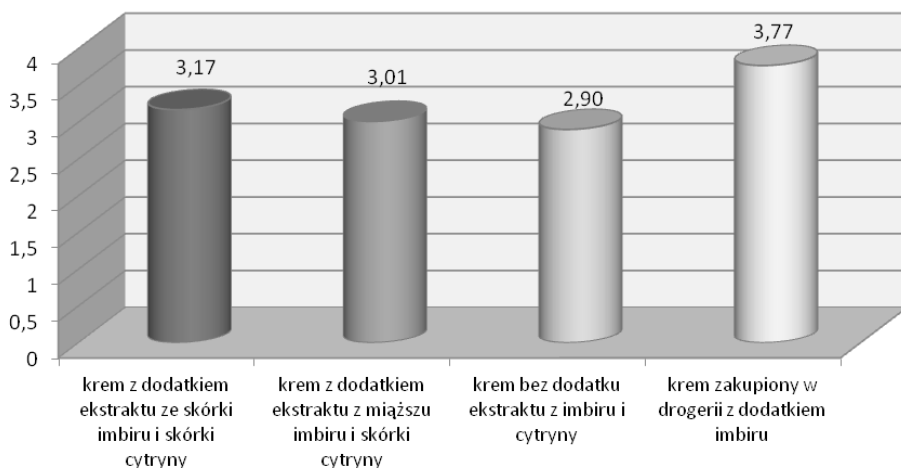


Wykres 8. Wyniki sensorycznej oceny jakości kremu zakupionego w drogerii z dodatkiem imbiru

Źródło: opracowanie własne.

Spśród wszystkich badanych próbek kremów najwyższy wynik częściowy uzyskała próbka z komercyjnym kremem z dodatkiem imbiru zakupionym w drogerii,

otrzymując wynik 3,77. Najniżej oceniony został natomiast krem bez dodatku imbiru oraz cytryny, który otrzymał wynik 2,90. Krem z dodatkiem ekstraktu z mięszu imbiru i skórki cytryny różnił się tylko o 0,2 w stosunku do kremu bez dodatku imbiru i cytryny, co świadczy o tym, że ekstrakt z mięszu imbiru i skórki cytryny nie wprowadził do kremu zauważalnych efektów, które wyróżniłyby się na tle pozostałych. Spośród próbek wykonanych przy pomocy autorskiego przepisu w warunkach laboratoryjnych, najlepiej oceniona została próbka kremu z dodatkiem ekstraktu ze skórki imbiru i skórki cytryny, otrzymując tym samym ogólny wynik 3,17. Zależności te przedstawia poniższy wykres (wykres 9).



Wykres 9. Porównanie wyników cząstkowych wszystkich czterech próbek kremów

Źródło: opracowanie własne.

Dyskusja

Oprócz pielęgnacyjnych kremów rozgrzewających na rynku dostępne są również maści lecznicze. Należą one do kategorii środków stosowania punktowego o działaniu przeciwbólowym, przeciwobrzękowym oraz przeciwzapalnym (Pawliczak 2021). Dzięki swoim rozgrzewającym właściwościom podrażniają zakończenia nerwowe naszej skóry w celu rozszerzenia naczyń krwionośnych. W efekcie do tkanek dopływa więcej krwi tętniczej, co sprzyja łagodzeniu stanów zapalnych oraz redukuje ból. Maści rozgrzewające posiadają również właściwości rozluźniające (Słowińska 2018). Najczęściej w maściach tego typu znajdziemy substancje czynne, takie jak mentol, który działa znieczulająco, oraz kamforę o działaniu łagodzącym i przeciwzapalnym (Pawliczak 2021).

Nasze mięśnie i stawy mogą ulegać kontuzjom w wyniku różnych uszkodzeń mechanicznych lub stanów zapalnych. Przy ich leczeniu stosowanie maści rozgrzewających, w przeciwieństwie do tradycyjnych leków przeciwbólowych w formie tabletek powlekanych, pozwala na uniknięcie obciążania wątroby oraz pracy żołądka, ponieważ działają one tylko w miejscu podania (Sierpniowska 2020).

Przeciwwskazania do stosowania maści rozgrzewającej to przede wszystkim nadwrażliwość lub uczulenie na którykolwiek ze składników, rany cięte oraz otarcia. Produktu nie powinno się również stosować bezpośrednio na błony śluzowe, twarz oraz pachy i szyję (Pawliczak 2021).

Wśród dostępnych pozycji literaturowych nie znajdują się informacje o prowadzeniu podobnych badań z zakresu pielęgnacyjnych kremów rozgrzewających. Można więc stwierdzić, że ta kategoria kosmetyków jest aktualnie mało popularnym przedmiotem do prowadzenia badań. Z powyższej analizy ankiety konsumenckiej wynika, że niewiele osób kiedykolwiek posiadało lub słyszało o rozgrzewających kremach do rąk, jednakże większość respondentów byłaby zainteresowana kupnem tego typu produktu.

Podsumowanie

Preferencje i potrzeby konsumentów ulegają dynamicznym zmianom pod wpływem zmieniającego się otoczenia. Poszukuje się składników wykazujących efekt rozgrzewający, które jednocześnie podnoszą jakość innowacyjnych produktów na rynku kosmetycznym. Jednym z nich może być imbir. Z przeprowadzonych badań ankietowych wynika, że większość z badanych osób raczej nie dokonałaby zakupu tego typu kremu. Bardzo mała grupa respondentów biorących udział w ankiecie miała w swoim posiadaniu krem z dodatkiem imbiru, jednakże deklarowała chęć nabycia tego typu produktu. Brak wcześniejszego posiadania przez respondentów kremu z dodatkiem imbiru może być spowodowany małą dostępnością na rynku produktów z tej kategorii. Z kolei sensoryczne badania konsumenckie wykazały, że najwyższą pożądalnością badanych wyróżników sensorycznych cechował się krem dostępny komercyjnie z imbirem w składzie. Ocena pożądalności cech produktów nie wykazała istotnych różnic między poszczególnymi ocenami próbek, jednak zauważalna jest tendencja w stronę wyższego stopnia poziomu zapachu, konsystencji, rozprowadzania na skórze, a także wyższego stopnia nawilżenia kremu dostępnego komercyjnie. Badane kremy z dodatkiem ekstraktów z różnych części imbiru wytworzone w warunkach laboratoryjnych charakteryzowały się niższą ogólną oceną wyróżników sensorycznych, co równoznaczne jest ze średnim zainteresowaniem nimi wśród ekspertów oceniających próbki.

Bibliografia

- Danwilai, K., Konmun, J., Sripanidkulchai, B., and Subongkot, S. (2017). *Antioxidant activity of ginger extract as a daily supplement in cancer patients receiving adjuvant chemotherapy: a pilot study*. *Cancer Manag Res.*, s. 11–18.
- Drużyńska, B. i Wojda, M. (2007). *Antioxidant Properties of Acetone Extracts From Selected Fresh and Dried Spices*, *Polish Journal of food and Nutrition Sciences*, no. 57, s. 47–51.
- Dylewska-Grzelakowska, J. (1999). *Kosmetyka stosowana*. Wydawnictwo Szkolne i Pedagogiczne.
- Klimek-Szczykutowicz, M., Szopa, A. i Ekiert, H. (2017). *Citrus limon (cytryna zwyczajna) – źródło surowców o cennych walorach kosmetycznych*. *Pol J Cosmetol*, 20(3): 184–195.
- Kościołek, A. (2021). *Cytryna – charakterystyka, właściwości, składniki odżywcze, zastosowanie*. Pobrane z <https://zywienie.abczdrowie.pl/wlasciwosci-cytryny>.
- Lee, J., Min, D., Lee, D. and Kim, W. (2021). *Zingiber officinale*. Roscoe Rhizomes Attenuate Oxaliplatin-Induced Neuropathic Pain in Mice. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(3), s. 1–2.
- Mahboubi, M. (2019). *Zingiber officinale Rosc. essential oil, a review on its composition and bio-activity*. *Clinical Phytoscience*. Tom 5, Article number: 6.
- Mashhadi, N.S., Ghiasvand, R., Askari, G., Hariri, M., Darvishi, L., and Mofid, M.R. (2013). *Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Effects of Ginger in Health and Physical Activity: Review of Current Evidence*. *Int J Prev Med.*, s. 36–42.
- Możdżeń, K., Barabasz-Krasny, B., Szymacha, K. i Oliwa, J. (2016). *Rośliny wykorzystywane w maskach kosmetycznych*. *Pol J Cosmetol*, 19(4): 372–379.
- Newerli-Guz, J. i Pych, M. (2012). *Właściwości przeciwutleniające imbiru (Zingiber officinale Roscoe)*. *Zeszyty Naukowe Akademii Morskiej w Gdyni*, nr 73, s. 28–33.
- Pawliczak, W. (2021). *Maść końska – skład, wskazania, działanie i przeciwwskazania*. Pobrane 9 czerwca 2021 z <https://www.swiatleku.pl/article/masc-konska-sklad-wskazania-dzialanie-i-przeciwwskazania>
- Sierpniowska, O. (2020). *Jak stosować maści?* Pobrane 9 sierpnia 2021 z <https://www.gdziepolec.pl/artykuly/jak-stosowac-masci>
- Słowińska, M. (2018). *Dlaczego ciepło leczy, czyli jak działają plastry, maści i herbaty rozgrzewające?* Pobrane 9 sierpnia 2021 z <https://apteline.pl/artykuly/dlaczego-rozgrzewanie-leczy-czyli-jak-dzialaja-plastry-masci-i-herbaty-rozgrzewajace>
- Sugimoto, K., Takeuchi, H., Nakagawa, K. and Matsouka, Y. (2018). *Hyperthermic Effect of Ginger (Zingiber officinale) Extract-Containing Beverage on Peripheral Skin Surface Temperature in Women*. *Complementary and Alternative Medicine*. (2):1–8.
- Szakiel, J. i Turek, P. (2019). *Sensoryczna ocena jakości kosmetycznych produktów nawilżających przeznaczonych do pielęgnacji skóry rąk*. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie*, 0(6(978)), 239–252.
- White, B. (2007). *Ginger: an overview*. *Am Fam Physician*. 75(11):1689-91.

Abstract

SENSORY EVALUATION OF THE QUALITY OF WARMING CREAMS FOR HAND CARE

The aim of this work was to assess consumer interest in warming creams and sensory evaluation of the prepared cream samples. In consumer questionnaire which entitled "Assessment of consumer interest in warming-up creams" participated 45 respondents. 45.5% answered that having a problem with cold hands and 55.6% had ever heard of skin care warming creams for hands. 84.4% of respondents had never used skincare warming creams, but more than 50% would be interested in buying a warming cream with ginger.

In the second stage there were prepared 3 samples of the cream: with extracts from ginger peel, ginger pulp and without any additives and compared them with a commercial ginger cream. All the samples were subjected to sensory tests by specialists from various scientific fields. The highest score was given to the commercial ginger cream, while the lowest score was given to the cream without ginger. The lab-prepared creams are average attractive among the experts who tested them.

Słowa kluczowe: imbir, krem do rąk, produkt naturalny, ekstrakty z roślin, zmniejszenie ilości odpadów

Keywords: ginger, hand cream, natural product, plant extracts, less waste

Karolina Lisińska, Wiktoria Stepnowska

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Nazwa wydziału: Wydział Nauki o Żywności

Koło Naukowe Żywienia i Profilaktyki Żywnościowej

Opiekun: dr inż. Joanna Ciborska

ORZECHY JAKO ŹRÓDŁO NIENASYCONYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH – WPŁYW NA FUNKCJE POZNAWCZE ORGANIZMU

1. Wstęp

Problemy z koncentracją, pamięcią i tym samym z szybkością przyswajania i przetwarzania informacji, a także zaburzenia funkcji wykonawczych, funkcji językowych i percepcji są coraz częściej występującymi problemami związanymi ze zdrowiem, zauważalnymi na całym świecie. Szczególnie widoczne są one w procesie starzenia się populacji i coraz częstszego występowania chorób neurodegeneracyjnych, które nasila przewlekła ekspozycja na stres oksydacyjny i rozwijające się w organizmie stany zapalne (Iżykowska 2020). Uszkodzenie neuronów osłabia proces komunikacji między neuronami, powodując deficyty pamięci, poznania i funkcji motorycznych, a modyfikacje te ostatecznie wykazują powinowactwo do patogenezy chorób, takich jak choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, stwardnienie zanikowe boczne i otępienie. Z tego względu ochrona przed rozwojem stresu oksydacyjnego i stanem zapalnym może chronić mózg przed nie tylko chorobami neurodegeneracyjnymi, będącymi ich skutkiem bezpośrednim, ale również przed chorobami współtowarzyszącymi (zapalenie stawów, nowotwory, cukrzyca typu 2 i inne zaburzenia korelujące ze starszym wiekiem). Skład błon neuronalnych, których kora jest między innymi stabilizowana przez nienasycone kwasy tłuszczowe omega-3, zmniejsza się wraz z wiekiem, przyczyniając się do zanikania funkcji neuronów. To sugeruje, że odpowiednie spożycie PUFA może być istotne w odwróceniu osłabienia morfologii neuronów i zmniejszenia plastyczności synaptycznej (Iżykowska 2020).

W 2014 roku wykazano, że dieta jest istotnym czynnikiem neuroprotekcijnym, a spożycie odpowiedniej podaży określonych składników odżywczych (m. in. niena-

syconych kwasów tłuszczowych, flawonoidów, choliny, witamin z grupy B, witaminy D i E, wapnia, cynku, seleniu, żelaza, miedzi, kurkuminy) wykazuje wpływ na łagodzenie zaburzeń poznawczych, poprawę plastyczności synaptycznej stanowiącej substrat dla procesów pamięciowych (Ciemniewska-Żytkiewicz i in. 2014).

Wykazano, że nienasycone kwasy tłuszczowe zawarte w orzechach przyczyniają się do poprawy funkcjonowania poznawczego: funkcjonowania związanego z uczeniem się i pamięcią, regulacją nastroju i odczuwaniem wyższego poziomu energii życiowej, a spożywanie orzechów każdego dnia może być korzystnym nawykiem żywieniowym (Gomez-Pinilla 2008).

2. Charakterystyka fizykochemiczna orzechów

Orzechy to owoce, w których nasiona stanowią część jadalną, a owocnie są twarde, suche i niejadalne. Charakterystyczną cechą składu chemicznego orzechów jest duża zawartość białka (15--18%) i tłuszczu (60–63%), a także wysoka wartość energetyczna, wynosząca ok. 640 kcal (Kazimierczak i in. 2008).

Orzechy są bogate w liczne wartościowe składniki odżywcze, przede wszystkim niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (orzechy są jednym z najobfitszych roślinnych źródeł tłuszczu), białko (posiadają niski stosunek lizyna:arginina, co skutkuje obniżeniem rozwoju miażdżycy i hipercholesterolemii), błonnik pokarmowy, flawonoidy, witaminy z grupy B (B_6 , niacyna, kwas foliowy), tokoferole i fitosterole, a także związki mineralne, takie jak żelazo, magnez, selen, miedź, cynk czy potas. Zawarte w nich uprzednio wspomniane flawonoidy mają wpływ na ich charakterystykę żywieniową, chroniąc organizm człowieka przed rozwojem stresu oksydacyjnego poprzez silne działanie antyoksydacyjne, które blokuje wzrost produkcji wolnych rodników (Zdrojewicz i in. 2015).

Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA) zaleca codzienne spożywanie 42 g orzechów różnego rodzaju (migdałów, orzechów laskowych, pistacji, orzechów włoskich, pekanów i orzechów arachidowych) (FDA 2003. Qualified health claims: Letter of Enforcement Discretion – Nuts and Coronary Heart Disease), a według EFSA (EFSA 2011, <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2032>) spożycie 30 g orzechów dziennie pomaga w utrzymaniu i poprawie stanu elastyczności naczyń krwionośnych. Są one zatem niezwykle cenną grupą produktów, którą można wprowadzić do codziennej diety.

3. Wpływ konsumpcji orzechów różnego gatunku na funkcje poznawcze organizmu

3.1. Orzechy włoskie

Orzechy włoskie wyróżniają się spośród innych najwyższą zawartością kwasu alfa-linolenowego (ALA, 18:3n-3), który w organizmie ludzkim posiada możliwość konwersji do aktywnej postaci kwasów tłuszczowych DHA i EPA. Kwas dokozaheksaenowy (DHA) i kwas eikozapentaenowy (EPA) pełnią funkcję utrzymującą plastyczność synaptyczną, utrzymywania stabilności błony neuronalnej i neurogenezy. Ich spożycie spowalnia spadek funkcji poznawczych u ludzi i zwierząt, tak jak ich niski poziom może odpowiadać za ich osłabienie (Gomez-Pinilla 2008).

Kwas alfa-linolenowy (ALA) działa hamująco na stan zapalny, między innymi obniżając poziom cytokin prozapalnych. Zawiera też kwas linolowy (LA; 18:2n-6), który posiada funkcję odwracania reakcji zapalnej w mózgu, będącej skutkiem ekspozycji na dietę obfitującą w nasycone kwasy tłuszczowe (działa jako homeostatyczny supresor w inicjacji zapalenia mikrogleju) (Tu i in. 2019).

Substancjami zawartymi w orzechach włoskich są też między innymi flawonoidy, fitosterole, kwas fenolowy, melatonina (która przekształca się w serotoninę), tokoferol gamma zwany inaczej witaminą E, selen, magnez, błonnik i białko. Ponadto, Vinson i in. (2011) wykazali, że orzechy włoskie mają najwięcej przeciwutleniaczy, posiadając tym samym najwyższy potencjał przeciwzapalny. Podkreślono również, że potrzeba tylko około siedmiu orzechów włoskich dziennie, aby uzyskać potencjalne korzyści zdrowotne odkryte w badaniach. W rankingowej tabeli związków redox-aktywnych, w żywności spożywanej w Stanach Zjednoczonych, spośród 1113 produktów żywnościowych, przebadanych pod kątem potencjału przeciwutleniającego, orzechy włoskie zajęły drugie miejsce (Halvorsen i in. 2006). Wykazano także, że orzechy włoskie posiadają najlepszy potencjał antyoksydacyjny wśród suszonych owoców (Mishra i in. 2010). Przeciwzapalne działanie składników odżywczych zawartych w orzechach włoskich sugeruje, że mogą one zmniejszać ryzyko chorób związanych ze starzeniem się organizmu.

W badaniu klinicznym, z udziałem grupy starszych kobiet, udowodniono, że wyższe długotrwałe spożycie orzechów ogółem korelowało z poprawą średniego stanu poznawczego dla wszystkich wyników poznawczych. Kobiety, które spożywały co najmniej 5 porcji orzechów tygodniowo uzyskały wyższe wyniki, niż kobiety, które nie wprowadziły tej zmiany w diecie. Można więc uznać, że częste spożycie orzechów może być skuteczną interwencją zdrowia publicznego w zakresie profilaktyki zaburzeń funkcji kognitywnych postępujących z wiekiem. Szczególną uwagę zwrócono tutaj na spożycie orzechów włoskich. Badanie powtórzono z uwzględnieniem zawartości orzechów włoskich w spożyciu ogółem, z uwagi na inny rozkład kwasów tłuszczowych w orze-

chach włoskich w porównaniu do innych orzechów (między innymi zawartość kwasu alfa-linolenowego). Pojawiła się sugestia, że osoby, które spożywały orzechy włoskie 1 do 3 razy w miesiącu miały lepsze funkcje poznawcze niż osoby, które spożywały orzechy włoskie rzadziej niż raz w miesiącu, lecz trudno wysunąć wnioski z uwagi na niską liczebność grupy spożywającej je częściej. Ani spożycie orzechów ogółem, ani spożycie z uwzględnieniem orzechów włoskich nie były związane ze spadkiem funkcji poznawczych w okresie obserwacji (O'Brien i in. 2014).

3.2. Orzechy brazylijskie

Spośród wszystkich orzechów, orzechy brazylijskie są najbogatszym źródłem selenu. Wykazano, że ich amazońska odmiana może stanowić substytut dla suplementacji selenem. Oprócz niego zawierają też wiele cennych związków o działaniu przeciwzapalnym, takich jak pochodne flawonoidów (m.in. kwercerynę, kwas galusowy, kwas protokatechowy, katechinę), kwasy fenolowe, tokoferole i cynk. Cechują się wysoką zawartością tłuszczu (60–70% energii ogółem). Najliczniejszą grupą w profilu kwasów tłuszczowych są polienowe kwasy tłuszczowe, stanowiące blisko 42%, następnie jednonienasycone kwasy tłuszczowe – około 34%, a następnie kwasy tłuszczowe nasycone, stanowiące nieco ponad 24% wszystkich kwasów tłuszczowych. Najistotniejszym kwasem tłuszczowym jest kwas linolowy C 18:2, którego zawartość oszacowano na około 43%. Przy tym wykazać można niewielką ilość kwasu alfa-linolenowego, co będzie czynnikiem stanowiącym o niekorzystnym stosunku n-6 do n-3 w tym produkcie (Kluczowski i in. 2015).

Wykazano, że spożycie orzechów brazylijskich wpływa na poziom selenu we krwi i tym samym sprawność poznawczą u osób starszych z łagodnymi zaburzeniami funkcji poznawczych. Osoby, które brały udział w badaniu (grupa 31 osób) spożywały dziennie jeden orzech brazylijski przez 6 miesięcy. Oceniano stężenie selenu we krwi, zdolność absorbowania rodników tlenowych i aktywność peroksydazy glutationowej w erytrocytach, a także poziom malondialdehydu, który jest markerem stresu oksydacyjnego. U osób, które ukończyły próbę, zanotowano podwyższony poziom selenu po wprowadzeniu dodatku do diety w postaci orzecha brazylijskiego, podczas gdy grupa kontrolna nie wykazała zmian, natomiast pod kątem parametrów związanych z układem antyoksydacyjnym zmianie uległ poziom aktywności GPx w erytrocytach i był wyższy u grupy badanej niż u grupy kontrolnej (Cardoso i in. 2016).

Nasilający się stres oksydacyjny jest w istotny sposób powiązany z upośledzeniem funkcji poznawczych. Selen, zawarty w orzechach brazylijskich, ma działanie przeciwutleniające poprzez selenoproteiny, dlatego działanie antyoksydacyjne i przeciwzapalne może mieć swoje zastosowanie terapeutyczne w zachowaniu sprawnego działania funkcji kognitywnych organizmu, tym samym przyczyniając się do ograniczenia ryzyka wystąpienia chorób neurodegeneracyjnych (Ren i Chung 2007).

3.3. Orzechy laskowe

Orzechy laskowe wyróżniają się wyjątkowymi właściwościami. W 60% składają się z tłuszczu, z czego tylko 8% tej wartości stanowią tłuszcze nasycone. Reszta to jedno- i wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Wśród nich znajdują się kwasy omega-3 (kwasy alfa-linolenowe oraz ich pochodne). Zawierają one zarówno witaminy rozpuszczalne w tłuszczach (A, E, K), jak i te rozpuszczalne w wodzie (C, cholina, betaina, niektóre witaminy z grupy B). Co więcej, zawierają również wolne aminokwasy (arginina, lizyna), białka, cukry, kwasy organiczne oraz proantocyjanidyny (Solfrizzi i in. 2006).

Orzechy laskowe wyróżniają się od innych charakterystyczną skórką pokrywającą orzech, ta natomiast bogata jest w polifenole (w tym kwasy fenolowe, flawonoidy, flawonole). Wysoka zawartość w orzechach laskowych witaminy E daje silne właściwości antyoksydacyjne (Rolnik, Olas 2018). W tradycyjnej medycynie perskiej, orzechy uważane są jako środek, który zapobiega atrofii mózgu oraz utracie pamięci. Wiele badań potwierdziło również związek pomiędzy spożyciem orzechów laskowych, a poprawą funkcji poznawczych (Barbour i in. 2014).

W 2016 roku zostało przeprowadzone badanie, które miało na celu ocenę zastosowania orzecha laskowego w terapii zaburzeń pamięci. W badaniu podawano szczeromom dziennie 800 mg orzecha laskowego oraz oceniano wpływ spożywania orzechów laskowych na pamięć, lęk, stany zapalne układu nerwowego. Wyniki tego badania wykazały, że karmienie orzechami laskowymi powoduje poprawę pamięci, zmniejszone zachowania lękowe oraz działa łagodząco na stany zapalne (Bahaeddin i in. 2016). Tego typu odkrycia w badaniach sugerują, że orzech laskowy, jako element diety, może mieć korzystny wpływ w leczeniu Alzheimer'a.

3.4. Migdały

Migdał jest orzechem pochodzącym z Azji Środkowej, natomiast obecnie największym producentem orzechów tej odmiany są stany Zjednoczone Ameryki Północnej. Migdały składają się w 50% z lipidów, 25% z białek oraz w 20% z węglowodanów (Barreca i in. 2020). Charakteryzują się wieloma różnymi związkami bioaktywnymi. Swoje właściwości zdrowotne zawdzięczają dużej zawartości jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (Gorji i in. 2017), ponadto zawierają błonnik, witaminy, związki mineralne (mangan, magnez, miedź, fosfor), polifenole, fitosterole oraz metabolity wtórne. Ich dokładny skład chemiczny zależy jednak od formy uprawy oraz cech klimatycznych (Barreca i in. 2020). Jakość migdałów oceniana jest poprzez zawartość wody, lipidów oraz skład kwasów tłuszczowych. Z tego względu wiele badań oceniało wpływ czynników zewnętrznych na jakość migdałów (Wroniak i in. 2016).

Badanie przeprowadzone przez Piscopo i in. (2010) wykazało, że podczas dojrzewania migdałów wzrasta zawartość tłuszczu i kwasów. Z badań opublikowanych w 2021

roku na temat wpływu spożywania migdałów na funkcje poznawcze u osób dorosłych, zaobserwowano znaczną poprawę pamięci wzrokowo-przestrzennej, uczenia się oraz pamięci roboczej (Rakic i in 2021). Kluczowe składniki odżywcze, obficie znajdujące się w migdałach (tj. jednonienasycone kwasy tłuszczowe, witamina E) zostały w wielu badaniach powiązane ze zmniejszonym spadkiem funkcji poznawczych (Morris i in. 2002).

Podsumowanie

Badania jednoznacznie potwierdziły, że orzechy zawierają wiele korzystnych dla organizmu związków. Ich liczba, jakość oraz różnorodność zależy przede wszystkim od odmiany, ale także wpływ na to ma sposób uprawy czy warunki klimatyczne. Jedno- oraz wielonienasycone kwasy tłuszczowe poprawiają funkcje poznawcze (uczenie się, zapamiętywanie, samopoczucie itd.), kwas alfa-linolenowy powoduje zahamowanie stanów zapalnych, a kwas linolenowy odwraca reakcje zapalne w mózgu. Polifenole oraz flawonoidy chronią organizm człowieka przed wolnymi rodnikami. Obfitość w witaminy i minerały zapobiega wszelkiego rodzaju niedoborom żywieniowym, chroniąc przed związanymi z tym chorobami.

Każda odmiana orzechów różni się od siebie składem chemicznym, dlatego tak ważna jest różnorodność w ich spożyciu. Badania potwierdziły, że 30 g orzechów dziennie przynosi zauważalne efekty zdrowotne, co więcej, ze względu na ich odmienny skład chemiczny, warto zadbać o ich różnorodność w diecie.

Spośród wyżej omówionych orzechów, te które wyróżniają się najbogatszą wartością odżywczą, to orzechy włoskie. Mają też najwyższą zawartość kwasów EPA i DHA. Charakteryzują się również największą ilością przeciwutleniaczy.

Wszystkie badania, potwierdzające wyjątkowe właściwości orzechów oraz ich wpływ na funkcje poznawcze, dały szansę w leczeniu choroby Alzheimera i Parkinsona oraz w ich profilaktyce. Zapobieganie stresowi oksydacyjnemu chroni także przed chorobami stawów, cukrzycy typu 2 a nawet nowotworami.

Literatura

- Bahaeddin Z., Yans A., Khodaghali F., Hajimehdipoor H., Sahranavard S. 2016. Hazelnut and neuroprotection: Improves memory and hindered anxiety in response to intrahippocampal A β injection. *Nutr Neurosci*, 129: 115-127.
- Barbour J., Howe P., Buckley J., Bryan J., Coates A. 2014. Nut consumption for vascular health and cognitive function. *Nutr Res Rev*, 27(1): 131-158.

- Barreca D., Nabavi M. S., Sureda A., Rasekhian M., Raciti R., Silva A., Annunziata G., Arnone A., Tenore Carlo G., Suntar I., Mandalari G. 2020. Almonds (*Prunus Dulcis* Mill. D. A. Webb): A Source of Nutrients and Health-Promoting Compounds. *Nutrients*. 12: 672.
- Cardoso A.B. D, da Silva B. V., Busse A.L., Magaldi R.M., Jacob-Filho W., Cozzolino S.M. 2016. Effects of Brazil nut consumption on selenium status and cognitive performance in older adults with mild cognitive impairment: a randomized controlled pilot trial. *Eur J Nutr*, 55(1): 107-16.
- Ciemniewska-Żytewicz H., Krygier K., Bryś J. 2014. Wartość odżywcza orzechów oraz ich znaczenie w diecie. *Post Tech Przetw Spoż*, 1: 90-96.
- EFSA 2011: Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to nuts and essential fatty acids (omega-3/omega-6) in nut oil (ID 741, 1129, 1130, 1305, 1407) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006, <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2032>
- FDA 2003. Qualified health claims: Letter of Enforcement Discretion - Nuts and Coronary Heart Disease: <https://www.fda.gov/food/food-labeling-nutrition/qualified-health-claims-letters-enforcement-discretion>
- Gómez-Pinilla F. 2008. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. *Nat Rev Neurosci*, 9(7): 568-578.
- Gorji N., Moeni R., Memariani Z. 2017. Almond, hazelnut and walnut, three nuts for neuroprotection in Alzheimer's disease: a neuropharmacological review of their bioactive constituents. *Pharmacol Res*, 129: 115- 127.
- Halvorsen L B., Carlsen H M., Phillips M K., Bohn K S., Holte K., Jacobs R D., Jr, Blomhoff R. 2006. Content of redox – active compounds (ie, antioxidants) in food consumed in the United States. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 84 (1): 95-135.
- Iżykowska I., Choroby neurodegeneracyjne jako problem degeneracyjny, (w:) Kompleksowa opieka nad pacjentem w chorobach cywilizacyjnych, pod red. Podhorska-Okołów M., Matkowski A., Uchmanowicz I. Wrocław 2020, 81-86.
- Kazimierzczak R. (2008). Owoce egzotyczne. W: Surowce pochodzenia roślinnego (red. K. Świetlikowska). Warszawa.
- Kluczkowski A. M., Artins M. M., Mundim S. M, Simoes R.H., Nascimento K.S., Marinho H. A., Kluczkowski A. 2015. Properties of Brazil nuts: A review. *Afr J Biotechnol*, 14(8): 642-648.
- Mishra N., Dubey A., Mishra R., Barik N. 2010. Study on antioxidant activity of common dry fruits. *Food Chem Toxicol*. 48(12): 3316-20.
- Morris M.C., Evans D.A., Bienias J.L. Tangney C.C., Wilson R.S. 2002. Vitamin E and cognitive decline in older persons. *Arch. Neurol*. 59: 1125-1132.
- O'Brien J., Okereke O., Devore E., Rosner B., Breteler M., Grodstein F. 2014. Long-term intake of nuts in relation to cognitive function in older women. *J Nutr Health Aging*, 18(5): 496-502.
- Piscopo A., Romeo F.V., Petrovicova B., Poiana M. 2010. Effect of the harvest time on kernel quality of several almond varieties (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb). *Sci. Hortic*. 125: 41-46.
- Rakic M. J., Tanprasertsuk J., Scott M. T., Rasmussen M. H., Mohn S. E., Chen O., Johnson E. 2021. Effects of daily almond consumption for six months on cognitive measures in healthy middle-aged to older adults: a randomized control trial. *Nutr Neurosci*, 15: 1-11.
- Ren J., Chung S.H. 2007. Anti-inflammatory Effect of α -Linolenic Acid and Its Mode of Action through the Inhibition of Nitric Oxide Production and Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Expression via NF- κ B and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. *J Agric Food Chem*, 55 (13): 5073-5080.
- Rolnik A., Olas B. 2018. Orzechy Leszczyny Pospolitej (*Corylus Avellana*) i jej inne organy jako bogate źródło związków o właściwościach prozdrowotnych. *Kosmos*. 63 (3): 643-646.
- Solfrizzi V., Colacicco A.M., D'Introno A., Capurso C., Torres F., Rizzo C., Capurso A., Panza F. 2006. Dietary intake of unsaturated fatty acids and age-related cognitive decline: A 8.5-year follow-up of the Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurobiol Aging*, 27 (11): 1694-1704

- Tu T. H., Kim H., Yang S., Kim J., Kim J. 2019. Linoleic acid rescues microglia inflammation triggered by saturated fatty acid. *Biochem Biophys Res Commun*, 513 (1): 201-206
- Vinson J., Cai Y. 2011. Nuts, especially walnuts, have both antioxidant quantity and efficacy and exhibit significant potential health benefits. *Food Funct*, 3: 134-40.
- Wroniak M., Parzychowska J., Rękas A. 2016. Charakterystyka i porównanie wartości żywienia orzechów i otrzymanych z nich olejów. *Post Nauki Techno Przem Rolno-Spoż*, 71 (3).
- Zdrojewicz Z., Starostecka E., Królikowska N., Kuźnicki P. 2015. Wpływ składników zawartych w orzechach na organizm człowieka. *Med Rodz*, 3(18): 124-130.

Abstract

NUTS AS A SOURCE OF UNSATURATED FATTY ACIDS- INFLUENCE ON COGNITIVE FUNCTION

It is now a well established belief that nuts have a positive effect on memory, concentration and other cognitive functions. They are also one of the important products in the Mediterranean diet, which is currently leading the way in terms of short- and long-term health benefits and inhibition of diet-related diseases. Various types of nuts are primarily a source of essential fatty acids, which are beneficial in inhibiting oxidative stress, reducing inflammation, delaying the ageing process, regulating blood pressure and improving insulin sensitivity of tissues. In addition, they can affect telomere length, which is an indicator of cellular aging. In a notable way through the presence of unsaturated fatty acids, they also act to increase cognitive functions, proper sleep, learning ability, memory, through the penetration of flavonoids contained in them into the hippocampus regions of the brain. This group of products supports the process of neurogenesis, i. e. the formation of new neurons. Depending on the type of nuts consumed - they activate particular brain waves, and some are effective in protecting the nervous system from developing neurodegenerative diseases.

This paper reviews the literature on the properties of different kinds of nuts, focusing on their effect on human cognitive processes.

Słowa kluczowe: orzechy, nienasycone kwasy tłuszczowe, funkcje poznawcze, mózg

Key words: nuts, unsaturated fatty acid, cognitive function, brain

Krzysztof Sikora

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Studenckie Koło Naukowe Pielęgniarstwa i Nauk o Zdrowiu
Opiekun: dr n. med. Ewa Kupcewicz

OCENA POZIOMU LĘKU, GNIEWU I DEPRESJI U PRACOWNIKÓW OCHRONY ZDROWIA W ZWIĄZKU Z PANDEMIĄ COVID-19

Wstęp

Koronawirusy – wirusy RNA zaliczane do rodziny *Coronaviridae* klasyfikowane są do dwóch podrodzin: *Torovirinae* oraz *Coronavirinae*. Pod kątem medycznym najbardziej istotne są grupy wirusów alfa i beta, gdyż należą do nich gatunki wywołujące zakażenia wśród ludzi (Pyrć 2015). Koronawirusy przyczyniają się do występowania chorób zarówno u ludzi jak i zwierząt. Wirusy należące do tej rodziny bardzo długo nie budziły szczególnego zainteresowania wirusologów i medyków, uważano bowiem, że odpowiedzialne są za występowanie łagodnego przeziębienia, ustępującego samistnie w przeciągu kilku dni.

SARS-CoV-2 (ang. *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) to jeden z siedmiu poznanych dotychczas wirusów z rodziny koronawirusów, cechujący się wysoką zakaźnością. Powoduje zespół ciężkiej niewydolności oddechowej określanej jako COVID-19 (ang. *coronavirus disease-19*) (Andersen i in. 2020).

COVID-19 jest chorobą układu oddechowego, w przebiegu której występują: duszność, gorączka oraz kaszel. W wyniku cięższego przebiegu infekcji dojść może nie tylko do zapalenia płuc, ale także do niewydolności nerek i/lub niewydolności wielonarządowej. Do jednego z najpoważniejszych powikłań zaliczany jest rodzaj „ataku płuc zwany nowatorskim zapaleniem płuc zakażonym koronawirusem 2019 (NICP). Należy do chorób wysoce zakaźnych. U przeważającej części ludzi, przebieg COVID-19 ma charakter łagodny lub umiarkowany. Osobami należącymi do grona wysokiego ryzyka wystąpienia powikłań i/lub śmierci są osoby starsze i chore przewlekle.

Początek pandemii COVID-19 rozpoczęła epidemia zapalenia płuc o lokalnym zasięgu i pierwotnie nieznaney etiologii, w grudniu 2019 r. w Chinach (Wuhan, pro-

wincja Hubei) (WHO, <https://www.who.int/china/news/detail/09-01-2020-who-statement-regarding-cluster-of-pneumonia-cases-in-wuhan-china>). Naukowcy szybko zidentyfikowali patogen, którym okazał się SARS-CoV-2 (koronawirus 2 zespołu ostrej niewydolności oddechowej). W niedługim czasie epidemia rozszerzyła się, obejmując wszystkie prowincje położone w Chinach kontynentalnych oraz 27 krajów i regionów. W dniu 17 lutego 2020 r. liczba potwierdzonych przypadków wynosiła ponad 70 000 (Dong i in. 2020).

Współcześnie podczas pandemii COVID-19 konsekwencje psychologiczne oraz psychiatryczne, na które narażeni są ludzie i z którymi muszą się zmagać są m.in. objawy pojawiające się w reakcji na traumatyczny stres, strach, niepewność oraz poczucie występowania zagrożenia ze strony innych osób, które może być rzeczywiste, domniemane, odczuwane subiektywnie.

Pandemie nie są wyłącznie zjawiskami medycznymi – wywierają wpływ zarówno na jednostki, jak i społeczeństwa wielopoziomowo wywołując zakłócenia. W aspekcie społecznym wymienić można piętno oraz ksenofobię jako skutki pandemii i/lub epidemii (Moukaddam, Shah 2020).

W literaturze przedmiotu emocje opisane są jako „subiektywny stan psychiczny, uruchamiający priorytet dla związanego z nią programu działania. Odczuwaniu emocji towarzyszą zwykle zmiany somatyczne, ekspresje mimiczne i pantomimiczne oraz specyficzne zachowania” (Doliński i in. 2008). Emocje definiować możemy również w aspekcie stanów intencjonalnych – dotyczą one wtedy obiektu i występuje związek między osobą odczuwającą a danym obiektem. Kwestią istotną w przypadku emocji, ich wstępowania i odczuwania jest samokontrola, czyli wykazywanie przez osobę zachowania, które mieści się w standardach akceptowanych przez nią samą bądź w standardach społecznych. Samokontrola obejmuje wyzwalanie przez osobę reakcji, w wyniku których zdobywa pokrewność między odczuwanymi stanami emocjonalnymi, odczuciami afektywnymi oraz myślami, a przyjętymi kanonami wewnętrznymi, bądź zewnętrznymi.

Istotną kwestią uważaną za niekorzystną jest tłumienie emocji, które może prowokować nasilenie intensywności doznawanych emocji, tudzież prowadzić do przedłużającego się ich utrzymywania w charakterze napięcia emocjonalnego (Kofta 1979).

Wyniki badań potwierdzają pozytywny wydzźwięk sposobności manifestowania emocji w obliczu katastrofy (Adams, Boscarino 2006).

Celem niniejszej pracy jest określenie poziomu lęku, gniewu i depresji u pracowników ochrony zdrowia w związku z pandemią COVID-19.

Material i metody

W badaniach zastosowano metodę sondażu diagnostycznego. Dane zebrano za pomocą kwestionariusza własnej konstrukcji, który zawierał pytania dotyczące zmiennych socjodemograficznych. Do pomiaru kontroli emocji posłużono się Skalą Kontroli Emocji (CECS – autorstwa: Maggie Watson, Steven Greer) w polskiej wersji językowej (adaptacja Zygfryd Juczyński). Skala CECS składa się z 21 stwierdzeń umożliwiających otrzymanie wyniku ogólnego dotyczącego kontroli emocji, a także podskal: kontroli lęku, kontroli gniewu, kontroli depresji. Uzyskany wynik porównuje się ze średnim wynikiem osób różnej płci i w różnym wieku lub ze średnim wynikiem osób z jednej z czterech grup klinicznych (diabetyków, pacjentów dializowanych, mężczyzn po zawałe i kobiet w okresie menopauzy). Obliczeń wyników dokonuje się osobno dla każdej z trzech podskal. Wartości jakie możemy otrzymać w poszczególnych podskalach zawierają się w przedziale od 7 do 28 punktów. Ogólny wskaźnik kontroli emocji mieści się w granicach od 21 do 84 punktów. Im wyższa wartość zostanie osiągnięta, tym większe występuje tłumienie negatywnych emocji.

Dane zostały zebrane w arkuszu kalkulacyjnym Excel 2019. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu TIBCO Statistica 13.3PL.

Badanie ankietowe przeprowadzono w pierwszym kwartale 2021 r. wśród pracowników Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Olsztynie oraz Miejskiego Szpitala Zespołowego w Olsztynie. Badanie było dobrowolne i anonimowe. Ankietowanym udzielono informacji o celu badania. Respondenci mieli możliwość zadawania pytań i uzyskania wyjaśnień.

Wyniki

W badaniu ankietowym uczestniczyło 163 pracowników ochrony zdrowia, w tym 126 (77,0%) pracowało w Uniwersyteckim Szpitalu Klinicznym w Olsztynie, a 37 w Miejskim Szpitalu Zespołowym w Olsztynie (23,0%). Najlicniejszą grupę (n=138; 85,0%) wśród ankietowanych stanowiły osoby wykonujące zawód pielęgniarza/pielęgniarki. Pozostali respondenci reprezentowali grupy zawodowe: opiekunów medycznych (n=3; 2,0%) lekarzy (n=9; 5,0%), rehabilitantów – fizjoterapeutów (n=6; 4,0%), pracowników higieny szpitalnej (n=7; 4,0%). Prawie połowa badanych (n=78; 48,0%) posiada wykształcenie wyższe magisterskie. Tytuł licencjata deklarowało 59 osób (36,0%). W pozostałej grupie 26 badanych (16,0%) znalazły się osoby, które ukończyły: liceum medyczne, medyczne studium zawodowe, szkołę policealną. W grupie badanych respondentów 76,0% (n=124) zatrudnionych było w wymiarze pełnego etatu, 32 osoby (20,0%) wykonywały pracę na podstawie kontraktu, natomiast 7 osób (4,0%) zatrud-

nionych było w wymiarze niepełnego etatu. Średni staż pracy liczony w latach wynosił 1 ± 11 z medianą 6.

29 ankietowanych (18,0%) jako miejsce wykonywanej pracy wskazało Oddział COVID-19, pozostałe osoby zatrudnione były m.in. w Klinice Budzik dla dorosłych w Olsztynie, w Oddziałach Chirurgii Ogólnej i Chirurgii Urazowo-Ortopedycznej, Kardiologii itp.

Przeważającą część respondentów, bo aż 90,0% ($n=147$) stanowiły kobiety, w badaniu uczestniczyło także 16 mężczyzn (10,0%). Przedział wiekowy respondentów mieścił się w zakresie od 22 do 62 lat. Blisko połowa badanych miała od 26 do 47 lat. Średnia wartość wieku badanych liczona w latach, wynosi 36 ± 12 z medianą 32. Jak wynika z analizy danych 60 (37,0%) osób wskazało, że jest stanu wolnego (kawaler/panna), kolejne 60 osób (37,0%) żyło w sformalizowanym związku małżeńskim, wdową lub wdowcem było 5 osób (3,0%). Na zadane pytanie, dotyczące posiadania dzieci ponad połowa badanych ($n=88$; 5,0%) stwierdziła, że nie posiada dzieci.

Pomiaru subiektywnej kontroli emocji: gniewu, lęku oraz depresji dokonano przy użyciu skali CECS. W badanej grupie wartości punktowe podskali kontroli emocji respondentów zawierały się kolejno w przedziałach: skala gniewu od 7 do 28 punktów, skala depresji od 7 do 27 a skala lęku od 7 do 25.

Wśród osób biorących udział w badaniu ogólny wskaźnik kontroli emocji osiągał poziom od 24 do 75 punktów. Szczegółowe dane zawarto w Tabeli 1.

Tabela 1. Statystyki opisowe dla skali kontroli emocjonalnej w grupie respondentów

Wskaźniki kontroli emocji	N	\bar{x}	Me	Min	Max	Q ₁	Q ₃	Roz- stęp	SD
Gniew	163	16.1	16	7	28	13	19	21	4.2
Depresja	163	16.8	17	7	27	14	20	20	4.2
Lęk	163	17.4	18	7	25	15	20	18	3.9
Ogólny wskaźnik	163	50.4	51	24	75	44	56	51	9.6

Źródło: Opracowanie własne.

W wyniku analizy korelacji r-Pearsona stwierdzono występowanie istotnych statystycznie dodatnich związków korelacyjnych pomiędzy poszczególnymi podskalami emocji. Osiągnięcie wyższego poziomu w skali gniewu jest związane ($r=0,47$) z wyższymi poziomami w skalach depresji i lęku ($r=0,29$). Występuje również pozytywny związek pomiędzy skalą depresji oraz lęku ($r=0,45$) wyższy poziom w skali depresja jest związany z wyższym poziomem w skali lęk. Za istotne statystycznie wartości przyjęto $p \leq 0,05$ (Tabela 2.).

Tabela 2. Istotność korelacji Pearsona (r) dla skal emocjonalnych

	Gniew		Depresja		Lęk	
	r	p	r	P	R	P
Gniew			0.47	0.0001	0.29	0.0001
Depresja	0.47	0.0001			0.45	0.0001
Lęk	0.29	0.0001	0.45	0.0001		

Istotność statystyczna $p \leq 0,05$.

Źródło: Opracowanie własne.

Stwierdzono, że poziom wykształcenia oraz zakład pracy mają istotny wpływ na poziom skali gniewu. Osoby pracujące w Miejskim Szpitalu Zespolonym w Olsztynie wykazywały o wiele wyższy średni poziom w skali gniewu w porównaniu do respondentów zatrudnionych w Uniwersyteckim Szpitalu Klinicznym w Olsztynie. Świadczy to o zjawisku związanym z tłumieniem emocji (gniewu) wśród pracowników Miejskiego Szpitala Zespolonego. Za istotną statystycznie wartość przyjęto $p \leq 0,05$ (Tabela 3.).

Tabela 3. Poziom istotności czynników związanych z pracą na poziomie skali Gniewu, Depresji i Lęku

	Gniew		Depresja		Lęk		Ogółem	
	x	SD	x	SD	X	SD	x	SD
Poziom wykształcenia	F=3.71. p<0.03		F=0.34. p<0.71		F=0.56. p<0.57		F=1.54. p<0.22	
studia licencjackie	16.1	4.3	17.2	4.0	17.6	3.7	50.9	9.2
studia magisterskie	15.4	3.6	16.6	4.4	17.1	4.1	49.2	9.4
Inne	18.0	5.0	16.8	4.2	18.0	3.8	52.8	10.7
Zakład pracy	F=4.68. p<0.03		F=0.80. p<0.37		F=1.95. p<0.16		F=3.67. p<0.06	
Szpital Miejski w Olsztynie	17.4	4.3	17.4	4.4	18.2	3.9	53.0	9.9
Uniwersytecki Szpital Kliniczny w Olsztynie	15.7	4.1	16.7	4.2	17.2	3.9	49.6	9.4

Istotność statystyczna $p \leq 0,05$.

Źródło: Opracowanie własne.

U ankietowanych z niższym poziomem wykształcenia średni poziom skali gniewu był zdecydowanie wyższy niż u osób posiadających wykształcenie licencjackie oraz magisterskie (Tabela 4.). Oznacza to, że im wyższy poziom wykształcenia, tym tłumienie emocji związanych z gniewem wśród badanych jest mniejsze. Za wartość istotną statystycznie przyjęto $p \leq 0,05$.

Tabela 4. Wpływ wykształcenia na średnia poziom skali gniewu (istotności p dla testu post-hoc NIR)

Wykształcenie	studia licencjackie	studia magisterskie	Inne
studia licencjackie		0.34	0.06
studia magisterskie	0.34		0.01
Inne	0.06	0.01	

Istotność statystyczna $p \leq 0,05$.

Źródło: Opracowanie własne.

Na drodze analiz statystycznych wykazano związek pomiędzy stanem cywilnym ankietowanych a poziomem skali lęku (Tabela 5.). Za wartość istotną statystycznie przyjęto $p \leq 0,05$.

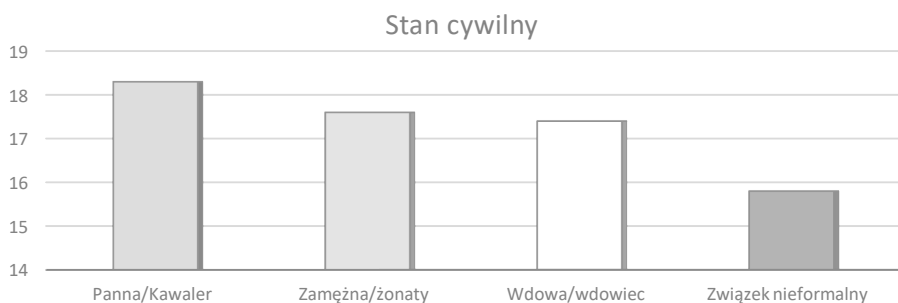
Tabela 5. Związek między stanem cywilnym a poziomem skali lęku (istotności p dla testu post-hoc NIR)

Stan cywilny	Kawaler/ panna	Zamężna/ żonaty	Wdowa/ wdowiec	Związek nieformalny
Kawaler/ panna		0.38	0.64	0.002
Zamężna/ żonaty	0.38		0.90	0.02
Wdowa/ wdowiec	0.64	0.90		0.38
Związek nieformalny	0.002	0.02	0.38	

Istotność statystyczna $p \leq 0,05$.

Źródło: Opracowanie własne.

Badani deklarujący swój stan cywilny jako kawaler/panna osiągnęli wyższy średni poziom skali lęku, a tym samym w większym stopniu tłumili emocje związane z lę-



Ryc. 1. Porównanie średnich poziomów skali lęku dla grup według stanu cywilnego

Źródło: Opracowanie własne.

kiem w porównaniu do osób pozostających w związku małżeńskim oraz związku nieformalnym (Ryc. 1.).

Dyskusja

Emocje nieprzerwanie towarzyszą człowiekowi oddziałując na sposób myślenia i tok podejmowanych poczynań. Bardzo ciężko jednoznacznie przewidzieć moment, w którym nacechowani będziemy konkretnymi emocjami. Trudno przewidzieć jakie uczucia będą nam towarzyszyły w momencie, w którym zetkniemy się z dramatycznymi wydarzeniami (Strycharska-Gać 2008).

Stan pandemii jest nie tylko zjawiskiem medycznym, gdyż wywierając wpływ na społeczeństwo prowadzi do powstawania zakłóceń, generowania niepokoju, wzrostu stresu, ksenofobii i stygmatyzacji (The coronavirus (COVID-19) pandemic's impact on mental Health 2020). Radzenie sobie z emocjami, które pojawiają się oraz są wzbudzane w czasie pandemii jest bardzo ważnym wyzwaniem o wysokim znaczeniu, nie mniejszym niż konsekwencje o charakterze zdrowotnym i gospodarczym (Neumann-Karpiński 2021). Kontrolę emocji ujmować można jako aspekt regulacji emocji, jednakże dotyczy się ona głównie przedsięwziętych przez jednostkę poczynań w kierunku radzenia sobie z tworzeniem, doświadczaniem, bądź ekspresją emocji lub też własnymi emocjonalnymi reakcjami. Zarówno ekspresja jak i kontrola emocjonalna związana jest z bardziej zakrojonym pojęciem regulacji emocji. Kontrola emocjonalna występować może w postaci częściowej, skupionej na poprzedniku regulacji uprzedzając wygenerowanie emocji czy też na drodze regulacji skupionej na reakcji po wytworzeniu emocji. Kontrola emocjonalna dotyczyć się może umiejętności wpływania na emocje i ich kształtowania za pomocą wykorzystywania strategii behawioralnych, bądź poznawczych. Taktyki wykorzystywane w celu osiągnięcia emocjonalnej kontroli rzutują na stan zdrowia oraz samopoczucia (Skinner 2013).

Badania własne wykazały, że średni ogólny poziom wskaźnika kontroli emocji wśród badanych pracowników ochrony zdrowia wynosił 50.4 ± 9.6 z medianą 51, natomiast ogólny wskaźnik kontroli emocji połowy badanych oscylował pomiędzy 44 a 56, gdzie wartości referencyjne ogólnego wskaźnika kontroli emocji wynoszą od 21-84 punktów.

W badaniach własnego autorstwa ustalono wpływ poziomu wykształcenia na poziom gniewu u badanych. Średni poziom skali gniewu u pracowników z niższym wykształceniem był istotnie wyższy niż u osób z wykształceniem licencjackim. Oznacza to, że pracownicy ochrony zdrowia z niższym wykształceniem w większym stopniu tłumili emocje związane z gniewem. Analogia występuje także w przypadku studiów drugiego stopnia. Osoby posiadające tytuł magistra w mniejszym stopniu tłumili swoje emocje związane z gniewem. Odmienne wyniki badań uzyskali Kalandyk i in. (2017), w których ekspresja emocji nie miała związku z poziomem wykształcenia wśród badanych.

Analiza wyników własnych wykazała wpływ miejsca pracy na poziom gniewu u badanych. Osoby pracujące w Miejskim Szpitalu Zespolonym w Olsztynie wykazywały większy poziom tłumienia emocji związanych z gniewem względem respondentów zatrudnionych w Uniwersyteckim Szpitalu Klinicznym w Olsztynie.

Na drodze analiz otrzymano wyniki wskazujące na to, iż pracownicy ochrony zdrowia wykonujący pracę na oddziałach COVID-19, w większym stopniu okazywali emocje związane z gniewem, w porównaniu do osób pracujących na innych oddziałach. Di Mattei i in. (2021) w badaniach przeprowadzonych wśród włoskich pracowników ochrony zdrowia, podczas pierwszej fali COVID-19, wskazują na występowanie wyższego poziomu gniewu, lęku, bezsenności oraz wypalenia i objawów zespołu stresu pourazowego u badanych pracujących na oddziałach COVID-19 w porównaniu do osób, które swoją pracę wykonywali w innych miejscach/ oddziałach szpitala.

W niniejszym badaniu nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji pomiędzy wykonywanym zawodem, formą zatrudnienia, stażem pracy, sytuacją mieszkalno-bytową oraz posiadaniem dzieci, czy zmiennymi socjodemograficznymi takimi jak płeć, wiek, sytuacja materialna na poziom ekspresji lęku gniewu i depresji wśród pracowników ochrony zdrowia. Podobne wyniki dotyczące zmiennych takich jak: wiek, płeć, staż pracy otrzymali autorzy przeprowadzonego badania wśród pracowników służby zdrowia w czasie pandemii COVID-19 w Turcji. Autorzy wskazują na brak występowania istotnej korelacji zmiennych socjodemograficznych z poziomem lęku oraz depresji (Besirli i in. 2021).

Wasemann i in. (2021) wskazują na występujące różnice ze względu na płeć, tzn. wśród pracowników szpitala to kobiety prezentują wyższy poziom gniewu w porównaniu do współpracowników płci męskiej w momencie zarówno bezpośredniego jak i pośredniego kontaktu z pacjentami chorymi na COVID-19.

W doniesieniach naukowych znaleźć możemy wyniki sugerujące występowanie różnic pomiędzy grupami zawodowymi wykonującymi pracę na oddziałach COVID-19 w kwestii odczuwanego poziomu gniewu i tendencji do jego okazywania. Zarówno personel pielęgniarski, jak i lekarski sygnalizował gorsze warunki pracy na oddziałach COVID-19 w porównaniu z pozostałym personelem pracującym na tychże oddziałach. Istotnym faktem jest także występowanie większych objawów lęku i bezsenności u pielęgniarek, aniżeli w grupie lekarzy pracujących zarówno na oddziałach COVID-19, jak i innych (Di Mattei i in. 2021).

Analiza wyników własnych wykazała, iż średni poziom skali lęku u osób będących kawalerem lub panną był istotnie wyższy niż u osób będących w nieformalnych związkach. W badaniach przeprowadzonych przez Gambina i in. (2020) na populacji dorosłych Polaków wykazano występowanie większego nasilenia objawów depresji oraz lęku uogólnionego u badanych pozostających w związku nieformalnym. Najwyższym poziomem lęku uogólnionego cechowały się natomiast osoby niemieszkające wspólnie ze swoim partnerem/partnerką.

Wyniki niniejszego badania sugerują występowanie związku pomiędzy poziomem skali gniewu (osoby takie bardziej tłumia emocje związane z gniewem) oraz poziomem skali depresji i lęku (osoby takie bardziej tłumia emocje związane z depresją oraz lękiem). Stwierdzono, że osoby tłumiące w większym stopniu gniew również w większym stopniu tłumia lęk i emocje związane z depresją. Istotnym wydaje się także, iż osoby w większym stopniu kontrolujące ekspresje emocji związanych z depresją, w większym stopniu także kontrolują lęk.

Przeprowadzone badania otwierają pole do dyskusji w tematyce poziomu kontroli emocji; lęku gniewu i depresji wśród pracowników ochrony zdrowia podczas pandemii COVID-19. Brak możliwości porównania do innych badań wynika z dynamicznie rozwijającej się sytuacji pandemicznej oraz braku dostępnej literatury porównawczej. Sugeruje się kontynuowanie dalszych badań w celu doboru odpowiednich środków prewencyjnych w zakresie zdrowia psychicznego pracowników ochrony zdrowia. Słusznym wydaje się także przeprowadzenie badania na większej populacji.

Podsumowanie

Ustalono zależność pomiędzy stopniem wykształcenia a poziomem tłumienia emocji. Im stopień wykształcenia był wyższy, tym statystycznie występowała większa ekspresja gniewu u badanych. Miejsce pracy determinowało poziom kontroli gniewu. Osoby pracujące w Miejskim Szpitalu Zespolonym w Olsztynie wykazywały większy poziom tłumienia emocji związanych z gniewem względem respondentów zatrudnionych w Uniwersyteckim Szpitalu Klinicznym w Olsztynie. Pracownicy ochrony zdrowia wykonujący pracę na oddziałach COVID-19 w większym stopniu okazywali emocje związane z gniewem. Zmienne takie jak: wykonywany zawód, forma zatrudnienia, staż pracy, sytuacja mieszkalno-bytowa, posiadanie dzieci, płeć, wiek, sytuacja materialna nie wpływają na poziom ekspresji lęku gniewu i depresji wśród pracowników ochrony zdrowia. Istnieje zróżnicowanie w średnim poziomie skali lęku. Osoby mające status cywilny kawaler/panna w większym stopniu kontrolują emocje związane z lękiem niż osoby pozostające w nieformalnych związkach. Stwierdzono występowanie związku pomiędzy poziomem gniewu, lęku i depresji w badanej grupie. Osoby tłumiące w większym stopniu gniew także w większym stopniu tłumia lęk i emocje związane z depresją. Respondenci w większym stopniu kontrolujący ekspresję emocji związanych z depresją, w większym stopniu także kontrolują lęk.

Literatura

- Adams R.E., Boscarino J.A. 2006. Predictors of PTSD and Delayed PTSD After Disaster. The Impact of Exposure and Psychosocial Resources. *J. Nerv. Ment. Dis.*, 194(7): 485.
- Andersen K.G., Rambaut A., Lipkin W.I., et al. 2020. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Med.*, 26: 450-452.
- Besirli A., Erden S.C., Atilgan M., et al. 2021. The Relationship between Anxiety and Depression Levels with Perceived Stress and Coping Strategies in Health Care Workers during the COVID-19 Pandemic. *Sisli Etfal Hastan Tip Bul.*, 55(1): 1-11.
- Di Mattei V.E., Perego G., Milano F., et al. 2021. The „Healthcare Workers’ Wellbeing (Benessere Operatori)” Project: A Picture of the Mental Health Conditions of Italian Healthcare Workers during the First Wave of the COVID-19 Pandemic. *Int. J. Environ. Res. Pub. Health*, 18(10): 5267.
- Dong E., Du H., Gardner L. 2020. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *Lancet Infect. Dis.*, 20(5): 533-534.
- Gambina M., Sękowski M., Woźniak-Prus M., i in. 2020. Uwarunkowania objawów depresji i lęku uogólnionego u dorosłych Polaków w trakcie epidemii COVID-19 – raport z pierwszej fali badania podłużnego. http://psych.uw.edu.pl/wp-content/uploads/sites/98/2021/01/Raport_objawy_depresji_leku_IV_fale.pdf/ (dostęp: 25 czerwca 2020 r.).
- Czytelnia Medyczna. <http://www.czytelniamedyczna.pl/5165,ludzkie-koronawirusy.html> (dostęp 19 kwietnia 2020 r.).
- National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7361582/#> (dostęp 18 kwietnia 2020 r.).
- World Health Organization. <https://www.who.int/china/news/detail/09-01-2020-who-statement-regarding-cluster-of-pneumonia-cases-in-wuhan-china> (dostęp 05 marca 2021 r.).
- Kalandyk H., Krajewska-Kułak E., Guty E. 2017. Ability to control emotions of nurses in relation to their jobs. *J. Edu., Health Sport*, 7(3): 86-96.
- Kofta M. 1979. Samokontrola a emocje. PWN, Warszawa.
- Maruszewski T., Doliński D., Łukaszewski W. i in. 2008. Emocje i motywacja [w:] *Psychologia. Podręcznik akademicki*. T 1, Doliński D., Strelau J. (red.), GWP.
- Moukaddam N., Shah A. 2020. Psychiatrists Beware! The Impact of COVID-19 and Pandemics on Mental Health. *Psychiatric Times*, 37(3): 11-12.
- Neumann-Karpiński P. 2021. Niebezpieczne emocje w dobie pandemii. *Filozofia w Praktyce*. T. 7. <http://filozofiawpraktyce.pl/niebezpieczne-emocje-w-dobie-pandemii/> (dostęp 22 marca 2021 r.).
- Skinner M. 2013. Emotional Control [w:] *Encyclopedia of Behavioral Medicine*. Gellman M. D., Turner J.R. (red.), Springer, Nowy Jork.
- Strycharska-Gać B. 2008. Złe emocje pod kontrolą. WSiP, Warszawa.
- Javed B., Sarwer A., Soto E.B., Mashwani Z.U.R. 2020. The coronavirus (COVID-19) pandemic’s impact on mental health. *Int. J. Health Plan. Manag.*, 35(5): 993-996.
- Wesemann U., Hadjamu N., Wakili R., et al. 2021. Gender Differences in Anger Among Hospital Medical Staff Exposed to Patients with COVID-19. *Health Equity*, 5(1): 181-184.

Abstract

ASSESSMENT OF THE LEVEL OF ANXIETY, ANGER AND DEPRESSION IN SECURITY PERSONNEL HEALTH IN CONNECTION WITH THE COVID-19 PANDEMIC

Coronaviruses are RNA viruses belonging to the Coronaviridae family. The causative agent of the epidemic and the subsequent pandemic is the SARS-CoV-2 virus belonging to this family. Relatively easy transmission method, its fast pace, none effective treatment, strain on the health-care system, and countermeasures in the form of quarantine and isolation, they result in a wide range of emotional reactions such as anxiety, anger, emotions related to depression in society. It is believed that suppressing emotions is unfavorable and has consequences in the form of, inter alia, emotional tension.

The aim of this study is to determine the level of anxiety, anger and depression in healthcare professionals in connection with the COVID-19 pandemic.

The survey was conducted in the first quarter of 2021 among the employees of the University Teaching Hospital in Olsztyn and the Municipal Complex Hospital in Olsztyn. The study was voluntary and anonymous. A proprietary questionnaire containing questions about sociodemographic data was used to collect the data. The CECS Scale was used to measure the control of emotions.

In half of the respondents, the average level of the anger scale was 16.1 ± 4.2 with a median of 16, the average level of the depression scale was 16.8 ± 4.2 with a median of 17, while the average level of the anxiety scale was 17.4 ± 3.9 with a median of 18. Among of people participating in the study, the overall emotional control index was from 24 to 75. The overall emotional control index for half of the respondents was from 44 to 56. People working at the Municipal Complex Hospital in Olsztyn showed a greater level of suppression of emotions related to anger compared to the respondents employed at the University Clinical Hospital in Olsztyn. It was found that employees have a significantly different level of anger depending on the type of education level.

There is a relationship between the level of anger, anxiety and depression in the study group. There is a relationship between the level of education and the workplace and the level of suppression of emotions.

Key words: emotional control, COVID-19, healthcare workers

Słowa kluczowe: kontrola emocji, COVID-19, pracownicy ochrony zdrowia

**SEKCJA NAUK
O ŻYWNOŚCI**

Joanna Browarek, Kamil Foss, Piotr Jakuc

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Nauki o Żywności
Studenckie Koło Naukowe Technologów Przetwórstwa Surowców Roślinnych
Opiekun: dr hab. inż. Małgorzata Tańska, prof. UWM

CHARAKTERYSTYKA PRADAWNYCH ZBÓŻ STOSOWANYCH W PIEKARSTWIE

Wstęp

Pradawne zboża są ponownie odkrywane, wysiewane i badane. Ze względu na szereg swoich właściwości prozdrowotnych, jak i fakt, że przez lata nie zostały skrzyżowane, są coraz chętniej wprowadzane do produktów spożywczych. Do pradawnych zbóż zaliczane są m.in. pszenica samopsza, pszenica orkisz, pszenica płaskurka, pszenica kamut, miłka abisyńska, jak również żyto krzyca (Internet 1). Z roku na rok odnotowuje się zmniejszone spożycie pieczywa, dlatego wykorzystanie do jego produkcji zapomnianych surowców może być szansą na zwiększenie zainteresowania coraz bardziej świadomych konsumentów produktami piekarskimi.

Cel pracy

Coraz większa świadomość żywieniowa skutkuje wzrostem zapotrzebowania na żywność postrzeganą jako sprzyjającą zdrowiu. Z tego względu w ostatnim czasie obserwuje się zainteresowanie m.in. pradawnymi gatunkami roślin, w tym również zbożami.

Celem pracy było dokonanie charakterystyki pradawnych zbóż na podstawie dostępnej literatury oraz ocena możliwości ich wykorzystania w produktach piekarskich. W pracy zwrócono uwagę zarówno na zdolności adaptacyjne pradawnych zbóż do polskich warunków glebowych i klimatycznych oraz skład chemiczny ziarna tych zbóż, jak i dostępność rynkową pieczywa zawierającego otrzymaną z nich mąkę.

Pradawne zboża – co to jest?

Pradawne zboża to surowce prastare, dawne i starożytne. Nie ma oficjalnej i jednoznacznej definicji tego pojęcia. Podkreśla się, że to takie zboża, które przez lata nie uległy dużym krzyżowaniom i mutacjom na drodze m.in. modyfikacji genetycznych (Internet 1).

Chęć zdrowego odżywiania oraz próbowania atrakcyjnej pod względem zdrowotnym żywności spowodowała odkrywanie na nowo pradawnych zbóż. Chętnie zwraca się uwagę na walory smakowe tych zbóż, ale też bada się ich wpływ na zdrowie człowieka. Poszukuje się możliwości wykorzystania ich w diecie ludzi (Krochmal-Marczak 2016). Do pradawnych zbóż zalicza się przede wszystkim (Internet 1):

- pszenicę samopszą (*Triticum monococcum*),
 - pszenicę orkisz (*Triticum spelta*),
 - pszenicę płaskurkę (*Triticum dicoccon*),
- ale także:
- miłkę abisyńską (*Eragrostis tef*),
 - pszenica kamut (*Triticum turanium*),
 - żyto krzyżę (*Secale montanum* Guss).

Charakterystyka pradawnych zbóż

Pszenica samopsza (Triticum monococcum)

Samopsza (Fotografia 1) zaczęła być uprawiana w gospodarstwach domowych około 10 tys. lat p.n.e. Charakteryzuje się ona bogactwem mikroskładników, które pełnią



Fotografia 1. Kłosa pszenicy samopszy

Źródło: <https://coach.nine.com.au>



Fotografia 2. Ziarniki pszenicy samopszy

Źródło: <https://www.forestwholefoods.co.uk/>

specyficzne właściwości w organizmie oraz dobrymi właściwościami sensorycznymi. Obecnie wraca się do większego użycia jej ziarna w piekarstwie, zwłaszcza do produkcji pieczywa o cechach żywności funkcjonalnej (Piasecka-Józwiak i in. 2016). Ziarno samopszy (Fotografia 2) charakteryzuje się wyższą wartością biologiczną w zestawieniu z pszenicą zwyczajną (*Triticum aestivum*), co wynika z obecności związków o charakterze przeciwutleniającym, tj. tokole, karotenoidy czy polifenole. Posiada ono również niski poziom aktywności β -amylazy czy też lipooksygenazy, dzięki czemu straty przeciwutleniaczy w trakcie przetwarzania surowców w gotowe produkty są ograniczone (Jankowska i in. 2011). Pszenica samopsza, tak jak i pszenica płaskurka, do momentu rozpowszechnienia pszenicy zwyczajnej, przez wiele wieków były podstawą diety ludzi. Pszenica samopsza jest odporna na stres biotyczny (tj. choroby i szkodniki roślin uprawnych) i abiotyczny (tj. intensywne promieniowanie słoneczne, niską czy wysoką temperaturę, ograniczoną dostępność wody (susza) lub nadmiar wody, silne wiatry, grad). Może być uprawiana w słabych warunkach glebowych, zapewniając rolnikowi przewagę nad innymi uprawami (Dostatny i in. 2019).

Pszenica orkisz (Triticum spelta)

Orkisz to pszenica heksaploidalna (Fotografia 3). Ma mniejsze wymagania glebowe i klimatyczne od pszenicy zwyczajnej, dlatego jest coraz częściej uprawiana w gospodarstwach ekologicznych. Ziarno (Fotografia 4) tej pszenicy jest obfitsze w białko, które charakteryzuje się stosunkowo wysoką wartością biologiczną (Majewska i in. 2007). Wartość odżywcza ziarna pszenicy orkisz jest wyższa niż ziarna pszenicy zwyczajnej. Ma niższą kaloryczność, a także jest bogatszym źródłem białka, tłuszczu, błonnika, składników mineralnych i witamin (Czerwińska 2009). Gluten z mąki orkiszowej jest lepiej przyswajalny, a ponadto jest lepszej jakości aniżeli gluten z mąki pszenicy zwyczajnej (Banaszkiewicz 2011). Wskazuje się, że regularne spożywanie orkiszowej, wraz z odpowiednim sposobem żywienia, leczy alergie, cukrzycę, a także wspomaga leczenie choroby Alzheimera i Parkinsona, otyłości, a nawet stwardnienia rozsianego. Aby



Fotografia 3. Kłosa pszenicy orkisz

Źródło: <https://commons.wikimedia.org>



Fotografia 4. Ziarniki pszenicy orkisz

Źródło: <https://pl.m.wikipedia.org>

orkisz wykazał pozytywne efekty lecznicze, nie może być on stosowany z domieszkami innych zbóż, ponieważ dodatek innych ziaren powoduje, że otrzymane produkty będą miały inny skład chemiczny, a tym samym mniejsze właściwości prozdrowotne (Rożnowski i in. 2015).

Pszenica płaskurka (Triticum dicoccon)

Płaskurka (Fotografia 5) powstała w wyniku spontanicznej mutacji pszenicy *Triticum dicoccoides*. Dała ona początek orkiszowi i pszenicy twardej (Internet 2). Najstarsze znalezione dzikie ziarna (Fotografia 6) tej pszenicy datuje się na ok. 10 tysięcy lat p.n.e. (Zohary i Hopf 1993). Płaskurka była głównym zbożem uprawianym w Babilonie, starożytnej Grecji i Egipcie. Przez coraz większe zainteresowanie rolnictwem ekologicznym, jak i podążanie za zwiększeniem różnorodności upraw, następuje powrót do uprawy tego pradawnego zboża. Jest ono znów chętnie wykorzystywane z powodu łatwego przystosowania się do niezbyt korzystnych warunków pogodowych i agrotechnicznych. Gleby słabe nie są przeszkodą do jego rozwoju, a ponadto jest odporne na stropy środowiskowe (Dostatny i in. 2019). Ziarno płaskurki zawiera dużą ilość przeciwutleniaczy i popiołu, na który składają się różnorodne składniki mineralne, m.in. wapń, magnez i fosfor. To także dobre źródło błonnika i β -glukanów odpowiedzialnych za regulację stężenia cholesterolu, ale też i cukru we krwi. Składniki te zapewniają dużą sytość po spożyciu, z powodu ponad trzykrotnego zwiększenia objętości w relacji z wodą (Internet 2).



Fotografia 5. Kłosa pszenicy płaskurki

Źródło: <https://welcome2poland.eu>



Fotografia 6. Ziarniaki pszenicy płaskurki

Źródło: <https://ilovegrain.com/pl>

Pszenica kamut (Triticum turanium)

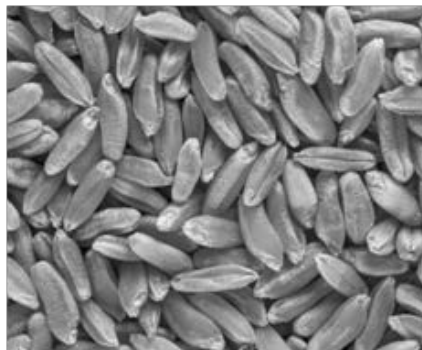
Pszenica kamut (Fotografia 7) jest najstarszą odmianą pszenicy durum. Inaczej nazywana jest pszenicą z Chorasaniu. Słowo „kamut” w języku egipskim oznacza ziarno, pszenicę. Pszenica ta pojawiła się w USA prawdopodobnie dzięki pilotowi Earlowi

Dedmanowi, który stacjonował w Portugalii podczas drugiej wojny światowej (Internet 3). Rzekomo dostał on dokładnie 36 ziaren od drugiego pilota, który przywiózł je z podróży z Egiptu (Marchand 2014). Pszenica kamut bardzo dobrze nadaje się do ekologicznych upraw. Produkty z jej ziarna (Fotografia 8) mają smak o orzechowej nucie, są delikatniejsze w smaku w stosunku do produktów z ziarna pszenicy zwykłej. Warto podkreślić, że są one również znacznie mniej alergizujące od produktów z pozostałych odmian pszenic. Ponadto ziarno pszenicy kamut zawiera duże ilości błonnika, witamin z grupy B, składników mineralnych (np. cynku i żelaza) oraz nienasyconych kwasów tłuszczowych. Ziarniaki pszenicy kamut są dwukrotnie większe od ziarniaków pszenicy zwyczajnej i mają charakterystyczny i rozpoznawalny dla tego gatunku kształt (Internet 1).



Fotografia 7. Kłosa pszenicy kamut

Zródło: <https://www.ekologia.pl>



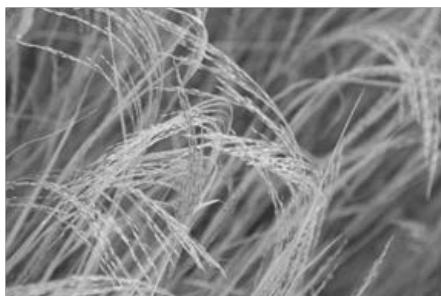
Fotografia 8. Ziarniaki pszenicy kamut

Zródło: <https://www.miod-malina.pl/>

Milka abisyńska (Eragrostis tef)

Milka abisyńska (teff, teff, trawa abisyńska) stanowi podstawę żywienia w Etiopii (Piccinin 2010). Pochodzi z kontynentu afrykańskiego. Stosowana jako roślina spożywcza od przeszło pięciu tys. lat. Występuje w szerokim wachlarzu kolorystycznym – od mlecznej bieli (Fotografia 9) do prawie ciemnego brązu. Ciekawostką jest pochodzenie nazwy, otóż *teff* w języku amharskim (język urzędowy w Etiopii) oznacza dosłownie „stracone” – ze względu na niewielki rozmiar ziarna wynoszący 0,9-1,7 mm długości i 0,7-1,0 mm szerokości (Fotografia 10). Takie ziarno można było bardzo łatwo zgubić, kiedy upadło na ziemię. Uważa się, że milka abisyńska jest bardzo odporna na szkodniki i ma wysokie zdolności adaptacyjne dla różnorodnych środowisk uprawy (Harasym 2015). To znakomity zamiennik dla pszenicy w diecie osób chorych na celiakię. Charakteryzuje się wysoką wartością odżywczą. Zawiera nawet do 13,3% białka, 73% skrobi i około 3% tłuszczu. Ale badania wskazują, że zbyt duży dodatek mąki z miłki abisyńskiej (na poziomie 20-30%) powoduje niekorzystny wpływ na jakość uzyskane-

go pieczywa, mniejszą objętość i grubszą skórkę. Spożywanie wyrobów z teff zapewnia wysoką podaż żelaza, dzięki czemu zapobiega się anemii wśród mieszkańców Etiopii (Achremowicz, Haber 2017).



Fotografia 9. Kłosa miłki abisyńskiej

Źródło: <https://www.ekologia.pl>



Fotografia 10. Nasiona teff

Źródło: <https://www.miod-malina.pl>

Żyto krzyca (Secale montanum Guss)

Żyto krzyca to starsza odmiana forma żyta ozimego, które stanowiło przede wszystkim podstawę żywienia zwierząt. Tylko niewielki procent stanowił surowiec do wypieku chleba czy robienia klusek. Obecnie konsumenci wybierają coraz chętniej pradawne zboża, w tym również żyto krzycę. Krzyca jest rośliną (Fotografia 11) o stosunkowo niskich wymaganiach glebowych, dobrze znosi ciężkie warunki glebowe, gliniaste doliny. Rośnie tam, gdzie inne zboża nie chcą rosnąć i dobrze radzi sobie z chwastami. Jest to także zboże o wysokiej odporności na choroby powodowane przez grzyby, dlatego może być uprawiane przy ograniczonej agrotechnice. Jednak z krzyicy uzyskiwano niskie plony w porównaniu z innymi odmianami żyta, dlatego zaniechano jej uprawy na korzyść innych zbóż, które dawały większe plony (Konopka i in. 2017). Ziarno żyta krzyca (Fotografia 12) wyróżnia się pod względem witamin z grupy E, a także zawiera dużą ilość żelaza, dlatego jest to dobry wybór dla wegan i wegetarian. Produkty z tego



Fotografia 11. Kłosa żyta krzyca

Źródło: <https://www.ekologia.pl>



Fotografia 12. Ziarniaki żyta krzyca

Źródło: <https://www.olx.pl>

ziarna polecane są również dla diabetyków, ponieważ indeks glikemiczny po spożyciu np. chleba z mąki z ziarna krzycy nie rośnie tak gwałtownie jak w przypadku białego pieczywa. Ponadto chleb z takiego zboża długo zachowuje świeżość i ma delikatniejszy smak (Internet 4).

Wartość odżywcza ziarna pradawnych zbóż

Najwyższą zawartością białka wśród analizowanych zbóż charakteryzuje się pszenica orkisz, jednakże zawiera około dziesięciokrotnie mniej błonnika pokarmowego w porównaniu do pszenicy samopszy i pszenicy płaskurki (Tabela 1.). Zawiera również prawie 20% więcej węglowodanów od pszenicy płaskurki. We wszystkich wymienionych pszenicach zawartość tłuszczu w ziarnie była na porównywalnym poziomie, jednak różnicę można zauważyć w profilu kwasów tłuszczowych (Tabela 2.). Najwyższym stosunkiem kwasów n-6 do n-3 charakteryzuje się pszenica orkisz (około 18:1), natomiast najniższy stosunek zaobserwowano w przypadku pszenicy płaskurki (około 12:1) (Dąbkowska 2009). Biorąc pod uwagę składniki mineralne, trudno jednoznacznie określić, które ziarno pszenicy jest najlepszym ich źródłem (Tabela 3.). Można jedynie zauważyć, że ziarno pszenicy samopsza zawiera więcej wapnia niż ziarno pszenicy orkisz i pszenicy płaskurki. Ziarno pszenicy orkiszowej w stosunku do pszenicy zwyczajnej zawiera dużo więcej makro- i mikroelementów, jak fosfor, potas, magnez, mangan, miedź, kobalt, selen, żelazo czy też cynk (Krochmal-Marczak i Sawicka 2016). Zawiera również znacznie więcej białka (około 17 g/100 g) w porównaniu do pszenicy zwyczajnej (około 12 g/100 g), co przekłada się na wyższą jakość uzyskanej z przemiału mąki (Cacak-Pietrzak i in. 2013). Również badania przeprowadzone przez Krochmal-Marczak i Sawicką (2016) wykazały, że w obrębie danego gatunku odmiany różnią się od siebie. Odmiana Schwabenkorn charakteryzowała się znacznie wyższą zawartością białka właściwego w porównaniu do innych odmian, co wskazuje na wyższą wartość odżywczą tej odmiany. Potwierdza to, że czynniki genetyczne zbóż znacząco wpływają na wartość odżywczą ziarna.

W innych badaniach wykazano także zróżnicowanie w zawartości związków bioaktywnych w ziarnie pradawnych zbóż. Przykładowo średnia zawartość karotenoidów w ziarnie pszenicy zwyczajnej wynosiła od 0,7 do 3,24 mg/kg s.m. (Di Silvestro 2012), natomiast pszenica samopsza okazała się lepszym źródłem tych związków (7,92 mg/kg s.m.) (Skrajda i in. 2020). Wykazano również, że ziarno pszenicy jarej cechuje się większą koncentracją tokoli, aniżeli ziarno płaskurki czy samopszy. W obrębie każdego gatunku pszenicy (płaskurki, samopszy, zwyczajnej, orkiszu) i ich odmian wykazano dużą jednorodność ogólnej zawartości tokoli i składu. Ponadto zaobserwowano, że wysoka zawartość tokoli była skorelowana z wysoką aktywnością antyoksydacyjną ziarna (Lampi i in. 2008).

Tabela 1. Porównanie wartości odżywczej ziarna wybranych prądawnych zbóż

Rodzaj zboża	Zawartość w 100 g			
	Białko [g]	Tłuszcz [g]	Węglowodany [g]	Błonnik pokarmowy [g]
Pszenvica samopsza	12,74	2,64	75,30	10,76
Pszenvica orkisz	16,95	2,47	80,61	1,26
Pszenvica płaskurka	13,26	2,80	64,50	13,50

Źródła: Kohajdová i Karovicova (2008), Suchowilska i in. (2009), Rachoń i in. (2012), Rachoń i in. (2015), Čurná i Lacko-Bartošová (2017), Ertpo i Atasoy (2018).

Tabela 2. Porównanie profilu kwasów tłuszczowych ziarna wybranych prądawnych zbóż

	Udział w ogólnej zawartości kwasów tłuszczowych (%)								
	mirysty- nowy	palmito- nowy	palmito- leinowy	margary- nowy	stearyno- wy	oleinowy	linolowy	linoleno- wy	arachido- wy
Pszenvica samopsza	0,19	14,85	0,50	0,10	0,96	26,35	52,79	3,76	0,26
Pszenvica orkisz	0,19	18,77	0,41	0,009	1,09	19,42	55,89	3,51	0,38
Pszenvica płaskurka	0,17	16,90	0,45	0,11	1,27	24,75	51,89	4,00	0,22

Źródło: Suchowilska i in. (2009).

Tabela 3. Porównanie zawartości mikroelementów i makroelementów w ziarnie wybranych prądawnych zbóż

Rodzaj zboża	Zawartość w 100 g						
	Magnez [mg]	Miedź [mg]	Źelazo [mg]	Cynk [mg]	Sód [mg]	Potas [mg]	Wapń [mg]
Pszenvica samopsza	1294,70	0,0318	73,10	0,69	59,70	4973,90	549,45
Pszenvica orkisz	1570,00	0,078	b.d.	0,27	b.d.	4330,00	338,00
Pszenvica płaskurka	1450,00	0,054	b.d.	0,22	b.d.	4180,00	330,00

b.d. – brak danych

Źródła: Čurná i Lacko-Bartošová (2017), Ertpo i Atasoy (2019), Piergiovanni i in. (1997).

Chleby z pradawnych zbóż dostępne w handlu

Rynek pieczywa z pradawnych zbóż jest jeszcze stosunkowo mały. Tylko nieliczne piekarnie produkują chleb z mąki z pradawnych zbóż, a ponadto większość produktów piekarskich zawiera tylko niewielki dodatek mąki lub ziarna z pradawnych zbóż. Wyjątkiem są produkty z mąki orkiszowej, które mogą zawierać 100% udział tej mąki. Poniżej przedstawiono przykładowe chleby wytworzone na bazie produktów z ziarna pradawnych zbóż. Spośród dostępnego na rynku asortymentu wybrano te produkty, które mają prawdopodobnie największy udział pradawnych zbóż, co ustalono na podstawie kolejności składników podanej na ich opakowaniach, ponieważ producenci chlebów nie deklarowali procentowego udziału poszczególnych składników.

1) Eko chleb 3-pra zboża (ORKISZ - PŁASKURKA - SAMOPSZA)

Skład: mąka pełnoziarnista z pszenicy płaskurki, mąka orkiszowa razowa, płatki z samopszy, mąka żytnia, woda, płatki orkiszowe, sól. Produkowany jest przez Piekarnię Kiełtyka M w Łęczanach (Internet 4)

To jeden z chlebów o najwyższej zawartości pradawnych zbóż w składzie.

2) Chleb trzech mąk – SAMOPSZA, PŁASKURKA, ORKISZ JASNY

Skład: mąka z samopszy Bio, mąka z płaskurki Bio, mąka orkiszowa Bio, sól kłodawska, woda, zakwas Bio. Chleb wytwarzany w piekarni Aga Bagietka w Więckowicach (Internet 5)

3) Gotowa mieszanka na Uldo Chleb z Pradawnymi Zbożami

Skład: mąka pszenna pradawna (29%) (orkiszowa, płaskurka pełnoziarnista, samopsza pełnoziarnista), mąka pszenna, mąka żytnia, gluten pszenny, ziarno sezamu, ziarno soi, otręby pszenne, sól, kwas żytni w proszku, ekstrakt słodu jęczmiennego, błonnik roślinny, słód jęczmienny, czarnuszka, enzymy: hemicelulaza; środek do przetwarzania mąki: kwas askorbinowy. Mieszanka ta produkowana jest przez firmę ULDO Polska we Wrocławiu (Internet 6).

Coraz większym powodzeniem w dzisiejszej diecie zaczyna cieszyć się pszenica orkisz, szczególnie dzięki bardziej popularnej diecie świętej Hildegardy z Bingen. Święta Hildegarda to średniowieczna mistyczka, która spopularyzowała dietę opartą na spożywaniu produktów w głównej mierze wegańskich. Głównymi surowcami szczególnie lubianymi przez mistyczkę była przede wszystkim pszenica orkisz, ale także owoce kasztana jadalnego, koper czy też cebula. Zgodnie z zasadami tej diety mięso oraz nabiał powinny stanowić tylko jej uzupełnienie. Zaleca się, aby ziarno orkiszu pojawiało się w głównych posiłkach. Wielu dietetyków uważa, że dieta św. Hildegardy jest jednym z najbardziej uniwersalnych planów żywieniowych (Kania i in. 2012).

Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonej analizy danych naukowych stwierdzono, że pradawne zboża coraz chętniej wracają na pola i są wykorzystywane w codziennym życiu. Ich ogromną zaletą jest brak krzyżowań i niezmiennosc genowa. To bogate źródło białek, składników mineralnych oraz związków o wysokim potencjale przeciwutleniającym. Są one bardzo dobrym wyborem dla producentów ziarna z uwagi na ich odporność na stresy biotyczne i abiotyczne, dzięki czemu mogą być uprawiane metodami ekologicznymi, na które tak zwracają uwagę świadomi konsumenci. Wiele rodzajów pradawnych zbóż można wykorzystywać w dietach eliminacyjnych, np. miłka abisyńska może być stosowana w diecie osób chorych na celiakię.

Analiza rynku zbóż wskazała, że stosunkowo niska popularność pradawnych zbóż w uprawie wynika z wyższych nakładów finansowych wymaganych w ich hodowli, ponieważ należy posiadać surowce o wysokiej czystości i niekrzyżowane. Innym czynnikiem ograniczającym ich większe wykorzystanie jest niższa zdolność plonowania niż w przypadku surowców obecnie hodowanych. Niemniej jednak na rynku produktów spożywczych pojawia się coraz więcej wyrobów piekarskich z dodatkiem ziarna lub mąki z pradawnych zbóż.

Literatura

- Achremowicz B., Haber T. 2017. Wykorzystanie bezglutenowego ziarna miłki abisyńskiej (teff) jako surowca w piekarstwie. *Przegląd Zbożowo-Młynarski*, 6: 14-15.
- Banaszkiewicz T. 2011. Pszenica orkisz w żywieniu człowieka. *Przegląd Zbożowo-Młynarski*, 9: 19.
- CSM Bakery Solution. 2016. Płaskurka i samopsza. *Przegląd Piekarsko-Cukierniczy*, 9: 38-40.
- Čurná V., Lacko-Bartošová M. 2017. Chemical composition and nutritional value of emmer wheat (*Triticum dicoccon* sbrank): A review. *J. Cent. Eur. Agric.*, 18(1): 118-125.
- Czerwińska D. 2009. Walory żywieniowe i zastosowanie orkiszu. *Przegląd Zbożowo-Młynarski*, 53(02): 14.
- Dostatny D.F., Ciępką A., Podyma W., Babalski M. 2019. Obecne użytkowanie dawnych gatunków pszenic. *Problemy Rolnictwa Światowego*, 19: 31-46.
- Ertop M., Atasoy R. 2019. Comparison of physicochemical attributes of einkorn wheat (*Triticum monococcum*) and durum wheat (*Triticum durum*) and evaluation of morphological properties using scanning electron microscopy and image analysis. *J. Agric. Sci.*, 25(1): 93-99.
- Escarnot E., Jacquemin J.M., Agneessens R., Paquot M. 2012. Comparative study of the content and profiles of macronutrients in spelt and wheat, a review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 16(2): 243-256.
- Fabijańska M., Fronczyk A. 2015. Historia i tradycja wypieku chleba oraz jego miejsce w diecie. *Zeszyty Naukowe. Turystyka i Rekreacja*, 1(15): 101-102.

- Harasym J. 2015. Jeszcze raz o miłce abisyńskiej – cennym afrykańskim zbożu. *Przegląd Zbożowo-Młynarski*, 10: 10-13.
- Internet 1: <https://polskieeko.pl/artykuly/pradawne-zboza-powrot-do-przeszlosci> (dostęp 15 czerwca 2021 r.).
- Internet 2: <https://sigma-not.pl/publikacja-100574-p%C5%82askurka-i-samopsza-przeglad-piekarski-i-cukierniczy-2016-9.html> (dostęp 11 czerwca 2021 r.).
- Internet 3: <https://www.kamut.com/de/entdecken/die-geschichte> (dostęp 17 czerwca 2021 r.).
- Internet 4: <https://swojskapiwniczka.pl/pl/n/Krzyca-Zyto-swietojanskie-starodawne-zboze-na-nowoczesny-stol./69> (dostęp 18 czerwca 2021 r.).
- Internet 4: <https://sklep.piekarniakieltyka.pl/eko-chleb-3-pra-zboza-orkisz-plaskurka-samopsza-p-35.html>
- Internet 5: <https://www.agabagietka.pl/pieczywa-bio/>
- Internet 6: <http://www.uldop.pl/index.php?Chleb-z-Pradawnymi-Zbozami>
- Jankowska M., Kedzior Z., Pruska-Kedzior A., Chojnacka E., Binder M. 2011. Porównanie właściwości funkcjonalnych glutenu z pszenicy samopszy i pszenicy zwyczajnej. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 18(6): 79-80.
- Kania M., Baraniak J., Derebecka N., Mrozikiewicz P. 2012. Ziołolecznictwo i zalecenia żywieniowe według św. Hildegardy z Bingen. *Cz. I. Postępy Fitoterapii*, 2: 124-129.
- Konopka I., Tańska M., Skrajda M. 2017. Ocena wartości wypiekowej i zawartości wybranych składników prozdrowotnych w ziarnie żyta krzyca. *Przegląd Zbożowo-Młynarski*, 4: 19-21.
- Kohajdová Z., Karovicova, J. (2008). Nutritional value and baking application of spelt wheat. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 7(3): 6-9.
- Krochmal-Marczak B., Sawicka B. 2016. Wartość odżywcza pszenicy orkiszowej (*Triticum spelta* L.) uprawianej na Podkarpaciu. *Herbalism*, 1: 146-149.
- Lipińska E. 2011. *Technologia Żywności cz. 2*. Wydawnictwo Format ab, Warszawa, s. 239, 250-253.
- Majewska K., Dąbkowska E., Żuk-Gołaszewska K., Tyburski J. 2007. Wartość wypiekowa maki otrzymanej z ziarna wybranych odmian orkiszu [*Triticum spelta* L.]. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 14(2): 60-71.
- Marchand B. 2014. KAMUT - czyli o amerykańsko-egipskiej pszenicy, która okazała się irańską. *Przegląd Zbożowo-Młynarski*, 2: 21.
- Piasecka-Józwiak K., Chabłowska B., Rozmierska J. 2016. Zastosowanie ekologicznej pszenicy samopszy do podwyższenia właściwości prozdrowotnych i sensorycznych pieczywa. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 49: 73-81.
- Piccinin D. 2010. More about Ethiopian food - teff. Department of Nutrition and Food Service.
- Piergiorganni A.R., Rizzi R., Pannacciulli, E., Gatta C.D. 1997. Mineral composition in hulled wheat grains: a comparison between emmer (*Triticum dicoccon* Schrank) and spelt (*T. spelta* L.) accessions. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 48(6): 383-384.
- Rachoń L., Szumiło G., Brodowska M., Woźniak A. 2015. Nutritional value and mineral composition of grain of selected wheat species depending on the intensity of a production technology. *J. Elementol.*, 20(3): 147-149.
- Rożnowski J., Kłosowska J., Polzer P. 2015. Żywieniowe i prozdrowotne znaczenie pszenicy orkisz (*Triticum spelta* L.). *Postępy Fitoterapii*, 1: 45-49.
- Suchowilska E., Wiwart M., Borejszo Z., Packa D., Kandler W., Krska R. 2009. Discriminant analysis of selected yield components and fatty acid composition of chosen *Triticum monococcum*, *Triticum dicoccon* and *Triticum spelta* accessions. *J. Cereal Sci.*, 49(2): 310-315
- Zohary D., Hopf M. 1993. *Domestication of plants in the Old World, the origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe, and the Nile valley*. 2nd ed. Oxford Univ. Press, Nowy Jork.

Abstract

ANCIENT GRAINS IN BAKERY

Ancient cereals are being rediscovered and studied. They include, among others, einkorn, spelt, emmer, kamut, abyssinian loam and primitive rye.

The aim of this study was to characterize the ancient cereals based on the available literature. The paper pays attention to both the chemical composition of the grains of these cereals and the ways in which they have been used in the past and in the present.

Based on the analysis of scientific data, it was concluded that ancient cereals are an attractive choice for grain producers because they are resistant to biotic and abiotic stresses. Therefore, these cereals can also be grown organically. In addition, they are an attractive choice for consumers because of their higher content of ingredients with antioxidant potential and minerals. An analysis of the market indicated that the relative low popularity of ancient cereals in cultivation is due to the higher cost and necessary to have pure raw material without any crossbreeding. Another factor limiting their greater use is their lower yielding capacity than currently bred raw materials.

Key words: ancient cereals, grain, bread, flour, ecological production, nutritional value

Słowa kluczowe: pradawne zboża, ziarno, chleb, mąka, produkcja ekologiczna, wartość odżywcza

Dane do kontaktu z autorem: asia.browarek@wp.pl

Kamil Foss, Joanna Browarek

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Nauki o Żywności
Studenckie Koło Naukowe Technologów Przetwórstwa Surowców Roślinnych
Opiekun: dr hab. inż. Małgorzata Tańska, prof. UWM

KAWA TYPU *COLD BREW* – OTRZYMYWANIE, WŁAŚCIWOŚCI I AKCEPTOWALNOŚĆ KONSUMENCKA

Wstęp

Każdego dnia na świecie wypija się około 2,25 miliarda filiżanek kawy (Cordoba i in. 2019). Według Międzynarodowej Organizacji Kawy, w 2016 r. na całym świecie spożyto ponad dziewięć milionów ton kawy (Angeloni i in. 2019). Kawą określa się zarówno całe, palone ziarna, jak również produkty częściowo przetworzone tj. koncentraty kawowe, kawy zbożowe, a także napoje gotowe do spożycia. Prawdopodobnie słowo kawa pochodzi od nazwy prowincji Kaffa w Etiopii. Nazwę wyprowadza się również od arabskiego słowa *kahwa*, co oznacza usuwający zmęczenie. Do Polski kawa dotarła na przełomie XVII i XVIII w. (Olejniczak 2004). W Poznaniu kawiarnie pojawiły się pod koniec XVIII w. Zapoczątkował to Jan Geisler w 1784 r. przy ulicy Wronieckiej (Rum 2004). Popularność napoju, którym jest kawa wynika z pobudzającego działania i efektywności kofeiny oraz jej przyjemnego aromatu oraz smaku (Cordoba i in. 2019). Kofeina jest najważniejszym należącym do pochodnych purynowych alkaloidem w kawie. Jej właściwa nazwa to 1,3,7-trimetylo-2,6-dioksypuryna lub 1,3,7-trimetyloksantyna. Kofeina charakteryzuje się gorzkim smakiem oraz nie ma zapachu. Oprócz kofeiny w kawie występują w małych ilościach dwa inne alkaloidy purynowe: teofilina (1,3-dimetyloksantyna) i teobromina (3,7-dimetyloksantyna) (Chrostowska-Siwiek 2011). W ostatnim czasie wpływ na popularność kawy wywiera także jej korzystne oddziaływanie na zdrowie. Charakterystyczny aromat i smak kawy zależny jest od stopnia wypalenia, rodzaju kawy oraz jej jakości. Za walory smakowo-zapachowe kawy odpowiedzialne są lotne i nielotne związki powstające podczas palenia, które uwalniane są podczas procesu parzenia. Związkami tymi są m.in. furany, pirazyny, ketony, aldehydy,

pirole, estry, laktony, furanony i polifenole (Cordoba i in. 2019). Od lat dziewięćdziesiątych XX w. jakość kawy określa się terminem *speciality coffee* lub *café gourmet*. Są to najwyższej jakości zielone ziarna kawy, o wyjątkowej smakowości. Ziarna te z reguły są certyfikowane oraz mają określone pochodzenie geograficzne. Do wypalania kawy typu *speciality* bardzo często dodawane są owoce w celu podkreślenia smakowości produktu (Tolessa i in. 2016).

Kawę można parzyć na wiele różnych sposobów. Ze strony technologicznej oraz inżynierskiej parzenie kawy jest ekstrakcją typu ciało stałe-ciecz, w której kawa wcześniej poddana procesowi palenia oraz mielenia pozostaje w ścisłym kontakcie z wodą. Woda w procesie tym działa jako rozpuszczalnik do ekstrakcji związków rozpuszczalnych w wodzie. W zależności od zastosowanej techniki ekstrakcji w ekstrakcie mogą być również obecne związki nierozpuszczalne w postaci rozpuszczonych lub zawieszonych cząstek stałych (López i in. 2016). Podczas ekstrakcji uwalniane są związki rozpuszczalne, i w zależności od metody ekstrakcji, związki nierozpuszczalne są wymywane z wodą ekstrakcyjną, kończąc w ekstrakcie w postaci zawieszonych substancji stałych (Angeloni i in. 2019). Lotne i nielotne związki sprzyjające cechom smakowo-zapachowym oraz zdrowotnym są ekstrahowane ze zmielonej kawy i rozpraszane w końcowym napoju kawowym (Steen i in. 2017). Na skład końcowy napoju kawowego istotnie wpływa metoda, którą dana kawa została zaparzona. Różnice występują szczególnie w przypadku zawartości polifenoli, kofeiny, substancji stałych, jej aktywności i pojemności przeciwutleniającej oraz profilu składników lotnych (López-Galilea i in. 2007). W literaturze przedmiotu najczęściej badanymi metodami ekstrakcji na gorąco są metoda „espresso” i metoda „filtrowanej kawy”. Stosowane są też inne metody parzenia kawy, a wiele z nich wykorzystuje wodę o wysokiej temperaturze i krótkim czasie parzenia, który zwykle nie przekracza 5 minut. Na przestrzeni ostatnich lat na rynku popularność zdobyła nowa metoda – ekstrakcja na zimno. Parzenie na zimno przeprowadza się w temperaturze pokojowej (20-25°C lub niższej) przez dłuższy czas niż metody parzenia na gorąco. Typowy czas parzenia wynosi od 8 do 24 godzin (Fuller i Rao 2017). Kawa parzona na zimno (nazywana *cold brew*) może być przygotowywana metodą ociekania, bezpośredniego lub pośredniego zanurzenia lub metodą prasowania francuskiego (Mestdagh i in. 2017).

Kawa *cold brew* zyskała na popularności około 2010 r. Parzona jest z kawy specjalnej (*speciality*) i zaczęła pojawiać się w kawiarniach specjalizujących się w sprzedaży kawy tego typu. Była ona odpowiedzią na rosnące zapotrzebowanie na kawę wysokiej jakości. Co ciekawe, kawa typu *cold brew*, szczególnie zamknięta, może być przechowywana nawet przez dziesięć dni. Niskie temperatury i długi czas kontaktu kawy z rozpuszczalnikiem (wodą) powodują, że końcowy napój kawowy ma odmienne właściwości fizykochemiczne i sensoryczne. Parametry te wpływają na szybkość ekstrakcji i sposób, w jaki związki chemiczne obecne w palonej kawie są ekstrahowane (Cordoba i in. 2019), co jest związane z różnymi właściwościami chemicznymi takimi jak rozpuszczalność, polarność i utleniałość (Andueza i in. 2003).

Kawa macerowana, bo tak nazywana jest *cold brew*, nie jest poddawana jakiegokolwiek obróbce cieplnej. Ekstrakcję prowadzi się poprzez zanurzenie wypalonych i zmielonych ziaren w wodzie o temperaturze pokojowej i powstałą zawiesinę przechowuje się w temperaturze chłodniczej. Ekstrakcję prowadzi się tak długo, aby wyekstrahować jak najwięcej związków smakowo-zapachowych (Maciejewski, Mokrysz 2019). Kawa *cold brew* jest bardzo popularna w Stanach Zjednoczonych i coraz bardziej popularna w Europie. Można ją również spotkać w polskich kawiarniach prowadzących sprzedaż kawy *speciality* i coraz częściej przygotowywana jest także w domach. Smak kawy macerowanej jest orzeźwiający, pozbawiony goryczki oraz głęboki (Claassen i in. 2021).

Warunki kulturowe, geograficzne, osobiste preferencje, środowisko społeczne decydują o sposobie przygotowania kawy. Najczęściej konsumenci piją kawę parzoną w sposób tradycyjny, aczkolwiek w ostatnich czasach wzrasta spożycie również kawy typu *cold brew* (Jakubowski 2019). Kawa ta jest bardzo dobra latem ze względu na właściwości orzeźwiające oraz niską temperaturę, w której jest podawana. Bardzo podobną i nową metodą parzenia kawy na zimno jest również sposób zwany *cold drip*. Parzenie za pomocą metody *cold drip* jest parzeniem przelewowym, ale w porównaniu do metody tradycyjnej, napój jest przelewany bezpośrednio na kostki lodu. Im szybsza prędkość przepływu wody, tym kawa ta jest przygotowana szybciej. Parzenie przy użyciu metody *cold brew* jest parzeniem bezpośrednim oraz długotrwałym, bez przelewu oraz ruchu wody. Obie te metody aktualnie zyskują bardzo na popularności i są bardzo cenione pośród baristów oraz koneserów kawy. Dla tych dwóch nowych metod nie ma konkretnych i jednoznacznych receptur dotyczących czasu i temperatury ekstrakcji. Specjaliści od kawy, zwani baristami, polegają na swojej percepcji i doświadczeniu, aby ustalić parametry ekstrakcji. Za pomocą swojego doświadczenia bariści również dobierają rodzaj kawy, jej pochodzenie i sposób oraz parametry jej ekstrakcji w zależności od oczekiwań konsumenta. Przykładowo, kawa z Brazylii będzie miała inny smak, goryczkę, aniżeli kawa z Etiopii. Smak i aromat kawy typu *speciality* jest również zależny od owoców, które są dodawane podczas palenia kawy (bardzo często dodaje się do niej np. truskawki) (Angeloni i in. 2019).

Cel badań

Z uwagi na rosnące zainteresowanie konsumentów nowym rodzajem napoju kawowego, *cold brew*, w niniejszej pracy podjęto badania mające na celu ocenę akceptowalności cech organoleptycznych tego napoju przez potencjalnych konsumentów w porównaniu do kawy tradycyjnej. Do badań przygotowano napoje kawowe z tego samego rodzaju kawy (typu *speciality*) poprzez parzenie dwiema różnymi metodami, na zimno (kawa *cold brew*) i na gorąco (kawa tradycyjna), które oceniano pod względem barwy, sma-

ku, zapachu, klarowności, konsystencji i intensywności aromatu kawowego, przyznając oceny z zakresu bardzo dobra – zła.

Materiał i metody badawcze

Materiał badań stanowiły dwa rodzaje kawy czarnej mielonej zakupione w specjalistycznym sklepie baristycznym w Olsztynie. Napój kawowy otrzymany z kawy czarnej mielonej z segmentu *speciality* (Caicedo Kolumbia) stanowił próbkę kontrolną (tradycyjnie parzona), natomiast próbką badaną była również kawa Caicedo Kolumbia, która została rozdrobniona poprzez mielenie w młynku, a następnie zaparzana metodą „na zimno”. Na Zdjęciu 1 przedstawiono urządzenia i naczynia wykorzystane do przygotowania tego napoju kawowego, a z kolei na Zdjęciu 2 przedstawiono etapy jego powstawania. W początkowej fazie przygotowania kawy *cold brew* należało naczynie szklane przepłukać wrzątkiem. Jest to proces, od którego za każdym razem należy zacząć przygotowanie tego typu kawy. Niższe temperatury sprzyjają rozwojowi bakterii, więc jeśli nie zadba się o sterylność naczyń, skutkiem będzie m.in. szybsze zepsucie się napoju. Kawę *speciality* należało zmielić dość grubo, do rozmiarów przypominających sól gruboziarnistą. W tym celu użyto młynka baristycznego (młynek ręczny firmy Comandante). Następnie odważono 30 g kawy, którą zalano 500 ml wody zgodnie z zalecanym przez producenta sposobem przyrządzenia (informacja zamieszczona na opakowaniu kawy). W sposobie przyrządzenia ustalono proporcję zakładającą stosunek naważki kawy do objętości wody jako 6 g na 100 ml. Zmielone ziarna kawy wsypano do czystego naczynia szklanego, zalano przefiltrowaną wodą o temperaturze pokojowej i dokładnie wymieszano. W celu ograniczenia dostępu światła oraz tlenu, a także uniemożliwienia przenikania obcych aromatów, mieszaninę kawy i wody zamknięto i umieszczono w warunkach chłodniczych na czas 16 godzin. Po procesie maceracji zawartość naczynia wymieszano i napój kawowy przefiltrowano w celu usunięcia drobinek kawy. Do procesu filtracji wykorzystano filtr v60. Próbkę kontrolną (kawę parzoną metodą tradycyjną) wykonano poprzez odważenie 10 g zmielonej kawy, którą wsypano do szklanego naczynia i zalano 300 ml wrzącej wody, po czym po krótkim czasie wymieszano i parzono przez 10 minut. Otrzymane napoje kawowe poddano ocenie organoleptycznej oraz ocenie klarowności.

Ocena organoleptyczna została przeprowadzona przez 20 osobowy zespół (potencjalnych konsumentów) w przedziale wiekowym od 18 do 65 lat. Kawy oceniano pod względem barwy, smaku, zapachu, klarowności, konsystencji oraz intensywności aromatu kawowego. Do oceny organoleptycznej użyto 5 punktowej skali, zgodnie z którą 1 punkt wskazywał na jakość najmniej pożądaną, a 5 punktów – jakość najbardziej pożądaną.



Zdjęcie 1. Sprzęt potrzebny do wykonania kawy *cold brew*

Źródło: Opracowanie własne.



Zdjęcie 2. Etapy otrzymywania kawy *cold brew*

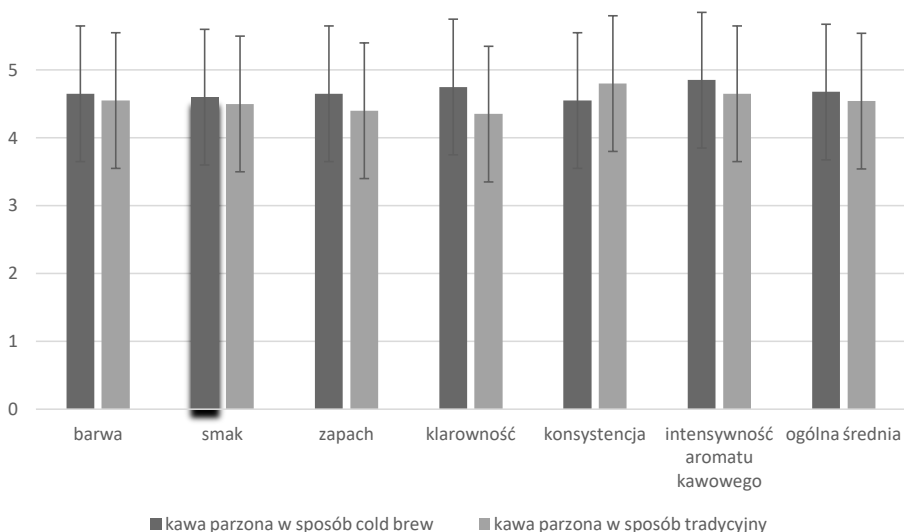
Źródło: Opracowanie własne.

Wyniki badań i dyskusja

Przeprowadzenie oceny organoleptycznej miało na celu zbadanie akceptowalności konsumenckiej kawy *cold brew* przez potencjalnych konsumentów w różnym wieku oraz zbadanie, czy nowy sposób parzenia kawy pozwala uzyskać porównywalne cechy do napoju kawowego parzonego w tradycyjny sposób. W ocenie jakości napojów kawowych brano pod uwagę takie cechy organoleptyczne jak smak, barwa, zapach, konsystencja, klarowność oraz intensywność aromatu kawowego.

Na Rysunku 1. przedstawiono średnie wyniki oceny organoleptycznej badanych cech kawy *cold brew* i kawy parzonej tradycyjnie. Na podstawie przeprowadzonych badań konsumenckich stwierdzono, że cechy organoleptyczne kawy parzonej metodą tradycyjną zostały gorzej ocenione niż w przypadku kawy *cold brew*, ale stwierdzone różnice nie były istotne statystycznie. Analizując przyznane oceny za poszczególne cechy orga-

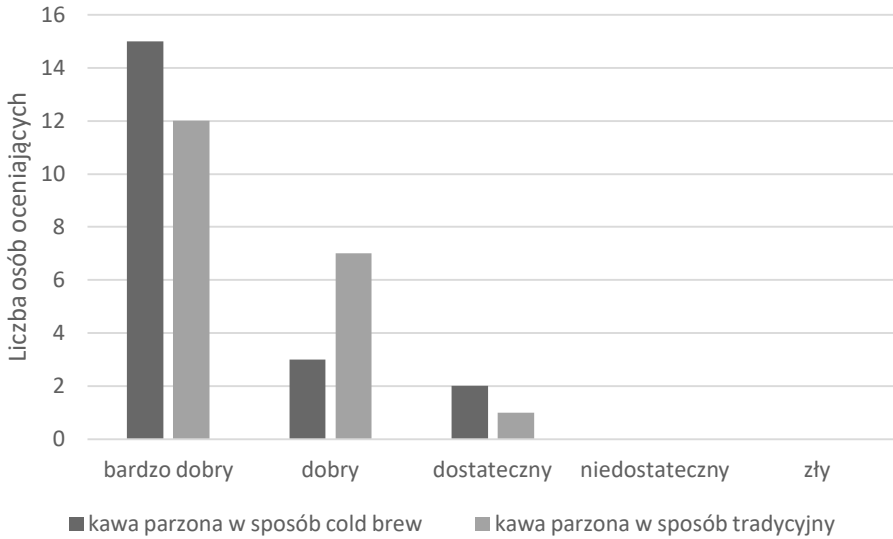
noleptyczne stwierdzono, że kawa *cold brew* cechowała się nieco lepszym smakiem, zapachem, barwą, klarownością i intensywnością aromatu kawowego. Wszystkie średnie wyniki oceny organoleptycznej mieściły się w zakresie 4,35-4,85 pkt., co świadczyło o tym, że przygotowane napoje kawowe były dobrej i bardzo dobrej jakości. Niewątpliwie związane było to także z jakością zakupionego surowca. Kawa, bezpośrednio po otwarciu opakowania, cechowała się przyjemnym aromatem i nie miała obcych posmaków i zapachów.



Rysunek 1. Porównanie wyników oceny konsumenckiej kawy parzonej metodą *cold brew* i kawy parzonej metodą tradycyjną (wartość średnia i odchylenie standardowe)

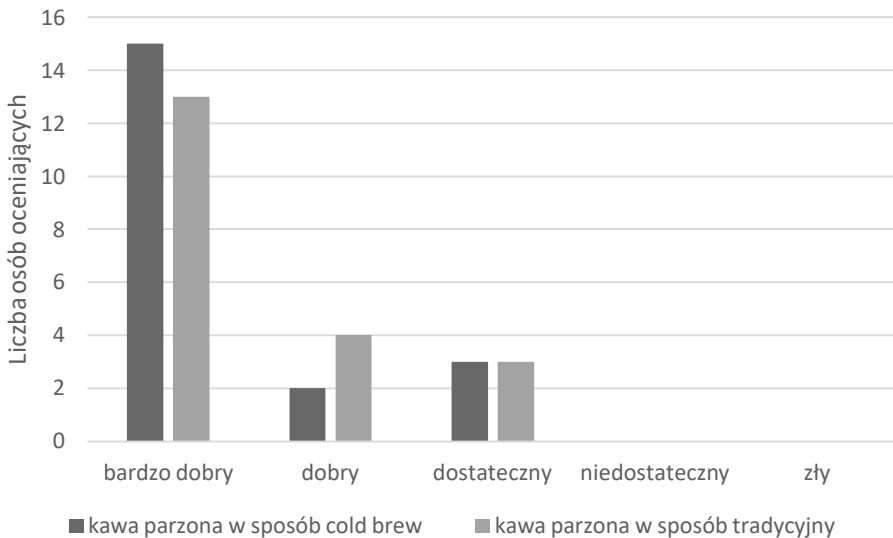
Źródło: Opracowanie własne.

Analizując wyniki oceny barwy i smaku zauważano nieznaczne różnice w liczbie przyznanych ocen bardzo dobrych, dobrych i dostatecznych dla obu rodzajów kaw (Rysunki 2 i 3). Potencjalni konsumenci przyznali więcej ocen bardzo dobrych za barwę i smak kawy parzonej w sposób *cold brew* w porównaniu do kawy parzonej w sposób tradycyjny, odpowiednio o 3 i 2 oceny. Podawali oni, że kawa parzona metodą *cold brew* ma barwę bardziej wyrazistą, przejrzystą, oraz że wygląda bardzo innowacyjnie i ciekawie. Z kolei smak tej kawy był opisywany jako delikatny, wyrazisty i przyjemnie słodki. Może to być spowodowane bardzo dobrym gatunkiem kawy oraz tym, że w przypadku parzenia na zimno, związki smakowe nie ulegają degradacji ani utlenieniu (Chrostowska-Siwiek 2011; Fuller, Rao 2017). Dodatkowo potencjalni konsumenci stwierdzili, że smak kawy *cold brew* jest bardziej orzeźwiający aniżeli kawy parzonej metodą tradycyjną. Analizując wyniki oceny barwy i smaku kaw odnotowano, że oceniający przyznali także oceny dostateczne, ale ich liczba nie była większa niż 3.



Rysunek 2. Porównanie ocen przyznawanych przez oceniających za barwę kawy parzonej metodą *cold brew* i kawy parzonej metodą tradycyjną

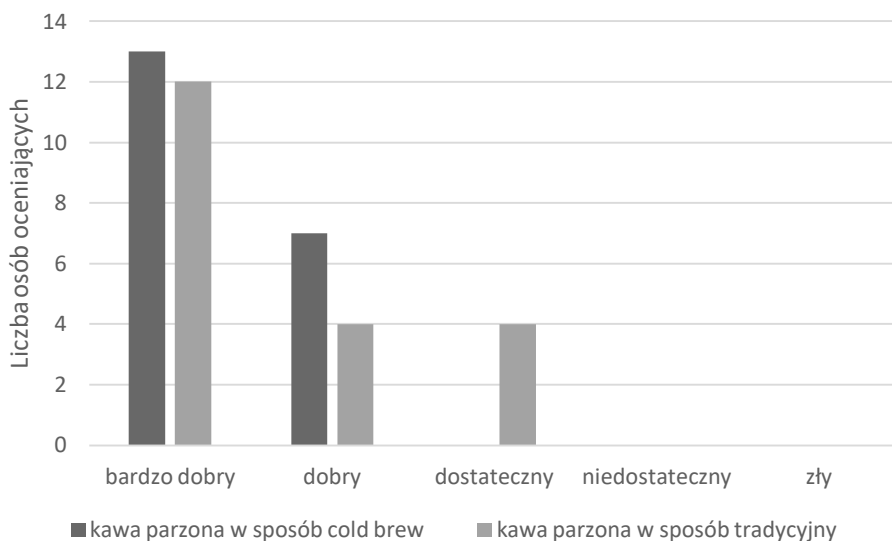
Źródło: Opracowanie własne.



Rysunek 3. Porównanie ocen przyznawanych przez oceniających za smak kawy parzonej metodą *cold brew* i kawy parzonej metodą tradycyjną

Źródło: Opracowanie własne.

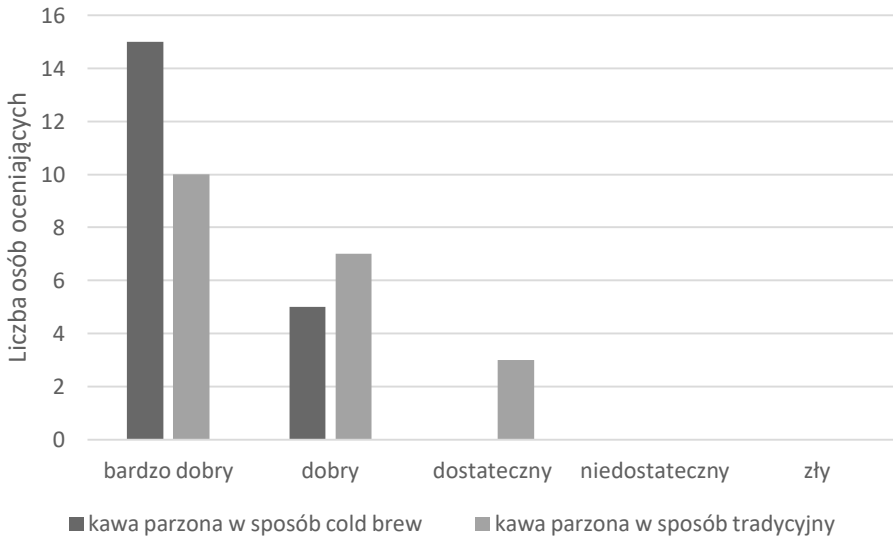
W przypadku wyników oceny zapachu stwierdzono większe zróżnicowanie w przyznawanych ocenach dobrych i dostatecznych (Rysunek 4.). Zapach kawy *cold brew* otrzymał tylko o jedną ocenę bardzo dobrą więcej i prawie dwa razy więcej ocen dobrych niż kawy parzonej w sposób tradycyjnych. Z kolei za zapach kawy parzonej tradycyjnie oceniający przyznali także cztery oceny dostateczne. W przypadku zapachu oceniający twierdzili, że do kawy *cold brew* został dodany jakiś dodatek zapachowy, który bardzo przyjemnie pachnie. Zapach ten mógł wynikać z tego, że związki zapachowe nie ulotniły się, ani nie rozłożyły do metabolitów, tak jak dzieje się podczas zaparzania na gorąco (Fuller, Rao 2017). Dodatkowo należy pamiętać, że kawa *cold brew* jest kawą długo oraz wolno parzoną, przez co również wiele substancji zapachowych mogło zostać uwolnionych. Mógł być on również inny niż kawy parzonej metodą tradycyjną, gdyż do parzenia kawy *cold brew* użyta była zimna woda, zaś do kawy parzonej metodą tradycyjną gorąca woda.



Wykres 4. Porównanie ocen przyznawanych przez oceniających za zapach kawy parzonej metodą *cold brew* i kawy parzonej metodą tradycyjną

Źródło: Opracowanie własne.

Natomiast wyniki oceny klarowności i konsystencji badanych napojów kawowymi były bardziej zróżnicowane (Rysunki 5 i 6). Klarowność kawy parzonej w sposób *cold brew* otrzymała o 50% więcej ocen bardzo dobrych, natomiast kawa parzona w sposób tradycyjny otrzymała więcej ocen dobrych, a nawet oceny dostateczne, których oceniający nie przyznawali oceniając klarowność kawy *cold brew* (Rysunek 5.). W przypadku tej cechy potencjalni konsumenci byli zdumieni, że kawa *cold brew* nie jest mętna, jest przejrzysta o bardzo wyraźnej bursztynowej barwie. Mogło to być wynikiem od-



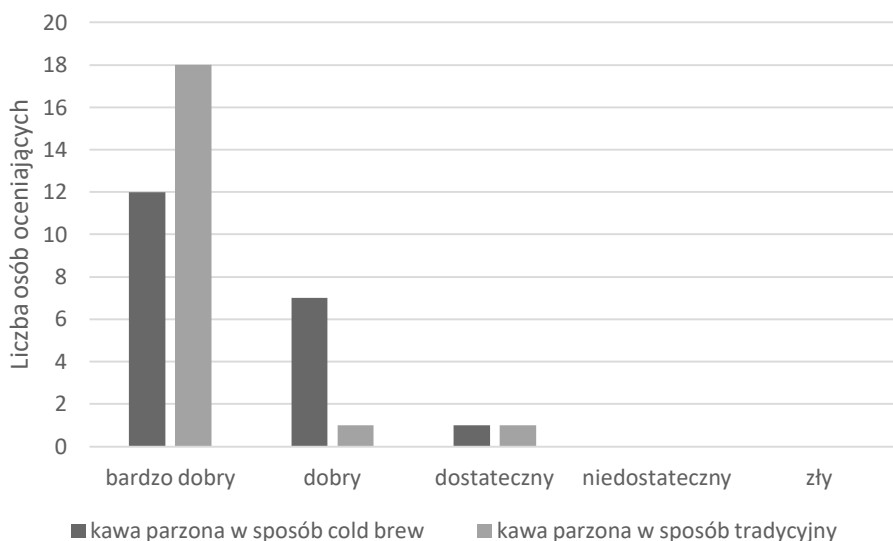
Wykres 5. Porównanie ocen przyznawanych przez oceniających za klarowność kawy parzonej metodą *cold brew* i kawy parzonej metodą tradycyjną

Źródło: Opracowanie własne.

powiedniego zmielenia ziarna kawy, jego długiego macerowania oraz przez to, że na końcu procesu powstały napój został przefiltrowany. W przypadku konsystencji zaobserwowano odwrotną tendencję, więcej ocen bardzo dobrych przyznali oceniający kawie parzonej w sposób tradycyjny, natomiast więcej ocen dobrych otrzymała kawa parzona w sposób *cold brew* (Rysunek 6.). Potencjalni konsumenci twierdzili, że kawie parzonej w sposób *cold brew* brakuje delikatnie gęstej konsystencji oraz pianki na górze. Mogło to być spowodowane przyzwyczajeniem konsumentów do konsystencji kawy tradycyjnej.

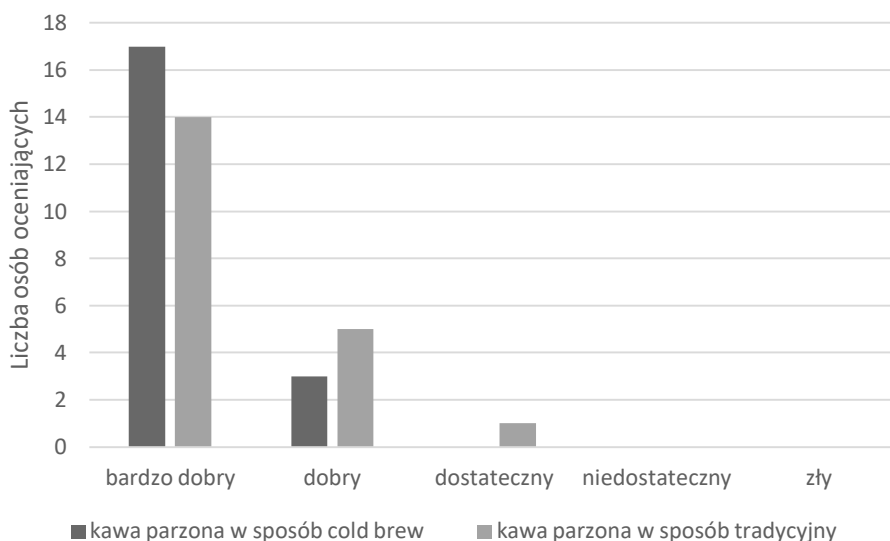
Kawa parzona metodą *cold brew*, zdaniem potencjalnych konsumentów, miała bardzo intensywny aromat kawowy, co wpłynęło także na większą liczbę ocen bardzo dobrych (Rysunek 7.). Oceniający na samym początku skomentowali, że bardzo wyraźnie jest wyczuwalny przyjemny aromat kawy. Dzięki warunkom przygotowania kawy *cold brew* prawdopodobnie nastąpiło wydobycie większej ilości związków smakowo-zapachowych aniżeli w przypadku kawy parzonej w sposób tradycyjny.

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że kawa parzona w sposób *cold brew* charakteryzowała się nieco większą akceptowalnością konsumentką niż kawa parzona w sposób tradycyjny. Potencjalni konsumenci twierdzili, że jest ona orzeźwiająca i bardzo przyjemna na gorące i upalne dni. Dodatkowo zwracali oni również uwagę, że kawa *cold brew* ma bardzo gładką teksturę, nie zostawia grudek na języku. Warto dodać, że potencjalni konsumenci po usłyszeniu, że możliwy jest do niej dodatek owoców i przypraw, takich jak np. cynamon, wyrazili opinię, że chętnie spróbowałiby



Wykres 6. Porównanie ocen przyznawanych przez oceniających za konsystencję kawy parzonej metodą *cold brew* i kawy parzonej metodą tradycyjną

Źródło: Opracowanie własne.



Rysunek 7. Porównanie ocen przyznawanych przez oceniających za intensywności aromatu kawowego kawy parzonej metodą *cold brew* i kawy parzonej metodą tradycyjną

Źródło: Opracowanie własne.

takiej kawy ponownie, nawet jeżeliby mieli za nią zapłacić więcej. Z kolei cechy kawy parzonej w sposób tradycyjny, pomimo uzyskania dużej ilości ocen bardzo dobrych, nie były dodatkowo komentowane. Zdaniem oceniających, kawa ta była kawą dobrą do spożycia i miała charakterystyczny dla użytej metody parzenia smak. Warto zwrócić uwagę, że część konsumentów nie chce przekonywać się do innowacji żywieniowych, woli zostać przy tradycyjnych napojach. Ponadto kawy *speciality* dopiero wchodzą na polski rynek, przez co mogą wydawać się bardzo drogie, a sposób przygotowywania z nich napojów kawowych wydaje się skomplikowany.

W przeciwieństwie do kawy parzonej tradycyjnie, kawa *cold brew* jest kawą parzoną na zimno w długim kontakcie, jednakże nazywanie kawy *cold brew* kawą mrożoną jest błędne. Ze względu na swoją specyfikację parzenia mówi się, że są napojami *ready to drink* (RTD). Dunkin' Donuts, Starbucks i inni komercyjni oraz regionalni amerykańscy sprzedawcy kawy zainteresowali się kawą *cold brew* i zainwestowali w nią. Sugerują oni, że wolniejsze parzenie w chłodnej temperaturze (bez wcześniejszego udziału wysokiej temperatury) pozwala na zachowanie smaku, aromatu, oraz poprawia ogólną smakowitość kawy (Fuller, Rao 2017). Badania cech jakościowych kawy parzonej na gorąco wskazują, że zarówno temperatura parzenia (Lang 2013), jak i stopień zmielenia ziarna kawy (Moroney 2016) wpływają na kinetykę ekstrakcji związków rozpuszczalnych z ziarna kawy i tym samym ich stężenie w napoju, m.in. kwasu chlorogenowego (Farah i in. 2005). Z kolei wzrost temperatury parzenia koreluje ze zmniejszeniem stężenia związków (np. kwasu chlorogenowego) i zwiększeniem stężenia kofeiny w napoju kawowym (Fuller i Rao 2017). Pomimo rosnącej popularności kawy parzonej na zimno, obecnie opublikowano niewiele badań dotyczących wpływu picia kawy macerowanej na zdrowie. Kim i Kim (2014) uznali, że najkorzystniejszymi cechami wyróżnia się *cold brew* parzona przez około 18 godzin. Z kolei badania przeprowadzone przez Shin (2017) wykazały, że polisacharydy wyizolowane z kawy parzonej na zimno mogą potencjalnie wzmacniać funkcje makrofagów i jelitowy układ odpornościowy. Ponadto, Healthy Living Made Simple (grupa osób prowadzących blog o zdrowym życiu oraz żywieniu) wypowiadając się o metodach parzenia kawy podkreśliło mniejszą kwasowość i niższy poziom kofeiny, ale większą zawartość przeciwutleniaczy w kawie parzonej na zimno (Rao i Fuller 2018). Jednak Lane i in. (2017) stwierdzili, że stężenie kofeiny w komercyjnej kawie *cold brew* może wynosić więcej aniżeli w przypadku kawy parzonej tradycyjnie.

Według sprzedawców Starbucks kawa parzona na zimno jest bardziej słodka, ma gładszą strukturę i pełniejszy smak aniżeli kawa parzona w sposób tradycyjny. Sprzedawcy Dunkin' Donuts uważają, że kawa ta jest mniej kwaśna i naturalnie słodsza niż zwykła kawa, dlatego można pić ją czarną, bez żadnych dodatków takich jak np. mleko (Fuller, Rao 2017). Firma StudyLogic, zajmująca się badaniem rynku, szacuje, że sprzedaż gorącej kawy w kawiarniach spadła o 3% w 2016 r., podczas gdy sprzedaż kawy *cold brew* wzrosła o prawie 80% w stosunku do poprzedniego roku (Perez 2017). Roast Magazine donosi o 460% wzroście sprzedaży detalicznej chłodzonej *cold brew* od 2015 do 2017 roku (Brown 2017).

W niniejszej pracy kawa parzona w sposób *cold brew* była przygotowana z kawy najwyższej jakości określanej jako *speciality* przy użyciu specjalistycznej aparatury. Została ona świeżo zmielona oraz macerowana przez długi czas, co wpłynęło na smakowość gotowego napoju kawowego. Kawa parzona w sposób tradycyjny nie wymagała żadnej specjalistycznej aparatury i jej przygotowanie trwało kilka minut. Kawa *cold brew* charakteryzowała się jednak nieco lepszymi cechami organoleptycznymi, w tym także orzeźwiająjącym efektem, który odpowiadał wszystkim oceniającym.

Na podstawie uzyskanych wyników i obserwacji uzyskanych w badaniu stwierdzono także, że młodszy konsumenci oceniali bardzo pozytywnie kawę zaparzoną w sposób *cold brew*. Kawa ta wzbudziła zainteresowanie, przez co konsumenci młodszy zadawali wiele pytań, m.in.: „Gdzie można kupić taką kawę?” i „Jak ją zrobić?”. Na podstawie obserwacji można ocenić, że starsi konsumenci, raczej niżej oceniali kawę zaparzoną w sposób *cold brew*. Nie chcieli oni pić zimnej kawy, co mogło wynikać z przyzwyczajenia.

Podsumowanie

Kawa *cold brew*, pomimo długiego czasu maceracji, została nieznacznie lepiej oceniona pod względem cech organoleptycznych aniżeli kawa parzona metodą tradycyjną. Wyróżniała się zwłaszcza pod względem barwy, klarowności i intensywności aromatu kawowego, za które to cechy otrzymała najwięcej najwyższych ocen. Jednakże potencjalni konsumenci nieznacznie lepiej ocenili kawę parzoną w sposób tradycyjny pod względem konsystencji. W badaniach wykazano znaczne zróżnicowanie ocen za poszczególne cechy organoleptyczne obu rodzajów kaw, co potwierdziło różne preferencje grupy oceniających oraz ich otwartość na innowacyjne produkty.

Literatura

- Andueza S., Maeztu L., Pascual L., Ibáñez C., de Peña, M. P., Cid C. 2003. Influence of extraction temperature on the final quality of espresso coffee. *J. Sci. Food Agric.*, 83(3): 240-248.
- Angeloni G., Guerrini L., Masella P., Innocenti M., Bellumori M., Parenti A. 2019. Characterization and comparison of cold brew and cold drip coffee extraction methods. *J. Sci. Food Agric.*, 99(1): 391-399.
- Brown N. 2017. New US Coffee Shop Growth Slows as RTD and Cold Brew Accelerate, According to Mintel. *Roast Magazine*. <https://macdaddycoffee.com/new-us-coffee-shop-growth-slows-as-rtd-and-cold-brew-accelerate-according-to-mintel/> (dostęp 4 sierpnia 2021 r.).
- Chrostowska-Siwiek I., 2011. Związki lotne jako wyróżniki zmian przechowalniczych kawy. Praca doktorska. Uniwersytet Ekonomiczny, Poznań. <https://www.wbc.poznan.pl/dlibra/publication/245856/edition/204103/content> (dostęp 4 sierpnia 2021 r.).

- Claassen L., Rinderknecht M., Porth T., Röhnisch J., Seren H.Y., Scharinger A., Gottstein V., Nock D., Schwarz S., Winkler G., Lachenmeier D. W. 2021. Cold brew coffee – pilot studies on definition, extraction, consumer preference, chemical characterization and microbiological hazards. *Foods*, 10(4): 865. doi: 10.3390/foods10040865.
- Cordoba N., Pataquiva L., Osorio C., Moreno F.L.M., Ruiz R.Y. 2019. Effect of grinding, extraction time and type of coffee on the physicochemical and flavour characteristics of cold brew coffee. *Sci. Reports*, 9(1): 1-12.
- Farah A., de Paulis T., Trugo L.C., Martin P.R. 2005. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1505-1513.
- Fuller M., Rao N.Z. 2017. The effect of time, roasting temperature, and grind size on caffeine and chlorogenic acid concentrations in cold brew coffee. *Sci. Reports*, 7(1): 1-9.
- Jakubowski M. 2019. Cold brew coffee-aspekty praktyczne i rynkowe. *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, 63(08-09): 20-22.
- Kim A.R., Kim J.S. 2014. Flavor contributing nonvolatile chemical and sensory characterization of cold water extraction-based coffee by different extraction methods (dripping vs steeping) and time. *J. Korea Soc. Coffee Ind.*, 3: 1-9.
- Lane S., Palmer J., Christie B., Ehling J., Le C. 2017. Can cold brew coffee be convenient? A pilot study for caffeine content in cold brew coffee concentrate using High Performance Liquid Chromatography. *Arbutus Rev.*, 8: 15-23.
- Lang R., Yagar E.F., Wahl A., Beusch A., Dunkel A., Dieminger N., Eggers R., Bytof G., Stiebitz H., Lantz I., Hofmann T. 2013. Quantitative studies on roast kinetics for bioactives in coffee. *J. Agric. Food Chem.*, 61(49): 12123-12128.
- López J.A.S., Wellinger M., Gloess A.N., Zimmermann R., Yeretian C. 2016. Extraction kinetics of coffee aroma compounds using a semi-automatic machine: On-line analysis by PTR-ToF-MS. *Int. J. Mass Spectrom.*, 401: 22-30.
- López-Galilea I., De Pena M.P., Cid C. 2007. Correlation of selected constituents with the total antioxidant capacity of coffee beverages: influence of the brewing procedure. *J. Agric. Food Chem.*, 55(15): 6110-6117.
- Maciejewski G., Mokrysz S. 2019. New trends in consumption on the coffee Market. *Zeszyty Naukowe Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Polityki Europejskie, Finanse i Marketing*, 22(71): 132-144.
- Mestdagh F., Glabasnja A., Giuliano P. 2017. The brew - extracting for excellence. In *The craft and science of coffee*. Academic Press, s. 355-380.
- Moroney K.M., Lee W.T., O'Brien S.B.G., Suijver F., Marra J. 2016. Coffee extraction kinetics in a well mixed system. *J. Math. Ind.*, 7(1): 1-19.
- Olejniczak R. 2004. Rynek kawy i herbaty. *Poradnik Handlowca*, 2004/9: 62-74.
- Perez M. 2017. Cold brew might save the Coffee Market. *Bloomberg Markets*. <https://www.bloomberg.com/news/articles/2017-07-19/hot-sales-of-cold-brew-might-just-be-what-coffee-market-needs> (dostęp 4 sierpnia 2021 r.).
- Rao N. Z., Fuller M. 2018. Acidity and antioxidant activity of cold brew coffee. *Sci. Reports*, 8(1): 1-9.
- Rum L. 2004. *Ilustrowany leksykon kawy*. Wydawnictwo Kurpisz, Poznań.
- Shin K.-S. 2017. Chemical characteristics and immune-modulating activity of polysaccharides isolated from cold-brew coffee. *Prev. Nutr. Food Sci.*, 22: 100-106.
- Steen I., Waehrens S.S., Petersen M.A., Münchow M., Bredie W.L. 2017. Influence of serving temperature on flavour perception and release of Bourbon Caturra coffee. *Food Chem.*, 219: 61-68.
- Tolessa K., Rademaker M., De Baets B., Boeckx P. 2016. Prediction of specialty coffee cup quality based on near infrared spectra of green coffee beans. *Talanta*, 150: 367-374.

Abstract

COLD BREW COFFEE – OBTAINING, PROPERTIES AND CONSUMER ACCEPTABILITY

Cold brew coffee is a popular product that has recently revitalized the coffee industry, especially during the warm months of the year. Despite the growing popularity of “*cold brew*” coffee for its taste and aroma benefits, few studies have been published to date on its chemical properties and associated health effects.

The aim of this study was to investigate the consumer acceptability of cold brew coffee compared to traditionally brewed (hot) coffee. An organoleptic evaluation was conducted by a 20-person panel. Coffees were evaluated for color, flavor, aroma, texture, consistency, and coffee aroma intensity. A 5-point scale was used, where 1 point – the least desirable attribute, 5 points – the most desirable attribute.

On the basis of the conducted consumer research, it was found that organoleptic features of traditional coffee were rated lower than in the case of cold brew coffee. The cold brew coffee was characterized by better taste, aroma, color, clarity and intensity of coffee aroma. Consumers emphasized that cold brew coffee had a sweeter taste and a smoother texture than traditionally brewed coffee. Traditional brew was only rated higher in terms of texture.

Key words: cold brew coffee, maceration, traditionally coffee, flavoring compounds, consumer assessment

Słowa kluczowe: kawa parzona na zimno, maceracja, kawa tradycyjna, związki smakowo-zapachowe, ocena konsumentka

Bartosz Gąsiniak, Szymon Andrzejewski
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Koło Naukowe Gastronomia – Sztuka Kulinarna

PORÓWNANIE WRAŻLIWOŚCI SENSORYCZNEJ MŁODZIEŻY Z WYBRANYCH SZKÓŁ ŚREDNICH

Wstęp

Ocena sensoryczna nabiera coraz większego znaczenia w dopasowaniu produktów spożywczych do oczekiwań współczesnych konsumentów. Ocena cech organoleptycznych produktów spożywczych odbywa się z wykorzystaniem różnych metod analizy sensorycznej, które zdefiniowane są normami międzynarodowymi oraz opisane w literaturze naukowej. Niemniej jednak najważniejszą rolę w ocenie odgrywają ludzie tworzący instrument pomiarowy, czyli zespół oceniający, odpowiednio dobrany na podstawie sprawdzonej wrażliwości sensorycznej i właściwie przeszkolony (Baryłko-Pikielna, Matuszewska 2014; PN-ISO 8586-1:1996; PN-ISO 8586-2:1996; PN-ISO 6658:1998). Dobór kandydatów do zespołu oceniającego uwzględnia spełnienie wymagań ogólnych (dostępność w czasie prowadzenia ocen, zainteresowanie wykonaniem ocen, dobry ogólny stan zdrowia), wymagań w zakresie wrażliwości sensorycznej oraz wymagań w zakresie psychologicznych predyspozycji do prowadzenia ocen organoleptycznych (Baryłko-Pikielna, Matuszewska 2014).

Wrażliwość sensoryczna, według PN-ISO 5492:1997, jest to zdolność odczuwania, identyfikowania i/lub rozróżniania jakościowego i/lub ilościowego jednego lub kilku bodźców za pośrednictwem organów zmysłów. Wrażliwość sensoryczna dotyczy pięciu zmysłów: smaku, węchu, wzroku, słuchu i dotyku, przy czym największe znaczenie w ocenie sensorycznej żywności mają trzy pierwsze zmysły (Drewnowski 1997; Zawadzki, Strelau 1997). Sprawdzanie wrażliwości sensorycznej odbywa się między innymi na podstawie testów: rozpoznawania smaków i określenia progów wrażliwości smakowej (PN-ISO 3972:1998), wykrywania i rozpoznawania zapachów (PN-ISO 5496:1997) oraz prawidłowości rozpoznawania barw – test Ishihara (Baryłko-Pikielna, Matuszewska 2014).

Testy i metody analizy sensorycznej, które można wykorzystać zarówno do określenia wrażliwości jak i szkolenia osób oceniających, to między innymi: test rozpoznawania smaków, test rozpoznawania zapachów, test pozwalający ustalić progi wrażliwości smakowej, test wykrywania różnicy bodźca do badania zmysłu smaku przy pomocy metody trójkątowej, która polega na podaniu do oceny dwóch takich samych próbek oraz jednej różniącej się od nich; test wykrywania zróżnicowania poziomu intensywności bodźca przy pomocy metody szeregowania, która polega na uszeregowaniu badanych próbek pod względem intensywności wrażeń, wykorzystywana do badania zmysłów smaku, węchu i wzroku; analiza opisowa smaku, zapachu lub tekstury (Baryłko-Pikielna, Matuszewska 2014; Danielczuk i in. 2015; PN-ISO 3972:1998; PN-ISO 8586-1:1997).

W celu monitorowania sprawności sensorycznej członków zespołu oceniającego konieczne jest cykliczne prowadzenie szkoleń i testów sprawdzających. Lider zespołu na bieżąco powinien dysponować aktualnymi danymi odnośnie sprawności sensorycznej członków zespołu, która jest określana dwoma kryteriami takimi jak: powtarzalność ocen i trafność wyników. Chcąc utrzymać wrażliwość na odpowiednim poziomie oceniający powinni unikać czynników, które mogą przeszkodzić w ich normalnym funkcjonowaniu, takich jak krótki sen, zmęczenie fizyczne i psychiczne (Baryłko-Pikielna, Matuszewska 2014; PN-ISO 8586-2:1996).

W czasie oceny należy przeciwdziałać adaptacji, czyli obniżeniu wrażliwości na bodźce sensoryczne, przez izolację od obcych zapachów dzięki starannej i częstej wymianie powietrza w pomieszczeniu, oddzielenie i ograniczenie ilości jednorazowo ocenianych próbek o wysokiej intensywności smaku lub zapachu oraz zachowanie odpowiednich przerw między ocenami. Przy ocenach smakowych należy płukać usta obojętną smakowo wodą o temperaturze odpowiedniej do badanego produktu, na przykład przy produktach tłustych o temperaturze około 37 °C. W celu uzyskania wiarygodnych wyników analizy sensorycznej należy pamiętać m.in. o przeprowadzaniu oceny nie wcześniej niż godzinę po posiłku, piciu napojów i nie zaleca się palenia wyrobów tytoniowych (Baryłko-Pikielna, Matuszewska 2014; PN-ISO 6658:1998).

Kandydaci do pracy w zespole oceniającym powinni wykazywać psychologiczne predyspozycje do wykonywania badań, tj. muszą wykazywać zdolność przeprowadzania ocen dokładnie według podanych instrukcji, posiadać umiejętność pracy w zespole, wykazywać przydatność do różnego rodzaju zadań w zakresie oceny sensorycznej oraz posiadać zdolność postrzegania różnic w próbkach tego samego typu i ich słownego określenia (Baryłko-Pikielna, Matuszewska 2014).

Cel pracy

W literaturze nie znaleziono informacji dotyczącej wrażliwości sensorycznej uczniów szkół średnich, którzy są potencjalnymi pracownikami dla branży spożywczej. W związ-

ku z tym głównym celem badań było porównanie wrażliwości sensorycznej młodzieży uczącej się w dwóch szkołach średnich, w klasach o profilu technik żywienia i usług gastronomicznych. Celem dodatkowym było wskazanie, czy wśród uczestników, którzy zostali zapoznani z podstawami analizy sensorycznej, wystąpi zróżnicowanie w ocenie cech organoleptycznych jogurtów truskawkowych ogólnie dostępnych w handlu detalicznym, wytworzonych przez różnych producentów.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w Katedrze Żywienia Człowieka UWM w Olsztynie na przełomie lat 2019/2020. W eksperymencie uczestniczyło 14 osób ze szkoły I oraz 26 osób ze szkoły II. W ocenie stopnia pożądalności jogurtów truskawkowych metodą skali hedonicznej wzięło udział 14 osób ze szkoły I.

Do sprawdzenia wrażliwości sensorycznej zespołów wykorzystano testy rozpoznawania smaku i zapachu (PN-ISO 3972:1998; PN-ISO 5496:1997; PN-ISO 8586-1:1996) oraz testy rozróżniania poziomów intensywności zapachu i barwy (PN-ISO 8586-2:1996). Do testu rozpoznawania smaków sporządzono wodne roztwory związków wzorcowych o odpowiednich stężeniach. Przygotowano siedem próbek reprezentujących następujące smaki: kwaśny (kwas cytrynowy), gorzki (kofeina), słony (chlorek sodu), słodki (sacharoza), umami (glutaminian sodu), metaliczny (siarczan żelazowy uwodniony) oraz obojętny (woda destylowana). Do przeprowadzenia testu zdolności rozpoznawania zapachów przygotowano próbki siedmiu produktów zakupionych w handlu detalicznym: kora cynamonu, tran, pieprz czarny, ocet, goździki, skórka z pomarańczy oraz liście suszonej bazylii, które w postaci rozdrobnionej umieszczono w zwitkach waty w szklanych naczyniach zamykanych korkami ze szlifem. Zdolność rozpoznawania różnic intensywności zapachu sprawdzano z wykorzystaniem pięciu roztworów koncentratu aromatu cytrynowego o zróżnicowanym stężeniu, umieszczonych w niewielkich kolbach stożkowych zamkniętych korkami ze szlifem. Do oceny zdolności rozpoznawania intensywności barwy wykorzystano dziesięć roztworów dichromianu potasu w mleku odtłuszczonym, również o zróżnicowanym stężeniu, umieszczonych w probówkach zamkniętych korkami gumowymi. Przed przystąpieniem do testów rozpoznawania smaków i zapachów młodzież została zapoznana ze smakami umami i metalicznym umieszczonymi w opisanych pojemnikach. Jako że eksperyment miał na celu jedynie sprawdzenie wrażliwości sensorycznej uczestników a nie ich kwalifikowanie do zespołu oceniającego, testy zostały wykonane w jednym powtórzeniu.

Dodatkowo, w ramach pracy, dokonana została ocena pożądalności jogurtów truskawkowych, pochodzących od dwóch różnych producentów. Ocenę przeprowadzono z wykorzystaniem 9-stopniowej skali hedonicznej i dotyczyła ona oceny pożądalności barwy, zapachu, konsystencji i smaku jogurtów. Skala miała następujące oznaczenia:

1 – ogromnie nie lubię, 2 – bardzo nie lubię, 3 – średnio nie lubię, 4 – trochę nie lubię, 5 – ani lubię ani nie lubię, 6 – dość lubię, 7 – średnio lubię, 8 – bardzo lubię, 9 – ogromnie lubię (Baryłko-Pikielna, Matuszewska 2014).

Wyniki poddano analizie statystycznej, korzystając z programu Statistica 13 [TIBCO Software Inc., USA, 2021]. Do stwierdzenia czy różnica w rozkładzie prawidłowych odpowiedzi, dotyczących wrażliwości sensorycznej młodzieży, pomiędzy szkołami jest istotna statystycznie wykorzystano test χ^2 i przyjęto ją za istotną, gdy wartość $P < 0,05$. Do interpretacji wyników oceny jogurtów wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji i na podstawie testu Tukey'a przyjęto, że różnice między cechami produktów są istotne statystycznie, gdy $P < 0,05$.

Wyniki

Test rozpoznawania smaków

Badania wykazały, że największe odsetki uczniów w obu szkołach rozpoznały prawidłowo próbki o smaku kwaśnym (szkoła I – 92,9%, szkoła II – 96,2%) oraz słonym (szkoła I – 78,6%; szkoła II – 61,5%). Najmniej prawidłowych wskazań uzyskano wśród uczniów szkoły I dla próbek o smaku umami (28,6%), a wśród uczniów szkoły II dla próbek o smaku słodkim i metalicznym (po 19,2%). Odnotowano istotną różnicę w wykrywaniu smaków: słonego, słodkiego i metalicznego (Tabela 1).

Tabela 1. Zestawienie poprawnych odpowiedzi w teście rozpoznawania smaków

Smak	Szkoła I	Szkoła II	P
Kwaśny	92,9%	96,2%	0,64817
Gorzki	50,0%	26,9%	0,14442
Słony	78,6%	61,5%	0,00843
Słodki	78,6%	19,2%	0,00026
Umami	28,6%	26,9%	0,91133
Metaliczny	57,1%	19,2%	0,01462
Obojętny - woda	42,9%	61,5%	0,25731

Źródło: Opracowanie własne.

Rozpoznawanie zapachów

W teście rozpoznawania zapachów najwięcej prawidłowych odpowiedzi w obu szkołach uzyskał zapach octu (szkoła I – 100%, szkoła II – 96,2%), zaś najmniej zapach bazylii (szkoła I – 35,7%, szkoła II – 11,5%). Istotne różnice w rozpoznawaniu odnotowano w odniesieniu do zapachu tranu i pomarańczy (Tabela 2).

Tabela 2. Zestawienie prawidłowych odpowiedzi w teście rozpoznawania zapachów

Zapach	Szkoła I	Szkoła II	P
Cynamon	92,90%	84,50%	0,45219
Tran	85,70%	11,50%	0,00000
Pieprz	92,90%	65,40%	0,05563
Ocet	100%	96,20%	0,45739
Goździki	85,70%	65,40%	0,16961
Pomarańcza	50,00%	92,30%	0,00224
Bazylia	35,70%	11,50%	0,06827

Źródło: Opracowanie własne.

Test rozróżniania intensywności zapachu i barwy

W testach rozróżniania intensywności zapachu i barwy, wyniki między szkołami nie różniły się istotnie statystycznie (odpowiednio $P=0,6425$ oraz $P=0,3678$). Największy odsetek uczniów ustawił w prawidłowej kolejności 3 spośród 5 ocenianych próbek zapachowych (szkoła I - 42,9%, szkoła II - 30,8%). W teście rozróżniania intensywności barwy największe odsetki uczniów ustawiły wszystkie próbki w prawidłowej kolejności, i było to 57,1% w szkole I oraz 50,0% w szkole II (Tabela 3).

Tabela 3. Wyniki uzyskane w testach rozróżniania intensywności zapachu i barwy

Ilość poprawnych odpowiedzi	Szkoła I	Szkoła II
Zdolność rozróżniania intensywności zapachu		
0	14,30%	7,70%
1	21,40%	26,90%
2	0,00%	11,50%
3	42,90%	30,80%
5	21,40%	23,10%
Zdolność rozróżniania intensywności barwy		
3	7,10%	0,00%
4	0,00%	3,80%
6	0,00%	11,50%
7	9,00%	7,70%
8	35,70%	26,90%
10	57,10%	50,00%

Źródło: Opracowanie własne.

Ocena pożądalności jogurtów truskawkowych

Asortyment jogurtów na rynku polskim jest bardzo szeroki. Producenci starają się zadowolić konsumentów i zdobyć nowych klientów wprowadzając do handlu produkty w coraz to nowych wariantach smakowych, jednak jogurty o smaku truskawkowym ciągle cieszą się dużą popularnością.

Wyniki oceny pożądalności barwy, zapachu, konsystencji i smaku jogurtów truskawkowych pochodzących od dwóch różnych producentów, przeprowadzonej metodą 9-stopniowej skali hedonicznej przedstawiono w Tabeli 4. Próbką I została wyżej oceniona pod względem barwy (7,93) zapachu (7,64) i smaku (7,64) i oceny te kształtowały się na poziomie zbliżonym do „bardzo lubię”. Próbką II uzyskała oceny tych cech na poziomie zbliżonym do „umiarkowanie lubię”. Oceny barwy i zapachu badanych próbek różniły się a smaku nie różniły się istotnie statystycznie. Obie próbki uzyskały jednakowe oceny konsystencji (7,07; „średnio lubię”) i nie różniły się istotnie statystycznie pod względem tej cechy. Otrzymane wyniki świadczą o większej pożądalności próbki I.

Tabela 4. Zestawienie wyników oceny pożądalności wybranych cech jogurtów truskawkowych

Cecha produktu	Próbka I	Próbka II
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$
Barwa	7,93 ^b ± 0,83	5,71 ^a ± 1,43
Zapach	7,64 ^b ± 1,15	5,93 ^a ± 2,02
Konsystencja	7,07 ^a ± 1,27	7,07 ^a ± 0,83
Smak	7,64 ^a ± 1,91	6,43 ^a ± 1,87

^{a,b} – wartości średnie oznaczone w wierszach różnymi literami różnią się istotnie statystycznie
 \bar{x} – średnia, SD – odchylenie standardowe

Źródło: Opracowanie własne.

Dyskusja

W badaniach własnych przeprowadzonych z udziałem młodzieży z dwóch różnych szkół średnich zauważono, że trudności sprawiało rozpoznanie (prawidłowe wskazania na poziomie $\leq 50\%$) smaku gorzkiego i umami (szkoła I i II) oraz dodatkowo obojętnego (szkoła I) oraz słodkiego i metalicznego (szkoła II). Jednakże dla obydwu grup uczestników badań wycucie smaku kwaśnego nie było problemem. Z doświadczeń przeprowadzonych przez Matuszewską i in. (1994) wynika, że równowaga smaku kwaśnego i słodkiego ma duże znaczenie dla konsumentów, dlatego istotne jest, aby szkolić zespół biorący udział w ocenach sensorycznych, przeprowadzać testy zdolności rozpoznawania bodźca jak i ustalania progów wrażliwości smakowej.

Hamerlińska (2020) wskazuje siedem sfer, na które niekorzystny wpływ ma problem z prawidłowym odczuwaniem zapachu. Autorka podaje, że w przypadku sfery kulinarnej i dietetycznej, które są powiązane ze sobą, zaburzenie węchu uniemożliwia/utrudnia dobór właściwego pożywienia, utrzymanie na odpowiednim poziomie łaknienia oraz wydzielanie śliny i soku żołądkowego. Zmysł ten odgrywa kluczową rolę w sferze zawodowej (kucharze, kiperzy, farmaceuci, strażacy) i problemy z nim mogą przyczynić się do utraty pracy oraz obniżyć poziom jakości życia. Opinię taką wyrażają również Bojarowicz i in. (2016). Dlatego istotna jest weryfikacja sensoryczna w tym zakresie członków zespołu oceniającego. W badaniach przeprowadzonych przez Dmowskiego i Platta (2012) zauważyć można różnice w wynikach oceny smaku i zapachu napojów mlecznych z dodatkiem ekstraktów kawy, pomiędzy zespołem przeszkolonym a zespołem bez szkolenia.

Spożywanie jogurtów jako mlecznych napojów fermentowanych jest częstym zjawiskiem wśród Polaków. W badaniach Mojka i Biel (2012) spożywanie tych produktów zadeklarowało 100% konsumentów, niższy wynik uzyskano w badaniach Kudełki i Marzec (2004) – 87,8% oraz 84,5% w badaniach Połoń i Rejman (2006).

Jak pokazały wyniki przeprowadzonych badań jeden z dwóch jogurtów był zdecydowanie „bardziej lubiany” przez zespół oceniających. Drugi produkt uzyskał niższe noty w ocenie barwy, zapachu i smaku, które mają bardzo duże przełożenie na ogólną ocenę produktów spożywczych. Zespół oceniający składający się z osób młodych jest odpowiedni do przeprowadzania oceny jogurtów, co wynika z badań przeprowadzonych przez Adamczyka (2007). Należy pamiętać, że wyniki oceny sensorycznej obok wielu innych czynników, takich jak: rodzaj badanego produktu, jego struktura, wykorzystane w produkcji dodatki, stopień wykszolenia zespołu oceniającego (Dmowski, Platta 2012), opakowanie (Żbikowski 2012) oraz zawartości tłuszczu w produkcie (Mossaz i in., 2010), wpływają na zainteresowanie konsumentów danym wyrobem. Badania przeprowadzone przez Sajdakowską i Grasewicz (2016) wykazały, że smak, konsystencja, zapach, obecność wsadu owocowego, są jednymi z głównych czynników ocenianych przy zakupie m.in. jogurtów, co wskazała również Waszkiewicz-Robak (2012). Kawecka (2018) podkreśla, że świadomość konsumentów wzrasta i zwracają oni coraz większą uwagę na wartość zdrowotną wybieranych produktów oraz „czystość” etykiety (krótki, prosty i naturalny skład), zaś z badań przeprowadzonych przez Kabacińską i Babicz-Zielińską (2009) wynika, że na ocenę sensoryczną jogurtów (brzoskwinio- wych) znaczący wpływ ma znajomość marki ocenianego produktu.

Podsumowanie

Młodzież ze szkoły I cechowała się nieco wyższą wrażliwością sensoryczną niż młodzież ze szkoły II. Istotne różnice w rozpoznawaniu smaków odnotowano w odniesieniu do

smaku słonego, słodkiego i metalicznego, a w rozpoznawaniu zapachów w odniesieniu do zapachu tranu i pomarańczy.

Badania pozwoliły ocenić indywidualne predyspozycje młodzieży w zakresie wrażliwości sensorycznej oraz pokazać uczestnikom badań, że ocena sensoryczna nie jest analizą łatwą, a wymagającą skupienia oraz odpowiednich warunków i czasu.

Przeprowadzona ocena sensoryczna badanych jogurtów wykazała zróżnicowanie wyrobów i pozwoliła na wskazanie wyrobu bardziej pożądanego (produkt I).

Literatura

- Adamczyk G. 2007. Zachowanie żywieniowe młodych konsumentów na rynku przetworów mlecznych. *Prz. Mlecz.*, 1: 2.
- Baryłko-Pikielna N. 1995. Sensoryczna analiza profilowa i ocena konsumentencka w opracowaniu nowych produktów żywnościowych. *Food Product Development-opracowywanie nowych produktów żywnościowych*. Wydawnictwo AR, Poznań.
- Baryłko-Pikielna N., Matuszewska I. 2014. Sensoryczne badania żywności. *Podstawy. Metody. Zastosowania*. PTTŻ, Kraków.
- Bojarowicz H., Ziółkowska A., Krysińska J. 2016. Wyjątkowość zapachy. *Hygeia Public Health*, 51(2): 154-160.
- Danielczuk J., Hałasińska A.G., Skąpska S. 2015. Metody szkolenia zespołu analizy sensorycznej w aspekcie spełnienia wymogów akredytacji. *Post. Nauki Techn. Przem. Roln. Spoż.*, 70(3): 99-113.
- Dmowski P., Platta A. 2012. Konsumentencka ocena atrakcyjności sensorycznej napojów mlecznych z dodatkiem ekstraktów kawy. *Zesz. Nauk. AM w Gdyni*, 73: 34-42
- Drewnowski A. 1997. Taste preferences and food intake. *An. Rev. Nutr.*, 17 (1): 237-253.
- Hamerlińska A. 2020. Niepełnosprawność węchowa – próba wprowadzenia pojęcia. *Szkoła Specjalna*, 1: 47-53.
- Kabacińska A., Babicz-Zielińska E. 2009. Wpływ marki na akceptację cech sensorycznych jogurtów. *Żywn. Nauka Technol. Jakość*, 4(65): 388-394.
- Kawecka A. 2018. Clean labels – zauważalny trend w branży spożywczej. *Prz. Mlecz.*, 12: 3-7.
- Kudełka W., Marzec M. 2004. Preferencje studentów dotyczących mlecznych napojów fermentowanych. *Żywn. Nauka Technol. Jakość*, 3: 63-76.
- Matuszewska I., Zacharewicz E., Baryłko-Pikielna N., Radzanowska J. 1994. Profilowa charakterystyka jakości sensorycznej soków owocowych, a ich ocena konsumentencka. *Mat. Konf. XXV Sesji Naukowej KTiChŻ PAN „Postępy w technologii żywności”*, Lublin, 15-16 września 1994, s. 141.
- Mojka K., Biel W. 2012. Czynniki wpływające na wybór mlecznych napojów fermentowanych przez młodzież akademicką – doniesienie wstępne. *Hygeia Public Health*, 47(3): 371-377.
- Mossaz S., Jay P., Magnin A., Panouillé M., Saint-Eve, A., Déléris, I., Juteau, A., Souchon, I. 2010. Measuring and predicting the spreading of dairy products in the mouth: sensory, instrumental and modelling approaches. *Food Hydrocol.*, 24: 681-688.
- PN ISO 3972:1998. Analiza sensoryczna. Metodologia. Metoda sprawdzania wrażliwości sensorycznej. PKN, Warszawa.

- PN-ISO 5492:1997. Analiza sensoryczna. Terminologia. PKN, Warszawa.
- PN-ISO 5496:1997 Analiza sensoryczna. Metodologia. Wprowadzenie i szkolenie oceniających w wykrywaniu i rozpoznawaniu zapachów. PKN, Warszawa.
- PN-ISO 6658:1998. Analiza sensoryczna. Metodologia. Wytyczne ogólne. PKN, Warszawa.
- PN-ISO 8586-1:1996. Analiza sensoryczna. Ogólne wytyczne wyboru, szkolenia i monitorowania oceniających. Wybrani oceniający. PKN, Warszawa.
- PN-ISO 8586-2:1996. Analiza sensoryczna. Ogólne wytyczne wyboru, szkolenia i monitorowania oceniających. Eksperti. PKN, Warszawa.
- Połoń A., Rejman K. 2006. Preferencje konsumentów i pożyacie mlecznych napojów fermentowanych. *Prz. Mlecz.*, 11: 4-6.
- Sajdakowska M., Grasewicz J. 2016. Wybrane walory zdrowotne jogurtów w opinii konsumentów. *ZN SGGW, EOIGŻ*, 114: 121-130.
- Waszkiewicz-Robak B. 2012. Dodatki stosowane w mlecznych napojach fermentowanych. *Prz. Ferm. Owoc.-Warz.*, 2: 4-6.
- Zawadzki B., Strelau J. 1997. Formalna Charakterystyka Zachowania – Kwestionariusz Temperamentu (FCZ-KT). Podręcznik. Pracownia Testów Psychologicznych Polskiego Towarzystwa Psychologicznego, Warszawa.
- Żbikowski Z. 2012. Zmiany w jogurcie podczas przechowywania w różnych opakowaniach. *Prz. Mlecz.*, 1: 16-20.

Abstract

COMPARISON OF SENSORY SENSITIVITY OF YOUNG PEOPLE FROM SELECTED SECONDARY SCHOOLS

The aim of the study was to compare the sensory sensitivity of youths from two secondary schools and to assess the desirability of two strawberry yoghurts. Tests of taste and smell recognition and smell and colour intensity differentiation were used. Yoghurts were assessed using the hedonic scale. Distribution of answers between schools was analysed with Chi² test and considered significant when $P < 0.05$. ANOVA was used to interpret the yoghurts evaluation results (Tukey's test; $P < 0.05$).

The highest percentages of students in both schools correctly recognized the sour and salty samples, while the lowest percentages recognized the umami (school 1) and sweet and metallic (school 2) samples. The smell of vinegar was the most correctly indicated in both schools, and that of basil the least. The results of smell and colour tests did not differ significantly between schools. The youths from school I had a slightly higher sensory sensitivity, and sample I was more desirable in the case of yoghurts.

Key words: sensory sensitivity, smell, colour, taste, yoghurt

Słowa kluczowe: wrażliwość sensoryczna, zapach, barwa, smak, jogurt

Piotr Jakuc

Uniwersytet Warmiński-Mazurski w Olsztynie

Wydział Nauki o Żywności

Studenckie Koło Naukowe Technologów Przetwórstwa Surowców Roślinnych

Opiekun: dr hab. inż. Małgorzata Tańska, prof. UWM

WPŁYW ALTERNATYW CUKRU BIAŁEGO NA JAKOŚĆ CZEKOLADEK DESEROWYCH

Wstęp

Spożycie rafinowanego cukru w diecie jest jedną z głównych przyczyn otyłości. Zaleca się, aby spożycie białego cukru ograniczyło się do 5% całkowitego spożycia energii. Jednakże, ze względu na ważne funkcje, jakie pełni cukier w produktach spożywczych, czasem nie jest możliwe lub jest bardzo trudne, aby zamienić go inną substancją słodzącą (Richardson i in. 2018). W ostatnich czasach coraz większą popularnością cieszy się żywność o obniżonej kaloryczności. Na półkach sklepowych można znaleźć między innymi takie produkty, jak czekolada, w której cukier został zastąpiony niskokalorycznymi substancjami słodzącymi (Martynow 2018). Wśród konsumentów najpopularniejszą substancją słodzącą jest wciąż cukier biały, sacharoza, która cechuje się wysoką kalorycznością i wysokim indeksem glikemicznym. Cukier biały nie sprzyja osobom zmagającym się z otyłością oraz źle wpływa na szkliwo zębów. Istnieje wiele substancji słodzących, które stanowią dobrą alternatywę dla cukru. Można wyróżnić substancje, które posiadają słodki smak, ale nie zawierają kalorii lub takie, które zawierają kalorie, lecz posiadają bardzo wysoki poziom słodkości, przez co używane są w niewielkich ilościach i ich kaloryczność nie jest znacząca (Grembecka 2015). W dzisiejszych czasach alternatywne substancje słodzące cieszą się dużym zainteresowaniem przemysłu spożywczego, konsumentów oraz mediów; mogą pomóc w zmniejszeniu ilości kalorii w produktach żywnościowych. Substancje te są badane od ponad 100 lat, a liczba dopuszczonych do stosowania substancji znacznie wzrosła od ostatnich 30 lat (O'Brien-Nabors 2012). Substancje słodzące można podzielić ze względu na pochodzenie, funkcję technologiczną, postać oraz wartości odżywcze. Substancje słodzące, oprócz kształtowania cech smakowych, mogą wpływać na trwałość, wartość kaloryczną,

teksturę oraz barwę produktu (Grembecka 2015). W przemyśle spożywczym w Polsce stosuje się również substancje intensywnie słodzące, takie jak acesulfam K, aspartam, sól aspartamu i acesulfamu, kwas cyklaminy i jego sole Na oraz Ca, neohesperydine DC, sacharynę i jego sole Na, K, Ca; sukralozę, taumatynę. Dla tych substancji obowiązuje próg maksymalnej dawki w produktach spożywczych. Oprócz powyższych, do substancji słodzących, które wykorzystuje się w przemyśle spożywczym, zaliczono m.in.: sorbitol (w tym syrop sorbitolowy), mannitol, izomalt, maltitol (w tym syrop maltitolowy), laktitol, ksylitol, erytrytol (Świąder 2010).

Czekolada jest jednym z popularniejszych słodkich przysmaków dzisiejszych czasów. Znana jest od czasów, gdy Olmekowie zaczęli uprawiać ziarna kakaowca, tj. od ponad 3 tysięcy lat (Skrajda i Dąbrowski 2015). Według PN-A-88102, czekoladą pełną nazywa się wyrób uformowany z masy czekoladowej naturalnej, mlecznej, śmietankowej lub białej, ewentualnie z nadzieniem. Pełna czekolada naturalna powinna zawierać nie mniej niż 98% suchej masy, nie więcej niż 65% cukrów ogółem jako cukier inwertowany w suchej masie oraz nie mniej niż 19% tłuszczu w suchej masie. Z kolei, według Dyrektywy 2000/36/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 23 czerwca 2000 r., odnoszącej się do wyrobów kakaowych i czekoladowych przeznaczonych do spożycia przez ludzi, czekolada oznacza wyrób zawierający nie mniej niż 35% suchej masy kakaowej ogółem, w tym nie mniej niż 18% masła kakaowego i nie mniej niż 14% suchej odtłuszczonej masy kakaowej. W czekoladzie naturalnej cukry pełnią wiele ważnych funkcji, nie tylko pod względem smakowym, ale są również substancją wypełniającą, odpowiedzialną za teksturę oraz środkiem konserwującym (Aguilar-Villa i in. 2020).

Cel badań

Celem badań było określenie, jak zastąpienie cukru białego innymi substancjami słodzącymi wpływa na wybrane cechy fizyczne oraz organoleptyczne czekoladek deserowych.

Materiał i metody badań

Materiałem badań były substancje słodzące: cukier biały, miód, maltitol, erytrytol, stevia, ksylitol, tagatoza oraz cukier kokosowy. Dodatkowo wykorzystano masło kakaowe oraz kakao. Wszystkie surowce zostały zakupione w olsztyńskich sklepach. Przed przystąpieniem do badań, każda substancja słodząca została zmielona w młynku do postaci proszku, w celu ułatwienia rozpuszczenia jej w tłuszczu kakaowym. Czekoladki deserowe wykonano samodzielnie w następujący sposób: odważono masło ka-

kaowe w ilości 22 g, kakao w ilości 23,5 g oraz z substancją słodzącą w ilości 43,5 g, a po dokładnym wymieszaniu produktów masa była temperowana przez podgrzanie do temperatury 45–48°C, chłodzenie do 27°C oraz ponowne podgrzanie do temperatury 31–32°C. Tak przygotowana masa została przeniesiona do silikonowych foremek i chłodzona w lodówce w temperaturze 8°C. Jakość otrzymanych czekoladek oceniono przy użyciu metod instrumentalnych, oznaczając barwę i twardość, a także dokonano ich oceny organoleptycznej.

Ocenę organoleptyczną czekoladek przeprowadziło 16 osób obu płci w wieku od 20 do 24 lat, stosując skalę pięciopunktową, gdzie 5 punktów oznaczało ocenę najwyższą, natomiast 1 punkt oznaczał ocenę najniższą. Ocenie podlegały takie cechy organoleptyczne, jak: barwa, smak, zapach, twardość, gładkość oraz wygląd powierzchni dolnej i górnej (Kowalska i in. 2011). Ocenę przeprowadzono w temperaturze około 20°C przy świetle dziennym. Każda próbka była zakodowana w taki sposób, aby oceniający nie sugerowali się dodanymi substancjami słodzącymi.

Pomiaru barwy czekoladek dokonano, układając pod kamerą pojedyncze czekoladki, za pomocą Zestawu Cyfrowej Analizy Obrazu, w której skład wchodziły: kamera cyfrowa Nikon DXM 1200, oświetlenie o temperaturze barwowej 6500 K, komputer, monitor, oprogramowanie LUCIA G wersja 4.80 oraz karty akwizycji obrazu (Tańska i in. 2016). Wyniki pomiaru barwy czekoladek zostały wyrażone w wartościach składowych modelu CIE $L^*a^*b^*$, gdzie składowa L^* wskazuje jasność barwy, składowa a^* wskazuje intensywność barwy zielonej (wartości ujemne)/czerwonej (wartości dodatnie), a składowa b^* wskazuje na intensywność barwy niebieskiej (wartości ujemne)/żółtej (wartości dodatnie) (Pastuszek 2000). Oznaczenie przeprowadzono w trzech równoległych powtórzeniach. Przy użyciu tych parametrów barwy określono różnicę pomiędzy barwami czekoladek za pomocą wzoru: $\Delta E = ((\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2)^{0.5}$. W zależności od otrzymanej wartości ΔE przyjmuje się, że: (0,0–1,0) – różnica barwy jest niedostrzegalna; (1,0–2,0) – różnica barwy jest nieistotna; (2,0–3,5) – różnica barwy jest nieznaczna; (3,5–,0) – różnica barwy jest duża; (5,0–7,5) – różnica barwy jest bardzo duża (Pastuszek 2000).

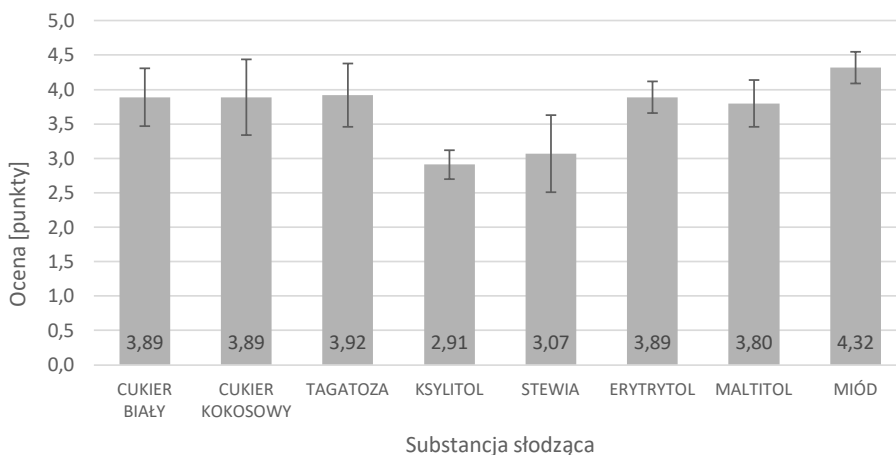
Twardość badanych czekoladek oceniono za pomocą maszyny testującej UMT Instron 4301 (Tańska i in. 2016). Oznaczenie polegało na pomiarze siły potrzebnej do przebicia czekoladki. Do tego celu został użyty trzpień o średnicy 4 mm. Oznaczenie przeprowadzono w trzech równoległych powtórzeniach.

Wyniki badań i dyskusja

Ocena organoleptyczna czekoladek miała na celu zbadanie akceptowalności produktu przez potencjalnych konsumentów oraz zbadanie, czy zostaną zauważone różnice pomiędzy cechami czekoladek z dodatkiem cukru białego i czekoladek z innymi sub-

stancjami słodzącymi. Podczas oceny organoleptycznej zwrócono uwagę na takie cechy czekoladek, jak: barwa, smak, zapach, gładkość, twardość oraz wygląd powierzchni górnej i dolnej.

Na rysunku 1 przedstawiono oceny ogólne badanych czekoladek. Najwyższą ocenę ogólną (4,32 pkt.) uzyskały czekoladki z miodem, zaś najniższe oceny (2,91 i 3,07 pkt.) uzyskały czekoladki z ksylitolem i stewią. Dla czekoladek z ksylitolem podobne wyniki uzyskała Martynow (2018), badała 3 różne czekolady z ksylitolem dostępne w handlu. W cytowanej pracy ocena ogólna czekolad z ksylitolem była w zakresie 2,67–4,15 pkt., natomiast w przypadku czekolad ze stewią w cytowanej pracy uzyskano wyższe wyniki: 3,27 oraz 4,38 pkt. Taka różnica pomiędzy wartościami oceny ogólnej mogła być spowodowana sposobem produkcji czekolad, jak też ich składem. Z kolei wysoką akceptowalność czekoladek z miodem potwierdziły badania Bhardwaj i in. (2021), w których to czekoladki z miodem zostały ocenione dobrze, posiadały akceptowalny smak, zapach oraz odpowiednią dla czekoladek konsystencję. Czekoladki z cukrem kokosowym, maltitolem, erytrytolem oraz tagatozą uzyskały oceny zbliżone do czekoladek z dodatkiem cukru białego, w zakresie od 3,80 do 3,92 pkt.



Rysunek 1. Porównanie ocen ogólnych uzyskanych z oceny organoleptycznej badanych czekoladek

Figure 1. Comparison of the total notes obtained from organoleptic evaluation of the tested chocolates.

Źródło: Opracowanie własne.

W tabeli 1 zestawiono wyniki średnich ocen przyznanych za poszczególne cechy organoleptyczne czekoladek z różnymi substancjami słodzącymi. Wyniki oceny barwy wykazały nieznaczne różnice pomiędzy czekoladami. Oceniający pod tym względem najwyżej ocenili czekoladki z erytrytolem oraz z cukrem kokosowym, najniżej zaś zostały ocenione czekoladki z tagatozą. Według ocen, pozostałe rodzaje czekoladek po-

siadały barwę zbliżoną do barwy czekoladek z cukrem białym. Wyniki ocen wyglądu powierzchni dolnej wskazały, że najlepiej na tę cechę wpłynęło zastosowanie miodu, natomiast stewia i tagatoza pogorszyły wygląd tej powierzchni czekoladek. Stwierdzono jednak, że pogorszenie tej cechy czekoladek nie było znaczące w porównaniu z czekoladkami z cukrem białym. Z kolei na wygląd powierzchni górnej czekoladek pozytywnie wpłynął erytrytol, zaś najgorzej cukier biały. Takie wyniki wskazują, że inne substancje słodzące poprawiły tę cechę czekoladek. Pod względem twardości, oceniający wskazali czekoladki z erytrytolem jako najlepsze, najniżej natomiast oceniono czekoladki ze stewią. Najlepszą gładkością, według oceniających, charakteryzowały się czekoladki z miodem, zaś najgorszą gładkością charakteryzowały się czekoladki ze stewią. Zapach czekoladek okazał się cechą najbardziej zróżnicowaną ze względu na dodane substancje słodzące. Za najlepszy oceniający uznali zapach czekoladek z miodem, a najmniej przyjemny był zapach czekoladek ze stewią. Dla konsumentów najważniejszą cechą jest smak. Potencjalnym konsumentom najbardziej smakowały czekoladki z miodem, zaś najmniej czekoladki ze stewią. Oceny te okazały się zbieżne z ocenami zapachu.

Tabela 1. Porównanie wyników oceny barwy, wyglądu powierzchni dolnej, wyglądu powierzchni górnej, twardości, gładkości, zapachu, smaku badanych czekoladek deserowych

Table 1. Comparison of the results of the color, appearance of the lower surface, appearance of the upper surface, hardness, smoothness, smell and taste of the tested chocolates

Substancja słodząca	Cechy czekoladek						
	Barwa	Wygląd powierzchni dolnej	Wygląd powierzchni górnej	Twardość	Gładkość	Zapach	Smak
Cukier biały	3,69±0,6	3,80±0,8	3,60±0,6	3,81±0,4	3,70±0,6	4,20±0,8	4,00±0,7
Cukier kokosowy	4,38±0,62	3,94±0,44	4,25±0,58	3,88±0,89	3,88±0,81	3,81±0,83	3,69±1,08
Tagatoza	3,56±0,73	3,69±0,79	3,69±1,01	3,75±0,58	3,56±0,81	4,19±0,54	4,13±0,72
Ksylitol	4,00±0,52	4,13±0,34	4,38±0,5	3,88±0,81	3,81±0,66	3,68±0,48	4,25±0,68
Stewia	4,00±0,73	3,69±0,7	4,06±0,57	3,31±0,79	2,94±0,93	3,25±1,0	2,13±0,81
Erytrytol	4,38±0,72	4,38±0,5	4,75±0,45	4,00±0,00	4,00±0,00	3,88±0,34	3,25±0,77
Maltitol	4,00±0,52	4,00±0,73	4,19±0,54	3,88±0,34	3,63±0,72	3,69±0,7	3,63±0,62
Miód	4,25±0,45	4,68±0,5	4,38±0,5	3,63±0,5	4,38±0,5	4,38±0,5	4,68±0,5

Źródło: Opracowanie własne.

Ocena organoleptyczna wykazała, że większość alternatyw cukru białego nie wpłynęło znacząco na badane przez oceniających cechy, tj.: barwę, smak czy wygląd. Czekoladki uzyskiwały oceny dobre (>3,5 punktów). Substancją słodzącą, która została oceniona najniżej, była stewia. Ta alternatywa cukru w niektórych przypadkach uzyskała oceny niższe niż 3. Wygląd powierzchni dolnej oraz górnej to cecha, która uży-

skała najczęściej 4 i 5 punktów, co wskazuje na niewielki wpływ substancji słodzących na tę cechę produktu oraz odpowiednio przeprowadzone temperowanie masy czekoladowej. Gładkość oraz twardość czekoladek były najniżej ocenione, co mogło być spowodowane domowymi warunkami ich przygotowania, przez co pełne rozpuszczenie substancji słodzącej w tłuszczu kakaowym było utrudnione. Do pełnego rozpuszczenia cukru w tłuszczu stosuje się specjalne maszyny tzw. konsze, które mechanicznie mieszają substancje i pozwalają osiągnąć właściwą gładkość. Pomimo wcześniejszego mielenia substancji słodzących, wewnątrz przygotowanych czekoladek tworzyły się grudki, co miało wpływ na niższe oceny. Substancją słodzącą, której dodanie do czekoladek spowodowało, że przyznawane oceny były najwyższe, był miód. Mogło to być spowodowane tym, że najlepiej mieszał się z kakao oraz masłem kakaowym.

W celu zmierzenia parametrów barwy czekoladek przeprowadzono instrumentalną analizę barwy. Wyniki zostały przedstawione w tabeli 2. Parametr L^* wskazuje na jasność barwy badanej próbki (Molenda i in. 2012). Z przebadanych czekoladek najjaśniejszą barwą charakteryzowały się te z dodatkiem tagatozy (23,21%). Bardzo podobny wynik otrzymał w swoich badaniach Shourideh i in. (2012). W przytoczonych badaniach autor wykazał, że wartość parametru L^* czekoladek z dodatkiem tagatozy wynosiła 22,18%. Najciemniejsze pod względem barwy okazały się czekoladki z ksylitolem ($L^*=18,96\%$). Badania przeprowadzone przez Martynow (2018), w których użyto czekoladek kupionych w sklepie, m.in. z ksylitolem wykazały, że parametr L^* dla czekolady z ksylitolem wynosił 33,08–37,13%. Zauważalna różnica pomiędzy badaniami może wynikać ze składu, bądź sposobu przygotowania czekolad.

Parametr a^* wskazuje na udział barwy zielonej przy wartości ujemnej, zaś przy wartości dodatniej wskazuje na udział barwy czerwonej na badanej powierzchni produktu (Molenda i in. 2012). W przeprowadzonych badaniach wszystkie wartości parametru a^* wskazały na udział barwy zielonej. Największy udział zauważono w czekoladkach z miodem (-21,45). Odwrotny wynik uzyskali w swoich badaniach Bhardwaj i in. (2021), w których to wartość parametru a^* wynosiła 2,97. Tak ogromna różnica mogła wynikać ze składu recepturowego, rodzaju miodu użytego do sporządzenia czekolady, ale także warunków pomiaru. Najmniejszy udział barwy zielonej oznaczono w czekoladkach z dodatkiem cukru kokosowego (-16,83). W badania Saputro i in. (2017) otrzymano także odmienne wyniki w porównaniu do tych uzyskanych w niniejszej pracy. Cytowane badania wykazały, że czekoladki z dodatkiem cukru kokosowego wykazują dodatnie wartości parametru a^* .

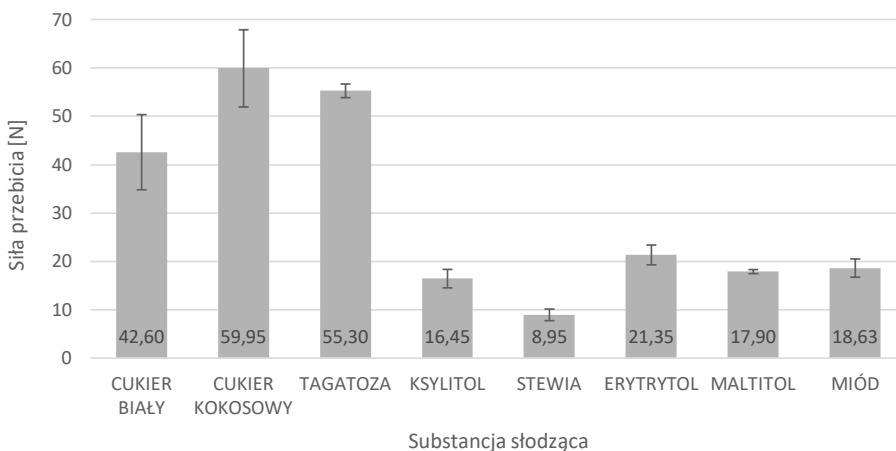
Dodatnie wartości parametru b^* wskazują na udział barwy żółtej, zaś ujemne na udział barwy niebieskiej (Molenda i in. 2012). Otrzymane wyniki potwierdziły we wszystkich badanych rodzajach czekoladek udział barwy żółtej. Największy udział barwy żółtej zauważono w przypadku czekoladek z dodatkiem erytrytolu, zaś najmniejszy w barwie czekoladek z ksylitolem.

Tabela 2. Parametry barwy powierzchni badanych czekoladek deserowych**Table 2. Color parameters of the tested chocolates surfaces**

Substancja słodząca	Parametry barwy		
	L* [%]	a* [-]	b* [-]
Cukier biały	22,65 ± 4,48	-17,33 ± 4,98	27,35 ± 3,15
Cukier kokosowy	21,36 ± 2,59	-16,83 ± 3,81	28,36 ± 2,22
Tagatoza	23,21 ± 5,47	-18,1 ± 4,57	27,01 ± 3,89
Ksylitol	18,96 ± 2,83	-19,78 ± 2,81	25,81 ± 2,98
Stewia	19,25 ± 2,06	-17,71 ± 4,34	26,78 ± 2,41
Erytrytol	22,91 ± 1,77	-19,84 ± 3,07	30,88 ± 1,81
Maltitol	20,86 ± 2,02	-19,98 ± 1,86	28,59 ± 2,3
Miód	19,88 ± 0,87	-21,45 ± 1,68	27,46 ± 1,03

Źródło: Opracowanie własne.

Na podstawie wyników oceny barwy w modelu CIEL*a*b* możliwe było wyznaczenie całkowitej różnicy barw (ΔE). Ten parametr pozwala wskazać, czy różnica pomiędzy dwiema badanymi próbkami jest np. widoczna dla oka ludzkiego. Wyniki porównania barwy wszystkich czekoladek przedstawiono w tabeli 3. Stwierdzono, że największa różnica w barwie wystąpiła pomiędzy czekoladkami z erytrytolem i czekoladkami z ksylitolem oraz stewią (bardzo duża różnica), najmniejsza zaś różnica była między czekoladkami z cukrem białym i czekoladkami z tagatozą. Ponadto, zbliżoną barwę do czekoladek z cukrem białym miały czekoladki z cukrem kokosowym.

**Rysunek 2. Porównanie twardości badanych czekoladek****Figure 2. Comparison of the hardness of the tested chocolates**

Źródło: Opracowanie własne.

Tabela 3. Całkowita różnica barwy (ΔE) wyznaczona pomiędzy czekoladkamiTable 3. the total difference in color (ΔE) between the chocolates

Substancja słodząca	Cukier biały	Cukier kokosowy	Tagatoza	Ksylitol	Stewia	Erytrytol	Maltitol	Miód
Cukier biały								
Cukier kokosowy	1,72							
Tagatoza	1,02	2,63						
Ksylitol	4,69	4,58	4,73					
Stewia	3,47	2,78	3,99	2,30				
Erytrytol	4,35	4,22	4,26	6,43	5,90			
Maltitol	3,43	3,19	3,40	3,37	3,33	3,08		
Miód	4,97	4,93	4,74	2,52	3,86	4,84	2,10	

Źródło: Opracowanie własne.

Powyższe warianty, tj. z tagatozą i cukrem kokosowym, nieistotnie różniły się barwą w porównaniu do czekoladek z cukrem białym.

Na rysunku 2 porównano wyniki użycia siły potrzebnej do przebicia czekoladek. Stwierdzono, że największą twardością charakteryzowały się czekoladki z cukrem kokosowym, dla których siła przebijania wynosiła 59,95 N. W badaniach przeprowadzonych przez Saputro i in. (2016) do przebicia czekoladek z cukrem kokosowym była potrzebna siła o wartości 15 N. Najmniejszą siłę do przebicia trzeba było użyć w przypadku czekoladek z dodatkiem stewii; wyniosła ona 8,95 N. W badaniach Vahedi i Mousazadeh (2016) twardość czekoladek ze stewią była większa, a do ich przebicia siła wyniosła 23,3 N. Taka duża różnica pomiędzy wynikami literaturowymi a prezentowanymi w niniejszej pracy mogła być spowodowana różnicą pomiędzy badanymi substancjami słodzącymi i/lub sposobem przygotowania czekoladek.

Podsumowanie

1. Zastąpienie cukru białego innymi substancjami słodzącymi wpłynęło na cechy jakościowe czekoladek deserowych, takie jak barwa, twardość, wygląd, smak i zapach.
2. Przeprowadzona ocena organoleptyczna wskazała na gorsze cechy czekoladek ze stewią i ksylitolem. Pozostałe zamienniki cukru białego nie pogorszyły cech organoleptycznych czekoladek.
3. Zdaniem potencjalnych konsumentów, najlepszymi cechami, zwłaszcza smakiem i zapachem, wyróżniały się czekoladki z miodem oraz z tagatozą.
4. Pod względem parametrów barwy, czekoladki z tagatozą oraz z cukrem kokosowym okazały się najbardziej zbliżone do tradycyjnych czekoladek z cukrem białym natomiast wprowadzenie do receptury miodu oraz ksylitolu spowodowało największą zmianę barwy czekoladek.
5. Cukier kokosowy oraz tagatoza okazały się dobrymi zamiennikami cukru białego również ze względu na nadawanie czekoladkom odpowiedniej twardości. Pozostałe substancje słodzące znacznie zmniejszyły twardość czekoladek w temperaturze pokojowej, co wskazuje na ich łatwe topienie się w dłoniach. Najbardziej miękkie okazały się czekoladki ze stewią.

Literatura

- Aguilar-Villa C., Acosta-Otalvaro E. V., Rodriguez-Sandoval E., Mazo-Rivas J. C. 2020. Sucrose-free milk chocolate manufacture using bulking agents and a non-caloric sweetener. *Food Sci. Technol.*, 40(1): 62-67.
- Bhardwaj D., Yadav B. S., Yadav R. B., Dangi N. 2021. The effect of substituting cocoa and conventional sugar with carob powder and honey respectively on the physicochemical, rheological and sensory properties of dark chocolate. *Carpath. J. Food Sci. Technol.*, 13(1): 145-160.
- Dyrektywa 2000/36/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 23 czerwca 2000 r. odnosząca się do wyrobów kakaowych i czekoladowych przeznaczonych do spożycia przez ludzi.
- Grembecka M. 2015. Natural sweeteners in a human diet. *Rocz. Państw. Zakł. Hig.*, 66(3): 195-202.
- Kowalska J., Majewska E., Jakubowska P. 2011. Wpływ czasu i temperatury przechowywania na właściwości organoleptyczne i stabilność tłuszczu w czekoladach pełnomlecznych. *Bromat. Chem. Toksyk.*, 44(3): 512-516.
- Martynow K. 2018. Wpływ zamienników cukru na cechy fizykochemiczne czekolad obecnych na rynku polskim. Monografia XLVII „Koła Naukowe – Szkoła Twórczego Działania”, Nauki Rolnicze i Weterynaryjne cz.2, ABADA, Olsztyn, 88-98.
- Molenda J., Wrona M., Siwiec E. 2012. Zastosowanie modelu CIE Lab w badaniach barwy lotnych popiołów, 3: 177-187.
- O'Brien-Nabors L. 2012. *Alternative sweeteners*. CRC Press Inc., Boca Raton, 1-10.
- Pastuszek W. 2000. *Barwa w grafice komputerowej*, Warszawa, 51-59.
- PN-A-88102, 1998. *Wyroby cukiernicze – Czekolada*. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa.
- Richardson A. M., Tyuftin A. A., Kilcawley K. N., Gallagher E., O'Sullivan M. G., Kerry J. P. 2018. The impact of sugar particle size manipulation on the physical and sensory properties of chocolate brownies. *Food Sci. Technol.*, 95: 51-57.
- Saputro A., Van de Walle D., Aidoo R. P., Mensah M. A., Delbaere C., de Clercq N., van Durme J., Dewettinck K. 2017. Quality attributes of dark chocolates formulated with palm sap-based sugar as nutritious and natural alternative sweetener. *Eur. Food Res. Technol.*, 243(2): 177-191.
- Shourideh M., Taslimi A., Azizi M. H., Mohammadifar M. A. 2012. Effects of D-tagatose and inulin on some physicochemical, rheological and sensory properties of dark chocolate. *Int. J. Biosci. Biochem. Bioinforma.*, 2(5): 314-319.
- Skrajda M., Dąbrowski G. 2015. Czekolada jako źródło związków bioaktywnych oddziałujących na organizm. *J. Educ. Health Sport*, 5(9): 429-442.
- Świąder K. 2010. Substancje intensywnie słodzące w świetle aktualnych przepisów prawnych. *Postępy Tech. Przetw. Spoż.*, 20/36(1): 100-105.
- Tańska M., Roszkowska B., Czapllicki S., Borowska E. J., Bojarska J., Dąbrowska A. 2016. Effect of fruit pomace addition on shortbread cookies to improve their physical and nutritional values. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 71(3): 307-313.
- Vahedi H., Mousazadeh M. 2016. The effect of using stevia and agave nectar as a substitute for sucrose on physical, chemical, rheological and sensory properties of dark chocolate. *Der Pharmacia Lettre*, 8(15): 194-201.

Abstract

EFFECT OF WHITE SUGAR ALTERNATIVES ON CHOCOLATE QUALITY

The most popular sweetener in food is white sugar, but its consumption negatively affects health. Natural sweeteners are less caloric, and most of them are not a nutrient for bacteria and promotes the health of teeth.

The aim of the work was to check the impact of substituting white sugar with other sweeteners on selected physical and organoleptic characteristics of chocolates. Measurements of color parameters using digital image analysis and hardness using Instron apparatus, as well as organoleptic assessment on a 5-point scale were carried out. Chocolates were made of cocoa butter, cocoa and sweetener (white sugar, coconut sugar, tagatose, xylitol, stevia, erythritol, maltitol or honey), tempered and cooled.

It was found that the replacement of white sugar with other sweeteners affects chocolate hardness and color. An assessment team also noticed differences between chocolates in terms of aroma, taste, appearance and consistency. The best features, especially the taste and smell, characterized chocolates with honey and tagatose. In addition, the chocolates with tagatose and coconut sugar had similar color and hardness compared to traditional chocolate.

Keywords: sweeteners, chocolate, organoleptic characteristics, color model, hardness

Słowa kluczowe: substancje słodzące, czekolada, cechy organoleptyczne, model barw, twardość

Marcelina Kreczman, Kacper Biernat, Artur Kowalicki

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski

Studenckie Koło Naukowe Towaroznawczej Oceny Sensorycznej

Opiekun: dr inż. Marta Czarnowska-Kujawska

ZAFALSZOWANIA MIODÓW DOSTĘPNYCH NA RYNKU

Wstęp

Historia fałszowania miodu wbrew pozorom nie jest krótka. Pierwsze zafałszowania na większą skalę pojawiły się w latach 70. XX wieku, kiedy przemysł wprowadził do *użycia* wysokofruktozowy syrop kukurydziany. Miód fałszuje się z kilku powodów, a najczęstszym z nich jest obniżenie kosztów produkcji, poprzez rozcieńczenie go innym syropem. Dodatkowo, zwiększenie poziomu fruktozy zapobiega krystalizacji glukozy, co z punktu widzenia konsumenta może być bardziej pożądane od krystalizującego się miodu. To właśnie cukry są głównymi składnikami miodu (60,7–77,8%), dominują monosacharydy – glukoza oraz fruktoza, które stanowią około 85–95% wszystkich cukrów (Pilizota, Tiban 2009).

Fałszowanie zazwyczaj odnosi się do mieszania naturalnego produktu z gorszą jakościowo i często szkodliwą substancją, na przykład z cukrem inwertowanym, który powoduje intensywny wzrost poziomu glukozy we krwi oraz negatywnie wpływa na układ trawienny. Pokusa zysku finansowego jest wysoka i niestety fałszowanie miodu stanowi poważny problem, który wynika również z niejasnych regulacji prawnych. W całej tej sprawie tracą przede wszystkim uczciwi pszczelarze oraz nieświadomi konsumenci, a na rynku można zaobserwować działania wynikające z nieuczciwej konkurencji (Fakhlaei i in. 2020).

Cel

Celem pracy była analiza oraz przybliżenie problemu zafałszowań miodu w kraju i na świecie oraz przegląd metod wykrywania zafałszowań i potwierdzania autentyczności miodu z użyciem nowoczesnych technik analizy instrumentalnej.

Materiał i metody

Przegląd piśmiennictwa w zakresie zafałszowania miodów, w oparciu o dostępne i aktualne dane literaturowe oraz statystyczne, publikowane w ostatnich latach w Polsce i za granicą. Następnie dane te zestawiono i porównano ze sobą w celu zobrazowania skali problemu.

Wyniki i dyskusja

1. Wyróżniki jakości miodów

Właściwości fizykochemiczne miodu są ważnym wskaźnikiem ich jakości i pochodzenia. Cechy fizykochemiczne zależą od rodzaju kwiatów nektarodajnych, jak również od lokalnych praktyk pszczelarskich i środowiskowych zmian klimatycznych. Główne kryteria jakości, według Rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 3 października 2003 roku, to: zawartość wody, zawartość fruktozy i glukozy, zawartość sacharozy, przewodność właściwa, zawartość substancji nierozpuszczalnych w wodzie oraz wolnych kwasów organicznych, liczba diastazowa i zawartość 5-hydroksymetylofurfuralu (HMF). Pszczoły, poprzez odpowiednią wentylację i ruch skrzydeł, odparowują wodę z surowca umieszczonego w plastrach. Widoczną oznaką, że ten proces się zakończył, jest zasklepienie miodu poprzez pokrycie komórek cienką warstwą wosku.

Zawartość wody, wedle zapisów rozporządzenia, nie powinna przekraczać np. w miodzie wrzosowym 23%. Sumaryczna zawartości fruktozy i glukozy powinna plasować się na poziomie nie mniejszym niż 60 g/100 g w miodach nektarowych oraz 45 g/100 g w miodach spadziowych i spadziowo-nektarowych. Przyjętą normą dla zawartości sacharozy jest limit 5 g/100 g z wyjątkami, jak np. miód z suchodrzewu – 10 g/100 g, czy miód z lawendy – 15 g/100 g. Wynik badania laboratoryjnego zawartości substancji nierozpuszczalnych w wodzie nie powinien przekraczać 0,1 g/100 g oraz 0,5 g/100 g dla miodu wytlóconego. Parametr przewodności elektrycznej właściwej nie jest określany dla miodów pochodzących z drzewa truskawkowego, wrzośca, eu-

kaliptusa, lipy, wrzосу pospolitego i drzewa herbacianego. Rozporządzenie szczegółowo podaje spodziewane wartości przewodności dla różnych rodzajów miodu oraz ich mieszanek, podobnie jeżeli chodzi o wyniki oznaczenia zawartości wolnych kwasów czy liczby diastazowej według skali Schade. Z kolei zawartość 5-hydroksymetylofurfuralu nie może przekraczać 40 mg/kg, z wyjątkiem miodów pochodzących z regionów tropikalnych 80 mg/kg. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14 stycznia 2009 roku w sprawie metod analiz związanych z dokonywaniem oceny miodu, wyróżnia także analizy w zakresie oznaczania zawartości jednego z aminokwasów, proliny, a także udział pyłku przewodniego w miodzie.

W pracy Puścion-Jakubik i Borawskiej (2016), opisującej badania nad pyłkami głównymi i towarzyszącymi, zawarte są wyniki analiz 45 polskich naturalnych miodów. Bliżko 36% badanych prób było błędnie sklasyfikowanych przez pszczelarzy pod względem zawartości pyłku przewodniego, co może wprowadzać konsumenta w błąd. Jak wynika z najnowszych danych Inspekcji Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych z marca 2021 roku, aż 7 z 35 badanych partii miodu zostało zakwestionowanych. Wątpliwości dotyczyły pochodzenia botanicznego miodów odmianowych, w których nie wykazano przewagi pyłku przewodniego wskazującego na konkretną odmianę. Przeprowadzono również badania na miodach wielokwiatowych z deklaracją polskiego pochodzenia, w których wykazano obecność ziaren pyłku roślin niewystępujących na terenie naszego kraju (Serwis Rzeczypospolitej Polskiej 2021).

2. Problemy autentyczności miodu

Autentyczność miodu jest kwestią poruszaną coraz częściej na rynku polskim, europejskim czy światowym. Standaryzacją miodu w handlu zajęły się Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa oraz Światowa Organizacja Zdrowia, które stworzyły Codex Alimentarius. Rynek unijny regulowany jest dyrektywą Rady Europejskiej 2001/110/WE z dnia 20 grudnia 2001 roku. Polska zobligowana jest do uwzględnienia standardów unijnych artykułem 37 Traktatu ustanawiającego Wspólnotę Europejską. Regulacje Codex Alimentarius są dobrowolne, lecz służą w wielu krajach jako podstawa do stanowienia norm krajowych. Dokumentami szczególnie istotnymi w Polsce jest Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14 stycznia 2009 roku w sprawie metod analiz związanych z dokonaniem oceny miodu oraz Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 3 października 2003 roku w sprawie szczegółowych wymagań w zakresie jakości handlowej miodu. Wszystkie wspomniane uregulowania precyzują podstawowe parametry jakościowe, które świadczą o pochodzeniu i jakości miodu.

Podczas, gdy konsument może dokonać oceny organoleptycznej, laboratoria zajmują się analizami konkretnych parametrów, takich jak np. zawartość wody, cukrów prostych, analiza pyłków. Miód kojarzy się konsumentom jako żywność wysokiej jakości,

przez co jest bardziej narażony na zafałszowania. Nieodpowiednie oznakowanie, nie-
dozwolone domieszki miodów gorszej jakości lub dodatki cukrów i innych substancji
często służą większym zyskom finansowym pośredników. To z kolei negatywnie wpły-
wa na konsumentów, którzy przepłacają za produkt gorszego gatunku i nie otrzymują
pozytywnie wpływającego na zdrowie produktu. Zapisy w Codex Alimentarius z roku
2019 wskazują, że konsument ma prawo do prawdziwej informacji o żywności, którą
spożywa. Miód powinien być wolny od dodatkowych składników, obcej materii, ob-
cego zapachu i aromatu, skażeń powstałych podczas transportu i przechowywania.
Usuwanie wybranych składników miodu, np. pyłków poprzez filtrację, dopuszczalne
jest tylko w przypadku, gdy nie można tego uniknąć przy eliminacji obcej materii. Po-
nadto miód nie powinien być podgrzewany lub poddawany zabiegom, które zmieniają
jego kompozycję i wpływają na jakość (Codex Alimentarius 2019).

Problem autentyczności miodu dotyczy szczególnie produktów importowanych,
których jakość najczęściej budzi zastrzeżenia. Produkty importowane często nie pod-
legają całkowitej kontroli państwa, do którego są sprowadzane, co skutkuje różnicą
jakości miodu importowanego w porównaniu do krajowego. Kraje, z których głównie
jest sprowadzany miód do Polski to Ukraina oraz Chiny. Udział miodu importowane-
go z tych dwóch państw stanowi aż 82% ogółu importowanego miodu i jest to wynik
niskiej ceny skupu w tych krajach, kolejno 1,5 i 1,3 EUR/ kg. Dla porównania, średnia
cena skupu w Europie wynosi ok. 1,8 EUR/ kg (Semkiw 2020). Na tak niską cenę ma
wpływ, m.in., dodatek syropów cukrowych oraz nadmierne dokarmianie pszczół sa-
charozą (Dhingra 2020).

W 2020 r. ekologiczna organizacja „Honey Authenticity Project” przeprowadziła
badania na 13 brytyjskich miodach i żaden z nich nie był w 100% naturalny, mimo
wyraźnej deklaracji producentów. Zafałszowania dotyczyły między innymi obecności
barwnika E150, który nadaje kolor karmelowy, glicerolu, dodatku cukrów czy zbyt
niskiej zawartości proliny, co jest spowodowane mieszaniami produktu naturalnego
z syropami cukrowymi. Założeniem było zakupienie tanich, ogólnodostępnych pro-
duktów oznaczonych jako „miód”. Zakupu dokonano w marcu 2020 r. w czterech róż-
nych miastach, a próbki dostarczono do laboratorium w Langenzenn w Niemczech.
Wyniki badań zostały dostarczone cztery miesiące później. Niestety publikacja wyni-
ków nie spowodowała wycofania produktów ze sprzedaży, czy nawet zmiany etykiety
wprowadzającej konsumenta w błąd (Arturo, Sanchez 2020). Wspomniana organizacja
od 3 lat publikuje wyniki testów przeprowadzanych na miodach sprzedawanych w zna-
nych marketach spożywczych, jednak problem z zafałszowaniem pozostaje niezmienny.

Badania przeprowadzone w Polsce przez Sykut i in. (2018) opierały się na wyko-
rzystaniu powszechnie znanych metod oceny jakości i zafałszowań miodów, takich
jak: badanie zawartości wody, kwasowości ogólnej, zanieczyszczeń mechanicznych,
obecności skrobi czy ocena zafałszowania sacharozą. W tym przypadku materiał do
badań stanowiły nie miody zakupione w sieciach handlowych, ale od regionalnych
pszczelarzy. Uzyskane wyniki potwierdziły, że analizowane miody: lipowy – kupiony

od prywatnego pszczelarza posiadającego pasiekę na Podlasiu, wrzosowy – z gospodarstwa pasiecznego „Sądecki Bartnik”, akacjowy – z Bielsko-Białej oraz ze spadzi iglastej z Roztoczańskiego Związku pszczelarzy, odbiegają od norm wyłącznie pod kątem ilości zanieczyszczeń mechanicznych, których obecność może być spowodowana zanieczyszczeniem środowiska naturalnego, z którego te miody pochodziły. Uzyskane wyniki są korzystne dla rzetelnych producentów, zwłaszcza, że wielu konsumentów w Polsce kupuje miody od sprawdzonych, regionalnych dostawców, często prosto z pasiek. Konsumenty wybierają te produkty zamiast tańszych i często nieznannej, gorszej jakości miód dostępnych powszechnie w sieciach handlowych.

3. Metody fałszowania miodu

Substancjami zafałszowującymi są wszelkie substancje, które są dodawane do oryginalnego i czystego produktu. Przykładem są cukry, które mogą być wykorzystywane na trzy sposoby: fałszowanie bezpośrednie, pośrednie i mieszane, inaczej nazwane blendowaniem. Najczęstszymi substancjami cukrowymi, *używanymi do zafałszowań miodu*, są wysokofruktozowy syrop kukurydziany (HFCS), syrop z cukru kukurydzianego (COSS), syrop z cukru inwertowanego (ISS) oraz syrop z cukru trzcinowego (CASS). Substancje, którymi fałszuje się miód, zmieniają się wraz z regionami świata. Na przykład w Turcji często wykorzystuje się domieszki syropu pszennego, a w Europie bardzo często syrop inulinowy o wysokiej zawartości fruktozy (HFIS). Z kolei w Etiopii w miodach wykryto dodatki wody, pszenicy czy też mąki (Fakhlai i in. 2020).

Bezpośrednie fałszowanie miodu zwykle jest wykonywane przez dodanie do niego konkretnej ilości substancji fałszującej, najczęściej syropu sacharozowego. Źródłem tego syropu mogą być buraki cukrowe, syrop maltozowy lub przemysłowe syropy cukrowe, takie jak glukoza i fruktoza, otrzymane z obróbki termicznej lub enzymatycznej skrobi. Producenci stosują tę metodę w celu zwiększenia smakowitości oraz objętości gotowego produktu (Fakhlai i in. 2020). Z kolei pośrednie zafałszowanie miodu polega na dokarmianiu pszczół syropami cukrowymi oraz innymi substancjami chemicznymi, w tym lekami. Składniki te przedostają się do wytwarzanego przez owady miodu i mogą mieć negatywny wpływ na zdrowie osób go spożywających. Blendowanie polega na mieszaniu czystego i wysokiej jakości miodu z innym, tańszym i uboższym w składniki mineralne, czy nawet produktem syntetycznym, przygotowanym na bazie syropów cukrowych. Na przykład w Chinach i Wenezueli znanym nadużyciem w branży pszczelarskiej jest mieszanie, dla zwiększenia zysku, drogiego miodu akacjowego z tańszym miodem rzepakowym. Jasno bursztynowy kolor miodu rzepakowego jest podobny do żółtawej barwy miodu akacjowego, dzięki czemu oszuści sprzedają miód rzepakowy oznakowany jako akacjowy po dużo wyższej cenie (Fakhlai i in. 2020).

4. Metody wykrywania zafałszowań

Fałszowanie miodu cukrami czy też innymi substancjami zmienia jego właściwości chemiczne i biochemiczne, takie jak aktywność enzymatyczna, przewodnictwo elektryczne i zawartość określonych związków (Fakhlaei i in. 2020). W oparciu o te zmiany opracowano różnorodne metody wykrywania dodatków czy zastosowanych procesów w trakcie produkcji miodu. Ze względu na rozwijający się dynamicznie rynek zafałszowań i technologii do tych celów wykorzystywanych, sposoby pozwalające na ich wykrywanie – w tym nowoczesne metody analizy instrumentalnej – muszą być stale doskonalone.

Jedną z metod, pozwalającą na wykrycie czy miejsce pochodzenia miodu jest zgodne z podanym na etykiecie, jest analiza pyłkowa. Polega ona na dokładnym przebadaniu próbki miodu pod mikroskopem i określeniu zawartości oraz rodzaju obecnych w nim pyłków kwiatowych. Analiza ta jest możliwa dzięki występującym znaczącym różnicom pomiędzy poszczególnymi pyłkami danych gatunków roślin. Na przykład w sytuacji, w której miód został zafałszowany poprzez dodatek syropu cukrowego, w badanej próbce jest istotnie mniej pożądanego pyłku kwiatowego (Hodujko 2016).

Do wykrywania zafałszowań polegających na zmianie naturalnego składu miodu stosuje się badania fizykochemiczne, w tym metodę z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem refraktometrycznym (HPLC-RID), która pozwala na wykrycie obecności syropu z sacharozy i określenie rodzaju lub odmiany miodu. W miodach spadziowych wykrywany jest cukier spadziowy – melecycotoza, a stosunek zawartości fruktozy do glukozy jest najczęściej wyższy niż w miodach nektarowych. Wyższa zawartość fruktozy jest także charakterystyczna dla miodu pozyskanego z robinii akacjowej, dlatego nawet przez kilka miesięcy miód ten charakteryzuje się płynną konsystencją. W miodzie rzepakowym przeważa glukoza, co powoduje jego krystalizację (Hodujko 2016). Do wykrywania dodatków cukrowych korzysta się z oznaczeń wykonanych przy użyciu spektrometru, który pozwala na określenie zawartości proliny – naturalnie występującego aminokwasu w miodzie. Jego minimalna zawartość powinna wynosić 25 mg na 100 g produktu (Hodujko 2016).

Analiza izotopów węgla to kolejna z metod, jedna z bardziej zaawansowanych, pozwalająca na identyfikację zafałszowań syropami glukozowo-fruktozowymi i cukrowymi otrzymanymi z cukru trzcinowego. Określenie stosunku izotopów węgla ^{13}C do ^{12}C jest możliwe dzięki spektrometrii masowej. Stosunek ten jest odmienny u roślin jednoliściennych, takich jak kukurydza czy trzcina cukrowa i dwuliściennych – nektarodajnych. Stosunek izotopów węgla w miodzie jest stały, a jego wartość powyżej 23,5‰ świadczy o zafałszowaniu. Określenie tego stosunku pozwala stwierdzić, czy miód zawiera syropy otrzymane z trzciny cukrowej, skrobi zbożowej i kukurydzianej, ponieważ parametr ten jest odmienny od cukru zawartego w nektarze roślin miododajnych (Kowalski, Łukasiewicz 2018).

Innym sposobem potwierdzenia autentyczności miodu jest wskaźnik enzymatycznej aktywności miodu, zwany liczbą diastazową. Jednym z biologicznych składników miodu

du są enzymy pochodzące z gruczołów ślinowych pszczół, do których należą głównie inwertaza i diastaza. Obniżona aktywność tych enzymów wskazuje na dodatek cukru inwertowanego, podgrzanie produktu czy przechowywanie zbyt długo w nieodpowiednich warunkach. Liczba diastazowa jest wyrażana w jednostkach Schade na 1 g miodu. Jednostka Schade to taka aktywność diastazy, która przekształca 0,01 g skrobi w temperaturze 40°C do określonego punktu końcowego w czasie jednej godziny. Liczba diastazowa nie powinna być niższa niż 8 jednostek. Miody dobrej jakości posiadają wysoką aktywność enzymatyczną, a ich liczba diastazowa jest często wyższa od 20 (Hodujko 2016).

Z kolei obecność sztucznych dodatków skrobiowych można wykryć dzięki badaniu aktywności enzymów β -fruktofuranazy oraz β - i γ -amylazy, które są wykorzystywane w procesie produkcji syropów ze skrobi. Producenci, w celu ukrycia aktywności powyższych enzymów, podgrzewają gotowy produkt, co powoduje ich dezaktywację i niemożliwość wykrycia tą metodą (Hodujko 2016).

Kolejnym skutecznym sposobem wykrycia zafalszowania miodu jest wykorzystanie parametru przewodności elektrycznej właściwej, który pozwala na rozróżnienie miodu nektarowego od spadziowego oraz wykrycie dodatku syropu cukrowego. Do oznaczenia przewodności właściwej miodu wykorzystuje się metodę konduktometryczną, która polega na pomiarze przewodności elektrolitów, która zmienia się wraz ze zmianą stężenia jonów. W przypadku obniżonej przewodności elektrycznej właściwej, która świadczy o niewielkiej ilości związków mineralnych i kwasów, można stwierdzić, iż miód zawiera celowo dodany syrop cukrowy (Hodujko 2016).

Metody wykrywania zafalszowań miodu muszą być nieustannie rozwijane i doskonalone. Producenci praktykują coraz trudniejsze do wykrycia sposoby fałszowania miodu, które umożliwiają im zwiększenie dochodu. Z tego powodu próbki miodu, przeznaczone do oceny potwierdzającej ich autentyczność, są badane przy wykorzystaniu różnych dostępnych metod, co pozwala na skuteczne wykrycie prawie wszystkich niezgodności w odniesieniu do informacji podanych na etykiecie produktu.

5. Regulacje prawne dotyczące oznakowania miodów

Fałszowanie na polskim i światowym rynku miodów jest zjawiskiem powszechnym. Warto dodać, że znaczna część zafalszowań miodu dotyczy ich niewłaściwego oznakowania. Na wielu etykietach „tanich” miodów kupowanych w popularnych marketach można przeczytać, iż produkt jest mieszanką miodów pochodzących z UE i spoza UE. Jest to niekonkretna informacja, która wprowadzała konsumentów w błąd i wynikała z luki w przepisach prawa żywnościowego.

W 2020 r. Polska oraz 15 innych państw członkowskich złożyły do Komisji Europejskiej postulat odnoszący się do tej sprawy. Aby zaradzić sytuacji potrzebne było dokładne sprostowanie regulacji prawnych. W trakcie posiedzenia Rady ds. Rolnictwa

i Rybołówstwa Komisji Europejskiej w 2019 roku zaproponowano obowiązek umieszczenia na opakowaniu dokładnej informacji o kraju pochodzenia miodu oraz mieszanek miodów (Styczyński 2020).

W ostatnim roku Inspekcja Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych przeprowadziła kontrolę jakości handlowej miodu i produktów wytworzonych na bazie miodu. Łącznie przebadano 72 podmioty, w tym 39 producentów i 33 sklepy. Zweryfikowano oznakowanie 120 partii (114 partii miodu i 6 partii produktów na bazie miodu), a wynikiem były nieprawidłowości stwierdzone aż w 35 partiach. Uchybienia dotyczyły: nazw sugerujących odmianę, deklarowania nieprawidłowej odmiany, braku obowiązującej informacji o pochodzeniu, danych identyfikujących producenta, informacji o dacie minimalnej trwałości, warunkach przechowywania i ilości nominalnej (Serwis Rzeczypospolitej Polskiej 2021). Przeprowadzona kontrola pokazała skalę problemu zafałszowań w zakresie nieprawidłowego znakowania miodów.

6. Rynek miodu na świecie

Wprowadzanie na rynek sztucznego, taniego miodu staje się, ze względu na dotkliwe różnice w cenie, istotnym zagrożeniem dla pszczelarzy, którzy dbają o zdrowie pszczół i jakość miodu. Import miodu do Europy, w tym również do Polski, jest konieczny ze względu na zbyt wysoki popyt w stosunku do podaży. Pomimo promowania zdrowego stylu życia i zwiększania świadomości konsumentów odnośnie wyróżników jakości produktów spożywczych, w tym miodu, problem z importowanym zafałszowanym miodem jest faktem. Czynnikiem mającym największy na to wpływ jest cena – miody importowane są tańsze od krajowych (Tamma 2020).

Największymi producentami miodu na świecie są Chiny – 502 614 ton, Unia Europejska – 237 549 ton oraz Turcja – 105 532 ton rocznie. Unia Europejska jest również największym importerem miodu, głównie kupuje miód z Chin, Ukrainy, Argentyny i Meksyku (PE, Rynek miodu w Unii Europejskiej, rok 2016). Od 2000 do 2014 roku produkcja chińskiego miodu wzrosła o 88%, jednak w tym samym czasie liczba rodzin pszczelich wzrosła jedynie o 21%. Chińscy pszczelarze, tak samo jak pochodzący z innych krajów, w tym z Polski, borykają się z problemem zatrucia pszczół pestycydami czy utratą siedlisk z powodu urbanizacji. Skoro wydajność produkcji nie wzrosła proporcjonalnie do wielkości produkcji, nasuwa się pytanie skąd pochodzi miód, który jest rozprowadzany na cały świat. Odpowiedzią jest chińska metoda produkcji, na przykład zbieranie niedojrzałego miodu i suszenie. W celu zamaskowania pochodzenia, pyłki zostają usunięte przez filtrowanie, dzięki czemu analiza pyłkowa nie daje wiarygodnych wyników. Sposób ten jest nadużyciem, a uzyskany produkt nie spełnia wymagań dotyczących miodu (Tamma 2020).

Podsumowanie

W obliczu problemów, z jakimi zmagają się polskie pszczelarstwo, w tym zafałszowania i nieuczciwa konkurencja, konieczne jest podjęcie działań odnośnie ochrony pszczół i pomocy pszczelarzom. Nie ulega wątpliwości, jak ważną rolę dla środowiska oraz gospodarki odgrywają pszczoły. W tym celu konieczne jest wsparcie finansowe, promocja regionalnych, certyfikowanych miodów oraz zaostrzenie regulacji w zakresie obecności w miodzie szkodliwych substancji, w tym pestycydów, które powodują wymieranie rodzin pszczelich przez ich zatrucie. Niezbędne jest także doprecyzowanie międzynarodowego prawa definiującego naturalny miód i wyróżniki jego jakości, jak również zwiększenie możliwości instytucji sprawujących kontrolę nad handlem miodem, w celu skutecznego zwalczania zafałszowań miodu i produktów na bazie miodu. Pozwoli to na lepszą współpracę oraz komunikację poszczególnych krajów, w celu zapobiegania nieuczciwym praktykom producentów i ich pośredników.

Literatura

- Arturo L., Sanchez C. 2020. Honey Authenticity Project. Huge honey fraud leaves bees helpless. https://www.honeyap.org/files/Document_III_HAP.pdf (dostęp 25 maja 2021 r.).
- Codex Alimentarius, Standard for honey poprawiony w 2019 r. http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B12-1981%252FCXS_012e.pdf (dostęp 18 maja 2021 r.).
- Dhingra S. 2020. Down to Earth. Adulteration of honey with sugar most pressing threat: Beekeepers. https://www.downtoearth.org.in/news/health/adulteration-of-honey-with-sugar-syrup-most-pressing-threat-beekeepers-74623?fbclid=IwAR2L6MmeIs2yMDdDf-BaWwY_FoYOZnm7uhpmBWV5COZPt-yc0rBLF6LwrOe8 (dostęp 28 maja 2021 r.).
- Dyrektywa rady 2001/110/WE z dnia 20 grudnia 2001 r. odnosząca się do miodu. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex%3A32001L0110> (dostęp 20 maja 2021 r.).
- Fakhlai R., Selamat J., Khatib A., Razis A. F. A., Sukor R., Ahmad S., Babadi A. A. 2020. The Toxic Impact of Honey Adulteration: A Review. MDPI. Switzerland. Foods 9 (10). <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/11/1538/pdf> (dostęp 18 maja 2021 r.).
- Hodujko M. 2016. Zafałszowania w miodach i metody ich wykrywania. IJHARS. Wiedza i Jakość, 1(42)/2016: 33-37.
- Kowalski S., Łukasiewicz M. 2018. Publikacje z konferencji: Pszczoły ludziom, ludzie pszczołom. Wieś i Doradztwo. Zafałszowanie i autentyczność miodu – metody identyfikacji. 1(95)/2018: 25-31.
- Parlament Europejski. 2018. Infografika: Rynek miodu w Unii Europejskiej <https://www.europarl.europa.eu/news/pl/headlines/economy/20180222STO98435/infografika-rynek-miodu-w-unii-europejskiej> (dostęp 20 maja 2021 r.).

- Pilizota V., Tiban N. N. 2009. Advances in honey adulteration detection, Food safety magazine. <https://www.food-safety.com/articles/4542-advances-in-honey-adulteration-detection> (dostęp 20 maja 2021 r.).
- Puścion-Jakubik A., H. Borawska M. 2016. Odmianowe miody pszczele – pyłki główne i towarzyszące jako podstawa ich zaklasyfikowania, Probl Hig i Epidemiol 97 (3): 275-278. <http://www.phie.pl/pdf/phe-2016/phe-2016-3-275.pdf> (dostęp 21 maja 2021 r.).
- Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14 stycznia 2009 r. w sprawie metod analiz związanych z dokonywaniem oceny miodu. <http://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/download.xsp/WDU20090170094/O/D20090094.pdf> (dostęp 20 maja 2021 r.).
- Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 3 października 2003 r. w sprawie szczegółowych wymagań w zakresie jakości handlowej miodu. <http://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/download.xsp/WDU20031811773/O/D20031773.pdf> (dostęp 20 maja 2021 r.).
- Semkiw P. 2020. Sektor pszczelarski w Polsce w 2020 roku. Puławy: Instytut Ogrodnictwa Zakład Pszczelnictwa w Puławach: 10-11. http://www.inhort.pl/files/program_wieloletni/PW_2015_2020_IO/spr_2020/4.3_Semkiw_Sektor_pszczelarski_2020.pdf (dostęp 21 maja 2021 r.).
- Serwis Rzeczypospolitej Polskiej. 2021. <https://www.gov.pl/web/ijhars/jakosc-handlowa-miodu2> (dostęp 20 maja 2021 r.).
- Styczyński J. 2020. Miody ze wskazaniem kraju pochodzenia? To coraz bardziej możliwe. Dziennik Gazeta Prawna https://biznes.gazetaprawna.pl/artykuly/1457006,miod-importowany-kraj-pochodzenia-regulacje-unijne.html?fbclid=IwAR2IjuYIqf5nj4XW6vBCPkbb_Z9_VYP0lIX-KUbfILaVDWm38VHTPrEYjk0 (dostęp 10 maja 2021 r.)
- Sykt B., Kowalik K., Hus W. 2018. Badanie jakości i zafałszowań miodów naturalnych. PTSP 1/2018: 60-64.
- Tamma P. 2020. Euractiv. Honeygate: How Europe is being flooded with fake honey. <https://www.euractiv.com/section/agriculture-food/news/honey-gate-how-europe-is-being-flooded-with-fake-honey/> (dostęp 28 maja 2021 r.).

Abstract

THE ADULTERATION OF HONEY AVAILABLE ON THE MARKET

Consumer awareness of a healthy and balanced diet is growing, thus increasing the demand for good quality honey on the market. However, the changing climate and the lack of sufficient number of apiaries mean that there is not enough honey on the market. Manufacturers, in order to increase the amount of honey produced and boost their profits, has begun to counterfeit honey, i.e. use sugar syrups and feed the bees with sucrose. The problem with honey counterfeiting occurs on a global scale, so scientists invented and then developed methods that allowed detection of artificial additives in products labeled as natural honey. The aim of the study was to present the scale of the problems of honey adulteration on the market and to present innovative methods that allow their detection. The available literature and statistical data were used to carry out the research, then analyzed and compiled in the presented article. Results of the research show the number of necessary legal changes that need to be done and the need for support for beekeepers.

Key words: adulteration, honey, quality, authenticity

Słowa kluczowe: zafałszowanie, miód, jakość, autentyczność

Zuzanna Mstowska

Uniwersytet Morski w Gdyni

Naukowe Koło Towaroznawstwa CARGO

PRÓBA WYKORZYSTANIA ANTYBAKTERYJNYCH WŁAŚCIWOŚCI WASABI W REDUKCJI ZANIECZYSZCZENIA MIKROBIOLOGICZNEGO SUSHI

Wstęp

Zdrowy rozsądek podpowiada nam, że powinniśmy unikać surowych produktów pochodzenia zwierzęcego. Jednak Japończycy, mimo że jedzą dużo surowej ryby, cieszą się długowiecznością. Czy surowa ryba jest rzeczywiście dobra dla naszego zdrowia? Czy podobnie jak w przypadku większości produktów pochodzenia zwierzęcego, spożywanie surowych ryb wiąże się z zagrożeniami dla zdrowia? W pracy podjęto próbę odpowiedzi na te pytania.

Zatrucie pokarmowe sushi i sashimi jest dość powszechne i stanowiło trzy procent wszystkich przypadków zatruc pokarmowych zgłoszonych do Departamentu Zdrowia Hongkongu w 2000 roku. Świeże i mrożone surowe owoce morza mogą zawierać bakterie, takie jak: *Salmonella* i *Listeria* oraz pasożyty tasiemca, obleńca lub płazińca. Ryzyko infekcji glistami jest wyższe w przypadku ryb morskich, takich jak makreła czy łosoś. Zakażenia pasożytnicze są częściej wywoływane przez tasiemca rybnego, mogącego osiągać nieco mniej niż kilka metrów długości i powodować skurcze żołądka, biegunkę, nudności i zmęczenie. Aby zapobiec zatruciu pokarmowemu surowymi owocami morza i zabić larwy pasożytów, surowe ryby należy poddać mrożeniu w temperaturze co najmniej minus 20°C przez 24 godziny.

Rodzajem zatrucia pokarmowego niezwiązanego z pasożytami, ale często występującego w wyniku jedzenia surowej ryby, jest zatrucie skromboidami. Dzieje się tak, gdy ryby po złowieniu zbyt długo nagrzewają. W rezultacie w ciele gromadzi się histamina. Niektóre rodzaje ryb, takie jak tuńczyk bądź makreła są szczególnie wrażliwe na działanie substancji chemicznych. Ryby zanieczyszczone toksyną Scromboid mogą mieć metaliczny lub pieprzny smak. Objawy zatrucia pokarmowego pojawiają

się w ciągu godziny po zjedzeniu takiego produktu. Przypominają reakcję alergiczną – uczucie mrowienia i pieczenia wokół ust, zaczerwienienie twarzy, pocenie się, nudności, wymioty, bóle i zawroty głowy oraz wysypkę. Z kolei spożywanie surowych skorupiaków, takich jak: małże i ostrygi, jest bardziej „niebezpieczne” niż surowej ryby. Naturalnie występujące drobnoustroje, takie jak czerwony przyplływ, związany z zawkitem toksycznych mikroalg, może zanieczyścić skorupiaki, które gromadzą te toksyny w swoim ciele. Zatem ryzyko zapalenia wątroby jest wysokie, szczególnie u osób, u których występują już choroby wątroby. Uważać należy także na krewetki morskie, które są powszechnie używane do przyrządzania sushi z krewetkami. Departament Zdrowia Hongkongu ostrzega, że skorupy krewetek są często zanieczyszczane przez różnorodne patogeny (Food data central. <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/171831/nutrients> (dostęp 23 grudnia 2020r.)). Surowe ryby, znajdujące się w sushi i inne owoce morza, które nie zostały uprzednio poddane obróbce termicznej, mogą być jednocześnie atrakcyjne pod względem cech sensorycznych i niebezpieczne (nawet zagrażać życiu), jeśli zostaną przygotowane w nieumiejętny bądź nieodpowiedni sposób, mogą być bowiem źródłem wielu drobnoustrojów.

Staphylococcus aureus oraz *Vibrio parahaemolyticus* to główne ludzkie patogeny powodujące szeroki zakres zakażeń klinicznych. Zwalczenie patogenów w produktach przeznaczonych do spożycia ma kluczowe znaczenie dla bezpieczeństwa żywności.

Wasabi nazywane jest potocznie japońskim chrzanem. Uważane jest za niezwykle cenioną roślinę, nie tylko dzięki swojemu unikatowemu smakowi, charakteryzującemu się ostrym aromatem, ale przede wszystkim dzięki swoim właściwościom prozdrowotnym i antibakteryjnym. *Wasabia japonica* lub *Eutrema japonica*, potocznie nazywana wasabi, należy do rodziny *Brassicaceae*, do której zalicza się również kapustę, kalafior, chrzan oraz gorczycę. Roślina pochodzi z obszarów Dalekiego Wschodu oraz północnych Chin. Zioło to odgrywa niezwykle ważną rolę zarówno w kuchni, jak i kulturze Japonii. Światowe zainteresowanie kuchnią japońską doprowadziło do spopularyzowania spożywania wasabi w wielu krajach.

Do najpopularniejszych form wasabi należy pasta wytwarzana z kłączy tej rośliny, używana do sushi, jak i wielu innych dań jako dodatek smakowy. Tradycyjne wasabi jest przygotowywane na bieżąco przed każdym podaniem, ponieważ jego lotne związki szybko się rozpraszają w powietrzu, tracąc swój aromat już w ciągu 15–20 minut (Genetic differentiation, molecular phylogenetic analysis, and ethnobotanical study of *Eutrema japonicum* and *E. tenue* in Japan and *E. yunnanense* in China. Hort. J. 2016).

Korzeń wasabi ma wyjątkowe właściwości odżywcze i zdrowotne. Zawiera niezwykle dużo witamin, minerałów oraz składników odżywczych niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Izotiocyjaniiny (ITC) obecne w kłączach nadają roślinie właściwości przeciwwzapalne oraz przeciwutleniające.

Poniżej przedstawiono tabelaryczne zestawienie informacji o wartości odżywczej wasabi w oparciu o USDA National Nutrient Database for Standard Reference jako procent dziennego zalecanego spożycia na podstawie Norm Żywienia IŻŻ (tabela 1).

Tabela 1. Wartość odżywcza wasabi w 100 g produktu

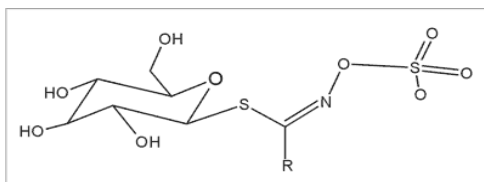
Wartość odżywcza	100 g wasabi	% dziennego zalecanego spożycia dla osoby dorosłej
Wartość energetyczna	109,0 kcal	–
Białko	4,8 g	–
Tłuszcze	0,63 g	–
Cholesterol	0,0 mg	–
Węglowodany	23,54 g	–
Błonnik	7,8 g	–
Witaminy		
Witamina B1	0,131 mg	10%
Witamina B2	0,114 mg	9%
Niacyna	0,743 mg	5%
Witamina B6	0,274 mg	21%
Foliany	18,0 µg	5%
Witamina A	2,0 µg	0,2%
Witamina C	41,9 mg	47%
Minerały		
Potas	568,0 mg	16%
Sód	17,0 mg	1%
Wapń	128,0 mg	13%
Fosfor	80,0 mg	11%
Żelazo	1,03 mg	10%
Magnez	69,0 mg	17%
Cynk	1,62 mg	15%
Miedź	0,155 mg	17%

Źródło: opracowanie własne na podstawie USDA National Nutrient Database for Standard Reference

Wasabi utożsamiane jest głównie ze swoim ostrym smakiem oraz charakterystyczną zieloną barwą. Związki te odpowiadają nie tylko za profil smakowy, ale przede wszystkim za pozytywne właściwości prozdrowotne. Izotiocyjaniiny aktywują specjalne czujniki w naszych komórkach, które niektórzy naukowcy nazwali „receptorem wasabi” (European Food Safety Authority. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa> (dostęp 13 stycznia 2021 r.)).

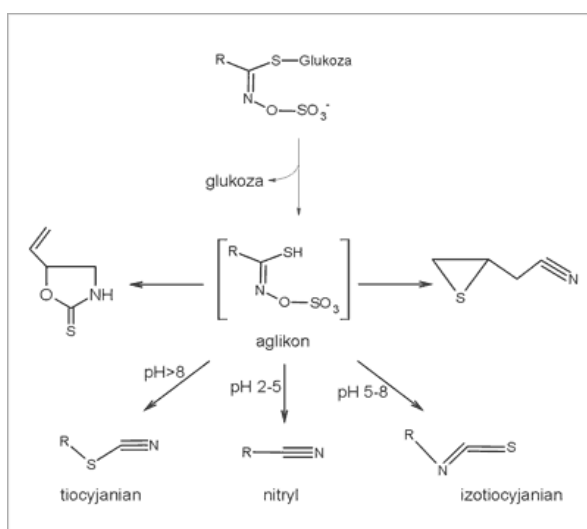
Izotiocyjaniiny (ITC) są to produkty hydrolizy glukozynolanów, czyli wtórnych metabolitów roślinnych, znajdujących się w wysokim stężeniu w warzywach z grupy *Brassica*, do których zaliczamy m.in. wasabi. Glukozynolany (rys. 1) odpowiadają za gorzki profil smakowy. Po hydrolizie z udziałem myrozynazy (rys. 2), glukozynolany są przekształcane w biologicznie aktywne izotiocyjaniiny, które podkreślają smak, a także ostry aromat. W zależności od warunków reakcji produkty rozkładu mogą

zawierać izotiocyjany oraz tiocyjany, nityle, a także epitionityle. Związki ITC wytwarzane są przez rośliny jako system obrony przed atakiem patogenów powstających w wyniku hydrolizy glukozynolanów (Parker 2015).



Rysunek 1. Wzór chemiczny glukozynolanu

Źródło: E. Kwiatkowska, 2007, Izotiocyjany wasabi (*Wasabia japonica*), *Postępy fitoterapii* 1/2007, s. 7–11.



Rysunek 2. Schemat hydrolizy glukozynolanów do izotiocyjanianów pod wpływem enzymu myrozynazy

Źródło: Kwiatkowska E., 2007, Izotiocyjany wasabi (*Wasabia japonica*), *Postępy fitoterapii* 1/2007, s. 7–11.

Oprócz zastosowań kulinarnych naukowcy zaczęli badać zastosowanie lecznicze wasabi. Uważa się, iż dostarczanie naszemu organizmowi w codziennej diecie wasabi łagodzi objawy chorób, w tym alergii, astmy, nowotworów, stanów zapalnych oraz chorób neurodegeneracyjnych. Badania opublikowane w „*Journal of Applied Microbiology*” potwierdziły te same właściwości w stosunku do pomidorów. Wprowadzenie wasabi do gleby doniczkowej znacząco zmniejszyło infekcję bakteryjną pomidorów. Bezpośrednie dawkowanie wasabi na owoc dało doskonałą skuteczność zwalczania *Meloidogyne incognita*. W badaniach został użyty korzeń rośliny, który mimo swojej wysokiej ceny może stanowić alternatywę dla tradycyjnych leków medycznych (Faeth, Fagan 2002).

Jedną z najważniejszych właściwości związanych ze spożyciem wasabi jest fakt, iż korzeń rośliny posiada właściwości, które są w stanie niszczyć bakterie obecne w jelitach odpowiadające za zapalenie bądź nowotwory żołądka. Wasabi jest cennym składnikiem dla przewodu pokarmowego, ponieważ pomaga usunąć toksyczne substancje z organizmu, eliminując możliwości wystąpienia powikłań związanych ze stanami zapalnymi.

Patogeny przenoszone przez żywność nadal stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego na całym świecie. Znaczna część epidemii przenoszonych przez żywność w wielu miejscach na ziemi była powiązana z różnymi gotowymi do spożycia produktami, m.in. sałatkami, pakowanymi warzywami liściastymi, sushi z mrożonej surowej ryby. Potrawy gotowe do spożycia najprawdopodobniej były niewłaściwie przygotowane bądź mogły być poddawane niewłaściwym procesom chłodniczym. Zwalczenie drobnoustrojów, zwłaszcza w żywności gotowej do spożycia ma zasadnicze znaczenia dla bezpieczeństwa zdrowotnego.

Do kontrolowania patogenów przenoszonych przez żywność stosuje się metody fizyczne i chemiczne, do których możemy zaliczyć pasteryzację, gotowanie, suszenie, solenie i wiele innych. Zważając na fakt, iż liczba konsumentów preferujących żywność nieprzetworzoną stale wzrasta, niezwykle ważne jest znalezienie naturalnych środków przeciwdrobnoustrojowych, które mogą zminimalizować potencjalne ryzyko związane z niekorzystnym wpływem tych produktów na organizm człowieka.

Analizując dostępną literaturę, wskazującą, że wasabi jest rośliną, która dzięki zawartości związków ITC zalicza się do wyżej wymienionej grupy eliminującej patogeny z żywności (Screening of wild plant species for antibacterial activity and phytochemical analysis of *Tragia involucrata* L. 2013) oraz biorąc pod uwagę stale rosnący popyt na sushi, podjęto badania dotyczące oceny wpływu wasabi na jakość mikrobiologiczną sushi oraz ocenę aktywności przeciwdrobnoustrojowej wasabi wobec *Staphylococcus aureus*.

Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowił zestaw świeżego sushi z surowym łososiem zakupiony w hipermarkecie oraz pasta wasabi. Sushi nabyto w dniu przygotowania produktu. Zważając na fakt, iż świeże wasabi nie jest dostępne powszechnie na rynku, zakupiono pastę wasabi, która w swoim składzie zawierała wodę, chrzan, olej sojowy, sorbitol, laktozę, mąkę kukurydzianą, emulgator E479, kurkumę, wasabi japońskie, stabilizator E415 oraz barwnik E133. Materiał badawczy przetransportowano w taki sposób, by zapewnić ciągłość łańcucha chłodniczego w celu zabezpieczenia produktu przed rozwijającymi się drobnoustrojami oraz działaniami niepożądanymi mogącymi obniżyć jakość surowca.

Aby zrealizować cel pracy sformułowano następujące hipotezy:

1. Wasabi redukuje liczbę drobnoustrojów obecnych w sushi.

2. Wasabi dodane do sushi redukuje w mniejszym stopniu drobnoustroje *Staphylococcus aureus* niż ogólną liczbę drobnoustrojów mezofilnych tlenowych.
3. Wraz ze wzrostem ilości dodanego wasabi zwiększa się jego skuteczność przeciwdrobnoustrojowa.

Metody badawcze

Produkty poddano analizie mikrobiologicznej w celu zweryfikowania ogólnej liczby drobnoustrojów mezofilnych tlenowych (OLD), bakterii *Staphylococcus aureus* oraz *Vibrio parahaemolyticus*.

W celu porównania wpływu dodatku wasabi na bakterie występujące w produkcji dokonano pobrania 20 g czystego sushi i umieszczenia naważki w 180 cm³ płynu do rozcieńczeń oraz 18 g sushi + 2 g wasabi i umieszczenia naważki w 180 cm³ płynu.

Pobieranie reprezentatywnych próbek, tzn. odzwierciedlających stan całego badanego produktu, odbywało się w komorze z laminarnym przepływem powietrza. Każdą naważkę przenoszono do kolby stożkowej Erlenmeyera, a następnie całość homogenizowano przy użyciu stomachera. Po dokonaniu posiewów, materiał zalewano wybranymi podłożami mikrobiologicznymi, a następnie inkubowano zgodnie z warunkami przedstawionymi w tabeli 3.

Przy ocenie efektu biostatycznego samego wasabi wobec *Staphylococcus aureus* uwzględniono stężenia dodatku (5%, 10%) oraz czas ekspozycji (30 i 60 min.). W celu oznaczenia inoculum *Staphylococcus aureus* ATTC25923 hodowlę prowadzono na podłożu bulionowym przez 48 godz. w 37°C, a następnie oznaczano inoculum na podłożu selektywnym Baird-Parker RPF, które wносиło około 6,69 log jtk/g. Do określonego w ten sposób inoculum dodawano odpowiednio 5 lub 10% wasabi. Metodę tę wybrano z uwagi na konieczność ilościowego oznaczenia poziomu redukcji *S. aureus*. Ocenę aktywności biostatycznej pasty wasabi w stosunku do *Staphylococcus aureus* (X') przeliczono w oparciu o wzór:

$$X' = \frac{(K - X)}{K * 100\%}$$

gdzie:

K – wartość inoculum drobnoustrojów,

X – wartość inoculum drobnoustrojów po dodaniu wasabi.

W celu dokonania obliczeń wybrano jedynie płytki, na których liczba wyrosłych kolonii mieściła się w granicach od 10 do 300. Po określonym w tabeli 3 czasie inkubacji płytki wyciągano z ciepłarki, a następnie liczono typowe kolonie, które przeliczano zgodnie ze wzorem:

Tabela 1. Warunki inkubacji badanych drobnoustrojów

Rodzaj bakterii	Temperatura	Czas	Rodzaj podłoża	Producent
OLD	30°C	72 h	Agar odżywczy	Merck
Staphylococcus aureus ATTC25923	37°C	48 h	B-Parker RPF	bioMerieux
Vibrio parahaemolyticus	37°C	48 h	TCBS	Merck

OLD – ogólna liczba drobnoustrojów mezofilnych tlenowych Źródło: opracowania własne.

$$L = \frac{C}{(N_1 + 0,1N_2) * d}$$

gdzie:

c – suma kolonii na wszystkich płytkach wybranych do liczenia,

d – wskaźnik rozcieńczenia odpowiadający pierwszemu (najniższemu) liczonemu rozcieńczeniu,

N_1 – liczba płytek z pierwszego liczonego rozcieńczenia,

N_2 – liczba płytek z drugiego liczonego rozcieńczenia.

Po przeliczeniu wyniki logarytmowano.

Wyniki i dyskusja

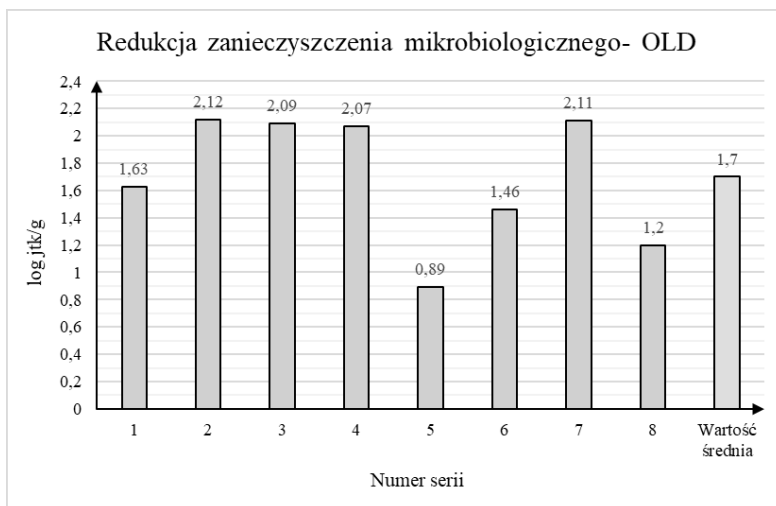
Analizując uzyskane wyniki badań, wykazano obecność w sushi ogólnej liczby drobnoustrojów mezofilnych tlenowych (OLD) oraz liczby bakterii *Staphylococcus aureus* odpowiednio na średnim poziomie – 5,24 i 1,69 log jtk/g oraz brak występowania przecinkowców *Vibrio parahaemolyticus*.

Zgodnie z Rozporządzeniem Komisji (WE) nr 1441/2007 dla produktów z gotowanych skorupiaków i mięczaków bez skorup i muszli, poziom zanieczyszczenia produktów *Staphylococcus aureus* nie powinien przekraczać wartości 100–1000 jtk/g (2–3 log jtk/g).

Interpretując wyniki zgodnie z powyższym Rozporządzeniem, przyjąć należy, że charakteryzowały się one jakością zadowalającą, gdyż żadna z próbek nie przekroczyła wartości > 1000 jtk/g (3 log jtk/g).

Uzyskane wyniki badań wykazały, że pasta wasabi posiadała właściwości przeciwdrobnoustrojowe (rys. 4, rys. 5).

Uwzględniając wyniki wszystkich serii, stwierdzono, iż dodatek wasabi do sushi w wysokości 10% powodował redukcję wzrostu ogólnej liczby drobnoustrojów mezofilnych tlenowych (OLD) na różnym poziomie (od 0,89 do 2,12 log jtk/g) (rys. 4).

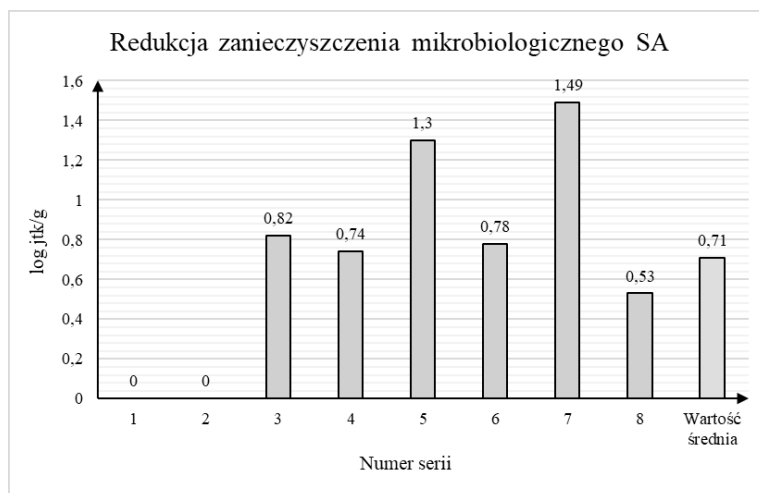


Rysunek 4. Wpływ wasabi na redukcję ogólnej liczby drobnoustrojów w sushi

Źródło: opracowania własne.

Ten sam dodatek wasabi powodował słabszą o 1 cykl logarytmiczny redukcję *S. aureus* występujących w badanych sushi (rys. 5).

Obecnie ogromne zainteresowanie budzi wykorzystywanie naturalnych związków przeciwdrobnoustrojowych obecnych w jadalnych roślinach. Spożycie surowych owoców morza jest dużym zagrożeniem dla konsumentów. Zatem, w jaki sposób można



Rysunek 5. Wpływ wasabi na redukcję bakterii *Staphylococcus aureus* w sushi

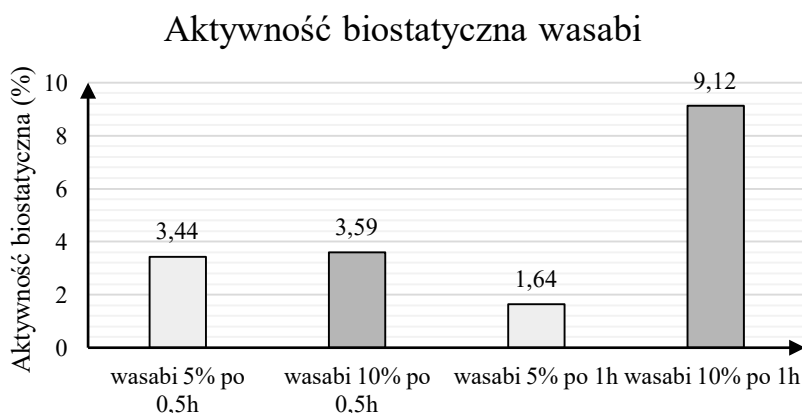
Źródło: opracowania własne.

się uchronić przed niebezpieczeństwami związanymi z zanieczyszczeniem mikrobiologicznym, które za sobą niesie spożywanie sushi? Warto jest zadać sobie na przykład pytanie, czy wasabi podawane do dań z surowymi rybami działa bakteriobójczo na drobnoustroje w nich obecne, czy też jest tylko dodatkiem smakowym?

Powszechnie uważa się, iż izotiocyjaniiny mają różne działanie biologiczne, w tym działanie przeciwgrzybicze. Aktywność biologiczna ITC wynika z ich zdolności do reagowania z grupą aminową aminokwasów. Kawakishi i Kaneko (1987) udowodnili, iż aktywność izotiocyjaniinów wynika z kowalencyjnego oddziaływania grupy izotiocyjaniinowej ($-N=C=S$) z grupami sulfhydryłowymi ($-SH$), grupami aminowymi i wiązaniami disiarczkowymi w białkach i aminokwasach, takich jak: lizyna, cysteina i fenolowa grupa reszt tyrozynowych białek. Po reakcji izotiocyjaniiny pozostają kowalencyjnie związane z białkiem, co powoduje zmiany w trzeciorzędowych strukturach białek, prowadząc do częściowej lub całkowitej utraty aktywności enzymatycznej.

Badania naukowe dowodzą, iż zmiana białek ma związek z działaniem przeciwgrzybiczym ITC. Niewiele jest jednak informacji na temat wpływu tych związków na określone białka drobnoustrojów lub enzymy zaangażowane w funkcje metaboliczne patogenów. W swoich badaniach Kojima i Ogawa (1971) udowodnili, iż pobór tlenu przez szczepy drożdży traktowanych izotiocyjaniinem allilu, metylu i fenylylu hamował procesy oksydazy. Badania dowodzą, że ITC mogą działać jako rozpraszacze fosforylacji oksydacyjnej, co z kolei może odpowiadać za wysoką wrażliwość ściśle tlenowych grzybów na te związki (Troncoso-Rojas, Tiznado-Hernández 2014).

W celu poddania ocenie autentyczności wasabi jako naturalnego środka spożywczego, zapobiegającego rozwojowi oraz sprzyjającego eliminowaniu drobnoustrojów w żywności, zbadano aktywność biostatyczną samego wasabi. Wyniki badania przedstawiono na wykresie dotyczącym aktywności biostatycznej wasabi wobec *Staphylococcus aureus* (rys. 6).



Rysunek 6. Aktywność biostatyczna wasabi wobec *Staphylococcus aureus*

Źródło: opracowania własne.

Analizując właściwości przeciwdrobnoustrojowe wasabi, wykazano, iż najwyższą zdolnością w obniżaniu liczebności hodowli *S. aureus* charakteryzował się dziesięcioprocentowy dodatek tej rośliny oddziałujący przez 60 minut na inoculum. Dodatek 5% wasabi najwyższą aktywność biostatyczną wykazywał po czasie 30 minut, natomiast po godzinie jego właściwości spadły. Badania prowadzone przez Lu i wsp. (2016) wykazały, że wasabi ma silne właściwości antybakteryjne oraz wysoki potencjał do skutecznego zwalczania *S. aureus* w żywności.

Wnioski

Na bazie uzyskanych wyników badania można sformułować następujące wnioski:

1. Wykazano, iż wasabi wpływało na redukując liczbę drobnoustrojów obecnych w sushi.
2. Wraz ze wzrostem zastosowanego stężenia wasabi zwiększała się jego aktywność przeciwdrobnoustrojowa.
3. Czas ekspozycji oraz zastosowane stężenie dodanego wasabi w sposób znaczący wpływały na efekt biostatyczny wobec *S. aureus* ATTC25923.

Analizując uzyskane wyniki badania, można uznać, że przyjęte przez autorkę hipotezy badawcze zostały zweryfikowane pozytywnie. Przeprowadzone badania wykazały, iż wraz ze wzrostem stężenia dodanego wasabi zmniejszała się liczba drobnoustrojów. Wynika z tego, że wasabi nie stanowi jedynie dodatku smakowego do sushi, ale jest ono także składnikiem posiadającym korzystne działanie przeciwdrobnoustrojowe. Wpływać to może na większe bezpieczeństwo spożywanego sushi.

Bibliografia

- European Food Safety Authority. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa> (dostęp 13 stycznia 2021 r.).
- Faeth S., Fagan W., 2002, Fungal Endophytes: Common Host Plant Symbionts but Uncommon Mutualists, *Integrative and Comparative Biology*, 42 (2), s. 360–368.
- Food data central. <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/171831/nutrients> (dostęp 23 grudnia 2020 r.).
- Gobalakrishnan R., Kulandaivelu M., Bhuvneswari R., Kandavel D., Kannan L., 2013, Screening of wild plant species for antibacterial activity and phytochemical analysis of *Tragia involucrata* L., *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3 (6), s. 460–465.
- Kawakishi S., Kaneko T., 1987, Interaction of proteins with allyl isothiocyanate, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35 (1), s. 85–88.

- Kwiatkowska E., 2007, Izotiocyaniany wasabi (*Wasabia japonica*), Postępy fitoterapii 1/2007, s. 7–11.
- Lu, Z., Dockery C.R., Crosby M., Chavarria K., Patterson B., Giedd M., 2016, Antibacterial activities of wasabi against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*, *Frontiers in Microbiology*, 7:1403, doi: 10.3389/fmicb.2016.01403.
- Parker J., 2015, Flavour Development, Analysis and Perception in Food and Beverages, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, s. 3–30.
- Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1441/2007 dla produktów z gotowanych skorupiaków i mięczaków bez skorup i muszli, poziom zanieczyszczenia produktów
- South China Morning Post. <https://www.scmp.com/article/964034/dangers-eating-raw-seafood> (dostęp 20 stycznia 2021 r.)
- Troncoso-Rojas R., Tiznado-Hernández M., 2014, *Alternaria alternata* (Black Rot, Black Spot), *Postharvest Decay Control Strategies*, s. 147–187.
- Yamane K., Sugiyama Y., Lu y., Lü N., Tanno K., Kimura E., Yamaguchi H., Genetic differentiation, molecular phylogenetic analysis, and ethnobotanical study of *Eutrema japonicum* and *E. tenue* in Japan and *E. yunnanense* in China. *Hort. J.* 85, 46–54, 2016.

Abstract

AN ATTEMPT TO USE THE ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF WASABI IN REDUCING MICROBIAL CONTAMINATION OF SUSHI

Raw fish found in sushi and other seafood that has not been previously cooked can be attractive in terms of sensory characteristics, but they can also be dangerous - and even life-threatening - if prepared in an unskillful or inappropriate manner. *Staphylococcus aureus* and *Vibrioparahaemolyticus* are the main human pathogens causing a wide range of clinical infections. Controlling pathogens in products intended for consumption is critical to food safety. The use of natural antimicrobial compounds present in edible plants is of great interest. So how can you protect yourself from the dangers of microbial contamination that come with eating sushi? It is worth asking whether wasabi served with dishes with raw fish has a bactericidal effect on microorganisms present in them or is it just a flavoring additive? The aim of this study was to evaluate the effect of wasabi on the microbiological quality of sushi. In the first stage of the study, the products were subjected to microbiological analysis to verify the presence of total number of aerobic mesophilic microorganisms (OLD), *Staphylococcus aureus* bacteria and *Vibrioparahaemolyticus*. The number of *Staphylococcus aureus* bacteria and the total number of aerobic mesophilic microorganisms (OLD) were determined in the tested sushi samples, while no *Vibrio* group microorganisms were isolated. Wasabi was also tested to evaluate the reduction of microbial contamination isolated from sushi. It was found that wasabi is not only a flavor additive, but also has the effect of reducing microbial contamination contained in sushi.

Słowa kluczowe: biostatystyka wasabi, sushi, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, ogólna liczba drobnoustrojów mezofilnych tlenowych

Keywords: wasabi biostatistics, sushi, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, Aerobic mesophilic bacteria total plate count

Anna Polakowska, Aleksandra Rzymka

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Nauki o Żywności
Studenckie Koło Naukowe Technologów Przetwórstwa Surowców Roślinnych
Opiekun: dr. hab. inż. Małgorzata Tańska, prof. UWM

MATCHA JAKO CENNY DODATEK DO PRODUKTÓW SPOŻYWCZYCH – MOŻLIWOŚĆ WYKORZYSTANIA W PRODUKCJI CIASTEK KRUCHYCH

Wstęp

Z uwagi na wysoki poziom zachorowalności na choroby wywołane złym sposobem żywienia oraz chęć przeciwdziałania temu zjawisku, wśród społeczeństwa popularny stał się „zdrowy” sposób odżywiania się. Spowodowało to, że producenci żywności proponują innowacyjne produkty, które mają sprostać oczekiwaniom konsumentów. Produkty takie powinny zarówno chronić organizm przed chorobami, jak i stanowić wartościowy posiłek pod względem zawartych w nich składników (Kozirok i in. 2012). Jednym z surowców, jaki mógłby być dodawany podczas produkcji żywności o działaniu prozdrowotnym jest japońska herbata matcha, która jest ceniona z uwagi na swoje właściwości.

Matcha jest delikatnym proszkiem z liści wysokiej jakości japońskiej zielonej herbaty (*Camellia sinensis*) odmiany Tencha. Jest szczególnie bogata w związki antyoksydacyjne, co jest wynikiem specjalnej metody uprawy. Zgodnie z tradycyjną metodą, przez większość okresu wzrostu krzewy herbaciane są przykryte matami bambusowymi w celu zacielenia liści przed nadmiernym, bezpośrednim działaniem promieni słonecznych. Pod wpływem zacielenia rośliny są w stanie wytwarzać większe ilości aminokwasów i związków bioaktywnych, w tym chlorofilu i teaniny, odpowiedzialnych za wyjątkowy, niegorzki smak i charakterystyczny, „żywy” kolor matchy. Dzięki temu matcha cechuje się wysoką jakością i uważana jest za najbardziej aromatyczną zieloną herbatę. Z uwagi na swój unikalny smak, aromat i kolor jest stosowana nie tylko jako napój, ale także jako składnik różnych wyrobów cukierniczych i potraw (Kochman

i in. 2021). Herbata ta ceniona jest z uwagi na swoje właściwości prozdrowotne, które wynikają m.in. z obecności naturalnych przeciwutleniaczy, takich jak polifenole, które stanowią aż 30% suchej masy zielonej herbaty (Unno i in. 2019).

Uważa się, że polifenole są wyjątkowo silnymi antyoksydantami o działaniu porównywalnym z witaminami C i E, a ich zawartość w napojach herbacianych zależy od rodzaju herbaty, ilości liści herbaty w porcji, temperatury i czasu parzenia. Z grupy polifenoli typowych dla herbaty za prozdrowotne działanie odpowiadają zwłaszcza katechiny, spośród których w zielonej herbacie matcha występują cztery główne związki, tj. (-)-epikatechina (EC), (-)-epikatechina-3-galwan (ECG), (-)-epigalokatechina (EGC) i (-)-epigallokatechina (EGC). Ten ostatni związek uznawany jest za najbardziej aktywny i najobficiej występujący (Unno i in. 2019). Katechiny pochodzące z herbaty wykazują wyjątkową aktywność antyoksydacyjną dzięki zdolności do neutralizowania wolnych rodników i zwiększania aktywności detoksykacyjnej enzymów, w tym peroksydazy glutationowej, katalazy i reduktazy glutationowej (Unno i in. 2019; Musiał i in. 2020). Grzesik i in. (2018) stwierdzili, że katechiny wykazują większe zdolności antyoksydacyjne niż glutation, witamina C i flawonoidy, co świadczy o ich kluczowej roli w utrzymaniu homeostazy redoks komórek. W matchy, jak i w innych zielonych herbatach szacuje się, że występuje 5,46-7,44 mg/g katechin, natomiast herbata czarna zawiera ich 0-3,47 mg/g (Kochman i in. 2021).

Poza katechinami w herbacie matcha w znacznej ilości występuje kofeina, która jest niezbędnym składnikiem napojów herbacianych i odpowiada za ich charakterystyczny, pożądany smak. Kofeina jest także silnym antyoksydantem, który zwiększa potencjał antyoksydacyjny napoju. Jej poziom może być związany z czasem zbioru i wiekiem liści, przy czym im starsze liście, tym niższa zawartość kofeiny. Zawartość kofeiny zależy również od odmiany herbaty, warunków pogodowych w czasie wegetacji, a także sposobu parzenia. Działanie kofeiny związane jest z potencjałem antyoksydacyjnym, neutralizującym reaktywne formy tlenu oraz zwiększaniem aktywności enzymów antyoksydacyjnych i całkowitego poziomu glutationu. W regularnych dawkach kofeina może zmniejszać utrzymujący się stres oksydacyjny, obniżając częstość występowania chorób wywołanych przez wolne rodniki. Dodatkowo, kofeina może hamować wydzielanie cytokin prozapalnych, wykazując działanie przeciwzapalne (Kochman i in. 2021; Musiał i in. 2020). Matcha posiada stosunkowo wysoką zawartość kofeiny w porównaniu do innych herbat zielonych, co nadaje jej charakterystyczny smak i aromat. Stwierdzono, że zawartość kofeiny w herbatach zielonych mieści się w przedziale 11,3-24,67 mg/g, natomiast w matcha wynosi od 18,9 do 44,4 mg/g (Koláčková i in. 2021). Dla porównania, większość ziaren kawy zawiera 10,0-12,0 mg kofeiny/g (Koláčková i in. 2021). Stąd coraz bardziej popularne staje się picie naparu z herbaty matcha zamiast kawy.

Za stosowaniem matchy jako dodatku do żywności prozdrowotnej przemawia także wysoka zawartość w jej składzie niezbędnej w żywieniu człowieka witaminy C, która jest silnym antyoksydantem i wzmacnia układ odpornościowy (Carr i in. 2017). Jakubczyk i in. (2020) wykazali, że napary z herbaty matcha zawierają od 32,12 do 44,8 mg/l

witaminy C, w zależności od temperatury wody użytej do przygotowania naparu oraz rodzaju herbaty. W badaniach Koláčková i in. (2021) stwierdzono, że matcha w formie sproszkowanej zawiera ponad dwukrotnie więcej witaminy C niż inne herbaty zielone. Jej zawartość określono na poziomie 1,63-3,98 mg/g, w zależności od rodzaju produktu i jego pochodzenia.

Matcha ze względu na obecność wielu związków bioaktywnych, z których ważniejsze zostały przedstawione powyżej, wykazuje także inne właściwości, m.in. przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, regulujące metabolizm węglowodanów czy też właściwości kardioprewencyjne (Unno i in. 2019). Przeciwnowotworowe właściwości zielonej herbaty wynikają z występowania w jej składzie galusanu epigallokatechiny (EGCG). Przypuszcza się, że ta substancja hamuje angiogenezę guza działaniem antyoksydacyjnym oraz tłumieniem procesów zapalnych przyczyniających się do transformacji, hiperprolifracji i inicjacji karcynogenezy. Ponadto EGCG jest w stanie hamować wzrost i indukować apoptozę komórek nowotworowych. Poprawia ona wrażliwość tkanek na insulinę i leptynę oraz obniża parametry lipidowe krwi, co może hamować karcynogenezę związaną z otyłością. Suplementacja ekstraktami z zielonej herbaty może dodatkowo zapobiegać nawrotom gruczolaków, które w większości przypadków mogą przerodzić się w raka jelita grubego. Wyniki badań dotyczące suplementacji EGCG obejmują również hamowanie wzrostu i proliferacji komórek raka pęcherzyka żółciowego i dróg żółciowych, a także zmniejszenie ryzyka raka dróg żółciowych. Katechiny zawarte w matchy działają synergistycznie z lekami przeciwnowotworowymi i mogą być stosowane do wspomagania terapii oraz profilaktyki nowotworów (Unno i in. 2019; Musiał i in. 2020).

Działanie przeciwzapalne herbaty matcha również wiąże się z występowaniem w matchy EGCG, ponieważ może on łagodzić powikłania procesu zapalnego powstałe po zastosowaniu krążenia pozaustrojowego w poważnych operacjach kardiochirurgicznych, w tym uszkodzenia i dysfunkcji płuc. Regulując stan zapalny, EGCG pomaga też zmniejszyć podatność na tworzenie się kamieni żółciowych. Spożywanie napojów z zielonej herbaty o wysokiej zawartości związków bioaktywnych regulujących procesy zapalne może również łagodzić rozwój zapalenia wątroby poprzez tłumienie ekspresji genów i białek cytokin zapalnych (Unno i in. 2019).

Katechiny i inne polifenole zawarte w zielonej herbacie matcha mają ponadto wpływ na parametry metabolizmu węglowodanów, co wskazuje na ich hipoglikemiczne działanie. Oznacza to, że matcha może pomóc obniżyć poziom glukozy we krwi. Natomiast obecność w jej składzie już wcześniej wspomnianego EGCG może hamować trawienie skrobi, minimalizując w ten sposób nagłe uwalnianie glukozy w przewodzie pokarmowym. Co więcej, EGCG może wykazywać zdolność do hamowania glukoneogenezy oraz wchłaniania lipidów i glukozy z przewodu pokarmowego, a także poprawiać wrażliwość na insulinę (Musiał i in. 2020).

Działanie kardioprewencyjne składników herbaty matcha zostało zbadane przez Unno i in. (2019) podczas eksperymentu ze szczurami. Z uwagi na fakt, iż palenie

papierosów jest uznawane za jeden z głównych czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych, w eksperymencie na modelu zwierzęcym szczury wystawiono na działanie dymu papierosowego z jednoczesnym doustnym podaniem EGCG. Wyniki tego badania sugerują, że EGCG może wywierać ochronny wpływ na mięsień sercowy zapobiegając zmianom zapalnym serca poprzez zmniejszenie stresu oksydacyjnego. Dodatkowo wskazano, że EGCG może potencjalnie wywierać ochronny wpływ na mięsień sercowy u pacjentów poddawanych zabiegom chirurgicznym podatnych na uraz niedokrwienny poprzez hamowanie aktywacji kinazy białkowej aktywowanej stresem i szlaków sygnałowych indukujących odpowiedź zapalną.

Cel badań

Celem badań było zastosowanie herbaty matcha jako dodatku do ciastek kruchych i sprawdzenie, w jaki sposób różne ilości tego składnika wpływają na wybrane cechy organoleptyczne produktu.

Materiał i metody badań

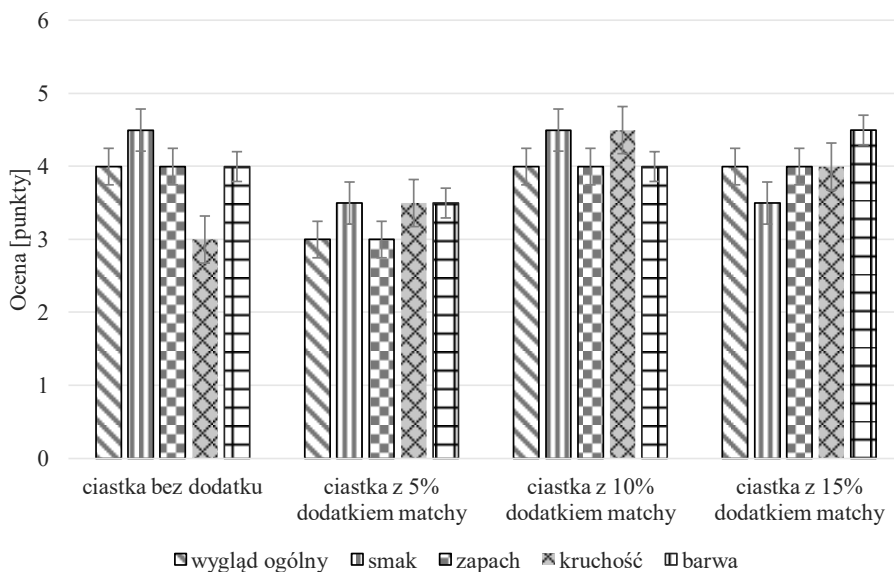
Materiał do badań stanowiły ciastka kruche z dodatkiem sproszkowanej herbaty matcha, wypieczone w temperaturze 180°C przez 12 minut. Ciastka zostały przygotowane przez zastąpienie 0% (próbka kontrolna), 5%, 10% i 15% mąki pszennej sproszkowaną herbatą matcha oraz dodanie pozostałej części mąki, masła, jajka, cukru pudru, proszku do pieczenia i odrobiny soli. Połączone składniki utworzyły ciasto, które zagniatano ręcznie, a następnie odłożono na godzinę do lodówki. Schłodzone ciasto zostało rozwałkowane i z niego zostały wykrojone ciastka o jednakowych kształtach i upieczone w piekarniku. Otrzymane ciastka kruche zostały poddane ocenie organoleptycznej po 24 h od wypieku. Ocenę organoleptyczną ciastek z dodatkiem herbaty matcha przeprowadzono z zastosowaniem pięciopunktowej skali ocen, za pomocą której oceniono takie cechy ciastek jak: wygląd ogólny, smak, zapach, kruchość, barwa. Metoda pięciopunktowa uwzględnia pięć głównych poziomów jakości produktu: 5 punktów oznacza poziom jakości bardzo dobry, 4 punkty – dobry, 3 punkty – dostateczny, 2 punkty – poziom niedostateczny, 1 punkt – zły. Ponadto dla każdej z badanych cech jakościowych kolejnemu stopniowi skali jest przypisana odpowiednia definicja jakości badanego produktu (Malinowska i in. 2014). Oceny dokonał 10 osobowy zespół, składający się z osób obu płci w wieku 20-58 lat. Każdy oceniający oceniał zakodowane próbki w temperaturze pokojowej przy świetle naturalnym, neutralizując jamę ustną wodą pomiędzy ocenianymi próbkami.

Wyniki i dyskusja

Przeprowadzenie oceny organoleptycznej miało na celu ocenę wybranych wyróżników jakości sensorycznej ciastek kruchych przygotowanych z różnym % dodatkiem herbaty matcha i porównanie ich jakości oraz sprawdzenie czy różny dodatek wpłynął istotnie na wybrane cechy ciastek. Na Rysunku 1. przedstawiono średnie oceny poszczególnych cech ciastek obliczone na podstawie ocen przyznanych przez wszystkich oceniających. W porównaniu do ciastek kontrolnych (bez dodatku) dodatek matchy wpłynął na zmianę wyglądu i tekstury ciastek. Generalnie, najwyżej oceniono wyróżniki jakości ciastek z 10% dodatkiem herbaty matcha, natomiast najniżej z 5% dodatkiem.

Oceniając wygląd ogólny zwracano uwagę czy jest on typowy dla takiego typu produktów czy zachował właściwy kształt nadany przed wypieczeniem. Według oceniających cecha ta była w większości rodzajów ciastek na dobrym poziomie, za wyjątkiem ciastek z 5% dodatkiem herbaty matcha, w przypadku której wygląd ogólny oceniono na poziomie dostatecznym. Prawdopodobnie niższa ocena tych ciastek mogła wynikać z nierówności na powierzchni, które powstały podczas formowania ciasta. Mały dodatek matchy trudniej było wymieszać z pozostałymi składnikami i prawdopodobnie zbyt szybko zakończono wygniataanie ciasta.

Oceniając smak i zapach przyznawano 5 punktów, jeśli uznano, że były one charakterystyczne dla ciastek kruchych, a wprowadzone dodatki nie spowodowały powsta-



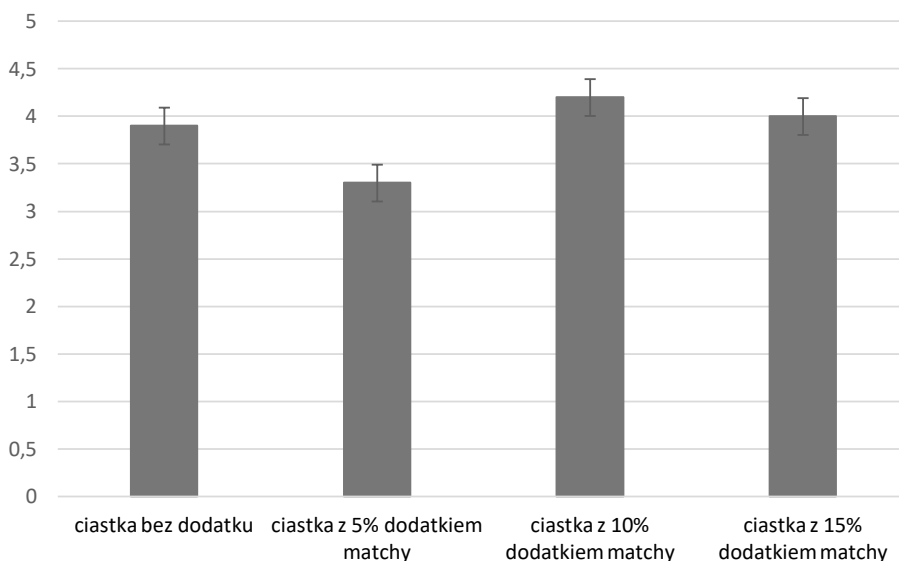
Rysunek 1. Wyniki oceny organoleptycznej poszczególnych cech ciastek kruchych z różnym dodatkiem herbaty matcha

Źródło: Opracowanie własne.

nia obcych i nieprzyjemnych posmaków. Smak ciastek oceniono w zakresie od 3,5 do 4,5 pkt, przy czym ciastka bez dodatków i z 10% dodatkiem herbaty matcha uzyskały więcej punktów. Niższe oceny ciastek z 5 i 15% dodatkiem matchy mogły być prawdopodobnie wynikiem zbyt małego i zbyt dużego dodatku tego składnika, co w efekcie skutkowało odpowiednio mało charakterystycznym (określanym przez oceniających jako niewyraźny, „bez wyrazu”) lub zbyt intensywnym smakiem. W przypadku zapachu tylko ciastka z 5% dodatkiem herbaty matcha wydały się oceniającym za mało aromatyczne, natomiast pozostałe rodzaje z dodatkiem matchy były porównywalne pod tym względem do próbki kontrolnej.

W przypadku kruchości i barwy stwierdzono, że dodatek herbaty matcha miał korzystny wpływ na te cechy, jedynie ciastka z 5% dodatkiem matchy uzyskały nieznacznie niższe oceny barwy, co mogło być wynikiem mało wyraźnego odcienia barwy, nie kojarzącego się oceniającym z tego typu produktem. Za najlepsze pod względem kruchości oceniający uznali ciastka z 10% dodatkiem matchy (ocena średnia wynosiła 4,5 pkt.), a pod względem barwy – ciastka z najwyższym dodatkiem herbaty matcha (średnia ocena wynosi 4,5 pkt).

Na Rysunku 2. przedstawiono wartości ocen ogólnych uzyskanych podczas przeprowadzonej oceny organoleptycznej. Najwyższą ocenę ogólną (4,2 pkt.) uzyskały ciastka kruche z 10% dodatkiem herbaty matcha, natomiast najniższą (3,3 pkt.) ciastka z 5% udziałem matchy. Ciastka z 15% dodatkiem oraz ciastka bez dodatku otrzymały bardzo zbliżone do siebie wyniki (uzyskane oceny ogólne wynosiły odpowiednio 3,9 dla



Rysunek 2. Porównanie ocen ogólnych uzyskanych podczas oceny organoleptycznej ciastek kruchych z różnym dodatkiem herbaty matcha

Źródło: Opracowanie własne.

ciastek bez dodatku oraz 4 dla ciastek z 15 % udziałem matchy), co wskazuje na porównywalną jakość tych produktów.

Uzyskane wyniki oceny organoleptycznej pokazały, że otrzymane ciastka z wyższym dodatkiem herbaty matcha (10 i 15%) uzyskały oceny odpowiadające produktowi o dobrej jakości. Natomiast jakość ciastek z 5% dodatkiem tego składnika można określić jako dostateczną. Przy zastosowaniu najwyższego dodatku matchy (15%) smak ciastek uległ pogorszeniu w porównaniu do ciastek z 10% dodatkiem. Za smak w przypadku matchy, który zazwyczaj jest słodkawy i delikatny, prawie bez goryczy odpowiada L-teanina, która powstaje dzięki prawidłowemu zacienieniu krzewów herbacianych na kilka tygodni przed zbiorami (Unno i in. 2019). Przy niskiej jakości herbaty matcha nie ma prawie L-teaniny i jednocześnie zawiera więcej tanin, dlatego jej smak jest bardziej ściągający, a nawet gorzki (Cichoń i in. 2007). Dlatego podczas produkcji ciastek ważne byłoby używanie tylko wysokiej jakości herbaty matcha, bądź zastosowanie dodatków smakowych, aby maskowały ewentualny gorzkawy posmak.

Odnosząc się do badań przeprowadzonych przez Żbikowską i in. (2019), w których badany był wpływ dodatku herbaty matcha na wyróżniki jakości bezglutenowych biszkoptowo-tłuszczowych wyrobów ciastkarskich zauważyć można, że barwa tych ciastek również była intensywniejsza wraz z większym udziałem herbaty. Poza barwą, podobny jak w niniejszej pracy, korzystny wpływ udziału matchy został zaobserwowany w odniesieniu do struktury ciastek. Zmiany w teksturze mogą wynikać z tego, że wprowadzone z herbatą polifenole przyczyniły się do poprawy spójności ciasta przez tworzenie dodatkowej dwurzędowej struktury białka (β -arkuszy), która stabilizuje strukturę „siateczki glutenowej”. Również aminokwas L-teanina ma zdolność do poprawy właściwości ciasta poprzez tworzenie dodatkowych β -arkuszy i wiązań dwusiarczkowych (Liu i in. 2020), czego efektem jest zmniejszenie twardości oraz zwiększenie sprężystości i spoistości ciasta.

Analizując wyniki oceny organoleptyczną produktów z dodatkiem herbaty matcha oraz biorąc pod uwagę wartości prozdrowotne zastosowanego dodatku, stwierdzono, że produkty w postaci kruchych ciastek mogą być rekomendowane jako uzupełnienie codziennej diety i mogą też stanowić „zdrowszą” alternatywę dla tradycyjnych słodkich ciastek, które często mają niską wartość odżywczą.

Podsumowanie

Z uwagi na zawartość związków bioaktywnych o właściwościach prozdrowotnych, takich jak: polifenole (katechiny), kofeina oraz witamina C w znacznych ilościach w składzie matchy można uznać ten surowiec za odpowiedni do produkcji żywności prozdrowotnej.

Ilość zastosowanego dodatku herbaty matcha miała wpływ na wynik oceny organoleptycznej produktów przez badaną grupę oceniających. Najwyżej zostały ocenione

wyróżniki jakości ciastek z 10% dodatkiem herbaty, które wyróżniały się bardzo dobrą kruchością i smakiem oraz dobrym zapachem, dlatego taki udział matchy w recepturze można uznać za optymalny. Barwa ciastek była zależna od ilości dodanej zielonej herbaty matcha. Im większy był jej dodatek, tym barwa była bardziej intensywna i zielona, a różnica w jej natężeniu podczas porównania próbki kontrolnej z próbkami z dodatkiem matchy była możliwa do uchwycenia wzrokowo nawet w ciastkach z najmniejszą ilością tego składnika.

Literatura

- Carr A.C., Maggini S. 2017. Vitamin C and immune function. *Nutrients*, 9: 1211.
- Cichoń Z., Miśniakiewicz M., Szkudlarek E. 2007. Właściwości zielonej herbaty. *Zeszyty Naukowe, Akademia Ekonomiczna w Krakowie*, 743: 59-90.
- Grzesik M., Naparło K., Bartosz G., Sadowska-Bartosz I. 2018. Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. *Food Chem.*, 241: 480-492.
- Jakubczyk K., Kochman J., Kwiatkowska A., Kałduńska J., Dec K., Kawczuga D., Janda K. 2020. Antioxidant properties and nutritional composition of matcha green tea. *Foods*, 9: 483.
- Kochman J., Jakubczyk K., Antoniewicz J., Mruk H., Janda K. 2021. Health benefits and chemical composition of matcha green tea: A review. *Molecules*, 26(1): 85.
- Koláčková T., Kolofíková K., Sytarová I., Snopek L., Sumczynski D., Orsavová J. 2020. Matcha tea: Analysis of nutritional composition, phenolics and antioxidant activity. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 75: 48-53.
- Kozirok W., Baumgart A., Babicz-Zielińska E. 2012. Postawy i zachowania konsumentów wobec żywności prozdrowotnej. *Bromatol. Chem. Toksyk.*, 45(3): 1030-1034.
- Liu Z., Chen J., Zheng B., Lu Q., Chen L. 2020. Effects of matcha and its active components on the structure and rheological properties of gluten. *LWT-Food Sci. Technol.*, 124: 109197.
- Malinowska E., Wiśniewska M.Z., Szymańska-Brałkowska M. 2014. Ocena sensoryczna jakości produktów żywnościowych. *Zakład Zarządzania Jakością i Środowiskiem. Wydział Zarządzania Uniwersytet Gdański, Sopot*.
- Musiał C., Kuban-Jankowska A., Gorska-Ponikowska M. 2020. Beneficial properties of green tea catechins. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(5): 1744.
- Inno K., Furushima D., Hamamoto S., Iguchi K., Yamada H., Morita A., Pervin M., Nakamura Y. 2019. Stress-reducing effect of cookies containing matcha green tea: essential ratio among theanine, arginine, caffeine and epigallocatechin gallate. *Helijon*, 5.5 (2019): e01653.
- Żbikowska A., Szymańska I., Marciniak-Łukasiak K., Udarcić Ż., Kowalska, M. 2019. Wpływ udziału zielonej herbaty matcha na wybrane wyróżniki jakości bezglutenowych biszkoptowo-tłuszczowych wyrobów ciastkarskich. *Żywn. Nauka Technol. Jakość*, 26(1): 79-94.

Abstract

MATCHA AS A VALUABLE FOOD ADDITIVE – POTENTIAL USE IN THE PRODUCTION OF SHORTCRUST PASTRY

Matcha is a Japanese tea valued for its unique chemical composition and original flavor, which distinguishes it from other teas. The health-promoting properties of this tea, confirmed by many studies, have led to its use as an additive in many food products.

The aim of this study was to use matcha tea as an additive to shortbread cookies and to analyze their organoleptic properties. The cookies were prepared with different additions of matcha tea, replacing 5, 10 and 15% of wheat flour provided in the recipe. In the organoleptic evaluation general appearance, flavor, aroma, crispness, color were evaluated on a five-point scale.

The study showed that matcha tea addition influenced the organoleptic characteristics of the shortbread cookies. This addition had a beneficial effect especially on the product texture, causing a reduction in hardness and an increase in elasticity and cohesiveness compared to the control sample. The color of the product depended on the amount of matcha tea used, being most intensely green with the highest addition. The cookies with 10% of matcha tea showed the most favorable organoleptic characteristics such as flavor (4,5 points), crispness (4,5 points) and aroma (4 points), therefore this amount of tea in the recipe can be considered optimal.

Key words: matcha, shortbread cookies, phenolic compounds, health promoting properties, organoleptic evaluation

Słowa kluczowe: matcha, ciastka kruche, związki fenolowe, właściwości prozdrowotne, ocena organoleptyczna.

Jolanta Remiszewska

Uniwersytet- Warmińsko Mazurski w Olsztynie

Wydział Nauki o Żywności

Studenckie Koło Naukowe Higieny Żywności i Toksykologii

Opiekun Koła: dr n. wet. inż. Magdalena Polak-Śliwińska

OŚWIADCZENIA ŻYWIENIOWE I ZDROWOTNE – PRAKTYKA RYNKU A WIEDZA KONSUMENTÓW

Wstęp

Rosnąca świadomość konsumentów, dotycząca wpływu sposobu odżywiania na zdrowie, przyczynia się do coraz większego zainteresowania informacjami umieszczanymi na opakowaniach produktów żywnościowych. Informacje te pomagają zrozumieć konsumentom, w jaki sposób spożywana przez nich żywność może wpłynąć na ich zdrowie i samopoczucie oraz pomóc w doborze prawidłowo zbilansowanego żywienia (Olejniczak 2018). Bardzo ważną pod tym względem jest edukacja konsumentów, aby potrafili w odpowiedni sposób odczytać oraz właściwie zrozumieć umieszczone na opakowaniu informacje (Krasnowska i Salejda 2011).

Istotny, ze względu na ochronę konsumentów na rynku żywności, akt prawny, stanowi Rozporządzenie (WE) nr 1924/2006 r. Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 20 grudnia 2006 r. w sprawie oświadczeń żywieniowych i zdrowotnych. Jego celem jest przede wszystkim zapewnienie skutecznej ochrony konsumentów przed błędnymi informacjami umieszczanymi dodatkowo przez producentów żywności na etykietach lub w reklamie żywności oraz zminimalizowanie stopnia nieuczciwej konkurencji w zakresie produkcji żywności (Ozimek 2012). W rozporządzeniu tym zdefiniowano „oświadczenie” jako: „każdy komunikat lub przedstawienie, które, zgodnie z przepisami wspólnotowymi lub krajowymi, nie są obowiązkowe, łącznie z przedstawieniem obrazkowym, graficznym lub symbolicznym w jakiegokolwiek formie, które stwierdza, sugeruje lub daje do zrozumienia, że żywność ma szczególne właściwości”. Występują dwa typy oświadczeń: żywieniowe i zdrowotne. Zgodnie z art. 2 ust. 2 pkt 4 wyżej wymienionego rozporządzenia, oświadczeniem żywieniowym jest „każde oświadczenie, które stwierdza, sugeruje lub daje do zrozumienia, że dana żywność ma szczególne

właściwości odżywcze ze względu na: energię (wartość kaloryczną), której dostarcza, dostarcza w zmniejszonej lub zwiększonej ilości; lub nie dostarcza, bądź substancje odżywcze lub inne substancje, które zawiera, które zawiera w zwiększonej lub zmniejszonej ilości lub których nie zawiera”. Z kolei, według art. 2 ust. 2 pkt. 5 tego rozporządzenia, oświadczenie zdrowotne to „każde oświadczenie, które stwierdza, sugeruje lub daje do zrozumienia, że istnieje związek pomiędzy kategorią żywności, daną żywnością lub jednym z jej składników a zdrowiem”. Oświadczenia zdrowotne stanowią ten rodzaj oświadczeń, na podstawie których stwierdza się, że produkt albo zawarte w nim składniki mogą pozytywnie wpływać na zdrowie, zapobiegać chorobom czy pomagać w ich leczeniu (Śmiechowska 2012). Dotyczą one wpływu danego składnika na fizjologię organizmu, np. „wapń uczestniczy w budowie mocnych kości”. Takie oświadczenie powinno opierać się na powszechnie zaakceptowanych oraz prawidłowo rozumianych przez przeciętnego konsumenta dowodach naukowych (Krysztofiak i Bilaska 2011). Z kolei przykładem oświadczeń żywieniowych mogą być wyrażenia, bądź wyrazy, które odnoszą się do zawartości danego składnika w produkcie, np. „niska zawartość”, „nie zawiera”, „bogaty w”, „źródło”, „bez dodatku” oraz ogólne stwierdzenia charakteryzujące produkt, np. „naturalny” czy „lekki”. Oświadczenia żywieniowe podkreślają jedynie fakt zawartości składników odżywczych bez wyjaśnienia, jaką pełnią funkcję w organizmie. Dla konsumentów są to tylko komunikaty podkreślające konkretne atrybuty danego produktu, które w innych okolicznościach mogłyby pozostać nieznanne (Oziemek i Przeździecka-Czyżewska 2017).

Oświadczenia żywieniowe i zdrowotne przemawiają za rozwojem rynku żywności prozdrowotnej, jednak praktyka rynku nie zawsze jest uczciwa i rzetelna. Praktyka rynkowa, która może wprowadzać konsumentów w błąd, występuje w momencie, gdy powstałe na jej podstawie wyobrażenia, które przyczyniły się do nabycia danego towaru, nie są zgodne ze stanem rzeczywistym. Wprowadzenie w błąd poprzez praktykę rynkową zawsze ma na celu wytworzenie w świadomości konsumenta mylnego obrazu rzeczywistości. Skutkiem tego jest uniemożliwienie przeciętnemu konsumentowi dokonania świadomego, a zatem również efektywnego wyboru (Sieradzka 2008). Istotne jest, iż wprowadzać konsumenta w błąd może zarówno podawanie informacji nieprawdziwych (fałszywych), ale również podanie informacji prawdziwej, jednak w taki sposób, że może to wprowadzić w błąd. Zatem praktykę wprowadzającą w błąd stanowi między innymi wskazywanie na unikatowe właściwości danego produktu w sytuacji, gdy tego samego rodzaju produkty konkurencyjne charakteryzują się tymi samymi cechami (Wojciechowski 2018). Innym przykładem są oświadczenia żywieniowe o niskiej zawartości tłuszczu, które mogą przyczynić się do pozwolenia sobie przez konsumentów na spożywanie większej porcji produktu, co w skutku prowadzi do podwyższonego pobrania energii (Bryła 2020). Odpowiednie wykorzystanie tych informacji przez konsumenta wymaga ich zrozumienia oraz właściwej interpretacji w kontekście potrzeb żywieniowych organizmu (Nieżurawski i Sobków 2015).

Cel pracy

Celem pracy było określenie świadomości konsumentów wobec zachowań producentów żywności, którzy stosują oświadczenia żywieniowe i zdrowotne na opakowaniach produktów żywnościowych.

Materiały i metody

Badanie przeprowadzono w maju 2021 roku z wykorzystaniem kwestionariusza ankiety wśród 150 osób zróżnicowanych pod względem płci, wieku oraz miejsca zamieszkania.

Ankieta składała się z 12 pytań i metryczki. Odpowiedzi na zadane pytania sformułowane były w formie zamkniętej, a odpowiadający mógł wybrać tylko jedną z opcji. Dotyczyły między innymi ilości, zrozumiałości, wiarygodności, znaczenia oraz treści oświadczeń. Zbadano wpływ tychże informacji na decyzje nabywcze oraz skłonność do zapłacenia wyższej ceny. Ankieta została przeprowadzona w sposób anonimowy. Otrzymane dane zliczono, a wyniki przedstawiono w formie opisowej, tabel oraz wykresów. Wyniki badań zostały opracowane przy pomocy arkusza kalkulacyjnego Microsoft Office Excel.

Wyniki badań i dyskusja

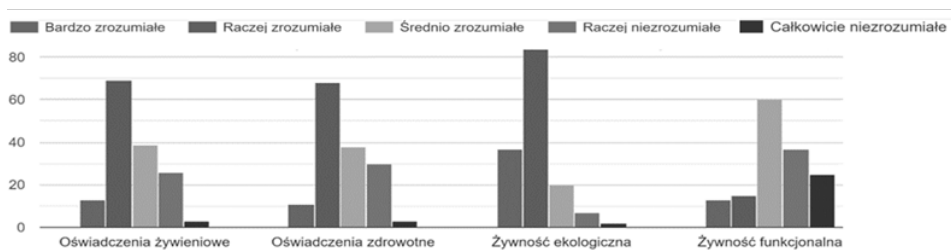
W badaniu ankietowym wzięło udział 150 osób, z których 60% stanowiły kobiety, zaś 40% mężczyźni. Większość respondentów stanowiły osoby w wieku 18–25 lat (49,3%) oraz w wieku 26–40 lat (26,7%), zaś najmniejsze grono badanych stanowiły osoby w wieku 41–50 lat (6,6%) i powyżej 50 lat (0,7%). Ponad połowa ankietowanych (60,7%) pochodziła z miasta, a pozostali ze wsi (39,3%). Najliczniejszą grupę badanych stanowiły osoby z wykształceniem średnim oraz podstawowym, odpowiednio 48,7% i 18% (Tab.1).

Pierwsze zadane pytanie dotyczyło zrozumienia przez konsumentów wybranych typów określeń dotyczących produktów żywnościowych. Ocenie podlegały cztery typy określeń: oświadczenia żywieniowe, oświadczenia zdrowotne, żywność ekologiczna oraz żywność funkcjonalna. Ankietowani najczęściej wskazywali, że te określenia są dla nich „raczej zrozumiałe”, z wyjątkiem żywności funkcjonalnej, gdzie większa grupa badanych wybrała odpowiedź „średnio zrozumiałe”. To pojęcie było najslabiej rozumiane przez konsumentów, o czym świadczył dość duży udział odpowiedzi: „raczej niezrozumiałe” (24,6%) i „całkowicie niezrozumiałe” (16,6%) (Wyk. 1). Wyniki te ko-

Tabela 1. Charakterystyka respondentów

Cechy populacji	Grupy	Respondenci	
		Liczba	Odsetek (%)
Ogółem		150	100
Płeć	kobiety	90	60
	mężczyźni	60	40
Wiek	poniżej 18 lat	25	16,7
	18–25 lat	74	49,3
	26–40 lat	40	26,7
	41–50 lat	10	6,6
	powyżej 50 lat	1	0,7
Miejsce zamieszkania	wieś	59	39,3
	miasto	91	60,7
Wykształcenie	podstawowe	27	18
	zawodowe	24	16
	średnie	73	48,7
	wyższe	26	17,3

Źródło: Opracowanie własne.

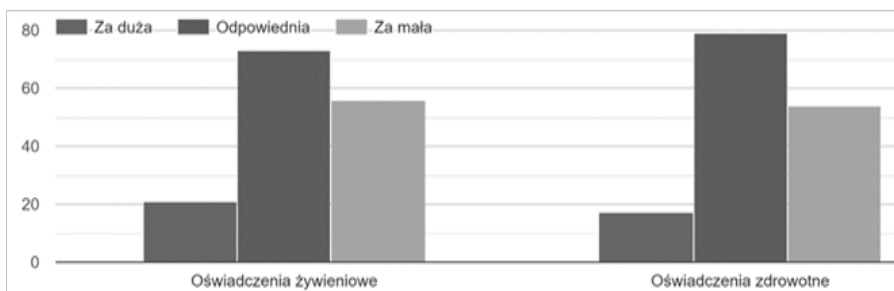


Wykres 1. Stopień zrozumienia wybranych określeń dotyczących produktów żywnościowych

Źródło: Opracowanie własne.

respondują z danymi uzyskanymi przez Bryłę (2018), w których stosunkowo rozumiała była informacja o żywności ekologicznej, a niezrozumiała dotycząca żywności funkcjonalnej. Warto podkreślić fakt, że nie każdy, kto kupuje żywność np. z oświadczeniem zdrowotnym, jest świadomy tego, że jest to również żywność funkcjonalna.

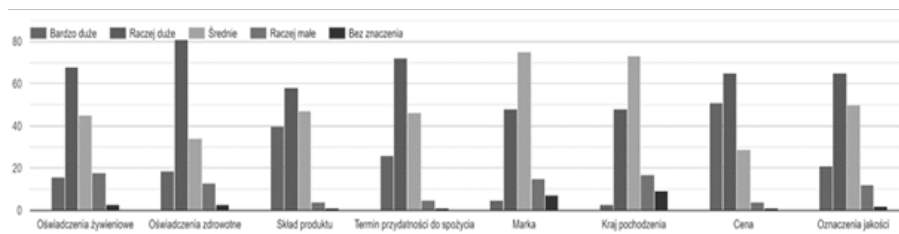
Kolejne pytanie dotyczyło oceny ilości umieszczanych oświadczeń żywieniowych i zdrowotnych na opakowaniach produktów żywnościowych. Większość ankietowanych, zarówno w przypadku oświadczeń żywieniowych (48,7%), jak i zdrowotnych (52,7%), uznała, że ich ilość na opakowaniach produktów żywnościowych jest odpowiednia. Ponad 37% respondentów stwierdziło, że oświadczeń żywieniowych jest zbyt mało na opakowaniach produktów żywnościowych, z kolei oświadczeń zdrowotnych 36% (Wyk. 2).



Wykres 2. Ocena ilości oświadczeń żywieniowych i zdrowotnych na opakowaniach produktów żywnościowych

Źródło: Opracowanie własne.

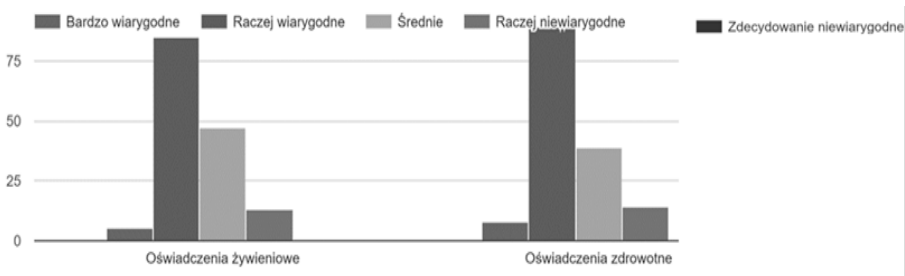
W kolejnym pytaniu poproszono ankietowanych o wskazanie, jakie znaczenie mają dla nich wybrane typy informacji umieszczane na opakowaniach produktów żywnościowych. Ocenie poddano 8 typów informacji: oświadczenia żywieniowe, oświadczenia zdrowotne, skład produktu, termin przydatności do spożycia, marka, kraj pochodzenia, cena oraz oznaczenia jakości. Bardzo duże znaczenie ankietowani przypisywali cenie (34%), składowi produktu (26,6%) oraz terminowi przydatności do spożycia (17,3%). W stosunku do oświadczeń żywieniowych, większe znaczenie mają dla respondentów oświadczenia zdrowotne. Najrzadziej bardzo duże znaczenie respondenci przypisywali marce (0,03%) oraz krajowi pochodzenia produktu (0,02%) (Wyk. 3). Podobne wyniki uzyskano również w badaniach przeprowadzonych przez Niewczas (2011), w których stwierdzono, że konsumenci w pierwszej kolejności zwracają uwagę na termin przydatności do spożycia, cenę oraz skład produktu, z kolei nieznaczna jest dla nich rola komunikatów o wartości odżywczej, certyfikacji jakości oraz obecności GMO.



Wykres 3. Znaczenie wybranych typów informacji umieszczanych na opakowaniach produktów żywnościowych

Źródło: Opracowanie własne.

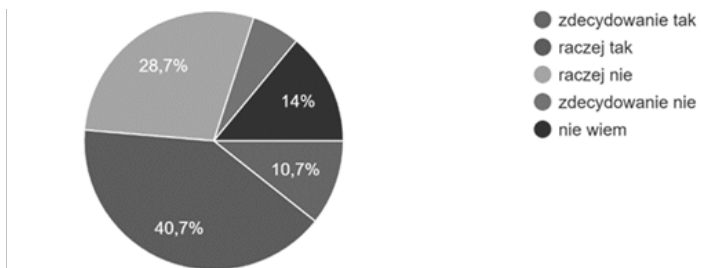
Respondentów zapytano również o wiarygodność oświadczeń żywieniowych i zdrowotnych na opakowaniach produktów żywnościowych. Ankietowani, zarówno w przypadku oświadczeń żywieniowych jak i zdrowotnych, zazwyczaj odpowiadali, że te informacje są dla nich raczej wiarygodne (Wyk. 4).



Wykres 4. Wiarygodność informacji na opakowaniach produktów żywnościowych

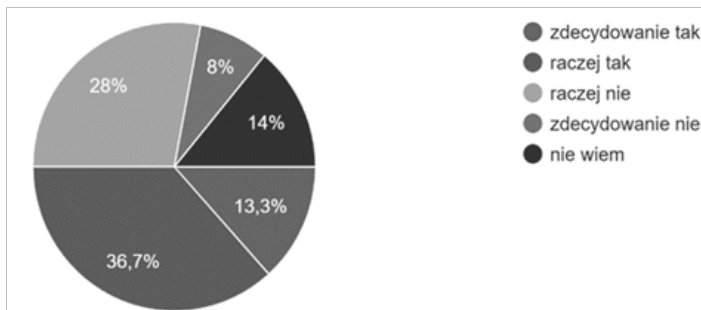
Źródło: Opracowanie własne.

W kolejnym pytaniu zbadano skłonność konsumentów do zapłacenia wyższej ceny za produkty z oświadczeniami żywieniowymi i zdrowotnymi, w porównaniu z podobnymi produktami bez takich oświadczeń. Najwięcej ankietowanych, zarówno w przypadku oświadczeń żywieniowych (40,7%), jak i zdrowotnych (36,7%), odpowiedziało, że są raczej skłonni do zapłacenia wyższej ceny za produkty spożywcze z tego typu informacjami (Wyk. 5 i 6).



Wykres 5. Skłonność do zapłacenia wyższej ceny za produkty z oświadczeniami żywieniowymi i zdrowotnymi

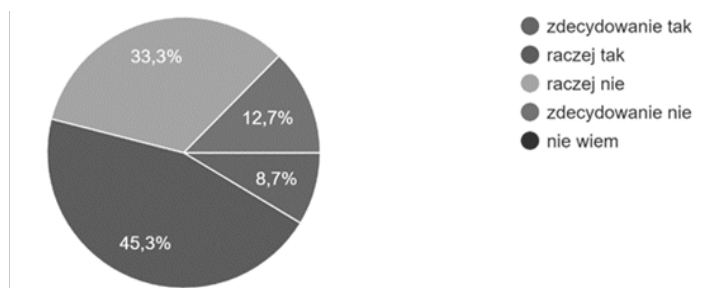
Źródło: Opracowanie własne.



Wykres 6. Skłonność do zapłacenia wyższej ceny za produkty z oświadczeniami żywieniowymi i zdrowotnymi

Źródło: Opracowanie własne.

Ankietowani, na pytanie *Czy oświadczenia żywieniowe na produktach mleczarskich mówiące, że produkt ten zawiera wapń w większym stopniu, wpływają na Pani/Pana chęć zakupu?*, w największej ilości (54%) odpowiedzieli twierdząco, wskazując odpowiedź „raczej tak” (45,3%) oraz „zdecydowanie tak” (8,7%). Co trzeci ankietowany (33,3%) stwierdził, że raczej nie wpływa to na jego decyzje dotyczące zakupu produktów spożywczych (Wyk. 7). Warto podkreślić, że prawie wszystkie produkty mleczarskie są źródłem wapnia, więc to stwierdzenie nie powinno wzbudzać wśród konsumentów podwyższonej percepcji zdrowotności w stosunku do produktów mleczarskich, które nie zawierają tego oświadczenia, jednak tylko 12,7% ankietowanych było pewnych zabiegu, które producenci celowo dokonują, aby zachęcić konsumentów do zakupu danej grupy żywności.

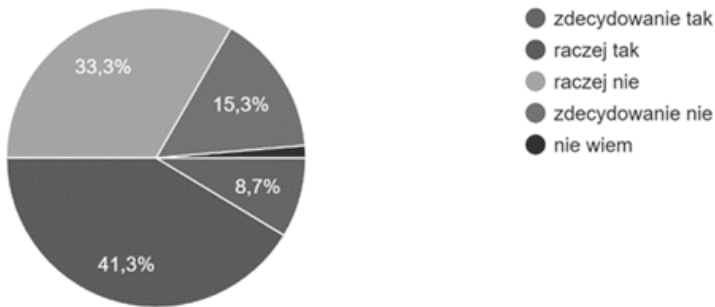


Wykres 7. Wpływ oświadczenia żywieniowego na produkcie mleczarskim wskazującego na to, że produkt zawiera wapń na większą skłonność do zakupu tego produktu

Źródło: Opracowanie własne.

Respondentów zapytano również o to, czy według nich produkty opatrzone oświadczeniami żywieniowymi „light” są zawsze niskokaloryczne. Połowa ankietowanych odpowiedziała na to pytanie twierdząco, poprzez wskazanie odpowiedzi „raczej tak” (41,3%) oraz „zdecydowanie tak” (8,7%). Mniej niż połowa respondentów (48,6%) uważa, że produkty zawierające oświadczenie żywieniowe „light” nie zawsze są niskokaloryczne. Co trzeci ankietowany (33%) sądzi, że „raczej” nie zawsze jest prawdą, z kolei 15,3% osób jest tego pewnych (Wyk. 8). Według Szczepańskiej i Grudowskiej (2020), grupa produktów spożywczych typu „light” sugeruje konsumentom, że produkt zawiera obniżoną wartość energetyczną, jednak rzeczywista wartość energetyczna może być zupełnie inna od oczekiwanej. Warto podkreślić, że wybierając produkt spożywczy i oceniając jego wartość odżywczą należy wziąć pod uwagę nie tylko jego wartość energetyczną, ale również zawartość poszczególnych składników odżywczych. Producenci żywności bardzo często, w celu obniżenia zawartości tłuszczu czy cukru w produkcie, dodają inne substancje, które mogą spowodować, że produkt będzie wysokokaloryczny.

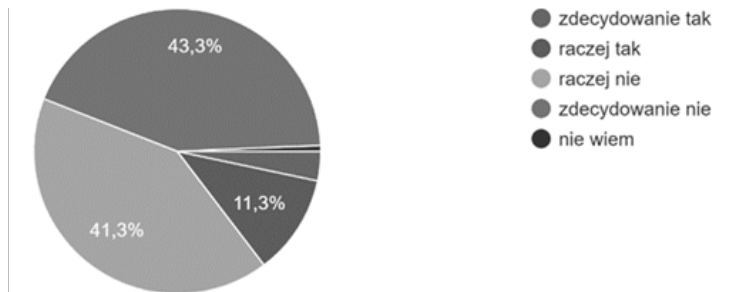
Następne pytanie miało na celu zbadanie preferencji konsumentów odnośnie umieszczania na opakowaniu przez producenta oświadczeń w formie długich, złożonych sformułowań naukowych lub cytatów z publikacji naukowych. Zdecydowana



Wykres 8. Opinia respondentów na temat, czy zawsze produkty opatrzone oświadczeniem żywieniowym „light” są niskokaloryczne

Źródło: Opracowanie własne.

większość ankietowanych (84,6%) nie preferuje takiego zjawiska. Za ledwie 11,3% badanych odpowiedziało, że raczej chciałoby, aby oświadczenia pojawiały się w takiej formie, z kolei tylko 5% respondentów zdecydowanie oczekuje takiego zjawiska (Wyk. 9).



Wykres 9. Preferencje konsumentów dotyczące umieszczania na opakowaniu przez producenta oświadczeń w formie długich, złożonych sformułowań naukowych lub cytatów z publikacji naukowych

Źródło: Opracowanie własne.

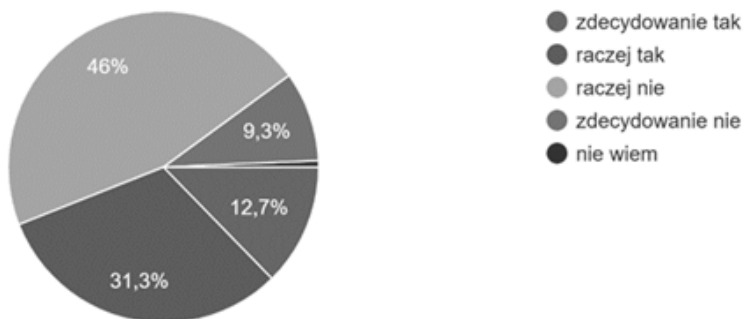
Respondentów zapytano również o to, co myślą na temat określeń typu „fit”, „fitness” czy „slim”, znajdujących się na etykietach produktów spożywczych. Według Derewiaka i in. (2013), informacje te mogą błędnie sugerować, że spożycie danych środków spożywczych wiąże się z niską kalorycznością produktu, umożliwiającą utrzymanie szczupłej sylwetki. Badania wykazały jednak, że znaczny odsetek respondentów (40%) uważa, że zawsze zawierają one mniej kalorii od innych tego typu produktów. Co trzeci ankietowany (33,3%) twierdzi, że są to zazwyczaj zwykłe produkty spożywcze opatrzone chwytliwym hasłem. Mniejszy odsetek respondentów (25,3%) sądzi, że produkty spożywcze z tymi określeniami nie zawsze są niskokaloryczne i mogą być chwytym marketingowym producenta (Wyk. 10).



Wykres 10. Opinia konsumentów na temat określeń typu „fit”, „fitness” czy „slim”, znajdujących się na etykietach produktów żywnościowych

Źródło: Opracowanie własne.

Na pytanie *Czy jeśli na opakowaniu produktu spożywczego występują oświadczenia żywieniowe np.: „niska zawartość tłuszczu” to czy mimo wszystko Pani/Pan zwraca uwagę na wartość odżywczą umieszczoną na etykiecie produktu spożywczego?* większość ankietowanych odpowiedziało przecząco, odpowiednio „raczej nie” (46%) i „zdecydowanie nie” (9,3%). Mniejszy odsetek respondentów (31,3%) raczej zwraca uwagę na te informacje, z kolei 12,7% badanych zdecydowanie sprawdza tabelę wartości odżywczej, pomimo występowania na opakowaniu produktów spożywczych oświadczeń (Wyk. 11). Konsumenty, mimo świadomości, że na opakowaniu występuje tabela wartości odżywczej, bardzo często nie zwracają na nią uwagi. Warto podkreślić, że nawet jeśli na opakowaniu produktu występuje oświadczenie żywieniowe np. „niska zawartość tłuszczu”, to nie oznacza to zawsze, że produkt jest niskokaloryczny. Bardzo często producenci, w celu obniżenia zawartości tłuszczu w produkcie, stosują dodatek cukru, który podwyższa wartość energetyczną produktu. Dlatego ważne jest, aby świadomy

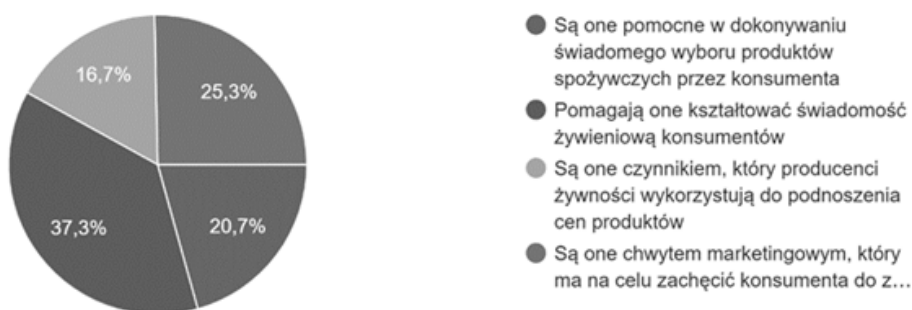


Wyk. 11. Zainteresowanie respondentów wartością odżywczą umieszczoną na etykiecie produktu spożywczego pomimo występowania na opakowaniu oświadczenia żywieniowego np.: „niska zawartość tłuszczu”

Źródło: Opracowanie własne.

konsument zawsze zwracał uwagę na tabelę wartości odżywczej, znajdującą się na opakowaniu produktu spożywczego.

W ostatnim pytaniu zbadano opinie konsumentów na temat oświadczeń żywieniowych i zdrowotnych. Najwięcej respondentów (37,3%) uważa, że tego typu informacje są pomocne w kształtowaniu świadomości żywieniowej konsumentów. Mniejsza grupa (25,7%) twierdzi, że są one chwytem marketingowym, który ma na celu zachęcić konsumenta do zakupu, natomiast 20,7% ankietowanych sądzi, że są one pomocne w dokonywaniu świadomego wyboru produktów spożywczych przez konsumenta. Najmniejsza liczba respondentów (16,7%) stwierdziła, że są one czynnikiem, który producenci żywności wykorzystują do podnoszenia cen produktów (Wy. 12). Również badania Szkiel (2018) pokazują, że konsumenci mają pozytywny stosunek do tego typu informacji, postrzegając je jako narzędzie ułatwiające podejmowanie świadomych wyborów produktów spożywczych oraz kształtujących świadomość żywieniową konsumentów.



Wykres 12. Opinia konsumentów na temat oświadczeń żywieniowych i zdrowotnych

Źródło: Opracowanie własne.

Podsumowanie

Producenci żywności, stosujący oświadczenia żywieniowe i zdrowotne, są zobligowani do przestrzegania odpowiednich regulacji prawnych oraz podawania prawdziwych informacji na etykiecie produktu spożywczego. Mimo tego, bardzo powszechnym zjawiskiem staje się wytwarzanie w świadomości konsumentów mylnego obrazu rzeczywistości, poprzez stosowanie informacji prawdziwych, jednak podanych w taki sposób, że mogą one wprowadzać w błąd. Dlatego też konsument powinien rozumieć informacje zamieszczone na etykiecie produktu oraz właściwie je interpretować, co ściśle związane jest z jego edukacją w tym zakresie. Przeprowadzone badania pokazały, że poziom wiedzy respondentów na temat praktyki rynkowej producentów żywności, stosujących oświadczenia żywieniowe i zdrowotne, nie jest zadowalający. Ankietowani

nie zawsze właściwie interpretują informacje umieszczane przez producentów żywności na etykietach produktów spożywczych. Bardzo często nie zwracają uwagi na wartość odżywczą produktu i sugerują się jedynie oświadczeniami, bez analizy zawartości poszczególnych składników.

Literatura

- Bryła P. 2020. Oświadczenia zdrowotne i żywieniowe na rynku produktów żywnościowych., Łódź.
- Derewiaka D, Sobiecka A, Ciecierska M, Drużyńska B, Majewska E, Kowalska J. 2013. Charakterystyka wybranej żywności o obniżonej kaloryczności. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, s. 70-74.
- Krasnowska G, Salejda A.M. 2011. Ocena wiedzy konsumentów na temat znakowania żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 1(74), 173-189.
- Krysztofiak K, Bilaska A. 2011. Zasady znakowania produktów spożywczych. *Nauka Przyroda Technologie*, 5(3): 17.
- Niewczas M. 2011. Kryteria wyboru żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, nr 6, 204-219.
- Nieźurawski L, Sobków C. 2015. Rola informacji na etykietach w procesie zakupu produktu żywnościowego. *Stowarzyszenie Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu. Roczniki Naukowe*, 17(3): 290-296.
- Olejniczak M. 2018. Postrzeganie atrybutów produktów żywnościowych opatrzone oświadczeniami żywieniowymi i zdrowotnymi. *Handel wewnętrzny*, 5(376): 225-235.
- Ozimek I, Przeździecka-Czyżewska N. 2017. Oświadczenia żywieniowe i zdrowotne w regulacjach prawnych i opinii konsumentów. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 24, 1 (110), 5-17.
- Ozimek I. 2012. Ochrona konsumentów na rynku żywności – wybrane aspekty, „Konsumpcja i Rozwój”, nr 1(2), s. 61-70.
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady UE nr 1924/2006 w sprawie oświadczeń żywieniowych i zdrowotnych dotyczących żywności; (Dz. U. UE z 2006 r., L 404, poz. 9).
- Sieradzka M. 2008. Ustawa o przeciwdziałaniu nieuczciwym praktykom rynkowym. *Komentarz*, Warszawa 2008, s. 93-94.
- Szczepańska E, Grudowska E. 2020. Consumption of light foods and drinks among adults. *Ann. Acad. Med. Siles.* 74: 68-76.
- Szkiel A. 2018. Ocena wiedzy konsumentów dotyczącej oświadczeń żywieniowych. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego w Katowicach*. Nr. 357. Zarządzenie 15.
- Śmiechowska M. 2012. Znakowanie produktów żywnościowych. *Ann. Acad. Med. Gedan.* 42, 65-73.
- Wojciechowski P. 2018. Informacja o braku zawartości określonych substancji w żywności w regulacjach prawa żywnościowego. *Przegląd Prawa Rolnego NR 1(22)*: 103-121.

Abstract

**NUTRITION AND HEALTH CLAIMS- MARKER PRACTICE AND
CONSUMER AWARENESS**

Nutrition and health claims support the development of a health food market, but market practice is not always fair and reliable. Appropriate use of this information by the consumer requires understanding and appropriate interpretation in the context of the body's nutritional needs. The aim of this study was to investigate consumer awareness of the behaviour of food producers who use nutrition and health claims on food packaging. Using an online questionnaire, the quantity, readability, credibility, meaning and content of the claims used were assessed. The study analysed the impact of the provided information on purchasing decisions and the willingness to pay a higher price for the product. Consumers' understanding of the information contained in product labels, their opinions and preferences were determined. As a result of the conducted research, it was found that the respondents do not always correctly interpret the information on the label of food products.

Słowa kluczowe: oświadczenia żywieniowe, oświadczenia zdrowotne, konsument

Keywords: nutrition claims, health claims, consumer

Aleksandra Rzymska

Anna Polakowska

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Nauki o Żywności

Koło Naukowe Technologów Przetwórstwa Surowców Roślinnych

Opiekun: dr hab. inż. Małgorzata Tańska, prof. UWM

WODY ROŚLINNE DOSTĘPNE NA RYNKU – RODZAJE I WŁAŚCIWOŚCI

Wstęp

W ostatnim czasie coraz częściej obserwuje się wzrastające zainteresowanie konsumentów zdrowym odżywianiem oraz aktywnym trybem życia. Zaczynają oni poszukiwać produktów jak najmniej przetworzonych, charakteryzujących się odpowiednim składem oraz właściwościami prozdrowotnymi, a także niską zawartością cukrów. Do takiego typu produktów można zaliczyć wody roślinne. Rynek wód roślinnych wciąż się rozwija ze względu na wzmożone zainteresowanie tymi produktami w Polsce oraz zagranicą (Bogacz 2018). Pojęcie „wody roślinne” zazwyczaj uważa się za dobry chwyt marketingowy, gdyż sprawia wrażenie, że produkt jest w pełni naturalny. Wody roślinne to inaczej wody funkcjonalne pozyskiwane ze specjalnych surowców pochodzenia roślinnego, których właściwości nadają produktowi charakter żywności funkcjonalnej, czyli takiej, która poza efektem odżywczym wywołuje korzystny wpływ na jedną lub więcej funkcji organizmu (Diplock 1999). Są one wodami alternatywnymi, które można pić ze względu na ich cenne właściwości, są bowiem produkowane z roślin, będących bogatym źródłem składników mineralnych. Warto wspomnieć, że nie ma standardowej definicji wody roślinnej i w zależności od rodzaju produktu wartość odżywcza podawana na etykiecie może być lub nie zgodna z regulacjami Agencji Żywności i Leków, FDA (Best Food Facts 2021).

Wody roślinne można podzielić na dwie kategorie: wody uzyskane z jednego surowca oraz wody produkowane na bazie ekstraktów roślinnych i surowców pochodzenia roślinnego oraz/lub witamin. Do kategorii pierwszej zalicza się najbardziej popular-

na wśród wszystkich woda kokosowa, a także woda klonowa, kaktusowa, brzoźowa, bambusowa, arbuzowa, różana i inne. Z kolei wody należące do drugiej grupy to np.: woda z ekstraktem z hibiskusa, moringi, rooibosa, grejpfruta, bzu itp. (Bogacz 2018).

Cel

Celem pracy było przedstawienie dostępności na rynku polskim oraz zagranicznym asortymentu wód roślinnych, ich rodzajów oraz właściwości.

Materiał badawczy i metody

Analizie poddano wody kokosowe, klonowe, kaktusowe, brzoźowe, bambusowe, arbuzowe, różane oraz wody z ekstraktem z hibiskusa, moringi i rooibos dostępne na polskim oraz zagranicznym rynku. Charakterystyki opisowej dokonano, uwzględniając walory zdrowotne wód roślinnych i możliwości ich zakupu w polskich sklepach stacjonarnych, jak również w sklepach internetowych, w tym zagranicznych. Przeprowadzona analiza polegała na porównaniu składu oraz cen wód roślinnych w zależności od danego sklepu oraz rodzaju wody i jej pojemności. Asortyment wód roślinnych przeanalizowano, korzystając z wód dostępnych w sześciu supermarketach na terenie Olsztyna oraz Pasłęka (Auchan, Biedronka, Lidl, Netto, Polomarket, Delikatesy Dwójka), a także wód dostępnych na stronach internetowych (wykaz adresów stron w tabelach) oraz na zagranicznych stronach internetowych (wykaz adresów stron w tabelach).

Wyniki i dyskusja

Woda kokosowa (inaczej zwana sokiem z kokosa) to półprzezroczysty, klarowny płyn, który otrzymuje się z zielonych kokosów. Często spożywana jest jako orzeźwiający napój (Preetha i in. 2012). Niektórzy mylą ją z mlekiem kokosowym, które różni się tym, że jest oleistym, białym płynem pozyskanym z rozartego, świeżego jądra rośliny (Prades i in. 2012a). Natomiast woda kokosowa zazwyczaj pozyskiwana jest z małych, nielicznych plantacji drzew kokosowych w krajach tropikalnych i subtropikalnych. Z tego też względu nadal pozostaje bardziej tradycyjnym i niedostatecznie jeszcze wykorzystywanym produktem. W ludowym leczeniu woda kokosowa stosowana jest na wiele dolegliwości, m.in. bóle głowy, gorączkę, biegunkę, zaburzenia żołądkowe. Ze względu na bogactwo elektrolitów we wnętrzu orzecha kokosowego wykorzystuje się

ją jako napój izotoniczny dla dzieci w wczesnej fazie biegunki lub dla dorosłych po intensywnym wysiłku fizycznym (Jessa, Hozyasz 2015). Ponadto wodę z kokosa można stosować w celu wzmocnienia serca, a ciężarne kobiety chętnie ją spożywają, wierząc, że da ona im dzieciom siłę oraz witalność (Ahuja i in. 2014). Należy jednak zwracać uwagę na skład wody kokosowej, ponieważ charakteryzuje się on dużą zmiennością, głównie w odniesieniu do: stężenia glukozy, sodu, osmolalności na różnych etapach dojrzewania kokosa, stąd też żywieniowcy nie polecają jej jako napoju nawadniającego (Jessa, Hozyasz 2015). Mimo to woda kokosowa cechuje się wieloma korzystnymi właściwościami, m.in. ma działanie przeciwutleniające i przeciwwzapalne.

Proces produkcji wody kokosowej jest skomplikowany ze względów technicznych, ponieważ woda kokosowa charakteryzuje się wysoką wrażliwością na warunki atmosferyczne. Palmy kokosowe muszą być zbierane w odpowiednim stadium dojrzałości oraz przy odpowiednich warunkach. Niedojrzałe owoce zazwyczaj spożywa się po zbiorze, są sprzedawane na rynek lokalny, ale też wysyłane do innych krajów po wcześniejszej obróbce termicznej. Woda kokosowa znajdująca się we wnętrzu owoców kokosa jest sterylna tak długo, jak pozostaje w orzechu, jednak jest bardzo trudna do przechowywania. Niedojrzałe owoce poddaje się czyszczeniu bądź płukaniu, a gdy kokos pęka, uzyskuje się świeżą wodę kokosową. W celu zapewnienia jej dłuższej trwałości należy stosować kilka dodatkowych procesów: filtrację i/lub odwirowanie. Po procesie filtracji/odwirowania odfiltrowaną świeżą wodę kokosową poddaje się chłodzeniu albo zamrażaniu, po czym uzyskuje się schłodzoną bądź zamrożoną wodę kokosową. Po filtracji można produkt poddać dodatkowo pasteryzacji, sterylizacji lub mikrofiltracji/ultrafiltracji, a dzięki karbonizacji (saturacji) oraz rozlewaniu, puszkowaniu i napełnianiu na gorąco uzyskać: schłodzoną pasteryzowaną wodę kokosową, gazowaną wodę kokosową, wodę HTST, mikrofiltrowaną wodę z kokosa (Prades i in. 2012b).

W tabeli 1 przedstawiono porównanie wód kokosowych dostępnych na polskim rynku, w supermarketach na terenie Olsztyna oraz Pasłęka. Analiza asortymentu wód roślinnych w supermarketach stacjonarnych wykazała, że woda kokosowa jest popularnym produktem wytworzonym z kokosa i można ją zakupić w różnych wariantach pojemnościowych, stąd też w tabeli zostało przedstawione porównanie składu wody w zależności od jej pojemności i ceny. Woda kokosowa może zostać wyprodukowana jako gazowana, może też zawierać dodatki smakowe, jak np.: dodatek soku arburowego czy ananasowego. Cena pojedynczego produktu waha się od 9,98 zł do 18,58 zł za 1000 ml produktu. Warto zauważyć, że wszystkie przedstawione produkty są w pełni naturalne i wyprodukowane z młodych kokosów, a nie z koncentratu wody kokosowej, co ma istotne znaczenie z perspektywy żywieniowej, ponieważ woda z koncentratu traci składniki odżywcze. W każdej z przedstawionych wód dominują węglowodany i to właśnie nim woda zawdzięcza swój unikatowy smak.

Woda aloesowa w swoim składzie zawiera witaminę C, jest więc naturalnym środkiem przeczyszczającym i jest przydatna do kontrolowania poziomu cukru we krwi. Charakteryzuje się cierpkim smakiem, powinna być spożywana podczas aktywności

Tabela 1. Porównanie asortymentu wód kokosowych dostępnych na polskim rynku w supermarketach na terenie Olsztyna oraz Pasłęka
 Table 1. Comparison of the assortment of coconut water available on the Polish market in supermarkets in Olsztyn and Pasłęk

Nazwa	Pojemność	Cena	Cena wyrobu w przeliczeniu na 1000 ml*	Składniki wyrobu oraz wartość odżywcza w 100 ml
Woda kokosowa z młodego kokosa. Produkt pasteryzowany (GoHigher! Coconaut® Pure young coconut water)	320 ml	4,15 zł	12,97 zł	Woda kokosowa z młodego kokosa (99,96%), przeciwutleniacz: kwas L-askorbinowy (witamina C) Wartość energetyczna 94 kJ/22 kcal Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g Węglowodany 5,5 g w tym cukry 5,2 g Białko 0 g Sód 0,05 g
Gazowana woda kokosowa z młodego kokosa. Produkt pasteryzowany (GoHigher! Coconaut® Sparkling young coconut water)	320 ml	3,99 zł	12,47 zł	Woda kokosowa z młodego kokosa (99,36%), dwutlenek węgla (0,6%), przeciwutleniacz: kwas L-askorbinowy (witamina C) Wartość energetyczna 94 kJ/22 kcal Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g Węglowodany 5,5 g w tym cukry 5,3 g Białko 0 g Sód 0,06 g

Woda kokosowa z młodego kokosa z sokiem arbuzowym. Produkt pasteryzowany (GoHigher! Coconut® Young coconut water with watermelon juice)	320 ml	3,99 zł	12,47 zł	Woda kokosowa z młodego kokosa (90%), sok arbuzowy NFC (10%). Wartość energetyczna 94 kJ/22 kcal Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g Węglowodany 5,5 g w tym cukry 5,0 g Białko 0 g Sól 0,08 g
Woda kokosowa z młodego kokosa z sokiem ananasowym. Produkt pasteryzowany (GoHigher! Coconut® Young coconut water with pineapple juice)	320 ml	3,99 zł	12,47 zł	Woda kokosowa z młodego kokosa (90%), sok ananasowy NFC (10%). Wartość energetyczna 102 kJ/24 kcal Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g Węglowodany 6,0 g w tym cukry 5,5 g Białko 0 g Sól 0,08 g
Napój z soku kokosowego z dodatkiem puree z mango (FOCO®. Coconut Water with mango)	500 ml	9,29 zł	18,58 zł	Sok kokosowy (woda kokosowa) 94%, puree z mango 5%, cukier, witamina C Wartość energetyczna 94 kJ/22 kcal Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g Węglowodany 5,8 g w tym cukry 4,9 g Białko 0 g Sól 0,07 g Witamina C 24 mg (30% RWS)

Nazwa	Pojemność	Cena	Cena wyrobu w przeliczeniu na 1000 ml*	Składniki wyrobu oraz wartość odżywcza w 100 ml
Sok kokosowy (woda kokosowa). Produkt sterylizowany (FOCO®. Coconut Water)	500 ml	7,89 zł	15,78 zł	Woda kokosowa 100% Wartość energetyczna 88 kJ/21 kcal Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g Węglowodany 5,2 g w tym cukry 5,0 g Białko 0 g Sód 0,05 g
Naturalna woda kokosowa z wnętrza młodych zielonych kokosów (Thaicoco. Pure Coconut Water Premium)	520 ml	5,99 zł	11,52 zł	Woda kokosowa 100% Wartość energetyczna 71 kJ/17 kcal Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g Węglowodany 4,3 g w tym cukry 2,7 g Białko 0 g Sód 0,05 g
Woda kokosowa. Produkt pasteryzowany (Solevita® Coconut Water not from concentrate)	500 ml	4,99 zł	9,98 zł	100% woda kokosowa Wartość energetyczna 63 kJ/15 kcal Tłuszcz < 0,5 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone < 0,1 g Węglowodany 2,9 g w tym cukry 1,7 g Białko < 0,5 g Sód 0,05 g

Woda kokosowa 100% NFC – nie z koncentratu z zielonego kokosa (Qeency)	500 ml	4,99 zł	9,98 zł	Woda z kokosa 100% (NFC – nie z koncentratu) Wartość energetyczna 97 kJ/23 kcal Tłuszcz < 0,1 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone < 0,1 g Węglowodany 5,7 g w tym cukry 5,0 g Błonnik < 0,5 g Białko < 0,3 g Sód 0,1 g Witamina C 6 mg (7,5% RWS) Potas 95 mg (4,7% RWS)
100% Ekologiczna woda kokosowa z koncentratu wody kokosowej (aquaverde® cocos pur nuss)	1000 ml	11,69 zł	11,68 zł	Woda kokosowa 100% Wartość energetyczna 79 kJ/19 kcal Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g Węglowodany 3,7 g w tym cukry 2,6 g Białko 0,7 g Sód 0,26 g

* Przeliczenia własne.

Źródło: opracowanie własne na podstawie opakowań przedstawionych produktów.

na świeżym powietrzu, pomaga w trawieniu oraz zwiększa frakcję HDL cholesterolu (Christaki, Florou-Paneri 2010). Jednakże wielu producentów dodaje do napoju aloesowego cukier trzcinowy, by zrównoważyć kwaśny smak aloesu, co sprawia, że napoje takie często charakteryzują się nieprawidłowym składem odżywczym (Eat This, Not That 2021). Przy wyborze wody aloesowej trzeba więc kierować się etykietą i podanym na niej składem, unikać tych, które zawierają dodatek cukru.

Woda kaktusowa to półprzezroczysty bladoróżowy napój, wytwarzany z kaktusów opuncji figowej. Jest pełna elektrolitów, witaminy C oraz składników mineralnych, dzięki czemu wzmacnia układ odpornościowy (Philadelphia Magazine 2021). Charakteryzuje się lekko jagodowym smakiem, zawiera przeciwutleniacze, jak np. betalainy. Opuncja znana jest z bardzo dobrego, słodkiego smaku i z silnych właściwości nawadniających, toteż napój z tego surowca jest dobrą alternatywą na radzenie sobie ze stanem po spożyciu nadmiernych ilości alkoholu etylowego, a także zapobiega utracie wody w skórze. Ponadto wpływa na regenerację mięśni po aktywności fizycznej oraz wykazuje się właściwościami przeciwzapalnymi (Bogacz 2018).

Woda klonowa (nazywana również sokiem klonowym) jest pozyskiwana z soku drzew klonowych w procesie ich gotowania i zbierania wody, która z nich wypływa. W Azji od wieków stosowana jest jako napój zdrowotny. Składa się z podobnych składników, co syrop klonowy, jednak nie zawiera cukru i jest bogata w witaminę B₂, wapń, potas, mangan, dzięki czemu wspomaga zdrowe kości (Matias i in. 2019). To niskokaloryczny, świeży i słodki napój bogaty w przeciwutleniacze oraz prebiotyki (Best Food Facts 2021). Sok klonowy zdobywa rzesze fanów ze względu na swoje właściwości i korzyści, jakie zapewnia organizmowi: sprzyja redukcji wagi, obniża ciśnienie, wzmacnia układ odpornościowy, niweluje zmęczenie (Matias i in. 2019).

Woda brzoza to napój pozyskiwany z Europy Wschodniej z soku z brzozy. Powstaje dzięki filtracji soku z korzeni drzewa brzozy. Zawiera mangan, czyli składnik mineralny wspomagający regulację prawidłowego poziomu cukru we krwi oraz strukturę kości. Ze względu na niską zawartość cukru wodę brzozową można stosować jako środek detoksykujący oraz moczopędny (Viškelis, Rubinskienė 2011). Ponadto ostatnio coraz częściej stosowanym określeniem na wodę brzozową staje się „nowa woda kokosowa”, gdyż obie te wody charakteryzują się podobnym składem. Woda brzozowa zawiera wiele składników przeciwutleniających, ma posmak łagodnej słodyczy (Best Food Facts 2021). Sok z brzozy jest znany ze względu na swoje właściwości, jak chociażby wpływ na porost włosów (wzmacnianie cebulek włosów) z uwagi na zawartość w składzie witaminy B, jak też dzięki betulinie łagodzi i zmniejsza podrażnienia skórne, działając antybakteryjnie i przeciwgrzybiczo (Bogacz 2018).

Woda arbuza zawiera dużo witamin A, C, jest dobrym źródłem potasu, błonnika, przeciwutleniaczy (likopenu), a ze względu na skład (głównie arbuza) wiąże się ze zwiększonym nawodnieniem – dlatego może być coraz częściej stosowana jako uzupełnienie naturalnej wody pitnej (Best Food Facts 2021).

Liście z bambusa od lat były stosowane w chińskiej medycynie, by przeciwdziałać gorączce, bólowi głowy czy bezsenności. Z tego względu kwestią czasu było wyprodukowanie wody bambusowej, pozyskiwanej z bambusa. Napój ten wykazuje się wieloma dobrymi właściwościami dla organizmu, ponieważ nawadnia organizm, zawiera małą ilość cukru, pobudza produkcję kolagenu – dzięki czemu powstrzymuje starzenie się organizmu (Nirmala i in. 2018).

Woda różana od lat stosowana jest w tradycyjnych lekach w Indiach oraz jako środek wzmacniający w produktach spożywczych. Ponadto wodę różaną, mającą właściwości podobne do innych preparatów z róży, stosuje się jako środek tonizujący, przeczyszczający, przeciwbakteryjny, w leczeniu bólu gardła, problemów z sercem, chorobami oczu. Wodę różaną otrzymuje się w procesie hydrodestylacji świeżych kwiatów róży (Agarwal i in. 2005). Hydrodestylacja przebiega następująco: płatki róży, np. *Rosa damascena*, zanurza się w wodzie, powstaje para wodna, a całość jest ogrzewana. Lotne składniki doprowadzone jako para do chłodnicy skraplają się i rozdzielają. Proces ten przeprowadza się w aparatach Derynga lub Clevengera. Wodę różaną można również wyprodukować, rozcieńczając wodą destylowaną olejek różany (Agarwal i in. 2005).

Coraz większym zainteresowaniem cieszy się również woda z karczocha. W jej składzie przeważają witaminy C, K, magnez, potas oraz foliany. Jest dobrym źródłem błonnika, a przez potencjał detoksykacyjny wspomaga działanie wątroby (Best Food Facts 2021). Można ją pić na zimno albo na gorąco, a ponadto jak zielona herbata (Eat This, Not That 2021).

Wody roślinne należące do drugiej grupy (wody produkowane na bazie ekstraktów roślinnych owocowych, kwiatowych) obecnie są mniej znane, ale cenione ze względu na swój skład. Jedną z firm produkującą takie produkty, jest Bolthouse Farms (Bogacz 2018). Firma wprowadziła na rynek unikalne wody o nazwie Aura Botanical Waters. Są to w 100% naturalne wody wzbogacone ziołami oraz sokami owocowymi. Wody te dostępne są w trzech zestawach smakowych: ogórek, rozmaryn i cytryna; pomarańcza i bazylika; grejpfrut i szałwia. Cena za butelkę 450 ml wynosi 1,99 \$ (7,60 zł), a w przeliczeniu na 1000 ml produktu 4,42 \$ (16,89 zł). Według deklaracji producenta produkt o nazwie Aura Botanical Waters dostarcza 50% dziennej rekomendowanej ilości witaminy B₃, B₅, B₆, B₁₂ oraz 100% witaminy C (PR Newswire 2021). W przypadku produktu o smaku ogórek-cytryna-rozmaryn, w składzie wody można wymienić sok z cytryny, kwas askorbinowy, ekstrakt z liści stewii oraz rozmarynu, co świadczy o tak znacznej zawartości witamin B i C w wyrobie (Beverage Industry 2021).

Niedawno na rynek weszła kolejna woda roślinna z tej grupy wyprodukowana przez Buxton Natural Mineral Water. Jest to woda z dodatkiem polifenoli roślinnych. Produkt stworzono na bazie wody źródlanej, polifenoli roślinnych, które zostały wyekstrahowane z ziaren zielonej kawy, magnezu oraz na bazie aromatów owocowych i ziołowych naturalnie występujących w roślinach, tak by napój zapewnił pobudzenie przez cały dzień. Wody dostępne są w trzech zestawach smakowych: cytryna, limonka i szałwia;

granat i bazylia oraz pomarańcza i rozmaryn w cenie £ 1,79 (9,50 zł) za 500 ml butelkę, a w przeliczeniu na 1000 ml wyrobu cena wynosi £ 3,58 (19,00 zł) (Talking Retail 2021).

Ciekawy przykład wód roślinnych należących do drugiej grupy stanowią wody kwiatowo-owocowe firmy Blossom Water. Są to wody smakowe do picia, które zawierają naturalne esencje kwiatowe i owocowe, są słodzone, aromatyzowane, barwione naturalnymi dodatkami. Produkty te nie zawierają glutenu, GMO, konserwantów (Bogacz 2018). Występują w pięciu smakach: mango i hibiskus, cytryna i róża, śliwka i jaśmin, granat i geranium, grejpfrut i bez. Cena jednostkowa to 2,5 \$ (9,55 zł) za 500 ml napoju (5,00 \$; 19,10 zł za 1000 ml wyrobu) (Blossom Botanical Water 2021).

Zestawione w tabeli 2 dane wskazują, że wody roślinne trafiają coraz częściej na półki sklepowe, jednak nadal ich asortyment (zaznaczając, że został porównany asortyment jedynie z większych wybranych supermarketów) jest dość skromny. W sklepach stacjonarnych dominuje woda aloesowa, choć ostatnio można zauważyć możliwości zakupu wody brzozonej czy różanej. Woda aloesowa w supermarketach występuje w kilku smakach (sok z mango, sok truskawkowy). Mimo zapewnienia producenta, że napój jest w pełni BIO, w składzie występują takie dodatki, jak: stabilizatory czy regulatory kwasowości. Pod względem składu wody aloesowe charakteryzują się dość przeciętną zawartością głównego surowca, tj. aloesu, stąd nazywane są napojami z aloesem/napojami aloesowymi. Ponadto większość przedstawionych wód aloesowych zawiera w sobie dodatkowe cukry (wg deklaracji producenta cukier trzcinowy), co sprawia, że produkt jest słodszy, ale uboższy we właściwe składniki odżywcze. Z kolei zaprezentowane wody brzozone w pełni mogą nadawać się do częstego spożycia z uwagi na dobry skład jakościowy, przede wszystkim naturalne surowce.

Analiza dostępności wód roślinnych na polskich stronach internetowych wykazała, że największym zainteresowaniem cieszą się wody kokosowe oraz brzozone (tabela 3). Ceny wszystkich wód w zależności od ich rodzajów i pojemności opakowania różnią się, jednak zawierają się w granicach od 10,88 zł za wodę kokosową 1000 ml do 103,96 zł za 1000 ml wody różanej. Tak wysoka cena wody różanej może wynikać z metod jej pozyskiwania i jak dotąd, dość niskiej popularności (poza oczywistym wykorzystaniem w kosmetyce do pielęgnacji skóry), jak również z faktu, że zawarty w wodzie ekstrakt z kwiatów róży pochodzi z upraw ekologicznych. Ponadto w przypadku niektórych produktów producent poza składem nie umieszczał na stronie informacji o jej wartości odżywczej. Najodpowiedniejszym składem cechowały się wody kokosowe oraz brzozone, ponieważ pochodziły z naturalnych surowców, bez użycia koncentratu czy dodatków wzmacniających smak, aromat. Wody aloesowe oraz arbuzy w swoim składzie zawierają wiele dodatków technologicznych, toteż takie produkty nie nadają się do częstego spożywania z uwagi na bezpieczeństwo zdrowotne.

Z kolei na zagranicznych stronach internetowych asortyment wód roślinnych jest szeroki, największym zainteresowaniem cieszy się znów woda kokosowa, ale można również zakupić mniej popularne produkty, takie jak woda kaktusowa czy klonowa (tabela 4). Produkty te są droższe aniżeli wody, które można zakupić w Polsce, jednak

Tabela 2. Porównanie asortymentu wód roślinnych innych niż woda kokosowa dostępnych na polskim rynku w supermarketach na terenie Olsztyna oraz Pasłęk

Table 2. Comparison of the assortment of plant waters other than coconut water available on the Polish market in supermarkets in Olsztyn and Pasłęk

Nazwa	Pojemność	Cena	Cena wyrobu w przeliczeniu na 1000 ml*	Składniki wyrobu oraz wartość odżywcza w 100 ml
Napój z aloesem i sokiem z mango. Zawiera cukier i substancje słodzące (Vita Aloe Premium juice & pulp 38% + 20% mango juice)	500 ml	4,09 zł	8,18 zł	Woda, sok z cząstkami miększo aloesu 38%, sok z mango 20%, cukier, fruktoza, substancje słodzące: sukraloza, glikozydy stewiolowe, regulatory kwasowości: kwas cytrynowy, cytryniany sodu, mleczan wapnia, substancja zagęszczająca: guma gellan, naturalny aromat mango, substancja wzbogająca: witamina C, barwnik: karoteny Wartość energetyczna 75 kJ/18 kcal Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g Węglowodany 4,5 g w tym cukry 4,5 g Białko 0 g Sól 0,035 g Witamina C 25 mg
Napój z aloesem i sokiem truskawkowym. Zawiera cukier i substancje słodzące (Vita Aloe Premium juice & pulp 38% + 20% strawberry juice)	500 ml	3,74 zł	7,48 zł	Woda, sok z cząstkami miększo aloesu 38%, sok truskawkowy 20%, cukier, fruktoza, substancje słodzące: sukraloza, glikozydy stewiolowe, regulatory kwasowości: kwas cytrynowy, cytryniany sodu, mleczan wapnia, substancja zagęszczająca: guma gellan, naturalny aromat truskawkowy, substancja wzbogająca: witamina C, naturalny barwnik z batatów Wartość energetyczna 75 kJ/18 kcal

Nazwa	Pojemność	Cena	Cena wyrobu w przeliczeniu na 1000 ml*	Składniki wyrobu oraz wartość odżywcza w 100 ml
Napój z aloesem. Zawiera cukier i substancje słodzące (Vita Aloe Premium juice & pulp 38%, original)	500 ml	3,74 zł	7,48 zł	<p> Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g Węglowodany 4,5 g w tym cukry 4,5 g Białko 0 g Sól 0,035 g Witamina C 25 mg </p> <p> Woda, sok z cząstkami miąższu aloesu 38%, sok winogronowy 20%, cukier, fruktoza, substancje słodzące: sukraloza, glikozydy stewiolowe, regulatory kwasowości: kwas cytrynowy, cytryniany sodu, mleczan wapnia, substancja zagęszczająca: guma gellan, naturalny aromat winogronowy, substancja wzbogacająca: witamina C </p> <p> Wartość energetyczna 75 kJ/18 kcal Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g Węglowodany 4,5 g w tym cukry 4,5 g Białko 0 g Sól 0,035 g Witamina C 25 mg </p>

Organiczny napój aloesowy BIO (Aloe organic OKF®)	500 ml	8,49 zł	16,98 zł	<p>Woda, koncentrat BIO Aloe Vera w proszku (22%), BIO Aloe Vera żel (8%), BIOcukier, naturalny aromat winogronowy, stabilizator (mleczan wapnia, guma gellan, kwas cytrynowy)</p> <p>Wartość energetyczna 105 kJ/25 kcal</p> <p>Tłuszcz 0 g</p> <p>w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g</p> <p>Węglowodany 6,0 g</p> <p>w tym cukry 5,0 g</p> <p>Białko 0 g</p> <p>Sól 0 g</p>
Napój aloesowy z cząsteczka- mi aloesu, niegazowany, paste- ryzowany, z dodatkiem soków owocowych i witaminy C, bez dodatku substancji konserwują- cych (Vitabella®)	500 ml	3,99 zł	7,98 zł	<p>Aloes 45% (sok z aloesu 16%, miąższ z aloesu 15%, żel z aloesu 14%), woda, sok jabłkowy z soku zagęszczonego (19%), sok winogronowy z soku zagęszczonego (1%) cukier trzcinowy, witamina C, aromat winogronowy</p> <p>Wartość energetyczna 87 kJ/21 kcal</p> <p>Tłuszcz 0 g</p> <p>w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g</p> <p>Węglowodany 5,0 g</p> <p>w tym cukry 5,0 g</p> <p>Błonnik < 0,1 g</p> <p>Białko < 0,1 g</p> <p>Sól 0,02 g</p> <p>Witamina C 16 mg</p>

Nazwa	Pojemność	Cena	Cena wyrobu w przeliczeniu na 1000 ml*	Składniki wyrobu oraz wartość odżywcza w 100 ml
Napój z aloesem (My Aloe. Pure Plus Original)	1500 ml	6,99 zł	4,66 zł	<p>Woda, sok z cząstkami miększo aloesu 30%, cukier trzcinowy, regulatory kwasowości: kwas cytrynowy, mleczan wapnia, cytryniany sodu, aromat, przeciwutleniacz: kwas askorbinowy, stabilizator: guma gellan, barwnik: karoteny</p> <p>Wartość energetyczna 182 kJ/44 kcal Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g Węglowodany 11,0 g w tym cukry 11,0 g Białko 0 g Sól 0,06 g</p>
Organiczny sok brzozaowy o smaku mięty. Delikatnie stearylizowany, bez konserwantów. Produkt bezglutenowy. Bez GMO. (Sip Sap Premium Quality)	330 ml	10,89 zł	33,00 zł	<p>Organiczny sok brzozaowy zebrany z brzoź w certyfikowanych lasach organicznych (96,06%), cukier organiczny (3,8%), kwas cytrynowy jako regulator kwasowości (0,1%), naturalny ekstrakt mięty (0,04%)</p> <p>Wartość energetyczna 75 kJ/18 kcal Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g Węglowodany 4,4 g w tym cukry 3,8 g Błonnik < 0,5 g Białko 0 g Sól 0 g</p>

Sok z brzozy bez dodatku cukru, pasteryzowany, bez konserwantów (Oleoform)	1000 ml	12,99 zł	12,99 zł	Sok z pnia brzozy (<i>Betula pendula</i>) (99,9%), regulator kwasowości: kwas cytrynowy Wartość energetyczna 16 kJ/4 kcal Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g Węglowodany 1,0 g w tym cukry 0,9 g Białko 0 g Sól 0 g
Woda różana (Rosenwasser Doyal®)	300 ml	10,49 zł	34,97 zł	Woda, aromat b.d.

Źródło: opracowanie własne na podstawie danych przedstawionych na konkretnej stronie internetowej, b.d. – brak danych na stronie, *przeliczenia własne.

Tabela 3. Porównanie asortymentu wód roślinnych dostępnych na polskim rynku w oparciu o dane dostępne na stronach internetowych
 Table 3. Comparison of the assortment of plant waters available on the Polish market based on data available on websites

Nazwa	Pojemność	Cena	Cena wyrobu w przeliczeniu na 1000 ml*	Składniki wyrobu oraz wartość odżywcza w 100 ml	Nazwa strony internetowej
Woda kokosowa niegazowana z collagenem (Diet-Food)	330 ml	4,99 zł	15,12 zł	Woda kokosowa, kolagen rybi (1,6%), kwas askorbinowy Wartość energetyczna 125 kJ/30 kcal Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g Węglowodany 6,1 g w tym cukry 5,5 g Białko 1,4 g Sód 0,05 g Witamina C 10 mg	https://www.doz.pl/apteka/p146343-Diet-Food_Woda_kosowa_niegazowana_z_collagenem_330_ml?tiduid=4d7b57ba127e1d3e293e7497ed7ee374&utm_medium=ZPR_ContentCommerce&utm_source=tradedoubler
Woda kokosowa niegazowana (Diet-Food. Natural cocosa)	330 ml	3,99 zł	12,09 zł	100% woda kokosowa z wnętrza miodego kokosa Wartość energetyczna 96 kJ/23 kcal Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g Węglowodany 5,8 g w tym cukry 5,3 g Błonnik 3,5 g Białko 0 g Sód 0,07 g	https://www.doz.pl/apteka/p146347-Diet-Food_Woda_kosowa_niegazowana_330_ml?tiduid=4d7b57ba127e1d3e293e7497ed7ee374&utm_medium=ZPR_ContentCommerce&utm_source=tradedoubler

Woda kokosowa 100% naturalna (Coco planet)	500 ml	5,99 zł	11,98 zł	100% naturalna woda kokosowa pochodząca z wnętrza kokosa, nie z koncentratu, bez cukru Wartość energetyczna 92 kJ/22 kcal Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g Węglowodany 5,4 g w tym cukry 5,0 g Białko 0 g Sól 0,028 g	https://www.bee.pl/coco-planet-woda-kokosowa-100-naturalna-500-ml_p1440085.html
Sok z brzozy bez-glutenowy (Ekowital)	1000 ml	10,88 zł	10,88 zł	Sok z pnia brzozy bio (99,86%), regulator kwasowości: kwas cytrynowy Wartość energetyczna 15,1 kJ/3,6 kcal	https://www.bee.pl/ekowital-sok-z-brzozy-bezglutenowy-1-l-bio_p1373427.html
Sok z brzozy (Bio Food)	1000 ml	18,49 zł	18,49 zł	Ekologiczny sok z brzozy (97,3%), fruktoza (2,6%), kwasek cytrynowy (0,1%) Wartość energetyczna 58,6 kJ/14 kcal Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g Węglowodany 3,5 g w tym cukry 2,6 g Białko 0 g Sól 0 g	https://www.bee.pl/bio-food-sok-z-brzozy-1-l-bio_p61198.html

Nazwa	Pojemność	Cena	Cena wyrobu w przeliczeniu na 1000 ml*	Składniki wyrobu oraz wartość odżywcza w 100 ml	Nazwa strony internetowej
Sok brzozy o smaku cytryny (NaturaVena)	300 ml	4,75 zł	15,83 zł	Sok z brzozy naturalny, cukier trzcinowy koncentrat soku z cytryny (5%) Wartość energetyczna 85 kJ/20 kcal Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g Węglowodany 5 g w tym cukry 4,8 g Błonnik < 0,5 g Białko 0 g Sól 0 g	https://www.bee.pl/naturavena-sok-z-brzozy-o-smaku-cytryny-300-ml_p1372198.html
Sok z brzozy z pigwowcem Bio (Dary Natury)	270 ml	5,08 zł	18,81 zł	Sok z brzozy 96%, sok z pigwowca	https://www.bee.pl/dary-natury-sok-z-brzozy-z-pigwowcem-270-ml-bio_p1364259.html
Sok z brzozy o smaku żurawiny (NaturaVena)	750 ml	7,99 zł	10,65 zł	Sok z brzozy naturalny, cukier trzcinowy, koncentrat soku żurawinowego (10%) Wartość energetyczna 106 kJ/25 kcal Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g Węglowodany 6,1 g w tym cukry < 0,5 g Błonnik < 0,5 g Białko 0 g Sól 0 g	https://www.bee.pl/naturavena-sok-z-brzozy-o-smaku-zurawiny-750-ml_p1149851.html

Sok z brzozy o smaku mięty (NaturaVena)	750 ml	7,99 zł	10,65 zł	<p>Sok z brzozy naturalny, cukier trzcinowy, kwas cytrynowy jako regulator kwasowości, naturalny aromat mięty</p> <p>Wartość energetyczna 85 kJ/20 kcal</p> <p>Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g</p> <p>Węglowodany 5 g w tym cukry 4,8 g</p> <p>Błonnik < 0,5 g</p> <p>Białko 0 g</p> <p>Sól 0 g</p>	<p>https://www.bee.pl/naturavena-sok-z-brzozy-o-smaku-miety-750-ml_p1149850.html</p>
Woda klonowa Bio. Prawdziwa ekologiczna woda klonowa. Zawiera naturalnie występujące cukry (Nectara. Eau d'érable pure maple water)	330 ml	8,99 zł	27,24 zł	<p>100% ekologiczne soki klonu</p> <p>Wartość energetyczna 40 kJ/10 kcal</p> <p>Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g</p> <p>Węglowodany 2 g w tym cukry 2 g</p> <p>Białko 0 g</p> <p>Sól 0,04 g</p>	<p>marketbio.pl/woda-klonowa-bio-330-ml-necta.html</p>

Nazwa	Pojemność	Cena	Cena wyrobu w przeliczeniu na 1000 ml*	Składniki wyrobu oraz wartość odżywcza w 100 ml	Nazwa strony internetowej
Napój arbuzowy z nasionami bazylii (Vinut)	290 ml	4,99 zł	17,21 zł	Woda, naturalny sok z arbuza (25%), cukier trzcinowy, nasiona bazylii (8), substancja zagęszczająca: guma gellan, substancja słodząca: sukraloza, regulator kwasowości: kwas cytrynowy, substancja konserwująca: kwas askorbinowy, naturalny aromat arbuza, naturalne barwniki: E163, E150D Wartość energetyczna 79 kJ/19 kcal Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g Węglowodany 4,8 g w tym cukry 4,5 g Białko 0 g Sód 0,028 g Witamina C 13 mg	https://fia.pl/Napoj-Arbuz-z-nasionami-bazylii-Vinut-290ml/?ref=Google+Merchant+Center
Woda różana BIO (Stellar Rose)	500 ml	7,49 zł	14,98 zł	Woda źródłana, ekstrakt z kwiatów róży b.d.	https://marketbio.pl/woda-r-243-zana-bio-500-ml-stellar-rose.htm?hash=1ce50071159ecb05ad807c50b2a2c8b5

Woda różana BIO (Cosmoveda)	250 ml	25,99 zł	103,96 zł	Woda, ekstrakt z kwiatów róży b.d.	https://marketbio.pl/woda-r-243-zana-bio-250-ml-cosmoveda.htm?hash=1ce50071159ecb05ad807c50b2a2c8b5
Napój z aloesem 51% aloe vera, matcha. Napój aloesowy, niegazowany, pasteryzowany, z cząstkami aloesu z dodatkiem soku z cytryny, herbaty matcha i wit. C (Qeency®)	500 ml	4,49 zł	8,98 zł	Aloes 51% (sok aloesowy 18%, miąższ aloesowy 17%, żel aloesowy 16%), woda, sok jabłkowy z koncentratu soku jabłkowego 19%, fruktoza, sok z cytryny z koncentratu soku z cytryny 1%, herbata matcha 0,5%, witamina C, aromat Wartość energetyczna 87 kJ/21 kcal Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g Węglowodany 5,0 g w tym cukry 5,0 g Białko < 0,1 g Sód 0,02 g	https://www.bee.pl/qeency-napoj-z-aloesem-51-aloe-vera-matcha-500-ml_p1497887.html

Źródło: opracowanie własne na podstawie danych przedstawionych na konkretnej stronie internetowej, b.d. – brak danych na stronie, *przeliczenia własne.

Tabela 4. Porównanie asortymentu wód roślinnych dostępnych na zagranicznym rynku w oparciu o dane dostępne na stronach internetowych
 Table 4. Comparison of the assortment of plant waters available on the foreign market based on data available on websites

Nazwa	Pojemność	Cena	Cena wyrobu w przeliczeniu na 1000 ml*	Składniki wyrobu oraz wartość odżywcza w 100 ml	Nazwa strony internetowej
Woda klonowa (Drink Simple Maple Water)	355 ml	2,99 \$ (11,42 zł)	8,42 \$ (32,17 zł)	b.d.	https://drinksimple.com/collections/maple-water/products/12-oz-drink-simple-maple-water-pack-of-12
Woda klonowa i cytrynowa (Drink Simple Raspberry Lemon Maple Water)	355 ml	2,99 \$ (11,42 zł)	8,42 \$ (32,17 zł)	b.d.	https://drinksimple.com/collections/maple-water/products/12-oz-drink-simple-raspberry-lemon-maple-water-pack-of-12
Organiczna woda kaktusowa z opuncji figowej (Caliwater Cactus Water Organic with prickly pear)	355 ml	2,75 \$ (10,51 zł)	7,75 \$ (29,61 zł)	Woda organiczna Niebieska Agawa, Organiczny sok z cytryny, organiczny koncentrat soku malinowego, naturalne aromaty, sproszkowana opuncja figowa, organiczny ekstrakt z owoców mnicha Wartość energetyczna 92 kJ/25 kcal Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g	https://drinkcaliwater.com/product/ginger-and-lime-12-pack/

Sok z brzozy (By-arozavik Birch Tree Water)	1000 ml	2,35 \$ (8,99 zł)	2,35 \$ (8,99 zł)	Węglowodany 4,0 g w tym cukry 3,0 g Białko 0 g Sód 0 g sok z brzozy, organiczny cukier trzcinowy, kwas cytrynowy b.d.	https://www.amazon.com/By-arozavik-Birch-Tree-Water/dp/B00HND07TM/ref=cm_cr_arp_d_product_top?ie=UTF8
Woda arbuzowa (WTRMLN WTR *The Original)	355 ml	4,17 \$ (15,93 zł)	11,75 \$ (44,87 zł)	Arbuz, woda filtrowana, sok z li-monki Wartość energetyczna 70 kcal Tłuszcz 0 g w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0 g Węglowodany 18 g w tym cukry 0 g Białko 1 g Sód 0 g	https://shop.wtrmlnwtr.com/products/original

Źródło: opracowanie własne na podstawie danych przedstawionych na konkretnej stronie internetowej, b.d. – brak danych na stronie, *przeliczenia własne.

charakteryzują się lepszym składem i właściwościami. Na uwagę zasługują produkty firmy Caliwater, produkujące wody kaktusowe w różnych smakach. Ceny wód roślinnych na rynku zagranicznym wahają się od 2,35 \$ (8,99 zł) za sok z brzozy do 11,75 \$ (44,87 zł) za wodę arbuzową za butelkę o pojemności 1000 ml.

Podsumowanie

Wody na bazie surowców roślinnych i/lub ekstraktów roślinnych są dobrą alternatywą dla wody pitnej, jednakże w zależności od składu, sposobu ich pozyskiwania oraz składu odżywczego różnią się znacznie. Mimo że niektóre z nich są dobrym źródłem potasu, sodu, magnezu oraz innych ważnych składników mineralnych, nie powinno się ich spożywać jako jedynych wód pitnych. Należy zachować zbilansowaną dietę i spożywać odpowiednie płyny tak, by nawodnić organizm, a wody roślinne traktować jako uzupełnienie diety. Analiza rynku wód roślinnych wykazała, że choć zaczynają one cieszyć się popularnością, mało które można znaleźć w sklepach z uwagi na obecnie mniejszy popyt i/lub nieadekwatną cenę.

Bibliografia

- Agarwal S.G., Gupta A., Kapahi B.K., Baleshwar, Thappa R.K., Suro O.P. 2005. Chemical composition of rose water volatiles. *J. Essential Oil Research*, 17(3): 265–267.
- Ahuja S.C., Ahuja U., Ahuja S. 2014. Coconut – history, uses and folklore. *Asian Agri-History*, 18(3): 221–248.
- Blossom Botanical Water 2021. <https://drinkblossomwater.com> (dostęp 18 czerwca 2021 r.).
- Best Food Facts 2021. <https://www.bestfoodfacts.org/plant-based-water> (dostęp 4 czerwca 2021 r.).
- Beverage Industry 2021. <https://www.bevindustry.com/articles/82275-aura-botanical-waters> (dostęp 7 sierpnia 2021 r.).
- Bogacz A. 2018. Wody roślinne – Botanical waters. *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, 3: 23–24.
- Christaki E.V., Florou-Paneri P.C. 2010. Aloe vera: a plant for many uses. *J Food Agric Environ*, 8(2): 245–249.
- Diplock A.T. 1999. Scientific Concepts of Functional Foods in Europe – Consensus Document. *Br. J. Nutr.*, 81(1): 1–27.
- Eat This, Not That 2021. <https://www.eatthis.com/plant-based-waters/> (dostęp 4 czerwca 2021 r.).
- Jessa J., Hozyasz K.K. 2015. Wartość zdrowotna produktów kokosowych. *Pediatrics Polska*, 90(5): 415–423.
- Matias A., Dudar M., Kauzlaric J., Frederick K.A., Fitzpatrick S., Ives S.J. 2019. Rehydrating efficacy of maple water after exercise-induced dehydration. *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, 16(1): 1–13.

- Nirmala C., Bisht M.S., Bajwa H.K., Santosh O. 2018. Bamboo: A rich source of natural antioxidants and its applications in the food and pharmaceutical industry. *Trends Food Sci. Technol.*, 77: 91–99.
- Philadelphia Magazine 2021. <https://www.phillymag.com/sponsor-content/water-101-need-know-plant-based-waters/> (dostęp 5 czerwca 2021 r.).
- PR Newswire 2021. <https://www.prnewswire.com/news-releases/new-aura-botanical-water-delivers-health-and-wellness-in-three-delicious-flavors-115724434.html> (dostęp 18 czerwca 2021 r.).
- Prades A., Dornier M., Diop N., Pain J.P. 2012a. Coconut water preservation and processing: a review. *Fruits*, 67(3): 157–171.
- Prades A., Dornier M., Diop N., Pain J.P. 2012b. Coconut water uses, composition and properties: a review. *Fruits*, 67(2): 87–107.
- Preetha P.P., Devi V.G., Rajmohan T. 2012. Hypoglycemic and antioxidant potential of coconut water in experimental diabetes. *Foods & Function*, 3(7): 753–757.
- Talking Retail 2021. <https://www.talkingretail.com/products-news/soft-drinks/buxton-launches-plantwater-28-07-2020/> (dostęp 18 czerwca 2021 r.).
- Viškelis P., Rubinskienė M. 2011. Chemical composition of birch sap. *Sodininkystė ir daržininkystė*, 30(3): 75–81.

Abstract

COMMERCIALY AVAILABLE PLANT-BASED WATER – TYPES AND PROPERTIES

The interest in plant-based waters in Poland and in the world has been growing in recent years. The reason of the trend is consumers' search for natural, least processed products with low sugar content. They include waters originating from a single raw material (e.g. coconut, cactus, birch, maple, bamboo, watermelon, rose) and waters produced on the basis of plant extracts (e.g. water with extract from hibiscus, moringa, rooibos).

The aim of this study was to present the availability of plant-based waters on the Polish and foreign markets, their types and properties. The characteristics were made considering health values of the waters and the possibility of their purchase in Polish stationary stores and in online stores.

The analysis of available information on the type, composition and sale of plant-based waters showed that the market of these products is still developing, and the dominant products are coconut water and maple water. Birch and aloe waters are also well known to consumers. Due to their composition, mainly rich in minerals and antioxidant potential, plant-based waters are a better alternative to mineral waters, which are widely available on the market.

Keywords: plant-based water, alternative waters, water market, coconut water, isotonic drinks

Słowa kluczowe: wody roślinne, wody alternatywne, rynek wód roślinnych, woda kokosowa, napoje izotoniczne

Paula Sadowska

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Studenckie Koło Naukowe Higieny Żywności i Toksykologii

Opiekun naukowy: dr n. wet. inż. Magdalena Polak-Śliwińska

PRZEGLĄD GŁÓWNYCH ZAFALSZOWAŃ ŻYWNOCI W POLSCE NA PODSTAWIE DANYCH Z URZĘDOWEJ KONTROLI ŻYWNOCI

Wstęp

Współczesny konsument staje dziś przed problemem oszustw żywnościowych, którym sprzyja globalizacja handlu, złożone łańcuchy dostaw, anonimowość rynku i coraz bardziej wysublimowane metody fałszowania żywności (Kowalska 2017a, 2017b, 2017c). Obowiązkiem każdego państwa jest opracowanie strategii, która umożliwi osiągnięcie celów zapewniających bezpieczeństwo żywności (ang. *food safety*) definiowane jako „ogół warunków, które muszą być spełnione i działań, które muszą być podjęte na wszystkich etapach produkcji lub obrotu żywnością, w celu zapewnienia zdrowia i życia człowieka” (Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006, Leśkiewicz 2012, Sitarz, Janczar-Smuga 2012). Bezpieczeństwo żywności stanowi zatem element jakości środka spożywczego (Sitarz, Janczar-Smuga 2012). Obowiązująca Ustawa o bezpieczeństwie żywności i żywienia z 2006 r. dzieli środki spożywcze o niewłaściwej jakości na: środki spożywcze, które są szkodliwe dla życia, bądź zdrowia człowieka, środki spożywcze zafałszowane oraz środki spożywcze zatrute. W polskim prawodawstwie funkcjonują dwie definicje produktu spożywczego zafałszowanego: pierwsza w „Ustawie o jakości handlowej artykułów rolno-spożywczych” (Ustawa z dnia 21 grudnia 2000) i druga w „Ustawie o bezpieczeństwie żywności i żywienia” (Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006). Ustawa z dnia 21 grudnia 2000 r. odnosi się do problemu fałszowania żywności z perspektywy jakości i bezpieczeństwa ekonomicznego (Bąk-Sypień, Karwowski 2018). Artykuł rolno-spożywczy zafałszowany to według tej ustawy „produkt, którego skład jest niezgodny z przepisami dotyczącymi jakości handlowej poszczególnych artykułów rolno-spożywczych, albo produkt, w którym zostały wprowadzone zmia-

ny, w tym zmiany dotyczące oznakowania, mające na celu ukrycie jego rzeczywistego składu lub innych właściwości, jeżeli niezgodności te lub zmiany w istotny sposób naruszają interesy konsumentów finalnych” (Ustawa z dnia 21 grudnia 2000). Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia podaje definicję środka spożywczego zafałszowanego, „którym określa się środek spożywczy, którego skład lub inne właściwości zostały zmienione, a konsument nie został o tym poinformowany albo środek spożywczy, w którym zostały wprowadzone zmiany, mające na celu ukrycie jego rzeczywistego składu lub innych właściwości, jak np. dodanie do niego substancji zmieniających jego skład, odjęcie składnika, niezgodne z prawdą podanie daty lub miejsca produkcji” (Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006). Początkowo zafałszowanie było określane jako brak autentyczności produktu (Śmiechowska 2013). Autentyczność żywności (ang. *food authenticity*) ocenia się bowiem jako zgodność produktu żywnościowego z opisem zamieszczonym na opakowaniu lub etykiecie, a także z obowiązującymi normami, przepisami prawnymi oraz standardami jej wytwarzania (Śmiechowska 2013; Kowalska 2017a).

Przyczyną zafałszowań produktów żywnościowych jest chęć nieuczciwego zwiększenia zysku poprzez obniżenie kosztów produkcji takiej żywności, wzrost konkurencyjności cen produktów, ukrycie wszelkich uchybień, jak niewłaściwa jakość czy błędy w procesie technologicznym (Targoński, Stój 2005; Bielecki, Bertrandt 2020). Skutki fałszowania dotyczą zarówno konsumentów, którzy, kupując takie produkty, zostają oszukani pod względem jakości, autentyczności żywności, a także uczciwych producentów, którzy przegrywają z nieuczciwą konkurencją (Targoński, Stój 2005).

Gospodarka żywnościowa jest zatem poważnie kontrolowana i regulowana ze względu na swoje znaczenie w ochronie zdrowia publicznego, a prawo żywnościowe opiera się na wytycznych Światowej Organizacji Zdrowia (ang. World Health Organization – WHO) i Organizacji Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (ang. Food and Agriculture Organization – FAO), stanowiących o wytycznych zawartych w Kodeksie Żywnościowym (ang. *Codex Alimentarius*) (Codex Alimentarius 2003; Szyba 2018).

Cel

Celem badań był przegląd wyników działań Inspekcji Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych (IJHARS) w kontekście upublicznionych decyzji, obejmujących różnego rodzaju zafałszowania żywności, z jakimi mógł spotkać się potencjalny konsument oraz omówienie sposobów obrony przed oszustwami związanymi z żywnością na podstawie dostępnej literatury.

Material i metody

W celu zrealizowania podjętego celu badań dokonano analizy decyzji wydanych przez IJHARS w okresie od 2019 do 2021 (I połowa) r., dotyczących zafałszowań artykułów rolno-spożywczych, sporządzonych na podstawie art. 29 oraz art. 40 a ust. 1 pkt 4 „Ustawy o jakości handlowej artykułów rolno-spożywczych” (IJHARS 2021a, Ustawa z dnia 21 grudnia 2000), które zostały podane do publicznej wiadomości, z pominięciem informacji stanowiących tajemnicę przedsiębiorstwa. Analizy dokonano na podstawie podziału zafałszowań ze względu na rok ich występowania, województwo i grupę technologiczną artykułów rolno-spożywczych, z krótkim omówieniem przyczyn ich zafałszowania. Ponadto na podstawie dostępnej literatury przedmiotu scharakteryzowano sposoby obrony przed oszustwami żywnościowymi.

Wyniki badań

W prezentowanej pracy przegląd zafałszowań żywności został przeprowadzony na podstawie danych zgromadzonych na rządowej stronie internetowej Inspekcji Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych (IJHARS 2021a). Przedstawiony w artykule przegląd zafałszowań żywności dotyczył polskiego rynku artykułów żywnościowych, które przeanalizowano w okresie od stycznia 2019 do czerwca 2021 roku i obejmował on następujące kategorie produktów:

- - produkty, dla których wymagania jakościowe regulują przepisy: owoce, warzywa i przetwory, mleko i przetwory mleczne, miody, napoje alkoholowe, oleje i tłuszcze, ryby i przetwory rybne,
- - produkty, dla których brak jest obligatoryjnych przepisów: mięso i przetwory mięsne, jaja oraz mąka i przetwory zbożowe.

W badanym okresie (od 2019 r. do I połowy 2021 r.) upublicznionych decyzji dotyczących zafałszowań artykułów rolno-spożywczych było najwięcej z województwa lubelskiego i zachodniopomorskiego. Najmniej tego typu sytuacji odnotowano w województwie polskim oraz śląskim (Tabela 1).

Zebrane dane dotyczące liczby zarejestrowanych przypadków zafałszowań w 2019 roku i w latach 2020-2021 wybranych kategorii żywności przedstawiono odpowiednio na wykresach 1 i 2. W roku 2019 największą liczbę zarejestrowanych zafałszowań odnotowano w przypadku grupy technologicznej mięso i przetwory mięsne, zaś najmniej zafałszowań wskazano w grupie technologicznej mleko i przetwory mleczne, co przedstawiono na wykresie 1 (IJHARS 2019, 2021a).

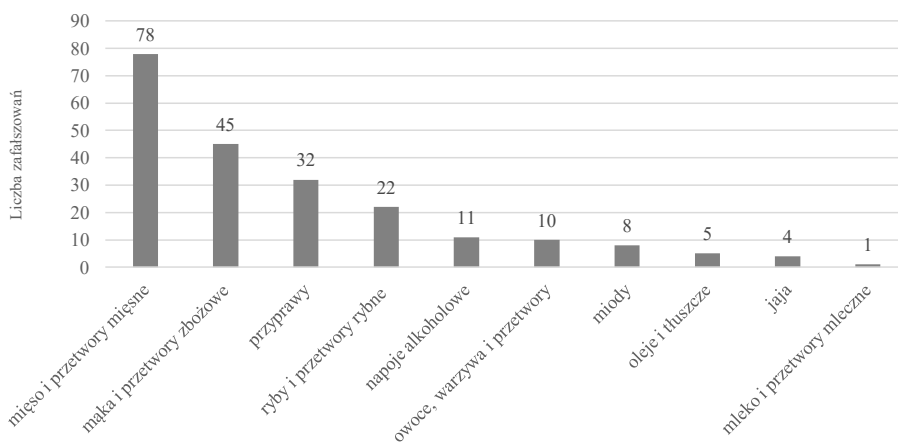
Największą liczbę zafałszowań w latach 2020–2021 odnotowano w kategorii mięso i produkty mięsne, na drugim miejscu znalazły się ryby i przetwory rybne, natomiast

Tabela 1. Liczba upublicznionych decyzji dotyczących zafałszowań artykułów rolnospożywczych wydanych w latach 2019–2021 z uwzględnieniem województw*

Województwo	Ogółem	2019	2020	2021 (I połowa roku)
Dolnośląskie	13	13	-	-
Kujawsko-pomorskie	31	19	7	5
Lubelskie	75	32	29	14
Lubuskie	32	12	1	19
Łódzkie	29	18	11	-
Opolskie	1	1	-	-
Małopolskie	38	22	15	1
Mazowieckie	19	10	9	-
Podkarpackie	15	9	6	-
Podlaskie	9	9	-	-
Pomorskie	26	10	4	12
Śląskie	-	-	-	-
Świętokrzyskie	47	17	20	10
Warmińsko-mazurskie	36	17	14	5
Wielkopolskie	54	31	23	-
Zachodniopomorskie	60	31	24	5

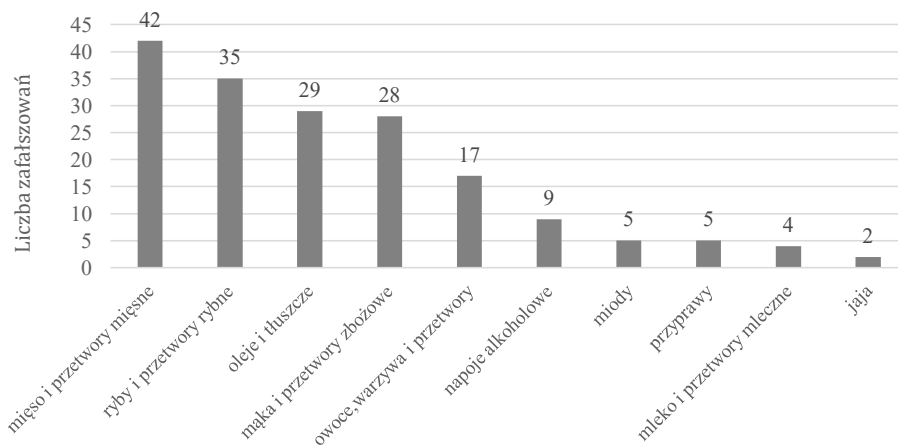
* Decyzje wydane na podstawie art. 29 oraz art. 40a ust. 1 pkt 4 Ustawy z 2000 roku o jakości handlowej artykułów rolnospożywczych.

Źródło: Opracowanie własne na podstawie IJHARS (2021a).

**Wykres 1. Liczba zafałszowań wybranych kategorii żywności zarejestrowanych w roku 2019**

Źródło: opracowanie własne na podstawie IJHARS (2019, 2021a).

na trzecim miejscu – zafałszowania olejów i tłuszczów (Wykres 2). Najbardziej fałszowaną kategorią produktów okazały się jaja (IJHARS 2020, 2021a).



Wykres 2. Liczba zafałszowań wybranych kategorii żywności w okresie od stycznia 2020 do czerwca 2021

Źródło: opracowanie własne na podstawie IJHARS (2020, 2021a).

W roku 2019, w porównaniu do lat 2020–2021, przypadków zafałszowań w grupie mięso i przetwory mięsne było więcej o 36, zafałszowań ryb było mniej o 13 przypadków, również mniej było przypadków zafałszowań olejów i tłuszczów – o 24 (IJHARS 2020, 2021a).

Dyskusja

W pracy podjęto problematykę zafałszowań żywności, w oparciu o którą dokonano przeglądu upublicznionych decyzji IJHARS, obejmujących różnego rodzaju zafałszowania żywności i wykonanych w roku 2019, 2020 oraz przez okres sześciu miesięcy 2021 roku. Na podstawie upublicznionych decyzji IJHARS w latach 2009–2017 dotyczących zafałszowań artykułów rolno-spożywczych najwięcej zafałszowań odnotowano w przypadku takich grup produktów, jak: mięso i przetwory mięsne, mąka i przetwory zbożowe oraz wyroby garmażeryjne, a także ryby i przetwory rybne. W przypadku kawy i herbaty, octu oraz czekolady i wyrobów czekoladowych inspektorzy IJHARS wykazali najmniej nieścisłości związanych z zafałszowaniem (Ozimek i in. 2017). W porównaniu do wyników własnych badań przeprowadzonych w 2019 roku oraz w latach 2020–2021 (I połowa), także mięso i jego przetwory były najczęściej fałszowaną kategorią żywności. Drugą z kolei najczęściej fałszowaną kategorią

żywności w roku 2019 były mąka i przetwory zbożowe, zaś w latach 2020–2021 (I połowa) były to ryby i ich przetwory. Najmniej nieścisłości odnotowano w kategorii mleko i przetwory mleczne w 2019 roku, natomiast w latach 2020–2021 (I połowa) w kategorii jaja. Wśród przyczyn zafałszowań upublicznionych decyzji pojawiał się najczęściej aspekt: „wprowadzające w błąd informacje na temat składu produktu”, najmniej często pojawiała się przyczyna wprowadzającej w błąd nazwy produktu, zafałszowania w zakresie masy produktu, niezgodnej z prawdą daty minimalnej trwałości/terminu przydatności do spożycia czy wprowadzania w błąd odnośnie pochodzenia produktu (IJHARS 2017).

W przeprowadzonych badaniach własnych na podstawie decyzji wydanych przez IJHARS w latach 2019–2021 (I połowa) na ogół zafałszowania w kategorii mięso i przetwory mięsne dotyczyły niekompletnego wykazu składników użytych do produkcji (IJHARS 2021). W grupie technologicznej ryby i przetwory rybne dość często nie udzielano wszystkich niezbędnych informacji, jak np. zawartość glazury oraz ryby w przypadku ryb mrożonych (IJHARS 2021). W kategorii oliwa i tłuszcze, oliwa dość często była określona jako najwyższej jakości, jednak ocena organoleptyczna podczas jej kontroli nie potwierdziła danej kategorii oliwy z oliwek (IJHARS 2021). W grupie technologicznej mąka i przetwory zbożowe zafałszowania najczęściej dotyczyły braku wykazu składników m.in. w przypadku pieczywa, często nie podawano wszystkich użytych składników czy używano określenia „na naturalnym zakwasie”, podczas gdy w procesie produkcji dodano również drożdże (IJHARS 2021). W kategorii owoce, warzywa i przetwory odnotowywano w nazwie „produkt ekologiczny”, „eko”, podczas gdy nie posiadał on certyfikatu w zakresie produkcji ekologicznej (IJHARS 2021). W grupie technologicznej mleko i przetwory mleczne często podawano nieprawidłową nazwę, jak np. informacja na cenówce „serek fromage czosnek 80 g”, podczas, gdy nazwa ser i jej zdrobnienia zarezerwowane są dla przetworów mlecznych (IJHARS 2021). Podobnie, jak w innych kategoriach nieprawidłowo podano wykaz składników, bądź nie uwzględniono wszystkich komponentów wchodzących w skład produktu. W przypadku miódów często stosowano nieprawidłową nazwę np. „miód rzepakowy”, podczas gdy pyłek rzepaku nie występował w nim w przewodzie (IJHARS 2021). W kategorii przyprawy, podobnie jak w pozostałych przypadkach, wykaz składników był niekompletny, bądź zafałszowano kraj pochodzenia produktu. W przypadku napojów alkoholowych zarejestrowano przypadki określeń „piwo pasteryzowane”, które, jak się okazywało, nie było poddawane temu procesowi (IJHARS 2021). Nie podawano również kompletnego wykazu składników. Natomiast w kategorii jaja wydłużano datę minimalnej trwałości (DMT), co stanowi bezpośrednie zagrożenie bezpieczeństwa zdrowotnego. Notowano także niższą klasę wagową jaj niż podał producent czy podawanie na opakowaniu informacji niezgodnych z prawdą, jak np. „od kur karmionych paszą bez GMO”, bez posiadania dowodów potwierdzających jakość zastosowanych pasz (IJHARS 2021).

Dominiak (2021) podaje, że najczęściej pod kątem cech organoleptycznych wśród zafałszowanych produktów stwierdzano niewłaściwy smak, zapach, a także wygląd.

Odnotowywano również bardziej poważne uchybienia jak obecność pleśni, ciał obcych czy dominujących części innych roślin w przyprawie sprzedawanej pod nazwą „oregano”. Aż 34% zakwestionowanych partii produktów stanowiły oleje roślinne, wśród których dominowała oliwa z oliwek. Owoce i warzywa posiadały natomiast wysoką jakość handlową, zakwestionowano jedynie 0,6% partii tych produktów.

Najpoważniejszym z tych oszustw jest celowe i ekonomicznie umotywowane fałszowanie żywności i opakowań (EMA – ang. *Economically Motivated Adulteration*), prowadzące do podwyższonego ryzyka w odniesieniu do zdrowia konsumentów (GFSI 2018; IFS 2018; Johnson 2014). Przykład zafałszowania preparatów dla niemowląt i mleka melaminą w 2008 roku, w wyniku którego zachorowało 294 tys. dzieci, a 6 dzieci zmarło, przypomina o podatności systemów w łańcuchu dostaw oraz o ignorowaniu i braku szacunku dla zdrowia ludzkiego ze strony oszustów (Bąk-Sypień, Karwowski 2018; IFS 2018). Kolejne niepokojące przypadki zafałszowań – w Indiach w 2011 r. wykryto alkohole spirytusowe zafałszowane metanolem i saletrą amonową, co spowodowało śmierć 126 osób, w Chinach tego samego roku wykryto ocet zafałszowany płynem przeciwzamarzającym, co spowodowało 11 zgonów i zachorowalność 120 osób, w Polsce w 2013 r. wykryto obecność końskiego DNA w mięsie oznakowanym jako wołowina – wskazują, że skala zjawiska fałszownia żywności nie zmniejsza się od lat, co najprawdopodobniej jest konsekwencją postępu technicznego w produkcji żywności i dostępnych w związku z tym metod wytwarzania oraz sposobów jej fałszowania (Bąk-Sypień, Karwowski 2018; Ozimek i in. 2017). Niezbędnym warunkiem egzystencji każdego człowieka i czynnikiem powodującym rozwój gospodarczy i spokój społeczny każdego kraju na świecie jest swobodny dostęp do bezpiecznej żywności (Szyba 2018). Przeprowadzone kontrole IJHARS były skoncentrowane na wykrywaniu zafałszowań artykułów rolno-spożywczych w oparciu o wyniki badań laboratoryjnych oraz poprzez sprawdzenie prawidłowości ich oznakowania (Dominiak 2021).

Warto przypomnieć, że od 1 lipca 2020 r. IJHARS przestała być organem sprawującym nadzór nad nawozami i jednocześnie od IH (Inspekcja Handlowa) przejęła zadania dotyczące m.in. weryfikacji jakości żywności i pasz dla zwierząt domowych w obrocie detalicznym oraz kontroli prawidłowości wprowadzania do obrotu i oznakowania materiałów oraz wyrobów przeznaczonych do kontaktu z żywnością (Dominiak 2021). Ponadto przypadł jej także w udziale nadzór nad znakowaniem „wolne od GMO (ang. *genetically modified organism*, czyli organizm zmodyfikowany genetycznie” czy sprawdzaniem deklaracji pochodzenia w zakresie podawania pochodzenia podstawowego składnika i prezentowania flagi kraju pochodzenia w przypadku nieopakowanego mięsa (Dominiak 2021).

Sposoby obrony przed oszustwami związanymi z żywnością

Po wielu kryzysach dotyczących bezpieczeństwa żywności w 2000 r. powstała Globalna Inicjatywa dotycząca Bezpieczeństwa Żywności (ang. *Global Food Safety Initiative* – GFSI), która to zdefiniowała oszustwo żywnościowe (ang. *Food Fraud* – FF) m.in. jako „oszukiwanie konsumentów przy użyciu produktów spożywczych, składników i opakowań w celu osiągnięcia korzyści ekonomicznych i obejmuje takie działania jak: zastępowanie, niezatwierdzone ulepszenia, niewłaściwe oznakowanie, podrabianie czy kradzież produktów” (GFSI 2014, 2017, 2018). Oszustwa żywnościowe są w obecnym stanie rzeczy istotnym zagrożeniem nie tylko dla konsumenta, ale i producenta żywności, stąd należy odnosić się do globalnych standardów zarządzania bezpieczeństwem żywności, obejmujących w swoich wymaganiach elementy zarządzania ryzykiem w tym obszarze, jak standardy IFS (ang. *International Featured Standards*), uwzględniające potrzebę stosowania środków ograniczających ryzyko oszustw w celu spełnienia wymagań GFSI (IFS 2018). Sposobem obrony przed oszustwami żywnościowymi są bez wątpienia interwencje prawne i innowacyjne technologie [FAO 2021]. Warto pamiętać, że działania dotyczące występowania zafałszowań na rynku żywności są prowadzone także w ramach sieci unijnej ds. zafałszowań żywności – EU FFN (ang. *European Union Food Fraud Network*) powstałej w lipcu 2013 r., co przyczynia się do większej ochrony konsumentów na poziomie całej Unii Europejskiej oraz do utrzymania najwyższych standardów bezpieczeństwa żywności.

Podsumowanie

Wyniki działań kontrolnych wykonywane przez inspekcje IJHARS dowodzą, że nadal istnieje w Polsce potrzeba kontroli w zakresie zafałszowań żywności przez organy urzędowej kontroli żywności. Na podstawie decyzji wydanych przez IJHARS w latach 2019–2021 (I połowa roku) spośród rozpatrywanych przypadków zafałszowań żywności kategoria mięso i przetwory mięsne były najczęściej fałszowaną kategorią produktów. Nieprawidłowości w tej grupie technologicznej dotyczyły zwykle zastępowania mięsa wieprzowego i wołowego tanim mięsem drobiowym, a także trudności w ustaleniu pochodzenia produktów, spowodowanych wydłużonymi łańcuchami dostaw, co stanowiłoby w takim przypadku bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia konsumentów. Sposobem oceny ryzyka zafałszowań żywności przez konsumentów jest śledzenie przez nich doniesień dotyczących żywności niebezpiecznej.

Literatura

- Bąk-Sypień I., Karwowski B. 2018. Wpływ zafałszowań na jakość zdrowotną żywności. *Hyg. Pub. Health*, 53(1): 52-61.
- Bielecki E., Bertrandt J. 2020. Fałszowanie żywności – realne zagrożenie bezpieczeństwa żywności i zdrowia konsumentów. *Hyg. Pub. Health*, 55(4): 133-141.
- Codex Alimentarius. 2003. *Food Hygiene Basic Texts*, FAO/WHO, Rzym.
- Doliński J., Wolska A. 2021. Podsumowanie działalności IJHARS w 2020 r. *Wiedza jakość*, 1(62): 8-10.
- Dominiak A. 2021. *Narodowa Jakość Handlowa. Wiedza jakość*. 1(62): 5-8.
- FAO. 2021. Food fraud – Intention, detection and management. Food safety technical toolkit for Asia and the Pacific No. 5. Bangkok. <http://www.fao.org/3/cb2863en/cb2863en.pdf> (dostęp 21 sierpnia 2021 r.).
- GFSI, Global Food Safety Initiative. 2014. GFSI Position Paper on Mitigating the Public Health Risk of Food Fraud. <https://mygfsi.com/wp-content/uploads/2019/09/Food-Fraud-GFSI-Position-Paper.pdf> (dostęp 2 sierpnia 2021 r.).
- GFSI, Global Food Safety Initiative. 2017. Guidance Document, Benchmarking Document, Version 7. http://www.theconsumergoodsforum.com/files/publications/GFSI_Guidance_Docuemnt_Intro.pdf (dostęp 2 sierpnia 2021 r.).
- GFSI, Global Food Safety Initiative. 2018. Food Fraud Technical Document, Tackling Food Fraud through Food Safety Management Systems. http://www.mygfsi.com/files/Technical_Documents/201805-food-fraud-technical-document-final.pdf (dostęp 2 sierpnia 2021 r.).
- IFS, International Featured Standards. 2018. IFS Standards Product Fraud. Guidelines for Implementation. IFS Management GmbH, Germany. https://www.ifs-certification.com/images/regional-sites/poland/documents-and-downloads/general-document/documents/Product-FraudGuide_PL_2018_1608_AS.pdf (dostęp 2 sierpnia 2021 r.).
- IJHARS, Inspekcja Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych. 2021a. <https://www.gov.pl/web/ijhars/zafalszowane-artykuly-rolno-spozywcze> (dostęp 29 marca 2021 r.).
- IJHARS, Inspekcja Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych. 2017. Sprawozdanie roczne 2017. Główny Inspektorat Jakości Artykułów Rolno-Spożywczych.
- IJHARS, Inspekcja Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych. 2019. Sprawozdanie roczne 2019. Główny Inspektorat Jakości Artykułów Rolno-Spożywczych.
- IJHARS, Inspekcja Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych. 2020. Sprawozdanie roczne 2020. Główny Inspektorat Jakości Artykułów Rolno-Spożywczych.
- IJHARS, Inspekcja Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych. 2021b. Jakość żywności pod lupą jednej inspekcji. <https://www.gov.pl/web/rolnictwo/jakosc-zywnosci-pod-lupa-jednej-inspekcji> (dostęp 2 sierpnia 2021 r.).
- IJHARS, Inspekcja Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych. 2021c. Przewodnik.
- Johnson R. 2014. Food Fraud and “Economically Motivated Adulteration” of Food and Food Ingredients. CRS Report Prepared for Members and Committees of Congress.
- Kołożyn-Krajewska D., Sikora T. 2010. Zarządzanie bezpieczeństwem żywności: teoria i praktyka. C.H. Beck, Warszawa.
- Kowalska A. 2017a. Problematyka oszustw żywnościowych w przepisach prawa i standardach branżowych. *Kwart. Nauk Przeds.*, 45(4): 30-41.
- Kowalska A. 2017b. Postawy konsumentów wobec autentyczności produktów żywnościowych. *Prob. Jak.*, 49(9): 34-42.
- Kowalska A. 2017c. Systemy wymiany informacji o oszustwach żywnościowych w Unii Europejskiej. *Przeds. Zarz.*, 18(9): 71-85.

- Leśkiewicz K. 2012. Bezpieczeństwo żywnościowe i bezpieczeństwo żywności - aspekty prawne. *Przeg. Prawa Rol.*, 1(10): 179-198.
- Ozimek I., Szlachciuk J., Przeździecka-Czyżewska N. 2017. Zafałszowania artykułów rolno-spożywczych w świetle regulacji prawnych oraz działań organów urzędowej kontroli żywności w Polsce. *Zesz. Naukowe SGGW Ekonom. i Org. Gosp. Żywn.*, 120: 97-109.
- Rozporządzenie (WE) Nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności (z późn. zm.) (Dz. U. UE L z dnia 1.02.2002 r.)
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) Nr 1169/2011 z dnia 25 października 2011 r. w sprawie przekazywania konsumentom informacji na temat żywności, zmiany rozporządzeń Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1924/2006 i (WE) nr 1925/2006 oraz uchylenia dyrektywy Komisji 87/250/EWG, dyrektywy Rady 90/496/EWG, dyrektywy Komisji 1999/10/WE, dyrektywy 2000/13/WE Parlamentu Europejskiego i Rady, dyrektyw Komisji 2002/67/WE i 2008/5/WE oraz rozporządzenia Komisji (WE) nr 608/2004.
- Sitarz S., Janczar-Smuga M. 2012. Współczesne zagrożenia bezpieczeństwa żywności, możliwości ich kontroli oraz eliminacji. *Nauki Inż. Tech.*, 2(5): 68-93.
- Szyba M. 2018. Wykorzystanie społecznej odpowiedzialności biznesu w odniesieniu do spraw konsumenckich dla poprawy bezpieczeństwa i jakości produktów spożywczych w Polsce. Praca doktorska. <https://winntbg.bg.agh.edu.pl/rozprawy2/11353/full11353.pdf> (dostęp 3 sierpnia 2021 r.).
- Śmiechowska M. 2013. Autentyczność jako kryterium zapewnienia jakości żywności. *Ann. Acad. Med. Gedan.*, 43: 175-181.
- Targoński Z., Stój A. 2005. Zafałszowania żywności i metody ich wykrywania. *Żywn. Nauka. Technol. Jakość.* 4 (45): 30-40.
- Ustawa z dnia 21 grudnia 2000 r. o jakości handlowej artykułów rolno-spożywczych (Dz. U. z 2019 r. poz. 2178).
- Ustawa z dnia 23 stycznia 2020 r. o zmianie ustawy o jakości handlowej artykułów rolno-spożywczych oraz niektórych innych ustaw (Dz.U. 2020, poz. 285).
- Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia, Dz.U. 2017, poz. 149 z późn. zm.

Abstract

REVIEW OF MAIN FOOD ADULTERATIONS BASED ON THE ANALYSIS OF DATA FROM FOOD OFFICIAL CONTROLS IN POLAND

The aim of the research was to review the results of activities undertaken by the Agricultural and Food Quality Inspection (AfQI) in the context of published decisions concerning various food adulterations which a potential consumer could encounter and to discuss the strategy of protection against food fraud. An analysis of decisions issued by the IJHARS in the years 2019 to 2021 regarding adulteration of agri-food items was made. In the analysed period (from 2019 to the 1st half of 2021), the highest number of decisions concerning adulteration of agri-food articles was published in Lubelskie and Zachodniopomorskie Voivodeships. The lowest number of such situations was observed in Opolskie and Śląskie Voivodships.

The review was based on the division of adulterations with regard to the year of their occurrence, voivodship and technological group of agri-food products. Results of conducted analyses showed that the largest number of counterfeits occurred in the technological group of meat and meat products (42 cases), in the group of fish and fish products (35 counterfeits) and oils and fats (29). The lowest number of counterfeits was recorded in the group of eggs (2 cases).

The results of control activities performed by the AfQI inspectorates prove that there is still a need to perform control activities in the scope of food adulteration by the official food control bodies in Poland, which constitutes consumer protection and allows to maintain the highest food safety standards.

Key words: food safety, food fraud, food defense

Słowa kluczowe: bezpieczeństwo żywności, oszustwa żywnościowe, obrona żywności

Julia Ziajka

Uniwersytet Morski w Gdyni

Naukowe Koło Towaroznawstwa „CARGO”

NAPOJE ROŚLINNE – WARTOŚCIOWE SUBSTYTUTY MLEKA?

Wstęp

Wzmoczone zainteresowanie dietą wegańską, jak i stale zwiększająca się liczba osób cierpiących na alergie pokarmowe oraz nietolerancję składników mleka sprawiły, że obecnie możemy zaobserwować wzrost zapotrzebowania na napoje roślinne, które mogą stanowić substytuty mleka. Ze względu na surowce, z których sporządza się napoje roślinne, dzielimy je na:

- napoje z roślin strączkowych: fasolowe, sojowe, z soczewicy,
- napoje zbożowe: ryżowe, owsiane, orkiszowe, amarantusowe, kukurydziane, jaglane (z łuskanego ziarna prosa), jęczmienne,
- napoje z pseudozbóż: gryczane, z komosy ryżowej,
- napoje z nasion: słonecznikowe, dyniowe, sezamowe, lniane, z siedmiu ziaren,
- napoje orzechowe: kokosowe, migdałowe, z orzechów nerkowca, z orzechów laskowych, z orzechów makadamia, z orzechów włoskich, z orzechów ziemnych, z orzechów brazylijskich, z orzeszków piniowych (sosnowych),
- inne napoje: ziemniaczane, z batatów, kasztanowe, konopne, makowe.

Źródło: <http://www.bogutynmlyn.pl/html/245.html>

Pierwsze wzmianki o roślinnych substytutach mleka sięgają XIII wieku. W 1226 roku w Bagdadzie została wydana książka kucharska *Kitab al-tabik*. Jest to najstarszy poznany dokument, w którym można znaleźć wzmiankę o napoju migdałowym. Ponad sto lat później (1365 r.) po raz pierwszy pojawił się przepis na napój sojowy. W 1390 roku powstał zapis, w którym można znaleźć przepis na napój migdałowy w języku angielskim, a pierwszy angielski przepis na napój sojowy pojawił się dopiero w 1704 roku (Shurtleff i Aoyagi, 2013).

Napoje roślinne otrzymuje się na drodze namaczania w wodzie surowców, z których są produkowane, oraz ich odpowiedniej obróbki (Szeremeta, 2012). Podstawą każdego procesu produkcji napoju roślinnego jest pozyskanie surowców, a następnie pozabawienie nasion łusek i łupin. Konieczna jest inaktywacja enzymów nieprzyswajalnych dla organizmu człowieka. Nasiona ulegają szlifowaniu, aby ich twarde oraz zgrubiałe części nie utrudniały ekstrakcji składników odżywczych do napoju. Podczas ekstrakcji oddziela się nierozpuszczalne w wodzie i niepożądane w napoju cząstki soi. Następnie mieszane są ze sobą witaminy, cukier, aromaty i surowy napój roślinny. Zmieszany napój poddaje się sterylizacji i homogenizacji, a następnie chłodzi się i pakuje. Tak przygotowany produkt jest gotowy do transportu (<http://www.madehow.com>).

Cel

Celem badania było określenie wiedzy wybranej grupy respondentów na temat napojów roślinnych, mogących być substytutami mleka krowiego. Dodatkowo zapytano o najczęstsze powody spożywania napojów roślinnych. W badaniu poruszono również kwestię przeciwwskazań do spożywania napojów roślinnych, a także zalet i wad konsumowania tych produktów. W toku badań sformułowano hipotezę, że napoje roślinne spożywane są ze względu na ich walory prozdrowotne.

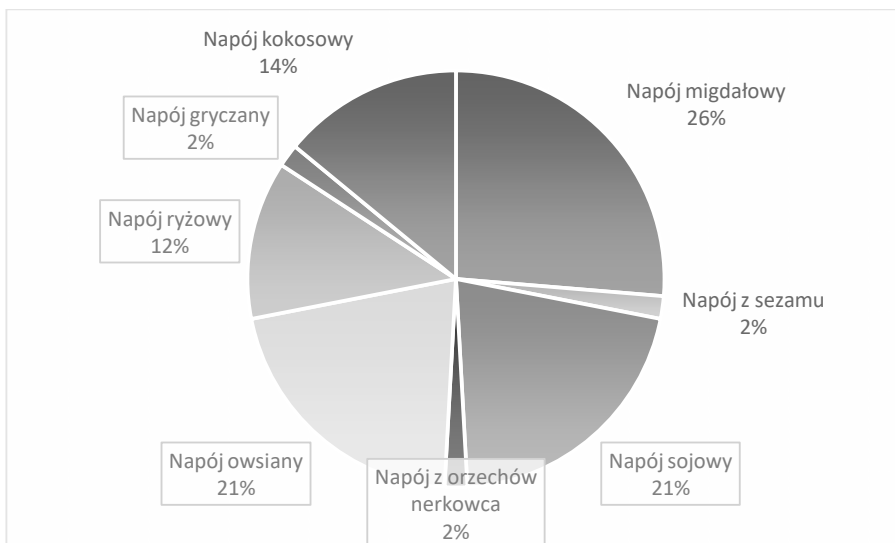
Materiał i metoda badania

Badanie zostało przeprowadzone w oparciu o zastosowanie metody ankietowej (internetowa ankieta pośrednia). Formularz ankiety umieszczono na stronach internetowych poświęconych tematyce zdrowego żywienia. Ankieta została przeprowadzona wśród losowo wybranych 100 osób, które zadeklarowały spożycie roślinnych substytutów mleka krowiego. Ankietyzacji zostały poddane osoby w wieku 18–25 lat (48 osób), 26–35 lat (24 osoby), 36–50 lat (20 osób) oraz powyżej 50 roku życia (8 osób). Czynnikiem różnicującym był wiek ankietowanych. Ankietowanych podzielono ze względu na częstość występowania alergii na białka mleka krowiego oraz nietolerancji laktozy według danych uzyskanych przez WHO. Formularz ankiety zawierał dziewięć pytań dotyczących wiedzy na temat napojów roślinnych, zalet i wad ich stosowania oraz powodów spożywania tych produktów jako substytutów mleka krowiego. Zapytano również o wiedzę ankietowanych na temat alergicznej reakcji krzyżowej.

Wyniki badań

Wstęp kwestionariusza miał na celu ustalenie, które z napojów roślinnych są najczęściej stosowane jako zamienniki mleka krowiego.

Na rysunku 1 przedstawiono rozkład procentowy wyników uzyskanych na pytanie dotyczące najczęściej spożywanych napojów roślinnych.

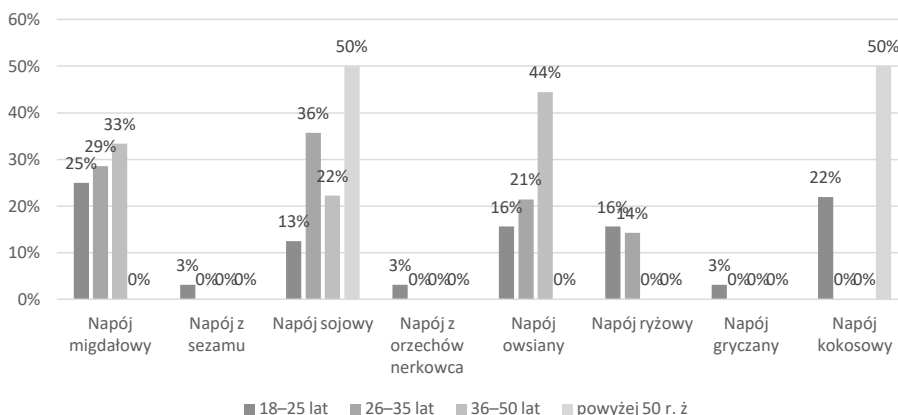


Rysunek 1. Stosunek procentowy najczęściej spożywanych roślinnych substytutów mleka krowiego

Źródło: opracowanie własne.

Najczęściej spożywanym napojem roślinnym był napój wyprodukowany z migdałów – 26% ankietowanych zadeklarowało jego konsumpcję. Napoje sojowe i owsiane były spożywane przez 21% badanych. Napój kokosowy został wskazany przez 14% respondentów. Napój ryżowy cieszył się popularnością wśród 12% uczestników badania. Napoje: z sezamu, gryczany oraz z orzechów nerkowca zostały wskazane przez 2% ankietowanych. Rozkład procentowy dla poszczególnych grup wiekowych przedstawiono na rysunku 2.

Najpopularniejszym napojem roślinnym w grupie 18–25 lat był napój migdałowy. Został wskazany przez 25% respondentów. Napój kokosowy to wybór 22% badanych, a 16% ankietowanych wybrało napój owsiany oraz napój ryżowy. Na napój sojowy jako najczęściej spożywany substytut mleka wskazało 13% uczestników ankiety, natomiast 3% respondentów wybrało napój z sezamu, napój z orzechów nerkowca oraz napój gryczany. W grupie 26–35 lat najczęściej wybierano napój sojowy (36% bada-

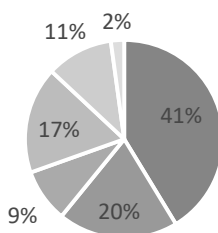


Rysunek 2. Rozkład procentowy najczęściej spożywanego substytutu mleka krowiego w poszczególnych grupach wiekowych

Źródło: opracowanie własne.

nych). Napój migdałowy został wskazany przez 29% ankietowanych, 21% uczestników ankiety wybrało napój owsiany jako najczęściej spożywany, a 14% wskazało napój ryżowy. Napój owsiany to najczęstszy wybór 44% respondentów z grupy wiekowej 36–50 lat. Napój migdałowy został wskazany przez 33% badanych, a napój sojowy przez 22%. Po 50% badanych z grupy wiekowej powyżej 50 lat wskazało odpowiednio napoje: sojowy i kokosowy.

Kolejne pytanie dotyczyło powodów spożywania roślinnych zamienników mleka krowiego. Rozkład procentowy uzyskanych odpowiedzi został przedstawiony na rysunku 3.

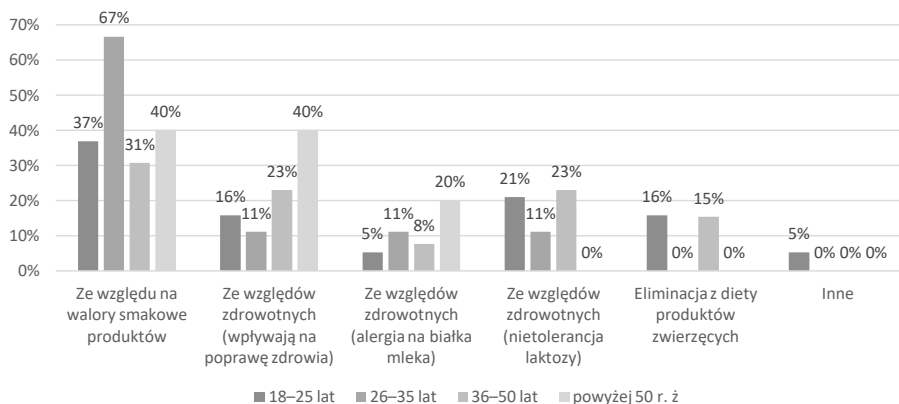


- Ze względu na walory smakowe produktów
- Ze względów zdrowotnych (wpływają na poprawę zdrowia)
- Ze względów zdrowotnych (alergia na białka mleka)
- Ze względów zdrowotnych (nietolerancja laktozy)
- Eliminacja z diety produktów zwierzęcych
- Inne

Rysunek 3. Powody spożywania napojów roślinnych jako substytutu mleka krowiego

Źródło: opracowanie własne.

Spośród ankietowanych 41% spożywało napoje roślinne ze względu na ich walory smakowe, a 20% badanych wybierało napoje roślinne ze względu na ich pozytywny wpływ na zdrowie. Spożywanie roślinnych substytutów mleka krowiego ze względu na nietolerancję laktozy zostało zaznaczone przez 17% respondentów. Spośród uczestników badania 11% konsumowało napoje roślinne, ponieważ eliminują z diety produkty zwierzęce, 9% ankietowanych stosowało substytuty mleka krowiego ze względu na alergię na białka mleka krowiego, a 2% respondentów wskazało wariant „inne”. Odpowiedzi uzyskane w poszczególnych grupach wiekowych zostały przedstawione na rysunku 4.

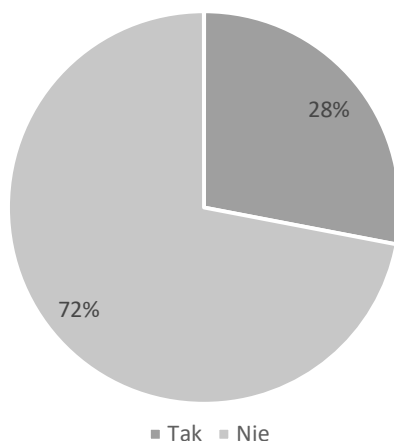


Rysunek 4. Powody zastępowania mleka krowiego napojami roślinnymi w poszczególnych grupach wiekowych

Źródło: opracowanie własne.

Wśród ankietowanych z grupy wiekowej 18–25 lat 37% spożywało napoje roślinne, które mogą być substytutami mleka krowiego ze względu na ich walory smakowe, 21% respondentów zastępowało mleko krowie napojami roślinnymi, ponieważ nie tolerowali laktozy. Po 16% badanych spożywało roślinne substytuty mleka krowiego, ponieważ wpływały na poprawę ich zdrowia oraz pozwalały wyeliminować produkty zwierzęce z diety. Po 5% uczestników badania zastępowało mleko krowie jego roślinnymi zamiennikami ze względu na alergię na białka mleka oraz wskazując inne powody. Najwięcej (67%) ankietowanych z grupy wiekowej 26–35 lat spożywało roślinne substytuty mleka krowiego z powodu ich walorów smakowych. Po 11% respondentów konsumowało napoje roślinne ze względu na ich pozytywny wpływ na zdrowie, alergię na białko mleka oraz nietolerancję laktozy. Walory smakowe napojów roślinnych to powód ich spożywania dla 31% osób z grupy wiekowej 36–50 lat. Po 23% badanych spożywa napoje roślinne, ponieważ poprawiają stan zdrowia oraz ze względu na nietolerancję laktozy znajdującej się w mleku krowim. Eliminowanie z diety produktów zwierzęcych było motywacją dla 15% ankietowanych, a dla 8% respondentów powodem zastępowania mleka napojami roślinnymi jest alergia na białka mleka.

Kolejne pytanie dotyczyło znajomości konsekwencji stosowania napojów roślinnych jako zamienników napojów mlecznych. Uzyskane odpowiedzi zostały przedstawione na rysunku 5.

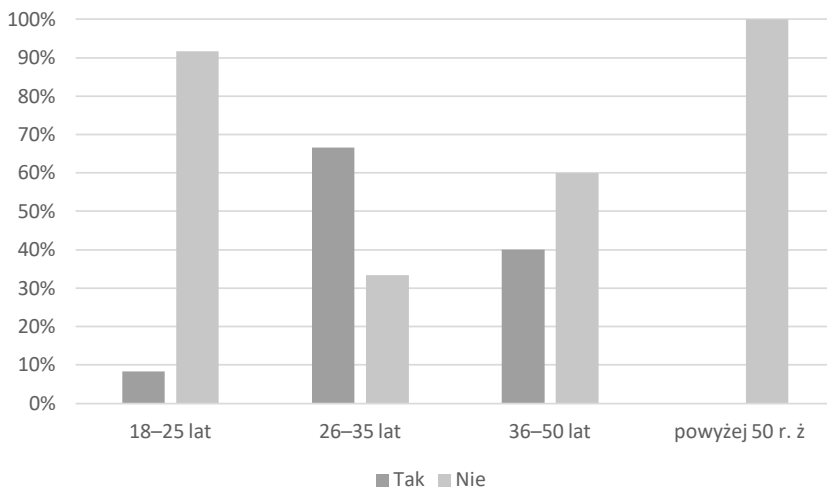


Rysunek 5. Znajomość konsekwencji stosowania napojów roślinnych jako zamienników mleka krowiego

Źródło: opracowanie własne.

Znajomość konsekwencji stosowania napojów roślinnych jako substytutów mleka krowiego potwierdziło 28% badanych. Uzupełniając odpowiedź w pytaniu otwartym, ankietowani dodali, że napoje roślinne zawierają składniki obniżające cholesterol, nie wywołują reakcji alergicznej u osób uczulonych na białka mleka krowiego oraz objawów nietolerancji u osób z nietolerancją laktozy. Aż 72% ankietowanych wskazało nieznaną konsekwencję stosowania napojów roślinnych jako zamienników mleka krowiego. Rozkład procentowy odpowiedzi w poszczególnych grupach wiekowych został przedstawiony na rysunku 6.

Aż 92% ankietowanych z grupy wiekowej 18–25 lat nie zna konsekwencji stosowania roślinnych zamienników mleka krowiego. Wynikać może to z niedostatecznej edukacji na temat zdrowego żywienia zapewnianej w szkołach, tylko 8% respondentów potwierdziło znajomość skutków stosowania napojów roślinnych jako substytutów mleka krowiego. Wskazywano na obniżenie poziomu cholesterolu. W grupie wiekowej 26–35 lat 67% badanych znało konsekwencje stosowania napojów roślinnych jako zamienników mleka krowiego. Stwierdzono, że nie powodują nieprzyjemnych objawów u osób nietolerujących laktozy oraz nie wywołują wstrząsu anafilaktycznego podczas ataku alergii u osób uczulonych na białka mleka. W grupie wiekowej 36–50 lat 60% osób nie znało konsekwencji stosowania napojów roślinnych jako zamienników mleka krowiego, 40% ankietowanych znało konsekwencje zastępowania mleka napojami roślinnymi. Wskazywano na niewywoływanie reakcji alergicznej u osób z alergią na

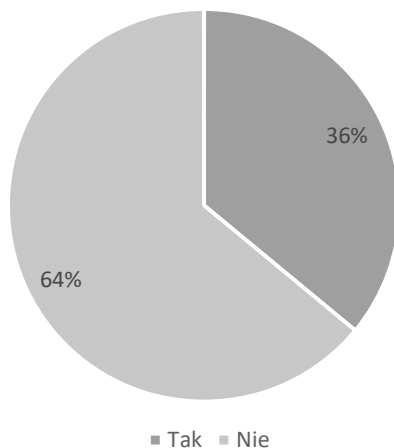


Rysunek 6. Znajomość konsekwencji stosowania napojów roślinnych jako zamienników mleka krowiego w poszczególnych grupach wiekowych

Źródło: opracowanie własne.

białko mleka. W grupie osób powyżej 50 roku życia 100% ankietowanych nie znało konsekwencji zastępowania mleka napojami roślinnymi.

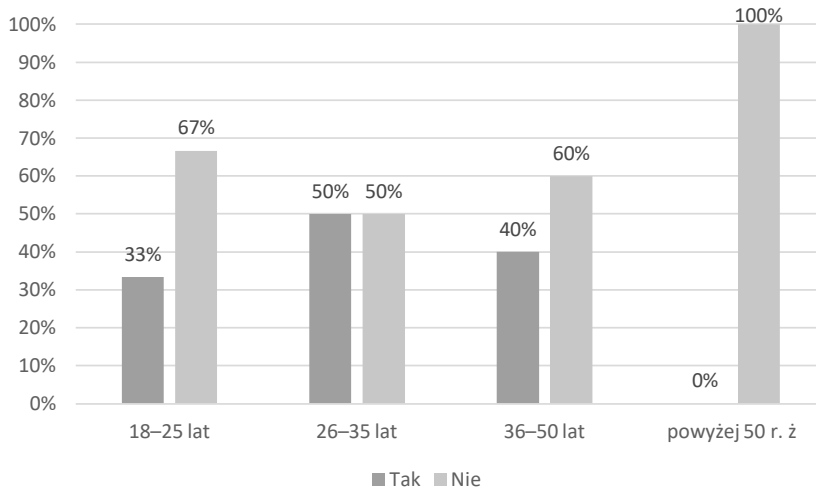
W odniesieniu do pytania o konsekwencje spożywania napojów roślinnych jako zamienników mleka krowiego zapytano o możliwość występowania alergicznej reakcji krzyżowej u osób spożywających napoje roślinne. Celem pierwszego pytania było określenie znajomości terminu „alergiczna reakcja krzyżowa”. Rozkład procentowy uzyskanych odpowiedzi przedstawiono na rysunku 7.



Rysunek 7. Znajomość terminu „alergiczna reakcja krzyżowa”

Źródło: opracowanie własne.

Aż 64% ankietowanych stwierdziło, że nie zna terminu „alergiczna reakcja krzyżowa”, a 36% potwierdziło znajomość tego terminu. Tylko 4% ankietowanych prawidłowo opisało mechanizm alergicznej reakcji krzyżowej. Rozkład procentowy wyników otrzymanych w poszczególnych grupach wiekowych przedstawiono na rysunku 8.



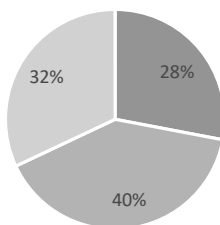
Rysunek 8. Znajomość terminu „alergiczna reakcja krzyżowa” w poszczególnych grupach wiekowych

Źródło: opracowanie własne.

W grupie wiekowej 18–25 lat 67% ankietowanych nie znało terminu „alergiczna reakcja krzyżowa”, 33% respondentów znało termin „alergiczna reakcja krzyżowa”. W tej grupie prawidłowo określono jego znaczenie. W grupie wiekowej 26–35 lat odpowiedzi rozłożyły się równomiernie. W grupie wiekowej 36–50 lat 60% badanych stwierdziło, że nie wie, co to jest alergiczna reakcja krzyżowa, a 40% ankietowanych uważało, że znają znaczenie „alergicznej reakcji krzyżowej”. W grupie wiekowej powyżej 50 roku życia uzyskano 100% odpowiedzi negatywnych. W ramach weryfikacji znajomości terminu „alergiczna reakcja krzyżowa” poproszono o wskazanie sytuacji, w której wystąpi jej objawy. Rozkład procentowy uzyskanych odpowiedzi został ukazany na rysunku 9.

Według 40% ankietowanych alergiczna reakcja krzyżowa wystąpi podczas spożycia produktu podobnego do alergenu. Prawidłowo mechanizm reakcji krzyżowej wskazało 32% respondentów, a 28% badanych uważało, że alergiczna reakcja krzyżowa wystąpi po kontakcie z alergenem. Odpowiedzi uzyskane w poszczególnych grupach zostały przedstawione na rysunku 10.

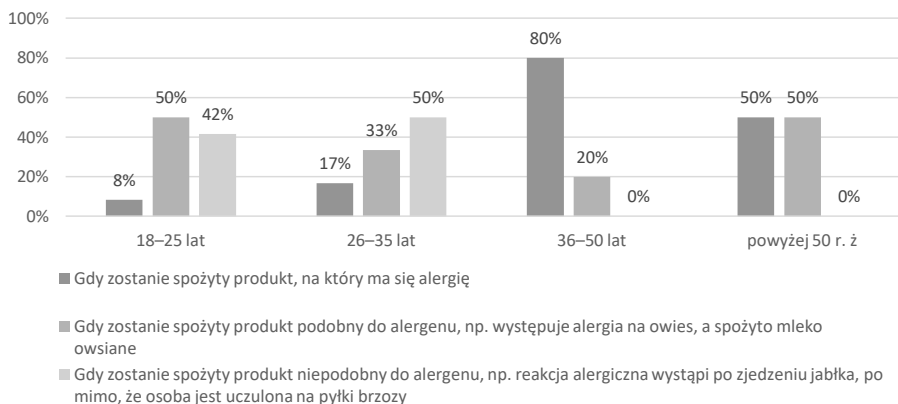
W grupie wiekowej 18–25 lat 50% badanych wskazało na sytuację, gdy spożyto produkt podobny do alergenu. Mniej, bo 42% ankietowanych wskazało na sytuację, gdy spożyto produkt zdecydowanie różniący się od alergenu – odpowiedź prawidłową, 8% ankietowanych wskazało na kontakt z alergenem. W grupie wiekowej 26–35 lat 50%



- Gdy zostanie spożyty produkt, na który ma się alergię
- Gdy zostanie spożyty produkt podobny do alergenu, np. występuje alergia na owies, a spożyto mleko owsiane
- Gdy zostanie spożyty produkt niepodobny do alergenu, np. reakcja alergiczna wystąpi po zjedzeniu jabłka, po mimo, że osoba jest uczulona na pyłki brzozy

Rysunek 9. Sytuacje, podczas których wystąpi alergiczna reakcja krzyżowa

Źródło: opracowanie własne.



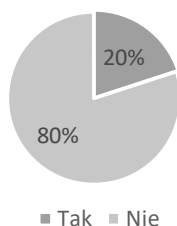
Rysunek 10. Sytuacje, podczas których wystąpi alergiczna reakcja krzyżowa według poszczególnych grup wiekowych

Źródło: opracowanie własne.

respondentów wskazało na sytuację, gdy spożyto produkt niepodobny do alergenu, 33% uczestników badania wskazało na spożycie produktu podobnego, a 17% na kontakt z alergenem. W grupie wiekowej 36–50 większość badanych (80%) zaznaczyła spożycie alergenu, 20% kontakt z produktem podobnym do alergenu. Po 50% respondentów w grupie wiekowej powyżej 50 roku życia wybrało odpowiedzi „gdy zostanie spożyty produkt, na który ma się alergię” oraz „gdy zostanie spożyty produkt podobny do alergenu”.

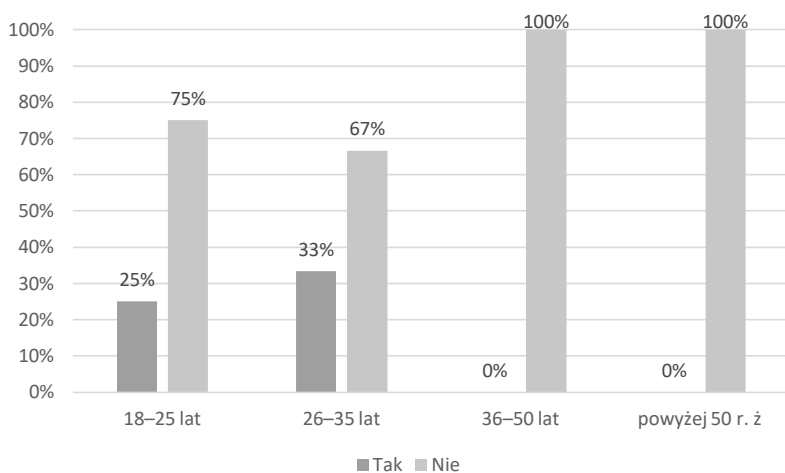
Następnie ankietowanych zapytano o znajomość konsekwencji alergicznej reakcji krzyżowej. Wyniki zostały przedstawione na rysunku 11.

Aż 80% ankietowanych zadeklarowało, że nie zna konsekwencji wystąpienia alergicznej reakcji krzyżowej, 20% uważa, że je zna i wymienia objawy reakcji alergicznej



Rysunek 11. Znajomość konsekwencji alergicznej reakcji krzyżowej

Źródło: opracowanie własne.



Rysunek 12. Znajomość konsekwencji alergicznej reakcji krzyżowej w poszczególnych grupach wiekowych

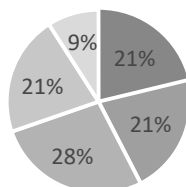
Źródło: opracowanie własne.

oraz wstrząsu anafilaktycznego. Rozkład procentowy uzyskany w poszczególnych grupach wiekowych został przedstawiony na rysunku 12.

Konsekwencji wystąpienia alergicznej reakcji krzyżowej nie zna 75% ankietowanych z grupy wiekowej 18–25 lat. Deklaruje znajomość konsekwencji wystąpienia tej reakcji 25% badanych. 67% respondentów z grupy wiekowej 26–35 lat nie jest świadoma konsekwencji wystąpienia alergicznej reakcji krzyżowej, a 33% uczestników badania deklaruje ich znajomość. Sto procent badanych w grupie wiekowej 36–50 lat oraz powyżej 50 roku życia deklaruje brak znajomości konsekwencji wystąpienia alergicznej reakcji krzyżowej.

Następne pytanie dotyczyło znajomości zalet spożywania roślinnych substytutów mleka krowiego. Otrzymane wyniki zostały przedstawione na rysunku 13.

Najczęściej wskazywaną zaletą roślinnych zamienników mleka krowiego była wysoka zawartość błonnika w spożywanym produkcie. Została ona zaznaczona przez 28%

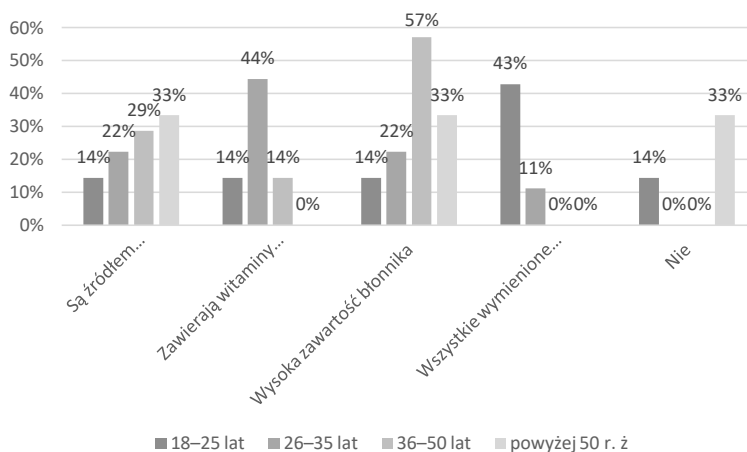


- Są źródłem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych
- Zawierają witaminy rozpuszczalne w tłuszczach
- Wysoka zawartość błonnika
- Wszystkie wymienione odpowiedzi są poprawne
- Nie

Rysunek 13. Znajomość zalet spożywania roślinnych substytutów mleka krowiego

Źródło: opracowanie własne.

badanych. Po 21% respondentów wybrało odpowiedzi o treści „zawierają witaminy rozpuszczalne w tłuszczach”, „są źródłem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych” oraz „wszystkie odpowiedzi wymienione są poprawne”. Spośród osób badanych 9% nie zna zalet napojów roślinnych. Rozkład procentowy odpowiedzi uzyskanych w poszczególnych grupach wiekowych został przedstawiony na rysunku 14.



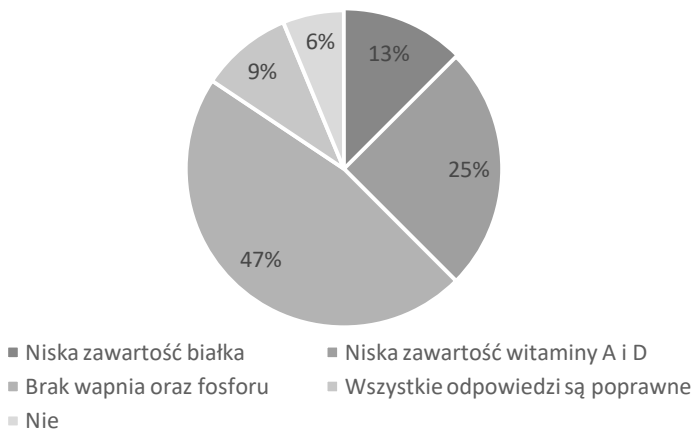
Rysunek 14. Znajomość zalet spożywania roślinnych substytutów mleka krowiego według poszczególnych grup wiekowych

Źródło: opracowanie własne.

Wśród ankietowanych w grupie wiekowej 18–25 lat 45% uważało, że wszystkie wymienione zalety dotyczyły spożywania roślinnych zamienników mleka krowiego. Po 14% respondentów z tej grupy wybrało odpowiedzi: „zawierają witaminy rozpuszczalne w tłuszczach”, „są źródłem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych”, „zawiera-

ją dużo błonnika” oraz „nie”. W grupie wiekowej 26–35 lat najwięcej badanych (44%) wybrało odpowiedź „zawierają witaminy rozpuszczalne w tłuszczach”, 22% uczestników badania uważało, że zaletami roślinnych substytutów mleka krowiego są: wysoka zawartość błonnika oraz wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w produkcie. 11% respondentów uważało, że wszystkie odpowiedzi są poprawne. W grupie wiekowej 36–50 lat 57% ankietowanych wybrało wysoką zawartość błonnika jako zaletę roślinnych substytutów mleka krowiego, 29% badanych z tej grupy wskazało na odpowiedź „są źródłem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych”, a 14% uczestników badania za zaletę napojów roślinnych uznało zawarte w nich witaminy rozpuszczalne w tłuszczach. Wśród ankietowanych w grupie wiekowej powyżej 50 roku życia 33% wybrało odpowiedzi: „są źródłem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych”, „zawierają dużo błonnika” oraz „nie”.

Ostatnie zadane pytanie dotyczyło wad stosowania napojów roślinnych jako zamienników mleka krowiego. Otrzymane wyniki zostały przedstawione na rysunku 15.

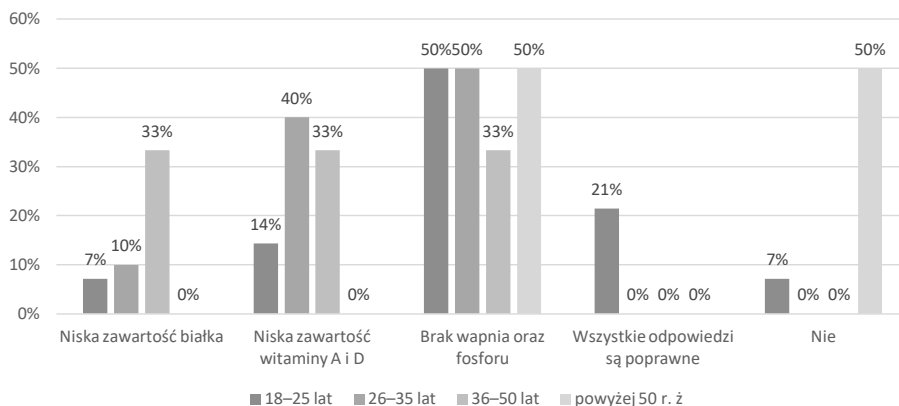


Rysunek 15. Znajomość wad spożywania roślinnych substytutów mleka krowiego

Źródło: opracowanie własne.

Większość ankietowanych (47%) uznała za wadę napojów roślinnych brak wapnia oraz fosforu, pomimo wcześniejszego zadeklarowania braku wiedzy na temat minusów stosowania roślinnych substytutów mleka, a 25% stwierdziło, że wadą napojów roślinnych jest niska zawartość witaminy A i D. Dla 13% respondentów wadą była niska zawartość białka, a 9% uczestników badania uważało, że wszystkie odpowiedzi są poprawne. 6% ankietowanych deklaruje brak wiedzy na temat wad roślinnych zamienników mleka krowiego. Rozkład procentowy uzyskanych wyników dla poszczególnych grup wiekowych został przedstawiony na rysunku 16.

Dla 50% ankietowanych w grupie wiekowej 18–25 lat wadą jest brak odpowiedniej ilości fosforu i wapnia w napojach roślinnych. 21% respondentów uważa, że wszystkie



Rysunek 16. Znajomość wad spożywania roślinnych substytutów mleka krowiego dla poszczególnych grup wiekowych

Źródło: opracowanie własne.

odpowiedzi są poprawne. Dla 14% badanych wadą jest niska zawartość witaminy A i D. Po 7% uczestników badania zaznaczyło odpowiedzi: „niska zawartość białka” oraz „nie znam wad”. W grupie wiekowej 26–35 lat połowa uczestników badania uznała za wadę brak odpowiedniej ilości wapnia i fosforu, a 40% ankietowanych wskazało na niską zawartość witaminy A i D jako wadę roślinnych zamienników mleka krowiego. Dla 10% respondentów niska zawartość białka była wadą napojów roślinnych. W grupie 36–50 lat rozkład procentowy dla uzyskanych odpowiedzi został rozłożony równomiernie między odpowiedziami: „niska zawartość białka”, „niska zawartość witaminy A i D” oraz „brak wapnia i fosforu”. W grupie wiekowej powyżej 50 roku życia odpowiedzi zostały rozłożone równomiernie między „brak wapnia i fosforu” a „nie znam wad”.

Dyskusja

Najczęściej wybieranymi zamiennikami mleka krowiego są napój migdałowy, sojowy oraz owsiany. Ich popularność wynika z dostępności w supermarketach lub sklepach osiedlowych. Soja, z której jest produkowany jeden z napojów, zawiera osiem aminokwasów egzogennych niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. Jest bogata w lecytynę, która wspomaga funkcjonowanie komórek nerwowych oraz pomaga zrównoważyć poziom LDL (cholesterolu o niskiej gęstości). Napój sojowy ma więcej żelaza i porównywalną do mleka krowiego ilość witaminy E, jest jednak uboższy w wapń. Przez brak zawartości glutenu oraz laktozy jest odpowiednią alternatywą dla osób cierpiących na nietolerancje i alergie pokarmowe (<https://portal.abczdrowie.pl/mleko-sojowe>, Endres, 2001). Napój owsiany jest znany z dużej

ilości białka (4–6 g białka w 100 g produktu) oraz działania odprężającego, dlatego zalecany jest w stanach długotrwałego niepokoju, lęku i bezsilności, bezsenności i innych zaburzeń nerwowych. Owies jest również zbożem o największej ilości tłuszczu roślinnego (w tym 65% wielonienasyconych kwasów tłuszczowych oraz 35% kwasu linolowego), dlatego napój produkowany z niego stanowi źródło tłuszczu roślinnego (<http://www.celiakia.pl/produkty-dozwolone>). Napój migdałowy jest bogaty w wapń, fosfor i potas, co wpływa na poprawę stanu kośćca. Jest również ubogi w sód, co pozytywnie wpływa na stan zdrowia u osób chorujących na nadciśnienie tętnicze oraz bogaty w kwas oleinowy, a także nie zawiera laktozy oraz glutenu (Zaczyńska, 2013). Głównym powodem spożywania napojów roślinnych jako zamienników mleka krowiego były ich walory smakowe. Ich smak wykazuje się charakterystycznym posmakiem surowców, z których są wykonane, a także przy prawidłowo przeprowadzonym procesie technologicznym powtarzalnością smaku. Brak dostatecznej wiedzy o zalecanych i wadach stosowania roślinnych zamienników mleka krowiego skutkuje również brakiem znajomości konsekwencji płynących ze spożywania roślinnych substytutów. Jednocześnie brak znajomości znaczenia terminu „alergiczna reakcja krzyżowa” może przyczynić się do pogorszenia objawów reakcji alergicznej u osób, u których wystąpi. Do podstawowych grup osób rezygnujących z mleka z przyczyn zdrowotnych należą osoby, które cierpią na nietolerancję lub alergię pokarmową. Podstawową różnicą między nietolerancją i alergią pokarmową jest fakt, że w przypadku alergii mamy do czynienia z działaniem układu immunologicznego, czyli układu odpornościowego organizmu. W przypadku nietolerancji pokarmowej reakcje zachodzą bez udziału układu immunologicznego (<http://www.alergiapokarmowa.pl>).



Rysunek 17. Różnice między alergią pokarmową a nietolerancją

Źródło: <http://www.dietaeliminacyjna.pl/nietolerancja-a-alergia-pokarmowa/>

Dodatkowym zagrożeniem, którego nie każdy konsument jest świadomy, jest występowanie alergicznej reakcji krzyżowej. Doskonałym przykładem jest brak rezygnacji z orzechów laskowych w przypadku alergii na pyłek leszczyny oraz produktów, takich jak: żyto, pszenica, jęczmień, owies i ryż, w przypadku alergii na pyłki traw. Wysokim ryzykiem jest również spożywanie napojów sojowych, pszenicznych oraz żytnich przez osoby uczulone na orzechy. Pomimo wielu zalet napojów roślinnych, których społeczeństwo jest świadome, nie wszystkie wady są znane. Wysokie spożycie soi przyczynia się do zwiększenia ilości osób z alergią na białka soi oraz powiększonym wolem tarczycy (<http://www.przepisy-dla-dzieci.pl/>).

Podsumowanie

Napoje roślinne są bogatym źródłem wielu składników mineralnych i odżywczych oraz witamin. Pomimo wad stanowią zdrową alternatywę dla mleka krowiego. W toku przeprowadzonych badań i analizy wyników ankietowanych w podziale na poszczególne grupy wiekowe sformułowano wniosek, że konsumenci spożywają napoje roślinne głównie ze względu na ich walory smakowe. Roślinne substytuty mleka krowiego ceni się ze względu na ich wysoką zawartość błonnika. Niska zawartość dobrze przyswajalnego fosforu i wapnia przemawia na ich niekorzyść. Hipoteza została zweryfikowana negatywnie. Podsumowując, uzyskane wyniki pozwalają na stwierdzenie, że konsumenci są świadomi swoich wyborów i mają dostateczną wiedzę, aby wykorzystać potencjał, jaki drzemie w napojach roślinnych.

Bibliografia

- Endres, J.G. (2001). *Soy protein products, characteristics, nutritional aspects and utilization*.
Shurtleff, W., & Aoyagi, A. (2013). *HISTORY OF SOYMILK AND OTHER NON-DAIRY MILKS (1226 TO 2013)*
Szeremeta, A., 2012, *O eko napojach roślinnych*
Zaczyńska D.,2013, *Zbawienne działanie roślinnych fitohormonów – profilaktyka antynowotworowa*.
<http://www.alergiapokarmowa.pl> (dostęp 7.04.2021)
<http://www.bogutynmlyn.pl/html/245.html> (dostęp 14.04.2021)
<http://www.madehow.com> (dostęp 4.05.2021)
<https://portal.abczdrowie.pl/mleko-sojow> (dostęp 19.05.2021)

Abstract

PLANT DRINKS – VALUABLE MILK SUBSTITUTES?

Increased interest in a vegan diet and the constantly increasing number of people suffering from food allergies and intolerance to milk components mean that we can now observe an increase in the demand for plant-based drinks that can be substitutes for milk. The most popular on the Polish market are soybean, cereal, and nut or coconut drinks.

The aim of the study was to determine the knowledge of a selected group of respondents about plant-based drinks that can be substitutes for cow's milk. The questionnaire form was placed on websites devoted to healthy eating. The survey was conducted among randomly selected 100 people who consume this type of drink. The age of the respondents was the differentiating factor. The questionnaire form contained 9 questions concerning the knowledge about plant drinks, the advantages and disadvantages of their use and the reasons for consumption.

The obtained results show that the respondents eagerly reach for plant drinks, pointing to a number of pro-health advantages. It is worth mentioning that the content of dietary fiber is the most frequently indicated among the benefits of consuming these drinks.

Keywords: soya, almond, beverages

**SEKCJA NAUK
ROLNICZYCH, LEŚNYCH
I OCHRONY ŚRODOWISKA**

Marta Czaja
Klaudia Stefaniak
Uniwersytet Morski w Gdyni
Koło Naukowe „NAUTICA”

ANALIZA WPŁYWU EKSPLOATACJI STATKU TYPU PASAŻERSKIEGO NA ZANIECZYSZCZENIA ATMOSFERY W ASPEKTCIE PRZESTRZEGANIA KONWENCJI MARPOL

Wstęp

Emitowany przez statki pasażerskie poziom emisji substancji szkodliwych jest tak wysoki, że wymaga prawnych regulacji oraz kontroli ich przestrzegania. W trosce o środowisko naturalne ustanowiony został szereg przepisów, konwencji i porozumień międzynarodowych, których zadaniem jest ograniczenie zanieczyszczania mórz i oceanów oraz atmosfery. Organizacja Morska IMO (ang. International Maritime Organization) opracowała i wdrożyła konwencję MARPOL 73/78 o zapobieganiu zanieczyszczaniu morza przez statki. W zakres załącznika VI tej konwencji wchodzi przepisy o zapobieganiu zanieczyszczeniu powietrza przez statki wraz z Kodeksem technicznym kontroli emisji tlenków azotu z okrętowych silników. Dzięki temu wprowadzono przepisy ograniczające emisję szkodliwych dla środowiska związków wchodzących w skład spalin silników okrętowych, do których należą: tlenki azotu, tlenki siarki, zanieczyszczenia stałe oraz lotne związki organiczne. Najniebezpieczniejszą dla człowieka substancją emitowaną ze statku do atmosfery jest tlenek azotu. Jest on wytwarzany w 75% podczas spalania olejów napędowych (Wiewióra 2002).

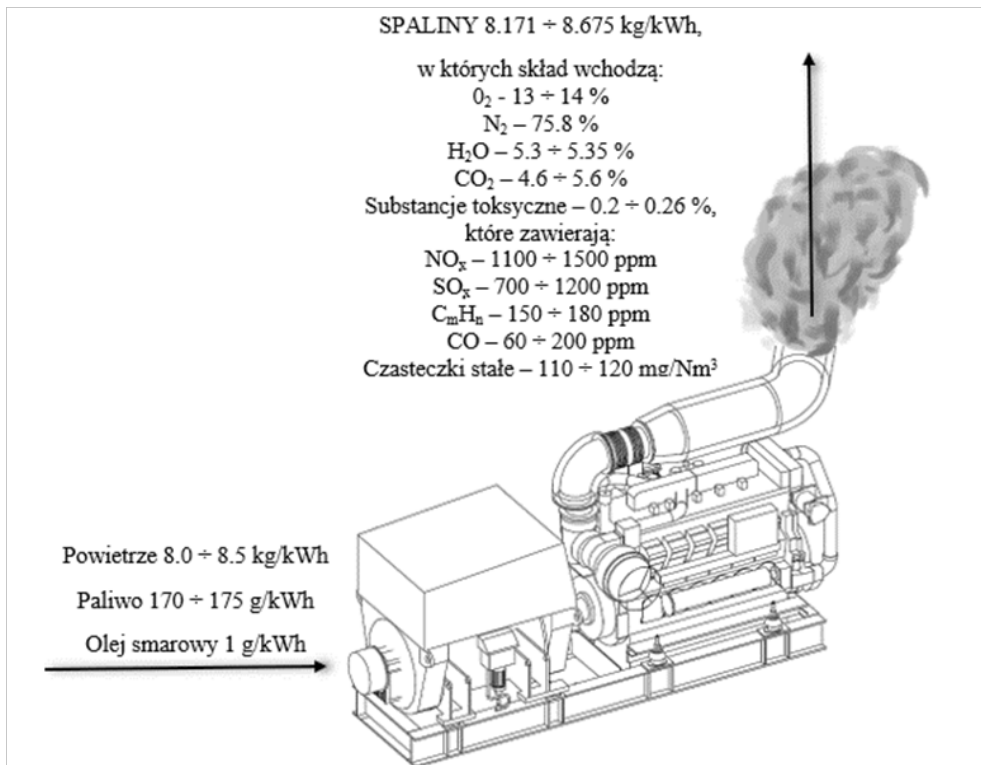
Zgodnie z załącznikiem VI dla każdego statku o pojemności rejestrowej 400 GT i wpływającego do portów i przystani państw podlegających Konwencji MARPOL 73/78 wystawiane jest międzynarodowe świadectwo o zapobieganiu zanieczyszczeniu powietrza (International Air Pollution Prevention Certificate – IAPP Certificate). Przeglądy statków w tym zakresie są dokonywane przez Polski Rejestr Statków. Statki,

którym przyznane zostanie *świadcstwo* IAPP, będą podlegały przeglądom: zasadniczemu, rocznym, pośrednim i odnawialnym, oraz ewentualnie dodatkowym przeglądom po zakończeniu poważnych napraw lub zmian (Konwencja MARPOL 73/78 2015).

Normy emisji stają się coraz bardziej rygorystyczne, co wpływa na to, że producenci silników muszą wprowadzać coraz nowsze rozwiązania pozwalające na redukcję emisji szkodliwych składników spalin. Natomiast armatorzy zmuszeni są do podejmowania inwestycji, aby ich instalacje były skuteczniejsze w przeciwdziałaniu zanieczyszczeniu atmosfery przez statki (Witkowski 2016b).

Statek źródłem zanieczyszczeń środowiska

Głównym źródłem emisji szkodliwych związków do atmosfery przez statki są silniki okrętowe.



Rysunek 1. Bilans produktów spalania typowego silnika okrętowego

Źródło: opracowanie własne.

Podczas jednej doby jednostka napędowa może wygenerować od kilku do nawet kilkudziesięciu ton niebezpiecznych produktów spalin: tlenku węgla, dwutlenku węgla, tlenków siarki, tlenków azotu, cząstek stałych, niespalonych węglowodorów itp. W tabeli 1 przedstawiona jest przybliżona dobową emisję szkodliwych składników spalin przez silniki okrętowe.

Tabela 1. Zestawienie wyników emisji szkodliwych składników spalin wytwarzanej przez różne typy silników okrętowych

Zanieczyszczenia	Dobowa emisja szkodliwych składników przez statki [t]			
	dwusuwo- wy	czterosu- wowy	dwupaliwowy	
			tryb paliwowy	tryb gazowy
Tlenki azotu (NO _x)	15,30	5,30	3,60	0,020
Tlenki siarki (SO _x)	1,53	0,53	0,36	0,002
Dwutlenek węgla (CO ₂)	8,30	2,90	1,92	0,010
Cząstki stałe (PM)	2,10	0,74	0,50	0,003
Niespalone węglowodory (CH)	1,50	0,53	0,36	0,002
Suma	~28,73	~10,00	~6,74	~0,037

Źródło: opracowanie własne.

Z powyższej tabeli wywnioskować można, że najwięcej szkodliwych związków generuje silnik dwusuwowy. Jest to spowodowane dużymi mocami osiąganymi przez tę jednostkę napędową i znaczne zużycie paliwa. Natomiast najmniejsze zanieczyszczenie atmosfery powoduje silnik dwupaliwowy w trybie gazowym. Gaz ziemny wykazuje bardzo wysoką sprawność spalania, a także nie zawiera w sobie siarki, co skutkuje takimi wynikami.

Źródłem emisji spalin do atmosfery przez statki nie są tylko spalinowe silniki tłokowe, ale również urządzenia znajdujące się na statkach, takie jak: turbiny, kotły, spalarki śmieci oraz samochody będące ładunkiem na statku. W trakcie pracy wytwarzają one trujące związki, takie jak: tlenki siarki, tlenki azotu, tlenki węgla, cząstki stałe czy niespalone węglowodory.

Kotły okrętowe to urządzenia służące do produkcji pary, które emitują spaliny zwłaszcza w czasie: postoju statku w porcie, postoju na kotwicy. Skutkuje to zmniejszeniem obciążenia silnika napędowego oraz doprowadzeniem do kotła utylizacyjnego zredukowanej ilości spalin służących do wytwarzania pary. Przez to konieczne jest zastosowanie pomocniczego kotła opalanego, co w konsekwencji skutkuje podwyższeniem całkowitej emisji szkodliwych substancji zawartych w spalinach. Z kotłów okrętowych podczas spalania generowane są głównie: dwutlenek węgla, dwutlenek siarki, a także para wodna.

Wyparcie turbin okrętowych przez silniki tłokowe ze względu na mniejszą sprawność energetyczną prowadzi do większego jednostkowego zużycia paliwa. Ograniczenia narzucone przez IMO (International Maritime Organization) dotyczące emisji zanieczyszczeń spalin z silników okrętowych prowadzą do tworzenia nowych rozwiązań konstrukcyjnych siłowni statków. Ograniczenia te powodują planowanie użycia silników turbinowych w układach energetycznych oraz napędowych siłowni. Zaletą zastosowania turbin okrętowych jest osiągnięcie zredukowanej ilości emisji szkodliwych związków obecnych w spalinach. W wyniku tego atmosfera jest mniej zatrutowana przez statki.

Spalanie jest jednym z najlepszych sposobów eliminacji odpadów stałych i olejowych. Proces ten pozwala na zmniejszenie objętości zanieczyszczeń o około 95% i ich ciężaru w przybliżeniu o 60%. Spalarki okrętowe są źródłem znacznie mniejszej ilości spalin niż ma to miejsce w przypadku silników okrętowych. Spalanie szlamu po paliwie wysokosiarkowym (zawartość siarki powyżej 1,5%) w spalarkach okrętowych doprowadza do tworzenia się znacznych ilości tlenków siarki. Zmniejszenie zanieczyszczenia atmosfery dokonuje się dzięki instalowaniu odpowiednich separatorów spalin lub specjalnemu ukształtowaniu komory spalania.

Wymagania VI załącznika Konwencji MARPOL

Międzynarodowa Organizacja Morska (IMO) przyczyniła się do opublikowania Załącznika VI do Międzynarodowej konwencji, który został wprowadzony 19 maja 2005 roku. Postanowienia tego załącznika w 3 rozdziale zawierają w prawidłach od 12 do 18 wymagania dotyczące kontroli emisji ze statków:

- substancji zubażających warstwę ozonową,
- tlenków azotu NO_x (dodatkowo zawiera Kodeks techniczny emisji tlenków azotu z okrętowych silników wysokoprężnych),
- tlenków siarki SO_x,
- lotnych związków organicznych,
- spalania na statku,
- jakości paliw.

Prawidło 12 zabrania rozmyślnej emisji substancji zubażających warstwę ozonową. Działanie to obejmuje emisję występującą w trakcie konserwacji, obsługi, napraw lub pozbywania się instalacji albo wyposażenia. Substancje te powinny być dostarczone do specjalnych urządzeń odbiorczych.

Prawidło 13 ustala dopuszczalne wartości emisji tlenków azotu z okrętowych silników wysokoprężnych w zależności od ich nominalnej prędkości obrotowej.

Poziom I dotyczy silników, które zamontowane zostały na statkach zbudowanych od 1.01.2000 roku do 1.01.2011 roku. Poziom II dotyczy silników zamontowanych na statkach zbudowanych po 1.01.2011 roku. Natomiast poziom III odnosi się do stat-

Tabela 2. Dopuszczalny poziom emisji tlenków azotu przez silniki okrętowe zgodnie z Aneksiem VI konwencji MARPOL 73/78

Poziom	Dopuszczalna emisja NOx	Data obowiązywania
Poziom I	- 17 g/kWh gdy $n < 130$ obr/min - $45,0n^{-0,2}$ g/kWh gdy $n > 130$ obr/min a $n < 2000$ obr/min - 9,8 g/kWh gdy $n > 2000$ obr/min	od 01.01.2000
Poziom II	- 14,4 g/kWh gdy $n < 130$ obr/min - $44,0n^{-0,23}$ g/kWh gdy $n > 130$ obr/min a $n < 2000$ obr/min - 7,7 g/kWh gdy $n > 2000$ obr/min	od 01.01.2011
Poziom III	- 3,4 g/kWh gdy $n < 130$ obr/min - $9,0n^{-0,2}$ g/kWh gdy $n > 130$ obr/min a $n < 2000$ obr/min - 2,0 g/kWh gdy $n > 2000$ obr/min	od 01.01.2016 (*)
*) odroczone do 01.01.2021, dotyczy obszarów kontroli emisji ECA		

Źródło: Międzynarodowa konwencja o zapobieganiu zanieczyszczeniu morza przez statki, 1973/1978, PRS Gdańsk 2015.

ków eksploatowanych w obszarach kontroli emisji NOx. Limity dotyczą silników zamontowanych na statkach zbudowanych 1.01.2016 roku lub później. Obowiązywanie poziomu III redukcji odroczone do roku 2021.

W celu praktycznej realizacji postanowień Prawidła 13, wprowadzono Kodeks techniczny emisji tlenków azotu z okrętowych silników wysokoprężnych (Kodeks techniczny NOx).

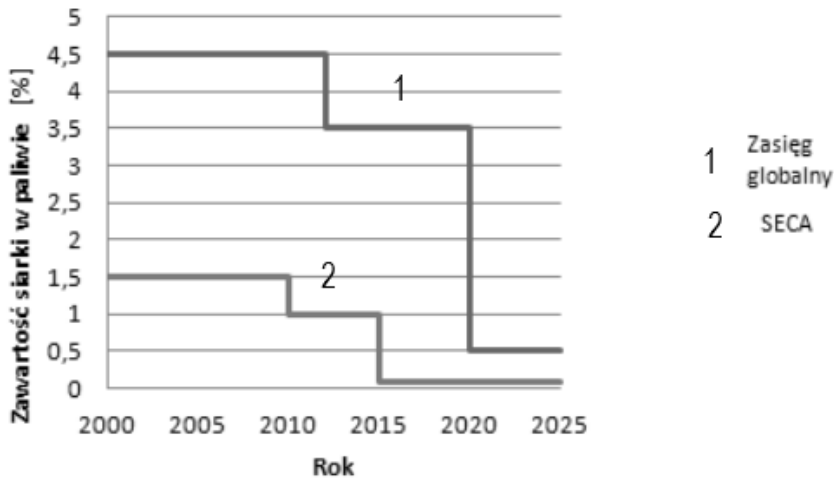
Celem ograniczenia emisji SOx w Prawidle 14 są określone limity zawartości siarki w paliwie żeglugowym. Zawartość siarki w każdym paliwie używanym na statku nie powinna przekraczać następujących limitów:

- 4,5% m/m (miesiąc/miesiąc) przed 1 stycznia 2012 roku;
- 3,5% m/m (miesiąc/miesiąc) od 1 stycznia 2012 roku i po tej dacie;
- 0,5% m/m (miesiąc/miesiąc) od 1 stycznia 2020 roku i po tej dacie.

Wymagania odnoszące się do emisji tlenków siarki są bardziej rygorystyczne na obszarach kontroli emisji SOx. Przed 1 lipca 2010 roku zawartość siarki w paliwie powinna wynosić 1,5% m/m (miesiąc/miesiąc), natomiast od 1 stycznia 2010 roku 1,0% m/m (miesiąc/miesiąc). Od 1 stycznia 2015 i po tej dacie zawartość siarki nie powinna przekraczać 0,1% m/m (miesiąc/miesiąc). Przy tym od 1 stycznia 2010 roku wszystkie statki, które cumują w portach Wspólnoty Europejskiej, są zobowiązane do używania paliw żeglugowych o zawartości siarki poniżej 0,1% m/m (miesiąc/miesiąc) na jednostkę masy paliwa.

Prawidło 15 dotyczy tzw. lotnych związków organicznych (VOCs) ze zbiornikowców, których emisję regulują porty lub przystanie.

Spalanie na statkach należy przeprowadzać w spalarkach okrętowych zgodnie z Prawidłem 16. Możliwe jest natomiast spalanie szlamów olejowych i fekalnych pochodzących z normalnej eksploatacji statków w silnikach głównych lub pomocniczych albo



Rysunek 2. Limity zawartości siarki w paliwie żelugowym według Konwencji MARPOL

Źródło: Międzynarodowa konwencja o zapobieganiu zanieczyszczaniu morza przez statki, 1973/1978, PRS Gdańsk 2015

w kotłach okrętowych. Takich czynności nie można przeprowadzać wewnątrz portów i przystani oraz w ujściach rzek. Każda spalarka umieszczona na statku 1 stycznia 2000 roku lub po tej dacie musi mieć *Świadectwo uznania typu* wystawione przez administrację lub uznaną organizację.

Prawidło 17 ustanawia, że każdy rząd podlegający Konwencji MARPOL ma obowiązek zapewnić urządzenia odbiorcze do zaspokojenia potrzeb statków korzystających z jego portów.

Postanowienia Prawidła 18 gwarantują poprzez ustalenie kryteriów dla paliwa żelugowego, że podczas spalania nie będzie źródłem dodatkowych szkodliwych emisji do środowiska.

Wpływ zanieczyszczeń emitowanych przez silniki na atmosferę

Podwyższona emisja zanieczyszczeń wywołuje zagrożenie zdrowia ludzi. Zależna jest od zwiększania transportu morskiego, jak również rosnącej potrzeby statków na energię elektryczną. Najbardziej niebezpiecznym składnikiem zanieczyszczającym powietrze jest tlenek azotu. NO_x jest kilkakrotnie bardziej szkodliwy od dwutlenku siarki i prawie dziesięciokrotnie bardziej szkodliwy niż tlenek węgla. Konsekwencją reakcji fotochemicznych jest tworzenie się smogu, który jest wysoce trujący dla żywych organizmów.

Emisja tlenków azotu wpływa negatywnie na naturalne przemiany chemiczne, które zachodzą w atmosferze. Tlenki azotu (NO, NO₂, N₂O, N₂O₃, N₂O₄, N₂O₅), zwa-

ne dalej NO_x-ami, przyczyniają się między innymi do degradacji warstwy ozonowej i potęgowania tzw. efektu cieplarnianego. W połączeniu z wodą tworzą kwas azotowy i azotawy, który wraz z opadami atmosferycznymi przedostaje się do gleby, powodując jej zakwaszenie. Ponadto, stężenie NO₂ równe 0,12 mg/dm³ powietrza powoduje podrażnienie błon śluzowych górnych dróg oddechowych u człowieka.

Reakcja tlenków siarki z innymi związkami zawartymi w atmosferze powoduje tworzenie się aerozoli siarczanowych. W konsekwencji połączenia się tej substancji z wodą powstaje kwas siarkowy będący podstawowym składnikiem kwaśnych deszczy. Wynikiem tego jest degradacja wrażliwych ekosystemów leśnych, osłabienie systemu korzeniowego oraz obniżenie ilości bakterii glebowych. Występowanie tlenków siarki w powietrzu niszczy liście roślin oraz hamuje ich fotosyntezę. Dodatkowo są one niebezpieczne dla człowieka, już krótkotrwały kontakt z wysokim stężeniem tlenków siarki działa drażniąco na układ oddechowy i powoduje dysfunkcje oddechowe. Poza tym aerozole siarczanowe potrafią wnikać głęboko do płuc i niszczyć funkcjonowanie układu oddechowego.

Cel

Celem pracy jest dokonanie analizy wpływu eksploatacji statku pasażerskiego na zanieczyszczenia atmosfery w aspekcie przestrzegania Konwencji MARPOL. Zakresem pracy objęto:

- przegląd źródeł zanieczyszczeń środowiska wytwarzanych przez statek,
- wymagania VI załącznika Konwencji MARPOL,
- wpływ zanieczyszczeń emitowanych przez silniki na atmosferę,
- opracowanie pomiarów zawartości tlenków azotu i siarki w spalinach w aspekcie Konwencji MARPOL.

Metodyka badań emisji spalin

Badania zostały przeprowadzone na silniku czterosuwowym typu V firmy MaK na statku pasażerskim. Dane silnika:

- Typ silnika głównego: MaK 12M43C,
- Producent silnika: MaK,
- Skok tłoka: 610 mm,
- Średnica cylindra/tłoka: 430 mm,
- Moc na wale: 12 000 kW,
- Nominalna prędkość obrotowa: 500 obr/min,

- Rodzaj odzysku energii odpadowej: Kocioł utylizacyjny,
- Pędnik: Wartsila LT700A-CPP.

Skład spalin został wyznaczony przy użyciu analizatora spalin Testo 350 XL producenta Termo Precyzja, Polska (rys. 3). Pozwolił on na pomiar zawartości tlenków azotu oraz dwutlenku siarki w generowanych spalinach celem porównania jej z kryteriami narzuconymi przez VI Załącznik konwencji MARPOL.

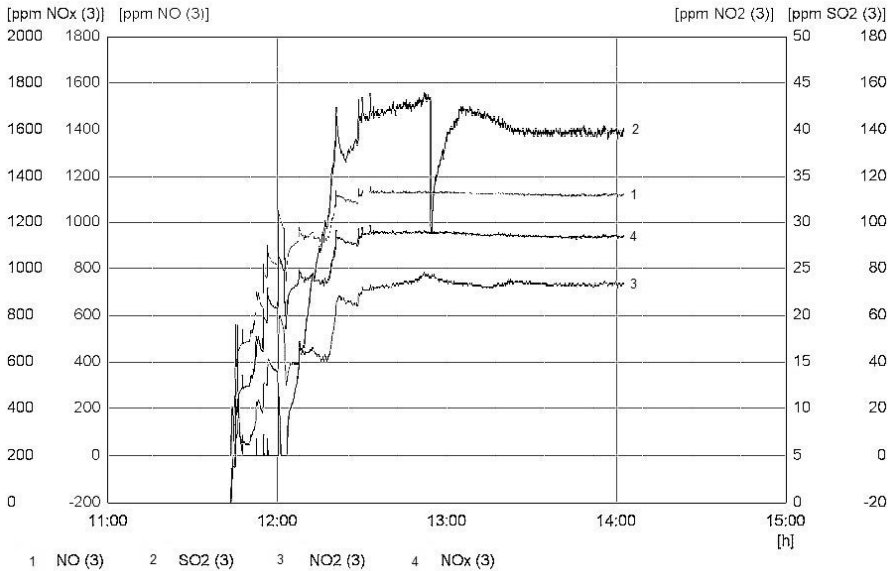


Rysunek 3. Widok ogólny analizatora spalin Testo 350 XL

Źródło: opracowanie własne.

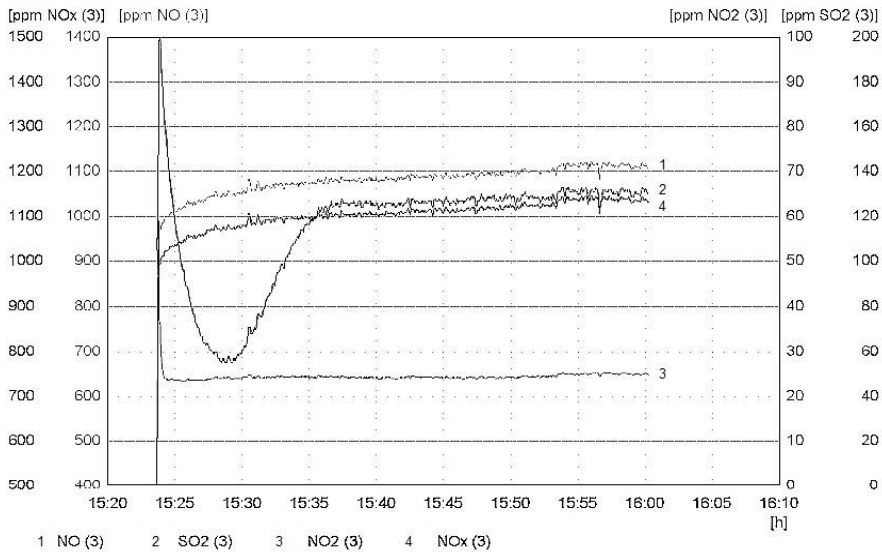
Badania zostały przeprowadzone podczas manewrów wejściowych do portu, manewrów wyjściowych oraz na pełnym morzu z obciążeniem silnika wynoszącym 85%. Wykresy na rysunkach 4–9 przedstawiają pomierzone wartości emisji spalin.

Z przeprowadzonych badań można wywnioskować, że silnik główny statku pasażerskiego uwalnia do atmosfery około 2500 ppm (ang. parts per million) szkodliwych składników spalin. Wyniki pomiarów przedstawione są w ppm, wykonane więc zostały niezbędne obliczenia w celu sprawdzenia, czy wytwarzana emisja spalin speł-



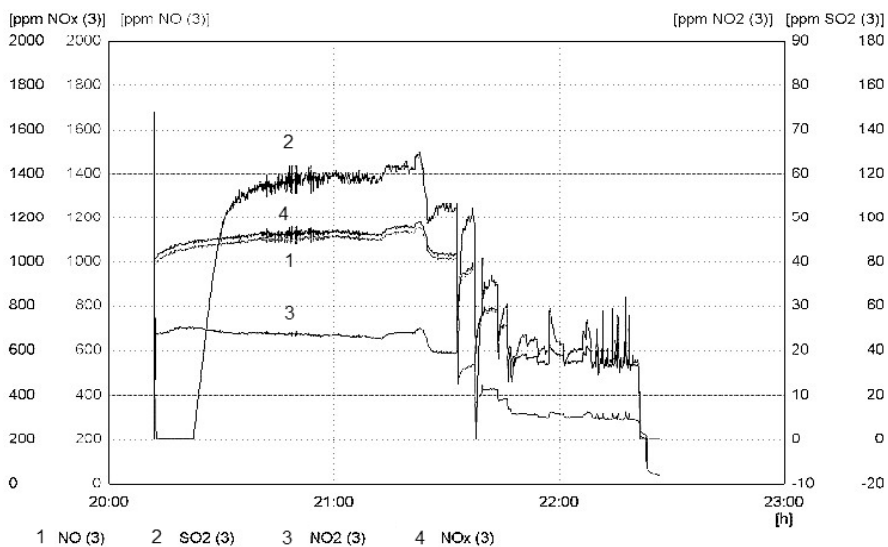
Rysunek 4. Wykres emisji spalin podczas manewrów wyjściowych silnika głównego z prawej burty

Źródło: opracowanie własne.



Rysunek 5. Wykres emisji spalin podczas pracy na pełnym morzu silnika głównego z prawej burty

Źródło: opracowanie własne.



Rysunek 6. Wykres emisji spalin podczas manewrów wejściowych silnika głównego z prawej burty

Źródło: opracowanie własne.

nia wymagania VI załącznika konwencji MARPOL, których wyniki zostały przedstawione w formie wykresów (rys. 8, 9, 10).

Tabela 3. Tabela pomiarowa pierwiastków emitowanych przez silnik MaK podczas pracy na morzu

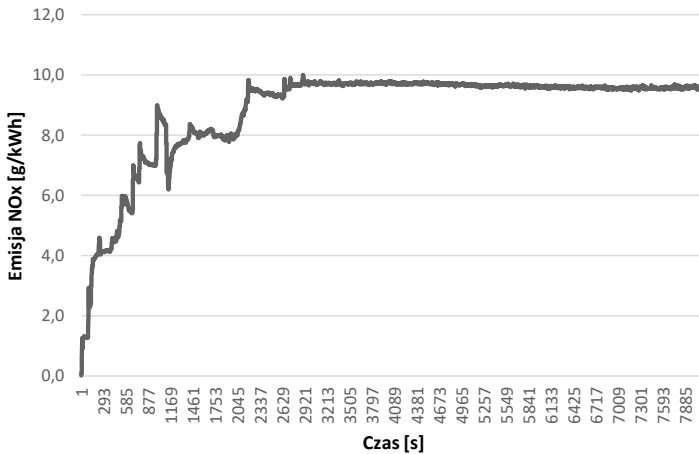
Czas [s]	%O ₂	ppm CO	ppm NO	ppm SO ₂	ppm NO ₂	ppm H ₂	ppm Nox	% CO ₂
0	13,45	19	0	0	0,0	5	0	5,54
1	13,45	19	808	0	158,5	5	967	5,54
2	13,45	19	808	0	158,5	5	967	5,54
3	13,44	19	824	177	155,3	4	979	5,54
4	13,44	19	824	177	155,3	4	979	5,54
5	13,44	20	879	177	155,3	4	1034	5,55
6	13,44	20	879	202	138,0	4	1017	5,55
7	13,45	20	879	202	138,0	4	1017	5,54
8	13,45	20	942	225	107,4	5	1049	5,54
9	13,45	20	942	225	107,4	5	1049	5,54
10	13,44	21	999	227	81,4	4	1080	5,54

11	13,42	20	999	227	81,4	6	1080	5,56
12	13,42	20	1041	223	65,4	6	1106	5,56
13	13,42	20	1041	223	65,4	6	1106	5,56
14	13,42	18	1057	217	56,0	6	1113	5,56
15	13,42	18	1057	217	56,0	7	1113	5,56
16	13,40	15	1063	217	56,0	7	1119	5,57
17	13,40	15	1063	212	50,1	7	1113	5,57
18	13,39	15	1063	212	50,1	7	1113	5,58
19	13,39	14	1066	207	46,4	7	1112	5,58
20	13,39	14	1066	207	46,4	6	1112	5,58
21	13,40	13	1067	204	46,4	6	1114	5,57
22	13,40	13	1067	204	43,9	5	1111	5,57
23	13,41	12	1067	204	43,9	5	1111	5,57
24	13,41	12	1067	201	42,4	5	1110	5,57
25	13,41	12	1067	201	42,4	6	1110	5,57
26	13,42	11	1067	199	41,1	6	1109	5,56
27	13,42	11	1067	199	41,1	6	1112	5,56
28	13,41	10	1070	199	41,1	6	1111	5,57
29	13,41	10	1070	198	40,3	6	1111	5,57
30	13,41	10	1070	198	40,3	6	1114	5,57
31	13,41	10	1074	197	39,6	6	1114	5,57
32	13,41	10	1074	197	39,6	6	1116	5,57
33	13,41	9	1076	195	39,6	6	1116	5,56
34	13,41	9	1076	195	39,0	6	1116	5,56
35	13,41	9	1076	195	39,0	6	1116	5,56
36	13,41	9	1077	194	38,6	6	1116	5,56
37	13,41	9	1077	194	38,6	6	1116	5,56
38	13,41	9	1081	193	38,1	6	1119	5,57
39	13,41	9	1081	193	38,1	6	1119	5,57
40	13,39	8	1083	193	38,1	6	1121	5,58
41	13,39	8	1083	192	37,7	6	1120	5,58
42	13,40	8	1083	192	37,7	6	1120	5,57
43	13,40	8	1082	190	37,3	6	1119	5,57
44	13,40	8	1082	190	37,3	5	1119	5,57
45	13,40	8	1082	190	37,3	5	1119	5,57

Źródło: opracowanie własne.

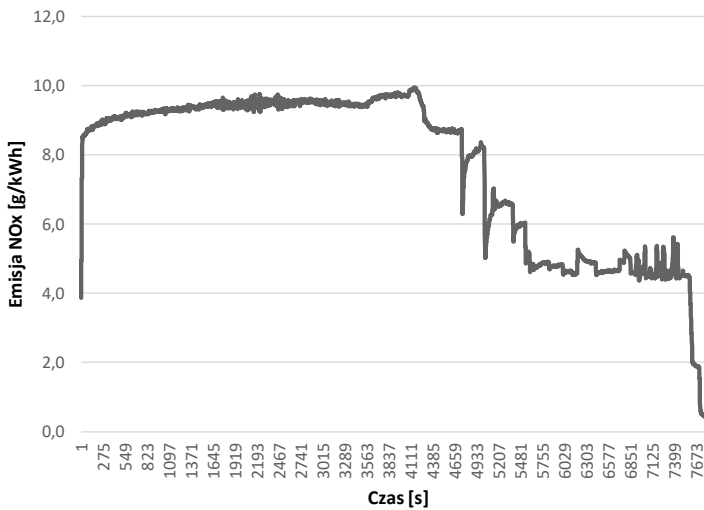
Wyniki badań

Po wykonaniu podstawowych obliczeń zostały sporządzone wykresy przedstawiające emisję tlenków azotu silnika głównego MaK 12M43C do atmosfery ($\frac{g}{kWh}$) w czasie manewrów wyjściowych, wejściowych, a także podczas pracy na pełnym morzu.



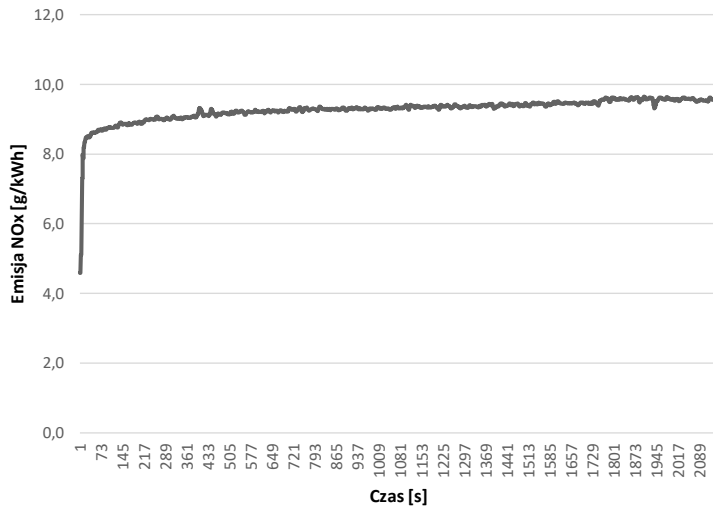
Rysunek 7. Wykres emisji tlenków azotu w czasie manewrów wyjściowych silnika głównego z prawej burty

Źródła: opracowanie własne.



Rysunek 8. Wykres emisji tlenków azotu w czasie manewrów wejściowych silnika głównego z prawej burty

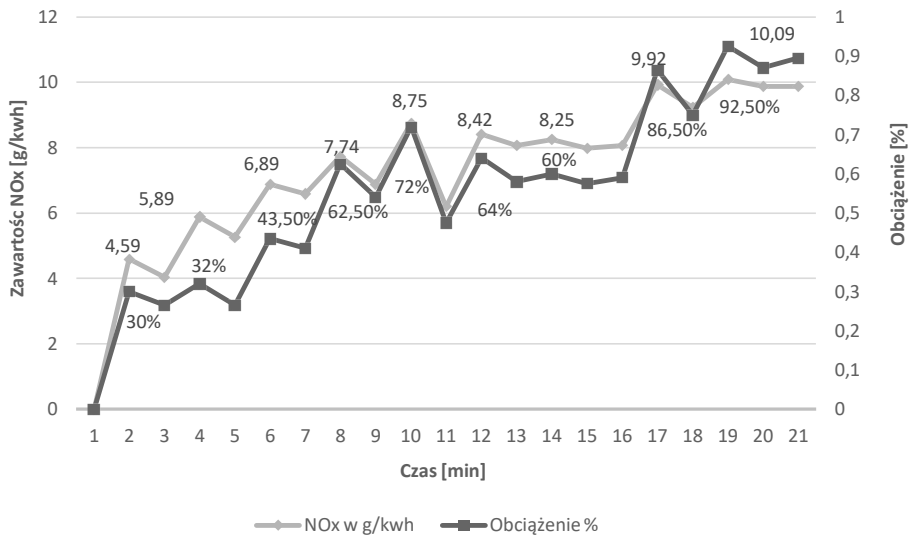
Źródło: opracowanie własne.



Rysunek 9. Wykres emisji tlenków azotu w czasie pracy na pełnym morzu silnika głównego z prawej burty

Źródło: opracowanie własne.

Następnie wykonano wykres zestawiający emisję tlenków azotu z procentowym obciążeniem silnika głównego MaK 12M43C.



Rysunek 10. Wykres zależności emisji do obciążenia podczas manewrów wyjściowych silnika z prawej burty

Źródło: opracowanie własne.

Statek, na którym zostały zrobione badania, obowiązuje I poziom emisji z tabeli 2:

Z zastrzeżeniem przepisu 3 niniejszego Załącznika, praca okrętowego silnika wysokoprężnego zainstalowanego na statku zbudowanym w dniu 1 stycznia 2000 r. lub po tej dacie, a przed 1 stycznia 2011 roku jest zabroniona, z wyjątkiem gdy emisja tlenków azotu z silnika (obliczona jako całkowita ważona emisja) zawiera się w poniżej podanych granicach, gdzie n = nominalna prędkość silnika (obrotów wału korbowego na minutę):

1. $17,0 \frac{\text{g}}{\text{kWh}}$, gdy n jest mniejsze niż $130 \frac{\text{obr}}{\text{min}}$;
2. $44,0 \cdot n^{-(0,2)} \frac{\text{g}}{\text{kWh}}$, gdy n wynosi 130 lub więcej, lecz mniej niż $2000 \frac{\text{obr}}{\text{min}}$;
3. $9,8 \frac{\text{g}}{\text{kWh}}$, gdy n jest $2000 \frac{\text{obr}}{\text{min}}$ lub więcej.

Przyjmując nominalną prędkość silnika równą $n = 460 \frac{\text{obr}}{\text{min}}$, obliczono, że dopuszczalna emisja wynosi:

$$E_u = 13,20 \frac{\text{obr}}{\text{min}}.$$

Silnik ten przy największym obciążeniu emituje 1157 ppm tlenków azotu do atmosfery, co równa się:

$$E_u = 9,73 \frac{\text{g}}{\text{kWh}}.$$

Silnik główny MaK 12M43C zainstalowany na statku pasażerskim spełnia wymagania VI Załącznika konwencji MARPOL zawierającego dopuszczalne wartości emisji tlenków azotu do atmosfery.

Dyskusja

Z powyższych badań wywnioskować można, że emisja pierwiastków szkodliwych do atmosfery jest wprost proporcjonalna do wzrostu obciążeń silnika głównego. Praca podczas zmiennych obciążeń skutkuje zmienną emisją spalin. Należy również pamiętać, że na emisję mają dodatkowo wpływ urządzenia pomocnicze, takie jak: kotły, spalarki, a także urządzenia powiązane bezpośrednio z działaniem silnika głównego, np. stery strumieniowe (Myśków 2005).

Pomiar rzeczywistej emisji spalin należy przeprowadzić na prototypie silnika głównego na hamowni wodnej z utrzymaniem oryginalnych części zamiennych, które gwarantują zachowanie emisji pierwiastków szkodliwych w pożądanych poziomach (tier I, tier II, tier III).

Decydujące znaczenie dla wzrostu zawartości NO_x-ów w gazach spalinowych ma wzrost temperatury. Innymi czynnikami wpływającymi na zawartość tlenków azotu

w gazach spalinowych jest szybkość wzrostu temperatury i ciśnienia oraz zawartość tlenu w spalinach. Im większe jest ciśnienie spalania i szybszy przyrost temperatury, tym mniejsza emisja tlenków azotu. Z kolei wzrost zawartości tlenu w gazach spalinowych powoduje wzrost zawartości NO_x-ów. Najlepszym i najtańszym sposobem na utrzymanie niskiej emisji tlenków azotu jest utrzymanie silnika w dobrym stanie technicznym. Prawidłowa regulacja pomp wtryskowych oraz dobry stan techniczny aparatury wtryskowej i elementów komory spalania powodują nie tylko niskie zużycie paliwa, ale także dzięki dynamicznemu spalaniu obniżenie zawartości NO_x-ów.

Obniżenie zawartości tlenu w gazach spalinowych wiąże się ze zmianami konstrukcyjnymi. Skutecznym sposobem obniżenia zawartości tlenków azotu jest recyrkulacja spalin. Dzięki niej wydłuża się czas chłodzenia spalin, a tym samym większa ilość NO_x-ów ulega rozpadowi. Ujemną stroną tego rozwiązania jest wzrost zawartości zanieczyszczeń stałych w spalinach przy dużych obciążeniach silnika. Zanieczyszczenia te mogą jednak być usunięte przez filtrację, co przyczynia się jednak do wzrostu kosztów obsługi. Dodatkowym rozwiązaniem mogą być katalizatory w postaci związków chemicznych dodanych do paliwa, ograniczające zanieczyszczenia stałe w spalinach. Innym sposobem obniżenia zawartości NO_x-ów w gazach spalinowych może być także zastosowanie dodatków chemicznych do paliw (Kniaziewicz, Piaseczny 2011).

Podsumowanie

Dla rozwoju globalnej gospodarki żegluga promowa ma duże znaczenie. Wpływa ona jednak negatywnie na atmosferę, a tym samym na środowisko naturalne. W celu minimalizacji emisji ze statków oraz zlikwidowania negatywnego ich wpływu na środowisko sporządza się standardy prawne, procedury i zalecane metody postępowania (Konwencja MARPOL, Konwencja Helsińska). Wymagania dotyczące kontroli emisji tlenków azotu reguluje Załącznik VI (MARPOL). Mają one zastosowanie do wysokoprężnych silników morskich, posiadających moc wyjściową ponad 130 kW. Poziomy kontroli emisji zależą od daty budowy statku.

Wybór najlepszej metody redukcji emisji szkodliwych związków do atmosfery jest kłopotliwy i uzależniony od wielu czynników, np. od: możliwości modernizowania siłowni okrętowej, specyfiki pracy, którą wykonuje dana jednostka pływająca, terenów, po jakich głównie będzie pływał statek, lub skutków ekonomicznych (Mikuła 2017).

Sposobem, który spełnia wymogi norm dotyczących emisji spalin, może być zastosowanie silników dwu- i trzypaliwowych (gaz LNG, paliwo lekkie MGO, paliwo ciężkie HFO). Wykorzystywanie gazu ziemnego jako paliwa okrętowego umożliwia obniżenie szkodliwych związków spalin do atmosfery, ale stosowanie tylko i wyłącznie paliwa gazowego spowoduje szybsze zużycie eksploatacyjne elementów silnika. Dlatego stosujemy silniki dwu- i trzypaliwowe, które dają nam gwarancję prawidłowego użyt-

kowania napędów statków. Kolejną metodą jest stosowanie napędów hybrydowych likwidujących emisję tlenków siarki.

Bibliografia

- Kniażewicz T. Piaseczny L. 2011. Identyfikacja obciążenia okrętowych silników spalinowych w aspekcie oceny emisji toksycznych składników spalin, Zeszyty Naukowe Akademii Marynarki Wojennej, Nr 4.
- Międzynarodowa konwencja o zapobieganiu zanieczyszczeniu morza przez statki, 1973/1978. PRS, Gdańsk 2015.
- Mikuła T. 2017. Okrętowe silniki tłokowe – ekologiczne i ekonomiczne rozwiązania techniczne, Bezpieczeństwo i Ekologia. Autobusy 6.
- Myśków J. 2005. Prognozowanie emisji związków toksycznych zawartych w spalinach opalanych pomocniczych kotłów okrętowych. Zeszyty Naukowe Akademii Morskiej w Szczecinie, Nr 5(77), str. 394–401.
- Wiewióra A. 2002. Ochrona środowiska morskiego w eksploatacji statków. Fundacja Rozwoju Wyższej Szkoły Morskiej w Szczecinie, Szczecin.
- Witkowski K. 2016a. Badania wpływu wybranych uszkodzeń silników okrętowych na parametry pracy silnika i skład spalin. Autobusy 4.
- Witkowski K. 2016b. Problematyka zanieczyszczenia atmosfery przez statki wykorzystywane w transporcie morskim. Autobusy 6.

Abstract

ANALYSIS OF THE IMPACT OF THE OPERATION OF A PASSENGER SHIP ON AIR POLLUTION IN THE ASPECT OF THE MARPOL CONVENTION

The aim of the article is to analyze impact of passenger ship operation on air pollution in the aspect of the MARPOL Convention. The reasons for the emission of pollutants related to the development of maritime transport as well as the increasing demand for energy of ships were discussed. The impact of pollution emitted by passenger ships on the environment was presented.

Emissions of nitrogen oxides and sulfur oxides were measured and compared with the requirements of the MARPOL Convention. The provisions contained in Annex VI to the MARPOL Convention concern the limitation of emissions of substances harmful to the environment, which include: nitrogen oxides, sulfur oxides, solid pollutants, substances that deplete the ozone layer and volatile organic compounds. As a result of the tests, it was found that the main engine MaK 12M43C meets the requirements of Annex VI.

Słowa kluczowe: MARPOL, spaliny, atmosfera, statek

Keywords: MARPOL, fumes, atmosphere, ship

mgr inż. Mateusz Dawid

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Nauk Technicznych

Studenckie Koło Naukowe Podstawowych Problemów Bezpieczeństwa

ANALIZA ALTERNATYWNYCH ZASTOSOWAŃ NASION ŁUBINU

Wstęp

Łubin jest rośliną o wielu zaletach, lecz nie przekłada się to na jego popularność. Należy do roślin z rodziny bobowatych oraz liczy około 200 gatunków. Największą część z nich można spotkać w Ameryce Północnej. W Europie występuje znacznie mniej gatunków, a znaczna część z nich to jedynie rośliny ozdobne. Jako rośliny uprawne wykorzystuje się zaledwie ok. 15 gatunków, gdyż zdecydowana większość zawiera toksyczne składniki, dlatego nie mogą być wykorzystywane w sektorze spożywczym. Popularność łubinu wzrosła wraz z rosnącym zapotrzebowaniem i koniecznością zagospodarowania mniej żyznych gleb (Harasimowicz-Herman 1997).

Najkorzystniejszym przedplonem dla łubinu są zboża, dzięki czemu jest on idealnym przerywnikiem monokultury zbożowej (www.rynek-rolny.pl). Przygotowanie stanowiska pod siew może odbyć się przy zastosowaniu tradycyjnej metody orkowej, ale można też wykonać uprawę uproszczoną. Także przy zasiewach łubinu coraz częściej sprawdza się wykonanie siewu bezpośredniego w ściernisko. Niewielka odporność na przymrozki wpływa na optymalny termin siewu, który zaleca się wykonywać od połowy marca, aż do końca kwietnia. Kielkowanie może rozpocząć się już w temperaturze powyżej 5°C, lecz najkorzystniejsza jest temperatura powyżej 9°C. Zalecana głębokość wysiewu to jedynie 3 cm, gdyż zbyt głęboki wysiew może skutkować znaczną nierównomiernością wschodów i zmniejszeniem plonu (www.agromor.pl).

Łubin sprawdza się na wszystkich rodzajach gleb, także na tych lekkich mniej żyznych (Grabowska i in. 2016). Często przejmuje słabsze stanowiska, gdzie było uprawiane żyto, lub obszary, gdzie nie były uprawiane zboża, choć sam plon na tak mało żyznych glebach będzie na ogół niski i zmienny (Szukała i in. 1997). Optymalne pH

gleby powinno mieścić się w przedziale od 6 do 7, zbyt silne zakwaszenie gleby może znacznie utrudnić lub w skrajnych przypadkach uniemożliwić uprawę łubinu. Nawożenie jest w dużej części zależne od stanowiska, na którym jest prowadzona uprawa. Sama charakterystyka rośliny umożliwia zastosowanie uprawy ekstensywnej i rezygnację z nawożenia. Jeśli pH jest zbyt niskie, warto przeprowadzić wapnowanie. Gdy chcemy uzyskać większy plon, warto zastosować dodatkowe nawożenie, najlepiej warto wspomóc uprawę nawozami fosforowymi i potasowymi. Charakterystyka rośliny umożliwia redukcję lub nawet rezygnację z nawożenia azotem, gdyż roślina jest w stanie samodzielnie pobrać ten składnik z powietrza. Jedynie na słabszych stanowiskach można przed siewem zasilić uprawę małą dawką azotu, aby zapewnić lepszy start dla roślin (Wojnowska i in. 1997).

Łubin jest także narażony na ataki przez oprzędziki, mszyce czy infekcje patogenów wywołujących choroby takie, jak: antraknoza, dlatego też istotne jest kontrolowanie stanu uprawy i w razie konieczności zastosowanie fungicydów lub insektycydów. Samo zachwaszczenie należy zwalczać bezpośrednio po siewie przy wykorzystaniu metod mechanicznych lub chemicznych.

Zbiór łubinu najczęściej następuje od połowy lipca aż do końca sierpnia, duży wpływ na termin zbioru ma wcześniejsza uprawa, gdyż na stanowiskach po roślinach okopowych lub po nawożeniu obornikiem wydłuża się okres wegetacji. Zaleca się, aby wilgotność zbieranych nasion wynosiła poniżej 20%, a najlepiej, gdy spadnie do około 15%.

Łubin jest cenną rośliną ze względu na wiele cech, sam system korzeniowy ułożony palowo sięga nawet do 2,5 m, tym samym doskonale spulchniając glebę pod przyszłą uprawę (www.fajnyogrod.pl). Łodygi z reguły osiągają do 60 cm, ale występują także gatunki, u których mogą osiągnąć nawet 2 m. Kolejną zaletą jest fakt, że roślina podczas symbiozy pobiera azot bezpośrednio z powietrza, dlatego też nie ma konieczności dodatkowego nawożenia jej tym składnikiem. Zdolność tę posiada dzięki relacjom symbiotycznym z bakteriami brodawkowymi. Cechy te sprawiają, że łubin jest świetną rośliną, aby poprawić stan gleby. Zostawia dobrze spulchnioną glebę, a także znacząco wzbogaca ją w azot (Krześlak, Sadowski 1997).

Wysoka zawartość alkaloidów w nasionach łubinu skutecznie utrudnia zastosowanie materiału w przemyśle spożywczym. Istnieje jedynie kilka gatunków o mniejszej zawartości toksycznych składników, które dzięki wysokiej zawartości białka dochodzącej nawet do 48% są świetnymi dodatkami do pasz. Podejmowano próby wykorzystania łubinu jako surogatu kawy, lecz niestety mogłoby wiązać się to wydzielaniem dużej ilości substancji szkodliwych dla zdrowia (Piechocka 1962).

Wysokie walory estetyczne, jak i kwiatostany w wielu różnych kolorach przyczyniły się do częstego wykorzystywania łubinu w ogrodach. Można w nich spotkać zdecydowanie więcej gatunków, gdyż toksyczne składniki nie stanowią problemu, a niewielkie wymagania glebowe znacząco pomagają w uprawie. Dodatkowo można także sadzić gatunki wieloletnie, które zdobią ogrody przez dłuższy czas. Duże kwiatostany sprawdzają się przy wykorzystaniu na kwiaty cięte.

Specjalizacje gospodarstw w produkcji roślinnej, a konkretniej produkcja ograniczająca się jedynie do kilku roślin są przyczyną uprawy roślin w monokulturze, co prowadzi do spadku żyzności gleby oraz jej zasobności w składniki pokarmowe (Romek, Michalcewicz 1990). Najczęściej uprawy ograniczają się jedynie do roślin takich, jak: pszenica, jęczmień, żyto, rzepak, kukurydza czy ziemniaki lub buraki. Często przy wielkopowierzchniowych uprawach nie jest możliwe, aby po zbożach nie były uprawiane dalej zboża. Najczęściej, aby uprawy zachowywały swój wysoki plon, stosuje się znaczne ilości nawozów mineralnych oraz środków ochrony roślin. Wciąż najlepszymi nawozami są nawozy naturalne, takie jak obornik, nawet w mniejszej dawce jako dodatek do nawozów mineralnych znacznie poprawiają żyzność i produktywność gleb (Sienkiewicz i in. 1999).

Poza nawozami naturalnymi można także zastosować odpowiednią strukturę zasiewów. Przerwanie monokultury zbóż może nastąpić np. poprzez zasiew łąbinu. Roślina ta przerwałaby niekorzystne procesy, a także wzbogaciła glebę w azot oraz inne składniki. Resztki roślin pozostałe po zbiorze stanowiłyby cenny nawóz, także możliwe jest wykorzystanie jako poplon, dzięki temu, że łąbin rośnie dość szybko i wytwarza dużą ilość zielonej masy w krótkim czasie. Obecne tendencje w rolnictwie prowadzą do ograniczenia stosowania nawożenia mineralnego, jak i samych środków ochrony roślin, dlatego wprowadzenie do uprawy większej ilości roślin stanie się koniecznością.

Głównym czynnikiem decydującym o uprawie danej rośliny jest opłacalność. Często rolnicy decydują się na uprawę w monokulturze, nawet gdy wiąże się to z dużymi ilościami nawozów mineralnych i środków ochrony roślin, o ile proces ten przyniesie zyski. Znaczna część roślin, które mogą być dobrym zmianowaniem upraw, nie osiąga wysokich plonów, jak i nie ma wysokiej ceny, która mogłaby zrekompensować mniejszy plon i podnieść opłacalność, taki fakt skutecznie zniechęca rolników. Dlatego poszukuje się nowych zastosowań dla roślin, które mogą przerwać monokulturę, aby móc w przyszłości wykorzystać zwiększając się ich powierzchnie upraw.

Wraz z rozwojem technologii cały czas rosną potrzeby paliwo-energetyczne, a wymagania redukcji emisji gazów cieplarnianych prowadzą do zwiększenia wykorzystywania odnawialnych źródeł energii (Wójcicki 2011). Sektor produkcji biopaliw w Polsce cały czas się rozwija i rośnie wykorzystanie różnego typu roślin. Do produkcji biodiesla głównie wykorzystuje się rzepak, lecz problemem przy tej uprawie jest znalezienie odpowiedniego stanowiska. Niestety rzepak wymaga żyznych gleb, dlatego też jego uprawa możliwa jest na ograniczonej powierzchni. Produkcja bioetanolu także cały czas się rozwija i jest na etapie licznych zmian technologicznych. Głównymi surowcami do produkcji bioetanolu są żyto i ziemniaki, choć obserwuje się tendencję spadkową wykorzystania tych ostatnich. Dodatkowo wzrasta zainteresowanie innymi surowcami, takimi jak: pszenżyto, buraki cukrowe, a także kukurydza. Produkcji bioetanolu nie ograniczają czynniki biologiczne, gdyż rośliny przeznaczone do przetworzenia można uprawiać nawet na słabszych glebach (Kupczyk 2006). Tendencje ekologiczne będą powodowały stały wzrost zapotrzebowania na biopaliwa, dlatego też

konieczne jest przygotowanie możliwości produkcji biopaliw z różnego typu roślin, które bez przeszkód można uprawiać na dużej powierzchni przy ograniczeniu stosowania środków chemicznych.

Cel

Celem badań było określenie alternatywnych zastosowań nasion łubinu na podstawie analizy ich cech chemicznych.

Material i metody

Materiał badawczy stanowiły nasiona łubinu trzech różnych gatunków: łubinu białego, łubinu wąskolistnego oraz łubinu żółtego.

Nasiona badanych gatunków łubinu przed wykonaniem analiz chemicznych poddano procesowi mielenia. Jako pierwszą cechą określono zawartość wody oraz suchej masy przy wykorzystaniu metody suszarkowej (PN-EN ISO 665:2002). Następnie oznaczono zawartość białka metodą Kjeldahla (PN-EN ISO 8968-1:2014-03). Kolejną cechą, którą określono, była zawartość tłuszczu, a do tego celu wykorzystano metodę ekstrakcji z fazy stałej przy użyciu eteru naftowego (metodę Soxhleta) (PN-EN ISO 659:2010). Metodę tę uznaje się za czasochłonną, lecz dającą najdokładniejsze wyniki. Do określenia popiołów wykorzystano proces suchej mineralizacji (PN-ISO 2171:2010). Głównymi składnikami popiołu są potas, sód, żelazo, fosfor, wapń, siarka, magnez oraz inne metaloidy i metale w mniejszych ilościach. Wszystkie analizy wykonano w trzech powtórzeniach. Dzięki wcześniejszym procesom i oznaczeniu pozostałych cech możliwe było matematyczne określenie zawartości węglowodanów w suchej masie nasion łubinu za pomocą poniższego wzoru:

$$W=100-(T+B+P)$$

gdzie:

- W – węglowodany w suchej masie nasion,
- T – tłuszcze w suchej masie nasion,
- B – białka w suchej masie nasion,
- P – popiół w suchej masie nasion.

Wyniki i dyskusja

Proces suszenia pozwolił określić zawartość wody w badanych nasionach łubinu. Tabela 1 przedstawia średnią zawartość wody oraz suchej masy w nasionach trzech badanych gatunków łubinu.

Tabela 1. Zawartość wody w badanych nasionach łubinu

Rodzaj łubinu	Średnia zawartość wody [%]	Odchylenie standardowe	Sucha masa [%]	Odchylenie standardowe
Łubin biały	14,56	0,05979	85,44	0,05979
Łubin wąskolistny	15,08	0,04862	84,92	0,04862
Łubin żółty	13,75	0,04160	86,25	0,04160

Źródło: opracowanie własne.

Zawartość wody we wszystkich badanych nasionach była na zbliżonym poziomie. Najmniejszą wartość – 13,75% – zaobserwowano dla łubinu żółtego, natomiast największą – 15,08% – dla łubinu wąskolistnego, a różnica między tymi wartościami wyniosła jedynie 1,33%.

Zestawienie średnich wartości zawartości białka w suchej masie nasion łubinu przedstawiono w tabeli 2. Największą zawartością białka charakteryzowały się nasiona łubinu żółtego, gdyż w suchej masie tych nasion stwierdzono 42,54% białka, co stanowiło wartość o 9,17% większą niż w nasionach łubinu białego i 9,58% łubinu wąskolistnego.

Tabela 2. Zawartość białka w badanych nasionach łubinu

Rodzaj łubinu	Średnia zawartość białka w suchej masie [%]	Odchylenie standardowe	Sucha masa [%]	Odchylenie standardowe
Łubin biały	33,37	0,41767	85,44	0,05979
Łubin wąskolistny	32,96	0,68531	84,92	0,04862
Łubin żółty	42,54	0,78043	86,25	0,04160

Źródło: opracowanie własne.

Metoda ekstrakcji z fazy stałej przy użyciu eteru naftowego pozwoliła określić zawartość tłuszczu w nasionach łubinu. Wszystkie nasiona cechowała niska zawartość tłuszczu (tabela 3). W nasionach łubinu żółtego oraz wąskolistnego odnotowano bar-

dzo zbliżone wartości wynoszące odpowiednio 4,36% oraz 4,38% średniej zawartości tłuszczu w suchej masie nasion. Natomiast w nasionach łubinu wąskolistnego parametr ten wystąpił na poziomie 4,82 %.

Tabela 3. Zawartość tłuszczu w badanych nasionach łubinu

Rodzaj łubinu	Średnia zawartość tłuszczu w suchej masie [%]	Odchylenie standardowe	Sucha masa [%]	Odchylenie standardowe
Łubin biały	4,82	0,79308	85,44	0,05979
Łubin wąskolistny	4,38	1,15983	84,92	0,04862
Łubin żółty	4,36	0,75177	86,25	0,04160

Źródło: opracowanie własne.

Tabela 4 przedstawia zestawienie średnich wartości węglowodanów oraz popiołu w przeliczeniu na suchą masę nasion trzech rodzajów łubinu. Nasiona łubinu żółtego, podobnie jak w przypadku zawartości białka, wykazały większą zawartość popiołu w suchej masie (4,88%) w porównaniu do dwóch pozostałych gatunków, dla których odnotowano wartości wynoszące: 3,76% dla łubinu wąskolistnego oraz 3,57% dla łubinu białego. Średnia zawartość węglowodanów w suchej masie ściśle wiąże się z zawartością innych elementów. Wyższe zawartości białka oraz popiołu odnotowane w nasionach łubinu żółtego przełożyły się na najmniejszą zawartość węglowodanów wynoszącą 48,22%. Jest to wartość mniejsza o około 10% niż w nasionach łubinu białego oraz wąskolistnego. Nasiona tych dwóch gatunków charakteryzowały się odpowiednio zawartością węglowodanów na poziomie 58,23% i 58,90%.

Dla nasion trzech badanych gatunków łubinu odnotowano zbliżone wartości przy oznaczaniu zawartości wody oraz tłuszczu, lecz są to jedyne parametry, dla których wszystkie poddane analizie gatunki miały podobne wyniki. Między nasionami łubinu wąskolistnego i białego nie zaobserwowano istotnych różnic we wszystkich badanych cechach. Natomiast nasiona łubinu żółtego wykazały znaczne różnice zawartości białka i węglowodanów względem nasion pozostałych badanych gatunków łubinu. Takie różnice mogą przełożyć się na inne zastosowania dla sprawdzanych rodzajów nasion.

Łubin żółty ze względu na istotnie większą zawartość białka, która jest wyższa aż o około 10% niż w pozostałych poddanych analizie nasionach, mógłby zostać wykorzystany jako dodatek do produkcji suplementów diety lub wzbogacenia innych produktów w białko.

Wysoka zawartość węglowodanów przy obniżonej zawartości białek w łubinie wąskolistnym oraz białym sugerują znaczny potencjał tego materiału przy wykorzystaniu go w sektorze energetycznym.

Zbliżone plonowanie oraz wymagania agrotechniczne różnych rodzajów łubinu pozwalają uzyskać materiał o znacznie odmiennym składzie chemicznym. Tak wysokie zawartości węglowodanów oraz białka w nasionach różnych rodzajów łubinu skłaniają do poszukiwania nowych zastosowań, aby w pełni wykorzystać potencjał nasion tej rośliny. Określenie nowego przeznaczenia dla danego gatunku łubinu pozwoliłoby zwiększyć jego istotność co powinno przełożyć się na rozszerzenie obszarów jego upraw.

Tabela 4. Zawartość węglowodanów i popiołu w badanych nasionach łubinu

Rodzaj łubinu	Średnia zawartość węglowodanów w suchej masie [%]	Odchylenie standardowe	Średnia zawartość popiołu w suchej masie [%]	Odchylenie standardowe
Łubin biały	58,23	1,18293	3,57	0,12565
Łubin wąskolistny	58,90	1,39136	3,76	0,29644
Łubin żółty	48,22	1,44676	4,88	0,18121

Źródło: opracowanie własne.

Podsumowanie

Wszystkie trzy gatunki łubinu wykazały zbliżone wartości wody, co wskazuje na to, że materiał do badań był odpowiednio magazynowany, gdyż średnia wilgotność dla wszystkich nasion wyniosła około 14,5%, a największa różnica między średnią wyniosła mniej niż jeden procent. Pierwszym parametrem, który istotnie wpływa na zastosowanie nasion badanych rodzajów łubinu, jest zawartość białka. Dla łubinu żółtego odnotowano najwyższą zawartość białka, która wyniosła aż 42,5%. Taka wartość udowodnia, że jest on świetnym materiałem paszowym. Wysoka zawartość białka ma niekorzystny wpływ na zastosowanie nasion łubinu w procesach energetycznych. Podczas bezpośredniego spalania wytwarzające tlenki azotu będą prowadziły do gaśnięcia i obniżenia wartości kalorycznej. W przypadku przeznaczenia pod biogaz nadmierna zawartość białka i związana z tym wysoka zawartość siarki będzie powodowała znaczne zanieczyszczenie gazu pofermentacyjnego. Co prawda w ostatnich latach pojawia coraz więcej doniesień o potencjalnym wykorzystaniu amoniaku jako bezpieczniejszego nośnika wodoru, lecz przemysłowe wykorzystanie tego procesu jest jeszcze odległą perspektywą. Sektor produkcji biopaliw cały czas szybko się rozwija, dlatego też jednym z założeń pracy była weryfikacja istotności łubinu jako materiału do ich produkcji. Zawartość tłuszczu poniżej 5% odnotowano dla wszystkich badanych gatunków

łubinu. Tak mała ilość tłuszczu w suchej masie wyklucza łubin z istotnych materiałów do produkcji biodiesla. Zdecydowanie łatwiej jest wykorzystać w tym celu niezwykle popularny rzepak, który będzie charakteryzował się aż ośmiokrotnie większą zawartością tłuszczu niż badany materiał. Odnotowano znaczną zawartość węglowodanów wynoszącą ponad 58% dla dwóch rodzajów łubinu (wąskolistnego oraz białego). Wartość ta klasyfikuje łubin wśród roślin uprawnych o istotnie wysokiej zawartości węglowodanów. Tak wysoka zawartość węglowodanów mogłaby zostać wykorzystana do produkcji bioetanolu, gdyż niska zawartość tłuszczu nie stanowi problemu. Dlatego można przyjąć, że łubin wąskolistny oraz biały może stanowić istotny materiał do produkcji bioetanolu. Po wstępnych obliczeniach, dla których przyjęto plon łubinu na poziomie 2,5 t z hektara, możliwe byłoby uzyskanie nawet około 400 litrów bioetanolu z jednego hektara uprawy.

Wykorzystanie łubinu także na cele inne niż spożywcze umożliwiłoby uprawę innych jego gatunków. Obecnie uprawia się tylko niektóre rodzaje łubinu, gdyż większość z nich zawiera trujące alkaloidy, lecz przy nowych zastosowaniach toksyczność nie stanowiłaby problemu. Analiza otrzymanych wyników wykazała, że gatunki łubinu o mniejszej zawartości białka wykazują większą zawartość węglowodanów. Takie wyniki świadczą, że gatunki o mniejszej wartości paszowej mają większy potencjał przy przetworzeniu na bioetanol. Łubin jest świetną rośliną do przerwania monokultury w uprawie zbóż, a jego nowe zastosowania mogłyby zwiększyć wartość rośliny, co mogłoby znacząco zachęcić rolników do rozpoczęcia częstszej uprawy łubinu. Przy obecnej tendencji do ograniczenia stosowania środków chemicznych podczas upraw, a także przy wzroście zainteresowania odnawialnymi źródłami energii warto rozważyć szerszą analizę obecnie niewykorzystywanych rodzajów łubinu, gdyż mogą one wykazać jeszcze większą istotność przy wykorzystaniu na cele energetyczne.

Bibliografia

- Grabowska K., Dymerska A., Grabowski J., Pożarska K., 2016. Plonowanie łubinu żółtego (odm. Juno) w zależności od elementów pogodowych w północnej Polsce. *Acta Agrophysica*, 23(2): 189–201.
- Harasimowicz-Herman G. 1997. Łubin żółty i seradela perspektywicznymi roślinami w rolnictwie proekologicznym. *Zeszyty problemowe postępów nauk rolniczych*, 446: 307–311.
- Krześlak S., Sadowski T. 1997. Plonowanie łubinu żółtego, łubinu wąskolistnego i grochu pastewnego uprawianych w okolicach Kętrzyna. *Zeszyty problemowe postępów nauk rolniczych*, 446: 271–275.
- Kupczyk A., 2006. Polski potencjał produkcyjny biopaliw ciekłych w kontekście uwarunkowań unii europejskiej. *Zeszyty problemowe postępów nauk rolniczych*. 508: 111–117.
- Piechocka J., 1962. O możliwościach zastosowania nasion łubinu żółtego (*lupinus luteus* L) jako surrogatu kawy. *Roczniki PZH*, XIII (1): 77–84.

- PN-ISO 2171:2010. Ziarno zbóż i przetwory zbożowe. Oznaczanie popiołu całkowitego.
- PN-EN ISO 659:2010 Nasiona oleiste – Oznaczanie zawartości oleju.
- PN-EN ISO 665:2002. Nasiona oleiste – Oznaczanie wilgotności i zawartości substancji lotnych.
- PN-EN ISO 8968-1:2014-03. Mleko i przetwory mleczne – Oznaczanie zawartości azotu – Część 1: Zasada Kjeldahla i obliczanie białka surowego.
- Romek B., Michalcewicz W., 1990. Wpływ monokultury zbożowej na biologiczne i chemiczne właściwości gleby lekkiej. *Zeszyty problemowe postępów nauk rolniczych*. 376: 113–120.
- Sienkiewicz S., Panak H., Wojnowska T., 1999. Wpływ wieloletniego nawożenia organiczno-mineralnego na poziom żyzności i produktywności gleby. *Zeszyty problemowe postępów nauk rolniczych*. 467: 207–213.
- Szukała J., Maciejewski T., Sobiech S. 1997. Porównanie plonowania trzech gatunków łubinu na różnych kompleksach glebowych. *Zeszyty problemowe postępów nauk rolniczych*, 446: 261–266.
- Wojnowska T., Panak H., Sienkiewicz S. 1997. Działanie azotu i magnezu na plonowanie skład chemiczny nasion i niektóre cechy morfologiczne łubinów *Zeszyty problemowe postępów nauk rolniczych*, 439: 115–120.
- Wójcicki Z., 2011. Energia odnawialna i ochrona środowiska wiejskiego. *Polska Akademia Nauk*. 1: 7–15.
- Wykaz stron:
Serwis rolniczy. <http://www.agromor.pl/> (dostęp 31 maja 2021 r.).
Serwis o uprawie roślin. <https://fajnyogrod.pl/> (dostęp 31 maja 2021 r.).
Portal produkcji nasiennej. <https://www.rynek-rolny.pl/> (dostęp 31 maja 2021 r.).

Abstract

ALTERNATIVE USE OF LUPINE SEEDS BASED ON THE ANALYSIS OF CHEMICAL CHARACTERISTICS

Lupine belongs to the fabaceae family and includes dozens of annual and perennial species. Due to its decorative value, magnificent inflorescences in various colors, it is very often found in gardens, but it is much more important as a plant used in agriculture. Lupine cultivation significantly improves the soil structure as it is often damaged by the grain monoculture. Current trends in agriculture are aimed at reducing the use of chemicals and the production of healthy food, which will make the cultivation of legumes more and more important. Currently, lupine is a valuable addition to the feed material for the nutrition of all species of farm animals. Only a few species may be used for this purpose, but a large proportion of species are poisonous due to their alkaloids content. Therefore, it is worth using the ingredients contained in lupine seeds in a different way, in order to be able to process the product from the increasing area of cultivation of this plant. The aim of the research is to determine the relevance of other uses for lupine seeds on the basis of their chemical properties. To do this, the seeds of white, yellow and blue lupine were analyzed. All varieties showed similar water content. Protein determination has already allowed to indicate the species significantly different from the others. Yellow lupine contained 42.5% of protein in dry matter, this value was higher by 10% compared to blue and white lupine. The fat content was similar for all species. Considering the importance of lupine seeds in the production of biofuels, attention should be paid to the content of fats and carbohydrates. The low content

of fat in the tested seeds indicates a low profitability of using this material in the production of biodiesel, while the high carbohydrate content of up to 58.9% for blue lupine may allow the use of lupine as a raw material for the production of bioethanol. Such use could additionally allow the use of species that cannot be used for food purposes.

Słowa kluczowe: łubin, cechy chemiczne, biopaliwa

Keywords: Lupine, chemical features, biofuels

Joanna Agnieszka Dąbrowska
Grzegorz Dzienis

Koło Naukowe Diagnostyki i Fitopatologii Molekularnej „Biohazard”

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Rolnictwa i Leśnictwa

Opiekun: dr hab. Adam Okorski, prof. nadzw.

REAKCJA WYBRANYCH ODMIAN SOI NA INFEKCJĘ WYWOŁANĄ PRZEZ *FUSARIUM GRAMINEARUM*

Streszczenie: Soja jest ważną rośliną uprawianą głównie w obu Amerykach i Azji z przeznaczeniem na paszę. W ostatnim czasie soja zyskuje na znaczeniu także w Polsce, co jest bezpośrednio związane z większą dostępnością odmian o zróżnicowanej wczesności i umożliwia jej uprawę na terenie całego kraju. Rośliny soi w okresie wegetacji atakowane są przez liczne patogeny, wśród których na szczególną uwagę zasługuje fuzaryjne więdnienie oraz fuzaryjna zgorzel. Są one powodowane przez kompleks grzybów rodzaju *Fusarium*. Na podstawie analizy dostępnej literatury stwierdzono, że jednym z ważniejszych gatunków powodujących zgorzele siewek oraz korzeni soi jest *Fusarium graminearum*.

Celem badań była ocena podatności sześciu odmian soi dostępnych w Polsce: Aldana, Aligator, Lissabon, Merlin, Obelix i Paradis na infekcję wywołaną przez *F. graminearum* (2016/278f, MF162320) w warunkach sztucznej infekcji. Oceny zdrowotności roślin soi przeprowadzono na siewkach 7 i 14 dni po infekcji na podstawie oceny nasilenia objawów chorobowych oraz metodą qPCR. Ocena indeksu porażenia potwierdziła, że najsilniej porażona przez *F. graminearum* była odmiana Obelix, zaś najmniej podatną na infekcję okazała się odmiana Aligator. W badaniach nie odnotowano zniszczenia siewek na skutek infekcji. Analizy molekularne wykonane techniką TaqMan qPCR potwierdziły najsilniejsze porażenie siewek odmiany Obelix, w przypadku której określono 217 pg gDNA *F. graminearum*. Infekcję siewek potwierdzono ponadto poprzez reizolację *F. graminearum* z porażonych tkanek soi.

Badania wykonano w ramach grantu studenckiego 30.450.001-150 pt. Wpływ wybranych gatunków z rodzaju *Fusarium* na plonowanie i zdrowotność soi w warunkach sztucznej infekcji.

Słowa kluczowe: soja, *Fusarium graminearum*, infekcja, Aldana, Aligator, Lissabon, Merlin, Obelix i Paradis

Wstęp i cel pracy

Soja jest najważniejszą rośliną białkową, która jest wykorzystywana do produkcji pasz dla zwierząt oraz do produkcji oleju. Nasiona soi zawierają białko o bardzo dobrym składzie aminokwasowym oraz nienasycone kwasy tłuszczowe. Soja wykorzystywana jest również w przemyśle spożywczym, ze względu na zawartość witaminy B oraz składników mineralnych, jako substytut produktów pochodzenia zwierzęcego. Dzięki zawartości fitoestrogenów jest używana również w przemyśle farmaceutycznym (Lewandowska 2016).

Z racji wzrostu zainteresowania uprawą soi w Polsce istotne jest określenie wartości gospodarczej i przydatności do uprawy odmian, których nasiona są dostępne na rynku nasiennym. Większość odmian, których nasiona są oferowane do sprzedaży, nie jest wpisana do krajowego rejestru i nieznana jest ich przydatność do uprawy na terenie Polski. Testowanie odmian soi koncentruje się między innymi na określeniu terminu dojrzewania w różnych rejonach kraju i w różnych warunkach pogodowych (Osiecka 2019). Dotychczasowe badania nie skupiały się na zdrowotności nasion soi stanowiący plon główny jej uprawy. Odmiany i ich dobór do konkretnego stanowiska i rejonu są kluczem do uzyskania zadowolających plonów soi.

Liczne prace badawcze pokazują, że zagrożeniem w uprawie soi jest występowanie chorób grzybowych, które znacząco obniżają plony i pogarszają jakość nasion. Choroby grzybowe soi powodowane są zwykle przez grzyby rodzaju: *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Ascochyta*, *Alternaria*, *Sclerotinia*, *Phomopsis* oraz *Perrenospora* (Bajwa i in. 2017, Filoda i in. 2016). Według Jandy i Wolskiej (2015) w warunkach Polski groźnym gatunkiem dla soi w ostatnich latach stał się *F. graminearum*. Pierwsze doniesienia o występowaniu *F. graminearum* na roślinach soi odnotowano w 2004 roku (Pioli i in. 2004). W Polsce gatunek ten na soi zidentyfikowano w roku 2015 (Janda i Wolska 2015), zaś najnowsze doniesienia potwierdzają, że patogen ten zagraża wielu gatunkom z rodziny bobowatych (Rasiukeviciute, Kelpsiene 2018). Jako jeden z kilku przedstawicieli rodzaju *Fusarium* powoduje on fuzaryjną zgorzel szyjki korzeniowej i podstawy łodyg. Patogeny te przenoszone są przez porażone nasiona, ale również występują w glebie w postaci grzybni lub zarodników przetrwalnikowych. Fuzaryjna zgorzel szyjki korzeniowej i podstawy łodygi prowadzi do rozkładu tkanek, co można zauważyć w postaci ciemnobrązowych i czerwonych przebarwień na szyjce korzeniowej i podstawie łodygi. Porażone rośliny są słabsze od roślin zdrowych i wolniej rosną. Niskie temperatury, monokultura oraz uszkodzenia korzeni sprzyjają rozwojowi choroby. Fuzaryjne więdnienie to choroba naczyniowa powodowana najczęściej przez *F. oxysporum*, choć zdaniem Hafez i in. (2021) chorobę powoduje kompleks grzybów rodzaju *Fusarium*, w tym *F. graminearum*. Patogeny te, wnikając w wiązki przewodzące, powodują zahamowanie wzrostu roślin. Liście zwijają się, więdną kwiatostany, co prowadzi do ograniczenia zawiązywania strąków. Szczególnie wyraźne objawy poja-

wiają się w okresie kwitnienia, nasilają się na przełomie czerwca i lipca, kiedy temperatura gleby jest wysoka (Praczyk i in. 2017).

Ważnym narzędziem wspomagającym proces decyzyjny stosowanym w walce z patogenami grzybowymi okazują się być molekularne metody diagnostyczne (Okorski i in. 2017). Identyfikację agrofagów przy wykorzystaniu reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) z materiału roślin uprawnych w Polsce rozpoczęto na początku XX wieku (Fordoński i in. 2001). Metody molekularne stanowią alternatywę dla klasycznych metod identyfikacji patogenów polegających na hodowli na podłożach mikrobiologicznych oraz bazujących na objawach chorobowych. Metody molekularne oferują wyjątkową skuteczność, bowiem ich próg detekcji dotyczy femtogramowych ilości DNA, ponadto charakteryzują się one powtarzalnością, łatwością wykonania. Jednak ich główną zaletą jest możliwość detekcji patogenów roślin w fazie presymptomatycznej, a następnie zastosowanie celowanej ochrony roślin, co zgodne jest z zasadami integrowanej ochrony roślin usankcjonowanej przepisami prawa zawartymi w Dyrektywie 2009/128/WE, Rozporządzenie WE/1107/2009, Ustawa z dnia 8 marca 2013 r. o środkach ochrony roślin, Dz.U. poz. 455.

Celem badań była ocena podatności sześciu odmian soi dostępnych w Polsce: Aldana, Aligator, Lissabon, Merlin, Obelix i Paradis na infekcję wywołaną przez *F. graminearum*.

Materiał i metody

Infekcja siewek soi oraz ocena ich zdrowotności

Materiał do badań stanowiły nasiona odmian Aldana, Aligator, Lissabon, Merlin, Obelix i Paradis pozyskane z firm nasiennych. Nasiona badanych odmian soi odkażono powierzchniowo, stosując najpierw płukanie sterylną wodą destylowaną, a następnie kolejno: w alkoholu etylowym [C_2H_5OH] przez 5 minut oraz przez kolejne 5 minut w podchlorynie sodu [$NaOCl$], na koniec nasiona przepłukano sterylną wodą destylowaną. Odkażony materiał nasienny umieszczono na sterylnej wacie w sterylnych probówkach wielkości 10 ml (po jednym nasieniu w jednej próbówce). Hodowlę prowadzono w komorze klimatycznej w temperaturze 18°C. Badania prowadzono w 10 powtórzeniach biologicznych na wariant badawczy. Po upływie 7 dni od skiełkowania nasion przeprowadzono sztuczną infekcję roślin soi. W badaniach wykorzystano izolat *Fusarium graminearum* (2016/278f, MF162320) z kolekcji Katedry Entomologii Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej UWM w Olsztynie. Za pomocą komory Bürkera przygotowano rozcieńczenie zarodników 1×10^6 w 1 ml, zawieszonych w sterylnej wodzie z dodatkiem glukozy oraz hydrolizatu kazeiny, którą następnie wytrząsano przez 24 h w celu pobudzenia kiełkowania zarodników. Tak przygotowana zawiesina

zarodników posłużyła do infekcji siewek soi, które infekowano, wprowadzając 2 ml zawiesiny do sterylnych probówek, w których hodowano rośliny. Doświadczenie przeprowadzono na 10 powtórzeniach na wariant badawczy. Badania prowadzono wobec wariantu kontrolnego, który stanowiły siewki badanych odmian soi traktowane 2 ml sterylnej wody. Po upływie 7 i 14 dni od infekcji przeprowadzono ocenę zdrowotności roślin w skali Hillstrand i Auldt (1982), w oparciu o którą obliczono indeks porażenia zgodnie ze wzorem McKinneya (Łacicowa 1969).

Analizy molekularne

Ocenę zdrowotności siewek przeprowadzono także metodą qPCR, umożliwiającą kwantyfikację DNA *F. graminearum* w zainfekowanych siewkach soi. Pierwszym etapem analiz była ekstrakcja DNA z porażonych siewek soi. Izolację DNA wykonano, korzystając z firmowego zestawu dedykowanego do izolacji DNA z tkanek roślinnych firmy Promega (USA) w aparacie Maxwell 16 (Promega, USA). Po przeprowadzeniu ekstrakcji uzyskane DNA poddano analizie spektrofotometrycznej w urządzeniu NanoDrop ND 2000c (Thermo-Fisher Scientific). Do dalszych analiz DNA rozcieńczano do stężenia 5 ng/ μ l. Analizę qPCR przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu starterów i sondy do detekcji *F. graminearum* (Tri): Tri 5 forward 5'-TCTTAACAC-TAGCGTGCGCCTTC-3', Tri 5 reverse 5'-CATGCCAACGATTGTTTGGAGGGA-3', Tri 5 Probe: Fam-AACAAGACTGCCCACTTTGCTCAGCCT-Tamara (Vegi i Wolf-Hall 2013). Badania przeprowadzono w aparacie ViiATM7 (Applied Biosystem) w objętościach 25 μ l, gdzie matryce reakcji qPCR stanowiło 2 μ l gDNA. Reakcja amplifikacji była przeprowadzana w następujących warunkach: wstępna denaturacja przez 3 minuty w temperaturze 95°C, następnie 40 cykli: denaturacja w temperaturze 95°C przez 15 sekund, przyłączanie starterów w temperaturze 60°C przez 15 sekund oraz wydłużanie w temperaturze 72°C przez 1 minutę. Kwantyfikację DNA przeprowadzono na podstawie krzywej standardowej powstałej dzięki rozcieńczeniu seryjnego gDNA *F. graminearum* metodą opisaną przez Okorskiego i in. (2017).

Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki badań zostały poddane analizie statystycznej z użyciem programu Statistica vs. 13 StatSoft®. Wykonano analizę wariancji testem Newmana-Keulsa przy poziomie istotności $p < 0,01$. Znaczące różnice między średnimi zostały oznaczone jako grupy jednorodne (A,B,C). W celu określenia istotnego związku pomiędzy wybranymi zmiennymi posłużono się metodą korelacji linowej Pearsona, wyznaczając współczynnik korelacji R.

Wyniki

W wyniku sztucznej infekcji siewek różnych odmian soi zarodnikami *F. graminearum* stwierdzono objawy w postaci brązowienia korzeni, których zakres był zróżnicowany w zależności od odmiany (fot. 1). Najsilniej rozwinięte objawy chorobowe stwierdzono na roślinach odmiany Obelix, w przypadku której stwierdzono porażenie na poziomie 30,5% (fig. 1).

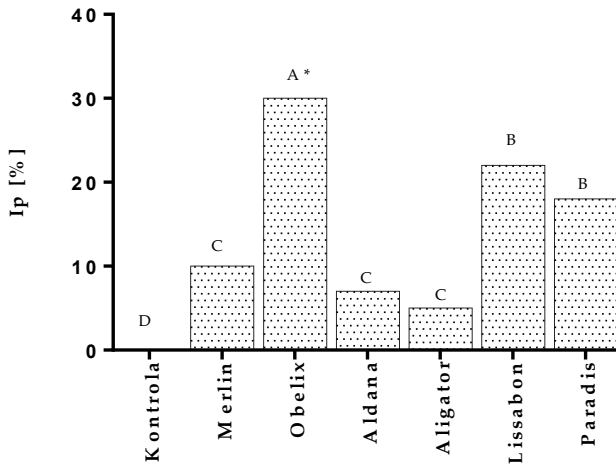
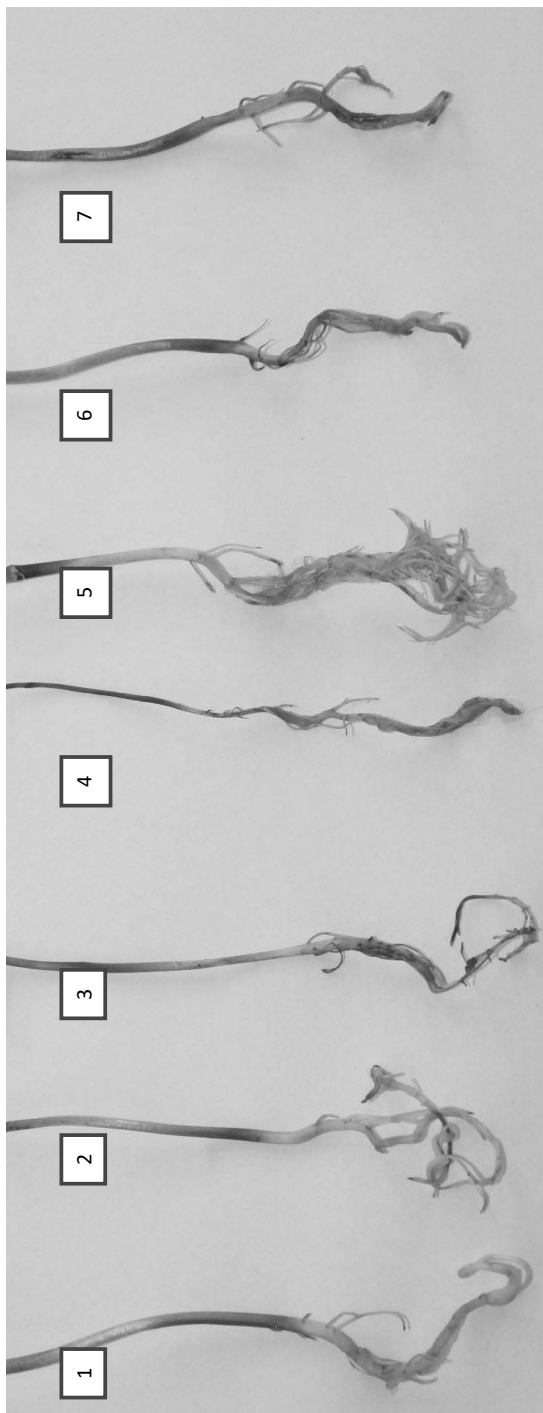


Fig. 1. Nasilenie objawów chorobowych wybranych odmian soi w warunkach sztucznej infekcji zarodnikami *F. graminearum*

Mniejszy zakres zmian chorobowych stwierdzono w odniesieniu do odmian Lissabon i Paradis, w przypadku których zanotowane indeksy porażenia wynosiły odpowiednio 22% i 18%. Najniższy poziom infekcji stwierdzono dla odmian Merlin, Aldana i Aligator. W przypadku siewek kontrolnych charakterystycznych objawów infekcji nie stwierdzano. Analiza mykologiczna zainfekowanych siewek potwierdziła, że sprawcą objawów chorobowych okazał się *F. graminearum*. Poprzez reizolację potwierdzono postulaty Kocha, dotyczące zdolności infekcyjnych *F. graminearum* wobec roślin soi.

Badania własne obejmowały zastosowanie detekcji qPCR w celu kwantyfikacji zakresu objawów chorobowych w oparciu o występowanie DNA (fig. 2).

W wyniku badań potwierdzono najwyższy poziom DNA badanego patogenu w korzeniach soi odmiany Obelix, w przypadku których odnotowano 217 pg gDNA *F. graminearum* (Fig. 3). Mniejsze ilości DNA patogenu określono w siewkach odmian z Paradis (180 pg) i Lisabon (154 pg). Analiza qPCR wykazała najniższy poziom infekcji w siewkach odmian Aldana i Aligator, w których określono odpowiednio 42,2pg



Fotografia 1. Porażenie siewek badanych odmian soi: 1 – kontrola, 2 – Merlin, 3 – Obelix, 4 – Aldana, 5 – Aligator, 6 – Lissabon, 7 – Paradis 14 dni po infekcji zarodnikami *F. graminearum*

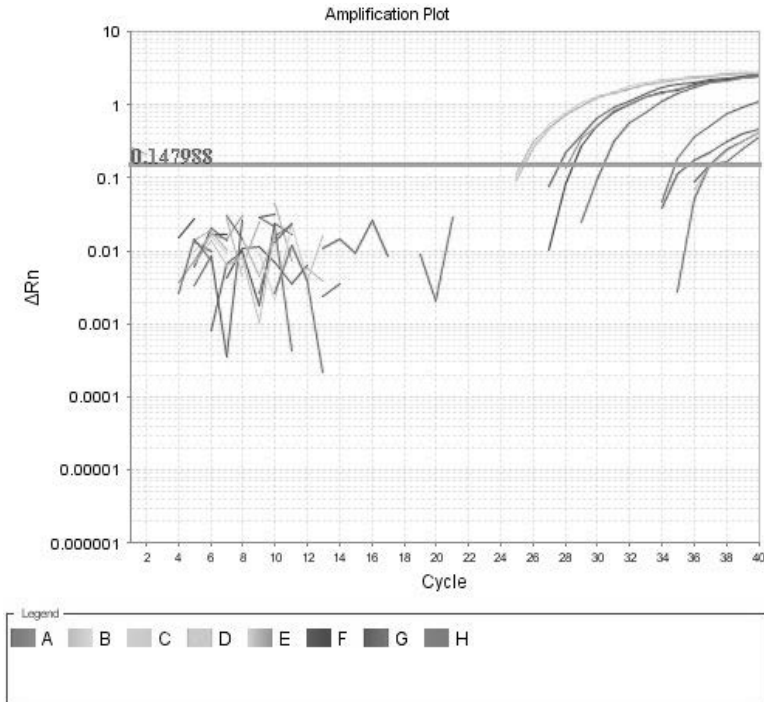


Fig. 2. Kwantyfikacja qPCR infekcji siewek soi zarodnikami *F. graminearum*

oraz 24,7 pg gDNA *F. graminearum*. W siewkach kontrolnych nie stwierdzono wzrostu sygnału fluorescencyjnego (fig. 2), co wskazuje na brak infekcji (fig. 3).

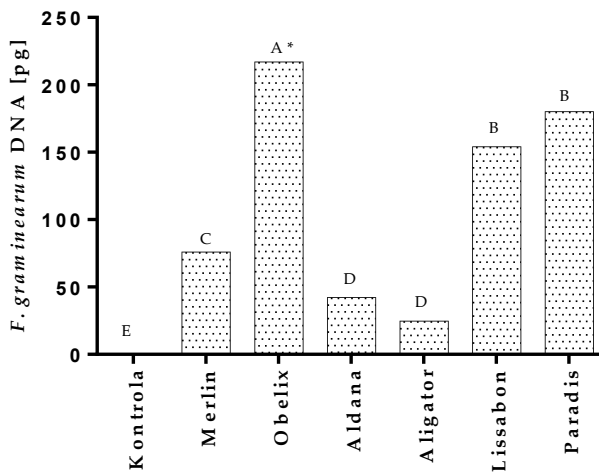


Fig. 3. Detekcja qPCR DNA *F. graminearum* w zainfekowanych siewkach wybranych odmian soi

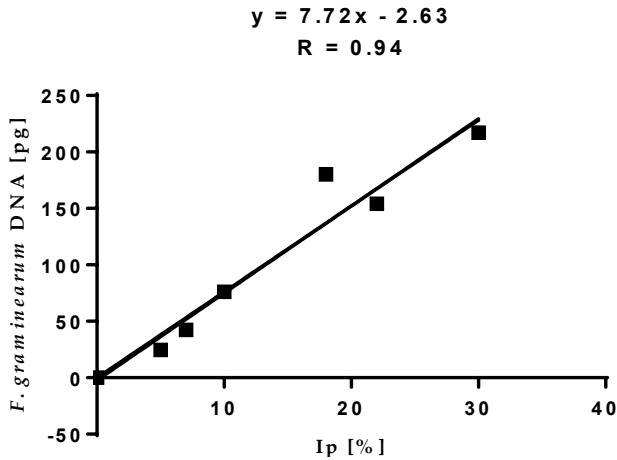


Fig. 4. Wykres regresji liniowej pomiędzy objawami zgorzeli siewek a ilością DNA *F. graminearum* oznaczoną metodą qPCR

Badania własne obejmowały także analizę korelacji liniowej pomiędzy ilością gDNA określoną metodą qPCR, a nasileniem objawów chorobowych w siewkach badanych odmian soi. W wyniku badań stwierdzono silną dodatnią korelację pomiędzy zmiennymi, z współczynnikiem korelacji wynoszącym $R=0,94$ (fig. 4).

Dyskusja wyników

Badanie występowania *F. graminearum* w uprawie soi może przynieść wymierne korzyści dla praktyki rolniczej. Szacuje się, że zespół nagłej śmierci soi SDS (sudden-death syndrome) spowodował straty zbiorów w USA na poziomie między 0,6 a 1,9 mln ton (Allen i in. 2017), odpowiada to stratom finansowym na poziomie 200–750 mln dolarów (Navi, Yang 2016). SDS ma licznych sprawców, a w literaturze można odnaleźć doniesienia o wywoływaniu choroby przez takie patogeny, jak: *F. brasiliense* (Roth i in. 2020), *F. azukicola* (Aoki i in. 2012b), *F. crassistipitatum* (Aoki i in. 2012a), *F. paranaense* (Costa i in. 2016), jednak za głównego sprawcę choroby uznawany jest *F. solani* (Meksem i in. 1999). W Europie największe zagrożenie w uprawie soi stanowi *F. graminearum* (Dunynjak i in. 2016). Objawami porażenia są: zgnilizna korzeni, nekrozy, przebarwienia naczyniowe korzeni i łodyg dolnych, chloroza międzyzębrowa, nekrozy liści i defoliacje czy zamieranie strąków (Mc Lean, Lawrence 1993). Dotychczasowe badania prowadzone w Polsce nie skupiały się na zdrowotności roślin soi. Odmiany i ich dobór do konkretnego stanowiska i rejonu są kluczem do uzyskania zadowolających plonów soi (Jarecki i in. 2019).

W badaniach własnych stwierdzono różną podatność odmian na infekcję wywołaną *F. graminearum*. Odmiana Obelix okazała się najbardziej podatna na infekcję. Prace badawcze przeprowadzone w Kanadzie obejmowały określenie podatności 57 odmian soi na cztery patogeny z rodzaju *Fusarium*, tj. *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum* (Zhang i in. 2010). W wyniku badań potwierdzono, że najsilniejsze objawy chorobowe powodował *F. avenaceum*, a następnie *F. graminearum*. W wyniku badań wytypowano odmianę Maple Amber jako odporną na wszystkie cztery patogeny.

W badaniach własnych wykazano, że najmniej podatne na infekcję okazały się odmiany Aldana i Aligator. Zróżnicowaną reakcją odmian soi na infekcję wywołaną przez *F. graminearum* potwierdzają także inne prace badawcze (Aoki, O'Donnell 1999; Barros i in. 2014; Lu i in. 2015; Chiotta i in. 2015; Cruz i in. 2020). Obecnie na całym świecie realizuje się wiele prac badawczych dotyczących poszukiwania genów odporności na poszczególne patogeny atakujące rośliny soi. Ważniejsze prace ukierunkowane są na: *Phytophthora* (Ramalingam i in. 2020), *Microsphaera diffusa* (Ramalingam i in. 2020), *Phakopsora pachyrhizi* (Chander i in. 2019), *F. graminearum* (Zhang i in. 2018), *F. virguliforme* (Tan i in. 2019). Soja wykazuje także pewną odpowiedź tkankową na infekcje oraz fitotoksyny (Chang i in. 2018).

Badania własne potwierdziły także wysoką przydatność techniki qPCR do określenia poziomu infekcji na porażonych siewkach soi. Uzyskane wyniki badań korespondowały z oceną nasilenia objawów chorobowych, co potwierdzono, wykonując analizę regresji liniowej ($R=0,94$). Dużą skuteczność metody qPCR w określaniu sprawców chorobowych poświadczają nasze wcześniejsze prace (Kotłowska i in. 2019; Przetakiewicz i in. 2019).

Wnioski

1. Najsilniejsze objawy infekcji stwierdzono w przypadku siewek soi odmiany Obelix.
2. Najmniej podatne na infekcję *F. graminearum* okazały się odmiany Aldana i Aligator.
3. W badaniach potwierdzono zdolności patogeniczne polskich szczepów *F. graminearum* wobec roślin soi.
4. Stwierdzono silną korelację pomiędzy zakresem objawów chorobowych a ilością DNA oznaczoną metodą qPCR.

Literatura

- Allen T.W., Bradley C.A., Sisson A.J., Byamukama E., Chilvers M.I., Coker C.M., Collins A.A., Damicone J.P., Dorance A.E., Dufalut N.S., Faske T.R., Giesler L.J., Grybauskas A.P., Hersman D.E., Hollier C.A., Isakeit T., Jardine D.J., Kelly H.M., Kemerait R.C., Kleczewski N.M., Koenning S.R., Kurle J.E., Malvick D.K., Markell S.G., Mehl H.L., Muller D.S., Muller J.D., Mulrooney R.P., Nelson B.D., Newman M.A., Osborne L., Overstreet C., Padgett G.B., Phipps P.M., Price P.P., Sikora E.J., Smith D. L., Spurlock T.N., Tande C.A., Tenuta A.U., Wise K.A., Allen Wrather J. 2017. Soybean yield loss estimates due to diseases in the United States and Ontario, Canada, from 2010 to 2014. *Plant Health Progress*, 18(1), 19–27.
- Aoki T., O'Donnell K. 1999. Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudo-graminearum* sp. nov., formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*. *Mycologia*, 91(4), 597–609.
- Aoki T., Scandiani M.M., O'Donnell K. 2012a. Phenotypic, molecular phylogenetic, and pathogenic characterization of *Fusarium crassistipitatum* sp. nov., a novel soybean sudden death syndrome pathogen from Argentina and Brazil. *Mycoscience*, 53(3), 167–186.
- Aoki T., Tanaka F., Suga H., Hyakumachi M., Scandiani M.M., O'Donnell K. 2012b. *Fusarium azukicola* sp. nov., an exotic azuki bean root-rot pathogen in Hokkaido, Japan. *Mycologia*, 104(5), 1068–1084.
- Bajwa S.G., Rupe J.C., Mason J. 2017. Soybean disease monitoring with leaf reflectance. *Remote Sensing*, 9(2), 127.
- Barros G.G., Zanon M.S.A., Chiotta M.L., Reynoso M.M., Scandiani M.M., Chulze S.N. 2014. Pathogenicity of phylogenetic species in the *Fusarium graminearum* complex on soybean seedlings in Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 138(2), 215–222.
- Chang H.X., Roth M.G., Wang D., Cianzio S.R., Lightfoot D.A., Hartman G.L., Chilvers M.I. 2018. Integration of sudden death syndrome resistance loci in the soybean genome. *Theoretical and applied genetics*, 131(4), 757–773.
- Chander, S., Ortega-Beltran, A., Bandyopadhyay, R., Sheoran, P., Ige, G.O., Vasconcelos, M.W., & Garcia-Oliveira, A. L. 2019. Prospects for Durable Resistance Against an Old Soybean Enemy: A Four-Decade Journey from Rpp1 (Resistance to *Phakopsora pachyrhizi*) to Rpp7. *Agronomy*, 9(7), 348. doi:10.3390/agronomy9070348.
- Chiotta M.L., Zanon M.A., Gaj-Merlera G., Tessmann D., Barros G.G., Chulze S. 2015. Phylogenetic analyses of the *Fusarium graminearum* species complex isolated from soybean in Argentina and Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, 10(1), 1–5.
- Cruz D.R., Leandro L.F.S., Mayfield D.A., Meng Y., Munkvold G. P. 2020. Effects of soil conditions on root rot of soybean caused by *Fusarium graminearum*. *Phytopathology*, 110(10), 1693–1703.
- Duvnjak T., Sudarić A., Kočar M.M., Čosić J., Vrandečić K. 2016. First report of soybean *Fusarium* wilt caused by *Fusarium graminearum* in Croatia. *Plant disease*, 100(3), 648
- Dyrektywa 2009/128/WE, Rozporządzenie WE/1107/2009, Ustawa z dnia 8 marca 2013 r. o środkach ochrony roślin, Dz.U. poz. 455
- Filoda G., Mrówczyński M. 2016. *Metodyka integrowanej ochrony i produkcji soi dla doradców*. Instytut Ochrony Roślin Państwowy instytut badawczy
- Fordoński G., Łapiński M., Pszczółkowska A., Kulik T., Olszewski J., Płodzień K. 2001. Identifying *Fusarium avenaceum* and *Fusarium culmorum* in selected legumes and cereals with the PCR method. *Electr. J. Pol. Agric. Univ. Ser. Agron*, 4(2).
- Hafez M., Abdelmagid A., Aboukhaddour R., Adam L.R., Daayf F. 2021. *Fusarium* root rot complex in soybean: Molecular characterization, trichothecene formation and cross-pathogenicity. *Phytopathology*, <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-21-0083-R>.

- Janda K., Wolska J. 2015. Study on the quantitative and qualitative of fungi colonizing soybeans (*Glycine max* L.). *Pomeranian journal of life sciences*, 61(4).
- Jarecki, W., Bobrecka-Jamro, D., Monich, R., Kopania, E., Kobrecka-Glinka G. 2019. Porównanie przebiegu wegetacji roślin oraz wielkość i jakość plonu nasion wybranych odmian soi. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, (285), 59–60.
- Kotłowska M., Przetakiewicz K., Dzienis G. 2019. Charakterystyka grzybów występujących na liściach cyklamena (*Cyclamen* L.). *BIOLOGICZNYCH*, 87.
- Lewandowska S. 2016. Perspectives of soybean cultivation in Poland. *Agric. XXI Century–Probl. Challenges*, 162–169.
- Lu C., Zhang H., Wang Y., Zheng X. 2015. Rapid diagnosis of *Fusarium* root rot in soybean caused by *Fusarium equiseti* or *Fusarium graminearum* using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays. *Australasian Plant Pathology*, 44(4), 437–443.
- Mc Lean K.S., Lawrence, G. W. 1993. Interrelationship of *Heterodera glycines* and *Fusarium solani* in sudden death syndrome of soybean. *Journal of Nematology*, 25(3), 434.
- Navi S.S., Yang X. B. 2016. Sudden death syndrome—A growing threat of losses in soybeans. *CAB Reviews*, 11(039), 1.
- Okorski A., Polak-Śliwińska M., Karpiesiuk K., Pszczółkowska A., Kozera W. 2017. Real time PCR: a good tool to estimate mycotoxin contamination in pig diets. *World Mycotoxin Journal*, 10(3), 219–228.
- Osiecka A. 2019. Możliwości zwiększenia areału uprawy roślin białkowych w świetle aktualnych wyników urzędowych i porejestrowych doświadczeń odmianowych COBORU. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, (285), 53–54.
- Pioli R.N., Mozzoni L., Morandi E.N. 2004. First report of pathogenic association between *Fusarium graminearum* and soybean. *Plant Dis* 88, 220
- Praczyk T., Bubniewicz P., Filoda G., Gwiazdowski R., Kurasiak-Popowska D. Luboiński A., Markowicz M., Nawracała J., Oblicki M. Poznań. 2017 Instrukcja uprawy soi, Instytut ochrony roślin, Państwowy Instytut Badawczy, 4–8, 34–39.
- Przetakiewicz K., Kotłowska M., Dzienis G. 2019. Występowanie grzybów na liściach fiołka ogrodowego (*Viola x wittrockiana*) wykazujących objawy chorobowe. *BIOLOGICZNYCH*, 100.
- Ramalingam, J., Alagarasan, G., Savitha, P. et al. Improved host-plant resistance to Phytophthora rot and powdery mildew in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Sci Rep* 10, 13928 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70702-x>
- Rasiukeviciute N., Kelpsiene J. 2018. The impact of *Fusarium graminearum* infection on different plant seeds. *Research for Rural Development*, 2, 114–118.
- Roth M.G., Oudman K.A., Griffin A., Jacobs J.L., Sang H., Chilvers M.I. 2020. Diagnostic qPCR Assay to Detect *Fusarium brasiliense*, a Causal Agent of Soybean Sudden Death Syndrome and Root Rot of Dry Bean. *Plant Disease*, 104(1), 246–254.
- Tan R., Collins P.J., Wang J., Wen Z., Boyse J.F., Laurenz R.G., Gu C., Jacobs J.L., Song Q., Chilvers M.I., Wang D. 2019. Different loci associated with root and foliar resistance to sudden death syndrome (*Fusarium virguliforme*) in soybean. *Theor Appl Genet*. Feb;132(2):501-513. doi: 10.1007/s00122-018-3237-9. Epub 2018 Nov 16. PMID: 30446796.
- Zhang J.X., Xue, A.G., Zhang H.J., Nagasawa A.E., & Tambong J.T. 2010. Response of soybean cultivars to root rot caused by *Fusarium* species. *Canadian Journal of Plant Science*, 90(5), 767–776. doi:10.4141/cjps09133.
- Zhang C., Zhao X., Qu Y., Teng, W., Qiu L., Zheng H., ... Li, W. 2018. Loci and candidate genes in soybean that confer resistance to *Fusarium graminearum*. *Theoretical and Applied Genetics*. doi:10.1007/s00122-018-3230-3

Abstract

RESPONSE OF SELECTED SOYBEAN CULTIVARS TO INFECTION BY FUSARIUM GRAMINEARUM

Soybean is an important crop grown mainly in the Americas and Asia for feed purposes. Recently soybean is gaining importance also in Poland, which is directly related to the greater availability of varieties with different earliness and enables its cultivation on the territory of the whole country. Soybean plants during the vegetation period are attacked by numerous pathogens, among which the most noteworthy are fusarium wilt and fusarium gangrene. They are caused by a complex of fungi of the genus *Fusarium*. On the basis of analysis of the available literature it was found that one of the most important species causing soybean seedling and root rot is *Fusarium graminearum*.

The aim of this study was to assess susceptibility of six soybean cultivars available in Poland: Aldana, Alligator, Lissabon, Merlin, Obelix and Paradis to infection by *F. graminearum* (2016/278f, MF162320), under artificial infection conditions. Soybean plant health was assessed on seedlings 7 and 14 days after infection, based on disease symptom severity and qPCR. Evaluation of the infection index confirmed that Obelix cultivar was the most severely infected by *F. graminearum*, while Alligator cultivar was the least susceptible to infection. No seedling damage due to infection was recorded in the study. Molecular analyses by TaqMan qPCR confirmed the strongest infection of seedlings in Obelix cultivar, which was found to contain 217 pg gDNA of *F. graminearum*. Seedling infection was further confirmed by reisolation of *F. graminearum* from infected soybean tissues.

The research was performed under student grant 30.450.001-150 entitled. "Effect of selected species of the genus *Fusarium* on yield and healthiness of soybean under artificial infection".

Keywords: soybean, *Fusarium graminearum*, infection, Aldana, Alligator, Lissabon, Merlin, Obelix and Paradis.

Joanna Agnieszka Dąbrowska

Aleksandra Karpiesiuk

Kinga Karwacka

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Rolnictwa i Leśnictwa

Koło Naukowe Diagnostyki i Fitopatologii Molekularnej „Biohazard”

Opiekun: dr hab. Adam Okorski, prof. nadzw.

WYSTĘPOWANIE GRZYBÓW TOKSYNOTWÓRCZYCH W ORZECHACH Z PRODUKCJI WŁASNEJ ORAZ KOMERCYJNEJ

Streszczenie: Orzechy to owoce wielu różnych gatunków roślin, charakteryzujące się wysoką wartością odżywczą. Są bogate w kwasy tłuszczowe: MUFA i PUFA, a ponadto w białko, błonnik liczne witaminy oraz makroelementy i mikroelementy. Przydatność orzechów do spożycia może być obniżana przez obecność grzybów syntetyzujących mykotoksyny.

Celem badań było zastosowanie metody hodowlanej oraz qPCR do badania obecności grzybów zasiedlających orzechy pochodzące z upraw ekologicznych oraz zakupione do badań w sklepach na terenie Olsztyna. Materiałem badań były orzechy włoskie, orzechy laskowe, migdały oraz orzechy nerkowca pochodzące z planacji własnych oraz nabyte w sklepie. Wyrosłe kultury grzybowe oznaczono do rodzaju i gatunku w oparciu o dostępne klucze na podstawie cech morfologicznych pod mikroskopem optycznym: Ellisa (1971), Gilmana (1957), Kwaśnej i in. (1991), zaś badania molekularne obejmowały zastosowanie techniki qPCR do określenia obecności DNA grzybów produkujących trichoteceny. W wyniku badań stwierdzono we wszystkich badanych próbach najliczniejsze występowanie *Trichotecium roseum* oraz *Alteranaria alternata*. Analiza qPCR wykazała obecność DNA grzybów *Fusarium* produkujących trichoteceny w orzechach włoskich oraz migdałach.

Słowa kluczowe: mykotoksyny, grzyby toksynotwórcze, migdały, orzechy włoskie, orzechy laskowe, nerkowce

Wstęp i cel pracy

Orzechy są to niepekające, suche owoce wielu gatunków roślin, posiadające jedno nasiono oraz łupinę (Ciemniewska-Żytkiewicz i in 2014). Są one coraz częstszym składnikiem diety człowieka ze względu na dobroczynne właściwości. W 2016 roku orzechy zostały ujęte w Piramidzie Zdrowego Żywienia i Aktywności Fizycznej opracowanej przez Instytut Żywności i Żywienia jako produkty codziennej diety, co potwierdza ich walory żywieniowe (Pachocka, Stróżyk 2017). Dominującym składnikiem orzechów jest tłuszcz, stanowi ok. 40–70 g/100g (Pachocka, Stróżyk 2017). Posiadają one również korzystny stosunek kwasów tłuszczowych dzięki niskiej zawartości kwasów tłuszczowych nasyconych (6–26%). Resztę kwasów tłuszczowych stanowią kwasy jedno- i wielonienasycone (Ciemniewska-Żytkiewicz i in 2014). Według Pachockiej (2017) z punktu widzenia żywieniowego i zdrowotnego ważne są zawarte w orzechach pewne makro- i mikroskładniki, które w układzie pojedynczym lub wskutek interakcji z innymi składnikami żywności odpowiadają za działania prewencyjne bądź nawet terapeutyczne. W tabeli 1 przedstawiono najważniejsze składniki zawarte w różnych

Tabela 1. Wybrane składniki bioaktywne w orzechach włoskich, orzechach laskowych, migdałach i orzechach nerkowca i ich działanie na organizm ludzki

Składnik orzechów	Udokumentowane w badaniach naukowych działanie w organizmie człowieka
Wolne aminokwasy	Arginina przyczynia się do poprawy elastyczności naczyń krwionośnych, zależnych od śródbłonna; niski stosunek argininy do lizyny obniża poziom LDL w osoczu krwi
Błonnik pokarmowy	Obniża poziom LDL w surowicy krwi
Magnez	Zapobiega ogólnoustrojowemu zapaleniu, insulinooporności, cukrzycy typu 2, zapobiega arytmii
Antyoksydanty, w tym: flawonoidy, polifenole, tokoferole	Zapobiegają powstaniu stanu zapalnego, na skutek właściwości przeciwutleniających oraz modulacji szlaków przesyłania sygnałów w tym wpływ na czynnik transkrypcji jądrowej κ B, co skutkuje m.in. modulowaniem genów zapalnych makrofagów; modulacja insulinooporności – przywracanie w osoczu prawidłowego stosunku utlenionego do zredukowanego glutationu oraz poprawa odpowiedzi komórek β na glukozę i działanie insuliny; zwiększają odporność LDL na oksydację
Jedno- i wielonienasycone kwasy tłuszczowe	Działają przeciwzapalnie, poprawiają profil lipoprotein i apolipoprotein w osoczu krwi
Kwas foliowy	Obniża poziom homocysteiny we krwi
Miedź	Obniża poziom cholesterolu we krwi i ciśnienie krwi

Źródło: KULIK K., WASZKIEWICZ-ROBAK., 2015. Trendy w żywieniu człowieka. Wydawnictwo Naukowe PTTŻ, 143-155.

orzecach uznane jako biologicznie aktywne, korzystnie wpływające na organizm człowieka. Spośród nich na szczególną uwagę zasługują: wolne aminokwasy, błonnik pokarmowy, magnez, miedź, kwas foliowy, tokoferole, związki polifenolowe czy wielonienasycone kwasy tłuszczowe. W tabeli 2 przedstawiono skład i właściwości odżywcze wybranych orzechów.

Tabela 2. Skład i wartość odżywcza badanych orzechów

Orzechy	Energia [kcal]	Tłuszcze [g/100g]	Białko [g/100g]	Błonnik pokarmowy [g/100g]	Żelazo [mg/100g]	Magnez [mg/100g]	Fosfor [mg/100g]	Witamina E [mg/100g]
Laskowe	628	60,75	14,95	9,7	4,7	163	290	33,1
Włoskie	654	65,21	15,23	6,7	2,91	158	346	5,5
Migdały	575	49,42	21,22	12,2	3,72	268	484	25,0
Nerkowce	553	43,85	18,22	3,3	6,68	292	593	1,3.

Źródło: National Nutrient Database for Standard Reference Release.

Orzechy włoskie zawierają najwięcej tłuszczu i są najbardziej kaloryczne. Bogatym źródłem białka i błonnika są migdały, natomiast orzechy nerkowca zawierają dużo żelaza, magnezu i fosforu. Doskonałym źródłem witaminy E są orzechy laskowe oraz migdały, których porcja 42 g zapewnia ponad 100% zalecanego dziennego spożycia (8–10mg), dzięki czemu organizm chroniony jest przed działaniem wolnych rodników, co zapobiega procesom starzenia się oraz rozwojowi miażdżycy (Ciemniewska-Żytkiewicz i in 2012).

Ze względu na specyficzny skład chemiczny oraz bogate wartości odżywcze orzechy zasiedlane są często przez różne gatunki grzybów, często posiadających zdolność do syntezy mykotoksyn. Materiał importowany z krajów o klimacie tropikalnym i subtropikalnym jest bardzo często skażony przez alfatoksyny, które wytwarzają głównie dwa gatunki grzybów pleśniowych: *Aspergillus flavus* oraz *A. parasiticus*. Wysoka temperatura oraz wilgotność sprzyjają ich akumulacji (Łangowska 2018).

Mykotoksyny

Mykotoksyny to niskocząsteczkowe metabolity wtórne grzybów pleśniowych. Grzyby pleśniowe produkują mykotoksyny jako produkt uboczny w procesach metabolicznych lub w celach obronnych. Wprowadzenie ich do organizmu drogą pokarmową, oddechową czy przez skórę i błony śluzowe nawet w niewielkich ilościach mogą wywoływać

toksyczne reakcje. Oprócz działania silnie toksycznego mogą mieć także właściwości mutagenne czy teratogenne (Kluczek 2000; Streit i in. 2013). Synteza mykotoksyn jest uwarunkowana genetycznie i związana z podstawowymi szlakami metabolicznymi, jak metabolizm aminokwasów i kwasów tłuszczowych. Synteza może być również warunkowana fenotypowo czynnikami środowiska, m.in. składem chemicznym substratu, jego konsystencją, zawartością mikroelementów, temperaturą i wilgotnością. Powstawaniu mykotoksyn zdecydowanie sprzyja wysoka wilgotność powietrza (powyżej 70%) oraz wilgotność surowca (powyżej 15%). Temperatura sprzyjająca syntezie mykotoksyn może różnić się od wartości, która jest optymalna dla rozwoju grzybni (Wolny-Koładka 2014).

Ważnym elementem, warunkującym tworzenie mykotoksyn, jest skład chemiczny podłoża, a szczególnie obecność takich mikroelementów, jak: cynk, kobalt czy magnez. Stres środowiskowy, taki jak: zmiana temperatury, wilgotności, dostępu tlenu lub działania substancji agresywnych w stosunku do grzybów, powoduje zwykle wzrost zawartości mykotoksyn (Smith i in. 1994). Każdy gatunek pleśni, a nawet każdy szczep danego gatunku ma inne swoiste właściwości toksynotwórcze (Jackson i in. 2012). Większość mykotoksyn jest trwała chemicznie i odporna na procesy przetwórcze, zmianę temperatury czy warunki przechowywania (Pitet 2005).

Skażona mykotoksynami żywność jest ogromnym zagrożeniem dla człowieka. Związki te mogą dostawać się do łańcucha pokarmowego ludzi i zwierząt w sposób pośredni (spożywanie mięsa i mleka zwierząt skarmianych skażonymi paszami) oraz bezpośredni (spożywanie produktów roślinnych skażonych mykotoksynami) (Dąbrowski i in. 2016; Lewczuk i in. 2016). Do najbardziej niebezpiecznych toksyn w żywności zaliczyć możemy: aflatoksynę, ochratoksynę A, patulinę, fumonizyny, zearalenon, deoksyniwalenol i trichoteceny (Zielonka i in. 2009). Najczęściej grzyby toksynotwórcze i mykotoksyny izolowane są ze zbóż, orzechów i innych nasion oleistych, a także nasion roślin strączkowych. Izolowane są także z warzyw, owoców czy przypraw. Znajdujące się w produktach spożywczych czy paszach mykotoksyny przedostają się drogą pokarmową do organizmów ludzi i zwierząt, powodując poważne choroby – mykotoksykozy (Gajewska i in. 2019; Waśkiewicz i in. 2013).

Osoba narażona na działanie mykotoksyn na początku może mieć łagodne objawy przypominające alergię: bóle głowy, przemęczenie, nieżyt nosa, zapalenie zatok, spojówek, krtani czy objawy skórne. W przypadku większych dawek i dłuższego czasu ekspozycji organizmu na mykotoksyny objawy mogą mieć charakter przewlekły lub ostry. Ich skutkiem mogą być zaburzenia w metabolizmie białek, tłuszczów i węglowodanów, ale również zaburzenia syntezy kwasów nukleinowych, w konsekwencji czego zostają uszkodzone nerki i wątroba, a także mogą przyczyniać się do rozwoju choroby nowotworowej (Bogacka 2008; Malagutti i in. 2005; Postupolski i in. 2010).

Mykotoksyny wykazują odporność na działanie wysokiej temperatury, a więc stosowanie takich zabiegów kulinarnych, jak: smażenie, pieczenie czy pasteryzacja, nie neutralizuje ich toksycznego działania. Żywność, na której pojawiła się pleśń, nadaje

się wyłącznie do wyrzucenia i pod żadnym pozorem nie wolno jej spożywać. Nawet jeśli tylko fragment produktu pokryty jest pleśnią, to mykotoksyny znajdować mogą się w całym produkcie (Scott 1984).

Grzyby z rodzaju *Fusarium* są najczęściej izolowanymi patogenami upraw rolniczych na świecie. Powodują olbrzymie straty gospodarcze z powodu wysokiej toksynotwórczości i patogenności, dlatego uznaje się je za jedno z najgroźniejszych grzybów toksynotwórczych. Zalicza się do nich gatunki: *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae* i *F. oxysporum* (Bottalico i in. 2002; Ghiasian i in. 2006; Malachova i in. 2011). Grzyby z rodzaju *Fusarium* mogą wytwarzać kilkanaście mykotoksyn, wśród których można wymienić m.in.: deoksyniwalenol, trichoteceny, zearalenon, fumonizyny, bowerycynę i wiele innych (Jurado i in. 2010).

Trichoteceny wytwarzane są przez liczne rodzaje grzybów jak *Fusarium*, *Trichotecium* czy *Trichoderma*. Trichoteceny zostały podzielone ze względu na swoją budowę na cztery grupy: A, B oraz C i D. W środowisku występującymi powszechnie są te należące do grupy A (T-2 toksyna, HT-2 toksyna) oraz do grupy B (deoksyniwalenol i jego pochodne). Ze względu na częstotliwość występowania w produktach spożywczych uważa się, że większy wpływ na zdrowie człowieka i środowisko mają trichoteceny z grupy B (Chełkowski 2010).

Deoksyniwalenol (DON) i niwalenol (NiV) są toksynami produkowanymi głównie przez *F. culmorum* i *F. graminearum* i *F. poae* (Barabasz i Pikulicka 2017). Spożywanie żywności zawierającej te mykotoksyny powoduje zaburzenia układu pokarmowego, immunologicznego oraz rozrodczego. Efektem są także zmiany na poziomie komórkowym, co prowadzi do obniżenia aktywności białek oraz enzymów i hamuje ich syntezę (Barabasz i Pikulicka 2017).

Celem badań było określenie składu gatunkowego grzybów zasiedlających różne orzechy pochodzące z upraw ekologicznych oraz zakupione do badań w sklepach na terenie Olsztyna. Wykorzystanie techniki qPCR do ilościowej oceny występowania genu *Tri5* warunkującego syntezę trichotecenów (DON).

Materiały i metody

W badaniach wykorzystano próby orzechów pozyskane z upraw w rejonie Warmii i Mazur oraz zakupione w sklepach na terenie Olsztyna. W badaniach wykorzystano następujące orzechy: laskowe [*Corylus avellana*] (1 próba z planacji własnej, 1 ze sklepu); włoskie [*Juglans regia*] (2 próby z planacji własnych, 1 ze sklepu); migdały [*Prunus dulcis*] (1 próba ze sklepu); nerkowce [*Anacardium occidentale*] (1 próba ze sklepu).

Identyfikacja grzybów zasiedlających orzechy metodą hodowlaną

Do analiz mikologicznych z każdego gatunku pobierano losowo 50 orzechów, które przepłukano trzykrotnie pod bieżącą wodą, następnie odkażono w 70-procentowym alkoholu etylowym i jednoprocetowym podchlorynie sodowym, po czym przepłukano w sterylnej wodzie i osuszono. Odkażone orzechy rozdrobiono przy pomocy skalpela na fragmenty wielkości 5 mm, a następnie wyłożono do płytek Petriego z zestaloną pożywką PDA (agarowo-glukozowo-ziemniaczaną) po 10 skrawków do szalki (10 szalek na wariant badawczy). Płytki umieszczono w cieplarni w temperaturze 20–23°C i przechowywano przez 14 dni. Po 14 dniach wyrosłe kultury grzybów przepięto do sterylnych szalek z pożywką PDA, następnie wyrosłe kultury grzybowe oznaczono do rodzaju i gatunku w oparciu o dostępne klucze na podstawie cech morfologicznych pod mikroskopem optycznym (ELLISA, 1971, GILMANA, 1957, KWAŚNEJ, I IN. 1991, LESLIE I SUMMERELL, 2006; WATANABE, 2010).

Analizy molekularne

Ekstrakcja DNA

Izolację DNA wykonano z wykorzystaniem aparatury Maxwell® 16 FFS (Promega, USA), zgodnie z zaleceniami producenta. Próbkę orzechów o masie 20 g zmielono w młynku IKA A11 Basic Analytical mill (IKA-WerkeStaufen, Niemcy). Następnie z każdej próbki pobierano 70 mg materiału wyjściowego, przenoszono do ceramicznego moździerza i ucierano w ciekłym azocie aż do uzyskania struktury cukru pudru. Utarty materiał następnie przenoszono do 1,5 ml probówek Eppendorfa, po czym do każdej próbki dodawano kolejno: 600 µl buforu ekstrakcyjnego CTAB, 10 µl proteinazy K oraz 4 µl RNazy A. Następnie próby wytrząsano w urządzeniu ThermoMixer C (Eppendorf, Niemcy) w temperaturze 65°C przez 30 minut. W kolejnym etapie próby wirowano w wirówce 5804R (Eppendorf, Niemcy). Supernatant przenoszono do zastawu firmowego, po czym realizowano automatyczną ekstrakcję zgodnie z protokołem producenta, po jej zakończeniu eluat przeniesiono do sterylnych probówek Eppendorfa. Pomiar czystości i ilości DNA przeprowadzono w spektrofotometrze NanoDrop ND 2000C (Thermo Scientific), trzykrotnie analizując każdą próbę. Do dalszych analiz próby rozcieńczono, uzyskując koncentrację 5 ng/µl.

TaqMan qPCR

Otrzymane w wyniku izolacji gDNA stanowiło matrycę w reakcji qPCR. Analizę przeprowadzono przy użyciu zestawów odczynników ThermoFisher Scientific w aparacie ABI Prism 7500 FAST (Applied Biosystem, USA) z wykorzystaniem specyficznych starterów i sondy umożliwiających kwantyfikację grzybów *Fusarium* produkujących

trichoteceny: Tri 5 forward 5' – TCTTAACACTAGCGTGCGCCTTC-3', Tri5 reverse: 5' – CATGCCAACGATTGTTTGGAGGGA-3', Tri5 Probe: Fam-AACAAGGCTGCCCA CCACTTTGCTCAGCCT-Tamra (Vegi i Wolf-Hall 2013). Analizę prowadzono w trzech powtórzeniach dla każdej matrycy gDNA w 25 µl objętości mieszaniny reakcyjnej zawierającej: -12,5 µl TaqMan PCR Master Mix [ThermoFisher Scientific], 10 pM starterów oraz 10 pM sondy zawieszonych w 4,5 µl dejonizowanej wody, 5 µl gDNA. Reakcję amplifikacji przeprowadzono w następujących warunkach: wstępna denaturacja w temperaturze 95°C przez 5 minut; 40 cykli: denaturacja w temperaturze 95°C przez 15 sekund; przyłączanie starterów w temperaturę 60°C przez 15 sekund; synteza nowej nici w temperaturze 72°C przez 1 minutę. Uzyskane wyniki zaprezentowano w postaci tabel i wykresów, podając wartości Ct (cykl progowy).

Wyniki badań

Z badanych prób orzechów wyizolowano łącznie 477 kultur grzybowych należących do 12 taksonów (tabela 12). W badanym materiale najliczniej występowały: *Trihotecium roseum* oraz *Penicillium* spp., które stanowiły odpowiednio 44 i 21% ogółu izolatów.

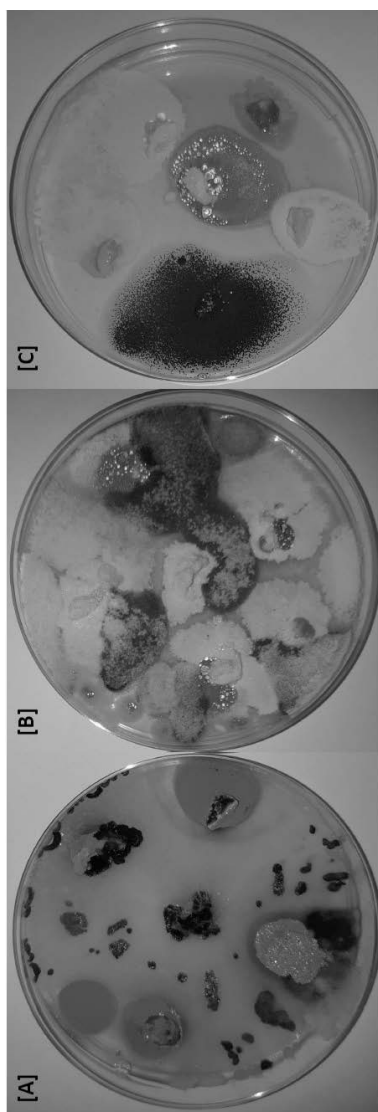
Orzechy włoskie zasiedlone były przez przedstawicieli 10 taksonów w liczbie 224 izolatów (tab. 1, fot. 1 A, B, C). W pierwszej próbie z plantacji własnej stwierdzono liczne występowanie gatunków: *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium* spp. (fot. 1 A). Grzyby toksynotwórcze reprezentowane były przez nielicznych przedstawicieli: *A. alternata* F. *graminearum*, *Penicillium verrucosum* i *T. roseum*, łącznie stanowiły one 28,5% ogółu wyizolowanych kultur. Próba druga z kolejnej plantacji ekologicznej w rejonie Warmii i Mazur zasiedlona było bardzo licznie przez gatunki toksynotwórcze: *T. roseum* (59%) oraz *A. alternata* (29,5%) (tab. 1, fot. 1 B). W przypadku tej próby odnotowano także obecność trzech izolatów *A. flavus*. Próbie orzechów włoskich zakupionych w sklepie zasiedlało łącznie 69 izolatów grzybów, z czego największy odsetek stanowili reprezentanci gatunku *T. roseum* (46%) (tab. 1., fot. 1 C). Ponadto na orzechach ze sklepu mniej licznie występowały: *A. niger* (23%) *Penicillium* spp. (17%) oraz gatunki syntetyzujące DON: *F. culmorum* i *F. graminearum* (stanowiące łącznie 8,6% izolatów wyosobnionych z tej próby).

Z orzechów laskowych pochodzących z plantacji ekologicznej w rejonie Warmii i Mazur wyizolowano przedstawicieli 7 taksonów w liczbie 115 kultur grzybowych (tab. 1, fot. 2 A). Największy odsetek (62%) w przypadku tej próby stanowiły izolaty reprezentujące gatunek *T. roseum* (fot. 2 A). Stosunkowo licznie orzechy laskowe z próby ekologicznej zasiedlone były przez *A. alteranta*, *F. avenaceum* oraz przedstawiciele rodzaju *Penicillium* (łącznie 36,5% izolatów tej grupy). Orzechy laskowe zakupione w sklepie zasiedlali reprezentanci 5 taksonów (tab. 1). Łącznie z tej próby wyizolowano

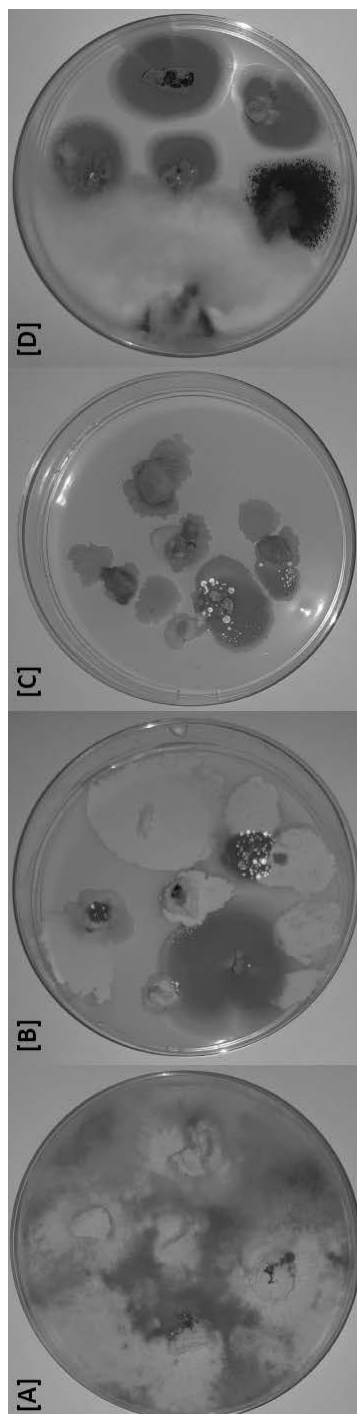
Tabela 1. Grzyby wyizolowane z badanych prób orzechów

Lp.	Gatunek	Orzechy							Σ
		1*	2	3	4	5	6	7	
1	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	11	21		14				56
2	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	27		16		4		14	61
3	<i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh.							1	1
4	<i>Aspergillus flavus</i> Link		3		1			2	6
5	<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	12							12
6	<i>Fusarium avenaceum</i> (Corda ex Fr.) Sacc.				14			1	15
7	<i>Fusarium culmorum</i> (Wm.G. Sm.) Sacc.			3					3
8	<i>Fusarium graminearum</i> Schwabe	5		3				3	11
9	<i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx	4				2		3	12
10	<i>Penicillium</i> spp.	21	5	12	14	15		25	108
11	<i>Trichoderma</i> spp.			3					3
12	<i>Trichothecium roseum</i> (Pers.) Link	4	42	32	72	41		3	226
Suma		84	71	69	115	72		37	514

1* – orzechy włoskie – produkcja własna A, 2 – orzechy włoskie – produkcja własna B, 3 – orzechy włoskie – sklep, 4 – orzechy laskowe – produkcja własna, 5 – orzechy laskowe – sklep, 6 – migdały – sklep, 7 – nerkowce – sklep.



Fotografia 1. Grzyby wyizolowane z prób orzecha włoskiego: [A] produkcja własna A, [B] produkcja własna B, [C] zakupionych w sklepie



Fotografia 2. Grzyby wyizolowane z prób orzechów: [A] laskowych – produkcja własna A, [B] laskowych – zakupionych w sklepie, [C] migdałów-zakupionych w sklepie, [D] nerkowców – zakupionych w sklepie

72 kultury grzybowe. Gatunek *T. roseum* stanowił w tej grupie 57%, zaś łączny udział grzybów *A. alternata* i *Penicillium* wyniósł w tym przypadku 34,7% (fot. 2 B).

Kolejną badaną próbą obejmującą migdały zasiedlona była przez 37 izolatów należących do 6 taksonów (tab. 1). W tym przypadku najliczniej występowały gatun-

Tabela 2. Wyniki qPCR obecności genu *Tri5* (*F. culmorum*/ *F. graminearum*) w badanych próbach orzechów

Genotyp	Orzechy						
	1*	2	3	4	5	6	7
<i>F. culmorum</i> / <i>F. graminearum</i> <i>TRI5</i>	29,89±0,21	-	26,23±0,47	-	-	30,31±0,17	-

1* – orzechy włoskie – produkcja własna A, 2 – orzechy włoskie – produkcja własna B, 3 – orzechy włoskie – sklep, 4 – orzechy laskowe – produkcja własna, 5 – orzechy laskowe – sklep, 6 – migdały – sklep, 7 – nerkowce – sklep.

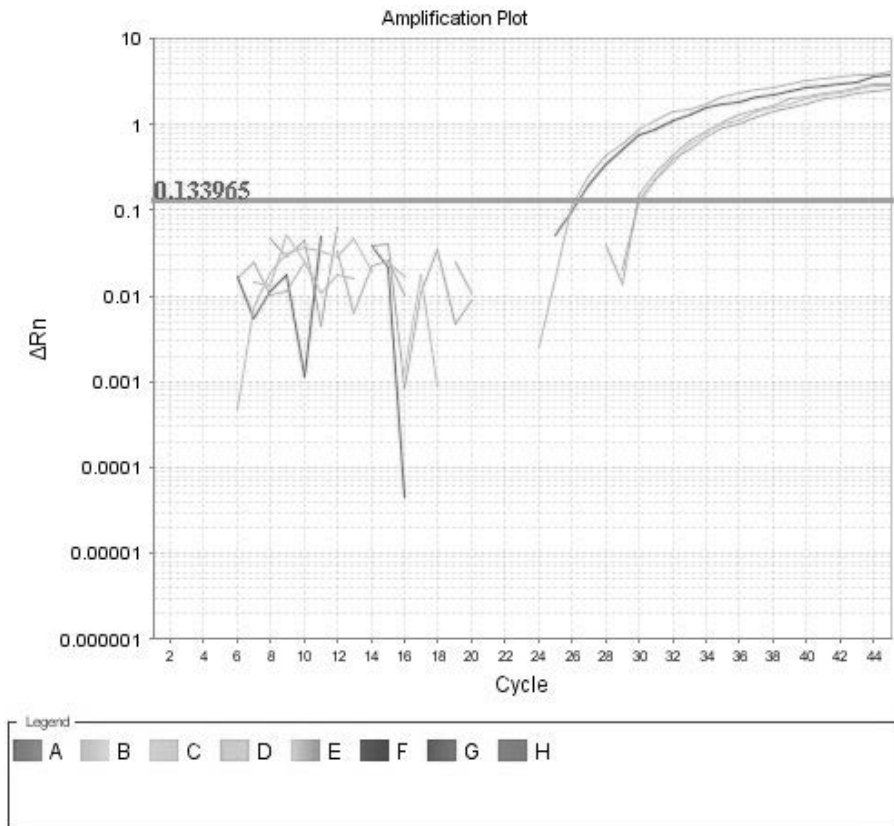


Fig. 1. Kwantyfikacja metodą qPCR genu *Tri5* w próbach orzechów pochodzących z planacji ekologicznych oraz zakupionych w sklepie na terenie Olsztyna

ki z rodzaju *Penicillium* (łącznie 67,5%). Przedstawiciele grzybów toksynotwórczych w tej próbie to nieliczne izolaty *A. flavus*, *F. avenaceum*, *F. graminearum*, *P. verrucosum* i *T. roseum* (łącznie 32,5% grzybów z tej próby) (fot. 2 C).

Orzechy nerkowca zasiedlone były przez 66 kultur grzybów należących do 5 taksonów (tab. 1). W przypadku tej próby gatunek *T. roseum* stanowił 48,5% ogółu wyosobnionych z tej próby grzybów, ponadto licznie izolowano przedstawicieli rodzaju *Penicillium* (24%) oraz gatunku *A. niger* (21%) (fot. 2 D). Na orzechach tej próby stwierdzono obecność trzech kultur *P. verrucosum* oraz jednego izolatu *A. ochraceus*.

Kwantyfikacja qPCR obecności genu *Tri5* pośredniczącego w syntezie DON, wykazała pozytywny wynik w przypadku wszystkich prób orzechów włoskich oraz w migdałach (tab. 2, fig. 1). Największą ilość DNA genu *Tri5* wykazano w próbie orzechów włoskich pochodzących ze sklepu, w tym przypadku odnotowano bowiem detekcję na poziomie $Ct=26,23\pm 0,47$ (fig. 1, tab. 2). Ponadto wykazano obecność genotypu *F. culmorum*/*F. graminearum* w próbach: orzechy włoskie z produkcji własnej ($29,89\pm 0,21$) i migdałach ($30,31\pm 0,17$). W pozostałych próbach orzechów nie stwierdzono obecności genu *Tri5* (fig. 1), co koresponduje z wynikami uzyskanymi metodą hodowlaną.

Dyskusja wyników

W badaniach własnych w próbach orzechów potwierdzono występowanie grzybów toksynotwórczych takich, jak: *A. alternata*, *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *Fusarium avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *Penicillium verrucosum* i *Trichothecium roseum*.

Uzyskane wyniki badań własnych korespondują rezultatami prac badawczych przeprowadzonych w Indiach, w których na orzechach włoskich stwierdzono występowanie 9 gatunków grzybów m.in.: *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Chaetomium globosum*, *Cladosporium herbarum*, *P. citrinum*, oraz *Trichothecium roseum*. Dominującym gatunkiem w tych badaniach okazał się *A. flavus*. W okresie letnim stanowił on 41%, w porze deszczowej 64% wszystkich uzyskanych kultur grzybowych (Singh i Shukla 2007). W badaniach własnych gatunek ten był reprezentowany przez nieliczne kultury pozyskane od orzechów włoskich i laskowych z produkcji własnej oraz z migdałów zakupionych w sklepie. W badaniach przeprowadzonych w Arabii Saudyjskiej wykazano występowanie aflatoksyny aż w 50% pobranych próbek orzechów włoskich, co było wynikiem występowania gatunku *A. flavus* (El tawila i in. 2012).

Obecność gatunków toksynotwórczych stwierdzano także na pędach i liściach orzecha włoskiego. W badaniach przeprowadzonych w Turcji (w rejonie Anatolii) stwierdzono liczne występowanie gatunków: *A. alternata*, *A. solani*, *Aspergillus ochraceus*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium chrysogenum* i *Microstroma juglandis*. Analizując uzyskane wyniki badań, Autorzy stwierdzili, że grzyby toksynotwórcze występujące

na liściach mogą stanowić poważny problem w produkcji orzecha włoskiego w tym rejonie (Komaki i in. 2019).

W badaniach przeprowadzonych w Pakistanie stwierdzono występowanie na orzechach włoskich bardzo zbliżonej mykobioty, w skład której wchodziły: *A. alternata*, *A. tenuissima*, *Aspergillus candidus*, *A. niger*, *Penicillium* spp., *Rhizopus* sp. i *T. roseum* (Bilgrami i Ghaffar 1996). Analizując mykoflorę włoskich orzechów, wykazano najczęstsze występowanie grzybów z rodzaju *Alternaria*, *Phoma* oraz *Penicillium*, które łącznie stanowiły prawie 60% wszystkich izolatów. W mniejszej liczbie występowały również grzyby: *Fusarium*, *Cladosporium*, *Epicoccum* i *Colletotrichum* (Pardatsher i Sweigkofler 2009).

Interesujące wyniki uzyskał Prella i in. (2012), którzy badali orzechy laskowe pod kątem zanieczyszczenia aflatoksynami. W badaniach wykazano, że 35 z 93 próbek orzechów (37,6%) było zanieczyszczonych przez aflatoksyny. W badaniach Jiménez i in. (1991) w próbach migdałów, orzeszków ziemnych, orzechów laskowych i pistacji wykazano obecność grzybów toksynotwórczych i mykotoksyn. Aflatoksyny wykryto w jednej próbce migdałów oraz w jednej próbce orzeszków ziemnych. Natomiast gatunki toksynotwórcze wykryto we wszystkich badanych próbkach orzechów ze zmienną częstością występowania uzależnioną od gatunku. Dominującymi grzybami były: *Penicillium* spp., *A.s niger*, *A. flavus*, *A. glaucus* i *Rhizopus* spp. Na podstawie analiz HPLC wykazano, że pozyskane izolaty były zdolne do wytwarzania aflatoksyn B1, B2, G1 i G2, sterigmatocystyny, ochratoksyny A, patuliny, cytryniny, kwasu penicylinowego, zearalenonu i gryzeofulwiny (Jiménez i in. 1991).

Bayman i in. (2002) w swoich badaniach przeprowadzonych na migdałach, orzechach włoskich i orzechach brazylijskich wykazali, że najczęściej izolowanymi rodzajami były *Aspergillus*, *Rhizopus* i *Penicillium*. *Alternaria*, *Cladosporium*, *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Verticillium*. Najliczniej reprezentowanymi gatunkami okazały się: *A. niger* (zasiedlający 42% wszystkich orzechów) oraz *A. flavus* (21%).

Christianah Adetunji i in. (2019) w badaniach porównywali profile metabolitów tworzonych przez grzyby wyizolowane z orzechów nerkowca w Nigerii i Afryce południowej. Autorzy w próbkach orzechów z Afryki Południowej i Nigerii stwierdzili, że licznie występowały aflatoksyny (odpowiednio 0,03-0,77 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i 0,01-0,28 $\mu\text{g}/\text{kg}$) i ZEA (123,2 i 788,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Wykazali, że częstość występowania toksyn fuzaryjnych była wyższa w orzechach nerkowca nigeryjskiego (100% i 17%) niż orzechach południowoafrykańskich (8% i 8%).

W badaniach własnych nie określono występowania mykotoksyn, jednakże zastosowano metodę qPCR umożliwiającą ocenę ilościową występowania genu *Tri* odpowiedzialnego za syntezę trichotecenów. Okorski i in. (2017) wykazali korelację pomiędzy występowaniem kultur grzybowych oraz DNA gatunków toksynotwórczych a zawartością DON, dlatego na podstawie uzyskanych w badaniach własnych wyników można przypuszczać, że próbki badanych orzechów zawierały mykotoksyny. W badaniach własnych wykazano, że najliczniej na próbkach wszystkich orzechów występował gatu-

nek *T. roseum*, który syntetyzuje mykotoksynę z grupy trichotecenów zwaną trichotecenem, a ponadto: roseocardynę, crotocynę, trichothecolonon, trichodiol i roseotoksynę (Marcinkowska 2012, Proctor i in. 2018, Sharma i in. 2014). Trichotecyna była izolowana z różnych płodów rolnych, takich jak: sorgo, proso i fasola. Stwierdzono, że często występowała w paszach dla drobiu i bydła, powodując mykotoksykozy, które powodowały słabe wykorzystanie paszy, odmowę przyjęcia paszy, biegunkę, zapalenie skóry, krwotok, immunosupresję, obniżenie wydajności jaj i mleka, brak odporności i martwicę szybko proliferujących tkanek, takich jak: błona śluzowa jelit, szpik kostny i śledziona (Sharma i in. 2014).

Wnioski

1. W próbach orzechów potwierdzono obecność grzybów toksynotwórczych: *A. alternata*, *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *Fusarium avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *Penicillium verrucosum* i *T. roseum*.
2. Najsilniej porażone przez gatunki toksynotwórcze okazały się orzechy laskowe z produkcji ekologicznej (101 izalatów) z dominującym udziałem *Trichotecium roseum*.
3. Grzyby posiadające zdolność do produkcji mykotoksyn zasiedlały najmniej licznie migdały.
4. Analiza qPCR potwierdziła obecność genu *Tri5* (kodującego syntezę trichotecenów) w próbach orzechów włoskich pochodzących ze sklepu i produkcji własnej oraz migdałach.

Bibliografia

- Adetunji Ch., Aroyeun S., Osho M., Sulyok M., Krska R., Mwanza M., 2019. Fungal metabolite and mycotoxins profile of cashew nut from selected locations in two African countries. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2019 Dec;36(12):1847–1859.
- Barabasz W. Pikulicka A. Mycotoxins – characteristics, occurrence, toxicity to organisms. *Journal of Health Study and Medicine*, 2017. nr 3, 65–108
- Bayman P., Baker J., Mahoney N., 2002. *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. *Mycopathologia* 2002;155(3):161-9.
- Bergner-Lang B, Kächele M, Stengel E. Zur Analytik von Patulin in Obstsaften und Obsterzeugnissen. *Dtsch. Lebens. Rundsch.* 1983, 79, 400–411
- Bilgrami Z., Ghaffar A., 1996, Location of fungi in different parts of walnut (*Junglans regia*) seed collected from different parts of Pakistan. *Pakistan.* 28(2): 225–230.
- Bogacka E. Alergia na grzyby pleśniowe: diagnostyka i leczenie [online]. *Polski Merkuriusz Lekarski.* 2008, 24, Supl, 1, 11–14.

- Bottalico A, Perrone G. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*. 2002, 108, 611–624.
- Chełkowski J. Mikotoksyny, grzyby toksynotwórcze i mikotoksykozy [online] <http://www.cropnet.pl/dbases/mycotoxins.pdf.pl>. 2010.
- Chełkowski J. Mikotoksyny, grzyby toksynotwórcze, mikotoksykozy. Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 1985.
- Ciemniewska-Żytkiewicz H., Krygier K., Bryś J., 2014. Wartość odżywcza orzechów oraz ich znaczenie w diecie. Postępy techniki przetwórstwa spożywczego 1/2014 s. 90–93.
- Dąbrowski, M., Obremski, K., Gajęcka, M., Gajęcki, M. T., & Zielonka, Ł. (2016). Changes in the subpopulations of porcine peripheral blood lymphocytes induced by exposure to low doses of zearalenone (ZEN) and deoxynivalenol (DON). *Molecules*, 21(5), 557.
- Gajewska M., Wyka K., Bartodziejska B., Szosland-Fałtyn A. (2019). Grzyby pleśniowe, groźne zanieczyszczenie przypraw. *Nauka, Technologia i Innowacje w Żywności i Żywieniu*, 131.
- Ghianian SA, Maghsood AH, Yazdanpanah H, Shephard GS, Westhuizen L, Vismer HF, Rheeder JP, Marasas WFO. Incidence of *Fusarium verticillioides* and levels of fumonisins in corn from main production areas in Iran. *J. Agric. Food Chem*. 2006, 54, 6118–6122.
- Gromadzka K, Waśkiewicz A, Chełkowski J, Goliński P. Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines. *World Mycotoxin Journal*. 2008, 1, 2.
- Hamilton PB. A natural and extremely severe occurrence of aflatoxicosis in laying hens. *Poultry Science*. 1971, 50, 6, 1880–1883.
- Jackson LS, Voss KA, Ryu D. Effects of different extrusion conditions on the chemical and toxicological fate of fumonisin B1 in maize: a short review. *World Mycotoxin Journal*. 2012, 5, 251–260.
- Jiménez M., Mateo R., Querol, Huerta T., Hernández E. 1991. Mycotoxins and mycotoxigenic moulds in nuts and sunflower seeds for human consumption. *Mycopathologia*. 1991 Aug;115(2):121-7.
- Jurado M, Marín P, Callejas C, Moretti A, Vazquez C, Gonzalez-Jaen MT. Genetic variability and fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. *Food Microbiol*. 2010, 27, 50–57.
- Kluczek JP. Mikotoksyny w zarysie. Wydawnictwa Uczelniane Akademii Techniczno-Rolniczej Bydgoszcz 2000, ss. 131.
- Komaki, A., Kordali, Ş., Bozhüyük, A. U., & Bostan, H. (2019). Microbial organisms detected on juglans regia in eastern anatolia, Turkey.
- KULIK K., WASZKIEWICZ-ROBAK., 2015. Trendy w żywieniu człowieka. Wydawnictwo Naukowe PTTŻ, 143–155.
- Kwaśna H., Chełkowski J., Zajkowski P., 1991. Grzyby (Mycota). Tom XXII. Sierpik (*Fusarium*). Polska Akademia Nauk, Flora Polska, Warszawa, Polska.
- Leslie J.F., Summerell B.A. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing, pp. 81–159.
- Lewczuk, B., Przybylska-Gornowicz, B., Gajęcka, M., Targońska, K., Ziółkowska, N., Prusik, M., & Gajęcki, M. (2016). Histological structure of duodenum in gilts receiving low doses of zearalenone and deoxynivalenol in feed. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 68(2-3), 157–166.
- Łangowska N., 2018. Aflatoksyny – trująca żywność. Naturalnie o zdrowiu.
- Pachocka, L., Stróżyk A., 2017. Orzechy w codziennej diecie – wartości żywieniowe i prozdrowotne. *Przemysł Spożywczy* T. 71, nr 3, s. 38–41.
- Mahmoud M. El tawila, Abdullatif Neamatallah, Sadeq A. Serdar, Incidence of aflatoxins in commercial nuts in the holy city of Mekkah, *Food Control*, Volume 29, Issue 1, 2013, Pages 121–124,
- Malachová A, Dzuman Z, Veprikova Z, Vaclavikova M, Zachariasova M, Hajslova J. Deoxynivalenol, Deoxynivalenol-3-glucoside, and Enniatins: The Major Mycotoxins Found in Cereal-Based Products on the Czech Market, *J. Agric. Food Chem*. 2011, 59, 12990–12997

- Malagutti L, Zannotti M, Scampini A, Sciaraffia F. Effects of ochratoxin A on heavy pig production. *Animal Research*. 2005, 54, 179–184.
- Marcinkowska J. 2012. Oznaczanie rodzajów grzybów sensu lato ważnych w fitopatologii. Warszawa: PWRiL.
- Mykotoksyny – zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt Część 1. Mykotoksyny – charakterystyka, występowanie, toksyczność dla organizmów Mycotoxins – a threat to human and animal health Part.
- Okorski A., Polak-Słiwińska M., Karpiesiuk K., Pszczółkowska A., Kozera W. 2017. Real time PCR: a good tool to estimate mycotoxin contamination in pig diets. *WORLD MYCOTOXIN JOURNAL*. DOI: 10.3920/WMJ2016.2137.
- Pardatscher R., Schweigkofler W., 2009, Microbial biodiversity associated with the walnut *Juglans regia* L. in South Tyrol (Italy), Italy, *Mitteilungen Klosterneuburg* 59 (2009): 24–30.
- Pittet A. Naturalne występowanie mikotoksyn w żywności i paszach – nowe dane [online]. Dostępny w Internecie: <http://www.naturan.com.pl/pittet.html>, 2005
- Pławińska-Czarnak J, Zarzyńska J. Mikotoksyny w żywności pochodzenia zwierzęcego. *Mikologia Lekarska*. 2010, 17, 2, 128–133.
- Postupolski J, Rybińska K, Lenzion E, Kurpińska-Jaworska J, Szczęsna M, Karłowski K. Mikotoksyny w żywności – zmiany w ustawodawstwie Unii Europejskiej. *Przemysł Spożywczy*. 2010, 64, 6, 16–20.
- Prelle A., Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M., Aflatoxin monitoring in Italian hazelnut products by LC-MS. *Food Addit Contam Part B Surveill*. 2012;5(4):279-85.
- Proctor R.H., McCormick S.P., Kim H-S., Cardoza R.E., Stanley A.M., Lindo L., et al. 2018. Evolution of structural diversity of trichothecenes, a family of toxins produced by plant pathogenic and entomopathogenic fungi. *PLoS Pathog* 14(4): e1006946. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006946>.
- Punam Kumari Singh , A.N. Shukla, 2007, Survey of mycoflora counts, aflatoxin production and induced biochemical changes in walnut kernels, *Journal of Stored Products Research* 44, 169–172,
- Scott PM. Effect of food processing on mycotoxins. *J. Food Prot*. 1984, 47, 489–496.
- Sharma A., Gautam S., Mishra B. B. 2014. *Trichothecium*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 647–652. doi:10.1016/b978-0-12-384730-0.00338-4.
- Smith JE, Solomons GL, Lewis CW, Anderson JG. Mycotoxins in human nutrition and health. *European Commission CG XII*, 1994.
- Streit E, Naehrer K, Rodrigues I, Schatzmayr G. Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia, *J. Sci. Food Agric*. 2013, 93, 2892–2899.
- Vegi A., Wolf-Hall C.E. 2013. Multiplex real-time PCR method for detection and quantification of mycotoxigenic fungi belonging to three different genera. *Journal of food science*. 78: M70-M76.
- Waśkiewicz, A., Beszterda, M., Kostecki, M., Zielonka, Ł., Goliński, P., & Gajęcki, M. (2014). Deoxynivalenol in the gastrointestinal tract of immature gilts under per os toxin application. *Toxins*, 6(3), 973-987.
- Watanabe T. 2010. *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species*, Third Edition. CRC Press. 426pp.
- Wolny-Koładka K. Grzyby z rodzaju *Fusarium* – występowanie, charakterystyka i znaczenie w środowisku. *Kosmos, Problemy Nauk Biologicznych*. 2014, 63, 4, 623–633.
- Zielonka, L., Wisniewska, M., Gajęcka, M., Obremski, K., & Gajęcki, M. (2009). Influence of low doses of deoxynivalenol on histopathology of selected organs of pigs. *Pol. J. Vet. Sci*, 12, 89–95.

Abstract

OCCURRENCE OF TOXIC FUNGI IN NUTS FROM OWN AND COMMERCIAL PRODUCTION

Nuts are the fruit of many different plant species, characterized by high nutritional value. They are rich in fatty acids: MUFA and PUFA, as well as in protein, fiber, numerous vitamins, as well as macroelements and microelements. The usefulness of nuts for consumption may be reduced by the presence of mycotoxin-synthesizing fungi.

The aim of the research was to use the breeding method and qPCR to test the presence of nuts, which come from organic farming and were purchased for research in stores in Olsztyn. The research material was walnuts, hazelnuts, almonds and cashews from own planning and purchased in the store. Grown mushroom cultures were marked by genus and species based on the available keys based on morphological features under an optical microscope: Ellis (1971), Gilman (1957), Kwaśna et al. (1991), and molecular studies involved the use of qPCR to determine the presence of the DNA of trichothecenes producing fungi. As a result of the research, *Trichotecium roseum* and *Alteranaria alternata* were found to be the most numerous in all tested samples. The qPCR analysis showed the presence of *Fusarium* DNA that produces trichothecenes in walnuts and almonds.

Keywords: mycotoxins, toxic fungi, almonds, walnuts, hazelnuts, cashews

Aleksandra Karpiesiuk

Kinga Karwacka

Karol Rapita

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Rolnictwa i Leśnictwa

Koło Naukowe Diagnostyki i Fitopatologii Molekularnej „Biohazard”

Opiekun: dr hab. Adam Okorski, prof. nadzw.

GRZYBY TOKSYNOTWÓRCZE W KRAJOWYCH I IMPORTOWANYCH ŚRUTACH SOJOWYCH

Abstract: Śruta sojowa jest obecnie podstawowym surowcem do produkcji pasz dla zwierząt gospodarskich ze względu na zawartość białka o korzystnym składzie aminokwasowym. Zapotrzebowanie przemysłu paszowego na soję przewyższa możliwości wytwórcze polskich gospodarstw trudniących się produkcją roślinną. Aby zachować ciągłość produkcji, zaspokajając potrzeby paszowe Polski, importuje się śrutę sojową GMO najczęściej z krajów Ameryki Południowej. Rośliny soi są często porażane przez patogeny powodujące choroby, a jedną z najpoważniejszych chorób ograniczających jakość i wielkość plonu jest fuzarioza. Celem badań było określenie obecności gatunków rodzaju *Fusarium* w krajowej oraz importowanej śrucie sojowej (GMO) metodą hodowlaną oraz molekularną. Badania mikroskopowe wykazały obecność *Fusarium* spp. w obu obiektach badawczych. Stwierdzono obecność następujących gatunków: *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. poae* oraz *F. tricinctum*. W wyniku przeprowadzonej analizy TaqMan qPCR, wykazano wyższy poziom DNA grzybów produkujących trichotecyny (*F. graminearum*/*F. culmorum*) w śrucie GMO (247 pg DNA).

Słowa kluczowe: soja, pasze, mykotoksyny, grzyby toksynotwórcze

1. Wstęp i cel pracy

Soja jest wykorzystywana w żywieniu zwierząt od lat, przez wzgląd na fakt, iż jest znakomitym źródłem białka o wysokiej wartości biologicznej, ponieważ ma korzystną kompozycję i jednocześnie duży udział aminokwasów egzogennych. Roślina ta charakteryzuje się najwyższą strawnością białka z wysokim udziałem lizyny przy niskiej zawartości włókna surowego i substancji antyodżywczych, co pozytywnie wpływa na przyrosty zwierząt. Najczęściej w żywieniu zwierząt stosowana jest śruta sojowa, która zawiera 388–449 g/kg białka ogólnego, 62–79 g/kg włókna surowego, 11,2–13,1 g/kg metioniny i cysteiny i 24,1–27,7 g/kg lizyny (Brzóska in. 2009). Substancje antyżywniowe, takie jak: inhibitory tripsyny i chymotripsyny, lektyny, oligosacharydy, wpływają negatywnie na ilość spożywanej paszy i przyrosty masy ciała. Zaletą śruty sojowej jest to, że powstaje ona jako produkt uboczny przemysłu olejarskiego, dzięki czemu jej ceny rynkowe są konkurencyjne w stosunku do innych surowców paszowych (Brzóska in. 2009). W paszach dla zwierząt wykorzystuje się przede wszystkim soję modyfikowaną genetycznie. Ponad 90% światowej produkcji tego gatunku to materiał GMO, który jest bardziej odporny na niekorzystny wpływ warunków środowiska, a ponadto na środki chwastobójcze. Polska co roku sprowadza około 2,5 miliona ton tego surowca (Grela 2020). Ustawą z 22 listopada 2018 roku minister rolnictwa i rozwoju wsi został zobowiązany do opracowania planu wykorzystania krajowych źródeł białka, co pozwoli na ograniczenie deficytu białka paszowego dzięki zwiększeniu udziału krajowych komponentów białkowych. W Polsce realizowany jest program białkowy, którego celem jest zastąpienie białka soi GMO surowcem bez obecności trans genu, pozyskiwanym z upraw krajowych (Brzóska i Śliwa, 2016).

Soja, tak jak i inne rośliny, jest narażona na zakażenie przez grzyby, zarówno przez gatunki polowe, jak i przechowalniane, których występowanie może być szkodliwe dla zdrowia ludzi i zwierząt (Okorski in. 2017). Do obu grup zaliczane są gatunki toksynotwórcze, których wtórnymi metabolitami są mykotoksyny. Grzyby mogą rozwijać się w surowcu sojowym praktycznie na każdym etapie produkcji, zaczynając od pola, przez zbiory oraz transport, a kończąc na karmidle. Najczęściej występującymi w paszach grzybami są gatunki z rodzaju *Aspergillus*, *Fusarium* oraz *Penicillium* (Okorski in. 2017). Mykotoksyny przez nie produkowane to: aflatoksyny, ochratoksyna A (OTA), deoksynivalenol (DON) oraz zearelon (ZEA) (Bennet i Klich in. 2003). Zwierzęta przez cały okres wzrostu i rozwoju narażone są na żywienie się paszami zanieczyszczonymi mykotoksynami, co może powodować liczne choroby (Cheli in. 2014). Ze względu na to, że zwierzęta stale pobierają z pokarmem niskie dawki mykotoksyn to początkowe objawy zakażenia są niezauważalne, dopiero po wielu latach może ujawniać się ich wpływ skutkujący objawami chorobowymi lub śmiercią, ponieważ kumulują się one w organizmie zwierząt (Przybylska-Gornowicz i in. 2015). Taki sam efekt ujawnia krótkoterminowe spożywanie wysokich dawek mykotoksyn (Skiepko i in. 2020).

Występujące w paszach DON i jego pochodne są produkowane przez grzyby z rodzaju *Fusarium*. W dużych dawkach w paszy powodują wzrost jej pobierania, a także podwyższenie temperatury ciała, zmiany w ścianie żołądka oraz powiększenie wątroby (Rotter in. 1996). Niższe dawki powodują przeciwne objawy, takie jak: zmniejszenie spożycia paszy oraz spadki masy ciała (Wiśniewska in. 2014).

ZEA jest niesteroidową estrogenopodobną toksyną, produkowaną przez grzyby z rodzaju *Fusarium*. W wysokich dawkach powoduje hiperestrogenizm, który ma negatywny wpływ na układ rozrodczy, powoduje bowiem zaburzenia w rozmnażaniu oraz bezpłodność. Niższe dawki powodują zaczerwienienie i potliwość genitaliów, niszczenie jajników i zwiększają współczynnik fałszywych ciąży (Schoevers in. 2012). OTA produkowana przez *Penicillium* i *Aspergillus* jest wysoko toksyczna dla wątroby i nerek, ma działanie immunotoksyczne, nowotworowe i teratogenne (Persi in. 2014).

Celem pracy było określenie obecności gatunków rodzaju *Fusarium* w krajowej oraz importowanej śrucie sojowej (GMO) metodą hodowlaną oraz molekularną.

2. Materiał i metody

Materiałem do badań były importowana śruta sojowa Roundup Ready (MON-40-3-2) oraz krajowa śruta sojowa (niemodyfikowana genetycznie).

2.1. Analiza mykologiczna

Z badanych śrut sojowych pobierano losowo próby, tworząc próbę zbiorczą (około 50 g). Z próby zbiorczej pobierano 20 g śruty, którą odkażano w 0,1% roztworze podchlorynu sodu (NaOCl), a następnie trzykrotnie płukano w sterylnej wodzie. Tak przygotowany materiał wykładano do szalek Petriego na pożywkę agarową (pożywkę glukozowo-ziemniaczaną). W skład pożywki wchodziło:

- 200 g ziemniaków (gotowane w 0,5 dm³ wody),
- 16 g glukozy,
- 18 g agaru,
- woda destylowana do 1 dm³.

Płytki przechowywano w termostacie w temperaturze 25°C, a wyrastające grzyby odczepiono na skosy z agarową pożywką glukozowo-ziemniaczaną (PDA), a następnie oznaczono przy pomocy dostępnych kluczy i monografii (Booth 1971, Borowska 1986, Domsch i Gams 1972, Gerlach i Nirenberg 1982, Kwaśna i in. 1991).

2.2. Analizy molekularne

2.2.1. Izolacja DNA

Izolację DNA wykonano za pomocą firmowego zestawu odczynników: DNeasy Plant Kit (QIAGEN). Materiał badawczy ucierano w ciekłym azocie w ceramicznych moździerzach przez dwie minuty. Dalsze etapy ekstrakcji przeprowadzono zgodnie z dostarczonym przez producenta protokołem. Elucję DNA przeprowadzono z użyciem buforu elucyjnego zawierającego sterylną dejonizowaną wodę. (izolaty DNA zawieszono 100 µl). Po izolacji DNA wykonano pomiary ilości i czystości DNA w spektrofotometrze Nanodrop ND 2000C (Thermo Fisher Scientific, USA).

2.2.2. Detekcja grzybów toksynotwórczych metodą qPCR

Uzyskane gDNA stanowiło matrycę reakcji PCR w czasie rzeczywistym (qPCR), którą przeprowadzono przy użyciu zastawów odczynników firmowych A&A Biotechnology w aparacie ABI Prism 7500 FAST (Applied Biosystem, USA) zgodnie z protokołem dla badanego gatunku grzyba (tab. 1). Dla każdej analizowanej matrycy gDNA reakcję prowadzono w dwóch powtórzeniach.

Reakcję prowadzono w objętości 19 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej: RT 2xPCR Master Mix (10 µl), Rox (0,7 µl), Matryca DNA (3 µl), Mix startrow (160 nM) (4 µl), Sonda (80 nM) (2 µl). Na podstawie krzywych standardowych obliczono ilość DNA poszczególnych gatunków i genotypów grzybów, posługując się zmodyfikowanymi metodami opisanymi przez Livak i Schmittgen (2001) oraz Pfaffl (2001). Analizę ilościową przeprowadzono metodą opisaną przez Okorskiego i in. (2017).

Tabela 1. Wykaz starterów i sond wykorzystywanych do analizy qPCR w identyfikacji obecności grzybów toksynotwórczych

Genotyp/gen	Starter/sonda	Sekwencja (5'-3')	Literatura
<i>F.culmorum</i> / <i>F.graminearum</i>	Tri5 forward	TCTTAACACTAGCGTGCGCCTTC	(Vegi i Wolf-Hall 2013)
Tri5	Tri5 reverse	CATGCCAACGATTGTTTGGAGGGA	
	FGTri5 Probe	AACAAGGCTGCCACCACTTT-GCTCAGCCT	
<i>P.verrucosum</i>	rRNA forward	TAAGGTGCCGGAATACACGCTCAT	(Vegi i Wolf-Hall 2013)
rRNA	rRNA reverse	TAGTTCATTCCGCCCGTGAGTTGT	
	PV rRNA Probe	TCTAGACAGCCCGACGGTGGC-CATGGAAGT	
<i>F.avenaceum</i> / <i>F.tricinctum</i>	Avetric f	AGCAGTCGAGTTCGTCAACAGA	(Kulik i in. 2011)
<i>Esyn1</i>	Avetric r	GGCYTTTCCTGCGAACTTG	
	Avetric probe	CCGTCGAGTCCTCT	

2.3. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki poddano analizie wariancji z wykorzystaniem oprogramowania StatSoft. STATISTICA (Data Analysis Software System); Version 13; StatSoft, Inc.: Tulsa, OK, USA, 2014. Użyto testu Newmana–Keulsa przy poziomie istotności $p < 0.01$. Istotne różnice pomiędzy średnimi oznaczono jako grupy jednorodne (A, B, C).

3. Wyniki

Z badanego materiału (tj. śruty z soi GMO oraz śruty z soi krajowej) wyizolowano łącznie 205 kultur grzybów należących do 19 taksonów (tab. 2). Śrutę pozyskaną z soi transgenicznej zasiedlało 88 izolatów należących do 11 gatunków/rodzajów. Dominującym gatunkiem okazał się *C. cladosporioides* (23,9% ogółu izolatów). Grzyby toksynotwórcze reprezentowane były przez gatunki: *A. alternata*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* i *P. verrucosum*.

Tabela 2. Grzyby wyizolowane z badanych śrut sojowych

Lp.	Gatunek	Soja		Σ
		1*	2	
1	<i>Acremonium strictum</i> W. Gams		2	2
2	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	18	39	57
3	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	2		2
4	<i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh.		2	2
5	<i>Aureobasidium bolleyi</i> (R. Sprague) Arx	1	4	5
6	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fries.) de Vries	21	11	32
7	<i>Epicoccum nigrum</i> Link	12	7	19
8	<i>Fusarium avenaceum</i> (Corda ex Fr.) Sacc.	2	4	6
9	<i>Fusarium culmorum</i> (Wm.G. Sm.) Sacc.	7	4	11
10	<i>Fusarium graminearum</i> Schwabe	12	3	15
11	<i>Fusarium oxysporum</i> Schldtl.		15	15
12	<i>Fusarium poae</i> (Peck) Wollenw.		4	4
13	<i>Fusarium tricinctum</i> (Corda) Sacc.		2	2
14	<i>Mucor mucedo</i> L.		2	2
15	<i>Mucor clavatus</i> Link		3	3
16	<i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx	8	5	13
17	<i>Penicillium</i> spp.	4	7	11
18	<i>Trichoderma viride</i> Pers.		3	3
19	<i>Trichoderma</i> spp.	1		1
Suma		88	117	205

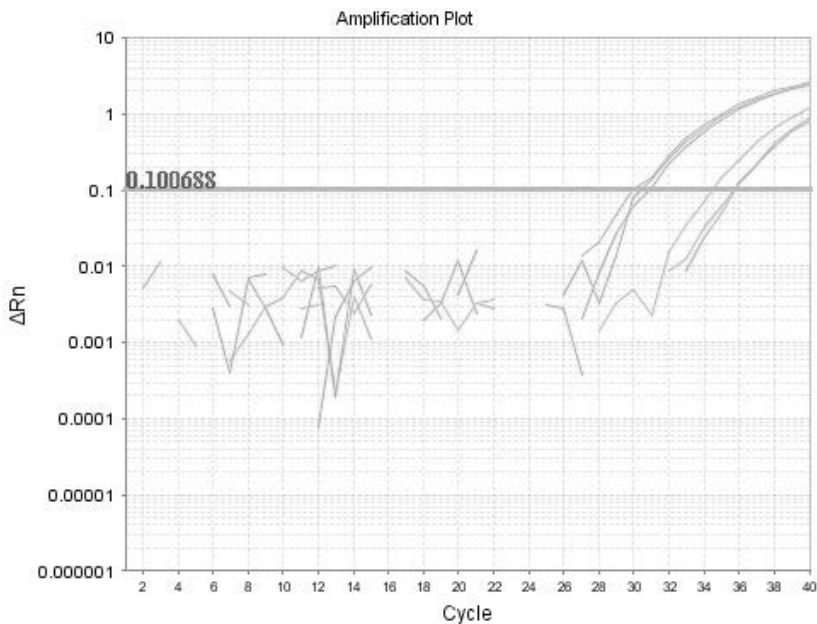
* 1 – śruta sojowa transgeniczna, 2 – śruta sojowa krajowa

Łącznie występowały one w liczbie 47 izolatów, co stanowiło 53% grzybów wyizolowanych ze śruty. W grupie tej dominowały: *A. alternata* oraz *F. graminearum*, których liczebność wyniosła odpowiednio 18 (20,4%) i 12 kultur grzybowych (12,6%).

Krajową śrutę sojową zasiedlało 117 izolatów należących do 18 taksonów. Liczebność grzybów była w tym przypadku o 25% większa w stosunku do śruty GMO. Ponadto w krajowej śrucie sojowej zidentyfikowano także większą różnorodność grzybów, wyrażonych liczbą taksonów 18 w stosunku do 11 (tab.2). Dominującym gatunkiem zasiedlającym ten materiał badawczy okazał się *A. alternata*, którego liczebność wyniosła 39 izolatów, co stanowiło 33,3% kultur grzybowych. Stosunkowo licznie reprezentowane były gatunki *C. cladosporioides* oraz *F. oxysporum*, w których stwierdzono odpowiednio 11 i 15 izolatów. Gatunki toksynotwórcze reprezentowane były przez: *A. alternata*, *Aspergillus ochraceus*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. tricinctum* i *P. verrucosum*. Łącznie wyizolowano 78 kultur reprezentujących tę grupę, co stanowiło 66,6% ogólnej liczby izolatów wyosobnionych ze śruty krajowej.

Badania własne obejmowały także przeprowadzenie analiz qPCR, umożliwiających kwantyfikację DNA gatunków toksynotwórczych: *F. avenaceum*/*F. tricinctum* (rys. 1), *F. culmorum*/*F. graminearum* (rys. 2) oraz *P. verrucosum* (rys. 3).

W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono obecność wszystkich badanych gatunków/genotypów zarówno w importowanej śrucie GMO, jak i śrucie z krajowej soi (tab. 3). Kwantyfikacja *F. avenaceum*/*F. tricinctum* opierająca się na wykorzystaniu



Rysunek 1. Detekcja qPCR genotypu *F. avenaceum*/*F. tricinctum* w badanych śrutch sojowych

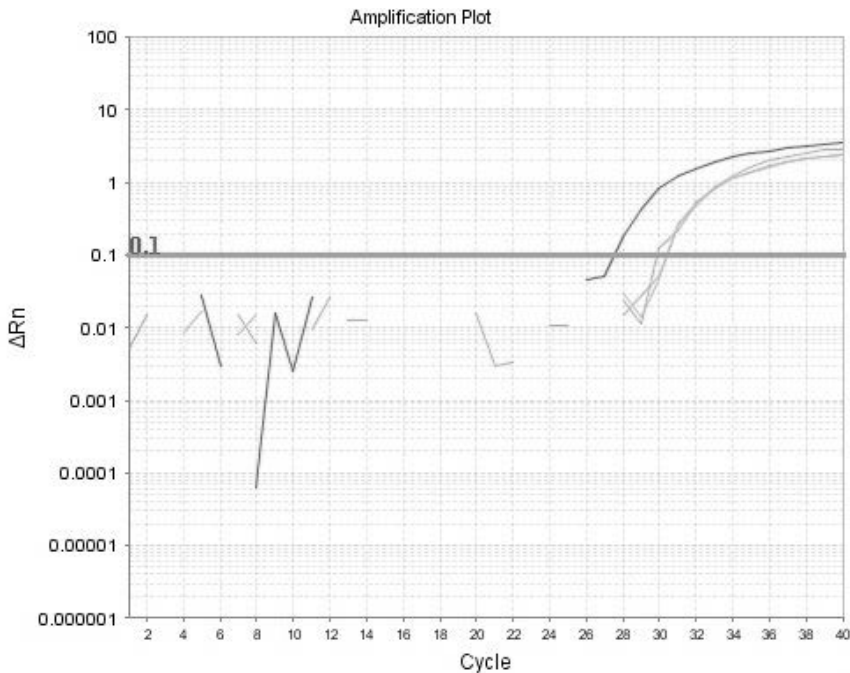
starterów i sondy TaqMan zaprojektowanych wobec genu *ESYNI*, odpowiadającego za syntezę eniatyn, potwierdziła większy udział DNA badanych gatunków w śrucie krajowej – 132,34 pg, podczas gdy w śrucie z soi transgenicznej wykazano obecność 21,32 pg DNA.

Detekcja DNA *F. culmorum*/*F. graminearum* bazująca na wykrywaniu genu *TRI5* odpowiedzialnego o za syntezę DON wykazała, że importowana śruta sojowa była dwukrotnie silniej skażona DNA tego genotypu w stosunku do śruty z krajowej soi.

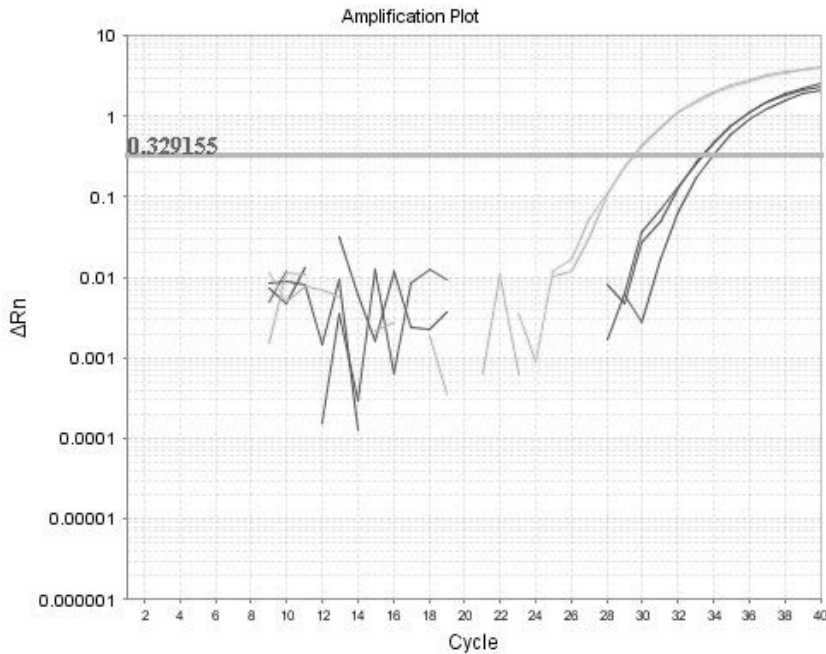
Tabela 3. Kwantyfikacja qPCR grzybów toksynotwórczych w badanych śrutach sojowych (pg DNA)

Gatunek	Soja	
	1*	2
<i>F. avenaceum</i> / <i>F. tricinctum</i>	21,32±12,21 B**	132,34±21,03 A
<i>F. culmorum</i> / <i>F. graminearum</i>	247,85±12,21 A	123,11±34,44 B
<i>P. verrucosum</i>	121,23±34,11 A	60,23±21,21 B

* 1 – śruta sojowa transgeniczna, 2 – śruta sojowa krajowa; ** średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie przy poziomie p-0,01.



Rysunek 2. Detekcja qPCR genotypu *F. culmorum*/*F. graminearum* w badanych śrutach sojowych



Rysunek 3. Detekcja qPCR *P. verrucosum* w badanych śrutach sojowych

Analiza qPCR obecności *P. verrucosum* w badanych śrutach sojowych wykazała wyższy poziom DNA tego gatunku w śrucie z soi GMO (121,23 pg) w stosunku do śrutki z krajowej soi (60,23 pg).

4. Dyskusja wyników

Zdaniem Milicevic i in. (2010) śruta sojowa jest doskonałym podłożem dla grzybów pleśniowych, które stanowią bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt ze względu na produkcję alergenów i toksyn. O występowaniu grzybów w paszach decydują: temperatura przechowywania, wilgotność oraz dostępność tlenu. Są one najważniejszymi czynnikami wpływającymi na rozwój grzybów, ale także produkcję mykotoksyn podczas przechowywania. W badaniach opisanych przez Piotrowską i in. (2013) potwierdzono, że w pierwszej kolejności zasiedlenie pasz grzybami zależy od infekcji materiału roślinnego w trakcie wzrostu i rozwoju, tj. na polu, zaś w dalszej – od warunków przechowywania.

W badaniach przeprowadzonych przez Al-Seeni (2012) stwierdzono zasiedlenie soi przez gatunki toksynotwórcze *A. alternata*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* oraz

przedstawicieli *Aspergillus* i *Penicillium*. W badaniach własnych właśnie te gatunki wskazywano jako głównych producentów mykotoksyn zarówno w śrucie krajowej, jak i pochodzącej z soi GMO. Do UE importowane są głównie soja i śruta sojowa, które są głównym komponentem pasz ze względu na ich wartość energetyczną i wysoką zawartość białka oraz dostępność, cenę i konkurencyjność rynkową. Transgeniczna śruta sojowa przywożona jest do UE z Brazylii (43,8%), Argentyny (22,4%), USA (15,9%) i Paragwaju (7,3%) (Korbutowicz 2020). Polski przemysł paszowy jest uzależniony od importowanej śruty sojowej sprowadzanej głównie z Ameryki Południowej, a konkretnie Argentyny i Brazylii (Kowalczewski 2010).

Badania Zelaya i in. (2013), dotyczące określenia różnorodności gatunkowej grzybów zasiedlających pasze sojowe GMO w Argentynie, wykazały największy udział gatunków: *A. alternata*, *A. flavus* oraz *F. equiseti*. Mniejsze znaczenie miały inne gatunki z rodzaju *Fusarium*, jak: *F. avenaceum*, *F. graminearum* czy *F. oxysporum*. Zaprezentowane przez Autorów dane korespondują z wynikami uzyskanymi w badaniach własnych, w których potwierdzono zasiedlenie śruty GMO przez: *A. alternata*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* i *P. verrucosum*. Krajowa śruta sojowa zasiedlona była przez gatunki toksynotwórcze: *A. alternata*, *A. ochraceus*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. tricinctum* i *P. verrucosum*. Podobne wyniki przedstawili Valenta i in. (2002), którzy prowadzili badania zawartości mykotoksyn w niemieckich śrutach sojowych. Autorzy w badaniach wykazali obecność: aflatoksyny syntetyzowanej przez *A. flavus*, OTA syntetyzowanej przez *P. verrucosum* oraz ZEA produkowanego przez gatunki *F. culmorum* i *F. graminearum*. Na podstawie badań przeprowadzonych w Rumunii potwierdzono zasiedlenie soi przez: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. candidus*, *A. niger*, *P. griseofulvum*, *P. variable*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* (Tabuc i Stefan, 2005). W badaniach własnych potwierdzono przydatność metody TaqMan qPCR do określenia poziomu skażenia pasz gatunkami toksynotwórczymi, a uzyskane wyniki korespondują z danymi analizy mykologicznej. Analizę qPCR do badania grzybów toksynotwórczych w paszach wykorzystywał także Okorski i in. (2017), wykazując wysoki udział producentów DON w paszach dla trzody chlewnej – głównym komponentem białkowym była soja GMO.

W badaniach własnych potwierdzono, że gatunki o największym znaczeniu w produkcji mykotoksyn występowały stosunkowo nielicznie, co można wytłumaczyć wysokim odsetkiem gatunku *A. alternata*, który zdaniem Piotrowskiej i in. (2013) jest antagonistyczny wobec *Fusarium*.

5. Wnioski

1. Badane śruty sojowe zasiedlone były przez 205 izolatów grzybów pleśniowych należących do 19 taksonów.

2. Śruta GMO była najliczniej zasiedlona przez *C. cladosporioides* oraz przez gatunki toksynotórcze *A. alternata* i *F. graminearum*.
3. Krajowa śruta sojowa zasiedlona była głównie przez *A. alternata* zaś *Fusarium* reprezentowane było nielicznie.
4. Analiza qPCR potwierdziła obecność w obu śrutach genotypów: *F. avenaceum*/*F. tricinctum*, *F. culmorum*/*F. graminearum* oraz *P. verrucosum*.

Bibliografia

- Al-Seeni M.N. 2012. Natural occurrence of heavy metal, fungi and mycotoxins in soybean meal samples used in animal feeding in Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(38), pp. 9288-9294.
- Bennett J.W., Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiological Review* 16: 497–516.
- Booth C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England.
- Borowska A. 1986. Flora Polska. Grzyby (Mycota). Grzyby Niedoskonałe (Deuteromycetes). PWN, Warszawa–Kraków.
- Brzóska F. 2009. Czy istnieje możliwość substytucji białka GMO innymi surowcami białkowymi (Część I). *Wiadomości Zootechniczne*, 1: 3–9.
- Brzóska F., Śliwa J. 2016. Soja niemodyfikowana genetycznie – jej produkcja i możliwości wykorzystania w żywieniu zwierząt w Polsce Część I. Soja w bilansie paszowym i jej uprawa w kraju. *Wiadomości Zootechniczne*. 4: 98–110.
- Cheli F., Battaglia D., Gallo R., Dell’Orto V. 2014. EU legislation on cereal safety: an update with a Focus on mycotoxins. *Food Control* 37: 315–325.
- Domsch K.H., Gams W. 1972. *Fungi in Agriculture Soils*. Longman Group Limited, London.
- Gerlach W., Nirenberg H. 1982. *The genus Fusarium – a pictorial atlas*. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft. Berlin, Germany.
- Grela E.R. 2020. Alternatywne dla soi pasze białkowe w żywieniu świń i drobiu. *Życie Weterynaryjne*. 95(8): 480–486.
- Korbutowicz T. 2020. Organizmy transgeniczne w Unii Europejskiej. *Studenckie Prace Prawnicze, Administratywistyczne i Ekonomiczne* 32:31–60.
- Kowalczewski P.Ł. 2010. Transgeniczna soja Roundup Ready. Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Praca inżynierska. pp. 34.
- Kulik T., Jestoi M., Okorski A. 2011. Development of TaqMan assays for the quantitative detection of *Fusarium avenaceum*/*Fusarium tricinctum* and *Fusarium poae* esyn1 genotypes from cereal grain. *FEMS Microbiology Letters*, 314(1): 49–56. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02145.x.
- Kwaśna H., Chelkowski J., Zajkowski P. 1991. *Grzyby (Mycota)*. Tom XXII. Sierpik (*Fusarium*). Polska Akademia Nauk, Flora Polska, Warszawa, Polska.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 25(4):402–408.
- Milicevic DR, Skrinjar M, Baltic T (2010). Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: Challenges for food safety control. *Toxins*, 2:572–592.
- Okorski A., Polak-Śliwińska M., Karpiesiuk K., Pszczółkowska A., Kozera W. 2017. Real time PCR: a good toll to estimate mycotoxin contamination in pig diets. *World Mycotoxin Journal*; 10 (3):219–228.

- Persi N., Pleadin J., Kovacević D., Scortichini G., Milone S. 2014 Ochratoxin A in raw materials and cooked meat products made from OTA treated pigs. *Meat Science* 96:203–210.
- Piotrowska M., Slizewska K., Biernasiak J. (2013). Mycotoxins in Cereal and Soybean-Based Food and Feed. Soybean - Pest Resistance. doi:10.5772/54470.
- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29(9):e45, <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- Przybylska-Gornowicz B., Tarasiuk M., Lewczuk B., Prusik M., Ziółkowska N., Zielonka Ł., Gajęcka M. 2015. The Effects of Low Doses of Two Fusarium Toxins, Zearalenone and Deoxynivalenol, on the Pig Jejunum. A Light and Electron Microscopic Study. *Toxins*. 7 (11):4684–4705.
- Schoevers E.J., Santos R.R., Colenbrandera B., Fink-Gremmelsb J., Roelen B.A.J. 2012 Transgenerational toxicity of zearalenone in pigs. *Reproductive Toxicology* 34:110–119.
- Skiepkó N., Przybylska-Gornowicz B., Gajęcka M., Gajęcki M., Lewczuk B. 2020. Effects of Deoxynivalenol and Zearalenone on the Histology and Ultrastructure of Pig Liver. *Toxins*. 12, 463.
- Tabuc C., Stefan G. 2005. Assessment of mycologic and mycotoxicologic contamination of soybean, sunflower and rape seeds and meals during 2002–2004. *Archiva Zootechnica*, 8:51–56.
- Valenta H., Dänicke S., Blüthgen A. 2002. Mycotoxins in soybean feedstuffs used in Germany. *Mycotoxin Res.*, 18 Suppl 2:208–11. doi: 10.1007/BF02946097. PMID: 23606164.
- Vegi A., Wolf-Hall C.E. 2013. Multiplex real-time PCR method for detection and quantification of mycotoxigenic fungi belonging to three different genera. *Journal of food science*. 78: M70–M76.
- Wiśniewska H., Stępień Ł., Waśkiewicz A., Waśkiewicz A., Beszterda M., Góral T., Bartel J., 2014 Toxigenic Fusarium species infecting wheat heads in Poland. *Central European Journal of Biology* 9:163–172.
- Zelaya M. J., González H.H.L., Resnik S.L., Pacin A. M., Salas M. P., Martínez M. J. 2013. Mycobiota and Potential Mycotoxin Contamination of Soybean RR in Different Production Areas in Argentina. *International Research Journal of Plant Science*, 4(5):133–143.

Abstract

TOXIGENIC FUNGI IN DOMESTIC AND IMPORTED SOYBEAN MEAL

Soybean meal is currently the basic raw material for the production of livestock feeds, due to its protein content with a favourable amino acid composition. The feed industry demand for soybean exceeds production possibilities of Polish farms engaged in plant production. In order to maintain continuity of production and meet the feed needs of Poland, GMO soybean meal is imported, most often from South American countries. Soybean plants are often infected by pathogens causing diseases, and one of the most important diseases limiting the quality and yield is fusariosis. The objective of this study was to determine the presence of species of the genus *Fusarium* in domestic and imported soybean meal (GMO) by culture and molecular methods. Microscopic examination revealed the presence of *Fusarium* spp. in both research facilities. The following species were found to be present: *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. poae* and *F. tricinctum*. TaqMan qPCR analysis revealed higher DNA levels of tricinctin-producing fungi (*F. graminearum*/*F. culmorum*) in GMO meal (247 pg DNA).

Keywords: soybean, feed, mycotoxins, toxigenic fungi

Olga Kosewska

Uniwersytet Warmińsko - Mazurki w Olsztynie,

Wydział Rolnictwa i Leśnictwa

Studenckie Koło Naukowe Entomologów „Pasikonik”

Opiekun naukowy: dr hab. Agnieszka Kosewska, prof. UWM

ROZWÓJ WOŁKA RYŻOWEGO (*SITOPHILUS ORYZAE*) NA RÓŻNYCH ODMIANACH ZBÓŻ

Wstęp

Ziarno zbóż będące głównym źródłem pożywienia dla ludzi jest szczególnie narażone na ataki szkodników. Nie może być od razu wykorzystane w całości, dlatego jest przechowywane w magazynach i przechowalniach, których prawidłowe parametry określone są w prawodawstwie. Dbłość o jakość produktów wskazuje również prawo unijne, które jasno stwierdza, że „w celu zapewnienia bezpieczeństwa żywności, konieczne jest uwzględnienie wszystkich aspektów łańcucha produkcji żywności począwszy od produkcji podstawowej i produkcji pasz, aż do sprzedaży lub dostawy żywności do konsumenta, ponieważ każdy element może mieć potencjalny wpływ na bezpieczeństwo żywności” (Rozporządzenie 178 WE 2002). Powoduje to większe narażenie ziarna na ataki szkodników magazynowych.

Mówiąc jednak o szkodnikach magazynowych, należy zaznaczyć, czym one są i skąd pochodzą. Szkodniki magazynowe są to organizmy wyrządzające szkody w przechowalnictwie – stąd wzięła się ich nazwa. Występują w magazynowych produktach pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, szczególnie chętnie zasiedlają ziarniaki zbóż. Powodują dwa rodzaje szkód, co przyczynia się do pogorszenia jakości handlowej ziarna. Straty bezpośrednie, wynikające ze zmniejszenia się masy przechowywanego produktu, i straty pośrednie, czyli na przykład zanieczyszczenie przechowywanego ziarna odchodami, wydzielinami, martwymi osobnikami oraz wylinkami (Kaczmarek 2009; Olejarski i Ignatowicz 2010).

Owady swoimi procesami życiowymi przyczyniają się także do wzrostu temperatury oraz wilgotności ziarna, w którym żerują, co stwarza dogodne warunki do rozwoju

różnego rodzaju drobnoustrojów, w tym pleśni. Zarówno zmiana warunków, jak i substancje wydzielane, jeśli są w znacznej ilości, mogą przyczynić się do zmniejszenia zdatności produktu do pierwotnego przeznaczenia. Spożycie takich produktów może powodować również różnego rodzaju alergię i inne stany chorobowe u człowieka (Phillips i Burkholder 1984; Stejskal i Hubert 2006, Olejarski i in. 2013).

Do szkodników magazynowych należą różne grupy organizmów. Są nimi również wyspecjalizowane grupy owadów przystosowane do życia w pomieszczeniach zamkniętych i to one bardzo często powodują największe szkody. Do typowych owadów szkodników magazynowych należą: wołek zbożowy (*Sitophilus granarius* L.), trojszyk ulec (*Tribolium confusum* Duv.), skórek zbożowy (*Trogoderma granarium* Ev.), mól ziarniak (*Nemapogon granellus* L.), spichrzek surynamski (*Oryzaephilus surinamensis* L.), kapturzik zbożowiec (*Rhyzoperta dominica* F.) czy wołek ryżowy (*Sitophilus oryzae* L.) (Nawrot 2001).

Cel pracy

Szkodniki magazynowe są w stanie spowodować znaczące straty w przechowywanym ziarnie. Jednym ze szczególnie trudnych do zwalczania szkodników magazynowych jest wołek ryżowy (*Sitophilus oryzae* F), który jest gatunkiem stosunkowo nowym w naszych rejonach geograficznych, a co za tym idzie niewystarczająco opisanym. W związku z dużym zagrożeniem związanym z działalnością tego szkodnika praca ta poświęcona jest wołkowi ryżowemu i jego rozwojowi na ziarniakach różnych gatunków zbóż (pszenicy i jęczmieniu).

Celem pracy było określenie rozwoju wołka ryżowego na różnych odmianach jęczmienia oraz pszenicy. Ocenie poddano liczebność pokolenia potomnego wołka ryżowego, masę wytworzonego pyłu oraz ubytek masy ziarna.

Materiał i metody badań

W przeprowadzonym doświadczeniu zbadany został rozwój wołka ryżowego na ziarnie jęczmienia oraz pszenicy.

Wybrane gatunki i odmiany zbóż:

- pszenica: Rotax, Rusałka,
- jęczmień: Radek, Accordine.

Założenie hodowli masowej i standaryzacja hodowli: osobniki badanego gatunku użyte w doświadczeniu pochodziły z hodowli masowej, która jest prowadzona w Katedrze Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej UWM w Olsztynie.

W hodowli masowej rozwój owadów był monitorowany, a wielkość hodowli regulowana. Hodowla była prowadzona w kontrolowanych warunkach temperatury (30°C) i wilgotności (70%) w komorze hodowlanej (Sanyo MLR – 350 H), a wartości tych parametrów były skorelowane z najlepszymi warunkami dla rozwoju wołka ryżowego (Gołębiowska i Nawrot 1976). Rozwój wołka przeprowadzono na 500-gramowych próbkach umieszczonych w szklanych pojemnikach na ziarnie pszenicy. W celu dostępu powietrza i wentylacji wlot został zabezpieczony siatką szyfonową. Do dalszych doświadczeń użyte zostały młode (1-/2-dniowe) osobniki dorosłe chrząszczy. Ich pozyskanie było zgodne ze schematem: na 500 g próbki ziarna pszenicy naniesionych zostało 40 osobników *S. oryzae*; hodowle były prowadzone w 6 powtórzeniach; po upływie 20 dni osobniki dorosłe, wcześniej naniesione, zostały usunięte z pojemników; rozwój populacji był monitorowany. Wylęgające się młode osobniki (1-/2-dniowe) zostały użyte w dalszej fazie doświadczenia. Płeć młodych chrząszczy *S. oryzae* została określona na podstawie proporcji rostrum (Halstead 1963).

Badanie rozwoju *S. oryzae* na poszczególnych odmianach zbóż wybranych do doświadczenia: każdy z wariantów wykonany został w pięciu powtórzeniach. Ziarno badanych odmian było kondycjonowane w komorze hodowlanej przez siedem dni w temperaturze 30°C. Po tym czasie zostało przesiane przez sito o oczkach szerokości 1 mm (odsianie pyłu). Następnie 20-gramowe próbki ziarna każdej z odmian zostały umieszczone w pojemnikach winidurowych o średnicy 8 cm i wysokości 3 cm. W wieczkach pojemników wywiercony jest otwór wentylacyjny o średnicy 2 cm zabezpieczony siatką szyfonową, uniemożliwiająca wydostanie się chrząszczy. Do każdej próby wprowadzonych zostało 10 osobników wołka ryżowego w stosunku płci 1:1. Po dwóch tygodniach osobniki dorosłe zostały usunięte z pojemników, a od tego momentu próbki ziarna były monitorowane na obecność wylęgających się młodych potomnych osobników chrząszcza. Odnotowana została ich liczebność (osobniki żywe i martwe) oraz dzień wylęgu. Doświadczenie zostało zakończone w momencie, gdy na materiale nie odnotowywano pojawu chrząszczy w ciągu 10 dni. Po zakończeniu doświadczenia zostały przeprowadzone pomiary masy pyłu powstałego po żerowaniu chrząszczy oraz ubytku masy ziarna. Do pomiaru masy użyta została waga laboratoryjna WPS 220/C/2. Eksperyment był prowadzony w komorze klimatyzacyjnej Sanyo MLR-350H w stałych warunkach termiczno-wilgotnościowych (30°C, wilgotność względna powietrza 80%), które są uważane za optymalne dla tego gatunku (Gołębiowska i Nawrot 1976).

Analiza statystyczna: uzyskane w czasie prowadzenia doświadczenia dane, dotyczące liczebności pokolenia potomnego *S. oryzae* oraz ubytku masy ziarniaków i powstałej masy pyłu zostały wprowadzone do programu komputerowego Excel, a następnie analizowane i poddane dalszej obróbce. Analizę statystyczną wykonano w programie Statistica 13.3.

Dokonano oceny charakteru rozkładu danych dotyczących liczebności osobników potomnych, ubytku masy ziarniaków oraz masy pyłu wytworzonego przez chrząszcze za pomocą testu W Shapiro-Wilka. Analizowane dane miały rozkład unimodalny, a więc

istotność różnic między średnimi oceniano, stosując uogólniony model liniowy GLM (Generalized Linear Model) uwzględniający typ rozkładu danych Poissona. W celu określenia zależności między liczebnością pokolenia potomnego *S. oryzae* a wybranymi parametrami ziarna wyliczono współczynnik korelacji liniowej r Pearsona. Istotność statystyczną wyliczonego współczynnika korelacji Pearsona (r) przyjęto dla $p < 0,05$.

Wyniki badań

Analiza liczebności pokolenia potomnego w zależności od odmiany ziarna doprowadziła do wyniku uogólnionego modelu liniowego (GLM), który wykazał istotne różnice między średnimi. Wartość p w tym przypadku była mniejsza niż 0,05 (tab. 1).

Tabela 1. Wynik uogólnionego modelu liniowego (GLM) dla liczebności pokolenia potomnego *S. oryzae*, masy wytworzonego pyłu oraz ubytku masy ziarniaków badanych odmian zbóż

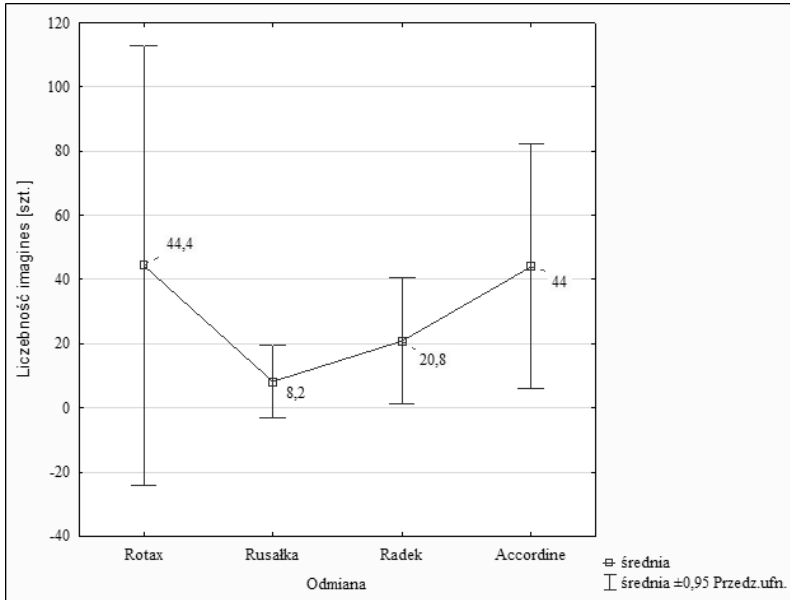
	Stopnie swobody df	Statystyka Walda Wald's statistic	P
Osobniki potomne suma	3	225,7	0,0
Osobniki potomne żywe	3	138,4	0,0
Osobniki potomne martwe	3	147,8	0,0
Masa pyłu	3	0,5	0,9
Ubytek masy ziarna	3	3,4	0,3

Źródło: opracowanie własne.

Uogólniony model liniowy nie wykazał istotnej zależności dla masy pyłu powstałego oraz dla ubytku masy ziarna w czasie żerowania wołka ryżowego rozwijającego się w badanych kombinacjach. Wartość p była większa niż 0,05 (tab.1).

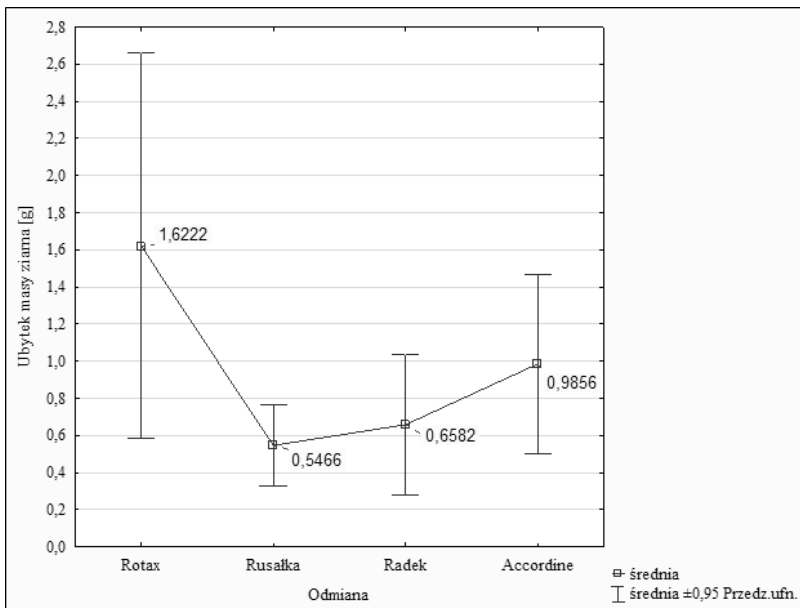
Analizując średnią liczebność pokolenia potomnego wołka ryżowego, widać, że nie ma znaczących różnic pomiędzy pszenicą i jęczmieniem. Najmniejszą liczebnością pokolenia potomnego charakteryzowała się odmiana pszenicy Rusalka z wynikiem średnim 8,2 imagines. Zaznaczyć należy również, że najlepszy rezultat pod względem średniej liczebności pokolenia potomnego wykazała odmiana pszenicy Rotax z wynikiem średnim 44,4 imagines. Zaraz za odmianą Rotax była odmiana jęczmienia Accordine ze średnią liczebnością 44 osobników. W środku zestawienia uplasowała się natomiast odmiana Radek (średnio 20,8 osobników w pokoleniu potomnym) (rys.1).

Analiza ubytku masy ziarna powstałego podczas żerowania wołka nie wykazała istotnych statystycznie różnic. Uogólniony model liniowy jednoznacznie wykazał brak istotnej zależności, ponieważ wartość uzyskanego p wyniosła 0,3 (tab. 1). Jednak wy-



Rysunek 1. Średnia liczebność pokolenia potomnego *S. oryzae* na badanych kombinacjach

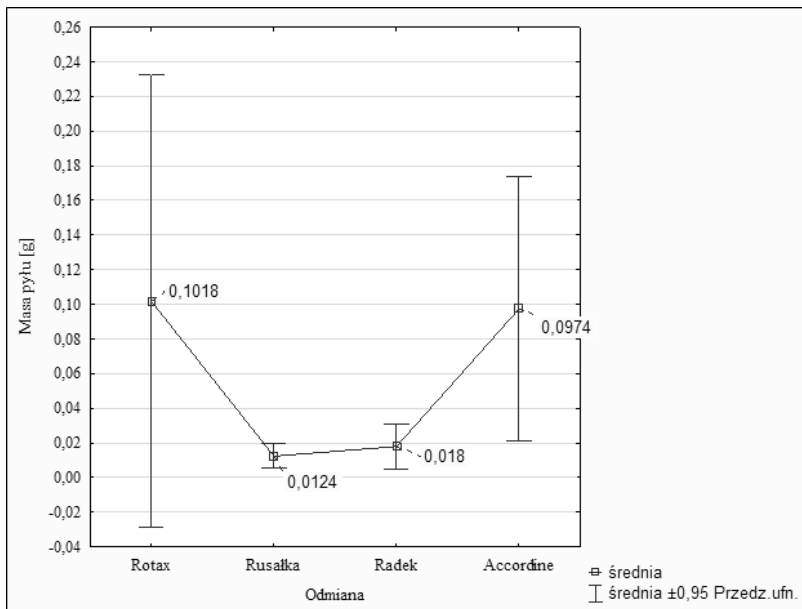
Źródło: opracowanie własne.



Rysunek 2. Średni ubytek masy ziarna powstały wskutek żerowania *S. oryzae* na badanych kombinacjach

Źródło: opracowanie własne.

niki ubytku masy ziarna, powstałego na skutek żerowania stadiów wołka ryżowego, ujawniły, że największy ubytek odnotowano na ziarnie pszenicy odmiany Rotax. Jest to sytuacja identyczna jak w przypadku analizy liczebności pokolenia potomnego, co potwierdza, że ziarno odmiany Rotax jest dobrym siedliskiem do rozwoju *S. oryzae*. Również najniższe wartości, tak jak w analizie rozwoju wołków, odnotowano dla odmiany Rusalka. W środku zestawienia uplasowały się odmiany jęczmienia Accordine z wynikiem 0,9856 g oraz Radek z wynikiem 0,6582 g (rys. 2).

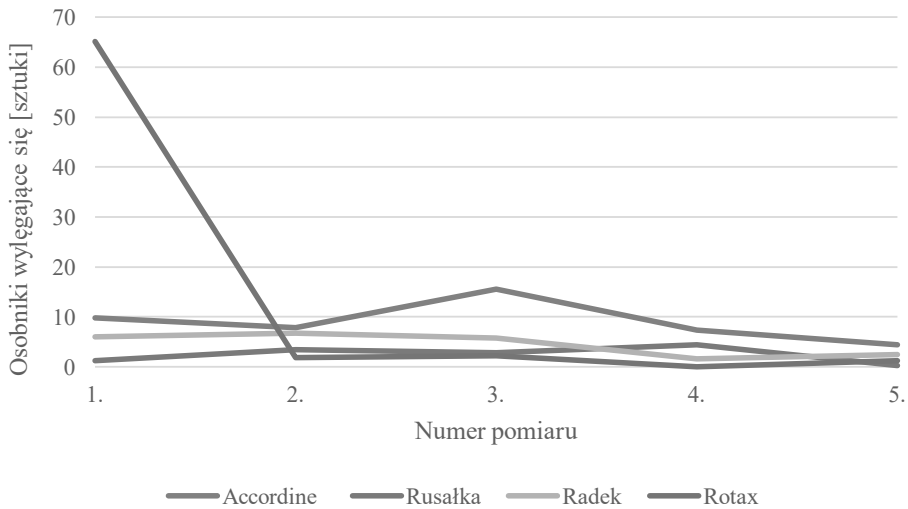


Rysunek 3. Średnia masa pyłu powstałego wskutek żerowania *S. oryzae* na badanych kombinacjach

Źródło: opracowanie własne.

Analiza statystyczna średniej masy pyłu powstałego podczas żerowania wołka ryżowego nie wykazała istotnych statystycznie różnic. Patrząc na wyniki, widać taki sam trend jak w przypadku poprzednich analiz. Największa średnia masa pyłu powstała w przypadku żerowania *S. oryzae* na odmianie Rotax. Owady wytworzyły w tym wariancie 0,1018 g pyłu. Zaraz za nią znalazła się odmiana Accordine z wynikiem średnim 0,0974 g. Natomiast najniższe wartości odnotowano dla odmiany Radek (0,018g) i Rusalka (0,0124 g) (rys. 3).

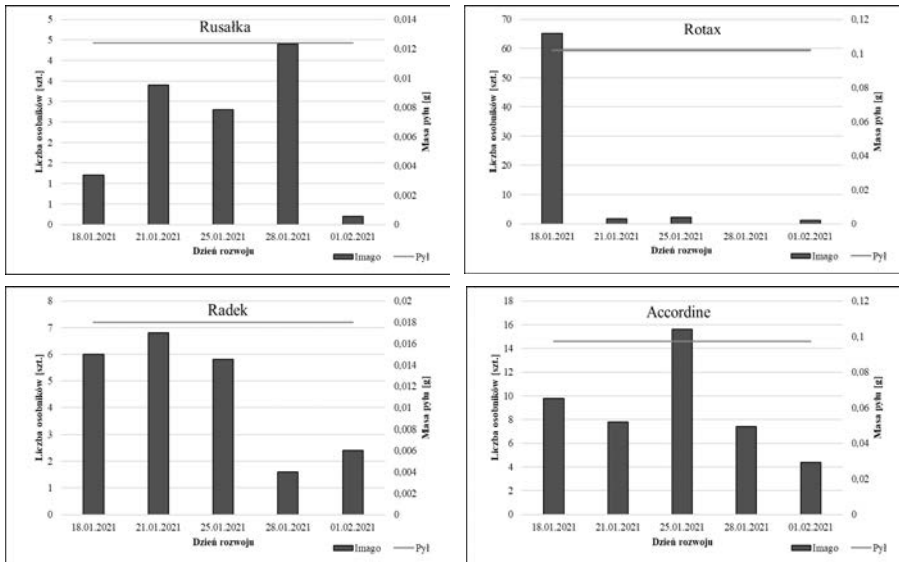
Przy analizie dynamiki wylęgu imagines *S. oryzae* uwidaczniają się różne trendy. Dla poszczególnych odmian ma on inny przebieg. Odmianą wyodrębniającą się i charakteryzującą się większym wylęgiem od pozostałych jest odmiana Rotax, na której



Rysunek 4. Dynamika wylęgu *S. oryzae* na badanych kombinacjach

Źródło: opracowanie własne.

najszybciej, ale i najliczniej rozwinęło się kolejne pokolenie. W przypadku pozostałych odmian rozwój ten był bardziej stabilny i mniej liczny (rys. 4).



Rysunek 5. Dynamika wylęgu *S. oryzae* rozwijającego się w badanych kombinacjach. Linia zaznaczono masę powstałego pyłu

Źródło: opracowanie własne.

Więcej informacji uzyskamy jednak, wykonując szczegółową analizę dynamiki wylęgu wołków ryżowych na badanych odmianach. Analizując dynamikę wylęgu wołka, należy prześledzić poszczególne jej etapy. Doświadczenie założono pod koniec listopada 2021 roku. Po siedmiu tygodniach od rozpoczęcia doświadczenia została wykonana pierwsza obserwacja. Największą liczbę chrząszczy w ilości 65 osobników odnotowano wówczas na odmianie Rotax. Mniejszą liczebnością charakteryzowały się pozostałe odmiany, które osiągnęły kolejno następujące wyniki: Accordine – 10 imagines, Radek – 6 imagines, i najniższy wynik Rusałka, gdyż w pierwszym pomiarze pojawił się tylko 1 chrząszcz. Przy kolejnych pomiarach w przypadku odmiany Rotax zauważalny był znaczący spadek pojawiania się nowych osobników. Podczas 2-, 3-, 4- i 5-go pomiaru w tej kombinacji pojawiły się jedynie pojedyncze osobniki. Analizując dynamikę wylęgu w kombinacji z odmianą Rusałka, widzimy, że rozwój owadów był stabilny, jednak liczba pojawiających się chrząszczy była niewielka. Najwyższa liczba pojawiających się imagines w tej kombinacji to 4 osobniki, które zostały odnotowane podczas czwartego pomiaru. W przypadku odmiany Radek większa dynamika wylęgu zauważalna jest podczas trzech pierwszych pomiarów. Podczas ostatnich dwóch pomiarów ilość pojawiających się nowych osobników spadła o ok. 70%. Analiza dynamiki wylęgu wołków na odmianie Accordine wykazała, że najwięcej imagines w tej kombinacji pojawiło się podczas środkowego (trzeciego) pomiaru. Pojawiło się wówczas 16 osobników. Podczas pozostałych pomiarów rozwój wołków na tej kombinacji był stabilny, z wyraźnym trendem spadkowym (rys. 5).

Tabela 2. Zawartość białka w badanych kombinacjach zbóż w skali 9-stopniowej

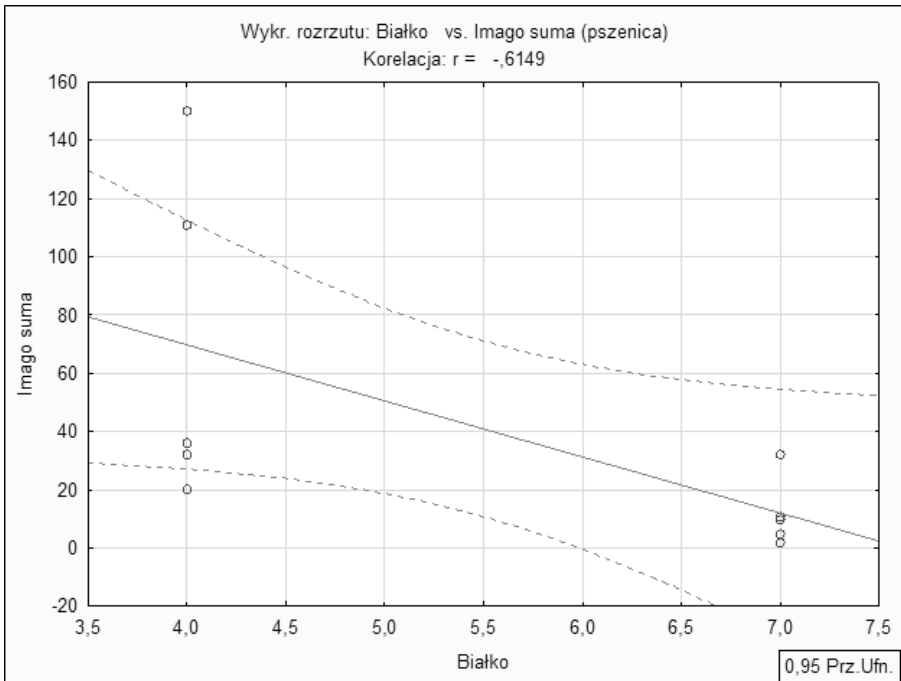
Odmiana	Białko*
Rotax	4
Rusałka	7
Radek	5
Accordine	5

* skala 9 stopniowa, gdzie: stopień 9 oznacza ocenę najkorzystniejszą, 5 – średnią, natomiast 1 – najmniej korzystną.

Źródło: opracowanie własne na podstawie COBORU.

Analizując wyniki uzyskane podczas trwania całego cyklu doświadczenia, zaobserwowano, że w badanych kombinacjach pszenicy występuje zależność pomiędzy zawartością białka a liczebnością imagines *S. oryzae*. Zawartość białka w ziarniakach poszczególnych odmian zbóż została przedstawiona w tabeli nr 2.

Wyliczona wartość współczynnika korelacji Pearsona ($r = -0,6149$) wskazuje na liniową, ujemną korelację między wzrostem zawartości białka w ziarnie a liczebnością



Rysunek 6. Zależność liczebności imagines *S. oryzae* od zawartości białka w ziarnie pszenicy

Źródło: opracowanie własne.

pokolenia potomnego badanego gatunku szkodnika. Wraz ze wzrostem zawartości białka pokolenia potomne były mniej liczne (rys. 6).

Dyskusja

Wołek ryżowy to szkodnik pierwotny ziarna zbóż, w związku z tym, podobnie jak wołek zbożowy i kapturzik zbożowiec, które również są szkodnikami pierwotnymi, dobrze rozwija się na pszenicy, pszenżycie, życie i jęczmieniu (Kordan i in. 2005; Nietupski i in. 2006). Gatunek ten można uznać za jednego z najgroźniejszych szkodników przechowywanego ziarna zbóż w strefie klimatu umiarkowanego. Należy również zaznaczyć, że jest to gatunek stosunkowo nowy w naszym klimacie, dlatego nie jest on jeszcze w pełni poznany. Sprawia to, że wołek ma nad nami przewagę i jest większym zagrożeniem dla przechowywanego ziarna zbóż. Aby stwierdzić, które odmiany są najlepszym siedliskiem dla rozwoju *S. oryzae*, a tym samym są bardziej podatne na jego ataki, należy bazować na porównaniu liczby populacji potomnej imagines oraz

parametrach takich, jak: ubytek masy ziarna czy ilość powstałego pyłu podczas żerowania owada (Kordan i in. 2008).

W przeprowadzonym doświadczeniu wołek rozwijał się we wszystkich badanych kombinacjach, tworząc liczną populację potomną, wytwarzając duże ilości pyłu i powodując znaczne ubytki w masie ziarna (rys. 1, 2, 3, 4). Wartości te były najkorzystniejsze dla pszenicy odmiany Rotax. Rozwój pokolenia potomnego szkodnika może zależeć od wielu czynników, zarówno biotycznych, jak i abiotycznych (Nawrot 2001, Perišić i in. 2018, Laszczak-Dawid i in. 2011). Jednym z nich może być pokarm. Wysokie wartości analizowanych parametrów mogą być związane z wysoką jakością pokarmu dla badanego owada (Niewiada i in. 2005; Park i in. 2008; Nawrot i in. 2010). Dodatkowo szkodniki magazynowe chętniej sięgają po ziarna bez osłon bardziej miękkie, o większych rozmiarach, aby rozwijające się larwy miały łatwiejszy dostęp do pokarmu (Perišić i in. 2018, Laszczak-Dawid i in. 2011). Campbell (2002) wykazał, że samice wołka ryżowego składają więcej jaj w ziarnach ≥ 20 mg. Ilość potomstwa wzrastała wraz ze wzrostem wielkości ziarna.

Bezpośrednio na rozwój szkodników magazynowych w tym wołka ryżowego (liczebność pokolenia potomnego i dynamikę rozwoju szkodnika) mogą mieć również wpływ substancje wchodzące w skład ziarna lub je pokrywające. Taka sytuacja została zaobserwowana w doświadczeniu z udziałem wołka zbożowego, którego samice składały średnio dwa jaja dziennie do zdrowych ziaren pszenicy, a do ziaren, które pozbawione były wosków kutykularnych, tylko jedno jajo (Nawrot 2001). Duży wpływ na rozwój *S. oryzae* może mieć skład chemiczny ziaren, w tym zawartość białka oraz cukrów prostych i złożonych. Optymalna wartość odżywcza wpływa na płodność, czas rozwoju i wielkość larw (Nawrot 2001, Awmack i Leather 2002). Boczek (2012) w swojej publikacji przedstawił doświadczenie polegające na porównaniu uszkodzeń powodowanych przez szkodniki owadzie na roślinie kapustnej o różnych składach chemicznych. Rośliny, które charakteryzowały się większą zawartością cukrów, były bardziej uszkodzane przez owady, natomiast te, które zawierały więcej białek i lipidów niszczone były w mniejszym zakresie. Nietupski i in. [2006] oraz Konopka i in. [2007] stwierdzili, że ziarniaki różnych odmian mogą mieć różną zawartość białka, a także poszczególnych frakcji i może być to bezpośrednio związane z rozwojem szkodników magazynowych. Taką zależność zaobserwowano również w doświadczeniu własnym. Odmiany z większą zawartością białka okazały się gorszym siedliskiem dla rozwoju wołka ryżowego.

Podsumowanie

Wołek ryżowy jest groźnym szkodnikiem magazynowym. Jego szkodliwość szczególnie doskwiera w momencie, kiedy posiada on dogodne warunki rozwoju. Podstawowym siedliskiem, na którym żeruje i w którym potencjalnie przybył na nasz kontynent, jest

zboże i to ono było pokarmem oraz siedliskiem rozwoju dla wołka ryżowego w tym doświadczeniu. Porównania pszenicy, która jest typowym pokarmem szkodników magazynowych, do różnych kombinacji jęczmienia, jednoznacznie wykazały, że jęczmień może być również doskonałym siedliskiem rozwoju chrząszcza. Tym samym magazyny przechowujące jęczmień, zwłaszcza o przeznaczeniu browarnym (co związane jest z ich składem chemicznym), powinny skupić większą uwagę na poznaniu tego szkodnika będącego ich potencjalnym wrogiem.

Wykonane badania pozwalają na sformułowanie kilku wniosków końcowych:

1. Zarówno ziarno jęczmienia, jak i pszenicy jest dobrym siedliskiem do rozwoju *S. oryzae*.
2. Najlepszym siedliskiem do rozwoju *S. oryzae* są ziarniaki pszenicy odmiany Rotax.
3. Najbardziej odporne na żerowanie *S. oryzae* są ziarniaki pszenicy odmiany Rusalka.
4. Widoczna jest bezpośrednia zależność między liczebnością imago pokolenia potomnego *S. oryzae*, ubytkiem masy ziarna i masą wytworzonego pyłu przez owady.
5. Istnieje liniowa, ujemna korelacja między wzrostem zawartości białka w ziarnie a liczniejszym pokoleniem potomnym badanego gatunku szkodnika.

Bibliografia

- Awmack C.S., Leather S.R. 2002: Host plant quality and fecundity of herbivorous insects. *Annu. Rev. Entomol.* 47:817–844.
- Boczek J., Pruszyński S. 2012. Rośliny jako pokarm i środowisko życia owadów i roztoczy. *Zagadnienia doradztwa rolniczego*. 1: 51–65.
- Campbell, J.F. Influence of Seed Size on Exploitation by the Rice Weevil, *Sitophilus oryzae*. *Journal of Insect Behavior* 15, 429–445 (2002). <https://doi.org/10.1023/A:1016225427886>.
- Kaczmarek K. 2009. Zagrożenia dla zmagazynowanych zbóż. *Poradnik Gospodarski*. (30): 30–33.
- Konopka I., Fornal Ł., Dziuba M., Czaplicki S., Nałęcz D. 2007. Composition of proteins in wheat grain streams obtained by sieve classification. *J. Sci. Food Agric.* 87: 2198–2206.
- Kordan B., Ciepiewska D., Nietupski M. 2005. Wpływ wybranych odmian zbóż na rozwój kaptownika zbożowca (*Rhizopertha dominica* F.). [Effect of cereal cultivars on the development of lesser grain borer (*Rhizopertha dominica* F.)]. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin* 45 (2): 794–796.
- Kordan B., Żuk-Gołaszewska K., Załuski D., Słomka W. 2008. Ziarno i kłoski pszenicy orkisz jako siedlisko rozwoju Kaptownika zbożowca (*Rhizopertha dominica* F.). *Progress in Plant Protection / Postępy w Ochronie Roślin*. 48 (3): 873–876.
- Laszczak-Dawid A., Ciepiewska D., Damszel M. 2011. Jakość technologiczna ziarna wybranych odmian pszenicy a rozwój kaptownika zbożowca (*Rhizopertha dominica* F.). *Progress in Plant Protection / Postępy w Ochronie Roślin*. 51 (3): 1126–1129.
- Nawrot J. 2001. Owady – szkodniki magazynowe. *THEMAR IMPORT-EKSPORT*, Warszawa. ss. 149.
- Nawrot J., Gawlak M., Szafranek J., Szafranek B., Synak E., Warchalewski J.R., Piasecka-Kwiatkowska D., Błaszczak W., Jeliński T., Fornal J. 2010. The effect of wheat grain composition,

- cuticular lipids and kernel Surface microstructure on feeding, egg-laying, and the development of the granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.). *Journal of Stored Product Research* 46 (2): 133–141. DOI: 10.1016/j.jspr.2010.02.001.
- Nietupski M., Ciepielewska D., Fornal Ł. 2006. Wpływ zróżnicowania chemicznego białek w ziarnie wybranych odmian pszenicy na rozwój szkodników magazynowych. [Effect of the chemical protein diversity of selected wheat grain cultivars on the development of storage pests]. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin* 46 (2): 420–423.
- Niewiada A., Nawrot J., Szafranek J., Szafranek B., Synak E., Jeleń H., Wąsowicz E. 2005. Some factors affecting egg-laying of the granary weevil (*Sitophilus granarius* L.). *Journal of Stored Product Research* 41 (5): 544–555. DOI: 10.1016/j.jspr.2004.11.001.
- Olejarski P., Ignatowicz S. 2010. Szkodniki magazynowe w produktach spożywczych. *Progress in Plant Protection / Postępy w Ochronie Roślin*. 50 (2): 600–604.
- Olejarski P., Węgorzek P., Zamojska J. 2013. Monitoring and control of stored grain insect pests in grain stores in Poland – Monitoring i zwalczanie szkodników w obiektach magazynowych w Polsce. *Progress in Plant Protection*. 53(3). 455–461.
- Park S.H., Arthur F.H., Bean S.R., Schober T.J. 2008. Impact of differing population levels of *Rhyzopertha dominica* (F.) on milling and physicochemical properties of sorghum kernel and flour. *Journal of Stored Product Research* 44 (4): 322–327. DOI: 10.1016/j.jspr.2008.02.008.
- Perišić V., Perišić V., Vukajlović F., Pešić S., Predojević D., Đekić V., Luković K. 2018. Feeding preferences and progeny production of *Rhyzopertha dominica* (Fabricius 1792)(Coleoptera: Bostrichidae) in small grains. *Biologica Nyssana*, 9(1).
- Phillips J.K., Burkholder W.E. 1984. Health hazards of insects and mites in food. *Insect Management for Food Storage and Processing*. American Association of Cereal Chemists. St. Paul. Minnesota, . 280–292.
- Rozporządzenie 178 WE 2002. Rozporządzenie (WE) Nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. bezpieczeństwa żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności. (Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej L 31. 6: 463–486).
- Stejskal V., Hubert J. 2006. Arthropods as sources of contaminants of stored products: an overview. In: *Proc. the 9th International Working Conference on Stored Product Protection*. Brazil. Campinas. São Paulo. October 15–18 2006. Brazilian Post-harvest Association – ABRAPOS. Passo Fundo. Brazil. 1074–1080.
- Gołębiowska Z., J. Nawrot. 1976. Szkodniki magazynowe. PWRiL. Warszawa. ss: 274.
- Halstead, D.G.H., 1963. External sex differences in stored-product Coleoptera. *Bulletin of Entomological Research* 54, 19–34.

Abstract

THE DEVELOPMENT OF THE RICE WEEVIL (*SITOPHILUS ORYZAE*) ON DIFFERENT VARIETIES OF CEREALS

Barley and wheat are types of cereals commonly cultivated and used in many branches of the economy. During storage, they are exposed to storage pests, including weevil (*Sitophilus oryzae*). The aim of the study was to evaluate the development of rice weevil on barley and wheat grain

of various forms and functional characteristics. The rate of development of this pest's population was analyzed, expressed as grain weight loss, the amount of dust generated and the size of its descendant population. Additionally, in order to better understand the subject, the influence of the protein content of the cultivars used on the insect's feeding was analyzed. The development of the pest was investigated on wheat grain, cv. Rotax (winter wheat) and Rusalka (spring wheat), and barley grain, cv. Radek (spring barley / PASTEWNY) and Accordine (spring barley / BREWERY). The analyzed data on the size of the child generation, the mass of the produced dust and the loss of kernel mass of the examined cereal cultivars had a unimodal distribution, therefore the significance of differences between the means was assessed with the use of the Generalized Linear Model (GLM). The obtained results indicate that all studied cultivars are a good habitat for the development of rice weevils. Winter wheat of Rotax variety turned out to be the best food. The most resistant variety to weevil feeding was the spring wheat variety – Rusalka. Analyzing the results obtained during the entire cycle of the experiment, it was also observed that in wheat combinations there is a relationship between the protein content and the abundance of *S. oryzae* imagines. The calculated value of the Pearson correlation coefficient (r) indicates a negative correlation between the increase in the protein content and the number of the descendant generation of the tested pest species.

Keywords: *Sitophilus oryzae*, barley, wheat, storage pests

Fabian Miszewski

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Koło Naukowe Miłośników Roślin Ozdobnych

Opiekun: dr inż. Beata Płoszaj Witkowska

OGRODY DZIAŁKOWE JAKO ISTOTNY ELEMENT EKOSYSTEMU MIASTA

Wstęp

Tkanekę miejską tworzą różnorodne elementy, z których każdy ma swoją odrębną specyfikę i morfologię. Szczególnie ważna dla każdego z nas jest oczywiście przestrzeń komunikacyjna, z której korzystamy na co dzień. Jednak bardzo istotnym, a jeszcze do niedawna często pomijanym składnikiem struktury miasta jest nie układ urbanistyczny czy komunikacyjny, tylko szeroko rozumiane tereny zieleni. Ostatnie kilkanaście miesięcy dowiodło nam, że każdy człowiek potrzebuje kontaktu z przyrodą, a zrozumieliśmy to dopiero pod wpływem ograniczeń, z jakimi przyszło nam się zmierzyć. Trafne jest spostrzeżenie, że przestrzeń, która otacza człowieka, ma dla niego duże znaczenie (Miszewski 2020). Jak uważa Kronenberg (2012), otoczenie, w jakim znajduje się człowiek, ma wieloraki wpływ na jego samopoczucie oraz na ogólny odbiór przestrzeni jako miejsca. Szeroko pojmowana zieleń okazała się zbawienna, szczególnie dla mieszkańców miast, co z kolei dowodzi, że ma ona znaczący wpływ na odpowiednie funkcjonowanie ludności miejskiej oraz psychofizyczny rozwój człowieka (Miszewski 2019). W przypadku ludności zamieszkującej obszary wiejskie dostęp do przyrody zawsze był i będzie w większym stopniu ułatwiony i możliwy niż w przypadku mieszkańców miast. Jednak zmiany mentalności ludności miejskiej oraz władz miast wraz z nowymi trendami rozwoju systemów zieleni miejskiej oraz przekształcania zdegradowanych obszarów miast na tereny zieleni dostępne dla mieszkańców sprawiają, że i w mieście dostępność natury wzrasta. Pewną ucieczką i azylem dla oddalonych i niejako odciętych od natury ludzi zamieszkujących w miastach okazały się ogrody działkowe.

Historia ogrodów działkowych sięga XIX w., a swój początek zawdzięcza rozwojowi przemysłu i szybko postępującej industrializacji. Wolaniuk (1991) wspomina, że nie do końca jasne jest, gdzie dokładnie założono pierwszy na świecie ogród działkowy, a na-

ukowcy spierają się w tej kwestii. Wiadomo jednak, jak zaczęła się ich historia w Polsce. Otóż pierwszy ogród robotniczy w Polsce powstał w roku 1897 w Grudziądzu, a jego założycielem był najprawdopodobniej dr Jankowski. Początki ogrodów działkowych, a dokładniej przyczyny ich powstawania zbliżone są do dzisiejszych realiów potrzeby obcowania z naturą. Wcześniej ogrody te miały być ucieczką od fizycznej pracy w fabrykach, miejscem odpoczynku fizycznego i psychicznego oraz budowania swoich wartości kulturowo-społecznych (Wolaniuk 1991). Ich stworzenie było odpowiedzią na pojawiające się coraz liczniej w gęsto zaludnionych miastach przejawy różnorodnych patologii społecznych.

Dzisiaj po ponad stu latach istnienie ogrodów działkowych jako miejsca rekreacji, czynnej uprawy roślin i często jedyne łącznika człowieka z naturą stoi przed szeregiem ogromnych wyzwań. Ogrody działkowe pełnią wiele zadań zarówno społecznych, jak i ekosystemowych (Pawlikowska-Piechotka 2009, Giedrych i Ponizy 2013, Kronenberg i in. 2013, Szczepańska i in. 2016). Towarzyszy temu ogromne niezrozumienie korzyści, jakie dostarczają nam te obszary (Kronenberg i in. 2013). Tereny ogrodów działkowych są różnie rozmieszczone w układzie urbanistycznym miasta. Razem z innymi terenami zieleni tworzą system przyrodniczy, który jest niezwykle istotny dla prawidłowego funkcjonowania każdej jednostki miejskiej oraz jej części składowych. Wodzińska (2015) zaznacza, jaki układ terenów zieleni jest najkorzystniejszy dla ośrodków miejskich i przynosi im najwięcej korzyści. Ogrody działkowe są ich idealnym uzupełnieniem i mogą pełnić między innymi istotne role korytarzy ekologicznych (Kronenberg i in. 2013), czyli miejsc przemieszczania się gatunków. Niestety braki w ochronie prawnej obszarów ogrodów działkowych oraz niezrozumienie oraz poczucie niesprawiedliwości społecznej mieszkańców niebędących ich użytkownikami (Kronenberg i in. 2013) wraz z presją zysku ekonomicznego i naciskami deweloperów oraz inwestorów stawiają właścicieli tych miejsc w trudnym położeniu. Często bowiem zajmują one tereny potencjalnie atrakcyjne ze względów ekonomicznych, na których mogłyby powstać nowe osiedla mieszkaniowe lub obiekty usługowe. Musimy jednak pamiętać, że mimo ograniczonego dostępu do obszarów ogrodów działkowych pełnią one szereg usług dla każdego mieszkańca miasta (Kronenberg i in. 2013), między innymi oczyszczają powietrze.

Cel i metoda

Celem przewodnim badań było dowiedzenie, że często lekceważone przez różne środowiska ogrody działkowe odgrywają istotną rolę jako składnik tkanki miejskiej oraz systemu ekologicznego miast. Ponadto założono, że pełnią one istotną funkcję w społeczeństwie miejskim jako miejsce spędzania czasu, rekreacji i integracji społeczności działkowców.

Cel badań zrealizowano drogą analizy zebranych materiałów, obliczenia wskaźników W_{OD} oraz W_{TZ} , które obrazują udział powierzchni ogrodów działkowych i terenów zieleni w ogólnej powierzchni wybranych miast według następującego wzoru:

$$W_{OD} = \frac{P_{OD}}{P} \times 100\%$$

gdzie:

P_{OD} – sumaryczna powierzchnia ogrodów działkowych w mieście,

P – powierzchnia miasta.

Dla obliczenia wskaźnika W_{TZ} użyto takiego samego wzoru, zmieniając odpowiednie zmienne na te odnoszące się do powierzchni terenów zieleni w mieście. W ramach dokonywanej analizy obliczono też wskaźnik sumaryczny, dodający powierzchnie zajmowane przez oba rodzaje użytkowania w stosunku do powierzchni ogólnej miasta – W_{OD+TZ} . Do obliczenia tego wskaźnika użyto wzoru:

$$W_{OD+TZ} = \frac{P_{OD} + P_{TZ}}{P} \times 100\%$$

gdzie:

P_{OD} – sumaryczna powierzchnia ogrodów działkowych,

P_{TZ} – sumaryczna powierzchnia terenów zielonych,

P – powierzchnia miasta.

Materiały służące opracowaniu wyników pozyskano z Okręgowych Zarządów Polskiego Związku Działkowców dla wybranych miast. Pozostałe dane pozyskano z Banku Danych Lokalnych (BDL). Uzyskane wyniki dla wszystkich miast zestawiono ze sobą i dokonano ich porównania. Następnie przeanalizowano je i porównano z dostępną literaturą z tego zakresu.

Wyniki badań

Wnioski skierowane do Okręgowych Zarządów Polskiego Związku Działkowców zawierały pytanie o liczbę ogrodów działkowych w każdym mieście, szacowaną liczbę ich użytkowników oraz o sumaryczną powierzchnię wszystkich Rodzinnych Ogrodów Działkowych (ROD) leżących w granicach administracyjnych miast. Z dwudziestu skierowanych wniosków otrzymano odpowiedź na dwanaście, jednak w przypadku dwóch z nich udzielone informacje okazały się niepełne, dlatego tych miast nie wzięto pod uwagę podczas opracowywania wyników. W celu porównania powierzchni ROD z powierzchnią terenów zieleni (TZ) oraz ogólną powierzchnią miasta sięgnięto po dane z Banku Danych Lokalnych. Dane te pobrano dla roku 2019 ze względu na pewność co do kompletności zbioru dla tego rocznika.

Do przeprowadzenia analizy i porównania wybrano miasta o różnej wielkości leżące w całej Polsce. Najmniejszymi miastami spośród wybranych są: Olsztyn i Koszalin, największymi: Warszawa oraz Szczecin (tabela 1). W każdym z tych miast, podobnie do powierzchni ogólnej, różnie kształtuje się powierzchnia ogrodów działkowych. Największą powierzchnią ROD charakteryzuje się Szczecin (1119,22 ha), a zaraz po nim Warszawa (1076 ha). Jest to o tyle fascynujące, że Warszawa jest miastem prawie dwukrotnie większym od Szczecina pod względem powierzchni oraz kilkakrotnie razy większa pod względem liczby ludności.

Tabela 1. Powierzchnia miast poddanych analizie i ich Rodzinnych Ogrodów Działkowych

Miasto	Powierzchnia ROD [ha]	Powierzchnia ogólna miasta [ha]
Olsztyn	209,8516	8833,00
Koszalin	241,9109	9834,00
Poznań	743,5333	26 191,00
Opole	209,6757	14 888,00
Częstochowa	344,3147	15 971,00
Lublin	388,1770	14 747,00
Warszawa	1076,0000	51 724,00
Białystok	250,0475	10 213,00
Rzeszów	220,0776	12 661,00
Szczecin	1119,2200	30 060,00

Źródło: opracowanie własne na podstawie danych z Okręgowych Zarządów Polskiego Związku Działkowców.

Zastosowane wskaźniki informują, jaki procent powierzchni miasta reprezentowany jest przez poszczególne badane formy zagospodarowania (ogrody działkowe oraz tereny zieleni). Pokazują również sumę powierzchni terenów zieleni i ROD w stosunku do powierzchni ogólnej miasta (tabela 2, wykres 1). Ze wskaźnika W_{OD} wynika, że największym udziałem ROD w powierzchni miasta charakteryzuje się Szczecin (3,71%), co nie budzi zdziwienia z racji największej sumarycznej powierzchni ROD wśród analizowanych jednostek. Drugi wynik osiągnął Poznań (2,84%), a za nim Lublin (2,63%). Najniższy wynik uzyskało Opole (1,41%). Różnica między największym a najmniejszym wynikiem wynosi 2,31 punktu procentowego.

Wskaźnik W_{TZ} pokazał, że największy udział terenów zieleni w ogólnej powierzchni miasta możemy spotkać w Rzeszowie (29,20%), Olsztynie (25,38%) oraz w Poznaniu (20,88%). Najmniejszym z tych miast jest Olsztyn, który reklamuje się również jako Ogród z Natury. Przy tak niewielkiej powierzchni i stosunkowo niedużej liczbie mieszkańców hasło to faktycznie może mieć uzasadnienie. Najmniejsze wyniki tego wskaźnika uzyskały: Opole, Koszalin i Częstochowa z wynikami odpowiednio: 6,15%, 6,72% oraz 7,55%.

Tabela 2. Powierzchnia terenów zieleni w miastach oraz wskaźniki WOD, WTZ oraz W_{OD+TZ}

Miasto	W_{OD}	Tereny zieleni ogółem pow. [ha]	W_{TZ}	Pow. ROD +TZ [ha]	W_{OD+TZ}
Olsztyn	2,38%	2241,72	25,38%	2451,572	27,75%
Koszalin	2,46%	661,26	6,72%	903,1709	9,18%
Poznań	2,84%	5467,82	20,88%	6211,353	23,72%
Opole	1,41%	915,44	6,15%	1125,116	7,56%
Częstochowa	2,16%	1205,70	7,55%	1550,015	9,71%
Lublin	2,63%	2158,13	14,63%	2546,307	17,27%
Warszawa	2,08%	8572,26	16,57%	9648,26	18,65%
Białystok	2,45%	1518,67	14,87%	1768,718	17,32%
Rzeszów	1,74%	3696,72	29,20%	3916,798	30,94%
Szczecin	3,72%	4238,48	14,10%	5357,7	17,82%

Źródło: opracowanie własne na podstawie obliczeń oraz danych z Banku Danych Lokalnych.

Wyniki uzyskane po obliczeniu ostatniego wskaźnika (W_{OD+TZ}) nie odbiegają zbyt-
nio od wyników wskaźnika poprzedniego. W tym przypadku czołówka i końcówka
stawki przedstawia się tak samo, z najwyższym wynikiem Rzeszowa (30,94 %) i naj-
niższym Opola (7,56 %). Pozostałe miasta wypadły podobnie w porównaniu do ze-
stawienia poprzedniego wskaźnika (tabela 2.). Zauważyć możemy również, że miasta
o największej powierzchni ogrodów działkowych (Szczecin i Warszawa) w przypadku
dwóch ostatnich wskaźników (W_{TZ} oraz W_{OD+TZ}) sytuują się w połowie stawki z wyni-
kami obu wskaźników na poziomie odpowiednio 14,87% i 17,32% dla Warszawy oraz

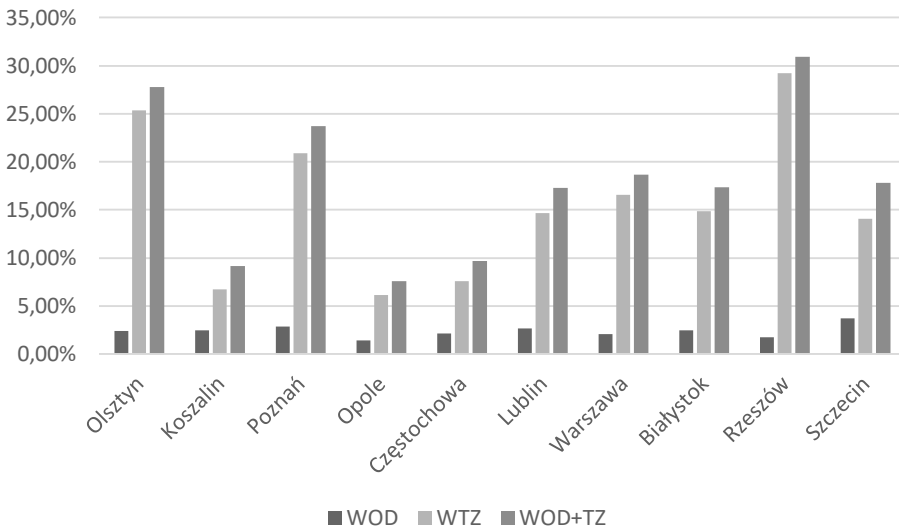
Tabela 3. Powierzchnia miast poddanych analizie i ich Rodzinnych Ogrodów Działkowych

Miasto	Udział powierzchni ogrodów działkowych w sumarycznej powierzchni terenów zielonych
Olsztyn	8,56%
Koszalin	26,78%
Poznań	11,97%
Opole	18,64%
Częstochowa	22,21%
Lublin	15,24%
Warszawa	11,15%
Białystok	14,14%
Rzeszów	5,62%
Szczecin	20,89%

Źródło: opracowanie własne.

14,10% i 17,82% dla Szczecina. Należy tu zauważyć, że miasta te mają również najwyższe wyniki powierzchni sumarycznej terenów zieleni (Warszawa 8572,26 ha, Poznań 5467,82 ha oraz Szczecin 4238,48 ha). Wyniki te jednak stają się niewielkie, jeśli porównamy je do miast o dużym wskaźniku W_{TZ} i ich powierzchni ogólnej.

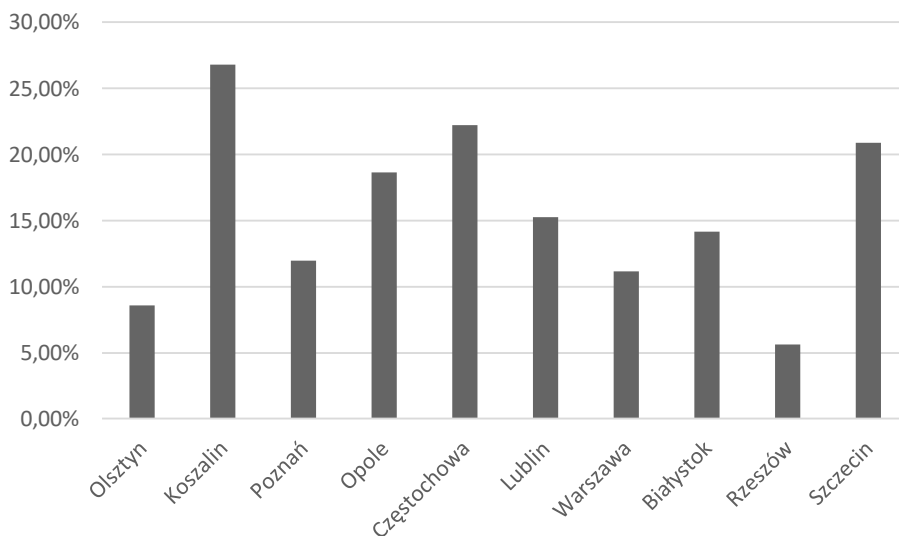
Wyniki przedstawione w tabeli 3 przedstawiają udział ogrodów działkowych w sumarycznej powierzchni terenów zieleni i ROD. Powstały procent obliczono jako udział powierzchni ROD w zsumowanej powierzchni ROD i terenów zieleni. Przedstawione wyniki pokazują, jak istotną rolę pełnią obszary zajmowane przez Rodzinne Ogrody Działkowe w całym systemie zieleni w miastach. Tutaj najwyższe wyniki uzyskały miasta, które osiągnęły najniższe wyniki wskaźnika W_{TZ} , czyli Koszalin (26,78%) oraz Częstochowa (22,21%). Natomiast najniższymi wynikami charakteryzują się miasta o najwyższym wskaźniku W_{TZ} , czyli Rzeszów (5,62%) oraz Olsztyn (8,56%).



Wykres 1. Wskaźniki W_{OD} , W_{TZ} oraz W_{OD+TZ} dla każdego z miast

Źródło: opracowanie własne.

Wykres 1 obrazuje wyniki wszystkich obliczonych wskaźników i pozwala od razu ocenić, które z miast osiąga najlepsze wyniki pod względem udziału analizowanych form użytkowania terenu w mieście w stosunku do ogólnej powierzchni miasta. Widać na nim dużą dominację trzech miast, którymi są: Rzeszów, Olsztyn i Poznań, oraz słabą sytuację Opola, Koszalina i Częstochowy. Natomiast wykres 2 obrazuje procentowy udział ROD w sumarycznej powierzchni ROD i TZ (tabela 3). Widać tu, jak ważną rolę w systemie zieleni miejskiej pełnią Rodzinne Ogrody Działkowe w każdym z analizowanych miast, a szczególnie w Koszalinie i Częstochowie.



Wykres 2. Procentowy udział powierzchni ROD sumarycznej powierzchni ROD i TZ

Źródło: opracowanie własne.

Dyskusja

Szacuje się, że Rodzinne Ogrody Działkowe są użytkowane przez 1 000 000 polskich rodzin, czyli blisko 3 600 000 osób. Ponadto pierwotna funkcja ogrodów działkowych uległa zmianie i nie są one już wykorzystywane jedynie w celach produkcji własnej żywności, a przede wszystkim dla wypoczynku i rekreacji (Szczepańska i in. 2016). Można stwierdzić, że straciły one swój pierwotny, dominujący status, jednak dalej grają ogromną rolę przyrodniczą i kulturową (Szczęsny i Kimic 2012).

Uzyskane wyniki pokazują, że ogrody działkowe nie pełnią tak samo istotnej funkcji w każdym z miast, dlatego sprawę tę trzeba rozpatrywać indywidualnie. Jednak jasne pozostaje, że dla każdego z miast, w którym się znajdują, realizują te same usługi ekosystemowe. Najważniejszymi z nich są wartości społeczno-kulturowe, takie jak kontakty towarzyskie, miejsce edukacji, zdrowy tryb życia (Pawlikowska-Piechotka 2009), oraz wartości ekosystemowe, czyli udział w cyklu hydrologicznym i biogeochemicznym, regulacja jakości powietrza oraz regulacja klimatu (Kronenberg i in. 2013). Wiadać, jak ważne zadanie w niektórych miastach pełnią ogrody działkowe, które obejmują spory odsetek obszarów zieleni. Świadczy to o dużym uzależnieniu systemu przyrodniczego miasta i całego ekosystemu miejskiego od funkcjonowania owych ogrodów.

Mimo częstego społecznego oporu dla funkcjonowania ROD oraz konieczności ich utrzymania (Kronenberg i in. 2013) możemy zauważyć, że ludzie bez dostępu do

takowych miejsc sami tworzą im podobne. Takie przykłady przytacza Gawryszewska (2018), pisząc o ogrodach wernakularnych. Według jej obserwacji społeczność potrafi stworzyć coś na wzór ROD na obszarach nieużytków miejskich. Świadczy to o zakorzenionej głęboko w człowieku potrzebie obcowania z naturą na co dzień.

Poza szeregiem usług ekosystemowych oraz społecznych, jakie są wpisane w ilość i obszar ROD w każdym mieście, najważniejsze są te służące zdrowiu psycho-fizycznemu mieszkańców i użytkowników oraz ogólna rola ogrodów działkowych w systemie przyrodniczym miasta. Mimo że ich znaczenie jest marginalizowane przez wiele osób, jednak są one ostoją przyrody i dopełnieniem ekosystemu miejskiego. Taki wniosek płynie również z analizy wyników badań. W większości miast ROD stanowią dopełnienie systemu zieleni miejskiej, tworząc po kilka lub kilkanaście procent ich wspólnej powierzchni. Jednak są ośrodki miejskie, w których pełnią one bardziej istotną funkcję i mogą być uznawane za trzon bioróżnorodności (Pawlikowska-Piechotka 2009).

Podsumowanie

Niestety mimo tego, że ogrodom działkowym przypisuje się rozmaite funkcje (Giedrych, Poniży 2013), a ich obszary pełnią szereg usług ekosystemowych dla środowiska (Kronenberg i in. 2013), to ciągle są one uzależnione od polityki wewnętrznej i obranych przez samorządy kierunków rozwoju (Giedrych, Poniży 2013). Należy zatem wypracować narzędzia prawne pozwalające chronić te cenne przyrodniczo obszary miejskie (Kronenberg i in. 2013).

Rozmawiając o istocie i funkcjach Rodzinnych Ogrodów Działkowych, nie da się pominąć faktu, że zmieniły one swój pierwotny charakter (Pawlikowska-Piechotka 2009) oraz stały się przede wszystkim miejscem rekreacji i wypoczynku mieszkańców. W obecnej sytuacji możemy zauważyć potrzebę człowieka, jaką jest obcowanie z naturą, i jest to widoczne wyraźniej niż kiedykolwiek wcześniej. Powodem jest sytuacja, w jakiej świat znajduje się od kilkunastu miesięcy, czyli pandemia wirusa ograniczająca dostęp do otwartych terenów rekreacyjnych. Taka sytuacja z pewnością miała wpływ na wartość materialną i ekonomiczną działek wchodzących w skład ROD.

Nie pozostawia wątpliwości fakt, że ogrody działkowe stanowią istotny element ekosystemu miasta, pełniąc role ostoji bioróżnorodności, korytarzy ekologicznych oraz siedliska życia wielu organizmów roślinnych i zwierzęcych. Naukowcy od wielu lat zastanawiają się, jak zwiększyć różnorodność biologiczną miast ze względu na nadmierne uszczelnianie powierzchni i degradację środowiska (Miszewski 2019). Istnieje wiele pomysłów i eksperymentów poruszających tę tematykę, takich jak wprowadzanie i zachowywanie tzw. nieużytków miejskich (Kleszcz 2017). Oczywiście każdy sposób na poprawę sytuacji ekosystemów miejskich jest dobry. Jednak podstawową zasadą powinno być zachowywanie istniejących terenów spełniających te kryteria, takich jak

ogrody działkowe, a nie przeznaczanie ich pod zabudowę mieszkaniową czy handlową, powodując tym samym uszczerpienie i tak ubogiego ekosystemu miast.

Bibliografia

- Gawryszewska B. 2018. *Zielona zmiana w krajobrazie miasta. Wernakularne ogrody miejskie jako konsekwencja przemian wizerunku, funkcji i znaczenia zieleni w przestrzeni publicznej*. Societas/Comunitas 2(26), s. 121–141
- Giedrych R., Poniży L. 2013. *Ogrody działkowe jako przedmiot polityki przestrzennej i ekologicznej miast na przykładzie Warszawy i Poznania*. Przegląd Komunalny nr8/2013, s. 48–52
- Kleszcz J. 2017. *Wykorzystanie nieużytków mniejszych jako przestrzeni międzygatunkowych – analiza efektów wprowadzenia*. Budownictwo i Architektura 16(2), s. 39–52
- Kronenberg J. 2012. *Usługi ekosystemów w miastach. Zrównoważony rozwój – zastosowania nr. 3*, s. 13–28
- Kronenberg J., Bergier T., Lisicki P. 2013. *Usługi ekosystemów w praktyce a ogrody działkowe*. Przegląd Komunalny nr8/2013, s. 53–56
- Miszewski F. 2019. *Wpływ zieleni miejskiej na podniesienie komfortu życia w mieście. Uwarunkowania budowy biogospodarki i zrównoważonego rozwoju w Polsce*, s. 145–153
- Miszewski F. 2020. *Bioróżnorodność – świadome zarządzanie przestrzeni*. Nowoczesne rozwiązania proekologiczne w naukach zootechnicznych, weterynaryjnych, rolniczych i technicznych, s. 276–285
- Pawlikowska-Piechotka A. 2009. *Ogrody działkowe w rozwoju zrównoważonym współczesnego miasta*. Problemy ekologii, ol. 13, nr 2, s. 106–109
- Szczepańska M., Krzyżaniak M., Świerk D., Urbański P. 2016. *Rodzinne ogrody działkowe jako element zielonej infrastruktury na terenie Aglomeracji Poznańskiej*. Studia Miejskie, t. 22, s. 129–142
- Szczęsny M., Kimic K. 2012. *Możliwości adaptacji terenów ogrodów działkowych na obiekty ogólnodostępne na przykładzie Rodzinnego Ogrodu Działkowego przy Kanale Goławskim w Warszawie*. Czasopismo Techniczne Architektura, 8-A 2012 zeszyt 30, s. 179–185
- Wodzińska D. 2015. *Rozwój systemu zieleni miejskiej w Głogowie*. Ecological Engineering. vol. 43, s. 15–22
- Wolaniuk A. 1991. *Ogrody działkowe Łodzi jako teren wypoczynku mieszkańców miasta*. Turyzm 1991, z. 1, s. 31–53

Abstract

ALLOTMENT GARDENS AS A CRUCIAL ELEMENT OF THE URBAN ECOSYSTEM

The natural space of the city is incredibly diverse in terms of functionality, territorial and biological. The natural and biological life of the city, forms one large ecosystem that functions in

various ways in very tough conditions. Every day it is subjected to enormous influences against a anthropopressure background. That is why every element of urban greenery systems, which significantly affect the psychophysical comfort of the city's inhabitants, is important. This article is devoted to the analysis of one of the components of the urban green system, which is often overlooked and neglected, and is an important task in the environmental and social context. The main aim of the research was to determine the share of allotment gardens in the area of the analyzed cities in order to show what scale they cover in relation to other forms of greenery. It turned out that allotment gardens occupy the largest percentage of the city's area in Szczecin and Poznań. However, when it comes to their share in the total area of green areas and allotment gardens, the highest results were achieved by Koszalin, Częstochowa and Szczecin.

Słowa kluczowe: ogrody działkowe, ekologia miasta, systemy zieleni miejskiej, tereny zieleni, ekosystem miejski

Keywords: allotment gardens, municipal ecology, urban green systems, green areas, urban ecosystem

Kinga Pałatyńska

Bartłomiej Wysoczański

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt

Studenckie Koło Naukowe Genetyki „Diversitas”

Opiekunowie: dr hab. Beata Myśków, prof. ZUT, dr inż. Magdalena Górska

ANALIZA GENU PAO1 ŻYTA – POSZUKIWANIE MARKERÓW PCR-SCAR I USTALENIE LOKALIZACJI NA MAPIE GENETYCZNEJ

Wstęp

Mimo gwałtownie zmieniających się w ostatnich latach potrzeb konsumenckich zboża, do których zaliczane jest między innymi żyto (*Secale cereale* L.), wciąż cieszą się wysokim popytem. W przypadku tej konkretnej rośliny przyczynia się do tego niezwykle szerokie zastosowanie, istotne szczególnie w przemyśle spożywczym. Szacuje się, że w 2019 roku, w samej Europie zebrano ponad jedenaście milionów ton ziarna (FAOSTAT 2019, www.fao.org/faostat). Poza zainteresowaniem ze strony sektora spożywczego, dostrzeżono również genetyczny potencjał żyta. Ze względu na wyjątkową wytrzymałość na stresy, takie jak: wahania temperatur, zasolenie czy też nieprzeciętna odporność na szkodniki (Nowosad i in. 2018), żyto jest chętnie wykorzystywane w hodowlach jako donor genów odpowiedzialnych za powyższe zalety (Crespo-Herrera i in. 2017). Z powodu tak szerokiej skali użytkowej pojawia się potrzeba dokładnego zbadania tego zboża, a gwałtowny rozwój genetyki, biologii molekularnej i bioinformatyki znacząco ułatwia ten proces.

W pracy podjęto próbę poszerzenia obecnej wiedzy na temat genetyki żyta dzięki zlokalizowaniu na mapie genetycznej genu PAO1, powiązanego ze stresami roślinnymi. Wiedza ta w przyszłości może poszerzyć znajomość procesów odpornościowych roślin, tym samym przyczyniając się do wyhodowania odmian o pożądanym gospodarczo cechach.

Cel

Celem pracy było zebranie informacji na temat genu oksydazy poliaminowej (PAO1) poprzez ulokowanie jego markera na mapie genetycznej żyta. Do tej pory gen ten został dokładnie opisany u niewielu roślin, między innymi u rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) (Sagor i in. 2016), jednak sekwencje pochodzące z bazy transkryptów żyta sugerują, że u *Secale cereale* L. mamy do czynienia z ortologiem genu PAO1.

Materiał i metody

Materiał roślinny – linie wsobne

Wstępne badania prowadzono na dwunastu liniach wsobnych *Secale cereale* L., o różnym pochodzeniu. Wykorzystany materiał jest własnością Katedry Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin (KGHiBR) z Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Wymienione linie stanowią pary rodzicielskie populacji mapujących, używanych do dalszych badań. W kolejnych etapach skupiono się na dwóch parach linii wykazujących polimorfizm przy użyciu zaprojektowanych starterów tworzących populacje mapujące opisane w literaturze (Milczarski i in. 2011; Bienias i in. 2020) exhibiting unique features such as outstanding resistance to biotic and abiotic stresses and high nutrient use efficiency. This species presents a challenge to geneticists and breeders due to its large genome containing a high proportion of repetitive sequences, self incompatibility, severe inbreeding depression and tissue culture recalcitrance. The genomic resources currently available for rye are underdeveloped in comparison with other crops of similar economic importance. The aim of this study was to create a highly saturated, multilocus linkage map of rye via consensus mapping, based on Diversity Arrays Technology (DARt):

- 541 i Ot1-3 – stanowiące materiał wyjściowy populacji RIL-K
- S32N/07 i RXL10bw – stanowiące materiał wyjściowy populacji BSR.

Materiał roślinny – populacja mapująca

W kolejnych etapach pracy wykorzystano DNA 92 genotypów populacji mapującej 541 × Ot1-3 (RIL-K), które stanowiły ekstrakty z liści roślin pokolenia S8 populacji rekombinacyjnych linii wsobnych oraz 92 genotypy populacji mapującej S32N/07 × RXL10 (BSR) pokolenia F₂.

Izolacja genomowego DNA z linii wsobnych

Proces izolacji genomowego DNA został przeprowadzony z użyciem zestawu A&A Biotechnology Genomic Mini AX Plant. W każdej z dwunastu odpowiednio oznaczonych próbek umieszczono około 100 mg wcześniej przygotowanego zamrożonego materiału roślinnego. Następnie materiał rozdrobniono za pomocą metalowych kulek przy użyciu wytrząsarki TissueLyser II firmy QIAGEN. Ostatecznie, dzięki wykonanym etapom, w próbkach zawieszono było genomowe DNA linii wsobnych żyta. Tak wykonane próby przechowywane były w temperaturze -20°C. Po izolacji oceniono czystość oraz stężenie DNA za pomocą mikroplótkowego spektrofotometru Epoch firmy BioTek®, który dokonuje pomiaru absorbancji światła UV przy długościach fali 260 i 280 nm. Stosunek tych dwóch wartości określa czystość DNA, a pomiar przy długości fali 260 nm umożliwia obliczenie jego stężenia w danej próbce. Oznaczone próby następnie wystandaryzowano do stężenia DNA 10 ng/μl.

Projektowanie starterów

Startery użyte w doświadczeniu zaprojektowano w oparciu o sekwencję kontigu (c74271_g1_i1) o długości 1848 par zasad. W bazie transkryptów żyta, skąd brana była powyższa sekwencja, znajdowały się adnotacje mówiące między innymi o znalezionych homologach wśród innych baz, w tym odniesienie do bazy danych TAIR (ang. *The Arabidopsis Information Resource*). W celu przeprowadzenia dalszych badań zaprojektowano startery za pomocą programu Primer-BLAST (Primer-BLAST, www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast), oraz sprawdzono poprawność ich wykonania dzięki programowi Multiple Primer Analyzer (www.thermofischer.com). Utworzone startery nazwano cR142L oraz cR142R, gdzie pierwsza litera odnosi się do angielskiego tłumaczenia słowa kontig (ang. *contig*), a druga – linii wsobnej, z której pochodził transkrypt, czyli RXL10. Szczegóły dotyczące utworzonych starterów zawarto w tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka pary starterów wykorzystanych w doświadczeniu

Nazwa startera	Sekwencja 5' → 3'	T _m [°C]	CG [%]	Pozycja start	Oczekiwana długość produktu [pz]	Długość startera [pz]
cR142L	CTTCAAAGTCCGTCCCAAGT	63,4	50	1530	97	20
cR142R	TTGACGATGCGAGGATACTG	64,3	50	1626		20

T_m – temperatura topnienia, pz – pary zasad

Łańcuchowa reakcja polimerazy

Skład mieszaniny reakcyjnej wykorzystywany w przebiegu łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) został przedstawiony w tabeli 2. Do sporządzenia jej korzystano z zestawu GoTaq[®] G2 Flexi DNA Polymerase firmy Promega.

Tabela 2. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR dla pojedynczej próby

Element składowy	Ilość [μl]
Woda destylowana	11,5
Bufor 5× GoTaq Flexi	4
MgCl ₂	0,8
dNTP	1
Starter 1 – cR142L	0,8
Starter 2 – cR142R	0,8
Polimeraza GoTaq	0,15
DNA	1

Amplifikacja kwasów nukleinowych została przeprowadzona w termocyklerze T100[™] Thermal Cycler firmy Bio-Rad. Ustalony profil reakcji (tabela 3) wykorzystywał technikę Touchdown (TD) PCR, która oparta jest na zmieniającej się temperaturze przyłączania starterów (anilingu) w coraz to kolejnych cyklach zachodzącej reakcji.

Tabela 3. Ustalony profil reakcji PCR z zastosowaniem techniki Touchdown

Etap	Temperatura [°C]	Czas trwania [min]
Wstępna denaturacja	95	3:00
Denaturacja	95	0:30
Aniling	62-52	0:30
Elongacja	72	1:00

Rozdział elektroforetyczny

Do przeprowadzenia doświadczenia wykorzystano 2% żel agarozowy. Przygotowane żełe zostały wprowadzone do aparatu przeprowadzającego elektroforezę (PowerPac[™] 300, Bio-Rad) z zachowaniem kierunku rozdziału. Zastosowano następujące parametry: napięcie 100 V (odpowiednio 10 V na każdy 1 cm rozdziału), natężenie prądu: 400 mA, czas trwania rozdziału ampikonów wynosił 90 minut. W celu uwidocznienia produktów amplifikacji zastosowano barwienie żeli agarozowych przy pomocy bromku etydyny o stężeniu 0,5 μg/ml przez 15 minut i naświetlanie światłem UV.

Mapowanie genetyczne

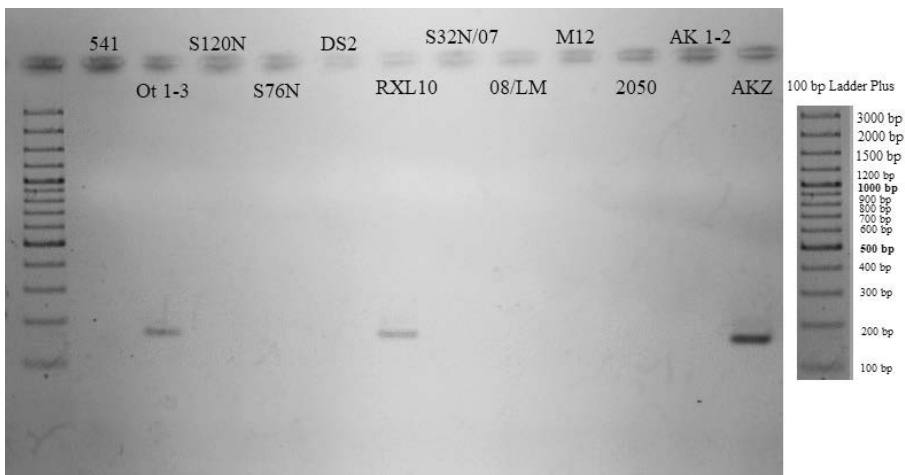
Po przeprowadzeniu rozdziałów i uwidocznieniu produktów amplifikacji z zastosowaniem starterów cR142L i cR142R na liniach wsobnych oraz populacjach mapujących możliwe było mapowanie genetyczne. Pierwszym etapem była ocena segregacji alleli badanego *locus*, czyli przypisanie odpowiedniego genotypu poszczególnym osobnikom populacji mapującej. W populacji RIL-K oczekiwane były osobniki homozygotyczne, wykazujące jeden z genotypów rodziców, z kolei w populacji BSR dodatkowo można było spodziewać się heterozygot. Analiza prążków odbywała się na podstawie ich długości, przez porównanie każdego z nich do pozycji prążków rodziców (linii 541 i Ot1-3). W przypadku wystąpienia heterozygot odczyt jest analogiczny, jednak występują dwa prążki reprezentujące allele obu rodziców. Homozygotę typu 541 oznaczano symbolem A, homozygotę typu Ot1-3 oznaczano jako B, zaś heterozygotom, które występować mogą na przykład w populacjach F_2 , przypisuje się symbol H.

Po określeniu genotypu każdego osobnika z populacji dane te zostały wprowadzone do plików z segregacjami innych markerów przypisanych do poszczególnych grup sprzężeń na podstawie danych literaturowych (Milczarski i in. 2011) exhibiting unique features such as outstanding resistance to biotic and abiotic stresses and high nutrient use efficiency. This species presents a challenge to geneticists and breeders due to its large genome containing a high proportion of repetitive sequences, self incompatibility, severe inbreeding depression and tissue culture recalcitrance. The genomic resources currently available for rye are underdeveloped in comparison with other crops of similar economic importance. The aim of this study was to create a highly saturated, multilocus linkage map of rye via consensus mapping, based on Diversity Arrays Technology (DARt. Program JoinMap® 5 firmy Kyazma, umożliwia analizę danych i na podstawie działań statystyczno-matematycznych dopasowuje otrzymany marker do odpowiedniej grupy sprzężeń i wskazuje jego położenie na jednym z chromosomów *Secale cereale*. Podczas mapowania genu PAO1 ustalono rozpatrywane wartości LOD w granicach od 3 do 20. Po etapie analizy sprzężeń i wskazaniu chromosomu, na którym zlokalizowany jest badany marker, następuje etap mapowania. Mapowania dokonano za pomocą algorytmu mapowania regresyjnego (RM, ang. *Regression mapping*), który pozwala na ukazanie pełnej mapy. Wyniki przeprowadzenia tego procesu zostały ukazane w formie graficznej, obrazującej położenie markera PAO1 na siódmym chromosomie wraz z grupą sąsiadujących markerów oraz markerów flankujących.

Wyniki

Segregacja próbna markera cR142 na liniach wsobnych

W celu znalezienia różnic pomiędzy parami rodzicielskimi startery cR142L oraz cR142R były testowane na liniach wsobnych żyta. Miało to na celu ocenę potencjalnej przydatności starterów w kolejnych etapach doświadczenia, a w przypadku powodzenia, także wybranie populacji do dalszej pracy. W pierwszym etapie uzyskano rozdział widniejący na rysunku 1, przedstawiający oczekiwane produkty w parze 541 i Ot1-3, RXL10 i S32N/07 oraz AK1-2 i AKZ. Na podstawie poniższych wyników można ustalić, że powstały marker jest typu dominującego ze względu na brak produktu u jednego z rodziców. Uzyskane amplikony miały długość około 180 pz, a do dalszych badań wybrano odpowiednio populację RIL-K, utworzoną dzięki liniom rodzicielskim 541 oraz Ot1-3, i BSR, utworzoną dzięki S32N/07 i RXL10.



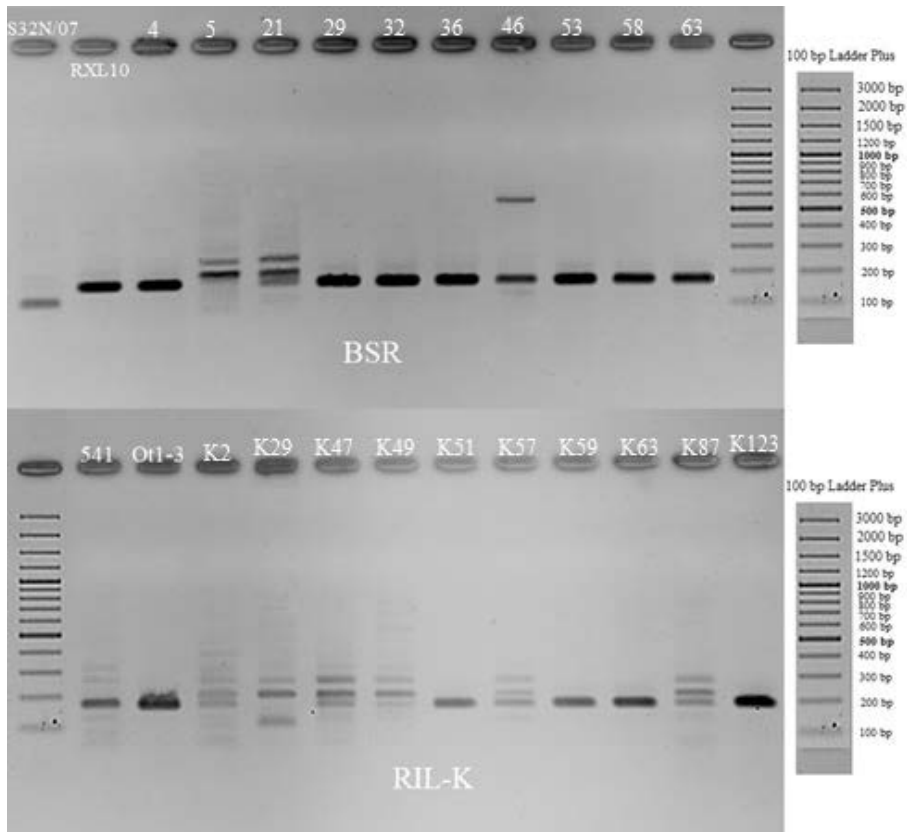
Rysunek 1. Wynik rozdziału elektroforetycznego produktów amplifikacji DNA linii wsobnych żyta z zastosowaniem starterów cR142L i cR142R

Źródło: opracowanie własne.

Segregacja próbna markera cR142 na fragmencie populacji

W celu wykazania, czy marker odpowiednio segreguje osobniki w wybranych populacjach, poza wyżej wspomnianymi liniami rodzicielskimi, użyto dziesięciu osobników populacji mapującej BSR oraz RIL-K. Podjęto dwie próby tego zabiegu. W wyniku optymalizacji procesu uzyskano produkty amplifikacji u wszystkich osobników różniące

się długością linii rodzicielskich, co wskazuje, że uzyskany marker jest typu kodominującego. W przypadku próby na populacji BSR uzyskano różnicę długości produktu na liniach rodzicielskich, jednakże zależność ta zdaje się nie być potwierdzona na fragmencie populacji mapującej. Z kolei na liniach rodzicielskich populacji RIL-K zaobserwowano nieznaczną różnicę długości produktów, natomiast były one zdecydowanie bardziej widoczne na fragmencie populacji mapującej. Ze względu na obciążające wyniki rozdziału zdecydowano się przeprowadzić testy powyższych markerów na populacjach mapujących BSR i RIL-K.

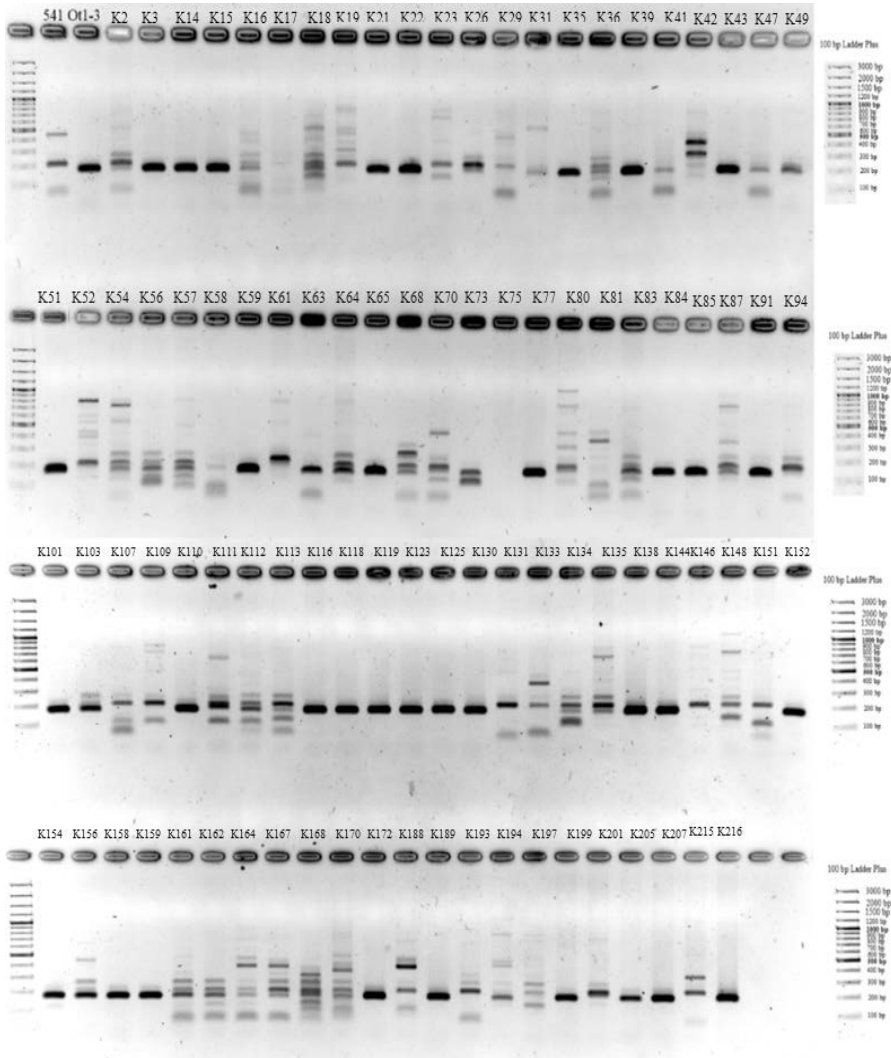


Rysunek 2. Wynik poprawionego rozdziału elektroforetycznego produktów amplifikacji DNA z zastosowaniem starterów cR142L i cR142R fragmentu populacji BSR i RIL-K

Źródło: opracowanie własne.

Test starterów cR142 na populacji mapującej

W celu potwierdzenia różnic w populacji wybrane startery przetestowano na populacjach mapujących BSR oraz RIL-K (rysunek 3). W oparciu o poprzednie oraz kolejne wyniki zastosowano optymalizację parametrów amplifikacji, stosując zakres temperatur 63°C → 53°C dla populacji mapującej BSR oraz 61°C → 51°C dla RIL-K z zachowa-



Rysunek 3. Wynik rozdzielania elektroforetycznego produktów amplifikacji DNA populacji mapującej RIL-K z zastosowaniem starterów cR142L i cR142R

Źródło: opracowanie własne.

niem wydłużenia cykli do 40 dla obu z nich. Dla populacji BSR nie wykazano różnic między osobnikami linii rodzicielskich, co dało potwierdzenie wśród populacji mapującej BSR, gdzie sytuacja jest analogiczna. Poprzednie wyniki na liniach wsobnych mogły być spowodowane między innymi błędem na jednym z etapów prowadzących do uzyskania wizualizacji wyników. Na populacji mapującej widać jednak, że produkt jest bardzo silny, co może wskazywać na amplifikację dwóch fragmentów z różnych miejsc w genomie, a to z kolei może sugerować duplikację w obszarze występowania genu *PAO1*. Warto również zaznaczyć, że otrzymane produkty są podobnej długości do tych, które otrzymano dla populacji RIL-K. Z kolei w populacji RIL-K zaobserwowano polimorfizm długości i występuje on zarówno między liniami rodzicielskimi, jak i osobnikami populacji mapującej, co kwalifikuje ten marker do poddania go mapowaniu genetycznemu.

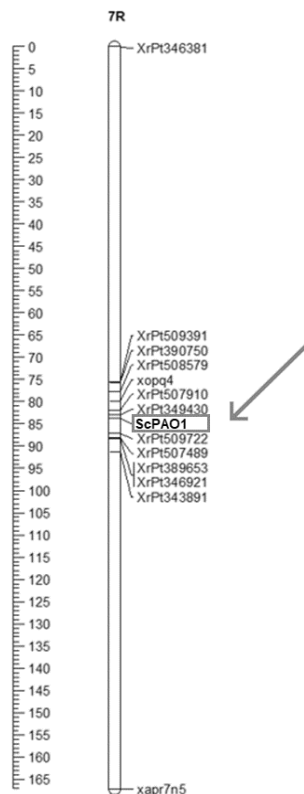
Segregacja markera cR142 w populacji RIL-K

W celu oceny segregacji utworzonego markera należało scharakteryzować osobniki populacji mapującej pod kątem genotypu pasującego do rodzica A – 541 lub rodzica B – Ot1-3. Osobniki z niepewnym wynikiem pominięto. Uzyskany wynik testu Chi-kwadrat ($\chi^2_{\text{obliczone}} > \chi^2_{\text{teoretyczne}}$) świadczy o tym, że badany gen nie dziedziczy się jednogenowo. Po obliczeniu segregacji na podstawie rozdziału elektroforetycznego odpowiednio 32% osobników uzyskało genotyp rodzica A, 52% osobników – rodzica B, a 16% produktów nie kwalifikowało się do zaliczenia do którejkolwiek z grup ze względu na niewyraźny obraz głównego produktu. Przyczyną braku potwierdzenia jednogenowego dziedziczenia może być dyskwalifikacja osobników mogących być identycznymi genotypowo z rodzicem 541 lub zbyt mała pula ocenionych osobników w populacji mapującej.

Mapowanie genetyczne

Uzyskane dane dotyczące segregacji markera ScPAO1 w populacji RIL-K zostały umieszczone w programie JoinMap® 5, w którym to znajdowały się dane dotyczące lokalizacji markerów z innych badań (Milczarski i in. 2011; Bienias i in. 2020) exhibiting unique features such as outstanding resistance to biotic and abiotic stresses and high nutrient use efficiency. This species presents a challenge to geneticists and breeders due to its large genome containing a high proportion of repetitive sequences, self incompatibility, severe inbreeding depression and tissue culture recalcitrance. The genomic resources currently available for rye are underdeveloped in comparison with other crops of similar economic importance. The aim of this study was to create a highly saturated, multilocus linkage map of rye via consensus mapping, based on Diversity Arrays Technology (DArT). Dzięki zawartym informacjom marker genu ScPAO1 został przypisany do grupy sprzężeń chromosomu siódmego, a prawidłowość tego procesu

potwierdza wartość $LOD = 5$. Mapowanie zostało wykonane dzięki algorytmowi Regression Mapping, co ulokowało marker na 60. pozycji w odległości 83,657 cM względem pierwszego markera na mapie. Cała mapa chromosomu utworzona przy pomocy tego algorytmu miała długość 167,348 cM oraz zawierała 152 markery, głównie DArT (Milczarski i in. 2011) exhibiting unique features such as outstanding resistance to biotic and abiotic stresses and high nutrient use efficiency. This species presents a challenge to geneticists and breeders due to its large genome containing a high proportion of repetitive sequences, self incompatibility, severe inbreeding depression and tissue culture recalcitrance. The genomic resources currently available for rye are underdeveloped in comparison with other crops of similar economic importance. The aim of this study was to create a highly saturated, multilocus linkage map of rye via consensus mapping, based on Diversity Arrays Technology (DArT. Markerem najbliższym sprzężonym z cR142 był XrPt349430. Na rysunku 4 przedstawiono położenie markera ScPAO1 względem sąsiadujących markerów.



Rysunek 4. Położenie ScPAO1 na chromosomie siódmym żyta

Źródło: opracowanie własne.

Sekwencja cDNA genu ScPAO1

Transkrypt c74271_g1_i1, który został wykorzystany do zaprojektowania starterów oraz uzyskania markera genu ScPAO1, miał długość 1848 par zasad. Ze względu na miejsce zaprojektowanych starterów spodziewany produkt amplifikacji powinien mieć długość 97 pz. Przybliżona długość amplikonu, uzyskanego dzięki zastosowaniu zaprojektowanych starterów na populacjach RIL-K i BSR, wynosi 180–200 pz. Różnica między oczekiwaną a rzeczywistą długością fragmentu wskazuje najprawdopodobniej na obecność intronu o długości około 100 pz w genomowej sekwencji genu ScPAO1.

Do analizy transkryptu użyto narzędzia BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*) dostępnego w bazie NCBI. Wykorzystuje ono algorytmy matematyczne dopasowujące wprowadzaną przez użytkownika sekwencję do tych, które znajdują się w biologicznych bazach badanych, a tworzone dopasowania są oparte na podstawie analizy ciągu takich samych nukleotydów (Altschul i in. 1990) basic local alignment search tool (BLAST). Narzędzie to umożliwia wiele różnych analiz, na przykład za pomocą Primer-BLAST, co pozwala na zaprojektowanie starterów PCR na podstawie wprowadzonej sekwencji. Funkcja ta została wykorzystana do utworzenia starterów cR142L i cR142R, użytych w niniejszej pracy.

Analiza homologii sekwencji cDNA z użyciem BLAST wykazała znaczne podobieństwo z sekwencjami u innych gatunków roślin, takich jak: pszenica płaskurka (*Triticum dicoccoides*), kozieniec (*Aegilops tauschii* subsp. *tauschii*) czy też jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*), które są blisko spokrewnione z żytem, co wykazała analiza transkryptu z użyciem BLAST Tree View. użytą metodą analizy był algorytm Fast Minimum Evolution przy zachowaniu maksymalnej różnicy sekwencji na poziomie 0,75. Dzięki danym zaprezentowanym przez program wywnioskować można, że wprowadzony transkrypt wykazuje najbliższe podobieństwo z mRNA pszenicy płaskurki, znajdując się także filogenetycznie blisko z gatunkami takimi, jak: jęczmień zwyczajny oraz kozieniec. Najwyższy wynik osiągnięto z sekwencją mRNA należącą do *Aegilops tauschii* subsp. *tauschii* na poziomie 96,29%. Dwie sekwencje mRNA pszenicy płaskurki były odpowiednio identyczne w 95,13% i 94,18% z sekwencją żytnią, a sekwencje mRNA jęczmienia zwyczajnego w 93,29% oraz 93,45%.

Dyskusja

Do tej pory nie były prowadzone żadne prace dotyczące żytniego genu PAO1. Tym samym nie był on dotychczas zlokalizowany w genomie *Secale cereale*. Dzięki przeszukaniu bazy danych transkryptomicznych żyta, będących w posiadaniu KGHIBR, odszukano sekwencję cDNA o długości 1848 pz, która na podstawie analizy ontologicznej (GO) wykazywała homologię do genu PAO1 rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*).

Ze względu na istotną funkcję genu PAO1 w odpowiedzi na warunki stresowe roślin badacze podejmowali się badań molekularnych i biochemicznych tego genu u innych roślin, zwłaszcza modelowych, takich jak: kukurydza (*Zea mays*) (Xue i in., 2009) czy rzodkiewnik pospolity, u którego PAO1 znajduje się na piątym chromosomie (Tavladoraki i in. 2006)spermidine (Spd).

Ze względu na brak badań w tym zakresie, podczas tego doświadczenia przeprowadzono próbę ulokowania genu PAO1 na mapie genetycznej żyta. Mapowanie zostało przeprowadzone na 92 osobnikach populacji RIL-K. Wybór populacji mapującej podyktowany był polimorfizmem między liniami 541 i Ot1-3 uzyskanym w teście na 12 liniach wsobnych żyta. Polimorfizmy wykryto także między komponentami rodzicielskimi populacji BSR, lecz ze względu na niepowodzenie w wykryciu różnic między osobnikami populacji mapującej BSR, na co mogło wpłynąć wiele czynników, w tym nieprawidłowość wykonania testu starterów na liniach wsobnych, informacje te nie mogły zostać użyte podczas mapowania genu PAO1. W populacji mapującej RIL-K osiągnięto stosunek genotypów odbiegający od oczekiwanej wartości, co prawdopodobnie ma związek z dużą liczbą nieokreślonych genotypowo osobników.

Mimo statystycznie istotnych odchyień segregacji markera od modelu jednogennego typowego dla populacji RIL (1:1) zdecydowano się na przeprowadzenie procesu mapowania. Taka praktyka jest dość często stosowana w pracach zmierzających do konstrukcji map genetycznych (Milczarski i in. 2011) exhibiting unique features such as outstanding resistance to biotic and abiotic stresses and high nutrient use efficiency. This species presents a challenge to geneticists and breeders due to its large genome containing a high proportion of repetitive sequences, self incompatibility, severe inbreeding depression and tissue culture recalcitrance. The genomic resources currently available for rye are underdeveloped in comparison with other crops of similar economic importance. The aim of this study was to create a highly saturated, multilocus linkage map of rye via consensus mapping, based on Diversity Arrays Technology (DArT). Uzyskane wyniki doświadczenia pozwoliły na umieszczenie markera genu ScPAO1 na siódmym chromosomie w pozycji 60 i odległości 83,567 cM względem pierwszego zmapowanego markera na tej mapie genetycznej, co pozwoliło na wzbogacenie mapy referencyjnej tej rośliny o ważny marker funkcjonalny.

Lokalizowanie genów z użyciem markerów SCAR jest powszechnie stosowaną techniką, szczególnie jako zwiększenie użyteczności markerów RAPD (Milczarski i in. 2011; Kadkhodaei i in. 2012) it is necessary to identify resistance genes in different germplasm and combine them in (a. W przypadku genomów roślin, które zostały poddane sekwencjonowaniu, istnieje prawdopodobieństwo znalezienia homologów różnych genów u innych gatunków, co ułatwia zaprojektowanie odpowiednich starterów i lokalizację szukanego genu, tak jak miało to miejsce w tym doświadczeniu. Prace o podobnym schemacie przeprowadzono z powodzeniem w celu zlokalizowania genu ScGAMYB na mapie genetycznej żyta (Górska i in. 2020) random forest and extreme gradient boosted trees (XGBoost).

Wnioski

Na podstawie powyższej pracy można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Marker cR142 umożliwił wykrycie obecności genu ScPAO1 w trzech z 12 badanych linii żyta. Ten wynik wskazuje na obecność co najmniej dwóch wariantów allelicznych genu ScPAO1.
2. Dzięki wykrytemu polimorfizmowi można uznać marker cR142 za przydatny w dalszych pracach związanych z mapowaniem genetycznym i analizą molekularną genu ScPAO1 w innych populacjach mapujących i w szerszym materiale w ramach gatunku *S. cereale*.
3. Gen ScPAO1 jest zlokalizowany na chromosomie siódmym żyta (7R).
4. Różnica długości produktu amplifikacji DNA genomowego przy zastosowaniu starterów cR142 w odniesieniu do sekwencji transkryptu jest związana z obecnością przynajmniej jednego intronu w sekwencji genu ScPAO1.

Bibliografia

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410.
- Bienias A., Górska M., Masojć P., Milczarski P., Myśków B. 2020. The GAMYB gene in rye: Sequence, polymorphisms, map location, allele-specific markers, and relationship with α -amylase activity. *BMC Genomics*, 21(1), 1–15.
- Crespo-Herrera L. A., Garkava-Gustavsson L., Åhman I. 2017. A systematic review of rye (*Secale cereale* L.) as a source of resistance to pathogens and pests in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Hereditas*, 154, 14.
- Food and Agriculture Organisation Corporate Statistical Database. www.fao.org/faostat/en/#data/QC (dostęp: 30 grudnia 2020 r.)
- Górska M., Bińkowski J., Lenarczyk N., Bienias A., Grądzielewska A., Czyczyło-Mysza I., Kapłoniak K., Stojalowski S., Myśków B. 2020. How machine learning methods helped find putative rye wax genes among GBS data. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 1–23.
- Kadkhodaei M., Dadkhodaie A., Assad M.T., Heidari B., Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R. 2012. Identification of the leaf rust resistance genes Lr9, Lr26, Lr28, Lr34, and Lr35 in a collection of Iranian wheat genotypes using STS and SCAR markers. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 15(4), 267–274.
- Milczarski P., Bolibok-Bragoszewska H., Myśków B., Stojalowski S., Heller-Uszyńska K., Górska M., Bragoszewski P., Uszyński G., Kilian A., Rakoczy-Trojanowska M. 2011. A high density consensus map of Rye (*Secale cereale* L.) based on dart markers. *PLoS ONE*, 6(12).
- National Center for Biotechnology Information, Primer-BLAST <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (dostęp 8 stycznia 2021 r.)
- Nowosad K., Łącka A., Bocianowski J. 2018. Charakterystyka mieszańców F_2 żyta ozimego (*Secale cereale* L.) Pod względem wybranych cech ilościowych. *Fragmenta Agronomica*, 35(2), 71–78.

- Sagor G. H. M., Zhang S., Kojima S., Simm S., Berberich T., Kusano T. 2016. Reducing cytoplasmic polyamine oxidase activity in *Arabidopsis* increases salt and drought tolerance by reducing reactive oxygen species production and increasing defense gene expression. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–16.
- Tavladoraki P., Rossi M.N., Saccuti G., Perez-Amador M.A., Polticelli F., Angelini R., Federico R. 2006. Heterologous expression and biochemical characterization of a polyamine oxidase from *Arabidopsis* involved in polyamine back conversion. *Plant Physiology*, 141(4), 1519–1532.
- Xue B., Zhang A., Jiang M. 2009. Involvement of polyamine oxidase in abscisic acid-induced cytosolic antioxidant defense in leaves of maize. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51(3), 225–234.

Abstract

ANALYSIS OF THE RYE *PAO1* GENE – SEARCHING FOR PCR-SCAR MARKERS AND DETERMINATION THE LOCATION ON THE GENETIC MAP

Rye (*Secale cereale* L.) is one of the most important crops on the planet. For this reason, the detailed development of a genetic map of this plant can lead to a number of benefits. The result of this work is localization of the PCR-SCAR marker of the *PAO1* gene involved in plant stress responses. This operation was possible by finding the homolog of the *Arabidopsis thaliana* *PAO1* gene in the rye transcript database. Primers designed for this sequence were tested for polymorphism on 12 inbred lines. Obtained results revealed genotypic differences between parental lines 521 and Ot1-3 from the RIL-K mapping population, on which further tests were carried out. The results of the obtained segregation were entered into the JoinMap® 5 program, which made it possible to locate the ScPAO1 marker on the seventh rye chromosome, at the 60th position, on the length 83.567 cM (Milczarski i in. 2011) exhibiting unique features such as outstanding resistance to biotic and abiotic stresses and high nutrient use efficiency. This species presents a challenge to geneticists and breeders due to its large genome containing a high proportion of repetitive sequences, self incompatibility, severe inbreeding depression and tissue culture recalcitrance. The genomic resources currently available for rye are underdeveloped in comparison with other crops of similar economic importance. The aim of this study was to create a highly saturated, multilocus linkage map of rye via consensus mapping, based on Diversity Arrays Technology (DArT).

Słowa kluczowe: żyto, markery SCAR, *PAO1*, stresy roślinne, mapa genetyczna

Keywords: rye, SCAR markers, *PAO1*, plant stresses, genetic map

**SEKCJA NAUK
TECHNICZNYCH**

Paulina Biała

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Studenckie Koło Naukowe Geodetów

BUDOWA MODELU 3D OBIEKTU MAŁEJ ARCHITEKTURY METODĄ FOTOGRAMETRYCZNĄ

Wstęp

Fotogrametria jest nieustannie rozwijającą się nauką. Początkowo używano jej w celach geodezyjnych do sporządzania map (fotogrametria lotnicza) oraz do inwentaryzowania obiektów architektonicznych (fotogrametria naziemna). Współcześnie posiada szerokie spektrum zastosowań. Polega na odtwarzaniu kształtów, wymiarów i wzajemnego położenia obiektów przestrzennych w terenie na podstawie fotogramów (zdjęć fotogrametrycznych) (Świątkiewicz, 1989). Fotogrametrię można podzielić na kilka segmentów. Ze względu na zastosowanie wyróżnia się fotogrametrię topograficzną (mierzone są powierzchnia topograficzna ziemi oraz obiekty znajdujące się na niej) i nietopograficzną (celem pomiaru może być kształt, ruch różnych konstrukcji, deformacja i inne). Ze względu na miejsce wykonywania zdjęć wyodrębnia się fotogrametrię naziemną (inaczej terrofotogrametrię, która dotyczy fotogramów wykonywanych bezpośrednio ze stanowisk naziemnych), lotniczą (aerofotogrametrię – fotogramy wykonywane są z powietrza) i satelitarną (dotyczy satelitarnych fotomap oraz map topograficznych). Natomiast ze względu na wykorzystanie fotogramu (pojedynczego zdjęcia) lub stereogramu (pary zdjęć) wyróżnia się fotogrametrię jednoobrazową i dwuobrazową. Głównie używa się jej do opracowań fotogrametrycznych, takich jak fotogrametryczne naloty dronem, skanowanie zdjęć lotniczych, aerotriangulacja cyfrowa, Numeryczny Model Terenu, ortofotomapa i mapa sytuacyjno-wysokościowa. Dziedzina ta pozwala na prezentację 2D lub 3D obiektu. Dzięki temu, z wykorzystaniem odpowiednich technik wchodzących w skład fotogrametrii, współczesna technologia może stworzyć wirtualny świat dostępny dla każdego. Zastosowanie fotogrametrii przestało ograniczać się tylko do geodezji, z czasem ewoluowała o inne gałęzie gospodarki, jak przemysł, rolnictwo, budownictwo, leśnictwo oraz inne. Na podstawie zdjęć fotogrametrycznych,

chmury punktów czy modeli 3D tworzone są dane przestrzenne, które wykorzystywane są w procesach inwestycyjnych, w analizowaniu zmian ukształtowania terenu oraz w wielu innych zjawiskach. Fotogrametria jest wykorzystywana praktycznie wszędzie, w celu ułatwienia wykonywanej pracy zawodowej lub w życiu prywatnym. Przykładem są serwisy takie jak: Google Street View czy Geoportal 360, które mogą być używane przez inwestorów w poszukiwaniu miejsca pod zabudowę inwestycji lub przez osobę prywatną, która szuka idealnego miejsca na wakacje. Dzięki temu można się przenieść do świata wirtualnego (Kurczyński, 2000).

Do tworzenia modeli 3D, oprócz fotogrametrii, wykorzystywany jest również skaning laserowy. Jednakże opracowanie chmur punktów ze zdjęć jest tańszą alternatywą w stosunku do skaningu laserowego, który wymaga specjalistycznego sprzętu oraz sporo czasu na prace terenowe.

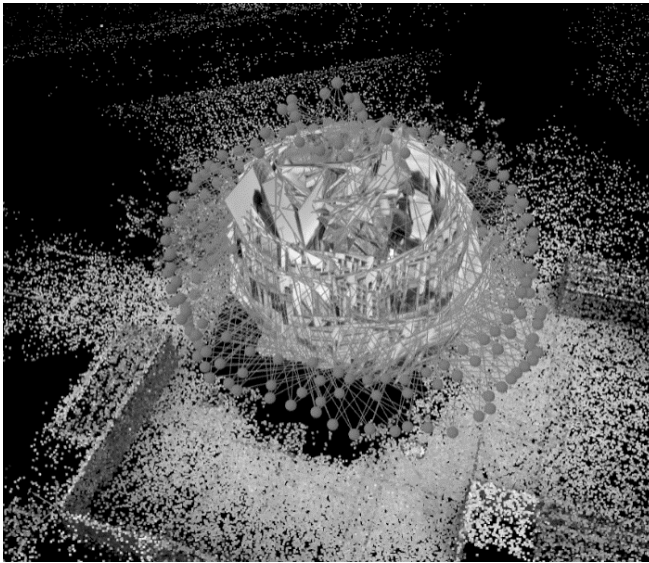
Cel pracy

Celem pracy było opracowanie modelu 3D wybranego obiektu małej architektury metodą fotogrametryczną. Obiektem opracowania była rzeźba pomnikowa niewielkich rozmiarów. Celowo wybrano odpowiednie proporcje, by obserwator mógł wykonać zdjęcia ze stanowisk naziemnych wokół rzeźby. Cała praca opierała się na pracach terenowych oraz kameralnych. W terenie zostały wykonane zdjęcia o odpowiedniej porze dnia, przy dobrym oświetleniu słonecznym. Wykonano serię zdjęć na kilku płaszczyznach dookoła obiektu. Poziomy wykonywania zdjęć miały na celu ująć widok rzeźby od dołu, na wprost, od góry oraz czubek głowy. Aby cały model 3D przedstawiał rzeczywiste proporcje obiektu pomiarowego, należało zwrócić uwagę na metryczność trójwymiarowego modelu. W celu uzyskania informacji o rzeczywistych wymiarach rzeźby, zmierzono kilka charakterystycznych elementów, tj. krawędzie podstawy rzeźby, które w dalszym procesie posłużyły do skalowania modelu.

Celem było również wykonanie zdjęć z wykorzystaniem aparatów dostępnych w smartfonach. Model telefonu komórkowego, iPhone XS marki Apple, został celowo wybrany do wykonania zdjęć w celu sprawdzenia czy ze smartfona, posiadającego słabsze parametry od profesjonalnego sprzętu, można wygenerować dobrą jakościowo chmurę punktów. Część kameralna polegała na opracowaniu modelu 3D ze zdjęć cyfrowych wykonanych smartfonem. W tym celu wykonano 253 zdjęcia. Liczba zdjęć miała znaczenie dla końcowej prezentacji modelu 3D, ponieważ miało to wpływ na dokładność ostatecznego wyniku.

Material i metody

Materiałem wykorzystanym do pracy były zdjęcia cyfrowe wykonane smartfonem marki Apple – model iPhone XS. Telefon posiada dwa aparaty zamontowane w tylnej części obudowy o rozdzielczości matrycy 12 Mpix z obiektywem szerokokątnym i wąskokątnym o liczbie przysłony odpowiednio $f/1,8$ oraz $f/2,4$ (Apple, 2020). Zdjęcia opracowano w programie Pix4Dmapper, wykorzystywanym do opracowywania zdjęć pochodzących zarówno z nalotów fotogrametrycznych wykonanych bezzałogowymi statkami powietrznymi, jak i instrumentami naziemnymi, w tym przypadku smartfonem. Część kameralną, czyli opracowanie modelu 3D, zaczęto od importu wcześniej wykonanych zdjęć do programu. Liczba zdjęć miała również znaczenie w celu wzajemnego pokrycia obrazu, wykonaniu serii zdjęć, mających cechy wspólne, w tym przypadku były to punkty jednoimienne pomiędzy zdjęciami

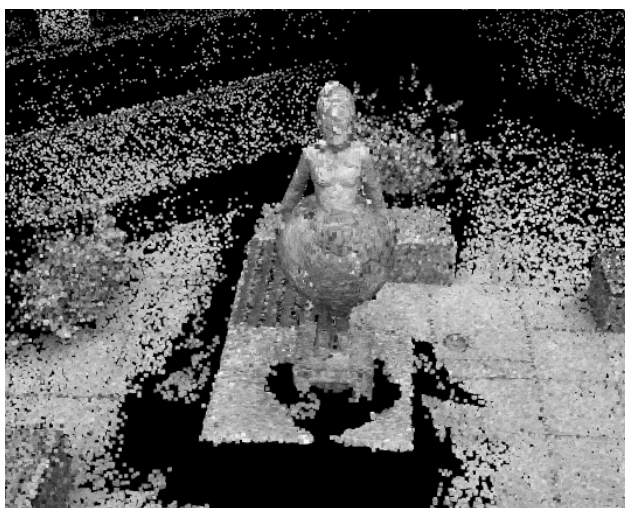


Rysunek 1. Rozmieszczenie zdjęć

Źródło: Opracowanie własne.

Rysunek 1. przedstawia układ zdjęć względem rzeźby. Każde kolejne zdjęcie było kontynuacją poprzedniego. Pierwszym etapem opracowania (ang. *Initial Processing*) było wstępne przetwarzanie zdjęć, inaczej mówiąc wstępna obróbka zdjęć, czyli proces łączenia. Po znalezieniu przez program punktów kluczowych (z części wspólnych pomiędzy zdjęciami wykonanymi obok siebie) ze zdjęć i dopasowaniu ich, wyznaczono elementy orientacji wewnętrznej i zewnętrznej kamery. W tym celu wykorzystano jedną z funkcji Pix4Dmapper, jaką jest oprogramowanie do automatycznej triangulacji

i wyrównania bloków zdjęć metodą wiązek. Ukończenie tego kroku było podstawą do rozpoczęcia kolejnej części tego etapu. Określono elementy dotyczące funkcji ogólnych, dopasowania i kalibracji. Funkcje ogólne obejmowały m.in. skalę obrazu punktów kluczowych w celu uzyskania precyzyjnych wyników. Dopasowanie dotyczyło par obrazów, które miały być dopasowane – dotyczyło to zdjęć naziemnych. W przypadku kalibracji użyto automatycznego sposobu wybierania punktów kluczowych do wyodrębnienia. Miało to wpływ na optymalizację wyznaczanych parametrów orientacji wewnętrznej i zewnętrznej kamery. Dla tych elementów wybrano optymalizację wszystkich wybranych parametrów. Cały etap zakończył się inicjalizacją obiektu, czyli nadaniem mu wartości początkowych, jaką jest rzadka chmura punktów, przedstawiająca wynik wyrównanych zdjęć (Rys. 2.).



Rysunek 2. Rzadka chmura punktów

Źródło: Opracowanie własne.

Rysunek 2. przedstawia tylko zarys modelu. W celu lepszej wizualizacji trójwymiarowego obiektu wykonano etap drugi (ang. *Point Cloud and Mesh*), mający na celu zagęszczenie chmury punktów, co prowadzi do większej dokładności wyników pomiaru. Proces ten polega na porównaniu nakładających się ze sobą obrazów w celu odnalezienia cech wspólnych. W rezultacie otrzymujemy gęstą chmurę punktów. Dzięki temu można było utworzyć siatkę teksturowaną 3D. Cały etap drugi dotyczył zdefiniowania parametrów określających zagęszczenie chmury punktów, klasyfikację chmury punktów oraz eksportu chmury punktów. Zagęszczenie polegało na zdefiniowaniu parametrów, takich jak skala obrazów, w których obliczane są dodatkowe punkty 3D, gęstość zagęszczonej chmury punktów oraz minimalna liczba dopasowań na punkt 3D. Klasyfikacja umożliwiła wygenerowanie końcowej chmury punktów.



Rysunek 3. Model wykonany na podstawie gęstej chmury punktów

Źródło: Opracowanie własne.

Rysunek 3. przedstawia model po zagęszczeniu chmury punktów oraz nałożonej tekstury na podstawie zdjęć cyfrowych. Proces polegał na połączeniu punktów w chmurze tworząc siatkę trójkątów (ang. *mesh*).

Wyniki

Rezultatem końcowym był raport jakości (ang. *Quality Report*) z opracowaniem modelu 3D rzeźby pomnikowej. Kluczowe znaczenie miała kontrola jakości (ang. *Quality Check*), wskazująca na poprawność wykonanej inicjalizacji obiektu, czyli rzadkiej chmury punktów.

Quality Check

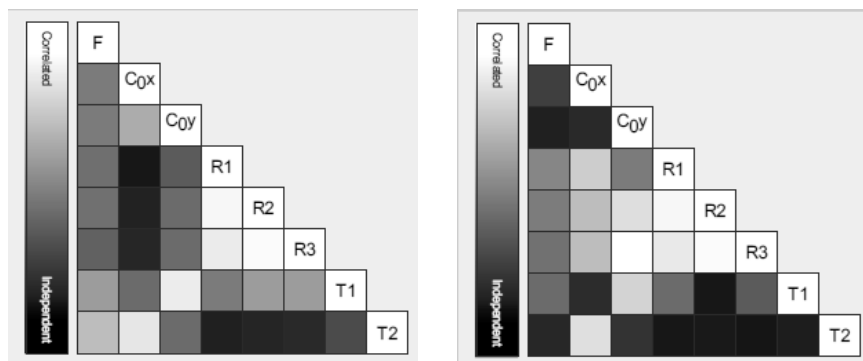


🔍 Images	median of 38417 keypoints per image	✔️
🔍 Dataset	230 out of 253 images calibrated (90%), all images enabled	⚠️
🔍 Camera Optimization	2.07% relative difference between initial and optimized internal camera parameters	✔️
🔍 Matching	median of 16040.6 matches per calibrated image	✔️
🔍 Georeferencing	no, no 3D GCP	⚠️

Rysunek 4. Kontrola jakości

Źródło: Opracowanie własne.

W przypadku zestawu danych (ang. *dataset*), co przedstawiono na Rysunku 4., liczba obrazów, która ma być poprawnie skalibrowana, powinna zmieścić się w przedziale 60–95% wszystkich zaimportowanych obrazów. Warunek ten został spełniony, gdyż wartość skalibrowanych obrazów wyniosła 90%. Powoduje to powstanie kilku bloków. Należy zwrócić uwagę na georeferencję (ang. *Georeferencing*), która na Rysunku 4. została wyszczególniona wykrzyknikiem. Było to spowodowane tym, że georeferencja nie była brana pod uwagę podczas wykonywania obliczeń, ponieważ funkcja geolokalizacji w smartfonie została wyłączona, by zapobiec nakładaniu się zdjęć na siebie. Spowodowałoby to, że model wyszedłby płaski, 2D. Elementy orientacji wewnętrznej kamery (ang. *Internal Camera Parameters*), zostały wyznaczone w jednym procesie obliczeniowym. W raporcie (Rys. 5.) można dostrzec zależności między tymi elementami, które są określane przez korelację. Korelacja ta występuje pomiędzy parametrami orientacji wewnętrznej kamery (ang. *Internal Camera Parameters Correlation*), określonymi przez regulację wiązki, a liczbą zastosowanej przysłony w obiektywie.



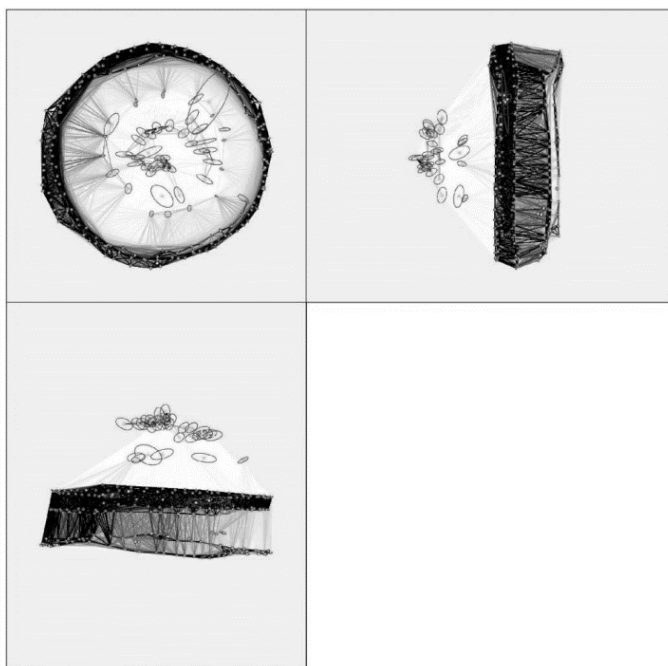
Rysunek 5. Współczynnik korelacji pomiędzy wewnętrznymi parametrami kamery wewnętrznej (fotografia lewa dotyczy liczby przysłony $f/1.8$, natomiast prawa - $f/2.4$)

Źródło: Opracowanie własne.

Rysunek 5. przedstawia wartości korelacji pomiędzy wewnętrznymi parametrami kamery, odpowiednio dla liczby przysłony $f/1.8$ oraz $f/2.4$, która maleje wraz z intensywnością koloru szarego. Kolor biały wskazuje na pełną korelację między parametrami, czyli jeden parametr ma wpływ na inny. Kolor czarny oznacza, że występuje całkowita niezależność między nimi. Między parametrami dystorsji radialnej (R1, R2, R3) można spodziewać się pełnej korelacji, ponieważ wartości te określają soczewkę oraz są związane z ograniczeniami fizycznymi. Dekorelacja, kolor ciemny, wskazuje na różnice w głębokości terenu (w przypadku rzeźby mowa o wgłębieniach w strukturze obiektu).

Przechodząc do dalszej analizy raportu jakości, należy zwrócić uwagę na względną pozycję kamery i niepewność orientacji kamery (ang. *Relative Camera Position and Orientation Uncertainties*). Względna pozycja kamery jest związana z ruchem kame-

ry w stosunku do obiektu pomiarowego. Pozycja ta musi być zoptymalizowana w celu przeprowadzenia prawidłowej rekonstrukcji. Średnia względna niepewność położenia kamery powinna mieścić się w granicach kilku wielokrotności rozdzielczości tereno-
wej obrazu (ang. *Ground Sampling Distance – GSD*), natomiast średnia niepewność orientacji powinna być mniejsza niż 0,1 stopnia. W raporcie również można zobaczyć schemat dopasowania punktów kluczowych (ang. *2D Keypoint Matches*). Punkty kluczowe to punkty, które są punktami wspólnymi zdjęć sąsiadujących ze sobą. Schemat ten (Rys. 6.) przedstawia rozmieszczenie zdjęć w poszczególnych płaszczyznach.

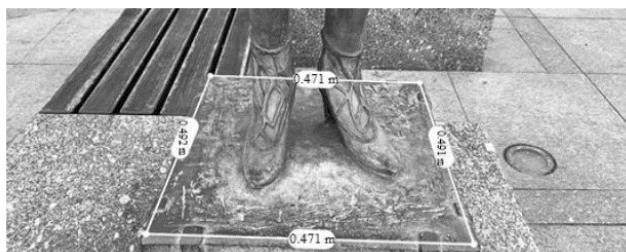


Rysunek 6. Schemat dopasowania punktów kluczowych

Źródło: Opracowanie własne.

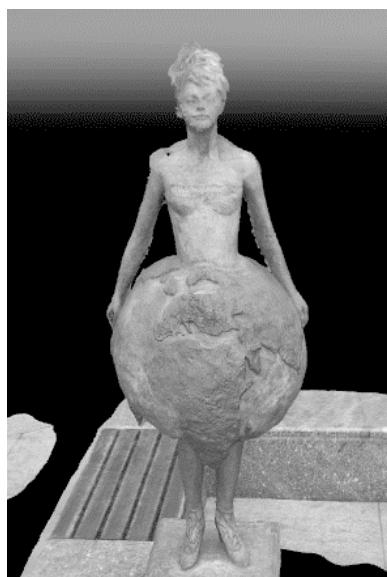
Wykonano skalowanie obiektu, w celu zachowania jego pierwotnych proporcji. Dzięki narzędziu *New Scale Constraint* oferowanym przez program, można było zdefiniować linię łączącą dwa wierzchołki, np. krawędź podestu, na którym stoi rzeźba. Na każdy wierzchołek przypada jeden punkt wiązania, który należało wskazać w programie ręcznie. Ten sam punkt należało wskazać na co najmniej dwóch zdjęciach. Do wyskalowania użyto podest, który został pomierzony w terenie (Rys. 7.).

Na Rysunku 7. widać długości krawędzi podestu pomierzone w terenie. Po przeskalowaniu obiektu w programie wartości te niewiele się różniły, wyniosły 0,470 m na 0,490 m, różnica była w milimetrach. Powstały model przedstawia trójwymiaro-



Rysunek 7. Pomierzone długości

Źródło: Opracowanie własne.



Rysunek 8. Model 3D Kryształowej Planety.

Źródło: Opracowanie własne.

wą konstrukcją – Kryształową Planetę. Rysunek 8. przedstawia wynik końcowy pracy programu.

Dyskusja

Analiza raportu jakości pomogła w ogólnej ocenie powstałych wyników. Model 3D w pełni oddaje trójwymiarowość obiektu pomiarowego. Zostały zachowane proporcje obiektu, po wcześniejszym jego wyskalowaniu. Dodatkowo, oprócz rzeźby, wymodelo-

wane zostały inne elementy ze zdjęć, jak podest czy ławka. Na wymodelowanej głowie można dostrzec szumy, które zostały wygenerowane podczas opracowywania modelu 3D. Zostały one zredukowane do maksimum, jednakże pozostałości jakie widać na głowie (Rys. 9.) mogą być efektem parametrów sprzętu, którego użyto do wykonania zdjęć. Na podstawie ilustracji można porównać efekt końcowy.



Rysunek 9. Model 3D Kryształowej Planety (model 3D, rzeźba pomnikowa)

Źródło: Opracowanie własne.

Podsumowanie

Cel, jakim było opracowanie modelu 3D wybranego obiektu, został osiągnięty. Cały proces nie był złożony, ponieważ modelowanie składało się z dwóch podstawowych kroków: wykonania prawidłowych zdjęć oraz obliczenia modelu przez program Pix4D-mapper. Celowo użyto smartfona, ze względu na jego słabsze parametry od profesjonalnego sprzętu przeznaczonego do fotogrametrii. Z powodu padającego na rzeźbę cienia budynków oraz optyki wybranego smartfona nie udało się całkowicie usunąć szumów z modelu. Należy nadmienić, że pora dnia jest szczególnie ważna, aby oświetlenie obiektu było optymalne i równomierne. Prace wykonywane o nieodpowiedniej porze dnia miałyby znaczący wpływ na jakość zdjęć, co mogłoby utrudnić opracowanie modelu 3D.

Odnosząc się do wspomnianego wyżej skalowania obiektu (Rys. 7.) można zwrócić uwagę na dokładności pomierzone w terenie oraz na modelu. Różnica jest niewielka, wynosi zaledwie kilka milimetrów. Może to być odpowiedź na pytanie: Czy ze smart-

fona można wygenerować dobrą jakościowo chmurę punktów? Skalowanie dowodzi temu, że można, a wynik końcowy jakim jest utworzony model 3D tylko to potwierdza.

Literatura

- Świątkiewicz A. 1983. Fotogrametria. Zasady i zastosowania w gospodarce rolnej i wodnej. PWN, Warszawa.
- Kurczyński Z., Preuss R. 2000. Podstawy fotogrametrii. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa.
- Pix4Dmapper, 2011-2020.
<https://support.pix4d.com/hc/en-us/categories/360001503192-Pix4Dmapper> (dostęp 30 maj 2021 r., 31 maj 2021 r.).
- Apple. 2020. <https://www.apple.com/pl/iphone/compare/?device1=iphoneXS&device2=iphone12&device3=iphone12mini> (dostęp 1 czerwca 2021 r.)

Abstract

BUILDING A MODEL 3D OF A SMALL ARCHITECTURE OBJECT USING PHOTOGRAMMETRIC METHOD

The aim of this study was to develop a three-dimensional (3D) model of selected object of a small architecture using photogrammetric method on the basis of digital images taken a smartphone. The methodology of developing the model was based on taking photos in three planes in order to best present the sculpture on the 3D model. The model was made in Pix4Dmapper software. The whole development process of model took place in two stages. The first stage consisted in initial processing. This step involved aligning the images and creating a sparse point cloud from them. This cloud represented only the illustrative shape of the object. The second stage consisted in densifying the point cloud calculated in the first stage, which led to a higher accuracy of the measurement results. A 3D texture mesh was created based on the dense point cloud. Upon completion of step two, a 3D model of the selected object was generated, which was the final and metric product.

Słowa kluczowe: metoda fotogrametryczna, model 3D, chmura punktów

Keywords: photogrammetric method, 3D model, point cloud

Daria Darznik

Adam Bieszk

Uniwersytet Morski w Gdyni

Wydział Mechaniczny

Koło Naukowe NAUTICA

Opiekun: dr inż. st. of. mech. Włodzimierz Kończewicz

ANALIZA MOŻLIWOŚCI REGENERACJI PŁATÓW STERÓW STRUMIENIOWYCH ZA POMOCĄ KOMPOZYTÓW

Wstęp

Ster strumieniowy jest urządzeniem, które za pomocą strumienia odrzuconej wody wywołuje zmianę kierunku ruchu kadłuba statku. Zasada działania steru strumieniowego polega na zasysaniu wody przez śrubę o odpowiedniej konstrukcji, umieszczonej w kanale przepływowym, i wyrzucenia jej strumienia w kierunku przeciwnym do zamierzonego zwrotu statku. Dzięki temu podczas pracy steru wytwarzana jest odpowiednia siła, prostopadła do osi wzdłużnej kadłuba statku, która umożliwia wykonanie zamierzonego manewru.

Celem zastosowania sterów strumieniowych na jednostkach jest zwiększenie ich możliwości manewrowych oraz zmniejszenie ograniczeń związanych z ich możliwością wejścia do portów. Zależnie od wielkości jednostki oraz od przyjętych założeń konstrukcyjnych statki wyposażane są przeważnie w jeden ster strumieniowy, umieszczony w dziobowej części kadłuba. W przypadku bardzo dużych jednostek, na których zastosowanie jednego steru strumieniowego mogłoby być niewystarczające, stosuje się dwa stery, po jednym w części dziobowej i rufowej kadłuba statku. Czasem stosuje się rozwiązanie specjalne – w przypadku jednostek o nietypowej konstrukcji kadłuba lub w przypadku jednostek, których realizacja zadań jest ściśle związana z precyzyjnym pozycjonowaniem (np. statki – platformy wykorzystywane do stawiania turbin wiatrowych na morzu lub jednostki układające kable na dnie morza) – umieszcza się dwa stery strumieniowe w dziobowej części kadłuba. Zależnie od potrzeb rozwiązanie to

jest modyfikowane. Budowane są bowiem jednostki wyposażone w większą ilość dziobowych sterów strumieniowych, które różnią się dodatkowo między sobą nie tylko rozmiarami, ale także chociażby rodzajem zastosowanej śruby napędowej.

Stery strumieniowe są urządzeniami złożonymi. Pracują w niekorzystnym środowisku, jakim jest woda morska. W związku z powyższym – są one bardzo narażone na szereg różnych uszkodzeń oraz awarii spowodowanych erozją, korozją elektrochemiczną, kawitacją, uszkodzeniami mechanicznymi itp. W pracy przedstawiono typowe uszkodzenia płatów sterów strumieniowych, ponadto przeprowadzono analizę możliwości regeneracji płatów sterów strumieniowych, ze szczególnym uwzględnieniem metody regeneracji za pomocą materiałów kompozytowych.

Śruby napędowe sterów strumieniowych

Śruba napędowa to pędnik o napędzie mechanicznym, zamieniający ruch obrotowy wału śrubowego na siłę naporu, która porusza masą wody. Śruby napędowe wyposaża się, zależnie od założeń projektowych, w dwa do aż siedmiu płatów. Rozróżniamy dwa rodzaje śrub napędowych:

- śruby o skoku stałym,
- śruby o skoku nastawnym (zmiennym).

Śruby o skoku stałym wykorzystuje się do układów napędowych, w których występują silniki nawrotne. Działanie śruby tego rodzaju zależy od prędkości obrotowej, a także od kierunku pracy silnika. Śruba o skoku zmiennym daje możliwość regulacji kąta natarcia płatów śruby, a co za tym idzie – zmianę zwrotu i wartości wytwarzanej siły naporu. Możliwe jest również ustawienie takiej śruby w pozycji neutralnej, co powoduje, że podczas pracy silnika nie wytwarza się siła ciągu.

Gabaryty śrub napędowych sterów strumieniowych, a także materiał, z jakiego się je wykonuje, zależą od rodzaju jednostki, na którym dany ster znajdzie zastosowanie. Ponadto wpływ na to ma również rejon, w jakim statek będzie realizował swoje zadania. Ze względu na warunki eksploatacyjne, w jakich wykorzystywane są stery strumieniowe, materiały stosowane do ich wykonania powinny posiadać wysokie własności mechaniczne (zarówno statyczne, jak i dynamiczne), a także wykazywać wysoką odporność na korozję, erozję, kawitację. Oprócz tego śruby powinny charakteryzować się niewielką przenikalnością magnetyczną, a także posiadać dobre właściwości tłumiące. Wymagania dotyczące rodzaju stosowanych materiałów, ich własności mechanicznych oraz naprężeń granicznych zawarte są w przepisach towarzystw klasyfikacyjnych. W przepisach towarzystw klasyfikacyjnych można znaleźć szczegółowy skład poszczególnych stopów wykorzystywanych do produkcji śrub napędowych oraz ściśle określoną procedurę oraz technologię ich diagnostyki oraz naprawy, gdy taka jest konieczna.

Grupą materiałów najczęściej wykorzystywaną na produkcję śrub napędowych sterów strumieniowych są odlewnicze stopy miedzi. Wysoka popularność tych materiałów wynika z ich lepszej odporności na zużycie korozyjne i kawitacyjne w środowisku wody słonej (morskiej) w porównaniu z innymi materiałami. Bardzo istotny jest również fakt, że śruby wykonane z tych stopów charakteryzują się wysoką odpornością na ścieranie, co jest ważne dla śrub pracujących w mocno zanieczyszczonych, mulistych wodach.

Wśród materiałów wykorzystywanych do produkcji śrub napędowych, prócz najpopularniejszych stopów miedzi, stosuje się także różnego rodzaju stale, m.in. nierdzewne, stopy aluminium, stopy tytanu, tworzywa sztuczne a także same materiały kompozytowe.

Typowe uszkodzenia płatów śrub sterów strumieniowych

Urządzenia sterowe mają decydujący wpływ na przebieg właściwej eksploatacji statku, na bezpieczeństwo załogi i przewożonego ładunku. Stery strumieniowe zaliczają się do pomocniczych urządzeń sterowych, lecz podczas awarii zwykłego urządzenia sterowego dzięki nim można utrzymać sterowność przy niewielkich prędkościach. W związku z tym należy pamiętać, że urządzenia sterowe muszą być otoczone specjalną opieką i staraniem ze strony załogi.

Płaty śrub sterów strumieniowych ulegają niszczeniu – proces ten jest nieunikniony i zależy od środowiska i warunków eksploatacji. Ważnym czynnikiem mającym wpływ na niszczenie płatów sterów strumieniowych jest zasolenie wody oraz jej skład chemiczny. Wymienione czynniki powodują, że woda jest słabszym lub mocniejszym elektrolitem, co determinuje szybkość korozji elektrolitycznej. Duży wpływ na proces niszczenia eksploatacyjnego ma również głębokość wód oraz rodzaj dna morskiego. Wraz ze zmianą głębokości w obrębie pracy pędnika mogą pojawić się elementy dna morskiego, kamienie lub inne przeszkody, które mogą uszkodzić śrubę. Każdy z wymienionych czynników ma w większym bądź mniejszym stopniu wpływ na proces niszczenia eksploatacyjnego płatów śrub sterów strumieniowych.

Jednym z najczęstszych uszkodzeń płatów śrub sterów strumieniowych jest kawitacja. Zjawisko to powoduje istotne zaburzenia w przepływie, odbijające się niekorzystnie na sprawności urządzeń sterujących, a oprócz tego przyspiesza proces niszczenia poszczególnych elementów tych urządzeń.

Zjawisko kawitacji przebiega w środowisku cieczy. Polega na gwałtownej przemianie fazowej z fazy ciekłej w fazę gazową pod wpływem zmiany ciśnienia. Jeśli ciecz gwałtownie przyspiesza, to zgodnie z zasadą zachowania energii, ciśnienie statyczne tej cieczy zmaleje.

Spadek ciśnienia statycznego doprowadza zwykle do wrzenia cieczy, a dalej – do tworzenia się pęcherzyków gazu. Gdy ciecz opuszcza obszar szybkiego przepływu –

ciśnienie statyczne ponownie rośnie, a pęcherzyki zapadają się, często gwałtownie implodując, co wytwarza fale uderzeniowe o dużej sile, w efekcie doprowadzając do powstawania niewielkich uszkodzeń w strukturze materiału śruby.

Kawitacja występuje przede wszystkim w obszarze turbulentnego przepływu cieczy. Jest gwałtownym i bardzo niepożądanym zjawiskiem. Według kształtu obłoku kawitacyjnego pojawiającego się za opływającym ciałem kawitację możemy podzielić trzy rodzaje:

- kawitację pęcherzykową – pęcherzyki poruszają się wzdłuż przedmiotu opływane-go i stają się widoczne w pobliżu obszaru o najmniejszym ciśnieniu – w tym przypadku mamy do czynienia z kawitacją pęcherzykową wędrującą. Gdy pęcherzyki narastają na powierzchni przedmiotu i następnie zostają zerwane przez przepływ – mamy do czynienia z kawitacją pęcherzykową w warstwie ścinania;
- kawitację pasmową przyłączoną – obszar kawitacji to kawerna z gładką powierzchnią wypełnioną jednorodną mieszaniną parowo-gazową;
- kawitację wirową.



Rysunek 1. Kawitacja na płacie steru strumieniowego

Źródło: opracowanie własne.

Kolejnymi typowymi uszkodzeniami występującymi przy eksploatacji sterów strumieniowych są korozja elektrochemiczna i erozja. Najczęściej spotykanym rodzajem zniszczenia jest korozja ogólna. Zależnie od zastosowanych materiałów możemy spotkać się także z korozją galwaniczną, szczelinową, wżerową, międzykrystaliczną itp.

Erozja jest z kolei niszczeniem materiału powodowanym jednocześnie mechanicznym i korozyjnym oddziaływaniem środowiska. Występuje najczęściej w formie

uderzenia lub korozji czarnej. Uszkodzenie erozyjne może zintensyfikować proces dalszego niszczenia.

Rodzajem uszkodzeń kluczowym dla eksploatacji są uszkodzenia mechaniczne śrub napędowych sterów strumieniowych. Powodują je ciała obce znajdujące się w wodzie morskiej zasysane do wnętrza tunelu steru strumieniowego w czasie jego pracy. Tego typu elementy mogą prowadzić m.in. do: pęknięć, wgnieceń, odkształceń, wyszczerbień krawędzi, a w ekstremalnych przypadkach nawet do ułamania płatów śruby.



Rysunek 2. Przegięcie płatu steru strumieniowego

Źródło: materiały nieopublikowane firmy Rolls-Royce.



Rysunek 3. Odłamanie płatu steru strumieniowego

Źródło: materiały nieopublikowane firmy Rolls-Royce.

Podczas pracy śruby z niewielką prędkością obrotową częściej spotyka się odkształcenia płatów, natomiast w przypadku jej pracy z większą prędkością obrotową – znacznie częściej zaobserwować można już ich wyszczerbienia lub odłamania.

Przepisy Towarzystw Klasyfikacyjnych dotyczące napraw i regeneracji śrub napędowych

Podczas napraw poszczególnych elementów urządzeń okrętowych należy stosować się do Przepisów Towarzystw Klasyfikacyjnych. Instytucja Towarzystw Klasyfikacyjnych to jednostka państwowa lub prywatna, która zajmuje się klasyfikacją jednostek pływających. Sprawuje nadzór podczas budowy nowych jednostek, a także odpowiada za przeglądy oraz dopuszczanie statków do eksploatacji.

Przepisy tworzone przez Towarzystwa Klasyfikacyjne mają za zadanie zapewnić możliwie najwyższy stopień bezpieczeństwa dla statków, załogi, armatorów oraz środowiska. Regulują one między innymi procedury związane z eksploatacją oraz naprawą poszczególnych elementów urządzeń okrętowych.

Przeważnie flota statków podlega przepisom Towarzystwa Klasyfikacyjnego kraju, z którego dany statek pochodzi. Ważniejsze Towarzystwa Klasyfikacyjne to:

- DNV (Det Norske Veritas) – Norwegia,
- GL (Germanischer Lloyd) – Niemcy,
- CCS (China Classification Society) – Chiny,
- LR (Lloyd's Register of Shipping) – Wielka Brytania,
- BV (Bureau Veritas) – Francja,
- RINA (Registro Italiano Navale) – Włochy,
- PRS (Polski Rejestr Statków) – Polska.

Diagnoza uszkodzeń – oględziny i badania nieniszczące

Przed przystąpieniem do naprawy lub regeneracji śruby napędowej steru konieczne jest dokonanie jej przeglądu w celu ustalenie stopnia uszkodzenia, możliwości naprawy oraz zaplanowania całego procesu naprawy. Towarzystwa Klasyfikacyjne wymagają dokładnych oględzin śruby oraz dokonania badań nieniszczących.

Oględziny powinny być wykonywane przez specjalistów. Zaleca się wykorzystanie przyrządów optycznych, a powierzchnia przed przystąpieniem do oględzin musi być dokładnie oczyszczona.

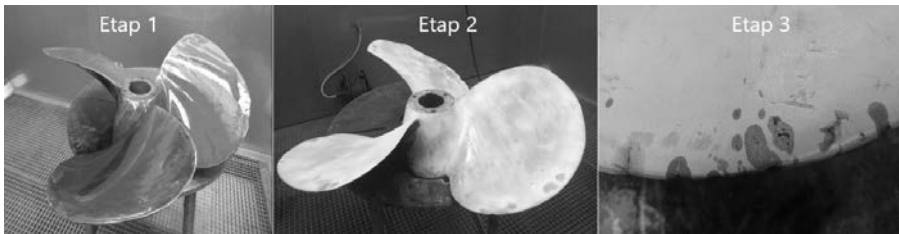
Po dokonaniu oględzin (rysunek 1) można zaobserwować znaczne ubytki na powierzchni płatów śruby, kawitację oraz mniejsze uszkodzenia w obrębie piasty.



Rysunek 4. Płaty śruby opisane po oględzinach

Źródło: opracowanie własne.

Kolejnym etapem jest precyzyjne pokrycie powierzchni śruby penetrantem, który ma za zadanie wykryć niewidoczne dla oka mikropęknięcia w materiale. Zależnie od wytycznych producenta zastosowanego penetrantu – powinien znajdować się on na powierzchni materiału od 15 do 45 min. Po tym czasie śrubę oczyszczamy z nadmiaru penetrantu za pomocą suchego czyszciva i nakładamy cienką warstwę wywoływacz – środek pozwalający na uwidocznienie penetrantu, który pozostał w pęknięciach materiału.



Rysunek 5 Badania nieniszczące na śrubie napędowej steru (etap 1 – pokrycie penetrantem, etap 2 – pokrycie wywoływaczem, etap 3 – uwidocznione działanie penetrantu)

Źródło: opracowanie własne.

Ciemniejsze miejsca na rysunku 2 (etap 3) to uszkodzenia, które zależnie od miejsca występowania oraz rodzaju będą decydowały o sposobie naprawy całej śruby lub – w przypadku śrub nastawnych, np. tylko płata.

Metody napraw płatów sterów strumieniowych

Naprawa płatów może odbywać się na kilka sposobów zależnie od stopnia uszkodzenia danego fragmentu śruby. Do najczęściej stosowanych sposobów zalicza się naprawę polegającą na: szlifowaniu, wytaczaniu, prostowaniu na zimno lub gorąco i spawaniu (w tym napawanie).

Szlifowanie jest rodzajem obróbki ścierniej pozwalającej na uzyskanie wysokiej jakości powierzchni. Naprawę tym sposobem możemy przeprowadzać w każdej strefie śruby. Bardzo ważne jest, aby podczas tego procesu zachować odpowiednią grubość płata śruby, zgodną z zatwierdzoną dokumentacją.

Gdy uszkodzeniu ulegnie czołowa powierzchnia płata śruby napędowej o skoku nastawnym, możliwe jest jej naprawienie poprzez wytaczanie. Zamontowany w specjalnej obróbce płat jest umieszczony w specjalnym stelażu i poddany obróbce skrawaniem.

Prostowanie na gorąco polega na podgrzaniu przy pomocy palnika uszkodzonego elementu w obrębie uszkodzonego miejsca, a następnie przykładania do niego odpowiedniego obciążenia statycznego celem poprawienia kształtu naprawianego elementu płata. Materiał należy nagrzewać równomiernie w obrębie całego przekroju, a temperatura powinna być utrzymywana na jednakowym poziomie. Zależnie od stopu, z jakiego wykonana jest śruba steru, Towarzystwa Klasyfikacyjne zalecają zakresy temperatur, w jakich należy się poruszać, aby otrzymać najwyższą jakość naprawy.

Prostowanie na zimno wykonuje się, podobnie jak prostowanie na gorąco, z wykorzystaniem nacisku statycznego, jednak bez podgrzewania materiału.

Naprawa śruby przy pomocy spawania polega na łączeniu materiałów za pomocą odpowiedniego spoiwa. Zaletami tej metody jest duża wydajność oraz możliwość łączenia elementów o znacznych grubościach, a także wysoka jakość wykonanej naprawy.

Zastosowanie materiałów kompozytowych w procesie regeneracji śruby

Po przeprowadzeniu oględzin śruby napędowej poddawanej regeneracji rozpoznano problem, jakim były widoczne wżery kawitacyjne na całej powierzchni śruby napędowej.

W celu przystąpienia do naprawy śruba została umyta pod wysokim ciśnieniem (350 bar). Służyło to jej wstępnemu oczyszczeniu oraz usunięciu pozostałości soli morskiej z ubytków materiału. Następnie uszkodzone miejsca zostały poddane obróbce strumieniowo-ścierniej w celu uzyskania klasy czystości SA2.5 (wg PN-ISO 8501), aby masa kompozytowa dobrze związała się z materiałem regenerowanym.

Odpowiednio przygotowaną powierzchnię odbudowano kompozytem (Belzona1311) i wyprofilowano za pomocą szlifierki. Wymieniony kompozyt jest dwuskładni-



Rysunek 6. Płat śruby poddawanej regeneracji

Źródło: dokumentacja firmy BELSE.



Rysunek 7. Śruba po obróbce przygotowującej do naprawy

Źródło: dokumentacja firmy BELSE.

kowym kompozytem epoksydowym, stworzonym głównie do napraw i zabezpieczania elementów urządzeń przez korozją i erozją. Jego cechą charakterystyczną jest dobra odporność chemiczna oraz przyleganie do wszystkich powierzchni metalowych. Utwarza się on pod wpływem temperatury otoczenia. Jego wytrzymałość na ściskanie sięga 124 MPa, a odporność termiczna mieści się na poziomie 93°C w zanurzeniu, do aż 200°C na sucho.

W celu uzyskania dodatkowego zabezpieczenia przed ponownym uszkodzeniem wskutek erozji kawitacyjnej gotowy element został pokryty kompozytem (Belzona 1321). Jest to dwuskładnikowa epoksydowo-ceramiczna powłoka, również charakteryzująca się wysoką odpornością chemiczną oraz odpornością na ściskanie. Zapewnia ona długotrwałą ochronę przed korozją i erozją.



Rysunek 8 i 9 Gotowy element po naprawie

Źródło: dokumentacja firmy BELSE.

Podsumowanie i wnioski

Postęp techniczny oraz konkurencyjność sprawiły, że trwałość urządzeń okrętowych jest kluczowa dla eksploatacji statków. Stosowanym materiałom stawia się coraz większe wymagania w zakresie właściwości mechanicznych, odporności na zmęczenie, oddziaływania cieplnego oraz właściwości fizyko-chemicznych związanych z korozyjnym oddziaływaniem środowiska.

W celu zwiększenia trwałości eksploatacyjnej przy jednoczesnym przeprowadzaniu regeneracji lub naprawy wytwarza się na powierzchni materiału specjalne warstwy o wymaganych i powtarzalnych właściwościach. Takie połączenie regeneracji i ulepszania powierzchni uzyskać można dzięki zastosowaniu do napraw materiałów kompozytowych.

Kompozyty projektowane są tak, aby osiągały optymalną odporność na oddziaływanie czynników działających bezpośrednio na warstwę kompozytową. W zależności od zapotrzebowania nakładać możemy różne kompozyty tak, aby uzyskać możliwie jak najlepsze właściwości materiału, m.in. długotrwałą odporność na erozję, korozję i wiele rodzajów substancji chemicznych, brak skurczu, rozszerzalności i ugięcia pod obciążeniem oraz dobre własności wytrzymałościowe.

Stosowanie kompozytów do napraw oraz regeneracji elementów maszyn i urządzeń ma wiele zalet. Przede wszystkim możliwe jest łączenie, odbudowywanie i naprawa elementów bez wykorzystywania skomplikowanych lub czasochłonnych technik oraz specjalistycznych sprzętów. Materiały kompozytowe charakteryzują się bardzo dobrą przyczepnością, zarówno do powierzchni metalowych, jak i niemetalowych.

Zasadniczą zaletą jest także możliwość zastosowania kompozytów w warunkach normalnych, tj. temperaturze otoczenia. Właśnie w takich warunkach elementy naprawiane lub regenerowane kompozytami uzyskują wymagane właściwości.

Sam proces przeprowadzania naprawy jest nieskomplikowany i szybki. Ogranicza się jedynie do zdiagnozowania usterki, odpowiedniego przygotowania powierzchni i nałożenia kompozytu. Naprawy można wykonywać zarówno na lądzie, jak i pod wodą, co eliminuje np. koszty dokowania statku. W niektórych przypadkach, aby dokonać naprawy, nie trzeba nawet sprowadzać statku do portu.

Materiały kompozytowe są tworzone tak, aby nie zawierały rozpuszczalników i innych szkodliwych substancji. Stosując je, mamy możliwość ograniczenia zagrożeń narażających bezpieczeństwo środowiska i zdrowie ludzi oraz zwierząt.

Bibliografia

- Bartosiewicz J. 2002. Techniki wytwarzania. Wydawnictwo Akademii Morskiej. Gdynia
- Dymarski Cz., Wieliczko L., Nalewajski A. 2003. Analiza techniczna i statystyczna rozwiązań konstrukcyjnych układów sterowania oraz określenie założeń projektowych sterów strumieniowych. Gdańsk
- <https://www.belse.com.pl/pl/artykuly/kompozyty-polimerowe-belzona-w-przemysle> (dostęp 01.06.2021)
- <https://www.belse.com.pl/pl/produkty/seria-1000/belzona-1311-ceramic-r-metal> (dostęp 01.06.2021)
- <https://www.belse.com.pl/pl/produkty/seria-1000/belzona-1321-ceramic-s-metal> (dostęp 01.06.2021)
- Nowak P., Kamieniecki M. 2013. Stery strumieniowe, konieczność czy zbędny wydatek? Pogoria
- Perepeczko A. 1983. Okrętowe urządzenia sterowe. Wydawnictwo Morskie, Gdańsk
- Publikacja PRS Nr7/P. 2002. Naprawy śrub napędowych ze stopów miedzi.

Abstract

**ANALYSIS OF THE POSSIBILITY OF REGENERATION OF JET RUDDER
BLADES USING COMPOSITES.**

A rudder, in general terms, is a device used to steer a ship. its main task is to maintain the vessel's course and change it in order to perform a manoeuvre or a turn. The principle of operation of a thruster is mainly based on the rejection of the water jet. During operation, damage often occurs to the rudder propeller blades, among other things.

The aim of this paper is to analyze the possibility of repairing jet rudder flaps with special emphasis on composite techniques. This paper introduces the subject of jet rudders. A visual inspection of the propellers was carried out, and on this basis information on their typical operating damage was prepared. The screw regeneration process is described and the benefits of using composite materials for regeneration of marine equipment are presented.

Key words: repair, regeneration, bow thrusters, composites

Słowa klucz: naprawa, regeneracja, stery strumieniowe, kompozyty

Amanda Grylewicz

Łukasz Sałaciński

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej

Doktoranckie Koło Naukowe „Zielona Chemia”

Opiekun: dr hab. inż. Robert Pełech, prof. ZUT

WPŁYW MODYFIKOWANYCH HNT NA WŁAŚCIWOŚCI ULTRAFILTRACYJNYCH MEMBRAN Z POLIETEROSULFONU

Wstęp

Technologie membranowe są jedną z najczęściej stosowanych metod do oczyszczania wody i ścieków (Descoins 2012), pozwalającą na ciągłą i automatyczną pracę, łatwą realizację procesu, selektywną separację oraz wysoką skuteczność (Descoins 2012). Ciśnieniowe procesy membranowe, takie jak: mikrofiltracja (MF), ultrafiltracja (UF), nanofiltracja (NF) oraz odwrócona osmoza (RO), są narażone na zjawisko foulingu oraz biofoulingu (Sadmani 2014). Polega on na osadzaniu się zawartych w oczyszczanej wodzie cząstek, koloidów i innych zanieczyszczeń na powierzchni membrany oraz/lub w jej porach, powodując obniżenie przepuszczalności, pogorszenie jakości permeatu oraz wzrost kosztów procesu (Shaffer 2015, Gaaz 2015). W celu zmniejszenia zjawiska foulingu prowadzi się szerokie badania nad metodami modyfikacji membran. Szczególnym zainteresowaniem cieszą się membrany polimerowe modyfikowane nanocząstkami. Nanokompozytowe membrany przygotowuje się poprzez zdyspergowanie nanonapełniacza w matrycy polimerowej. Można wyróżnić kilka metod preparatyki takich membran: inwersję faz, elektroprzędzenie, polimeryzację międzyfazową i szczerpienie chemiczne (Esfahani 2019). W ostatnich latach jako nanonapełniacze stosowano metale (Subair 2016) i tlenki metali (Rabiee 2015), zeolity (Anadao 2010), materiały węglowe (Wang 2018) czy też włókna polimerowe (Shang 2012). Wprowa-

dzenie nanonapełniacza skutkowało poprawą właściwości fizykochemicznych, transportowych oraz obniżeniem foulingu (Buruga 2018).

Oprócz wcześniej wspomnianych nanonapełniaczy ostatnimi czasy dużym zainteresowaniem cieszą się również nanorurki haloizytu (HNT). Materiał ten jest naturalnie występującą i stosunkowo tanią kopaliną o wyjątkowych właściwościach (Saif 2018). Nanorurki haloizytu należą do grupy materiałów ilastych dwuwarstwowych o strukturze typu 1:1 i formule $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (Vinokurov 2018). Haloizyt charakteryzuje się porowatą strukturą, wysoko rozwiniętą powierzchnią oraz zdolnością do wymiany jonowej. W zależności od miejsca wydobycie HNT może zawierać śladowe ilości tlenków metali oraz charakteryzować się różnym stopniem krystalizacji i strukturą. Haloizyt najczęściej występuje w formie tubularnej, może również przyjmować formę sfer oraz płytek (Yu 2016). Zewnętrzna struktura HNT składa się z czworościennego kryształu Si-O-Si, natomiast wewnętrzna z ośmiościennego kryształu Al-OH – różnica w budowie zewnętrznej i wewnętrznej ściany powoduje różnicę we właściwościach (Suh 2015). Pomimo wielu zalet HNT jest poddawane różnym modyfikacjom w celu poprawy jego właściwości, np. zwiększeniu powinowactwa przez dodatkowy mechanizm kompleksowania oraz nadaniu mu nowych właściwości, np. antykorozyjnych poprzez wypełnienie inhibitorem korozji (Yu 2016; Rawtani 2012).

Cel

Celem pracy było porównanie wpływu komercyjnych HNT oraz modyfikowanych HNT na właściwości ultrafiltracyjnych membran z PES. Membrany polimerowe otrzymano metodą inwersji faz z żelowaniem nierozpuszczalnikiem (wodą). Zbadano wpływ modyfikacji na morfologię, właściwości fizykochemiczne, transportowe, separacyjne oraz antyfoulingowe otrzymanych membran.

Stosowane materiały

Do przygotowania membran użyto polieterosulfon (PES, Ultrason E6020P; BASF SE, Niemcy), N,N-dimetyloformamid (DMF, cz.d.a., Avantor Performance Materials Polska S.A.) jako rozpuszczalnik, nanorurki haloizytu (Sigma Aldrich) o długości do 1250 nm oraz średnicy wewnętrznej do 28 nm zastosowano do modyfikacji membran. Do modyfikacji HNT zastosowano kwas siarkowy (VI) (POCH, cz.d.a.) oraz wodorotlenek sodu (POCH, cz.d.a.). Badania foulingu prowadzono z użyciem surowiczej albuminy wołowej (BSA, Probumin, Merck, Niemcy), a właściwości separacyjne określono

z użyciem poli(glikoli etylenowych) (Sigma Aldrich) oraz dextranów (Pofa Kutno). We wszystkich eksperymentach zastosowano wodę ultraczystą typu 2 o przewodności 0,066 μ S/cm (Elix 3, Millipore).

Metodyka

Preparatyka modyfikowanego HNT

Nanorurki haloizytu (2,5g) umieszczono w kolbie stożkowej o pojemności 250 ml, następnie dodano 250 ml roztworu kwasu (H_2SO_4) o stężeniu molowym 1, 2, 3 oraz 5. Kolba umieszczana była w wytrząsarce (rpm = 120, amplituda = 4) w łaźni wodnej w temperaturze 60°C na 8 h (1, 2, 3 M) oraz 24 h i 48 h (5 M). Po procesie produkt był przemywany kilkakrotnie wodą ultraczystą do uzyskania neutralnego pH, na koniec produkt był suszony w temperaturze 80°C przez 12 h.

Preparatyka membran

Membrany otrzymane zostały metodą inwersji faz z żelowaniem nierozpuszczalnikiem. Roztwór błonotwórczy polimeru (15% wag.) w rozpuszczalniku (85% wag.) został przygotowany w celu otrzymania membrany niemodyfikowanej. Zhomogenizowany roztwór pozostawiono do odgazowania w temperaturze pokojowej na 2 h, a następnie rozprowadzono na płycie szklanej za pomocą automatycznego aplikatora (Elcometer 4340, Elcometer Ltd.). Płytę szklaną z rozprowadzonym roztworem umieszczano następnie w kąpeli żelującej o temperaturze 20°C, wilgotność powietrza wynosiła 40% RH.

Modyfikacja membrany następowała na etapie preparatyki roztworu błonotwórczego. Nanomateriał wprowadzany był do roztworu błonotwórczego (15% wag. polimeru, 40cm³ rozpuszczalnika) po wcześniejszym zdyspergowaniu w rozpuszczalniku (10 cm³) za pomocą sondy ultradźwiękowej (Vibra-Cell VCX-130, Sonics, USA; moc 130 W, częstotliwość 20 kHz, amplituda 80%). Ilość wprowadzonego HNT oraz modyfikowanego HNT wynosiła 1% wag. w stosunku do masy polimeru. Po wprowadzeniu dyspersji roztwór naprzemiennie mieszano na mieszadle magnetycznym w kąpeli wodnej o temperaturze w zakresie 55–60°C oraz sonikowano w łaźni ultradźwiękowej po 15 minut przez 2 godziny. W kolejnym etapie roztwór pozostawiono do odgazowania i wylano na płycie szklanej.

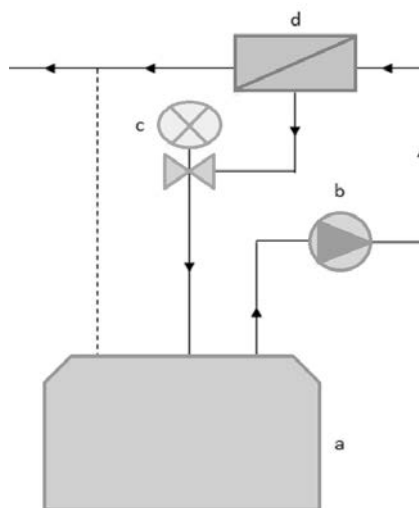
Charakterystyka nanorurek haloizytu i modyfikowanych HNT

Nanorurki haloizytu oraz modyfikowane nanorurki haloizytu scharakteryzowano na podstawie pomiarów wykonanych na skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM) (UHR FE-SEM) Hitachi SU8020 oraz spektrometrze fluorescencji rentgenowskiej (EDXRF) typ EPSILON3 firmy Panalytical B. V. z zastosowaniem lampy rtg rodowej (Rh, 9 W, max 30 kV, max 1 mA), analizatora wysokorozdzielczego (<135 eV) i półprzewodnikowego detektora SDD (krzemowy detektor dryftowy), który umożliwia analizę pierwiastków w zakresie Na – U.

Charakterystyka membran

Statyczny kąt zwilżania wyznaczono metodą siedzącej kropli przy zastosowaniu gonimetru OCA 15EC firmy Dataphysics. Badanie przeprowadzono przy użyciu wody (0,05 $\mu\text{S}/\text{cm}$, Elix 3, Milipore). Objętość kropli wynosiła 7 μl . Membrany przed badaniem odwodniono w alkoholu etylenowym (EtOH) oraz suszono w 40°C przez 24 h.

Topografię powierzchni membrany zbadano metodą mikroskopii sił atomowych (AFM) przy użyciu mikroskopu NanoScope V Multimode 8 (Bruker Corp.) Pomiary przeprowadzono z zastosowaniem sondy z azotku krzemu w trybie ScanAsyst. Ska-nowano powierzchnię o wymiarach 10 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$. Próbkę do badań były odwadniane w EtOH.



Rysunek 1. Schemat instalacji do ultrafiltracji (a – zbiornik nadawczy, b – pompa tłokowa, c – zawór iglicowy z manometrem, d – moduł membranowy)

Źródło: opracowanie własne.

Skaningowego mikroskopu elektronowego z emisją polową (UHR FE-SEM) Hitachi SU8020 użyto do analizy morfologii otrzymanych membran. Odwodnione wcześniej próbki dodatkowo łamano w ciekłym azocie celem zbadania przekrojów membran. Przed analizą na próbki nanoszono warstwę chromu (Q150T ES, Quorum Technologies Ltd., UK). Zastosowano technikę pomiarową z wykorzystaniem elektronów wtórnych (SE) o napięciu przyspieszającym 5kV.

Przepuszczalność membran, odporność na fouling oraz właściwości separacyjne określono podczas ultrafiltracji odpowiednio: wody ($0,066\mu\text{S}/\text{cm}$, $20\pm 1^\circ\text{C}$, TMP = 1,2,3 bar), roztworu surowiczej albuminy wołowej BSA ($1\text{g}/\text{l}$, $20\pm 1^\circ\text{C}$, TMP = 2 bar) oraz PEG-ów (4, 20, 35 kDa) i dekstranów (110, 200kDa, 500kDa) ($0,5\text{g}/\text{l}$, TMP = 1 bar). Badania przeprowadzono na instalacji do ultrafiltracji (rys. 1), w której skład wchodziła: pompa tłokowa, moduł membranowy ze stali nierdzewnej, zbiornik nadawczy oraz manometr z zaworem iglicowym do regulacji ciśnienia. Właściwości transportowe określone były przy ciśnieniu transmembranowym TMP = 0,1; 0,2 lub 0,3 MPa, natomiast podczas 2 h procesu ultrafiltracji roztworu BSA, TMP = 0,2 MPa. Ultrafiltrację roztworów glikoli i dekstranów prowadzono przy TMP = 0,1MPa po 15 minut na każdy roztwór.

Wyniki i dyskusja

Charakterystyka nanomateriałów

W tabeli 1 przedstawiono skład procentowy HNT trawionych kwasem siarkowym (VI) wyznaczony z krzywej kalibracyjnej na podstawie pomiarów XRF.

Tabela 2. Skład procentowy nanomateriału po modyfikacji

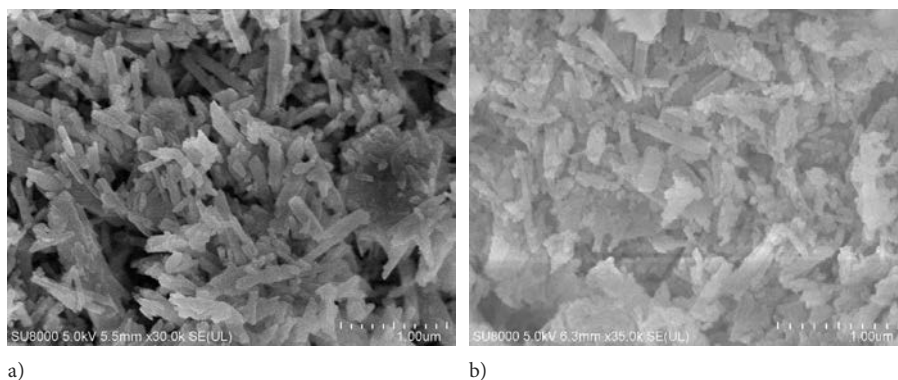
Stężenie kwasu	Ilość Al [%]	Ilość Si [%]
1M – 8h	31,8	42,7
2M – 8h	28,94	45,62
3M – 8h	26,32	50,14
5M – 24h	6,77	71,27
5M – 48h	0,24	98,35

Źródło: opracowanie własne.

Skład procentowy modyfikowanego HNT zmieniał się wraz ze wzrostem stężenia kwasu oraz czasem prowadzonej reakcji. Zastosowanie 1M roztworu nie wpłynęło znacząco na skład procentowy nanorurek haloizytu, podobne niewielkie zmiany zachodziły

po zwiększeniu stężenia 2M i 3M. Zastosowanie 5M roztworu skutkowało znaczącym zmniejszeniem ilości tlenku glinu w strukturze nanomateriału. Trawienie HNT kwasem powoduje usunięcie ośmiościennych Al^{3+} i utworzenie się rurowej amorficznej struktury mezoporowatej krzemionki o zwiększonych średnicach wewnętrznych (Gaaz i in. 2016). Do dalszych badań wybrano HNT trawione w 5M roztworze przez 48 h ze względu na najwyższy stopień usunięcia kationów Al^{3+} .

Na rysunku 2 przedstawiono zdjęcia SEM komercyjnych HNT (a) oraz HNT po modyfikacji (b).



Rysunek 2. Zdjęcia SEM komercyjnych HNT (a) oraz HNT po modyfikacji (b)

Źródło: opracowanie własne.

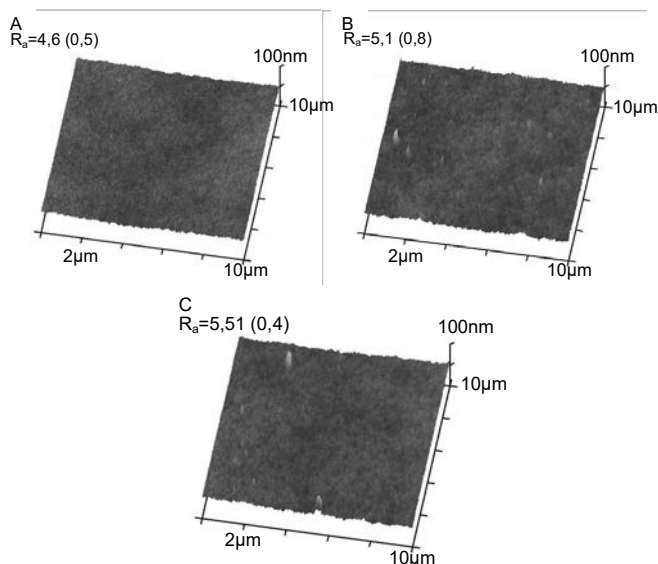
Po modyfikacji zaobserwować można pojawienie się mniejszych i krótszych struktur o budowie rurowej. Na zdjęciu przedstawiającym modyfikowany HNT zaobserwować również można rozpad struktury rurowej na skutek trawienia.

Wyniki badań i dyskusja

Badania kątów zwilżania przeprowadzono metodą siedzącej kropli z zastosowaniem gonionometru. Wartości kątów zwilżania zmieniły się po wprowadzeniu do matrycy membrany po zastosowaniu komercyjnych HNT zaobserwowano spadek wartości kątów zwilżania z $63,14^\circ$ na $61,63^\circ$, natomiast wprowadzenie HNT modyfikowanego kwasem siarkowym (VI) spowodowało nieznaczny spadek ($60,8^\circ$) w stosunku do membrany z komercyjnym HNT. Wzrost hydrofilowości membran po zastosowaniu modyfikacji powiązany jest ze strukturą HNT na powierzchni, której występują grupy $-OH$.

Topografia powierzchni przedstawiona została na zdjęciach AFM przedstawionych w formie 3D (rysunek 3). Na powierzchni membran zawierających HNT (rysunek 3B i 3C) zauważyć można pojedyncze dobrze rozproszone nanocząstki do 30 nm oraz

większe aglomeraty osiągające rozmiary do 200 nm (w przypadku membran PES/HNT) oraz do 300 nm (w przypadku membrany PES/m-HNT). Chropowatość powierzchni określona została na podstawie zdjęć AFM za pomocą oprogramowania NanoScope Analysis i przedstawiona na rysunku 3. Wzrost chropowatość związany jest z obecnością nanomateriału na powierzchni membrany.

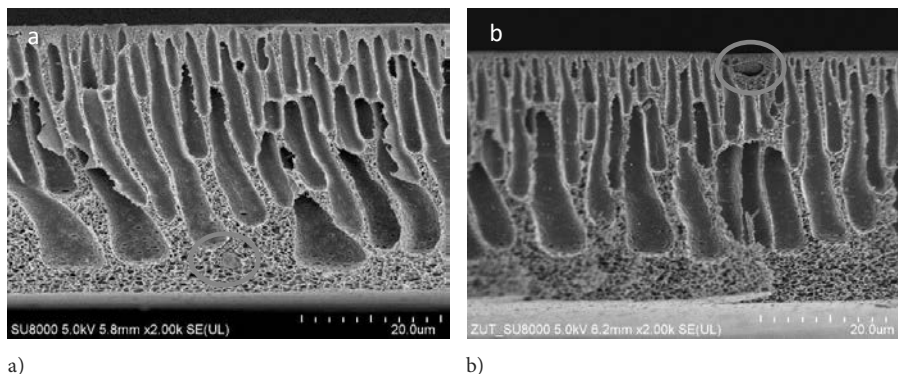


Rysunek 3. Zdjęcia AFM otrzymanych membran (A-NM, B-PES/HNT, C-PES/m-HNT)

Źródło: opracowanie własne.

Zdjęcia przekroju membran modyfikowanych HNT i m-HNT zostały przedstawione na rysunku 4. Membrany odznaczały się asymetryczną strukturą z cienką warstwą separacyjną w górnej części membrany, palczastymi porami rozszerzającymi się ku dołowi oraz gąbczastą strukturą pomiędzy porami oraz w dolnej części membrany. Nie zaobserwowano wpływu wprowadzonego nanomateriału na strukturę membran, a jedynie zaobserwować można było aglomeraty występujące w różnych miejscach w przekroju membrany. Zarówno w przypadku membrany PES/HNT, jak i PES/m-HNT stwierdzono obecność aglomeratów w dolnych oraz górnych warstwach membrany o wielkości do 5µm. Umieszczenie aglomeratów w górnej części membrany może tworzyć dodatkowe miejsca przepływu cieczy przez membranę nie tylko w prześwicie nanorurek, ale również w samym aglomeracie.

Przepuszczalność membran podczas ultrafiltracji wody przedstawiono na rysunku 5. Przeprowadzone badania wykazały pozytywny wpływ modyfikacji na właściwości transportowe otrzymanych membran. Zaobserwowano 13-procentowy wzrost maksy-

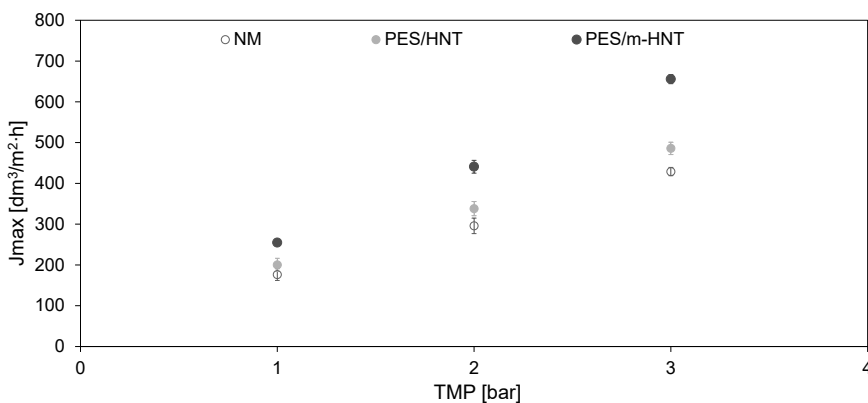


Rysunek 4. Zdjęcia SEM membrany modyfikowanej HNT oraz m-HNT

Źródło: opracowanie własne.

malnego strumienia permeatu membrany PES/HNT oraz 53-procentowy w przypadku membrany PES/m-HNT w porównaniu do membrany niemodyfikowanej. Wzrost maksymalnego strumienia permeatu powiązany jest ze strukturą rurową nanomateriału, która zapewnia dodatkowe kanały przepływu oraz grupami hydrofilowymi na powierzchni HNT oraz modyfikowanego HNT wpływającymi na wzrost hydrofilowości membran. Znaczny wzrost właściwości transportowych w przypadku zastosowania modyfikowanego nanomateriału powiązane jest z otwarciem struktury haloizytu, co zapewniło większy przepływ przez membranę, oraz z utworzeniem się struktury meziporowatej, co również wpłynęło na zwiększenie przepływu.

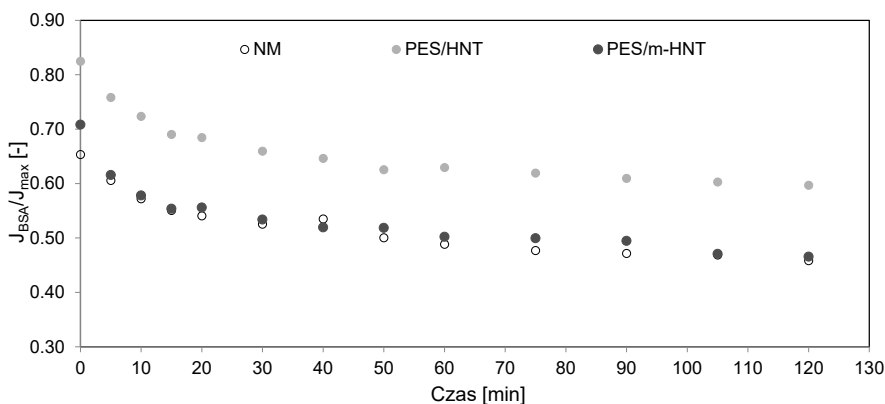
Odporność na fouling określona została podczas ultrafiltracji roztworu surowiczej albuminy wołowej. Na rysunku 6 przedstawiono spadek strumienia permeatu w sto-



Rysunek 5. Maksymalny strumień permeatu otrzymanych membran podczas ultrafiltracji wody

Źródło: opracowanie własne.

sunku do maksymalnego strumienia permeatu uzyskanego na wodzie, a spadek strumienia permeatu w czasie został przedstawiony na rysunku 7. Po wprowadzeniu HNT do matrycy membrany zaobserwowano wzrost odporności na blokowanie membran, a spadek strumienia z 54% obniżył się do 46%. Niestety po zastosowaniu modyfikowanych nanorurek HNT ponownie nastąpił wzrost do 52%. Obniżenie podatności na fouling powiązane jest ze wzrostem hydrofilowości membrany, stosunkowo niską chropowatością powierzchni oraz specjalnymi właściwościami powierzchni HNT, a mianowicie obecności ładunku ujemnego na powierzchni. W roztworze wodny ujemnie naładowane nanocząstki mogą odpychać ujemnie naładowane cząsteczki BSA, zapobiegając ich osadzeniu się na powierzchni membrany. Ponowne obniżenie odporności na fouling membrany PES/m-HNT powiązane jest ze znacznym zwiększeniem przepuszczalności (zwiększenie kanałów przepływu) i łatwiejszym wnikaniem cząsteczek BSA w kanały przepływu. Dodatkowo zwiększeniu uległa chropowatość matrycy polimerowej, co również odpowiadało za zwiększenie podatności na fouling.



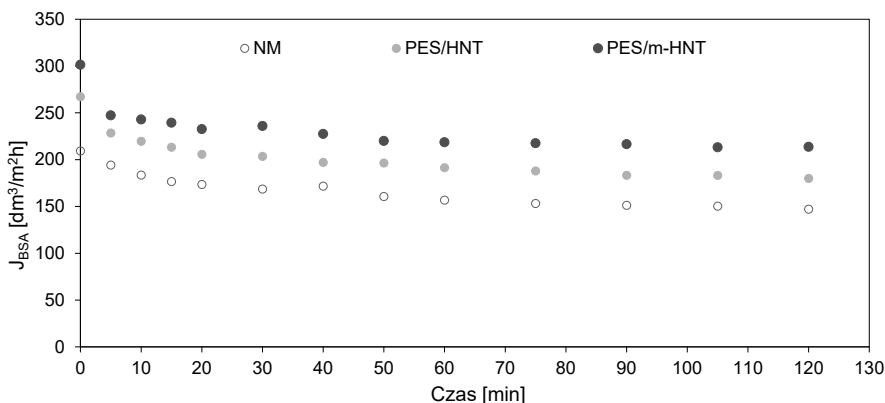
Rysunek 6. Odporność otrzymanych membran na zjawisko foulingu

Źródło: opracowanie własne.

Pomimo obniżenia właściwości antyfoulingowych membrany PES/m-HNT należy zwrócić uwagę na strumienie permeatu zaobserwowane podczas procesu i przedstawione na rysunku 7. Pomimo zwiększonej podatności na fouling po 2 h procesu membrany te odznaczały się wyższymi strumieniami niż membrana niemodyfikowana oraz membrana PES/HNT, co wpływa na zwiększenie wydajności procesu.

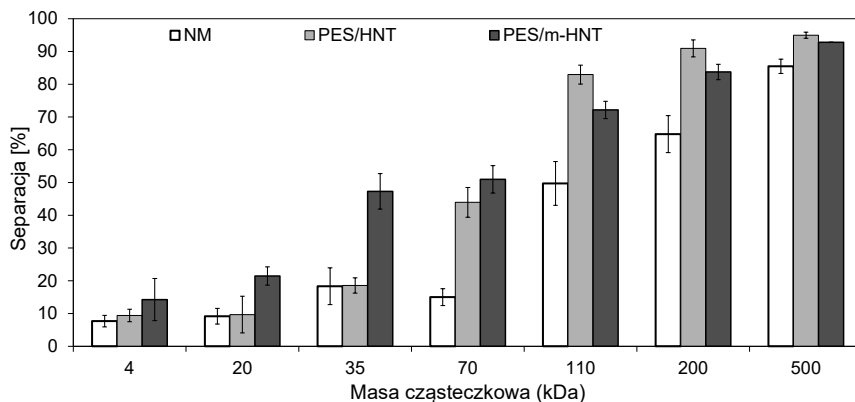
Na rysunku 8 przedstawiono separacje modelowych związków organicznych PEG-ów oraz dekstranów.

Modyfikacja membran pozytywnie wpłynęła na właściwości separacyjne. Wprowadzenie HNT oraz m-HNT do matrycy membrany. Podczas procesu ultrafiltracji PEG-ów oraz dekstranu 70kDa zaobserwowano znaczny wzrost właściwości separa-



Rysunek 7. Strumienie permeatu podczas procesu ultrafiltracji BSA

Źródło: opracowanie własne.



Rysunek 8. Separacja modelowych związków organicznych

Źródło: opracowanie własne.

cyjnych membrany PES/m-HNT w porównaniu do membrany PES/HNT. Odwrotną zależność zaobserwowano w przypadku dekstranów 110, 200 i 500kDa. Mogło to mieć związek z wielkością oraz budową cząsteczek, pomimo iż glikole mają mniejszą masę cząsteczkową i budowę liniową, mogą tworzyć kłęбки, które przenikały przez dodatkowo naładowane wnętrza nanorurek haloizytu, a zatrzymywane były przez zmodyfikowany haloizyt. Spadek zdolności separacyjnych w przypadku membrany PES/m-HNT w porównaniu z membraną PES/HNT związany jest z otwarciem prześwitu nanomateriału przez modyfikację.

Wnioski

Zastosowanie jako modyfikatorów HNT oraz m-HNT wpłynęło na właściwości fizykochemiczne, topografię powierzchni, morfologię membrany, właściwości transportowe, separacyjne oraz odporność na fouling.

Wprowadzenie zarówno komercyjnego nanomateriału, jak i po modyfikacjach spowodowało wzrost hydrofilowości powierzchni otrzymanych membran. Wzrost hydrofilowości membran po wprowadzeniu nanonapełniacza powiązany jest z obecnością grup –OH na powierzchni nanorurek. Podobnie jak wzrost hydrofilowości, tak samo wzrost chropowatości powiązany jest z obecnością nanomateriałów na powierzchni membrany. Komercyjne nanorurki haloizytu, jak i po modyfikacji nie są środkami porotwórczymi, a ich ilość wprowadzona do matrycy jest mała i nie wpłynęły one na budowę struktury membrany.

Wzrost przepuszczalności membran po modyfikacji powiązany jest ze zwiększeniem hydrofilowości, tubularną strukturą nanomateriału oraz otwarciem prześwitu w nanorurkach po ich modyfikacji.

Właściwości antyfoulingowe określono na podstawie procesu ultrafiltracji surowiczej albuminy wołowej. Zaobserwowano znaczny wzrost odporności na fouling w przypadku membrany PES/HNT oraz nieznaczny wzrost w przypadku membrany PES/m-HNT. Wzrost odporności na fouling w przypadku membrany PES/HNT powiązany jest ze wzrostem hydrofilowości oraz ujemnie naładowaną powierzchnią membrany, co pozwalało na 'odpychanie' ujemnie naładowanych cząsteczek BSA. Obniżenie odporności po wprowadzeniu modyfikowanego HNT jest powiązane ze wzrostem chropowatości powierzchni, co pozwalało zanieczyszczeniom na łatwiejsze osadzanie się na membranie, ale również z wysoką przepuszczalnością membran. Pomimo że po wprowadzeniu m-HNT do membrany zmniejszyła się odporność na fouling w porównaniu do membrany PES/HNT, była ona wciąż wyższa niż membrany niemodyfikowanej. Dodatkowo należy zaznaczyć, że podczas procesu membrana PES/m-HNT miała znacznie wyższe strumienie permeatu, co wskazuje na wyższą wydajność procesu niż w przypadku pozostałych membran.

Zastosowanie modyfikacji pozytywnie wpłynęło na właściwości separacyjne otrzymanych membran.

Bibliografia

Anadao P., Sato L.F., Wiebeck H., Valenzuela-Diaz F. 2010. Montmorillonite as a component of polysulfone nanocomposite membranes. *Appl. Clay Sci.*, 48: 127–132.

- Buruga K., Kalathi J.T., Kim K., Ok Y.S., Danil B. 2018. Polystyrene-halloysite nanotube membranes for water purification. *J. Ind. Eng. Chem.*, 61: 169–180.
- Descoins N., Deleris S., Lestienne R., Trouvé E., Maréchal F. 2012. Energy efficiency in waste water treatments plants: Optimization of activated sludge process coupled with anaerobic digestion, *Energy*, 41: 153–164.
- Esfahani M.R., Aktij S.A., Dabaghain Z., Mostafa Dadashi Firouzjaei M.S., Rahimpour A., Eke J., Escobar I.C., Abolhassani M., Greenlee L.F., Esfahani A.R., Sadmani A., Koutahzadeh N. 2019. Nanocomposite membranes for water separation and purification: fabrication, modification, and applications. *Sep. Purif. Technol.*, 213: 465–499.
- Gaaz T.S., Sulong A. B., Kadhum A.A.H., Ba-Abbad M., Al-Amiery A.A. 2015. Enhancement of physical and chemical properties of halloysite nanotubes using sulfuric acid. *Wulfenia*, 22: 264–284.
- Gaaz T.S., Sulong A.B., Kadhum A.A.H., Nassir M.H., Al-Amiery A.A. 2016. Impact of Sulfuric Acid Treatment of Halloysite on Physico-Chemical Property Modification. *Materials*, 9: 620–635.
- Li J., Xu Z., Yang H., Yu L., Liu M. 2009. Effect of TiO₂ nanoparticles on the surface morphology and performance of microporous PES membrane. *Appl. Surf. Sci.*, 255: 4725–4732.
- Mousavi M., Høgsaa B., Fini E.H. 2019. Intermolecular interactions of bio-modified halloysite nanotube within high-impact polystyrene and linear low-density polyethylene. *Appl. Surf. Sci.*, 473: 750–760.
- Rabiee H., Vatanpour V., Farahani M.H.D.A., Zarrabi H. 2015. Improvement on flux and anti-fouling properties of PVC ultrafiltration membranes by incorporation of zinc oxide (ZnO) nanoparticles. *Sep. Purif. Technol.*, 156: 299–310.
- Rawtani D., Agrawal Y.K. 2012. Multifarious applications of halloysite nanotubes: A review. *Rev. Adv. Mater. Sci.*, 30: 282–295.
- Sadmani A.H.M.A., 2014. The rejection of pharmaceutically active and endocrine disrupting compounds via nanofiltration as a function of natural water components. Department of civil engineering, University of Toronto.
- Saif M.J., Asif H. M., Naveed M. 2018. Properties and modification methods of halloysite nanotubes: a state-of-the-art review. *J. Chil. Chem. Soc.*, 63: 4109–4125.
- Shaffer D.L., Werber J.R., Jaramillo H., Lin S., Elimelech M. 2015. Forward osmosis: where are we now? *Desalination*, 356: 271–284.
- Shang Y., Si Y., Raza A., Yang L., Mao X., Ding B., Yu J. 2012. An in situ polymerization approach for the synthesis of superhydrophobic and superoleophilic nanofibrous membranes for oil-water separation. *Nanoscale*. 24: 7847–7854.
- Subair R., Tripathi B.P., Formanek P., Simon F., Uhlmann P., Stamm M. 2016. Polydopamine modified membranes with in situ synthesized gold nanoparticles for catalytic and environmental applications. *Chem. Eng. J.*, 295: 358–369.
- Suh, Jae Y. 2015. Use of natural halloysite as a functional cosmetics carrier. *Econ. Environ.*, 48: 247–253.
- Vinokurov V.A., Stavitskaya A.V., Glotov A.P., Novikov A.A., Zolotukhina A.V., Kotelev M. S., Gushchin P.A., Ivanov E.V., Darrat Y., Lvov Y.M. 2018. Nanoparticles formed onto/into halloysite clay tubules: architectural synthesis and applications. *Chem. Rec.*, 18: 858–867.
- Wang W., Zhu L., Shan B., Xie C., Liu C., Cui F., Li G. 2018. Preparation and characterization of SLS-CNT/PES ultrafiltration membrane with antifouling and antibacterial properties. *J. Membr. Sci.*, 548: 459–469.
- Yu L., Wang H., Zhang Y., Zhang B., Liu J. 2016. Recent advances in halloysite nanotubes derived composites for water treatment. *Environ. Sci.: Nano*, 3: 28–44.

Abstrakt

INFLUENCE OF MODIFIED HNT ON THE PROPERTIES OF ULTRAFILTRATION POLYETHERSULFONE MEMBRANES

Ultrafiltration (UF) polyethersulfone (PES) membranes were prepared by phase inversion method. The *N,N* – dimethylformamide (DMF) was used as a solvent and water as nonsolvent. Commercial halloysite nanotubes (HNT) and modified halloysite nanotubes (m-HNT) were applied as nanofiller. Morphology were evaluated on scanning electron microscope (SEM) and topography on atomic force microscope (AFM). Positive influence of the modification on permeability was observed as well as on the separation and antifouling properties. The antifouling properties of the membranes were evaluated during ultrafiltration (UF) of bovine serum albumin (BSA) solution, after modification during the 2h of UF process a smaller decrease in permeate flux was observed.

Słowa kluczowe: polietersulfon, membrany polimerowe, nanorurki haloizytu, ultrafiltracja, fouling

Keywords: polyethersulfone, polymer membranes, halloysite nanotubes, ultrafiltration, fouling

Alicja Hołowiecka

Politechnika Lubelska

Studenckie Koło Naukowe „Kwaternion”

Opiekun: dr hab. Anna Kuczmaszewska, prof. Uczelni

ZASTOSOWANIE MODELI MIESZANYCH W ANALIZIE ROZWOJU PANDEMII COVID-19 NA ŚWIECIE

Wstęp i cel pracy

W momencie, gdy cały świat trwa w ogłoszonym przez WHO stanie pandemii i mimo ogromnego rozwoju medycyny nie jesteśmy w stanie zahamować rozprzestrzeniania się koronawirusa, bardzo ważne jest podejmowanie prób modelowania rozwoju choroby. Wiedza zdobyta w ten sposób może pomóc zarówno w chwili obecnej, jak i w przyszłości na wypadek pojawienia się kolejnych pandemii.

Praca ma na celu zidentyfikowanie czynników mających wpływ na rozwój pandemii choroby COVID-19 w różnych krajach. Zastosowane metody badawcze pozwalają na znalezienie czynników, które są „przeciętnie” istotne na całym świecie, co sprawia, że wyniki mogą być traktowane bądź jako ogólne studium rozwoju pandemii, bądź jako punkt wyjścia do bardziej szczegółowych rozważań dla poszczególnych krajów.

Materiał i metody badawcze

Zbiór badawczy pochodzi z witryny internetowej Our World In Data (Our World In Data 2020c), w której dane zostały zebrane z różnych źródeł, m.in. ze Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) oraz Europejskiego Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ECDC). W zbiorze znajduje się 210 krajów, dane dotyczące terytoriów międzynarodowych oraz łącznie dla całego świata.

W zbiorze zanotowano wiele braków danych. Dla każdego kraju zostały usunięte dane sprzed rozpoczęcia się epidemii na jego terytorium, dni są numerowane kolejnymi liczbami całkowitymi. Ze zbioru danych zostały usunięte wszystkie kraje o populacji poniżej miliona mieszkańców, ponieważ w większości były to nieduże wysepki, dla których dane były wybrakowane. Oprócz tego, kilka innych krajów zostało usuniętych, ponieważ mimo większej populacji, dane były niepełne. Zmienne, które posłużą do budowy modeli statystycznych, są przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1. Czynniki badane w pracy

Nazwa zmiennej	Opis zmiennej
<i>location</i>	Nazwa kraju
<i>total_cases_per_million</i>	Liczba potwierdzonych przypadków koronawirusa w danym kraju od początku pandemii w przeliczeniu na milion mieszkańców
<i>time</i>	Liczba dni od pierwszego przypadku koronawirusa w danym kraju
<i>total_tests_per_thousand</i>	Liczba testów na koronawirusa wykonanych w danym kraju od początku pandemii w przeliczeniu na tysiąc mieszkańców
<i>stringency_index</i>	Wskaźnik siły obostrzeń, kombinacja dziewięciu zmiennych, takich jak: zamykanie szkół, ograniczenie kontaktów międzyludzkich i inne (Our World In Data, 2020a). Przyjmuje wartości od 0 do 100, im wyższa wartość, tym silniejsze obostrzenia w danym kraju
<i>population_density</i>	Gęstość zaludnienia danego kraju
<i>GDP_per_capita</i>	PKB na osobę
<i>extreme_poverty</i>	Wskaźnik tego, jak duża część społeczeństwa kraju żyje w skrajnym ubóstwie
<i>diabetes_prevalence</i>	Wskaźnik powszechności występowania cukrzycy w danym kraju. Pod uwagę brane są osoby z przedziału wiekowego 20–70, dane pochodzą z roku 2017
<i>human_development_index</i>	Wskaźnik rozwoju społecznego (HDI)
<i>life_expectancy</i>	Oczekiwana długość życia w danym kraju, stan na 2019 r.

Źródło: opracowanie własne na podstawie (Our World In Data, 2020b).

Dane zostały ograniczone do zakresu od początku pandemii do 1 grudnia 2020 roku, ponieważ nie uwzględniają wpływu liczby zaszczepionych osób na liczbę zachorowań.

Do zbadania wpływu różnych czynników na liczbę zachorowań zostały użyte modele regresji prostej wraz z transformacją zmiennych oraz modele mieszane. Modele liniowe możemy stosować, jeżeli obserwacje są niezależne. Z kolei jeżeli wiele obserwacji było dokonywanych na jednym obiekcie (np. obserwacje liczby zachorowań dzień po dniu dla tego samego kraju) lub jeżeli nie interesuje nas efekt osobniczy (w tym przypadku efekt konkretnego kraju), to należy użyć modeli mieszanych (Biecek 2013).

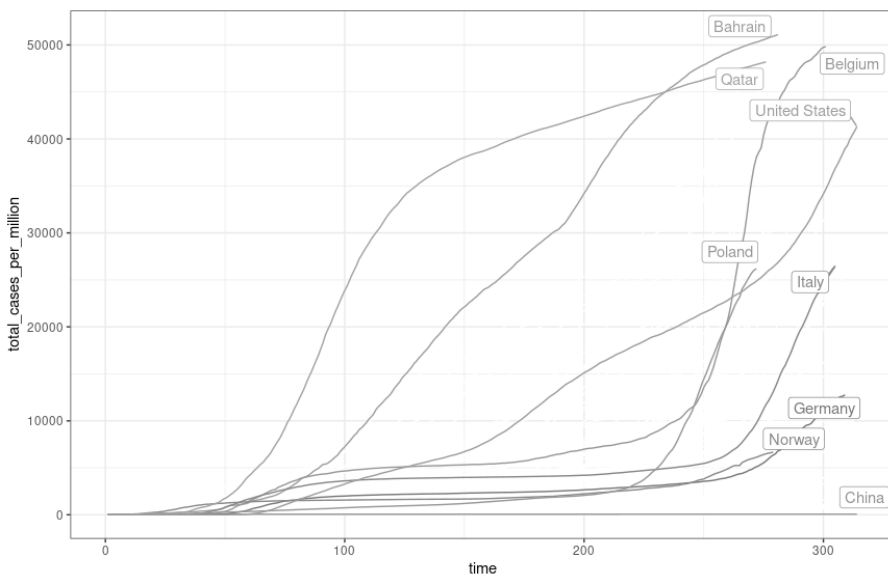
We wszystkich modelach mieszanych kraj jest czynnikiem losowym. Modele mieszane są budowane na podstawie całego zbioru danych. Modele regresji prostej są budowane na podstawie zbioru danych, w którym znajdują się po maksymalnie cztery obserwacje dla każdego kraju: po 3, 6, 9 i 12 miesiącach trwania epidemii. W przypadku modeli liniowych zastosowano konieczne przekształcenia zmiennych za pomocą transformacji Boxa-Coxa. Modele są dopasowywane przy użyciu środowiska R. Dla uproszczenia zapisu, we wszystkich modelach nazwa *total_cases* oznacza zmienną *total_cases_per_million*, a *total_tests* jest używane zamiennie z *total_tests_per_thousand*.

Wyniki i dyskusja

Zależność pomiędzy liczbą potwierdzonych zachorowań a czasem

Na początek interesuje nas dynamika rozwoju pandemii, badamy więc hipotezę, że czas ma istotny wpływ na liczbę zachorowań w poszczególnych krajach.

Na rysunku 1 jest pokazana zależność pomiędzy liczbą zachorowań a czasem (czas rozumiemy jako kolejne dni trwania epidemii). Widzimy, że największa liczba zachoro-



Rysunek 1. Wykres przedstawiający zależność liczby zachorowań od czasu dla wybranych krajów

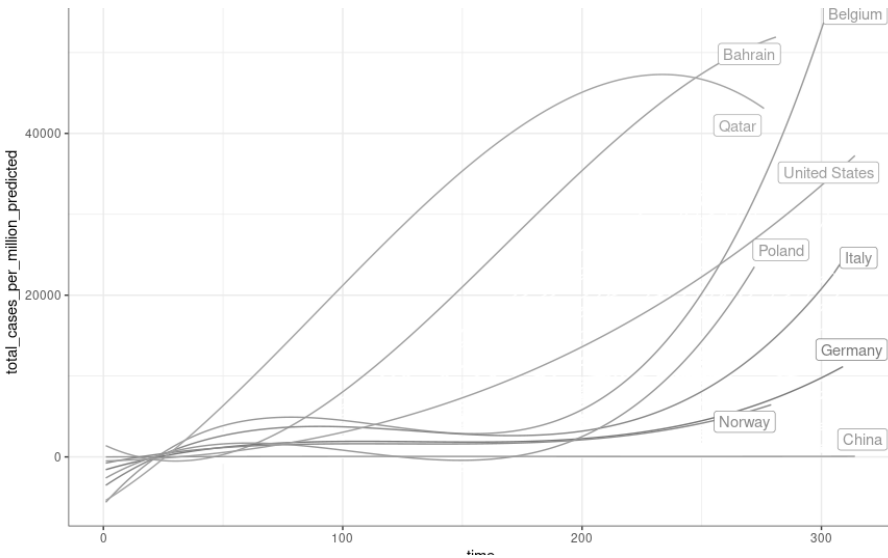
Źródło: opracowanie własne.

rowań (na milion mieszkańców) pojawia się w Bahrajnie i Katarze. W krajach takich, jak Polska, Niemcy, Włochy, Wielka Brytania, początkowo wzrost liczby zachorowań jest dość wolny, dopiero pomiędzy dwusetnym a trzysetnym dniem epidemii następuje bardziej gwałtowna zmiana. Jest to szczególnie widoczne na przykładzie Belgii, gdy pod koniec badanego okresu notowane są bardzo wysokie liczby zachorowań. Dla Chin wykres jest dość płaski, prawdopodobnie z powodu bardzo dużej populacji – w przeliczeniu na milion mieszkańców zachorowań w Chinach było najmniej.

Na podstawie wykresu można przypuszczać, że najlepiej będzie dopasowany model mieszany z wielomianem trzeciego stopnia, tj.:

$$y_{\text{total_cases}} = \beta_0 + X_{\text{time}} \beta_{\text{time}} + X_{\text{time}}^2 \beta_{\text{time}}^2 + X_{\text{time}}^3 \beta_{\text{time}}^3 + Z_{0,\text{location}} u_{0,\text{location}} + Z_{\text{time},\text{location}} u_{\text{time},\text{location}} + Z_{\text{time}^2,\text{location}} u_{\text{time}^2,\text{location}} + Z_{\text{time}^3,\text{location}} u_{\text{time}^3,\text{location}} + \varepsilon.$$

Badamy w tym modelu potęgę zmiennej *time* do trzeciej włącznie, a kraj traktujemy jako czynnik losowy. Okazuje się, że wszystkie potęgi zmiennej *time* są istotne. Dopasowanie modelu do danych widać na rysunku 2. Dla większości badanych krajów epidemię można podzielić na trzy umowne fazy: początkowy powolny wzrost, następnie stabilizacja, a jeszcze później – gwałtowny wzrost.

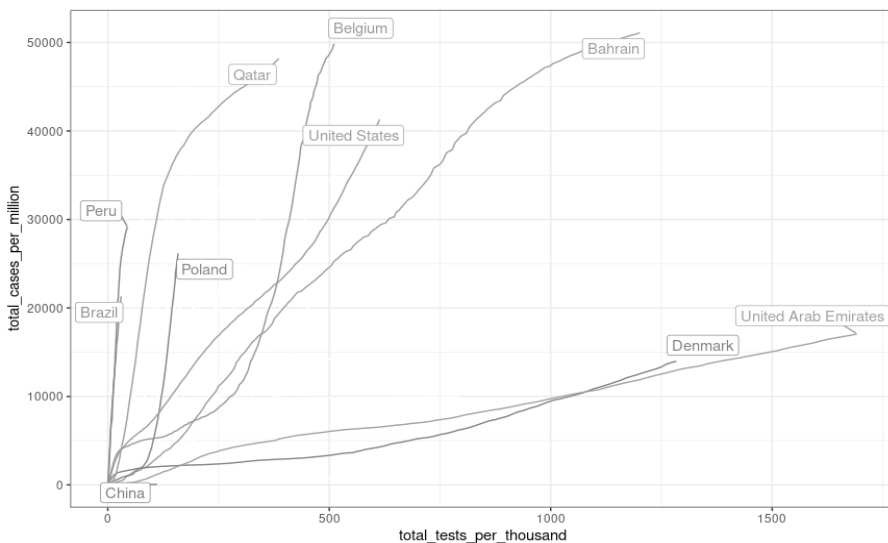


Rysunek 2. Dopasowanie modelu do zależności pomiędzy liczbą zachorowań a czasem dla wybranych krajów

Źródło: opracowanie własne.

Zależność pomiędzy liczbą potwierdzonych zachorowań a liczbą wykonywanych testów na koronawirusa

Liczba zachorowań jest ustalana na podstawie liczby pozytywnych wyników testów na COVID-19. W niektórych krajach potwierdzić zachorowanie można także na podstawie innych badań, na przykład tomografii albo RTG płuc, jednakże najpopularniejszą metodą diagnozowania tej choroby są testy. Z tego powodu zbadamy hipotezę, że istnieje związek pomiędzy liczbą potwierdzonych zachorowań, a liczbą wykonywanych testów na COVID-19.



Rysunek 3. Zależność pomiędzy liczbą zachorowań a liczbą wykonywanych testów dla wybranych krajów

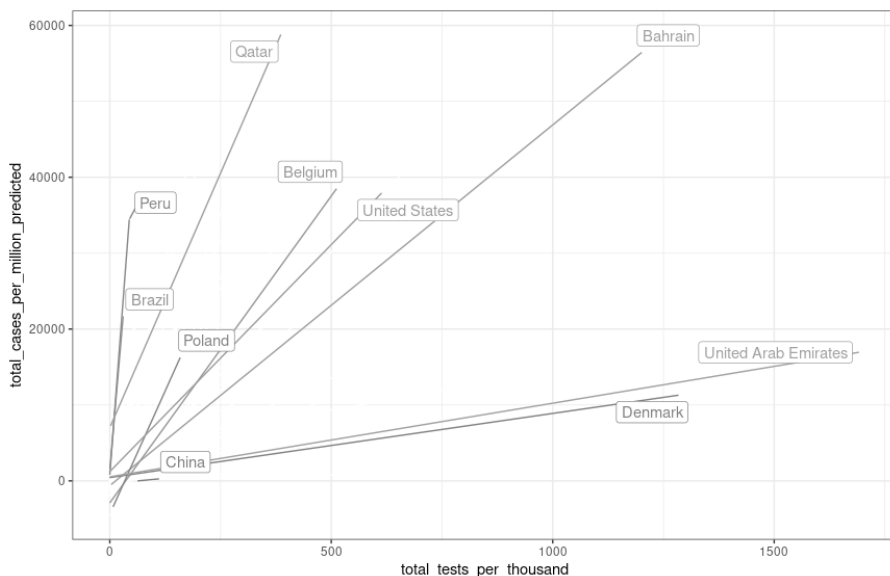
Źródło: opracowanie własne.

Na rysunku 3 przedstawiona jest zależność liczby zachorowań od liczby wykonywanych testów. Na pierwszy rzut oka widać, że wraz ze wzrostem liczby wykonywanych testów rośnie liczba potwierdzonych zachorowań. W niektórych krajach (np. Peru, Brazylia) ten wzrost jest bardzo gwałtowny, mimo stosunkowo niewielkiej liczby testów. W krajach takich, jak Polska czy Włochy widać też fazy epidemii, o których była mowa przy okazji zależności liczby zachorowań od czasu. W Danii i Zjednoczonych Emiratach Arabskich wykonywano bardzo dużo testów, ale wzrost liczby zachorowań jest wolniejszy niż w większości krajów.

Do danych dopasowujemy model mieszany postaci:

$$y_{\text{total_cases}} = \beta_0 + X_{\text{total_tests}} \beta_{\text{total_tests}} + Z_{0,\text{location}} u_{0,\text{location}} + Z_{\text{total_tests},\text{location}} u_{\text{total_tests},\text{location}} + \varepsilon.$$

Proste regresji dopasowane z tego modelu są widoczne na wykresie 4. Oddają one szybkość rozwoju pandemii w funkcji liczby wykonanych testów w poszczególnych krajach. Widać przykładowo, że proste regresji dla Danii i Zjednoczonych Emiratów Arabskich są nachylone pod stosunkowo małym kątem, a dla Brazylii i Peru kąt nachylenia jest duży. Wykres ten nie oddaje dokładnie dynamiki rozwoju pandemii; nie uwzględnia tego, że krzywe się wypłaszczały, aby potem gwałtowniej wzrosnąć. Ten model umożliwia jednak proste porównanie tempa wzrostu liczby potwierdzonych zachorowań w zależności od liczby wykonywanych testów.



Rysunek 4. Dopasowanie modelu do zależności pomiędzy liczbą zachorowań a liczbą wykonywanych testów dla wybranych krajów

Źródło: opracowanie własne.

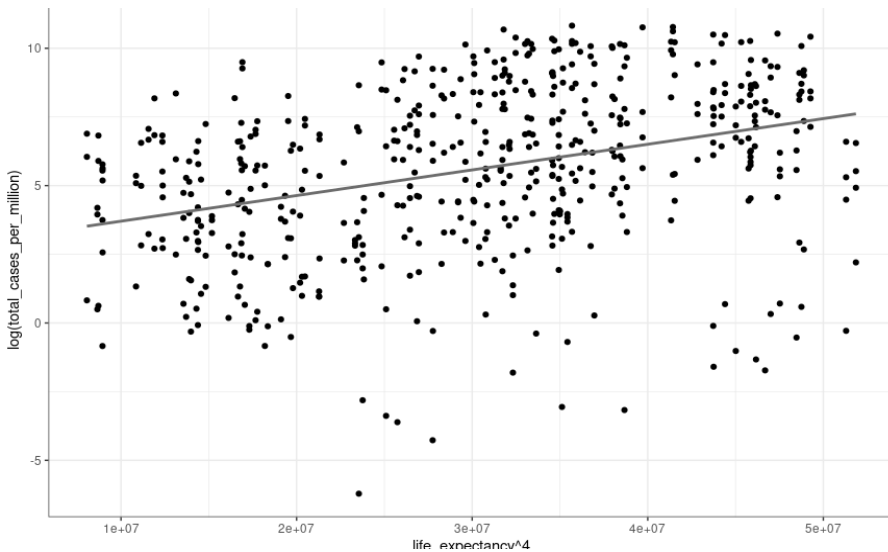
Zależność między liczbą potwierdzonych zachorowań a oczekiwaną długością życia

Można się spodziewać, że kraje o wyższej oczekiwanej długości życia charakteryzują się wyższą liczbą zachorowań, gdyż osoby starsze są bardziej narażone na zachorowanie, podczas gdy młodszy albo nie chorują, albo przechodzą infekcję bezobjawowo. Zbadamy hipotezę o tym, że kraje o różnej oczekiwanej długości życia różnią się potwierdzoną liczbą zachorowań. Trzeci model jest modelem liniowym, ponieważ cecha *life_expectancy* nie zmienia się dla danego kraju. Z transformacji Boxa-Coxa otrzymujemy następujące potęgi dla zmiennych: 3,72 dla *life_expectancy* oraz 0,09 dla *total_*

cases_per_million. W przybliżeniu przyjmijmy czwartą potęgę dla zmiennej x , a dla zmiennej y stosujemy przekształcenie logarymiczne, co daje model:

$$\log(y_{\text{total_cases}}) = \beta_0 + \beta_{\text{life_expectancy}} (X_{\text{life_expectancy}})^4 + \varepsilon.$$

Efekt *life_expectancy* jest istotny statystycznie (p-value poniżej 0,001). Współczynnik $\beta_{\text{life_expectancy}}$ wynosi około $8,54 \times 10^{-8}$. Jest on dodatni, co oznacza, że ze wzrostem oczekiwanej długości życia w danym kraju rośnie liczba zachorowań na COVID-19. Niska wartość tego współczynnika może wynikać z tego, że zmienna *life_expectancy* jest podniesiona do potęgi 4, więc obserwacje mają duże wartości. Dopasowanie modelu liniowego do danych widać na wykresie 5.



Rysunek 5. Zależność pomiędzy liczbą zachorowań a oczekiwaną długością życia z dopasowaną linią regresji

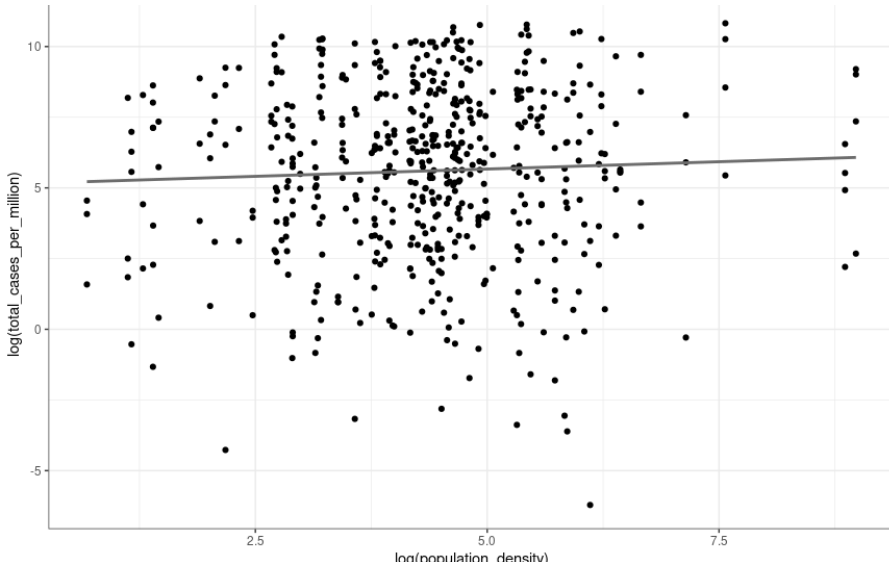
Źródło: opracowanie własne.

Zależność między liczbą potwierdzonych zachorowań a gęstością zaludnienia

Koronawirus rozprzestrzenia się drogą kropelkową, rozwojowi pandemii sprzyjają więc miejsca, gdzie dużo osób ma ze sobą kontakt osobisty. Dlatego rozważymy hipotezę, że gęstość zaludnienia ma wpływ na liczbę zachorowań. Zastosujemy model regresji prostej z przekształceniem logarytmicznym obu zmiennych:

$$\log(y_{\text{total_cases}}) = \beta_0 + \log(X_{\text{population_density}}) \beta_{\text{population_density}} + \varepsilon.$$

Wykres rozrzutu obu zmiennych po przekształceniu znajduje się na rysunku 6.



Rysunek 6. Zależność pomiędzy liczbą zachorowań a gęstością zaludnienia z dopasowaną linią regresji

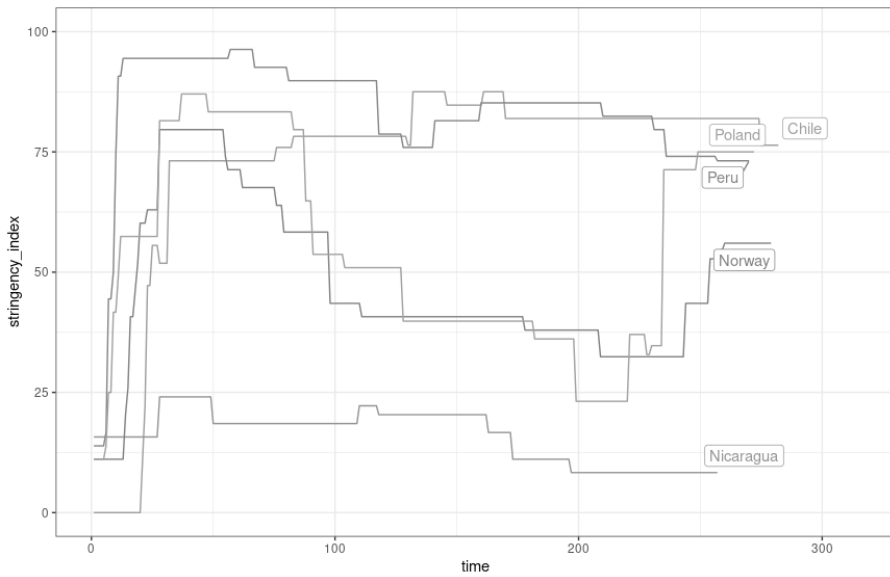
Źródło: opracowanie własne.

Gęstość zaludnienia nie jest czynnikiem istotnym statystycznie (p -value powyżej 0,05). Nie można mówić o istotnym związku pomiędzy gęstością zaludnienia a liczbą zachorowań.

Zależność między liczbą potwierdzonych zachorowań a siłą obostrzeń

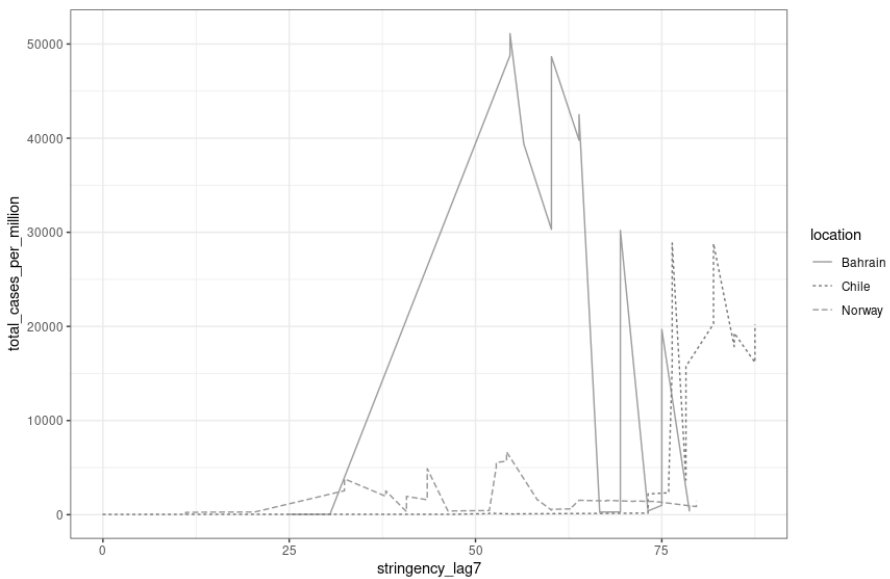
Aby spowolnić wzrost liczby zachorowań, kraje wprowadzają różne polityki obostrzeń, takie jak ograniczenia w przemieszczaniu się, zamknięcie szkół itp. Sprawdźmy więc prawdziwość hipotezy, że siła obostrzeń ma wpływ na liczbę zachorowań.

Siła obostrzeń jest mierzona za pomocą zmiennej *stringency_index*. Zarówno wartość średnia, jak i zmienność *stringency_index* bardzo się różnią pomiędzy krajami. Na rysunku 7 przedstawiono przebieg zmienności *stringency_index* w czasie. Jak widać, są kraje, jak np. Nikaragua, gdzie siła obostrzeń jest na niskim poziomie i ma małą zmienność. Mamy też kraje takie jak Chile lub Peru, w których obostrzenia wzrastały silnie na początku pandemii, a potem zmieniały się już mniej znacznie. W Norwegii obostrzenia początkowo były wysokie, a potem znacząco spadły. W Polsce początkowo poziom siły obostrzeń zmieniał się podobnie jak w Norwegii, ale pod koniec badanego przedziału czasowego znacząco wzrósł.



Rysunek 7. Zmiany siły obostrzeń w czasie dla wybranych krajów

Źródło: opracowanie własne.



Rysunek 8. Zależność liczby zachorowań od siły obostrzeń opóźnionej o 7 dni dla wybranych krajów

Źródło: opracowanie własne.

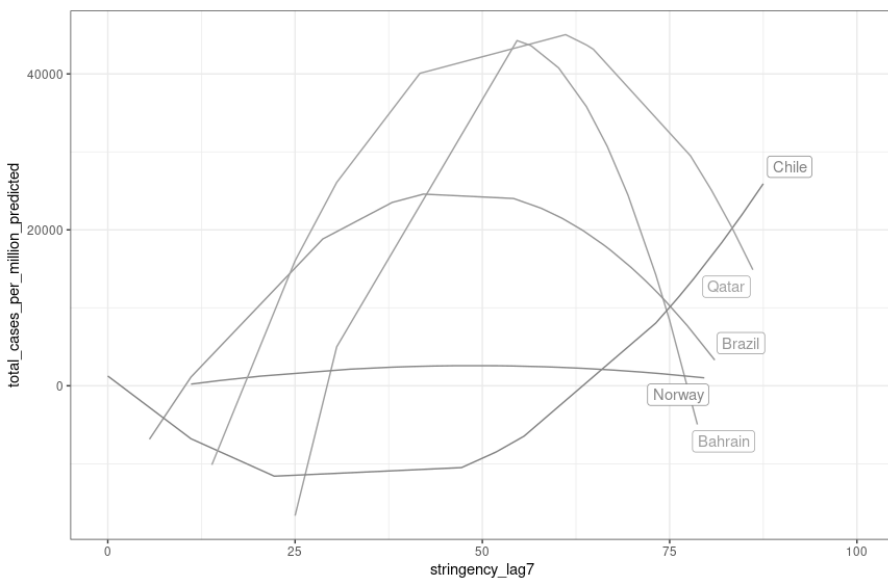
Przed budową modelu zostały przeanalizowane korelacje pomiędzy liczbą zachorowań a zmienną *stringency_index* bez opóźnienia oraz z opóźnieniem kolejno 7, 14, 21, 28, 35 i 42 dni. Najwyższa korelacja wystąpiła przy opóźnieniu o 7 dni, więc tak opóźnionej zmiennej użyjemy do budowy modelu mieszanego. Rysunek 8 jest wykresem zależności liczby zachorowań od siły obostrzeń opóźnionej o 7 dni.

Ponieważ z wykresu 8 widać, że zależność między opóźnioną siłą obostrzeń a liczbą zachorowań raczej nie jest liniową, to dopasujemy model mieszany z drugą potęgą zmiennej *stringency_lag7*:

$$Y_{\text{total_cases}} = \beta_0 + \beta_{\text{stringency_lag7}} X_{\text{stringency_lag7}} + \beta_{(\text{stringency_lag7})^2} X_{(\text{stringency_lag7})^2} + Z_{\text{location}} u_{\text{location}} + Z_{\text{stringency_lag7,location}} u_{\text{stringency_lag7,location}} + Z_{(\text{stringency_lag7})^2, \text{location}} u_{(\text{stringency_lag7})^2, \text{location}} + \epsilon.$$

Współczynnik przy drugiej potędze *stringency_lag7* jest istotny statystycznie (p-value poniżej 0.001) i wynosi -402699.65 . Efekt pierwszej potęgi *stringency_lag7* nie jest istotny, ale nie możemy go usunąć z modelu, ponieważ jest istotny efekt wyższego rzędu.

Wykres zależności liczby zachorowań od *stringency_lag7* i drugiej potęgi tej zmiennej widać na rysunku 9. W większości krajów współczynnik przy drugiej potędze *stringency_lag7* rzeczywiście jest ujemny, co oznacza, że po przekroczeniu pewnego punktu (a dokładniej wierzchołka paraboli) liczba zachorowań zaczyna spadać. Wyjątkiem jest tu np. Chile, gdzie zależność jest odwrotna.



Rysunek 9. Dopasowanie modelu do zależności pomiędzy liczbą zachorowań a siłą obostrzeń opóźnioną o 7 dni

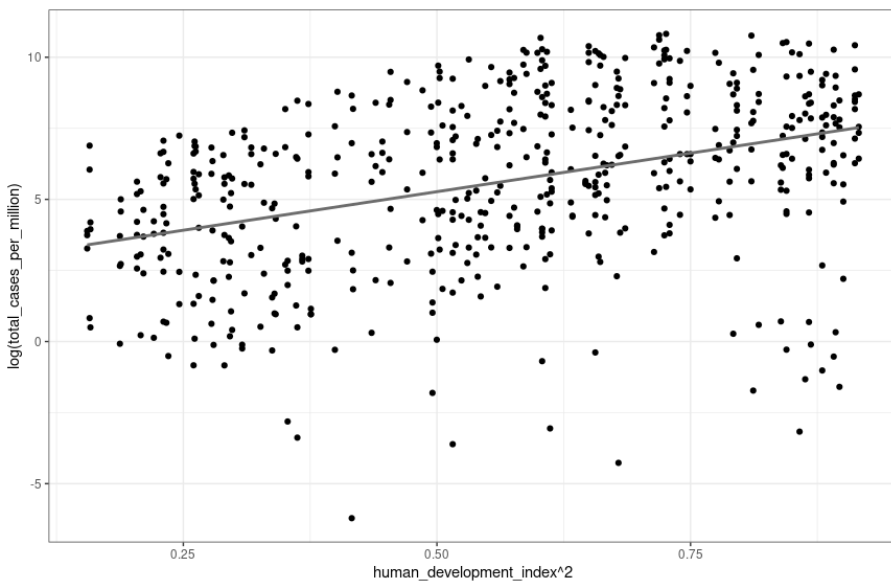
Źródło: opracowanie własne.

Zależność między liczbą potwierdzonych zachorowań a wskaźnikiem rozwoju społecznego

Wskaźnik rozwoju społecznego mówi o tym, jak rozwinięty jest kraj pod względem m.in. gospodarki i edukacji, bierze się w nim pod uwagę także oczekiwaną długość życia. Zbadamy hipotezę mówiącą, że kraje o różnej wysokości wskaźnika rozwoju społecznego (*HDI*) różnią się liczbą zachorowań. Ponieważ wartość *HDI* nie zmienia się dla kraju w trakcie trwania epidemii, to szósty model jest modelem regresji prostej. Z przekształcenia Boxa-Coxa otrzymujemy potęgę 2 dla zmiennej *HDI* oraz logarytm dla *total_cases_per_million*:

$$\log(y_{\text{total_cases}}) = \beta_0 + \beta_{\text{HDI}}(X_{\text{HDI}})^2 + \varepsilon.$$

Współczynnik β_{HDI} wynosi około 5,57 i jest istotny statystycznie (p-value poniżej 0,001). Wartość tego współczynnika jest dodatnia, co oznacza, że im wyższy wskaźnik rozwoju społecznego w danym kraju, tym więcej potwierdzonych przypadków COVID-19. Dopasowanie modelu do danych jest ukazane na rysunku 10.



Rysunek 10. Zależność pomiędzy liczbą zachorowań a wskaźnikiem rozwoju społecznego z dopasowaną linią regresji

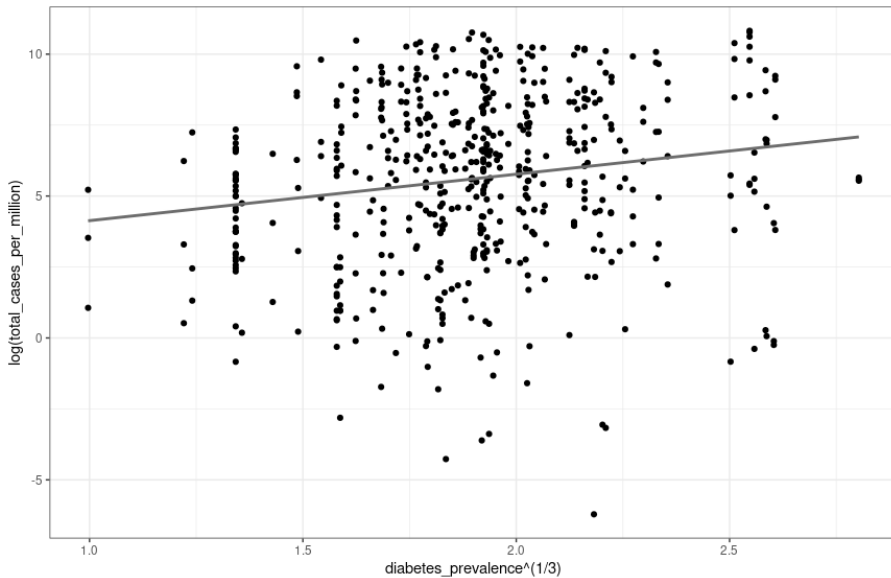
Źródło: opracowanie własne.

Zależność między liczbą potwierdzonych zachorowań a powszechnością cukrzycy

Wśród czynników osłabiających odporność organizmu często jest wymieniana cukrzyca (Duszyński i in. 2020, Pawlak 2020). Dlatego zbadamy hipotezę, że rozpowszechnienie cukrzycy wpływa na liczbę zachorowań na COVID-19. Model ten jest modelem regresji prostej. Na podstawie transformacji Boxa-Coxa otrzymujemy pierwiastek trzeciego stopnia ze zmiennej *diabetes_prevalence* oraz logarytm z *total_cases_per_million*:

$$\log(y_{\text{total_cases}}) = \beta_0 + \beta_{\text{diabetes_prevalence}} (X_{\text{diabetes_prevalence}})^{1/3} + \varepsilon.$$

Wartość współczynnika $\beta_{\text{diabetes_prevalence}}$ jest równa 1,65. Efekt ten jest istotny statystycznie (p-value poniżej 0,001). Dodatnia wartość współczynnika potwierdza hipotezę, że wraz ze wzrostem części populacji chorującej na cukrzycę, rośnie liczba potwierdzonych zachorowań. Dopasowanie modelu liniowego do danych po przekształceniu jest zaprezentowane na rysunku 11.



Rysunek 11. Zależność pomiędzy liczbą zachorowań a rozpowszechnieniem cukrzycy z dopasowaną linią regresji

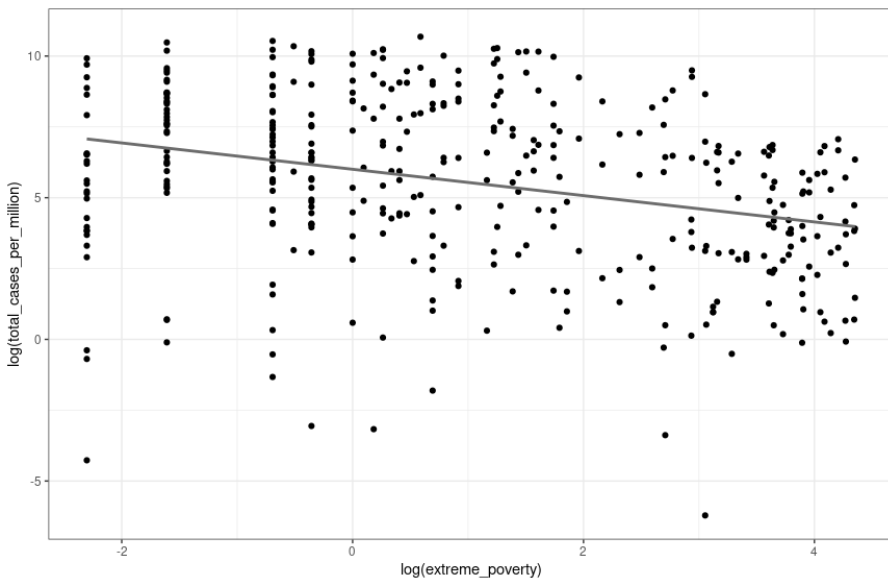
Źródło: opracowanie własne.

Zależność między liczbą potwierdzonych zachorowań a częścią populacji żyjącą w skrajnej biedzie

Kraje, w których więcej osób żyje w ubóstwie, na ogół charakteryzują się słabszym dostępem do służby zdrowia oraz niższym poziomem opieki medycznej. Zajmiemy się więc hipotezą zakładającą, że kraje o różnej liczbie osób żyjących w skrajnej biedzie różnią się liczbą zachorowań. Ten model jest modelem regresji prostej. Stosując transformację Boxa-Coxa, otrzymujemy przekształcenie logarytmiczne dla obu zmiennych w modelu:

$$\log(y_{\text{total_cases}}) = \beta_0 + \beta_{\text{extreme_poverty}} \log(X_{\text{extreme_poverty}}) + \varepsilon.$$

Czynnik *extreme_poverty* jest istotny statystycznie (p-value poniżej 0,001). Współczynnik $\beta_{\text{extreme_poverty}}$ wynosi $-0,46$. Jest on ujemny, więc im większy jest w danym kraju odsetek osób żyjących w biedzie, tym niższa liczba zachorowań. Prawdopodobnie jest to spowodowane mniejszą dostępnością do służby zdrowia w biedniejszych krajach i mniejszą liczbą wykonywanych testów. Na rysunku 12 przedstawiona jest zależność między przekształconymi logarytmicznie liczbą zachorowań a odsetkiem osób żyjących w skrajnej biedzie z dopasowanym modelem liniowym.



Rysunek 12. Zależność pomiędzy liczbą zachorowań i częścią populacji żyjącą w skrajnej biedzie z dopasowaną linią regresji

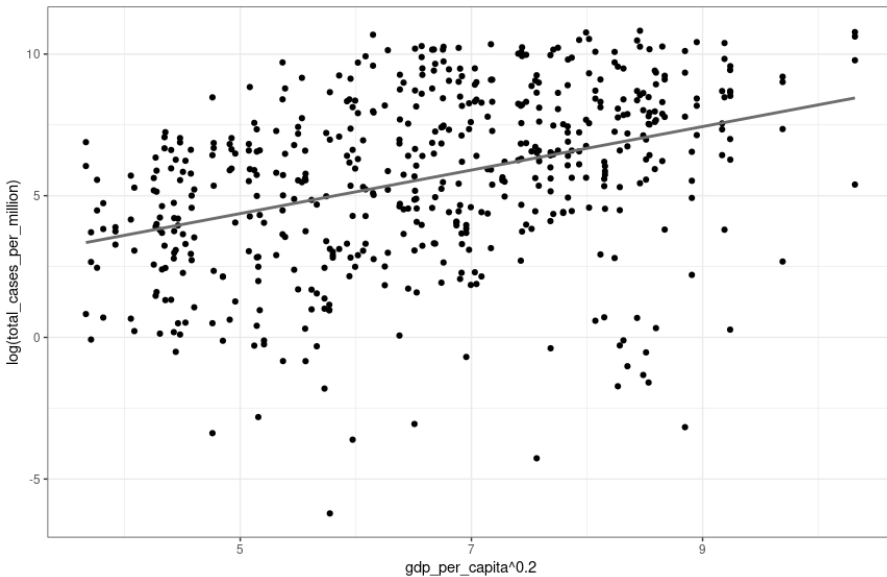
Źródło: opracowanie własne.

Zależność między liczbą potwierdzonych zachorowań a wysokością PKB na osobę

Wysokie PKB na osobę wskazuje na kraje dobrze rozwinięte gospodarczo, spodziewamy się w nich dobrego dostępu do opieki medycznej. Sprawdźmy hipotezę, że kraje o różnej wysokości PKB na osobę różnią się liczbą zachorowań. Model dziewiąty jest modelem regresji prostej. Na podstawie przekształcenia Boxa-Coxa otrzymujemy pierwiastek piątego stopnia z gdp_per_capita oraz logarytm z $total_cases_per_million$:

$$\log(y_{total_cases}) = \beta_0 + \beta_{GDP} (X_{GDP})^{1/5} + \epsilon.$$

PKB na osobę jest istotny statystycznie (p-value poniżej 0,001). Współczynnik β_{GDP} wynosi 0,79. Jest on dodatni, więc im wyższe PKB danego kraju, tym wyższa liczba zachorowań. Na rysunku 13 widać wykres rozrzutu zmiennej $total_cases_per_million$ w zależności od gdp_per_capita po przekształceniu z dopasowanym modelem liniowym.



Rysunek 13 Zależność pomiędzy liczbą zachorowań a PKB na osobę z dopasowaną linią regresji

Źródło: opracowanie własne.

Podsumowanie

Wnioski dotyczące wpływu różnych czynników na liczbę zachorowań w krajach całego świata są przedstawione w tabeli 2.

Tabela 2. Wpływ badanych czynników na liczbę zachorowań

Cecha	Wpływ na liczbę zachorowań
Czas	istotny, można do tej zależności dopasować wielomian trzeciego stopnia
Liczba wykonywanych testów	istotny, wraz ze wzrostem liczby testów rośnie liczba zachorowań
Oczekiwana długość życia	istotny, ze wzrostem oczekiwanej długości życia rośnie liczba zachorowań
Gęstość zaludnienia	nieistotny
Wskaźnik siły obostrzeń	istotny jest wskaźnik opóźniony o 7 dni, w większości krajów przy wysokiej sile obostrzeń jest mniej zachorowań
Wskaźnik rozwoju społecznego	istotny, w krajach o wysokim wskaźniku rozwoju jest więcej zachorowań
Powszechność występowania cukrzycy	istotny, im wyższy jest ten współczynnik, tym więcej przypadków koronawirusa
Część populacji żyjąca w skrajnym ubóstwie	istotny, im większa jest część mieszkańców żyjąca w biedzie, tym mniej zachorowań
PKB na osobę	istotny, im wyższe PKB, tym więcej zachorowań

Źródło: opracowanie własne.

Przedstawione w tej pracy modele pozwoliły wstępnie zidentyfikować czynniki mające wpływ na rozwój pandemii koronawirusa. Należy jednak pamiętać, że te efekty są istotne dla „przeciętnego kraju”, więc nie w każdym kraju zależności te będą wyglądać tak samo – dobrze widać to na przykładzie modelu z siłą obostrzeń, który to czynnik bardzo różnił się pomiędzy badanymi krajami. Rozwój pandemii jest procesem niezwykle złożonym, jednakże widać, że nawet użycie prostych metod statystycznych pozwala na wyciągnięcie pewnych wniosków na ten temat.

Bibliografia

Biecek P. 2013. Analiza danych z programem R. Modele liniowe z efektami stałymi, losowymi i mieszanymi. Wydawnictwo Naukowe PWN, Wydanie II, Warszawa

- Duszyński J., Afelt A., Ochab-Marcinek A., Owczuk R., Pyrc K., Rosińska M., Rychard A., Smiatcz T. 2020. Zrozumieć COVID-19. Opracowanie zespołu ds. COVID-19 przy Prezecie Polskiej Akademii Nauk. Polska Akademia Nauk
- Our World In Data. Covid 19: Stringency Index. <https://ourworldindata.org/covid-stringency-index> (dostęp: 09.01.2021)
- Our World In Data. Covid Codebook. <https://github.com/owid/covid-19-data/blob/master/public/data/owid-covid-codebook.csv> (dostęp: 09.01.2021)
- Our World In Data. Statistics and Research. Coronavirus Pandemic. <https://ourworldindata.org/coronavirus> (dostęp: 30.11.2020)
- Pawlak M. Kto jest w największej grupie ryzyka koronawirusa? <https://www.medonet.pl/koronawirus-pytania-i-odpowiedzi/sars-cov-2,kto-jest-w-najwiekszej-grupie-ryzyka-koronawirusa-,artykul,48398767.html> (dostęp: 09.01.2021)

Abstract

THE USE OF MIXED-EFFECTS MODELS IN THE ANALYSIS OF THE COVID-19 PANDEMIC IN THE WORLD

Modelling the development of a pandemic is an extremely important issue these days, as it can allow for better prevention of its spread. The coronavirus pandemic is a problem that touches many countries, so it is important to look at this problem globally. This study's aim is to identify the factors that significantly affect the increase or decrease of number of cases of the COVID-19 disease in countries around the world. The research was conducted on a dataset of about 150 countries that was collected from the beginning of the pandemic until the end of November 2020. Linear and mixed-effects models were used to draw statistical conclusions. This research enabled identification of factors that have a stimulating or limiting effect on the number of cases and exclusion of irrelevant factors. The results can be treated either as a general study of pandemic development worldwide or as a starting point for more detailed country-specific considerations.

Słowa kluczowe: pandemia, koronawirus, modelowanie, modele mieszane, regresja

Keywords: pandemic, coronavirus, modelling, mixed-effects models, regression

Martyna Jurkiewicz

Barbara Hanna Roman

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Doktoranckie Koło Naukowe „Zielona Chemia”

Opiekun: dr hab. inż. Robert Pełech, prof. ZUT

EFFECT OF MODIFICATION OF THE ADSORBENT WITH ORGANIC COMPOUNDS ON THE ADSORPTION OF MULTICOMPONENT MIXTURES FROM THE GAS PHASE

1. Introduction

Activated carbon is of wide interest due to its remarkable properties. This adsorbent can produce a developed porosity and a large internal surface. This allows to obtain a large adsorption surface, and thus high absorption capacity for solvent vapors and gases (Derbyshire et al. 2001). It is characterized by good mechanical strength. The great advantage is the regeneration of this material by e.g. thermal or pressure swing desorption, oxidation of organic substances.

Activated carbon is obtained by carbonization of the raw material in an inert gas atmosphere to remove elements, e.g. sulfur, oxygen. Then activation takes place. This causes the development of a porous structure and obtaining a large specific surface by cleaning it from amorphous carbon (Bansal, Goyal 2009). There are chemical and physical activation. During chemical activation, the process of carbonization and activation is carried out simultaneously. Activated carbon reacts with an activating agent such as NaOH, H₃PO₄ (Hayashia et al. 2000; Tseng 2007). In physical activation, water vapor, carbon dioxide, or a mixture thereof are used to cause the expansion of the porous structure of the char (San Miguel et al. 2003; Bouchelta et al. 2008).

In the impregnation process, the so-called surface functional groups, and possibly ions or metals, which determine the nature of the active carbon surface, are responsible for the efficiency and selectivity of the separation (Bansal, Goyal 2009; Pełech et al. 2016). Oxygen groups (carboxyl, lactone, and others) are most often present on the

commercial surfaces of active carbons. New sorption properties of the adsorbent are obtained by exchanging oxygen groups with other groups, e.g. amine, ester, or deeper oxidation of the surface (Peřech et al. 2016).

Activated carbon is most often obtained from wood, hard and brown coal (Jasieńko-Hałat, Kędzior 2005; Nakai et al. 2007). Contemporary pro-ecological trends are looking for new possibilities of recycling waste. Activated carbon began to be produced from fruit seeds and nutshells, sewage sludge, agricultural waste, lignin, plastics (Graham et al. 2001; Suárez-García et al. 2001; Ballice, Reimert 2002; Aygun et al. 2003; Tsai et al. 2006; Dias et al. 2007; Lian et al. 2011).

The use of activated carbon is very wide. It is used to remove various types of pollutants from air and water. It is used in chemical, food, pharmaceutical, medical, sewage treatment, petrochemical, and other industries. (Lillo-Ródenas et al. 2006; Hameed, Rahman 2008; Danish et al. 2011; Jafarinejad 2017; Zawadzki et al. 2017; Bernal et al. 2018; Guillossou et al. 2019; Amgbara et al. 2020).

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (TRIS) and melamine are amines. They are easily available and chemically stable compounds. During the activation of activated carbon, it plays the role of electrophiles (Chabre et al. 2008), enabling its effective modification.

2. Purpose

The aim of the study was to determine the influence of adsorbent modifications by organic compounds (DL-malic acid, trisma, melamine) on the adsorption from the gas phase of air mixtures with: acetone and ethyl acetate, toluene and n-butyl acetate.

3. Material and methods

The coal-based granular activated carbon WG – 12 (Grand Activated Sp. z o. o.) was used as an adsorbent. It was impregnated by DL-malic acid, trisma, melamine in amount 0,2 g impregnate per gram of activated carbon. For trisma and malic acid, dissolution was carried out at room temperature, while melamine was dissolved in boiling water. 50 g of untreated activated carbon was poured into an aqueous solution of the impregnate and stirred by a mechanical stirrer at room temperature for 3 hours. The whole was then dried for 12 hours at 80°C. The next step was to heat the samples at 600°C in Goldbrunn Therm GBPC-3000 crucible furnace. The samples thus prepared were eluted with distilled water and dried for 12 hours at 80°C. The activated carbon samples were named:

- (a) for untreated adsorbent – WG-12-untreated
- (b) for malic acid-modified – WG-12-MA

(c) for trisma-modified – WG-12-T

(d) for melamine-modified – WG-12-Mel

A 10 g sample of each adsorbent was directed to the adsorber. The experimental setup is shown in Figure 1. Mixtures of acetone (pure p. a., Stanlab) with ethyl acetate (pure p. a., Chempur) and toluene (pure p.a., POCH S.A.) with n-butyl acetate (pure p.a., EUROCHEM BGD Sp. z o. o.) were used as adsorbates. The temperature in the thermostat 4 was set at 15°C. The air fed from the compressor was directed through rotameters to the rinsers containing solvents. From the bottom, a feeding stream was introduced to the fixed-bed, which was a mixture of air with acetone and ethyl acetate (or toluene and n-butyl acetate) vapors. The choice of flow rate was influenced by the vapor pressure of the solvents. The values of the flow rates are given in the Table 1. A gas sample was taken before the adsorption bed (5a) to determine concentration changes during adsorption and to determine the initial concentrations C_0 of each adsorbate. The concentration of adsorbates was defined by gas chromatography with a flame ionization detector (FID) using a Trace GC Ultra ThermoElectron with a RESTEK RTX - 1701 column, taking a gas sample every 4-5 minutes (5b) and injecting 500 μl of gas (mixture 1). For the adsorption of mixture 2, measurements were made every 10-20 minutes. Measurements were carried out until the ethyl acetate or n-butyl acetate concentration reached $>0.9C_0$. At that point, the gas supply was turned off, and the adsorbent was weighed to appoint the total adsorption value (a_{sum}). From the peak areas obtained by chromatographic analyses, the changes in concentrations over time were determined, and breakthrough curves were prepared (Fig. 2 and Fig. 3), and appropriate calculations were made. The results are shown in Table 2. The adsorbent samples were analyzed for ash content by thermogravimetric analysis (TG 209 F1 Libra) and results are shown in Table 3. The results of the elemental analysis (using CHNS-O ANALYZER, FLASH 2000, Organic Elemental Analyzer) are shown in Table 4.

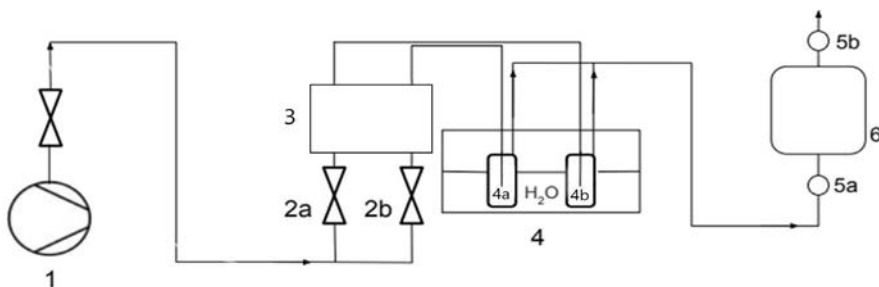


Figure 1. Schematic diagram of the experimental setup: 1 – compressor, 2a, 2b – control valves, 3 – mass flow controller, 4 – thermostat filled with distilled water, 4a – rinser with acetone, 4b – rinser with ethyl acetate, 5a – sampling point (inlet concentration), 5b – sampling point (outlet concentration), 6 – adsorber

Source: own study

The following formulae were used for the calculations:

$$1) a_{\text{sum}} = \frac{m_{z2} - m_z}{m_z} \cdot 1000$$

$$2) a_1 = \frac{q}{m_z} \left(C_{0,i} \cdot t - \int_0^t C dt \right)$$

a_{sum} – total adsorption value for two components [mg/g]

m_{z2} – adsorbent weight after adsorption process [g]

m_z – adsorbent weight before adsorption process [g]

a_1 – adsorption capacity for each adsorbate [mg/g]

q – gas flow [l/min]

$C_{0,i}$ – initial concentration of each adsorbate [mg/l]

t – analysis time [min]

Table 1. Values of the gas flows

Mixture	Component	Flow rate [l/h]
1	acetone	3
	ethyl acetate	6
	air	8
2	toluene	9
	n-butyl acetate	20
	air	1

Source: own study

4. Research results and discussion

Table 2 shows the adsorption capacity results for each adsorbent.

Table 2. Results of adsorption capacities for each adsorbate

	AC+EA (1)				T+BA (2)			
	a_{AC} [mg/g]	a_{OE} [mg/g]	$a_{\text{sum}1}$ [mg/g]	$\frac{a_{EA}}{a_{AC}}$	a_T [mg/g]	a_{OB} [mg/g]	$a_{\text{sum}2}$ [mg/g]	$\frac{a_{EA}}{a_T}$
WG-12-untreated	80	207	276	2,59	110	171	283	1,55
WG-12-MA	75	216	282	2,89	111	192	312	1,74
WG-12-T	63	180	238	2,85	102	167	271	1,63
WG-12-Mel	52	140	188	2,70	73	124	191	1,69

Source: own study; AC – acetone; EA – ethyl acetate; T – toluene; BA – n-butyl acetate

For the adsorption of mixture 1, a higher adsorption capacity was observed for ethyl acetate than for acetone, for both unmodified and modified adsorbents. Adsorption on modified activated carbons increased the a_{EA}/a_{AC} ratio. What is more, the acetone-ethyl acetate vapor mixture adsorbed most efficiently on activated carbon modified with DL-malic acid. Modifications with other compounds did not improve the adsorption efficiency. Similar trends were observed for the adsorption of mixture 2. Toluene and n-butyl acetate vapors were adsorbed on DL-malic acid-modified activated carbon with the highest efficiency. Compared to the untreated adsorbent, the modifications with trisima and melamine worsened the adsorption efficiency. In addition, modifications of the adsorbent increased the a_{BA}/a_T ratio. Moreover, activated carbon WG - 12 adsorbed n-butyl acetate preferable to toluene.

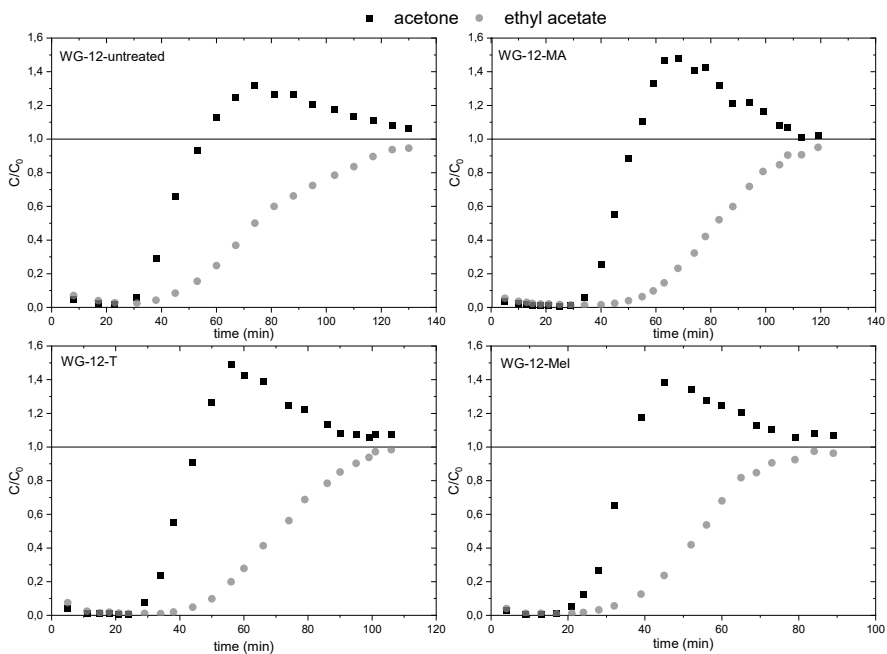


Figure 2. Experimental breakthrough curves for the adsorption of acetone and ethyl acetate vapors

Source: own study

The shape of the breakthrough curve gives information about the displacement phenomenon and interactions between adsorbate and adsorbent surface. In Fig. 2 the breakthrough curves illustrating the adsorption process of acetone - ethyl acetate vapors. The curves corresponding to acetone are characterised by a clear maximum followed by a transition into the Plateau region. The outlet concentration of acetone exceeds its inlet concentration (indicated by a horizontal straight line passing through

1). The ethyl acetate breakthrough curves are characterised by a slight rise and a move towards the inlet concentration value, but this is not exceeded. The breakthrough time of the adsorption bed is longer for ethyl acetate than for acetone, with a clear increase during adsorption on WG-12-MA. Acetone is displaced from the adsorption bed by the less volatile ethyl acetate, so the outlet acetone concentration exceeds its inlet concentration by 30% (WG-12-untreated) or even 50% (WG-12-MA).

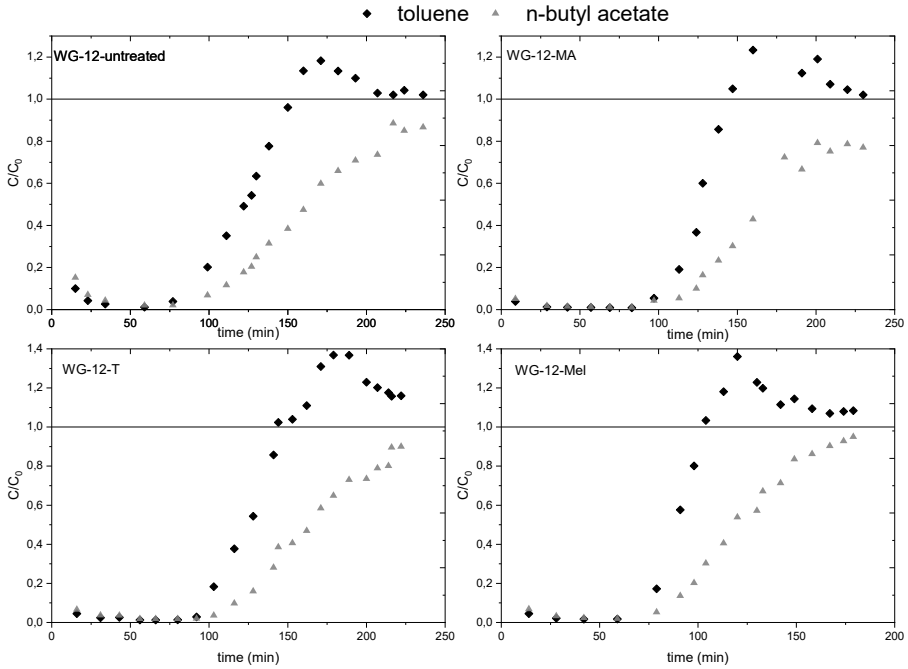


Figure 3. Experimental breakthrough curves for the adsorption of toluene and n-butyl acetate vapors

Source: own study.

In Fig. 3 the breakthrough curves illustrating the adsorption process of toluene – n-butyl acetate vapors. After a certain time, the outlet concentration of toluene is higher than its inlet concentration - the less volatile n-butyl acetate displaces the more volatile toluene from the adsorption bed. At the same time, the outlet concentration of n-butyl acetate not exceed its initial value. Adsorption on modified adsorbents enhances the displacement effect, especially on WG-12-T and WG-12-Mel. The breakthrough times are similar – somewhat shorter for toluene than n-butyl acetate by about 5 minutes.

The modification of WG-12 activated carbon resulted in a reduction in the ash content of the samples. The effect is most pronounced with the WG-12-MA sample. We suppose that some of the ash may also have been removed during the washing of the samples with distilled water.

Table 3. Results of the thermogravimetric analyses

Sample	Ash content [%]
WG-12-untreated	23,54
WG-12-MA	13,77
WG-12-T	14,66
WG-12-Mel	14,82

Source: own study

Table 4. Results of the elemental analysis

Sample	Content of chemical elements [%]			
	C	H	N	O
WG-12-untreated	71,95	0,51	0,65	4,61
WG-12-MA	77,01	0,63	0,68	3,82
WG-12-T	75,66	0,39	1,61	2,70
WG-12-Mel	67,45	0,53	7,46	4,16

Source: own study

As a result of the temperature and chemical treatments of the WG-12-MA and WG-12-T samples, their degree of carbonisation increased compared to the WG-12-untreated sample. In contrast, the carbon content of the WG-12-Mel sample decreased, while the nitrogen content increased significantly. Nitrogen was introduced to the surface of the activated carbon using an activating agent (in samples WG-12-T and WG-12-Mel). The exact determination of the type of nitrogen functional groups will be the subject of our further research. These modifications also reduced the oxygen content of the samples, which may be due to the detachment of oxygen groups from the adsorbent surface.

5. Summary

Adsorption studies on WG-12 modified activated carbon were carried out. Activated carbon (modified and unmodified) WG – 12 shows a higher adsorption affinity for ethyl acetate than for acetone and for n-butyl acetate than toluene. Using thermogravimetric analysis, the ash content of the samples was determined, while elemental analysis provided information on changes in the elemental composition of the adsorbents. The modifications affected the elemental composition of the adsorbents and reduced the ash content of the samples. The surface modifications of activated carbons influenced its adsorption properties and selectivity toward using adsorbates. For both mixtures, activated carbon modified with DL-malic acid was the most effective adsorbent.

The adsorbate molecules competed with each other for adsorption sites, but it was ethyl acetate that more strongly displaced acetone from the adsorption bed. During the adsorption process of the second mixture, n-butyl acetate displaced toluene from the adsorption bed. Such a phenomenon is indicative of competitive adsorption. To sum up, the volatility of adsorbates plays an important role in the adsorption of VOC mixtures on WG-12 activated carbon - the less volatile component is adsorbed to a bigger extent and displaces the more volatile component from adsorption bed.

Literature

- Amgbara T., Ayotamuno J., Kalu Uche Ch. 2020. Solidification and stabilization of petrochemical flocculation effluent (sludge) after treatment with activated carbon.
- Aygun A., Yeniso-y-Karakasb S., Duman I. 2003. *Production of granular activated carbon from fruit stones and nutshells and evaluation of their physical, chemical and adsorption properties*. Micropor. Mesopor. Mat. 66:189–195.
- Ballice L., Reimert R. 2002. *Temperature-programmed co-pyrolysis of Turkish lignite with polypropylene*. J. Anal. Appl. Pyrol. 65:207–219.
- Bansal R., Goyal M. 2009. *Adsorpcja na węglu aktywnym*. Wydawnictwo Naukowo- Techniczne, Warszawa.
- Bernal V., Giraldo L., Moreno-Pirajan. 2018. *Physicochemical properties of activated carbon: their effect on the adsorption of pharmaceutical compounds and adsorbate-adsorbent interactions*. J. Carbon Res. 4, 62.
- Bouchelta C., Medjram M., Bertrand O., Bellat J. 2008. *Preparation and characterization of activated carbon from date Stones by physical activation with steam*. J. Anal. Appl. Pyrol. 82:70–77.
- Chabre, Y.M., Contino-Pepin Ch., Placide V., Shiao T., Roy R. 2008. *Expeditive synthesis of glycodendrimer scaffolds based on versatile TRIS and mannoside derivatives*. J. Org. Chem. 73:5602–5605.
- Danish M., Rafatullah M., Sulaiman O., Hashim R., Ahmad T. 2011. in *Advances in Chemistry Research*, ed. James C. Taylor, chapter 3: Activated Carbons: Preparations and Characterizations, Vol. 11, p-38.
- Derbyshire F., Jagtoyen M., Andrews R., Rao A., Martin-Gullon I., Grulke E.A. 2001. *Carbon materials in environmental applications*. Chem. Phys. Carbon, Vol. 27, ed. L.R. Radovic Marcel Dekker, Inc., New York-Basel.
- Dias J.M., Alvim-Ferraz M.C.M., Almedia M.F., Rivera-Utrilla J., Sanchez-Polo M. 2007. *Waste materials for activated carbon preparation and its use in aqueous-phase treatment: A review*. J. Environ. Manage. 85:833-846.
- Graham N., Chen X., Jayaseelan S. 2001. *The potential application of activated carbon from sewage sludge to organic dyes removal*. Water Sci. Technol. 43:245-252.
- Guillossou R., Le Roux J., Mailler R., Vulliet E., Morlay C., Nauleau F., Gasperi J., Rocher V. 2019. *Organic micropollutants in a large wastewater treatment plant: What are the benefits of an advanced treatment by activated carbon adsorption in comparison to conventional treatment?* Chemosphere. 218:1050-1060.

- Hayashia J., Kazehayaa A., Muroyamaa K., Watkinson A. 2000. *Preparation of activated carbon from lignin by chemical activation*. Carbon 38:1873–1878.
- Jafarinejad S. 2017. *Activated sludge combined with powdered activated carbon (PACT process) for the petroleum industry wastewater treatment: A review*. Chem. Int. Vol. 3, 4:368–377.
- Jasieńko-Hałat M., Kędzior K. 2005. *Comparison of molecular sieve properties in microporous chars from low-rank bituminous coal activated by steam and carbon dioxide*. Carbon 43:944–953.
- Lian F., Xing B., Zhu L. 2011. *Comparative study on composition, structure, and adsorption behavior of activated carbons derived from different synthetic waste polymers*. J. Colloid. Interf. Sci. 360:725–730.
- Nakai T., Kartal S., Hata T., Imamura Y. 2007. *Chemical characterization of pyrolysis liquids of wood-based composites and evaluation of their bio-efficiency*. Build. Environ. 42:1236–1241.
- Pelech I., Pelech R., Kaczmarek A., Jędrzejewska A., Moszyński D. 2016. *Effect of treating method on the physicochemical properties of amine-functionalized carbon nanotubes*. Int. J. Biomed. Mater. Res. 107 (1):35–43.
- Pelech I., Pelech R., Jędrzejewska A., Moszyński D. 2016. *Selective introduction of hydroxyl groups onto the carbon nanotube surface via chlorination and hydrolytic dechlorination*. Sci. Adv. Mater. 8:1208–1215.
- San Miguel G., Fowler G., Sollars C. 2003. *A study of the characteristics of activated carbons produced by steam and carbon dioxide activation of waste tyre rubber*. Carbon 41:1009–1016.
- Suárez-García F., Martínez-Alonso A., Tascón J. 2001. *Porous texture of activated carbons prepared by phosphoric acid activation of apple pulp*. Carbon. 39:1111–1115.
- Tsai W., Lee M., Chang Y. 2006. *Fast pyrolysis of rice straw, sugarcane bagasse and coconut shell in an induction-heating reactor*. J. Anal. Appl. Pyrol. 76:230–237.
- Tseng R. 2007. *Physical and chemical properties and adsorption type of activated carbon prepared from plum kernels by NaOH activation*. J. Hazard. Mater. 147:1020–1027.
- Zawadzki A., Johnson L.B., Måns Bohe M., Claes Johansson C., Mats Ekelund M., Nielsen O.H. 2017. *An open prospective study evaluating efficacy and safety of a new medical device for rectal application of activated carbon in the treatment of chronic, uncomplicated perianal fistulas*. Int. J. Colorectal. Dis. 32:509–512.

Abstract

EFFECT OF MODIFICATION OF THE ADSORBENT WITH ORGANIC COMPOUNDS ON THE ADSORPTION OF MULTICOMPONENT MIXTURES FROM THE GAS PHASE

The aim of this work was to determine the influence of activated carbon modifications on volatile organic compounds adsorption from the gas phase. The adsorbates were air-vapor mixtures of the following compounds: acetone and ethyl acetate, toluene and n-butyl acetate. Commercial WG-12 activated carbon was impregnated with an aqueous solution of DL-malic acid, trisma, and melamine. The samples were heated at 600°C in a crucible furnace. The next step was eluting sample with distilled water and dried for 12 h at 80°C. The obtained modifications of adsorbents were subjected to thermogravimetric and elemental analyses. The changes in the concentration of organic solvents were determined by gas chromatography analysis. Compared to the unmodified activated carbon, modifications with trisma and melamine decreased the

adsorption efficiency. DL-malic acid-modified activated carbon showed the most effective adsorption properties for the using mixtures. What is more, WG-12 activated carbon presented a higher adsorption affinity towards n-butyl acetate than acetone and a higher affinity towards n-butyl acetate than toluene. In the case of adsorption of both mixtures, the phenomenon of competitive adsorption was observed - the less volatile component displaced the more volatile component from the adsorption bed.

Keywords: adsorption, competitive adsorption, modified activated carbon, volatile organic compounds

Słowa kluczowe: adsorpcja, adsorpcja konkurencyjna, modyfikowany węgiel aktywny, lotne związki organiczne

inż. Damian Kołos

inż. Tomasz Łodziński

Politechnika Białostocka, Wydział Mechaniczny

Studenckie Koło Naukowe Auto-Moto-Club

Opiekun naukowy: dr hab. inż. Dariusz Szpica prof. PB

PROJEKT UKŁADU TURBODOŁADOWANIA DO SILNIKA WOLNOSSĄCEGO POJAZDU BIORĄCEGO UDZIAŁ W ZAWODACH FORMUŁA STUDENT

Wstęp

Zawody Formuła Student polegają na zaprojektowaniu, zbudowaniu oraz przetestowaniu w ramach konkurencji międzyuczelnianej jednoosobowego pojazdu o otwartym kokpicie.auta tworzone są przez grupy studentów, a celem tego jest wykształcenie młodych inżynierów gotowych do pracy w branży motoryzacyjnej. Zawody posiadają wiele obostrzeń, które narzucają ogólny zarys pojazdu oraz kierunek prac projektowych. Jednym z głównych ograniczeń narzuconych na silnik jest ogranicznik przepływu w układzie dolotowym, który sprawia, że jednostka napędowa osiąga znacznie niższe moce. Dodatkowo w skład zawodów wchodzi konkurencja „efficiency”, w której porównywane jest zużycie paliwa do czasu osiągniętego przez auto na torze. Z tych właśnie powodów implementacja układu doładowania wydaje się być korzystnym rozwiązaniem.

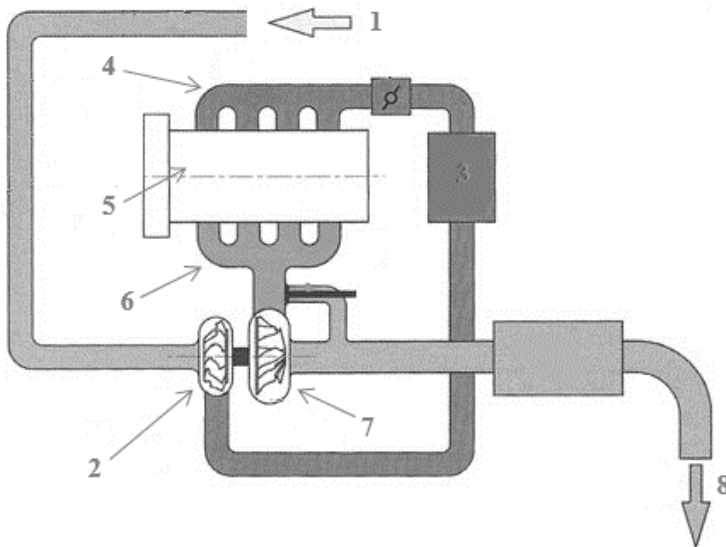
Od wielu lat konstruktorzy silników spalinowych dążą do uzyskania jak najlepszych wskaźników pracy, takich jak: moc, sprawność ogólna czy emisja spalin. Część tych zagadnień jest rozwiązywana właśnie przez doładowanie. Regulamin Formuła Student narzuca maksymalną pojemność silnika wynoszącą 710 cm^3 , co może utrudnić dobór turbospężarki ze względu na to, że na rynku występuje mało aplikacji o tak niskim natężeniu przepływu spalin.

Cel

Jak zostało wcześniej wspomniane, regulamin zawodów Formuła Student narzuca obostrzenia, które mają na celu zapewnić bezpieczeństwo oraz rozwinąć kreatywność studentów. Jednym z obostrzeń jest zwężka w układzie dolotowym silnika pojazdu. Zmniejsza ona masę dostarczanego powietrza do cylindrów, co negatywnie wpływa na charakterystykę zewnętrzną jednostki napędowej. Jedną z metod podniesienia mocy silnika spalinowego jest zwiększenie jego sprawności objętościowej, czego można dokonać przez zastosowanie turbosprężarki. Praca miała na celu dobór odpowiedniej turbosprężarki, ocenę przyrostów mocy i momentu obrotowego silnika oraz możliwości zabudowy pojazdu.

Budowa układu turbodoładowania

Działanie układu turbodoładowania polega na wykorzystaniu energii spalin do napędzenia turbiny, która jest połączona wałkiem ze sprężarką, która to z kolei spręża powietrze trafiające do cylindrów silnika. Stronę, w której pracuje turbina, określa się mianem gorącej, z kolei tę, w której pracuje sprężarka – stroną zimną.



Rysunek 1. Budowa układu turbodoładowania

Źródło: motodiagnostyka.wordpress.com dostęp (27.12.2020).

Powietrze zasysane jest do układu dolotowego (1) dzięki podciśnieniu generowanemu przez stronę zimną turbosprężarki (2). Sprężone powietrze trafia do chłodnicy powietrza (3), a następnie do kolektora dolotowego (4), który poprzez porty w głowicy silnika dostarcza je wraz z paliwem do komory spalania. Po spaleniu mieszanki paliwowo-powietrznej powstają spaliny, które usuwane są z silnika (5) poprzez kolektor wylotowy (6) połączony z turbiną (7). Dzięki temu spaliny trafiające do turbosprężarki napędzają ją. Ostatecznie produkty spalania trafiają do atmosfery (8).

Charakterystyka techniczna bazowego wolnossącego silnika spalinowego

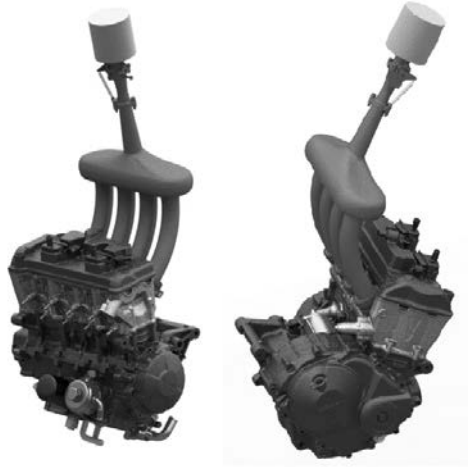
Silnik bazowy jest jednostką napędową z motocykla Honda CBR600 rr PC40. Produkowany był w latach 2007–2016. Jest to silnik czterocylindrowy, szesnastozaworowy nadkwadratowy (współczynnik $\lambda = 1,58$). Jednostka waży około 55 kg. Dane dotyczące fabrycznego silnika zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Wybrane dane techniczne silnika motocykla Honda CBR 600rr PC40

Konfiguracja silnika	Rzędowy czterocylindrowy, czterosurowy
Objętość skokowa silnika	599 cm ³
System chłodzenia silnika	Ciecz
Stopień sprężania	12.2:1
Zawory na cylinder	4
Średnica x skok tłoka	67 x 42.5 mm
Moc maksymalna	76.66 kW przy 13,900 obr/min
Maksymalny moment obrotowy	57.77 Nm przy 11,400 obr/min
Układ paliwowy	Keihin – wtrysk wielopunktowy
Typ układu wydechowego	4–2–1
Układ zapłonowy	Cyfrowy
Układ smarowania	Mokra misa olejowa
Typ skrzyni biegów	sześciociobiegowa, Kłowa
Typ sprzęgła	Wielotarczowe, Mokre

Źródło: (Honda Motor, 2008) oraz (aperaceparts.com, 2020).

Silnik przystosowany został do regulaminu zawodów Formuła Student, który między innymi narzuca zwężkę o średnicy 20 mm w układzie dolotowym (zapis CV 1.7.1 oraz CV 1.7.2), która znacząco ogranicza moc silnika. Dla tak przygotowanego silnika moc maksymalna wynosi 52,5 kW przy 9000 obr/min oraz 56 Nm przy 8500 obr/min.



Rysunek 2. Silnik motocykla Honda CBR 600rr PC40

Źródło: opracowanie własne.

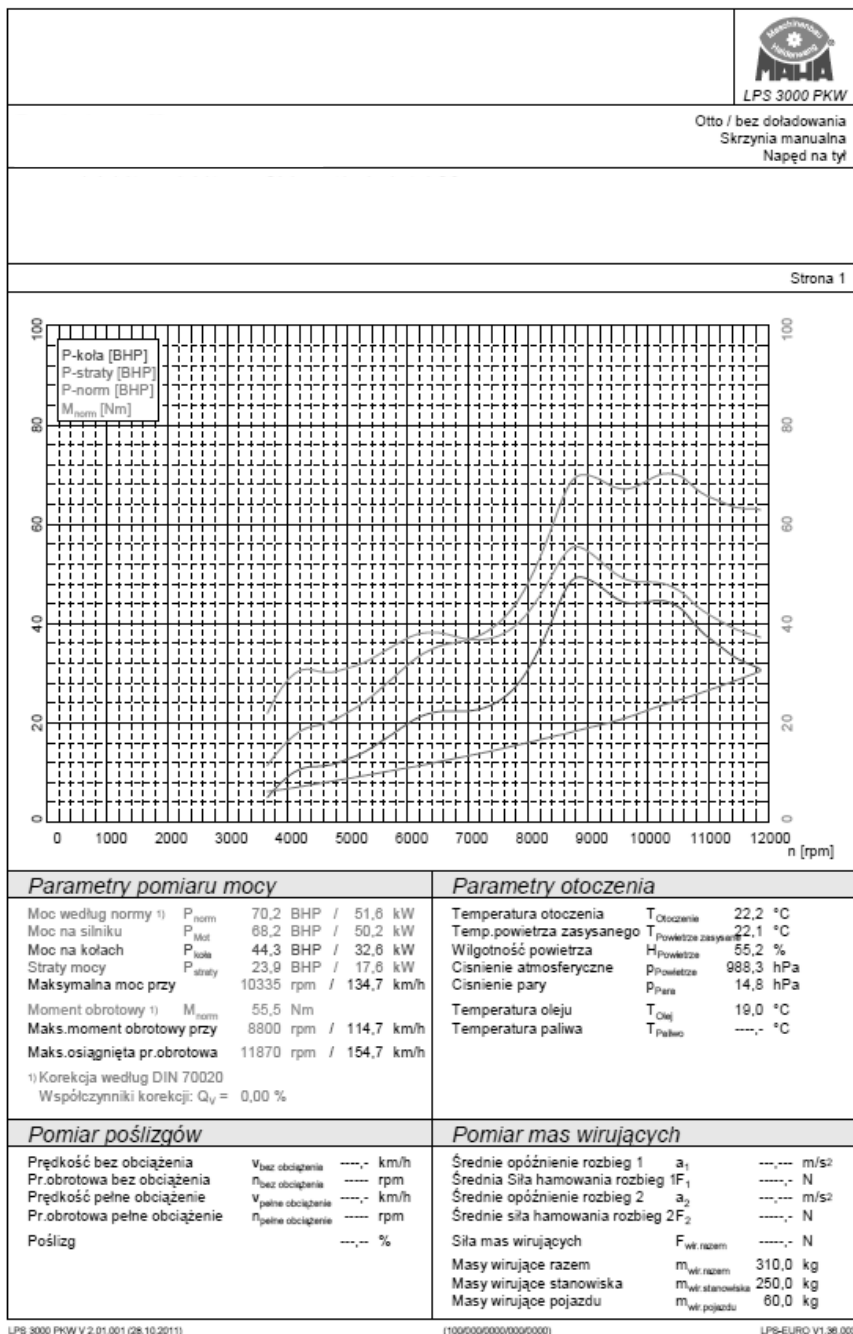
Badanie bazowego silnika wolnoścącego na hamowni podwoziowej

Wykonane zostało badanie na hamowni podwoziowej (rys. 3) w celu pozyskania charakterystyki zewnętrznej silnika, która jest niezbędna do wykonania koniecznych obliczeń.



Rysunek 3. Badanie charakterystyki zewnętrznej bazowego silnika pojazdu typu Formuła Student

Źródło: opracowanie własne.



LPS 3000 FKW V 2.01.001 (28.10.2011)

(1000000000000000000)

LPS-EURO V1.38.000

Rysunek 4. Wykres charakterystyki zewnętrznej uzyskany podczas pomiaru

Źródło: opracowanie własne.

Założenia projektowe układu turbodoładowania

Założenia projektowe pomimo tytułu dotyczyć będą także peryferii silnika ze względu na to, że układ turbodoładowania wymaga odpowiedniego ich przystosowania.

Przygotowanie bazowego wolnossącego silnika spalinowego

W celu przygotowania bazowego wolnossącego silnika spalinowego do turbodoładowania wykonane zostaną następujące elementy:

- zmodernizowany układ wydechowy,
- zmodernizowany kolektor dolotowy,
- zapewnienie smarowania turbosprężarki,
- układ paliwowy o dopasowanej wydajności.

Zmodernizowany układ wydechowy – ze względu na konieczność połączenia kolektora wydechowego ze stroną gorącą turbosprężarki zmodernizowany zostanie układ wydechowy. Obliczenia dotyczące kolektora nie zostaną wykonane ze względu na charakter pracy.

Zmodernizowany kolektor dolotowy – podobnie jak przy kolektorze wydechowym ze względu na konieczność połączenia kolektora dolotowego ze stroną zimną turbosprężarki zmodernizowany zostanie układ dolotowy. Obliczenia dotyczące kolektora nie zostaną wykonane ze względu na charakter pracy.

Zapewnienie smarowania turbosprężarki – w celu zapewnienia odpowiedniego smarowania łożysk wirnika zaprojektowane zostaną węże olejowe spełniające tę funkcję.

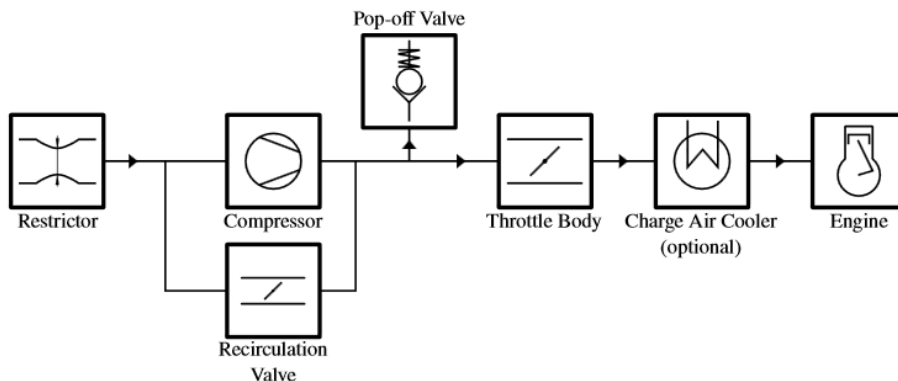
Układ paliwowy o dopasowanej wydajności – wraz ze wzrostem ilości powietrza doprowadzanego do silnika należy również doprowadzić większą ilość paliwa w celu utrzymania AFR na odpowiednim poziomie. Wykonane zostaną obliczenia wymaganej wydajności wtryskiwaczy.

Układ turbodoładowania

Poniżej przedstawione zostały założenia projektowe dotyczące układu turbodoładowania:

- turbosprężarka podnosząca moment w średnim wysokim zakresie prędkości obrotowej,
- maksymalna moc na poziomie 75 kW,
- relatywnie wysoka nadążność turbosprężarki,

- układ zgodny z regulaminem Formuła Student (rys. 5),
- spręż na poziomie 1,5.



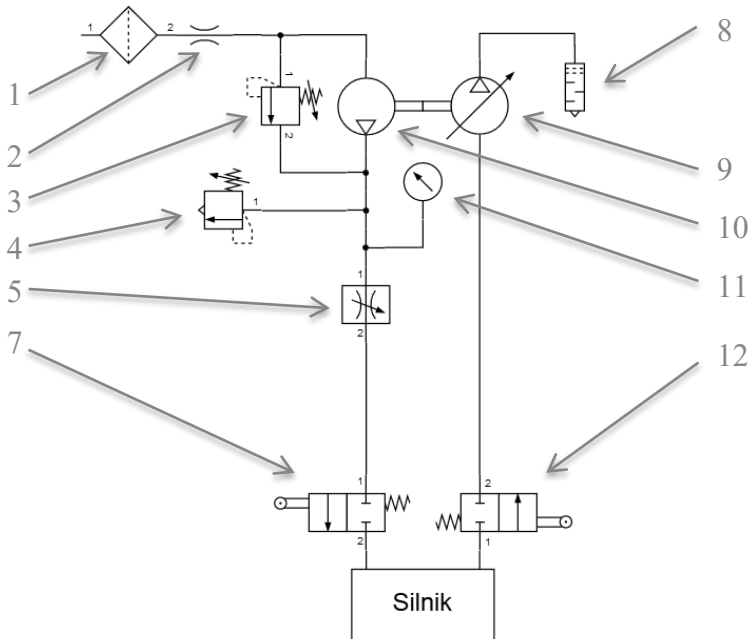
Rysunek 5. Konfiguracja układu dolotowego dla turbodoładowanych silników według regulaminu Formuła Student

Źródło: (formulastudent.de, 2020).

Zgodnie z regulaminem, podążając od atmosfery wokół pojazdu, układ powinien składać się kolejno z: zwężki o średnicy 20 mm, strony zimnej turbosprężarki z podłączonym równolegle zaworem recyrkulacyjnym, zaworu upustowego, przepustnicy oraz opcjonalnej chłodnicy powietrza trafiającego do silnika.

Schemat pneumatyczny układu

Schemat pneumatyczny układu przedstawia rys. 6. Układ schematu jest identyczny jak w opisie powyżej. Wykonane zostały dwa schematy ze względu na opcjonalność zastosowania chłodnicy powietrza. Dodatkowo umieszczony został czujnik ciśnienia doładowania.



1 – filtr powietrza, 2 – ogranicznik przepływu, 3 – zawór recyrkulacyjny, 4 – zawór upustowy, 5 – przepustnica, 6 – chłodnica powietrza, 7 – zawór dolotowy, 8 – tłumik, 9 – turbina, 10 – kompresor, 11 – czujnik ciśnienia, 12 – zawór wylotowy

Rysunek 6. Schemat pneumatyczny układu turbodoładowania

Źródło: Opracowanie własne.

Obliczenia

Obliczenia wykonane zostały w programie PTC Mathcad na podstawie (Rajput 2005) oraz (Szpica 2018). Celem obliczeń było dobranie odpowiedniej turbosprężarki oraz obserwacja przyrostu mocy i momentu obrotowego. Obliczenia zostały przeprowadzone na podstawie wyników pomiaru charakterystyki zewnętrznej wolnossącego silnika przystosowanego do zawodów Formuła Student.

Obliczenie sprawności objętościowej napędzenia silnika

Pierwszym krokiem obliczeń był import danych z programu Microsoft Excel do programu PTC Mathcad. Importowana była prędkość obrotowa oraz moc silnika wolnossącego.

Prędkość obrotowa silnika

$$n_e := \overline{\text{READExcel}(\text{".\proba.xlsx"}, "[1]A2:A1642")}] \cdot \text{min}^{-1} \quad (1)$$

$$\vec{n}_e = \begin{bmatrix} 3.665 \cdot 10^3 \\ 3.67 \cdot 10^3 \\ 3.675 \cdot 10^3 \\ \vdots \end{bmatrix} \text{min}^{-1}$$

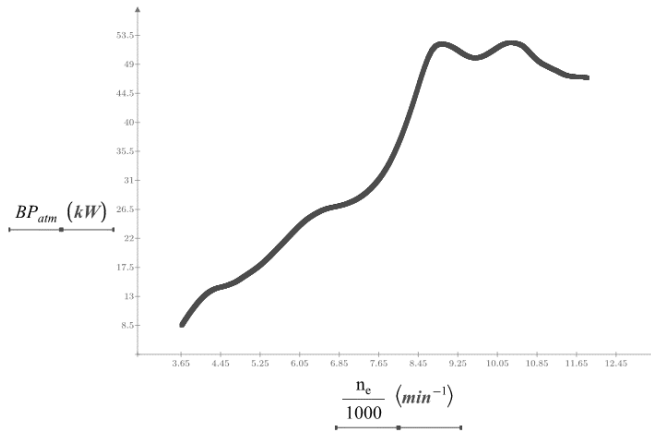
Import danych realizowany był to za pomocą oddzielnych funkcji, tak aby utworzyć dwie oddzielne macierze, co umożliwiło prowadzenie dalszych obliczeń.

Moc silnika

$$BP_{atm} := \overline{\text{READExcel}(\text{".\proba.xlsx"}, "[1]B2:B1642")}] \cdot \text{hp} \quad (2)$$

$$BP_{atm} = \begin{bmatrix} 8.528 \\ 8.588 \\ 8.648 \\ 8.708 \\ 8.768 \\ \vdots \end{bmatrix} \text{kW}$$

Jak można zauważyć na rysunku 7, bazowa jednostka napędowa generuje 52 kW przy 9000 obr/min.



Rysunek 7. Wykres mocy od prędkości obrotowej bazowego silnika wolnossącego

Źródło: opracowanie własne.

Kolejnym krokiem było wyliczenie masowego natężenia przepływu paliwa. Opisuje ono jaką masę paliwa w ciągu jednostki czasu zużywa silnik.

Masowe natężenie przepływu paliwa bazowego silnika wolnossącego

$$M_{fuel_atm} := \frac{BP_{atm}}{C.V \cdot \eta_{atm}} = \begin{bmatrix} 0.745 \\ 0.751 \\ 0.756 \\ 0.761 \\ \vdots \end{bmatrix} \frac{gm}{s} \quad (3)$$

Gdzie:

BP_{atm}

-moc silnika wolnossącego (Wzór 2)

$C.V := 44000000 \frac{J}{kg}$
 $\eta_{atm} := 0.26$

-kaloryczność paliwa dla benzyny bezołowiowej
 -sprawność silnika 4-suwowego wolnossącego o zapłonie iskrowym według Tab.4

Sprawność została odczytana z pozycji numer 1 odpowiadającej dla silnika czterosuwowego wolnossącego o zapłonie iskrowym.

Tabela 2. Bilans cieplny wybranych silników (Rajput, 2005)

S. No.	Prime mover	% of Fuel energy				Total
		To power	To coolant	To exhaust	To radiation	
1.	4-stroke S.I. engine	26	30	32	12	100
2.	Diesel engines :					
	(i) 2-stroke	30	21	37	12	100
	(ii) 4-stroke					
	(a) Naturally aspirated	31	26	30	13	100
	(b) Turbo-charged	35	22	29	14	100
3.	Gas turbine :					
	(i) Simple cycle	15	—	70	15	100
	(ii) Regenerative cycle	15	—	65	20	100

Tabela 3. Kaloryczność benzyny w zależności od przeznaczenia pwr.wroc.pl, dostęp:15.01.2021

Nazwa		Wartość opałowa, kJ/kg	Zastosowanie
Benzyny	lotnicza	42 900–46 500	do tłokowych silników spalinowych z zapłonem iskrowym w lotnictwie
	samochodowa	42 900–46 500	do tłokowych silników spalinowych z zapłonem iskrowym w motoryzacji oraz w innych maszynach i urządzeniach
	traktorowa	43 500–45 250	do tłokowych silników spalinowych z zapłonem iskrowym w traktorach i innych maszynach rolniczych

Kolejnym krokiem było obliczenie masowego natężenia przepływu powietrza. Jest on zależny od masowego przepływu paliwa.

Masowe natężenie przepływu powietrza

$$M_{air_atm} := \overrightarrow{M_{fuel_atm}} \cdot AFR \quad (4)$$

Gdzie:

M_{fuel_atm} -przepływ masowy paliwa dla silnika wolnossącego (Wzór 3)

$AFR := 12.5$ -współczynnik powietrze paliwo

Można zauważyć, że wykres masowego natężenia przepływu powietrza i paliwa (rys. 8) ma identyczny kształt jak wykres mocy (rys. 7).

Rysunek 8. Wykres masowego natężenia przepływu powietrza oraz paliwa bazowego silnika wolnossącego

Źródło: opracowanie własne.

BSFC zostało wyliczone do obliczeń zapotrzebowania na powietrze silnika doładowanego (wzór 9). Jest to wskaźnik efektywności spalania paliwa.

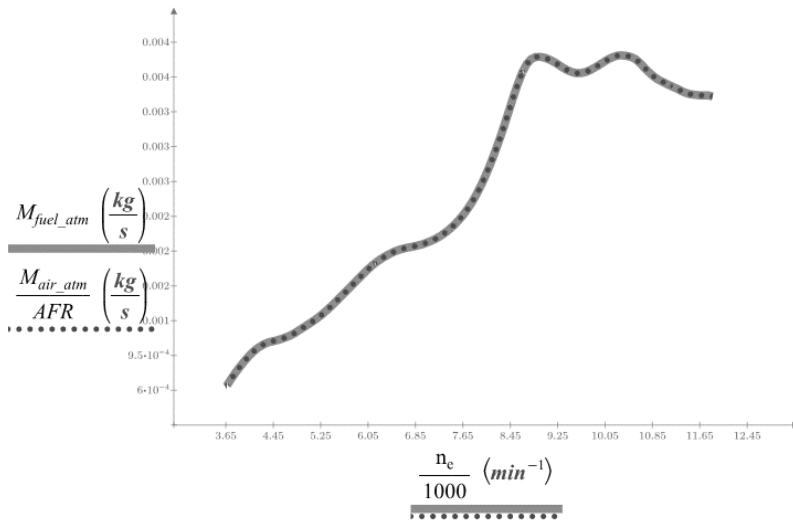
BSFC silnika wolnossącego

$$BSFC_{atm} := \frac{\overrightarrow{M_{fuel_atm}}}{BP_{atm}} = \begin{bmatrix} 0.315 \\ 0.315 \\ 0.315 \\ 0.315 \\ \vdots \end{bmatrix} \frac{kg}{kW \cdot hr} \quad (5)$$

Gdzie:

M_{fuel_atm}
 BP_{atm}

-przepływ masowy paliwa (Wzór 3)
-moc silnika wolnossącego (Wzór 2)



Sprawność objętościowa silnika wolnossącego została wyliczona, aby w dalszej części obliczeń wyliczyć z niej sprawność objętościową napędzenia silnika doładowanego.

Sprawność objętościowa silnika wolnossącego

$$VE_{atm} := \frac{\overrightarrow{M_{air_atm}}}{\rho_{air} \cdot V_e \cdot n_e} \quad (6)$$

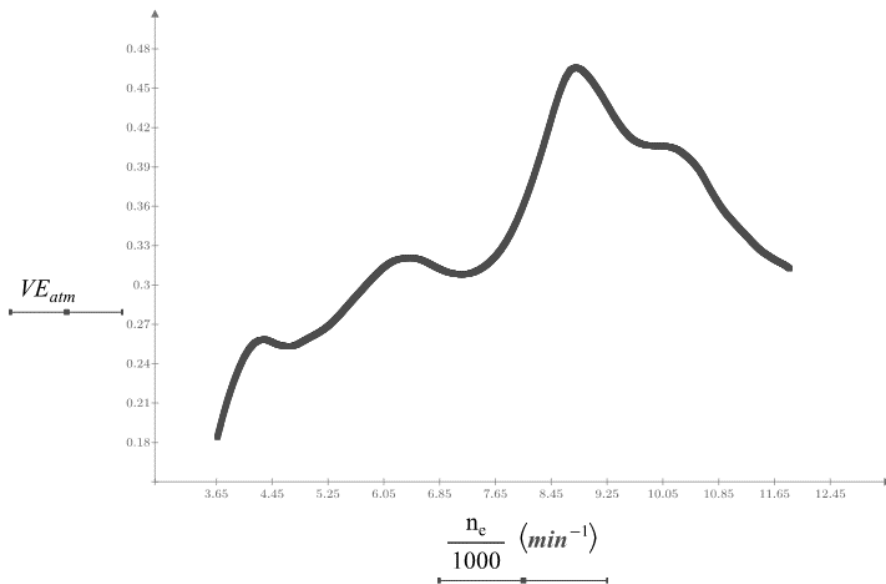
Gdzie:

M_{air_atm} -przepływ masowy powietrza dla silnika wolnossącego (Wzór 4)

$\rho_{air} := 1.2 \frac{kg}{m^3}$ -gęstość suchego powietrza dla 20 °C

$V_e := 599 \text{ cm}^3$ -objętość skokowa badanego silnika
 n_e -prędkość obrotowa silnika (Macierz 1)

Na rysunku 9 można zauważyć, że maksymalna wartość sprawności objętościowej wynosi około 0,5. Wynika to z tego, że regulamin zawodów Formuła Student narzuca zwężkę w układzie dolotowym o średnicy 20 mm.



Rysunek 9. Wykres sprawności objętościowej napełnienia silnika wolnossącego

Źródło: opracowanie własne.

Wyznaczenie sprężu turbosprężarki

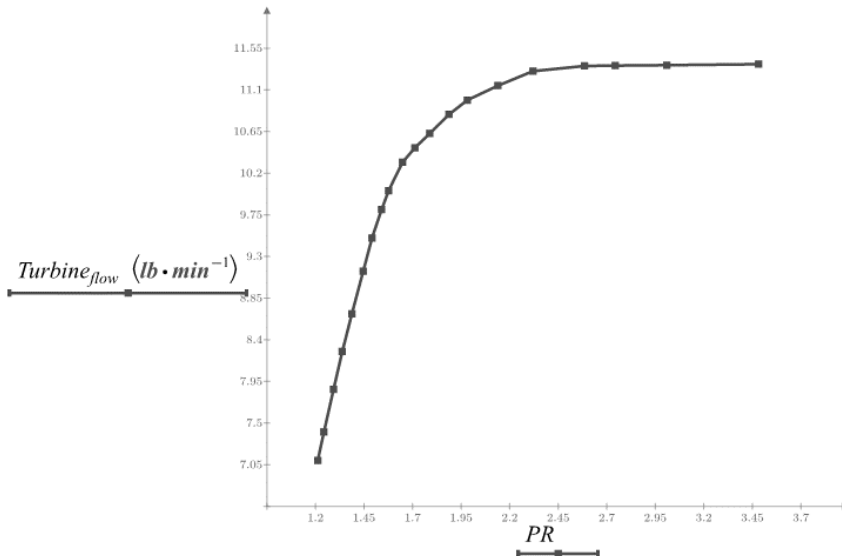
Kolejnym krokiem był import danych dotyczących turbosprężarki, a dokładniej wykresu przepływu spalin przez turbinę od sprężu.

Import danych z grafu

$$Turbine_{flow} := (\text{READExcel}(\text{".\turbograf.xlsx"}, "[1]B1:B20")) \cdot \text{lb} \cdot \text{min}^{-1} = \begin{bmatrix} 7.096 \\ 7.403 \\ 7.863 \\ 8.272 \\ \vdots \end{bmatrix} \text{lb} \cdot \text{min}^{-1} \quad (7)$$

$$PR := (\text{READExcel}(\text{".\turbograf.xlsx"}, "[1]A1:A20")) = \begin{bmatrix} 1.212 \\ 1.243 \\ 1.293 \\ 1.338 \\ \vdots \end{bmatrix} \quad (8)$$

Dane zaczerpnięte są z (Garrett 2020) i odnoszą się do turbosprężarki GT2052. Jest to najmniejsza turbosprężarka producenta.



Rysunek 10. Wykres masowego natężenia przepływu powietrza od sprężu turbosprężarki Garrett GT2052

Źródło: opracowany na podstawie (Garrett, 2020).

Następnie obliczono maksymalne zapotrzebowanie na powietrze. Wymagane było do tego podanie mocy maksymalnej. Zgodnie z założeniami projektowymi obliczone zostało zapotrzebowanie dla mocy 75 kW.

Maksymalne zapotrzebowanie na powietrze

$$V_0 := BP_{comp_max} \cdot AFR \cdot BSFC_{atm} = 9.404 \text{ lb} \cdot \text{min}^{-1} \quad (9)$$

Gdzie:

$BP_{comp_max} := 75 \text{ kW}$ -założona moc maksymalna turbodoładowanego silnika
 $AFR := 12.5$ -współczynnik powietrze paliwo
 $BSFC_{atm}$ -brake specific fuel consumption silnika wolnossącego (Wzór 5)

Po obliczeniu maksymalnego zapotrzebowania na powietrze wyliczono zapotrzebowanie na powietrze silnika doładowanego. Wykonano to, dopasowując masowe natężenie przepływu powietrza silnika wolnossącego do maksymalnego zapotrzebowania na powietrze silnika doładowanego.

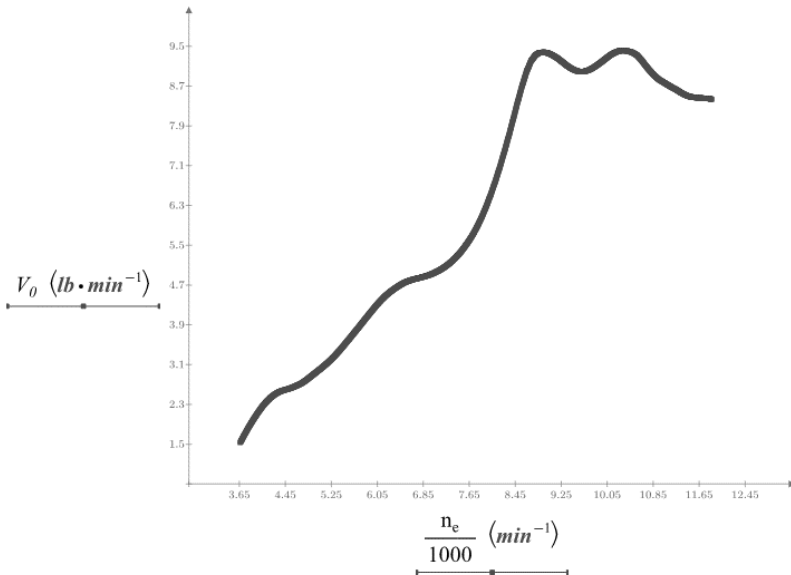
Zapotrzebowanie na powietrze silnika doładowanego

$$V_0 := M_{air_atm} \cdot 1.435 = \begin{bmatrix} 1.534 \\ 1.544 \\ 1.555 \\ 1.566 \\ \vdots \end{bmatrix} \text{ lb} \cdot \text{min}^{-1} \quad (10)$$

Gdzie:

M_{air_atm} -przepływ masowy powietrza dla silnika wolnossącego (Wzór 4)

Kolejnym krokiem było ograniczenie ilości punktów macierzy, która dotyczy zapotrzebowania na powietrze silnika doładowanego (wzór 10). Ma to na celu ułatwienie naniesienia punktów na wykres masowego natężenia przepływu powietrza od sprężu turbosprężarki. Rozdzielczość prędkości obrotowej silnika została ustalona na 250 obr/min. Wyniki zostały przepisane tworząc (macierz 12).



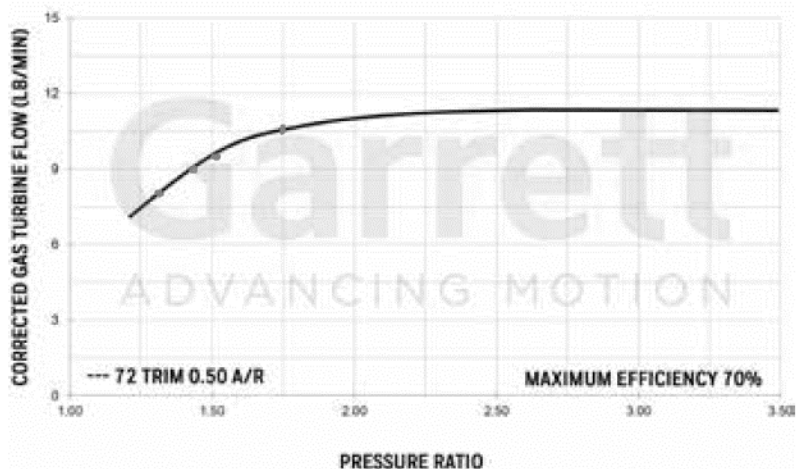
Rysunek 11. Zapotrzebowanie na powietrze silnika doładowanego w funkcji prędkości obrotowej

Źródło: opracowanie własne.

Ograniczenie liczby punktów

1. $V_{0_4000rpm} := \text{lookup}(4 \cdot 10^3 \cdot \text{min}^{-1}, n_e, V_0) = [2.179] \text{ lb} \cdot \text{min}^{-1}$ (11)
2. $V_{0_4250rpm} := \text{lookup}(4.25 \cdot 10^3 \cdot \text{min}^{-1}, n_e, V_0) = [2.488] \text{ lb} \cdot \text{min}^{-1}$
3. $V_{0_4500rpm} := \text{lookup}(4.5 \cdot 10^3 \cdot \text{min}^{-1}, n_e, V_0) = [2.611] \text{ lb} \cdot \text{min}^{-1}$

Po ograniczeniu liczby punktów możliwe było naniesienie ich na wykres (rys. 12). Celem tego było odczytanie sprężu, jaki powstanie przy danym przepływie powietrza przez turbinę.



Rysunek 12. Wykres z naniesionymi punktami do poprawy

Źródło: (Garrett 2020).

Po naniesieniu punktów na wykres został odczytany odpowiadający im spręż. W macierzy sprężu (wzór 13) poniżej 7000 obr/min wpisane zostały zera ze względu na konstrukcję wzoru na sprawność objętościową silnika doładowanego (wzór 17). Gdyby w miejsca zer wstawiona była wartość 1, wtedy według wzoru sprężarka doładowywałaby silnik, co w rzeczywistości nie wystąpi na niższych prędkościach obrotowych.

$$\begin{array}{c}
 \left[\begin{array}{c}
 2.179 \\
 2.488 \\
 2.611 \\
 2.739 \\
 2.96 \\
 3.207 \\
 3.531 \\
 3.886 \\
 4.244 \\
 4.54 \\
 4.736 \\
 4.834 \\
 4.924 \\
 5.086 \\
 5.363 \\
 5.794 \\
 6.447 \\
 7.339 \\
 8.415 \\
 9.244 \\
 9.366 \\
 9.202 \\
 9.012 \\
 9.034 \\
 9.23 \\
 9.404 \\
 9.368 \\
 9.067 \\
 8.796 \\
 8.629 \\
 8.485 \\
 8.457
 \end{array} \right] \quad (12) \\
 V_0 := \quad lb \cdot min^{-1}
 \end{array}
 \qquad
 \begin{array}{c}
 \left[\begin{array}{c}
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 1 \\
 1 \\
 1.1 \\
 1.1 \\
 1.3 \\
 1.3 \\
 1.5 \\
 1.5 \\
 1.4 \\
 1.4 \\
 1.45 \\
 1.45 \\
 1.5 \\
 1.5 \\
 1.35 \\
 1.35 \\
 1.3 \\
 1.3
 \end{array} \right] \quad (13) \\
 k :=
 \end{array}$$

Kolejnym krokiem było ograniczenie liczby punktów macierzy sprawności objętościowej silnika wolnoścącego.

Ograniczenie ilości punktów dla sprawności objętościowej silnika wolnossącego

1. $V_{e_4000rpm} := \text{lookup}(4 \cdot 10^3 \cdot \text{min}^{-1}, n_e, VE_{atm}) = [0.24]$ (14)
2. $V_{e_4250rpm} := \text{lookup}(4.25 \cdot 10^3 \cdot \text{min}^{-1}, n_e, VE_{atm}) = [0.257]$
3. $V_{e_4500rpm} := \text{lookup}(4.5 \cdot 10^3 \cdot \text{min}^{-1}, n_e, VE_{atm}) = [0.255]$

Macierze po ograniczeniu ilości punktów przedstawiono poniżej. Jako minimalną prędkość obrotową silnika przyjęto 4000 obr/min, a maksymalną 11750 obr/min.

$$VE_{atm} := \begin{bmatrix} 0.24 \\ 0.257 \\ 0.255 \\ 0.254 \\ 0.26 \\ 0.269 \\ 0.282 \\ \vdots \end{bmatrix} \quad (15)$$

$$n_e := \begin{bmatrix} 4 \cdot 10^3 \\ 4.25 \cdot 10^3 \\ 4.5 \cdot 10^3 \\ 4.75 \cdot 10^3 \\ 5 \cdot 10^3 \\ 5.25 \cdot 10^3 \\ 5.5 \cdot 10^3 \\ \vdots \end{bmatrix} \text{min}^{-1} \quad (16)$$

Obliczenie mocy silnika doładowanego

Kolejnym krokiem było wyliczenie sprawności objętościowej silnika doładowanego. Odbłyło się to przez mnożenie wektorowe sprawności objętościowej silnika wolnossącego przez spręż.

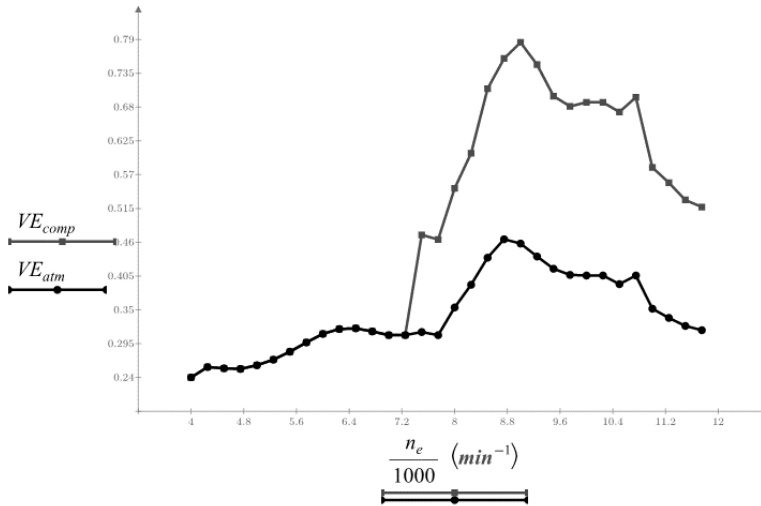
Sprawność objętościowa silnika doładowanego

$$VE_{comp} := VE_{atm} \cdot (k+1)^{\frac{1}{1.7}} = \begin{bmatrix} 0.24 \\ 0.257 \\ 0.255 \\ 0.254 \\ \vdots \end{bmatrix} \quad (17)$$

Gdzie:

VE_{atm} -sprawność objętościowa (Macierz 15)
 k -spręż (Macierz 13)

Na rysunku 13 można zauważyć, że sprawność objętościowa silnika wolnossącego oraz doładowanego jest identyczna, aż do 7000 obr./min. Wynika to z tego, że na niższych prędkościach obrotowych przepływ gazów wydechowych jest zbyt niski, aby napędzić turbinę na tyle, aby kompresor generował spręż powyżej jedności. Na wyższych prędkościach obrotowych można zaobserwować wyraźny wzrost sprawności objętościowej silnika doładowanego.



Rysunek 13. Porównanie sprawności objętościowej silnika wolnossącego z doładowanym w funkcji prędkości obrotowej

Źródło: opracowanie własne.

Objętościowe natężenie przepływu powietrza silnika doładowanego zostało wyliczone w celu umożliwienia przeliczenia go na masowe natężenie przepływu (wzór 21).

Objętościowe natężenie przepływu powietrza silnika doładowanego

$$V_{air_comp} := V_e \cdot \frac{n_e}{2} \cdot VE_{comp} = \begin{bmatrix} 0.005 \\ 0.005 \\ 0.006 \\ \vdots \end{bmatrix} \frac{m^3}{s} \quad (18)$$

Gdzie:

- V_e -objętość skokowa badanego silnika
- n_e -prędkość obrotowa silnika (Macierz 16)
- VE_{comp} -sprawność objętościowa silnika doładowanego

Wyliczenie ciśnienia w przewodzie dolotowym jest niezbędne do obliczenia masowego natężenia przepływu powietrza silnika doładowanego.

Ciśnienie w przewodzie dolotowym silnika doładowanego

$$p_{comp} := p_{air} \cdot k \quad (20)$$

Gdzie:

$$p_{air} := 102 \text{ kPa} \quad \text{-ciśnienie atmosferyczne}$$

$$k \quad \text{-spręż (Macierz 19)}$$

Kolejnym krokiem było obliczenie masowego natężenia przepływu powietrza silnika doładowanego w celu wykorzystania go do (wzór 22).

Masowe natężenie przepływu powietrza silnika doładowanego

$$m_{air_comp} := V_{air_comp} \cdot \frac{p_{comp}}{R \cdot T} = \begin{bmatrix} 5.769 \\ 6.564 \\ 6.896 \\ 7.251 \\ \vdots \end{bmatrix} \frac{gm}{s} \quad (21)$$

Gdzie:

V_{air_comp} -przepływ objętościowy powietrza silnika doładowanego

p_{comp} -ciśnienie w przewodzie dolotowym silnika doładowanego (Wzór 20)

$R = 287.05 \frac{m^2}{s^2 \cdot K}$ -uniwersalna stała gazowa dla suchego powietrza

$T = 295.15 \text{ K}$ -temperatura powietrza atmosferycznego

Do obliczeń masowego natężenia przepływu paliwa silnika doładowanego został przyjęty AFR=12.5.

Masowe natężenie przepływu paliwa silnika doładowanego

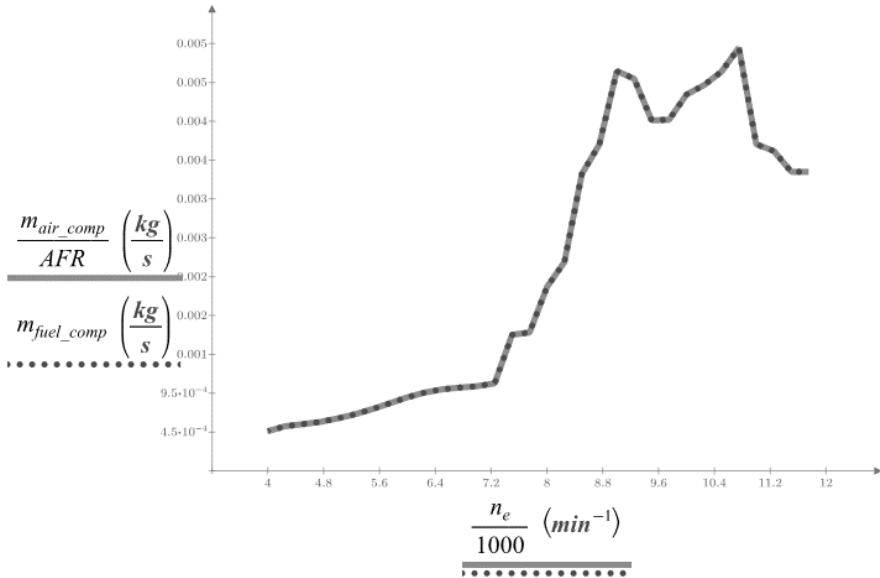
$$m_{fuel_comp} := \frac{m_{air_comp}}{AFR} = \begin{bmatrix} 0.462 \\ 0.525 \\ 0.552 \\ 0.58 \\ \vdots \end{bmatrix} \frac{gm}{s} \quad (22)$$

Gdzie:

m_{air_comp} -przepływ masowy powietrza dla silnika doładowanego (Wzór 21)

$AFR := 12.5$ -współczynnik powietrze paliwo

Kształt wykresu masowego natężenia przepływu paliwa oraz powietrza ma taki sam kształt jak wykres mocy, więc już w tym momencie można zauważyć zmiany jego kształtu. Jednym z ostatnich kroków obliczeń było obliczenie mocy silnika doładowanego. Za sprawność przyjęto 0,35 ze względu na to, że turbodoładowanie podnosi ciśnienie w komorze spalania, a co za tym idzie sprawność.



Rysunek 14. Wykres masowego natężenia przepływu powietrza oraz paliwa silnika doładowanego

Źródło: opracowanie własne.

Moc silnika doładowanego

$$BP_{comp} := m_{fuel_comp} \cdot C.V \cdot \eta_{comp} \quad (23)$$

Gdzie:

- | | |
|--------------------------------|--|
| m_{fuel_comp} | -przepływ masowy paliwa silnika doładowanego (Wzór 22) |
| $C.V := 44000000 \frac{J}{kg}$ | -kaloryczność paliwa dla benzyny bezołowiowej |
| $\eta_{comp} := 0.26$ | -sprawność silnika doładowanego |

Ostatnim krokiem do wyznaczenia charakterystyki zewnętrznej silnika doładowanego było obliczenie momentu obrotowego. Wykonane to zostało na podstawie mocy wyliczonej we (wzór 23).

Moment obrotowy silnika doładowanego

$$T_{comp} := \frac{BP_{comp}}{2 \cdot \pi \cdot n_e} \quad (24)$$

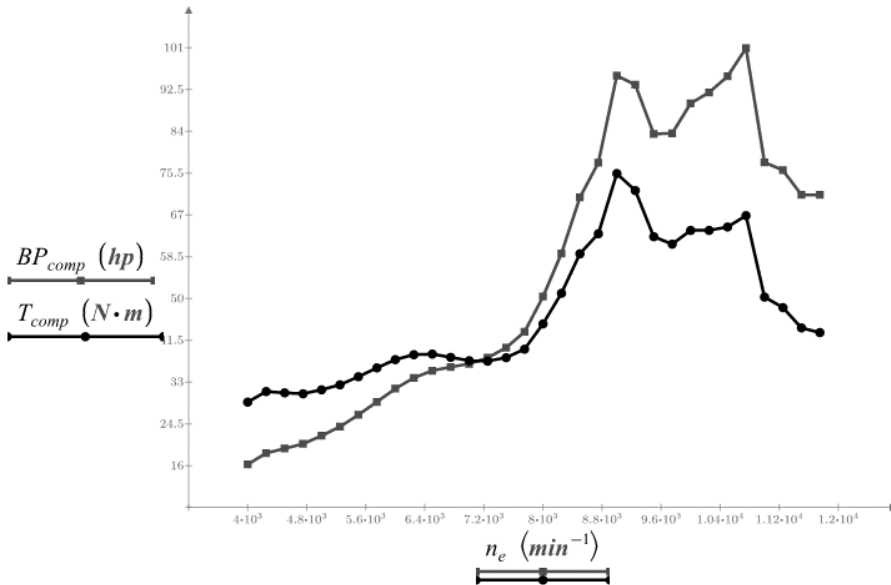
Gdzie:

BP_{comp}

-moc silnika doładowanego (Wzór 23)

n_e

-prędkość obrotowa silnika (Macierz (16))



Rysunek 15. Charakterystyka zewnętrzna silnika doładowanego

Źródło: opracowanie własne.

Maksymalne wartości mocy dla obu silników wyznaczone zostały za pomocą funkcji „max”, która wyszukuje maksymalne wartości w podanych macierzach.

$$BP_{comp_max} := \max(BP_{comp}) = 75.258 \text{ kW} \quad (25)$$

$$BP_{atm_max} := \max(BP_{atm}) = 52.348 \text{ kW}$$

Gdzie:

BP_{comp} -moc silnika doładowanego (Wzór 23)
 BP_{atm} -moc silnika wolnossącego (Wzór 2)

Aby podsumować wyniki, wyliczono procentową różnicę maksymalnej mocy silnika wolnossącego i doładowanego. Różnica wynosi 43,8%.

$$\delta := \frac{|BP_{atm_max} - BP_{comp_max}|}{BP_{atm_max}} \cdot 100 = 43.765 \quad (26)$$

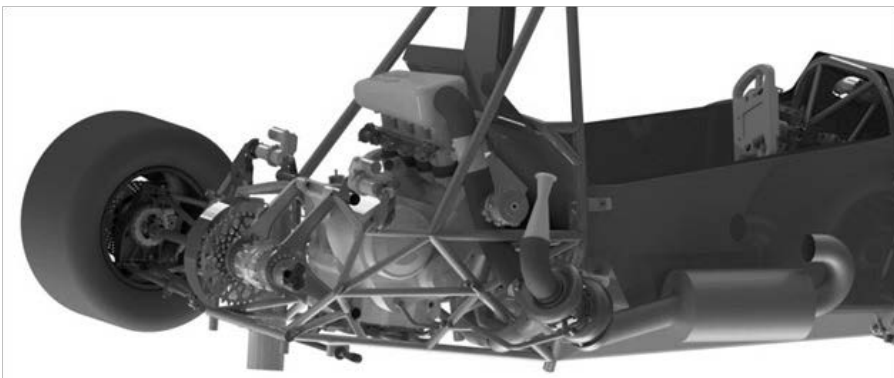
Gdzie:

BP_{atm_max} -maksymalna moc silnika wolnossącego
 BP_{comp_max} -maksymalna moc silnika doładowanego

Silnik doładowany generuje 75 kW przy około 10750 obr/min oraz 75 Nm momentu obrotowego przy około 9000 obr/min.

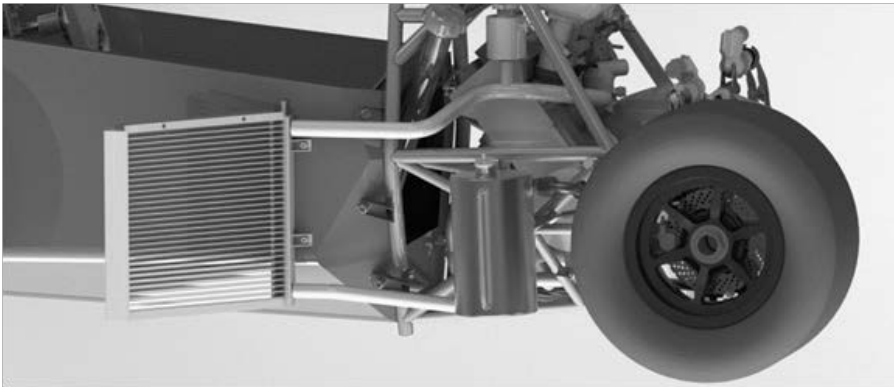
Opis działania zaprojektowanego układu turbodoładowania

Po ukończeniu obliczeń utworzony został model CAD układu turbodoładowania w programie SolidWorks. Układ został zaprojektowany w oparciu o istniejący już model auta. Rozmieszczenie poszczególnych elementów jest uwarunkowane przez regulamin Formuła Student (formulastudent.de, 2020) oraz możliwości zabudowy pojazdu.



Rysunek 16. Układ turbodoładowania w zabudowie pojazdu Formuła Student

Źródło: opracowanie własne.

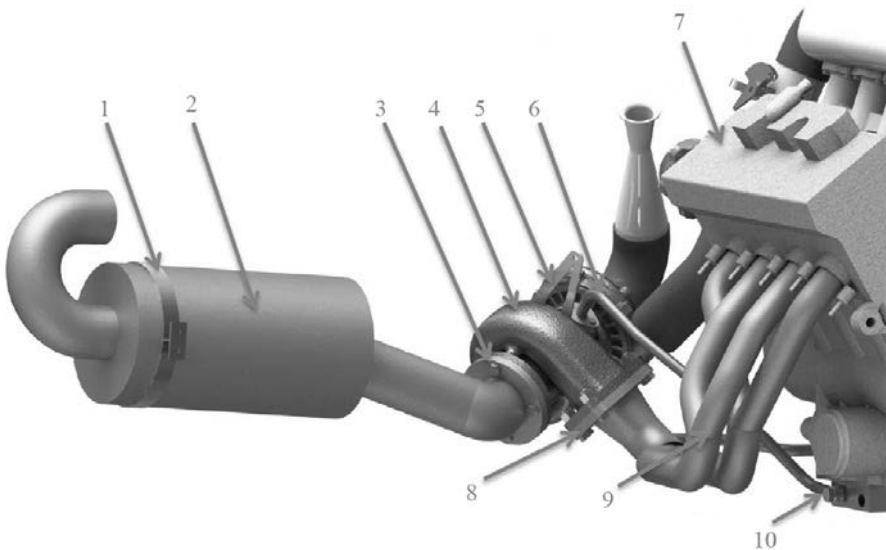


Rysunek 17. Widok układu chłodzenia oraz smarowania z lewej strony auta

Źródło: opracowanie własne.

Strona gorąca turbosprężarki

W celu ukazania wszystkich elementów w jak najlepszy sposób dalsza część opisów będzie wykonywana na podstawie wizualizacji układu doładowania bez zabudowy.



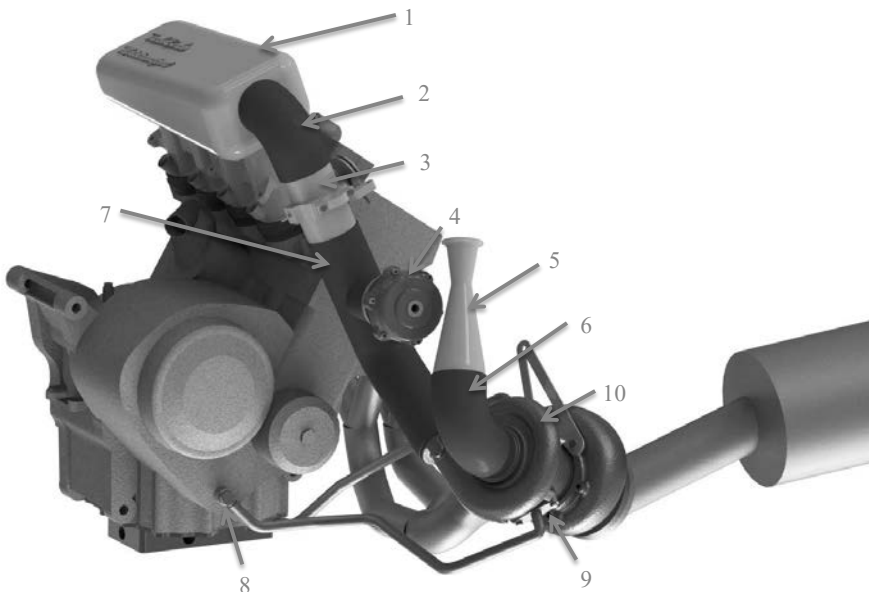
Rysunek 18. Widok strony gorącej turbosprężarki

Źródło: opracowanie własne.

W pierwszej kolejności opisane zostaną elementy po stronie gorącej turbosprężarki, którą przedstawia rysunek 18. Spaliny będące produktem spalania mieszanki paliwowo- powietrznej usuwane są z silnika (7) do kolektora wylotowego (9), który został przeprojektowany tak, aby umożliwić przyspawanie do niego kołnierza (8), który umożliwi przykręcenie do niego turbosprężarki. Spaliny trafiające do turbiny (4) napędzają wirnik i usuwane są do atmosfery przez tłumik (2), który został zaprojektowany na nowo ze względu na warunki zabudowy oraz konieczność mocowania go do korpusu turbosprężarki przez kołnierz (3). Dodatkowo w celu nadania tłumikowi sztywności zaprojektowana została skręcana obejma mocowana do konstrukcji nośnej pojazdu. Turbina przykręcona jest do tylnej ramy pojazdu stalowym mocowaniem (5). Olej stosowany do smarowania łożysk wirnika odprowadzany jest przez przyłącze z jednej strony przykręcane do korpusu turbosprężarki (6), a z drugiej do miski przez złącze banjo (10).

Strona zimna turbosprężarki

Kolejną opisywaną częścią układu będą elementy po stronie zimnej turbosprężarki (rys. 19).



Rysunek 19 Widok strony zimnej turbosprężarki

Źródło: opracowanie własne.

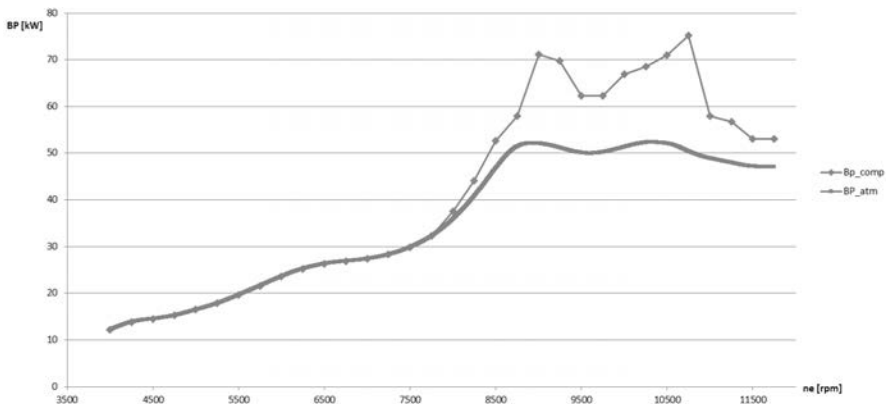
Rozpędzony wirnik kompresora (10) zasysa powietrze przez zwężkę (5) połączoną rurą (6) z wlotem do kompresora. Zwężka została umieszczona przed wlotem powietrza do turbosprężarki ze względu na obostrzenia, które narzuca regulamin Formuła Student. Skompresowane powietrze trafia przez rurę (7) do przepustnicy (3) przymocowanej do tylnej ramy pojazdu. W razie zbyt wysokiego ciśnienia przed przepustnicą oraz usterki zaworu recyrkulacyjnego w turbosprężarce zawór upustowy (4) obniży ciśnienie, usuwając nadmiar powietrza. Po otwarciu przepustnicy powietrze trafia do kolektora dolotowego (1) połączonego z przepustnicą gumową rurą (2). Dzięki połączeniu rurki doprowadzającej oleju do turbosprężarki z magistralą olejową (8) układ nie wymaga zastosowania dodatkowej pompy oleju. Olej trafia do turbosprężarki dzięki przykręcanemu przyłączu (9).

Podsumowanie i wnioski

Cel i zakres pracy zostały osiągnięte. W ramach pracy wykonano projekt układu turbodoładowania do wybranego silnika wolnossącego pojazdu biorącego udział w zawodach Formuła Student. Obliczenia zostały przeprowadzone w programie PTC Mathcad, a model CAD wykonany w programie SolidWorks.

Wszystkie założenia projektowe zostały spełnione. Zaprojektowany układ turbodoładowania posiada następujące cechy:

- jest zgodny z regulaminem Formuła Student,
- osiąga moc maksymalną na poziomie 75kW,
- maksymalny spręż osiągnięty przez turbosprężarkę wynosi 1,5.



Rysunek 20. Wykres mocy od prędkości obrotowej dla silnika wolnossącego oraz doładowanego

Źródło: opracowanie własne.

Jak można zaobserwować na rysunku 20, poniżej 8000 obr/min silnik turbodoładowany dysponuje taką samą mocą jak wolnossący. Wynika to z tego, że przepływ spalin silnika nie jest w stanie napędzić wirnika turbiny na tyle, aby spręż przekroczył wartość 1. Powyżej 8000 obr/min sytuacja się zmienia, aby przy maksymalnej mocy spręż osiągnął szczytową wartość równą 1,5. Różnica pomiędzy mocą maksymalną silnika wolnossącego a doładowanego wynosi 43,8%. Dobrana turbosprężarka jest najmniejszą z oferowanych w katalogu firmy Garrett.

Podczas projektowania duży wpływ na kształt układu turbodoładowania wywarło: poprzeczne umieszczenie silnika, tylna rama pojazdu, zawieszenie – należało uwzględnić jego zakres pracy, oraz układ chłodzenia i smarowania.

Zaprojektowany układ wymaga dopracowania przed montażem w pojeździe. Należy przeprowadzić jeszcze obliczenia przepływowe kolektora dolotowego oraz obliczenia poziomu hałasu generowanego przez auto. Wynika to z charakteru pracy, która miała się skupiać na samym zjawisku turbodoładowania.

Wnioski:

- Z dwóch dostępnych opcji układu zaproponowanych na rysunku 5 układ bez chłodnicy powietrza okazał się korzystniejszy ze względu na dostępną ilość miejsca w pojeździe.
- Zaprojektowany układ spełnia postawione wymagania i założenia konstrukcyjne.
- Zawór upustowy został zastosowany w celu zapobiegnięcia awarii układu w razie uszkodzenia zaworu recyrkulacyjnego.
- Zastosowanie programu PTC Mathcad znacznie ułatwiło przeprowadzane obliczenia.
- Implementacja układu turbodoładowania do silnika wolnossącego jest korzystna pod względem przyrostu mocy (43,8%).
- Maksymalna moc silnika doładowanego wynosi 75 kW przy 10750 obr/min.

Bibliografia

- aperaceparts.com. 13 12 2020. http://www.aperaceparts.com/tech/2008cbr600rr_1.html (data uzyskania dostępu: 12 13, 2020).
- Co. Honda Motor. 2008 Honda CBR 600rr Service Manual. California, 2008.
- Dariusz Szpica. „The Calculation Method of Determining of the Engine Full Load Characteristics and Performance.” *Mechanika 2018 Proceedings of the 23rd international scientific conference*. Kaunas: Technologija, 2018.
- formulastudent.de. 13 12 2020. www.formulastudent.de (data uzyskania dostępu: 12 13, 2020).
- Garrett. Performance catalog vol 8. Garrett Motion inc, 2020.
- motodiagnostyka.wordpress.com. 27 12 2020. <https://motodiagnostyka.wordpress.com/>.
- R.K. Rajput. *Internal Combustion Engines*. New Delhi: Laxmi Publications, 2005.

Abstract

**DESIGN OF A TURBOCHARGING SYSTEM FOR THE NATURALLY
ASPIRATED ENGINE OF A VEHICLE PARTICIPATING IN THE FORMULA
STUDENT COMPETITION**

The aim of the study was to design a turbocharging system for the naturally aspirated engine of a vehicle participating in the Formula Student competition. A review of the design solutions of the turbo-charging systems was carried out and the design assumptions were specified on its basis. With the external characteristics of the naturally aspirated base engine, calculations were made to select an appropriate turbocharger, and then the external characteristics of the supercharged engine were calculated. CAD models of the intake manifold, muffler, intake pipes, throttle and necessary fittings were also created. As a result of the performed calculations, the maximum power was obtained at the level of 75 kW. This is an increase of 43.8% compared to the naturally aspirated engine. The designed system meets the requirements and design assumptions and complies with the Formula Student regulations.

Słowa kluczowe: turbodoładowanie, formula student, motorsport, silnik spalinowy

Keywords: turbocharging, formula student, motorsport, internal combustion engine

Dane do kontaktu z autorem:

Damian Kołos: damian.kolos77@gmail.com

Tomasz Łodziński: tlozdinski1@gmail.com

mgr inż. Tomasz Kruszewski

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Nauk Technicznych

Studenckie Koło Naukowe Podstawowych Problemów Bezpieczeństwa

Opiekun: dr inż. Wojciech Rejmer

WPŁYW STĘŻENIA KWASU FLUOROWODOROWEGO HF NA ODPORNOŚĆ KOROZYJNĄ MATERIAŁU AW-2017A

Wstęp

W ostatnich latach obserwuje się szybki rozwój stopów metali nieżelaznych, w tym stopów aluminium (Michna 2007). Wywołane jest to rosnącym zapotrzebowaniem na stopy lekkie oraz związane z rozwojem technologii wytwarzania pozwalających na uzyskiwanie dla nich coraz wyższych właściwości mechanicznych, przy jednoczesnym zachowaniu ich niskiej gęstości, umożliwiającej obniżenie masy elementów z nich wytwarzanych. Istotne jest to m.in. w przemyśle motoryzacyjnym, lotniczym czy okrętowym.

Istotnym czynnikiem są również właściwości stopu aluminium: może być poddany powtórnemu wykorzystaniu (Lipiński 2018), łączony za pomocą technik spawalniczych (Nam i in. 2016; Sinhmar, Dwivedi 2017), łączony z innymi stopami (Brown 1999), stanowić warstwy powierzchniowe (Jose i in. 2020; Renaud i in. 2019) itp. Mechanizmy tego procesu bywają różne i zależą od szeregu czynników (Szklarczyk i in. 2014; Baszkiewicz, Kamiński 2006; Wie i in. 1998; Abdell Rehim i in. 2004; Bagheri i in. 2013). Rzadko spotyka się procesy zużycia prowadzące do niszczenia powierzchni materiałów metalicznych oparte wyłącznie na jednym mechanizmie. W praktyce spotykamy się ze zużywaniem materiału pod wpływem co najmniej dwóch procesów niszczących. Równoczesne oddziaływanie czynników klimatycznych i eksploatacyjnych sprawia, że elementy konstrukcyjne narażone są na działanie złożonego zespołu czynników niszczących wywołujących bardzo róż-

nicowane formy zużycia, w tym korozję (Kwiatkowski 2009; Kubasek i in. 2017; Curioni i in. 2009; Wang i in. 2016).

W zależności od składu chemicznego stopy metali przeznaczone są na elementy pracujące zarówno w środowiskach agresywnych, jak i pod obciążeniem. Ze względu na odporność korozyjną, niską gęstość oraz dobrą spawalność stopy aluminium stosowane są do przeróbki plastycznej (Michna i in. 2005; Novak i in. 2012; Lipiński a 2017). Kształtowniki i blachy wykonane z tych stopów znajdują szerokie zastosowanie w zbiornikach, głównie stosowanych w transporcie drogowym. Muszą one spełniać odpowiednie kryteria wytrzymałościowe w zależności od przeznaczenia zbiornika ze względów bezpieczeństwa. Właściwości te wynikają z mikrostruktury (Bousquet i in. 2011; Hughes in. 2011; Dong i in. 2013), która jest efektem procesu technologicznego jej wytwarzania i składu chemicznego stopu (Lipiński 2018). Zaleca się, biorąc pod uwagę ekologię, wykonanie zbiorników z jak najmniejszym naddatkiem grubości zapewniającym bezpieczeństwo użytkowania.

W trakcie eksploatacji zapas ten ulega zmianie, zmniejszeniu się na skutek zużycia ściernego, również i korozyjnego (Orman, Golian 1963; Vargel 2004; Sinjavskij i in. 1979). Zmiana mikrostruktury stopu stanowi najistotniejszy problem spowodowany penetracją czynników agresywnych, głównie po granicach ziaren stopu (Vargel 2004; Sinjavskij i in. 1979). Szczeliny submikroskopowe powodujące rozwarstwienie materiału, zwłaszcza przy pracy zbiornika w środowisku cieczy mogą zostać niezauważone nawet przy prowadzonych okresowo badaniach grubości blach. Skutkiem procesu korozji jest obniżenie rzeczywistego przekroju roboczego materiału konstrukcyjnego poniżej wartości dopuszczalnej dla obciążenia nominalnego mogącego skutkować awarią. Ze względu na zjawisko korozji istotne jest poszerzenie wiedzy dotyczącej przebiegu procesów korozji zachodzących w materiałach, co czyni temat podjęty w niniejszej pracy aktualnym (Poderez-Radziszewska, Haimann 2011; Jurczak 2010).

Pomimo ciągłego doskonalenia stopów metali nadal ulegają one procesom korozji. Jednym z czynników powodujących degradację materiałów konstrukcyjnych są substancje chemiczne stosowane w warunkach eksploatacyjnych do mycia i konserwacji urządzeń. Współczesne materiały konstrukcyjne mają kontakt z szeroką gamą środowisk agresywnych stanowiących media robocze oraz środki myjące, do których należy między innymi kwas fluorowodorowy o wzorze sumarycznym HF (Vargel 2004).

Cel

Celem badań jest określenie szybkości korozji stopu AW-2017A w środowisku kwasu fluorowodorowego (HF).

Material i metody

Stop aluminium AW-2017A (PA6) charakteryzuje się wysokimi właściwościami wytrzymałościowymi, jest podatny na obróbkę skrawaniem. Tabela 1 przedstawia skład chemiczny stopu AW-2017A wg PN EN-ISO 573-2, natomiast tabela 2 – wybrane własności mechaniczne.

Tabela 1. Skład chemiczny stopu AW-2017A

AW-2017A - skład chemiczny [%]							
Si	Fe	Cu	Mn	Mg	Cr	Zn	Ti
0,20–0,80	0,60–0,80	3,50–4,50	0,40–1,00	0,40–1,00	0,08–0,12	0,23–0,27	0,17–0,23

[PN EN-ISO 573-2]

Tabela 2. Właściwości mechaniczne stopu AW-2017A

Właściwości mechaniczne			
Rm [MPa]	Rp _{0.2} [MPa]	A [%]	Twardość [HBW]
390	260	9	105

Źródło: [<http://www.oberonrd.pl/?p=main&what=120> (dostęp 30.03.2020 r.)]

Do badań został wytypowany stop aluminium cieszący się dużą popularnością w obróbce plastycznej AW-2017A. Z arkusza blachy zostały wycięte próbki o wymiarach 40x10x6 mm. Próbki zostały zważone po procesie cięcia przy użyciu wagi laboratoryjnej KERN ALT 310-4AM z dokładnością 0,0001 g. Badania korozyjne przeprowadzono w wodnym roztworze kwasu fluorowodorowego o stężeniach: 0,5%; 1%; 1,5%; 2% oraz 2,5%. Próbki przetrzymywano pojedynczo w roztworach kwasu fluorowodorowego o objętości 100 ml przez 48, 96, 144, 192 oraz 240 h w temperaturze pokojowej. Następnie próbki wyjmowano, przerywano oddziaływanie roztworu poprzez przemycie w wodzie destylowanej. Na wysuszonych próbkach określono ubytki masowe przy użyciu wagi laboratoryjnej KERN ALT 310-4AM. Pomiaru chropowatości parametrów Ra [µm] i Rz [µm] dokonano przy użyciu profilometru liniowego Mitutoyo SJ-210 według PN EN-ISO 4287:1999/A1:2010. Badania metalograficzne przeprowadzono na mikroskopie optycznym OLYMPUS IX70.

Procentowy ubytek masowy określano z równania (1):

$$\Delta m = \frac{m_0 - m_x}{m_0} \cdot 100\% \quad (1)$$

gdzie:

Δm – ubytek masowy [%],

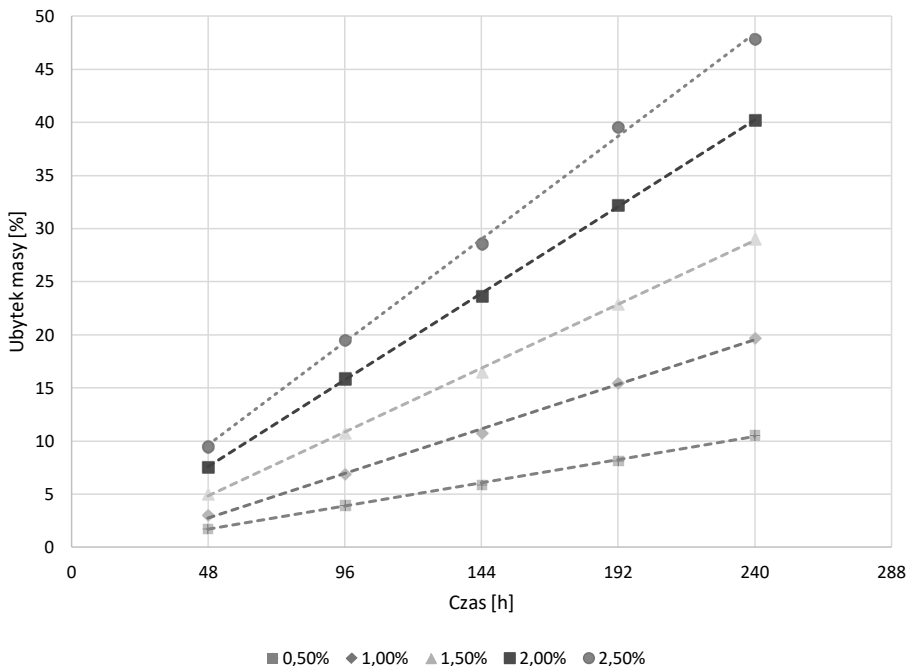
m_0 – początkowa masa próbki [g],

m_x – masa próbki po czasie przetrzymywania $x = 48, 96, 144, 192$ oraz 240 h [g].

Adekwatności równań $\Delta R_a, \Delta R_z, \Delta m = f(t)$ oceniano przy pomocy testu t-Studenta dla próby i poziomic istotności $\alpha = 0,05$.

Wyniki badań i ich analiza

Ubytki masowe w przygotowanych stężeniach kwasu fluorowodorowego HF wyrażone w [%] przedstawiono na rysunku 1. Dla doświadczenia przedstawiono równania regresji wraz ze współczynnikami determinacji.



Rysunek 1. Ubytki masowe stopu AW-2017A w [%] przetrzymywane w odpowiednich stężeniach kwasu HF

Źródło: opracowanie własne.

Równania funkcji liniowej i współczynnika determinacji R^2 dla ubytków masowych [%] w czasie [h] (2–6):

– dla stężenia 0,5% HF

$$y = 0,0454x - 0,4761, \quad \text{dla którego} \quad R^2 = 0,9986 \quad (2)$$

– dla stężenia 1,0% HF

$$y = 0,0874x - 1,4279, \quad \text{dla którego} \quad R^2 = 0,9985 \quad (3)$$

– dla stężenia 1,5% HF

$$y = 0,1253x - 1,1881, \quad \text{dla którego} \quad R^2 = 0,9994 \quad (4)$$

– dla stężenia 2,0% HF

$$y = 0,1699x - 0,5615, \quad \text{dla którego} \quad R^2 = 0,9998 \quad (5)$$

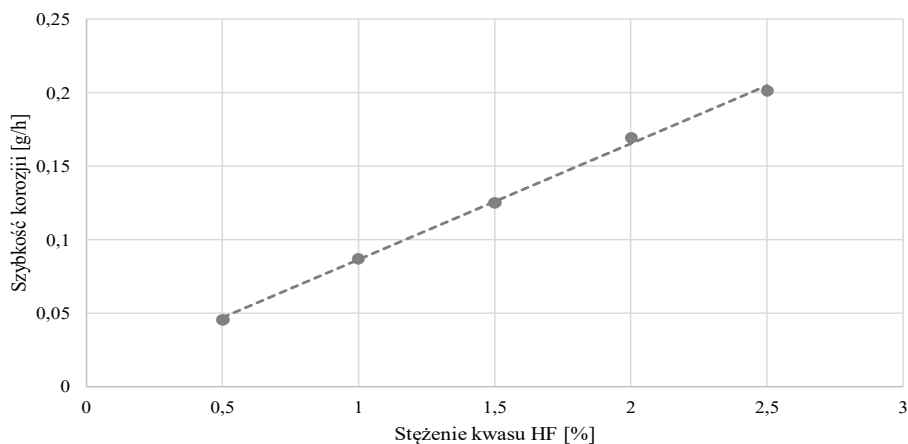
– dla stężenia 2,5% HF

$$y = 0,2017x - 0,0377, \quad \text{dla którego} \quad R^2 = 0,9987 \quad (6)$$

Adekwatności równań oceniano przy pomocy testu t-Studenta dla próby i poziomie istotności $\alpha=0,05$.

Analizując rysunek 1, stwierdzono, że wraz ze wzrostem stężenia kwasu HF wzrasta ubytek masy. W czasie przetrzymywania próbek przez 48 h ubytek masowy w kwasie HF o stężeniu 0,5% wzrósł około pięćpółkrotnie mniej niż w przypadku stężenia 2,5%, w czasie przetrzymywania próbek przez 144 h ubytek masowy wzrósł około pięciokrotnie, w czasie przetrzymywania próbek 240 h ubytek masowy wzrósł około czterypółkrotnie.

Wyniki badań z wystarczającą dokładnością można przedstawić za pomocą funkcji liniowej, której równania przedstawiono w równaniach od (2) do (6). Współczynnik determinacji na największą wartość $R^2 = 0,9998$ w kwasie HF o stężeniu 2%, natomiast najmniejszą wartość $R^2 = 0,9985$ w kwasie HF o stężeniu 1%. Wartość współczynnika determinacji R^2 wykresów dla każdej mieszaniny można uznać za bardzo dobry. Współczynniki kierunkowe równań liniowych reprezentują szybkość korozji w g/h.



Rysunek 2. Zależność szybkość korozji stopu AW-2017A od stężenia kwasu HF

Źródło: opracowanie własne.

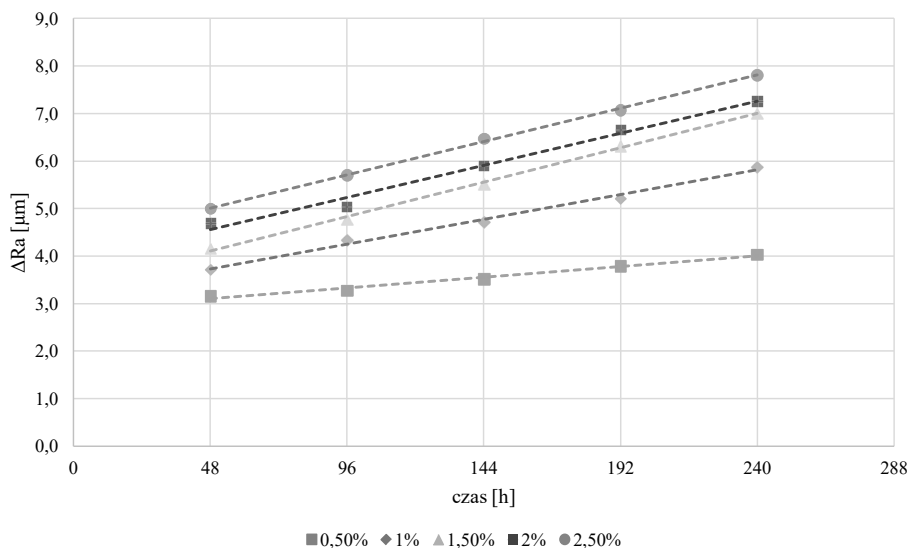
Zależność szybkości korozji [g/h] od stężenia kwasu fluorowodorowego przedstawiono na rysunku 2.

Równanie funkcji liniowej i współczynnika determinacji R^2 dla zależności szybkości korozji w [g/h] (7):

$$y = 0,079x + 0,0074, \quad \text{dla którego} \quad R^2 = 0,9978 \quad (7)$$

Analizując rysunek 2, stwierdzono, że szybkość korozji wzrasta wraz ze wzrostem stężenia kwasu HF. Szybkość korozji wzrosła około czterokrotnie dla stężenia kwasu HF 2,5% niż o stężeniu 0,5%.

Na rysunku 3 przedstawiono zmianę wartości parametru chropowatości ΔRa w czasie w różnych stężeniach kwasu HF wyrażoną w $[\mu\text{m}]$, natomiast rysunek 4 przedstawia parametr chropowatości ΔRz w $[\mu\text{m}]$. Wartości parametrów Ra oraz Rz przedstawiono jako przyrost wartości od wartości materiału rodzimego. Dla parametru Ra wartość wyniosła 0,982 μm , natomiast dla Rz – 5,351 μm .



Rysunek 3. Zmiany parametru chropowatości Ra stopu $\Delta PA6$ w $[\mu\text{m}]$ przetrzymywanych w odpowiednich stężeniach kwasu HF

Źródło: opracowanie własne.

Równania funkcji liniowej i współczynnika determinacji R^2 dla parametru chropowatości Ra $[\mu\text{m}]$ w czasie [h] (8–12):

– dla stężenia 0,5% HF

$$y = 0,0047x + 2,8770, \quad \text{dla którego} \quad R^2 = 0,9807 \quad (8)$$

– dla stężenia 1% HF

$$y = 0,0108x + 3,2095, \quad \text{dla którego} \quad R^2 = 0,9932 \quad (9)$$

- dla stężenia 1,5% HF

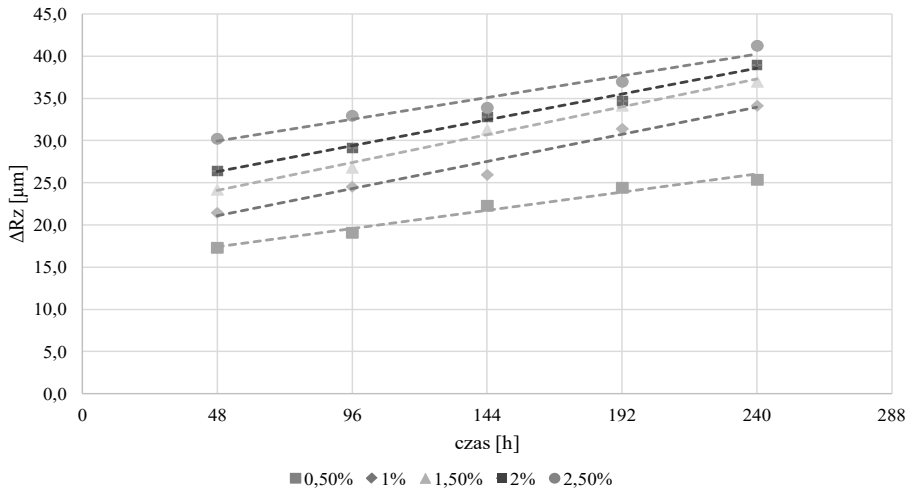
$$y = 0,0151x + 3,3823, \quad \text{dla którego} \quad R^2 = 0,9983 \quad (10)$$

- dla stężenia 2% HF

$$y = 0,0141x + 3,8783, \quad \text{dla którego} \quad R^2 = 0,9868 \quad (11)$$

- dla stężenia 2,5% HF

$$y = 0,0146x + 4,3098, \quad \text{dla którego} \quad R^2 = 0,9989 \quad (12)$$



Rysunek 4. Zmiany parametru chropowatości ΔR_z [μm] stopu PA6 w czasie w odpowiednich stężeniach kwasu HF

Źródło: opracowanie własne.

Równania funkcji liniowej i współczynnika determinacji R^2 dla parametru chropowatości R_z [μm] w czasie [h] (13–17):

- dla stężenia 0,5% HF

$$y = 0,0450x + 15,239, \quad \text{dla którego} \quad R^2 = 0,9751 \quad (13)$$

- dla stężenia 1% HF

$$y = 0,0689x + 20,754, \quad \text{dla którego} \quad R^2 = 0,9706 \quad (14)$$

- dla stężenia 1,5% HF

$$y = 0,0671x + 17,859, \quad \text{dla którego} \quad R^2 = 0,9918 \quad (15)$$

- dla stężenia 2% HF

$$y = 0,0638x + 23,236, \quad \text{dla którego} \quad R^2 = 0,9901 \quad (16)$$

- dla stężenia 2,5% HF

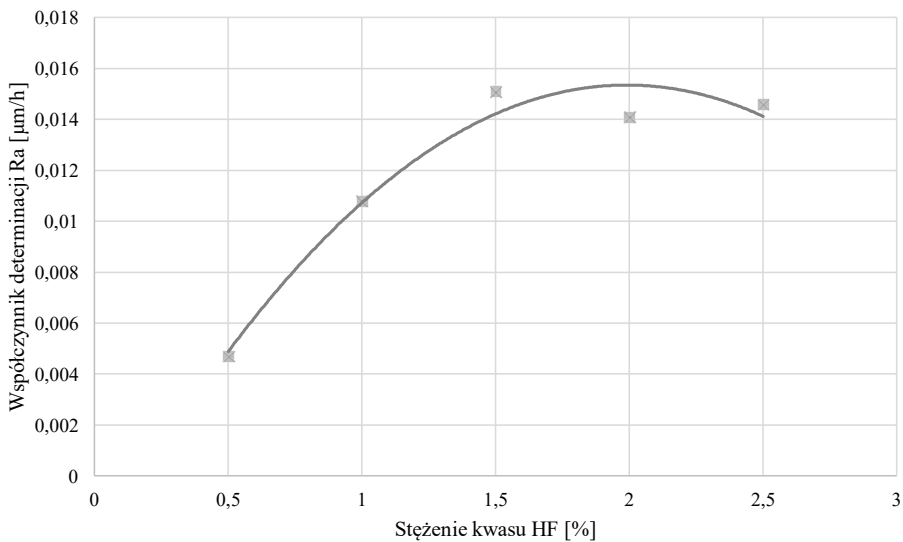
$$y = 0,0538x + 27,333, \quad \text{dla którego} \quad R^2 = 0,9555 \quad (17)$$

Analizując parametry chropowatości R_a [μm] przedstawione na rysunku 3 i R_z [μm] przedstawione na rysunku 4, stwierdzono ich podobny przebieg. Największe wartości parametru R_a , jak i R_z dla każdego czasu przetrzymywania próbek uzyskano w kwasie HF o stężeniu 2,5%, natomiast najmniejsze w kwasie HF o stężeniu 0,5%.

Wraz ze wzrostem czasu przetrzymywania próbek w kwasie HF o stężeniu 0,5% wartość parametru R_a [μm] wzrosła od czasu 48 h do czasu 240 h o około 25%, w kwasie o stężeniu 1,5% wartość wzrosła o około 50%, natomiast w kwasie HF o stężeniu 2,5% wartość wzrosła o około 55%.

Wraz ze wzrostem czasu przetrzymywania próbek w kwasie HF o stężeniu 0,5% wartość parametru R_z [μm] wzrosła od czasu 48 h do czasu 240 h o około 50%, w kwasie o stężeniu 1,5% wartość wzrosła o około 50%, natomiast w kwasie HF o stężeniu 2,5% wartość wzrosła o około 35%.

Zależności szybkości zmian chropowatości od stężenia kwasu fluorowodorowego dla parametru R_a w [μm] przedstawiono na rysunku 5, natomiast parametru R_z w [μm] przedstawiono na rysunku 6.

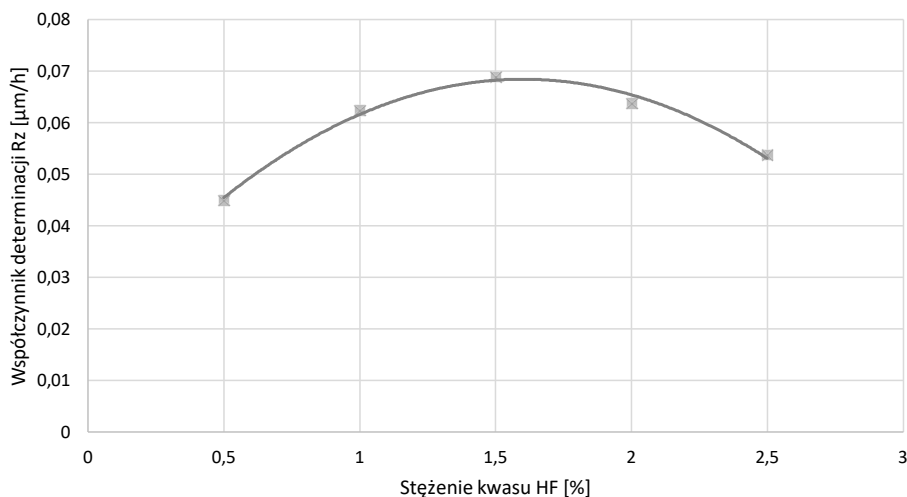


Rysunek 5. Zależność szybkość zmian chropowatości parametru R_a [μm] stopu AW-2017A od stężenia kwasu HF

Źródło: opracowanie własne.

Równanie funkcji kwadratowej i współczynnika determinacji R^2 dla zależności szybkości zmian chropowatości parametru R_a w [μm] od stężenia kwasu HF (18):

$$y = -0,0047x^2 + 0,0188x - 0,0033, \quad \text{dla którego} \quad R^2 = 0,9655 \quad (18)$$



Rysunek 6. Zależność szybkość zmian chropowatości parametru Rz [µm] stopu AW-2017A od stężenia kwasu HF

Źródło: opracowanie własne.

Równanie funkcji kwadratowej i współczynnika determinacji R^2 dla zależności szybkości zmian chropowatości parametru Rz w [µm] od stężenia kwasu HF (19):

$$y = -0,019x^2 + 0,0607x + 0,0199, \quad \text{dla którego} \quad R^2 = 0,9655 \quad (19)$$

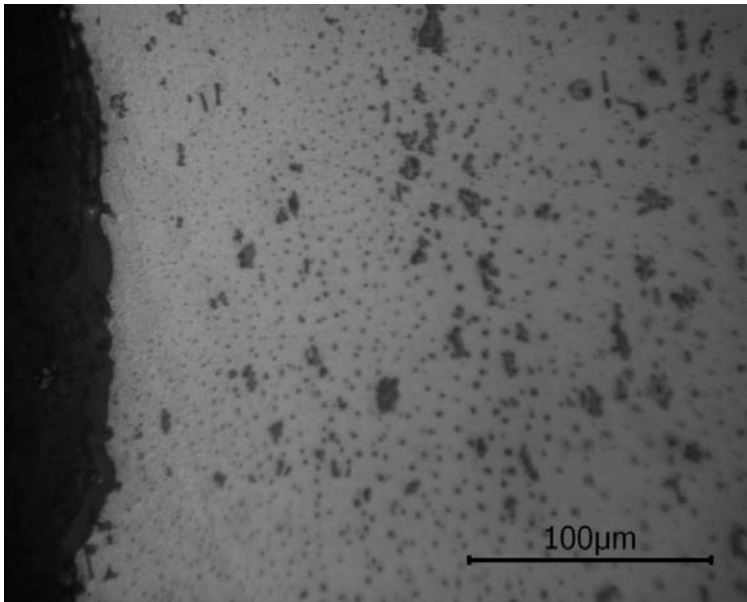
Zależność szybkości zmian chropowatości od stężenia kwasu fluorowodorowego HF przyjmuje zależności wielomianu drugiego stopnia z ekstremum występującym na poziomie stężenia kwasu 1,5%. Zjawisko to można tłumaczyć wpływem niedoskonałości powierzchni i występowania na nim centrum aktywnych. W przypadku stężeń większych niż 1,5% następuje najprawdopodobniej tworzenie się mikroogniw, co powoduje niejednorodne zmiany w strukturze.

Mikrostruktury metalograficzne dla stężenia kwasu HF 0,5% w czasie przetrzymywania próbek 240 h przedstawiono na rysunku 7, natomiast dla stężenia kwasu HF 2,5% w czasie przetrzymywania próbek 240 h przedstawiono na rysunku 8. Wykonane zostały przy użyciu mikroskopu optycznego OLYMPUS IX70.

Podsumowanie

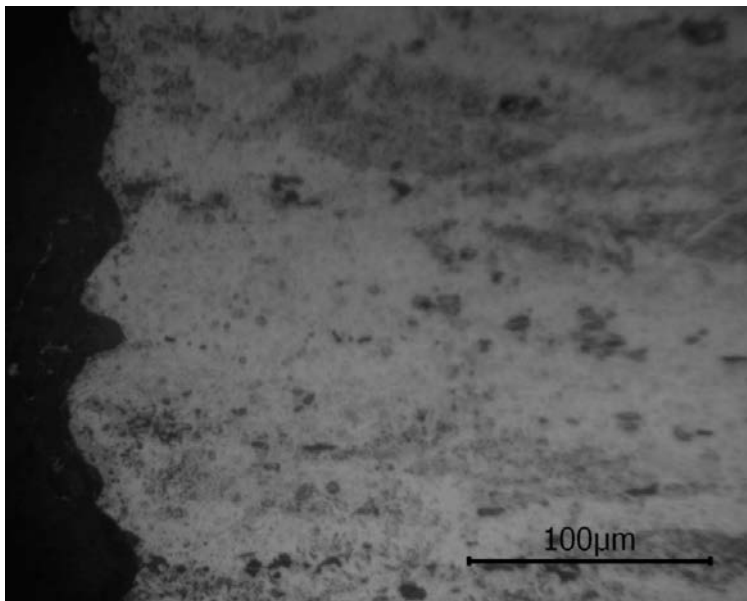
Na podstawie wyników przeprowadzonych badań sformułowano poniższe wnioski.

- Szybkości korozji zależy od: składu chemicznego środowiska korozyjnego, rozwinięcia powierzchni próbki oraz czasu przebywania próbek w środowisku korozyjnym:



Rysunek 7. Mikrostruktura stopu PA6 moczona w kwasie HF o stężeniu 0,5% w czasie 240 godz., pow. 400x

Źródło: opracowanie własne.



Rysunek 8. Mikrostruktura stopu PA6 moczona w kwasie HF o stężeniu 2,5% w czasie 240 godz., pow. 400x

Źródło: opracowanie własne.

- Największą szybkość korozji stopu AW-2017A stwierdzono dla stężenia 2,5% kwasu HF.
- Dla każdego ze stężeń kwasu HF wraz z wydłużeniem czasu przetrzymywania próbek stwierdzono proporcjonalny wzrost ubytku masy.
- Szybkość ubytku masowego można przedstawić z dużą dokładnością w postaci funkcji liniowej. Oznacza to, że kinetyka procesu zużycia jest procesem pierwszorzędowym.
- Wraz ze wzrostem stężenia kwasu HF stwierdzono wzrost przyrostów parametrów chropowatości Ra i Rz.
- Szybkość zmian parametrów chropowatości jest opisywana wielomianem drugiego stopnia. Nieliniowa zależność jest spowodowana tworzeniem mikroogniw i różną szybkością ubytku masowego w szczytach i dolinach. W związku z tym zmiany chropowatości zachodzą najszybciej dla stężenia 1,5%. Wyższe stężenia powodują bardziej równomierne zużycie materiału, stąd mniejsze szybkości zmian chropowatości.
- Przedstawione równania regresji mogą posłużyć do przeprowadzenia procesu symulacji korozji badanego stopu w środowisku HF o różnym stężeniu.

Bibliografia

- Abdel Rehim S.S., Hassan H.H., Amin M.A. 2004. Chronoamperometric studies of pitting corrosion of Al and (Al-Si) alloys by halide ions in neutral sulphate solutions. *Corrosion Sci.*, 46, 1921–1938
- Bagheri Hariri M., Gholami Shiri S., Yaghoubi Nezhad Y. 2013. Mohammadi Rahvard M. The optimum combination of tool rotation rate and traveling speed for obtaining the preferable corrosion behavior and mechanical properties of friction stir welded AA5052 aluminum alloy. *Mater Des*;50:620–34.
- Baszkiewicz J., Kamiński M. 2006. *Korozja materiałów*. Warszawa: Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej.
- Bousquet E., Poulon-Quintin A., Puiggali M., Devos O., Touzet M., 2011. Relationship between microstructure, microhardness and corrosion sensitivity of an AA 2024-T3 friction stir welded joint. *Corros Sci*; 53:3026–34.
- Brown S. 1999. Feasibility of Replacing Structural Steel with Aluminum Alloys in the Shipbuilding Industry, University of Wisconsin-Madison
- Curioni M., Skeldon P., Koroleva E., Thompson G.E., Ferguson J. 2009. Role of tartaric acid on the anodizing and corrosion behavior of AA 2024 T3 aluminum alloy. *J. Electrochem. Soc.*, 156, 147–153.
- Dong P, Sun D, Wang B, Zhang Y, Li H. 2014. Microstructure, microhardness and corrosion susceptibility of friction stir welded AlMgSiCu alloy. *Mater Des*;54:760–5. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2013.09.001>.

- Hughes E.A., Birbilis N., J MC, J. S, Zhou X., E.G. High strength Al-alloys: microstructure, corrosion and principles of protection. In: Ahmad Zaki, editor. Recent trends process. degrad. alum. alloy. InTech; 2011. p. 223–62.
- José Cabral-Miramontes, Citlalli Gaona-Tiburcio, Francisco Estupinán-López, María Lara-Banda, Patricia Zambrano-Robledo, Demetrio Nieves-Mendoza, Erick Maldonado-Bandala, José Chacón-Nava and Facundo Almeraya-Calderón Corrosion Resistance of Hard Coat Anodized AA 6061 in Citric–Sulfuric Solutions. *Coatings* 2020, 10(6), 601;
- Jurczak W., 2010. Problemy i perspektywy stopów aluminium w zastosowaniu na konstrukcje morskie, *Zeszyty naukowe akademii morskiej w Gdynii*, nr 4 (183)
- Kubásek J., Dalibor V., Dvorský D. 2017. Structure and mechanical properties of aluminium alloy sampled from a firefighter ladder. In: *Manufacturing Technology*, Vol. 17, No 6, pp. 876-881.
- Kwiatkowski L. 2009. Podatność na korozję i skuteczność aktualnych metod ochrony przed korozją stopów aluminium stosowanych w budownictwie, *Inżynieria powierzchni*, nr 4 –, str. 24–32
- Lipiński T., 2017. Corrosion effect of 20% NaCl solution on basic carbon structural S235JR steel. 15th International Scientific Conference Engineering for Rural Development, Jelgava Proceedings, vol. 15, pp. 1069–1074.
- Lipiński T., 2017. Corrosion Effect of Animal Slurry on Low Carbon S235JR Steel at 333 K. Proceedings of the 8th International Scientific Conference Rural Development 2017, Lithuania, pp. 352–358.
- Lipinski T. 2018. Influence of Ti and melt number on microstructure and mechanical properties of Al-Si alloy on agriculture machine parts. In: Proceedings of Engineering for Rural Development, Vol. 17, pp. 1431–1436.
- Michna S., Luka I., Ocenasek, V., Koren R., Drapala J., Schneider H., Miskufova A. 2005. Encyclopaedia of aluminium. Adin s.r.o. Presov.
- Michn Š., Lukáč, I., Louda P., Očenašek V. 2007. Aluminium materials and technologies from A to Z Adin s.r.o.
- Nam N.D., Dai L.T., Mathesh M., Bian M.Z., Thu V.T.H. 2016. Role of friction stir welding – traveling speed in enhancing the corrosion resistance of aluminum alloy. *Mater Chem Phys*;173:7–11.
- Novak M., Naprstkova N., Ruzicka L. 2012. New ways in aluminium alloys grinding. *Key Engineering Materials*, Vol. 496, pp. 132–137.: Precision Machining IV. TTP. Zurich.
- Orman M., Golian A. 1963. *Korozja aluminium i jego stopów*. Wydawn. Ślă sk.
- Podrez-Radziszewska M., Haimann K., 2011. Badania porównawcze odporności na korozję elektrochemiczną wybranych stopów aluminium z serii 2xxx, 5xxx i 7xxx, *Ochrona przed korozją*, nr 7, str. 440–443
- Renaud A., Paint Y., Lanzutti A., Bonnaud L., Fedrizzi L., Dubois P., Poorteman M., Olivier M.G. Sealing Porous anodic layers on AA2024-T3 with a low viscosity benzoxazine resin for corrosion protection in aeronautical applications. *RSC Adv.* 2019, 9, 16819–16830
- Sinjavskij V.S., Volkov V.D., Budov G.M., *Korozja i zashchita aluminijevych splavov*. “Metalurgija”, Moskva 1979.
- Sinhmar S., Dwivedi D.K. Enhancement of mechanical properties and corrosion resistance of friction stir welded joint of AA2014 using water cooling. *Mater Sci Eng A* 2017:684.
- Szklarczyk P., Klimecka-Tatar D., Sygut P., Lipiński T., 2014. Quality assessment of the hot-rolled production. In: Identification of the factors demanding for improvement in the engineering

- material production. Scientific editors S. Borkowski, T. Lipiński. Faculty of Logistics, University of Maribor. Celje, Chapter 4, p. 41–52. ISBN 978-961-6562-96-6. 0.55
- Uhlig H.H., Revie R.W. Corrosion and corrosion control. 3rd Edition, John Wiley and Sons 1985.
- Vargel C. 2004. Corrosion of Aluminium, Elsevier Ltd., s. 9, 220
- Wang B., Liu J., Yin M., Xiao Y., Wang X.H., He J.X. 2016. Comparison of corrosion behavior of Al-Mn and Al-Mg alloys in chloride aqueous solution. *Mater. Corros.*, 67, 51–59
- Wei R.P., Liao C.M., Gao M., 1998. Magnetic Fields Induced by Electrochemical Reactions: Aluminum Alloy Corrosion Sensing by SQUID Magnetometry on a Macroscopic Scale, *Metall. Mat. Trans. A*, 29A, p. 1153–1160.
- <http://www.oberonrd.pl/?p=main&what=120> (dostęp 30.03.2020 r.)
- PN EN-ISO 4287:1999/A1:2010. Specyfikacje geometrii wyrobów. Struktura geometryczna powierzchni: metoda profilowa. Terminy, definicje i parametry struktury geometrycznej powierzchni.
- PN EN ISO 573-3:2019-12. Aluminium i stopy aluminium. Skład chemiczny i rodzaje wyrobów przerobionych palstycznie. Część 3: skład chemiczny i rodzaje wyrobów.
- PN EN-ISO 9223:2012. Korozja metali i stopów. Korozyjność atmosfer. Klasyfikacja, określanie, ocena

Abstract

THE INFLUENCE OF HF ENVIRONMENT ON THE CORROSION RESISTANCE OF AW-2017A MATERIAL

One of the factors vastly contributing to the corrosion of construction materials are chemicals used in service conditions, mostly for cleaning and maintaining equipment. Contemporary construction materials come into contact with a wide range of aggressive environments, among cleaning agents and others working media, which include HF acid. One of the most popular aluminum alloys for plastic forming AW-2017A was selected for research. The degradation tests were carried out in specific environments HF acid with a concentration: 0,5%; 1,0%; 2,5%; 2% and 2,5%. Then the samples were taken out and the effect of the solution was stopped by distilled water. Their mass losses were determined on dried samples, roughness measurements were carried out using a profilometer and metallographic tests of sample cross-section were performed using an optical microscope. On the basis of the tests performed, the corrosion rate of the alloy was determined for each selected concentration of HF acid. A greater impact on the degradation of the AW-2017A alloy was demonstrated by HF acid with a concentration 2,5%, for which the interaction with sufficient determination can be represented by a linear function

Słowa kluczowe: aluminium, stopy aluminium, korozja, AW-2017A

Key words: aluminium, aluminium alloys, corrosion, AW-2017A

Łukasz Łobko

Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie

Wydział Geodezji Górniczej i Inżynierii Środowiska

Koło Naukowe Geodetów „Dahlta”

Opiekun Koła: dr inż. Tadeusz Szczutko

KONSTRUKCJA NIWELATORA HYDROSTATYCZNEGO WSPOMAGANEGO MINIKOMPUTEREM RASPBERRY PI

1. Wstęp

Niwelacja jest podstawowym, a zarazem niezwykle ważnym elementem pomiarów geodezyjnych. Dokładne wyznaczenie wysokości jest bardzo istotne dla wielu działań gospodarki. W ramach niwelacji geometrycznej korzysta się z niwelatorów optycznych lub cyfrowych. Są to sprzęty tanie jak na standardy geodezyjne oraz wykazują się bardzo dobrą dokładnością 1–2 milimetrów na kilometr podwójnej niwelacji (www.Sklepylaserowe.Pl, 2021). Ich działanie polega na odczycie wartości wysokości z dwóch łąt niwelacyjnych, a następnie obliczeniu przewyższenia. W tym artykule skupię się na wykorzystaniu niwelatorów w trudnych warunkach silnie zurbanizowanego otoczenia z wieloma przeszkodami terenowymi. To w takich okolicznościach najczęściej korzysta się z niwelacji geometrycznej. Z tego powodu pominięta zostanie niwelacja trygonometryczna, która jest wykorzystywana dla długich celowych (do 250 metrów). Nie znajdzie też tutaj zastosowania niwelacja satelitarna, gdyż w warunkach silnie zurbanizowanych nie jest możliwe zapewnienie odpowiedniej widoczności satelitów.

Jednak nawet niwelacja geometryczna czasami nie jest w stanie w optymalny sposób wyznaczyć przewyższeń. Niejednokrotnie dochodzi do potrzeby przeprowadzania pomiarów na zamkniętych dziedzińcach kamienic, gdzie ciąg trzeba prowadzić przez korytarze okalających go budynków. Podobna sytuacja ma miejsce na budowach w gęsto zabudowanym obszarze. Mała ilość miejsca powoduje wystąpienie dużej ilości przeszkód terenowych, które skutecznie przesłaniają wizurę. Takie sytuacje niekorzyst-

nie wpływają na dokładność oraz czas wykonania pomiaru, dlatego powstał pomysł skonstruowania sprzętu pozwalającego na szybszy i dokładniejszy pomiar w przytoczonych warunkach.

2. Cel pracy

Celem pracy było stworzenie instrumentu pozwalającego na wyznaczenie przewyższeń w trudnych warunkach gęstej zabudowy szybciej i dokładniej niż wykonywane jest to w niwelacji geometrycznej za pomocą tradycyjnych niwelatorów. Pomysł opiera się na wykorzystaniu zasady naczyń połączonych. Powierzchnia ustabilizowanej cieczy w nich zgromadzonej wyznaczy płaszczyznę prostopadłą do siły grawitacji (Zhang et al. 2018) to obtain the actual deformation of a monitoring target, the measurements should be further processed to reduce the effect of temperature on the result. To this end, four data processing schemes are proposed, which are based on the frequency of processing (i.e., day by day, monthly, quarterly, or annually). Całość została wsparta przez minikomputer Raspberry PI.

3. Określenie problemów niwelacji geometrycznej

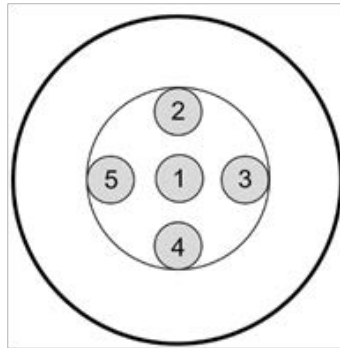
Pierwszym etapem było określenie, jakie czynniki powodują znaczne pogorszenie dokładności niwelacji geometrycznej. Dzięki temu łatwiej było jej uniknąć w konstruowanym instrumencie. Przy pomiarze muszą zostać spełnione następujące warunki geometryczne:

- płaszczyzna główna libeli okrągłej powinna być prostopadła do pionowej osi obrotu instrumentu,
- oś celowa lunety powinna być pozioma w zakresie działania kompensatora,
- nitka pozioma siatki celowniczej powinna być prostopadła do głównej osi niwelatora.

Oprócz podanych warunków (Beluch et al. 2007) na dokładność także wpływa błąd miejsca zerowego łaty oraz niepoprawne pionowanie podczas pomiaru.

Sprawdzenie warunku pierwszego należy rozpocząć od spoziomowania instrumentu. Po doprowadzeniu pęcherzyka do górowania należy obrócić alidadę o 200 gradów. Jeżeli pęcherzyk powietrza nie jest w górowaniu, oznacza to, że warunek nie jest spełniony. Może to być powodem niewielkich błędów systematycznych na każdym stanowisku. Przy wydłużaniu celowych wpływ również jest coraz większy. Jego regularne nawarstwianie się może poważnie wpłynąć na ostateczne wyniki. Trudne warunki nie mają wpływu na ten warunek, a jego sprawdzenie jest szybkie i proste.

Drugi warunek dotyczy kompensatora, który w pewnym zakresie automatycznie poziomuje oś celową. Jego stan można sprawdzić, stukając w obudowę niwelatora i obserwując siatkę krzyża nitek. Jeżeli układ kompensatora jest sprawny, to siatka powinna drgać. Następnie należy sprawdzić, czy kompensator działa poprawnie w całym swoim zakresie. Instrumentem z libellą w pozycji pierwszej według zamieszczonego rysunku (rys. 1) wykonuje się pomiar na łące. Następnie wychyla się pęcherzyk powietrza do pozycji 2, 3, 4, 5, za każdym razem dokonując odczytów. Różnica pomiędzy nimi powinna wynosić maksymalnie 1–2 milimetry.



Rysunek 1. Schemat pozycji wychyleń pęcherzyka powietrza libeli okrągłej

Jednak to wciąż nie jest koniec sprawdzania tego warunku, ponieważ pozostaje jeszcze kwestia poziomowości osi celowej lunety. W tym celu ustawia się instrument między dwiema łąkami w równych odległościach. Należy wykonać pomiar przewyższenia, a następnie przenieść instrument w pobliże jednej z łąk i powtórzyć pomiar. Jeżeli otrzymane wartości przewyższenia różnią się, to znaczy, że warunek nie został spełniony. Nawet w przypadku braku spełnienia warunku można dokonywać pomiaru, ale przy zachowanych równych odległościach do obu łąk. Przy takim układzie odczyty „wstecz” oraz „wprzód” są w takim samym stopniu obciążone błędem. Przy wyznaczaniu przewyższenia wartość z łąki „wprzód” jest odejmowana od wartości łąki „wstecz”. Tym samym wartości błędów też są odejmowane i się likwidują. Jednak w warunkach gęstej zabudowy z wieloma przeszkodami często utrzymanie symetrii odległości jest niemożliwe lub wiąże się ze znacznym zwiększeniem liczby stanowisk. Sprawdzenie instrumentu również zajmuje dosyć dużą ilość czasu.

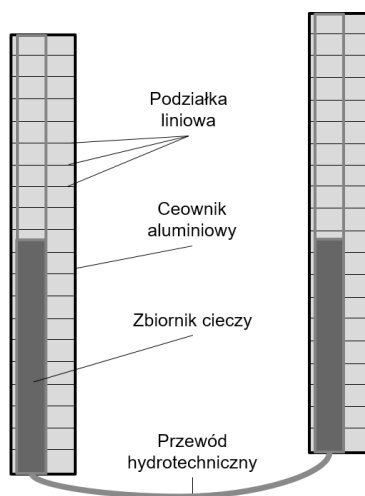
Ostatnim warunkiem geometrycznym jest zachowanie prostopadłości poziomej siatki celowniczej do osi głównej instrumentu. Sprawdzenie tego błędu polega na obserwacji swobodnie zwisającego pionu sznurkowego. Jeżeli pokrywa się on z pionową kreską siatki celowniczej, to warunek jest spełniony. W przypadku braku spełnienia warunku nie jest to przeszkodą tak wielką, jak wcześniejsze przypadki. Zakłócony może zostać odczyt z łąki, jednak wystarczy celować krzyżem nitek na jej środek w płaszczyźnie poziomej.

Pozostał błąd miejsc zera łąty oraz wpływ braku jej pionowości. Pierwszy można rozwiązać, stosując parzystą liczbę stanowisk. Przykładowo, jeżeli miejsce zero łąty „wstecz” jest przesunięte w górę o centymetr, to przewyższenie będzie o jeden centymetr mniejsze niż powinno. Na drugim stanowisku łąta „wstecz” przechodzi na kolejny punkt i staje się łątą „wprzód”. Tym razem błąd miejsca zero powoduje powiększenie przewyższenia o centymetr, likwidując się nawzajem z błędem z poprzedniego przewyższenia. Na trzecim stanowisku błąd ten znów się pojawia. W ten sposób, dopóki zostanie zachowana parzysta liczba stanowisk, błąd nie będzie miał wpływu na wynik. Natomiast odnośnie do wpływu niepionowości, to jedynym zabiegiem mogącym zredukować jego wpływ jest obniżanie stanowiska lub stosowanie podparcia łąty.

Wymienione czynniki mogą znacznie pogorszyć dokładność ostatecznego wyniku. Dokładności podane przez producenta dotyczą sprzętu nowego i w pełni sprawnego. Wraz z eksploatacją urządzenia dokładność będzie się zmniejszać. Uwolnienie nowej konstrukcji od części błędów pozwoli na zaoszczędzenie czasu przy sprawdzaniu warunków oraz środków przy serwisowaniu.

4. Konstrukcja niwelatora hydrostatycznego

Na rynku istnieją już niwelatory hydrostatyczne, jednak są to konstrukcje o wiele bardziej zaawansowane i stworzone do specjalistycznych pomiarów. Celem projektu było stworzenie prostej konstrukcji do niwelacji technicznej. Cały schemat urządzenia zamieszczono na rysunku poniżej (rys. 2).



Rysunek 2. Uproszczony schemat konstruowanego urządzenia

Konstrukcja składa się z dwóch łąt połączonych dwudziestometrowym przewodem hydrotechnicznym zapewniającym swobodny przepływ cieczy. Łata jest zbudowana z dwóch ceowników aluminiowych o długości jednego metra każdy. Są one połączone kątownikami w sposób umożliwiający ewentualny demontaż w celach transportowych. Do powstałego szkieletu jest przytwierdzony przezroczysty przewód oraz podziałka liniowa. Jest to podstawowa konfiguracja urządzenia. Do pomiaru wymagane jest napełnienie przewodu cieczą. Sam proces wyznaczenia przewyższenia polega na ustawieniu łąt na punktach i odczytaniu wartości z podziałki liniowej, jaka jest wskazywana przez poziom cieczy. Urządzenie bardzo przypomina poziomicę węzową, jednak jest konstruowane z myślą o innym zastosowaniu. Brak instrumentu pomiarowego likwiduje potrzebę spełnienia wcześniej wymienionych warunków geometrycznych. Błąd miejsca zera łąty może być usuwany tą samą metodą co w przypadku niwelacji tradycyjnej, a wpływ niepionowości łąt jest znacznie mniejszy. Dzieje się tak, ponieważ przy odchyleniu od pionu zakrzywieniu ulega jedynie niewielka część słupa cieczy przy powierzchni. Wysokość, na której dokonano odczytu, nie ma tutaj znaczenia. Ważną cechą jest też barak wymogu wizury pomiędzy stanowiskami. W przypadku terenu z wieloma przeszkodami pozwala to na znaczne zaoszczędzenie czasu.

Konstrukcja ta nie jest bez wad. Napełnianie urządzenia wodą jest kłopotliwe, ponieważ trzeba uważać, by przewód nie uległ zapowietrzeniu. Pęcherzyki powietrza w przewodzie utrudniają przepływ, co negatywnie wpływa na czas pomiaru. Dodatkowo należy mieć na uwadze rozszerzalność termiczną. W przypadku niejednorodnego nagrzania się cieczy (np. kiedy jedna łąta jest w słońcu, a druga w cieniu) gęstość w obu naczyniach będzie różna. Zgodnie z zasadami hydrostatyki układ będzie dążył do równowagi ciśnień (Fontana&DiCapua 2005). Spowoduje to zwiększony poziom cieczy w naczyniu bardziej nagrzanym. Przez budowę urządzenia mieszanie się zawartości obu łąt jest utrudnione. Przez zastosowanie przewodu o większej średnicy w części odczytowej urządzenia można wpływ rozszerzalności zredukować. Zwiększenie średnicy pomaga również w kolejnym problemie, jakim są meniski. Ich występowanie jest spowodowane zbyt mocnym przyciąganiem cząsteczek cieczy do ścianek naczynia (menisk wklęsły) lub do siebie (menisk wypukły) (Moore et al. 2005). Zakłóca to odczyt wartości z podziałki liniowej. Innym sposobem na ich redukcję jest zmiana właściwości używanej cieczy tak, by nastąpiła równowaga. Przykładem takiego działania jest dodanie detergentu do wody. Urządzenie wymaga bezpośredniego połączenia przewodem, przez co może być nieporęczne. Problem może też stanowić zakres pomiarowy, ponieważ w przypadku większych przewyższeń poziom cieczy na jednej łącie znajdzie się bardzo wysoko, uniemożliwiając odczyt. W celu rozwiązania tego problemu należy przestrzegać określonej procedury pomiaru wyjaśnionej w części artykułu numer 6.

5. Wspomaganie konstrukcji minikomputerem Raspberry PI

Minikomputery Raspberry PI to bardzo funkcjonalne urządzenia. Platforma ta powstała w celach edukacyjnych, jednak znalazła szerokie zastosowanie wśród majsterkowiczów i programistów. Dużą zaletą tej platformy jest liczna społeczność, dzięki czemu w razie napotkania problemów bez trudu można znaleźć odpowiedź na licznych forach użytkowników. Problem, jaki minikomputer miał rozwiązać, stanowiła rozszerzalność cieplna. Jeśli znane są wymiary poszczególnych elementów konstrukcji oraz temperaturę cieczy, możliwe jest obliczenie wpływu tego zjawiska na pomiar. Jednak w pierwszej wersji usprawnionej konstrukcji zdecydowano, że wystarczający będzie komunikat o przekroczonej wartości różnicy temperatur w obu naczyniach. W tym celu zamontowano czujniki temperatury w słupach cieczy obu łąt. Niestety projekt jest wciąż w fazie rozwoju i nie zaimplementowano bezprzewodowego odczytu danych. W przyszłości zostanie również dodana opcja wpisywania wyników pomiarów i nadawanie poprawek ze względu na różnicę temperatur w czasie rzeczywistym.

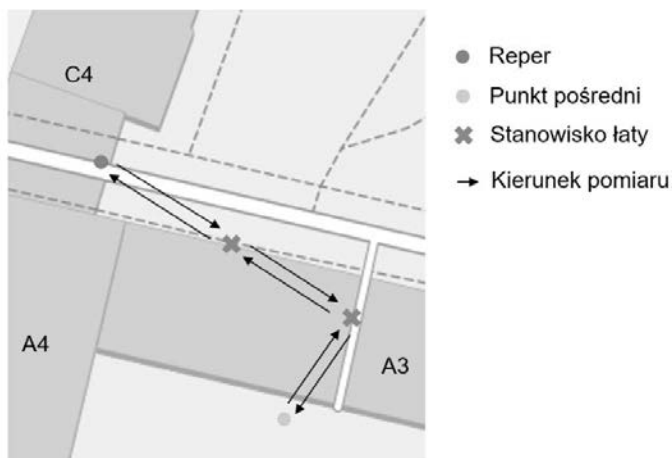
6. Testy urządzenia

Stworzone urządzenie miało jeszcze jedną istotną zaletę dotyczącą pomiarów. Do wyznaczenia przewyższenia wystarczył odczyt z jednej łąty. Możliwe to było dzięki zachowaniu identycznej budowy obu łąt. Dzięki zamkniętemu obiegowi ilość cieczy nie ulega zmianie. Dlatego w przypadku zwiększania się poziomu w jednej łącie, w drugiej następuje obniżenie o tę samą wartość. Mając na uwadze tę zależność, zastosowano następującą procedurę pomiarową:

- dwie łąty postawiono na jednym poziomym obiekcie,
- napełniono je wodą do poziomu wskazującego jeden metr,
- przy pomiarze od wartości jednego metra odejmowano odczytaną wartość z łąty „wstecz”,
- otrzymana różnica pomnożona przez dwa była przewyższeniem,
- wykonywano również odczyt z łąty „wprzód” dla kontroli.

Odczyt z drugiej łąty stanowi kontrolę pomiaru. Dzięki niej można wykryć nierównomierne nagrzanie się cieczy lub zatkanie przewodu spowodowane np. jego zagięciem. Po ustaleniu procedury możliwe było przystąpienie do pierwszego testu. Celem było pomierzenie ciągu zamkniętego prowadzonego z reperu na budynku C4 Akademii Górniczo-Hutniczej. Punktem pośrednim była kratka kanalizacyjna znajdująca się na dziedzińcu zespołu budynków A4 oraz A3. Szkic pomiaru stanowi rysunek (rys. 3).

Z punktu widzenia analizy dokładnościowej istotne było wyznaczenie przewyższenia całego ciągu. Z racji jego zamkniętej formy powinno ono być zerowe. Przeprowa-



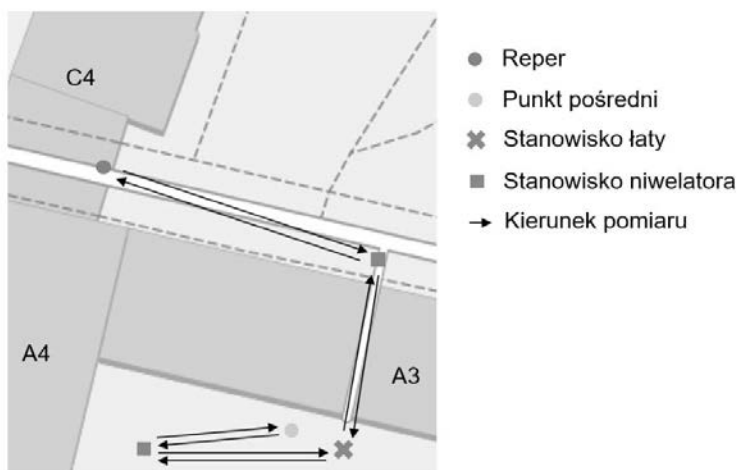
Rysunek 3. Szkic pomiaru stworzonym niwelatorem hydrostatycznym

dzenie testu w takiej formie uwalnia analizę od błędów nawiązania. Wyniki pomiarów przedstawiono w tabeli (tab. 1). „Przewyższenie 1” zostało obliczone na podstawie odczytów jedynie z łąty wstecz. „Przewyższenie 2” jest wynikiem różnicy odczytów „wstecz” i „wprzód”, tak jak ma to miejsce w tradycyjnej niwelacji.

Tabela 1. Dane z pomiarów stworzonym niwelatorem hydrostatycznym

Lp.	Odczyt z łąty wstecz [m]	Przewyższenie 1 [m]	Odczyt z łąty w przód [m]	Przewyższenie 2 [m]
1	0,783	-0,434	1,217	-0,434
2	1,137	0,274	0,863	0,274
3	0,815	-0,370	1,185	-0,370
4	1,185	0,370	0,815	0,370
5	0,871	-0,258	1,129	-0,258
6	1,209	0,418	0,791	0,418
	Suma:	0,000	Suma:	0,000

Przewyższenie wyniosło 0,000 metra. Czas pomiaru wyniósł 4 minuty. Pomiar temperatury minikomputerem Raspberry PI nie wykazał zmian zakłócających wyniki. Po pomiarze sprawdzono poziom cieczy na równej powierzchni. Zgodnie z oczekiwaniami, tak jak przed pomiarem, wynosił on jeden metr w obu łątach. Następnie ten sam ciąg pomierzono niwelatorem Leica Sprinter. Odczytów dokonywano kodowo w celu redukcji błędów. Z powodu przeszkód terenowych należało w inny sposób rozstawić stanowiska (rys. 4).



Rysunek 4. Szkic pomiaru niwelatorem cyfrowym

Wyniki pomiarów przedstawiono w tabeli (tab. 2). Przewyższenie wyniosło 0,001 metra. Czas pomiaru wyniósł 7 minut. W momencie pisania artykułu projekt wciąż był w fazie rozwoju, dlatego był to jedyny test. Dzięki jego obiecującym wynikom przystąpiono do jego dalszej rozbudowy i zaplanowano szerszy zakres testów.

Tabela 2. Dane z pomiarów niwelatorem cyfrowym

Lp.	Odczyt z łąty wstecz [m]	Odczyt z łąty w przód [m]	Przewyższenie [m]
1	1,289	1,774	-0,485
2	1,592	1,637	-0,045
3	1,637	1,592	0,045
4	1,761	1,275	0,486
		Suma:	0,001

Standardy wykonywania pomiarów niwelacyjnych w Polsce określają wymogi dokładnościowe wyznaczania wysokości dla osnów. Jedną z nich dotyczy sum przewyższeń ciągu w obie strony. Ich różnica może wynosić maksymalnie $\sigma = 0,04 \cdot \sqrt{L}$, gdzie L to długość ciągu w kilometrach, a wynik wyrażony jest w metrach (MSWiA, 2011). Wymóg ten dla niwelatora hydrostatycznego wyniósł 9 milimetrów, a dla niwelatora cyfrowego 13 milimetrów. Rozbieżności są wynikiem innego rozkładu stanowisk. Obie metody z dużym zapasem zmieściły się w wymogach.

7. Dyskusja oraz podsumowanie

Przedstawiony instrument to ciekawa alternatywa dla tradycyjnych niwelatorów. Sama idea działania urządzenia jest znana od bardzo dawna, jednak dotychczas wykorzystywano ją w budownictwie pod nazwą poziomicy węzowej. Modyfikacja budowy pozwala na wykorzystanie jej do celów geodezyjnych. Instrument pozbawiony jest wymogu spełnienia warunków geometrycznych. Ma również mniej elementów, które mogą ulec awarii, dzięki czemu jest bardziej niezawodny. Wstępny test wykazał, że jego dokładność jest na podobnym lub nawet wyższym poziomie niż oferuje niwelacja techniczna. W celu jednoznacznego określenia parametrów dokładnościowych należy wykonać jeszcze wiele pomiarów przeprowadzonych według obowiązujących w Polsce norm. Przeprowadzony test był bardzo krótki, więc trudno oszacować wpływ zmiany temperatury cieczy na pomiar. Urządzenie posiada też kilka wad. Najbardziej uciążliwe są te natury logistycznej. Wymóg połączenia łąt przewodem skutkuje nieporęcznością systemu. Przy poruszaniu się trzeba uważać, by kabel nie splątał się lub nie zaczepił o elementy naziemne. Napełnienie urządzenia cieczą wymaga nieco cierpliwości i wprawy. Po pomiarze nie trzeba jej wylewać. Wystarczy zaślepić końcówki tak, by całość była szczelna. Pamiętać przy tym trzeba, żeby przy ponownym pomiarze zapewnić dostęp powietrza do obu końców przewodu. Nie można wtedy urządzenia przechylać nadmiernie, gdyż spowoduje to wyciek cieczy. Zmiana jej ilości uniemożliwi wyznaczenie przewyższenia za pomocą odczytu z jednej łąty. Wtedy odczyt z drugiej straci swój charakter kontrolny. Koszt skonstruowania urządzenia bez wspomaganie minikomputerem wyniósł około 350 złotych. Jest to bardzo niewielka kwota na standardy cenowe geodezyjnych urządzeń pomiarowych. Z tego powodu może ono stanowić tani dodatek do standardowych narzędzi wyznaczania wysokości z racji swojego dobrego przystosowania do pomiarów w warunkach ciasnego otoczenia z wieloma przeszkodami. Opcja ze wspomaganie jest dwukrotnie droższa. Zapewnia ona jedynie pomiar temperatury, jednak udział minikomputera Raspberry PI będzie systematycznie zwiększany. W planach jest wprowadzenie możliwości zapisu danych pomiarowych i automatycznego obliczania wyników. Trwają też prace nad zdalnym połączeniem czujników temperatury. Rozwijany jest też pomysł, by wykorzystać czujnik poziomu cieczy do dokładniejszego odczytu wartości, gdy poziom cieczy jest w ekstremalnych pozycjach. Projekt będzie kontynuowany i część z problemów z pewnością zostanie rozwiązana.

Bibliografia

- Beluch, J., Mróz, J., Frukacz, M., Pokrzywa, A., & Szczutko, T. (2007). *Badania laboratoryjne niwelatorów i precyzyjnych łat niwelacyjnych*.
- Fontana, F., & DiCapua, R. (2005). Role of hydrostatic paradoxes towards the formation of the scientific thought of students at academic level. *European Journal of Physics*, 6, 1017–1030.
- Moore, J., Stanitski, C., & Jurs, P. (2005). *Chemistry: The Molecular Science*. Brooks/Cole.
- MSWiA. (2011). *Rozporządzenie w sprawie standardów technicznych wykonywania geodezyjnych pomiarów sytuacyjnych i wysokościowych oraz opracowania i przekazywania wyników tych pomiarów do państwowego zasobu geodezyjnego i kartograficznego*. 263, 15395–15461. www.sklepylaserowe.pl. (2021). <https://www.sklepylaserowe.pl/inne/67/strona/2/sortuj/cenaasc>
- Zhang, X., Zhang, Y., Zhang, L., Qiu, G., & Wei, D. (2018). Power transmission tower monitoring with hydrostatic leveling system: Measurement refinement and performance evaluation. *Journal of Sensors*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4176314>

Abstract

CONSTRUCTION OF THE HYDROSTATIC LEVELLER ASSISTED BY MINICOMPUTER RASPBERRY PI

Levelling is the basic and at the same time extremely important element of geodetic measurements. Accurate determination of the heights is very important for many sectors of the economy. Traditionally, optical, or digital levelers are used. With their help, it is possible to determine the height difference between points. As a result of theoretical considerations, an idea emerged to simplify the structure and reduce the number of elements that generate errors. The hydrostatic leveler, designed as part of the AGH Rector's Grant project, uses the principle of communicating vessels. The goal was to obtain equipment that is faster and more accurate than standard leveler used in technical levelling. The constructed device was subjected to a preliminary test which showed that it is possible to achieve an accuracy better than with the use of traditional levels. The project is under development, so more tests are needed to determine the true accuracy of the device. Support of the Raspberry PI minicomputer is limited only to measuring the temperature of the liquid, but it is planned to extend its functions for data recording and introduce corrections of the thermal expansion.

Słowa kluczowe: niwelacja, niwelator hydrostatyczny, pomiar przewyższeń

Keywords: leveling, hydrostatic leveler, measurement of height differences

Magdalena Piłat

Politechnika Lubelska

Wydział Podstaw Techniki

Studenckie Koło Naukowe „KWATERNION”

Opiekun: dr hab. Anna Kuczmaszewska, prof. Uczelni

PRZEWIDYWANIE CEN NIERUCHOMOŚCI ZA POMOCĄ ZAAWANSOWANYCH TECHNIK REGRESJI

Wstęp

Algorytmy uczenia maszynowego są obecnie używane w wielu dziedzinach ludzkiego życia, większość ludzi kojarzy je z systemami rozpoznawania twarzy na serwisach społecznościowych czy bezzałogowymi pojazdami. Technologie te mogą być również używane w celach eksploracji danych, tj. wykrywania ukrytych w nich związków.

Uczenie maszynowe na przestrzeni ostatnich lat rozwinęło się, a algorytmy stały się bardziej efektywne, czego skutkiem stało się porównywanie wyników modeli opartych na różnych algorytmach. W tym celu naukowcy i pasjonaci biorą udział w konkursach organizowanych między innymi przez spółkę Kaggle, w których muszą rozwiązać problemy dotyczące sztucznej inteligencji oraz eksploracji danych. Jednym z konkursów dostępnych na tej stronie jest „House Prices – Advanced Regression Techniques” (Kaggle). Zadaniem uczestników jest prognozowanie cen nieruchomości opisanych w zbiorze testowym przy pomocy modeli zbudowanych na zbiorze uczącym. To zadanie wydaje się być szczególnie ciekawe ze względu na obecnie panującą sytuację na rynku nieruchomości. Przez epidemię SARS-Cov-2 ceny nieruchomości wzrosły gwałtownie, dlatego interesującą z punktu widzenia konsumentów jest wiedza o tym, jakie cechy nieruchomości wpływają na wzrost jej ceny.

1. Cel pracy

Głównym celem pracy jest przewidywanie cen domów z miasta Ames, w stanie Iowa w Stanach Zjednoczonych. Ceny te zostały oszacowane za pomocą predyktorów zawartych w zbiorze danych. W tym celu stworzony został model techniką XGBoost na podstawie zbioru uczącego, a następnie wygenerowano predykcję cen nieruchomości zawartych w zbiorze testowym, które nie brały udziału w uczeniu modelu. Zbudowany model umożliwił również analizę wagi poszczególnych zmiennych w tworzeniu modelu.

2. Materiał i metody

Dane do budowy modelu zostały zaczerpnięte z konkursu „House Prices – Advanced Regression Techniques” dostępnego na stronie internetowej Kaggle (Kaggle). Uczestnicy konkursu używali zamieszczonego na stronie zbioru testowego i uczącego do budowy modeli pozwalających przewidzieć ceny nieruchomości znajdujących się w mieście Ames.

Obróbka danych, model oraz wszystkie wykresy zostały wykonane w pakiecie do obliczeń statystycznych R. (R Core Team 2020). Zbiór danych konkursowych, na podstawie którego został zbudowany model, jest podzielony na dwie części. Zbiór uczący składa się z obserwacji, testowy – z obserwacji. W zbiorze uczącym oraz testowym znajduje się zmiennych opisujących stan oraz otoczenie sprzedawanych nieruchomości. Przykładowymi z nich są: rodzaj sprzedawanego domu (*MSSubClass*), wielkość działki wyrażona w stopach kwadratowych (*LotArea*), rodzaj drogi prowadzącej do działki (*Street*). Dodatkowo w zbiorze uczącym znajduje się również zmienna zależna *SalePrice*, która odpowiada za cenę sprzedaży danej nieruchomości oraz pozwala na zbudowanie modelu predykcyjnego.

Pierwszym etapem niezbędnym do budowy modelu było przygotowanie oraz obróbka danych. Ze względu na mnogość braków danych w kolumnach *PoolQC* (stan basenu), *MiscFeature* (dodatkowe udogodnienia), *Alley* (rodzaj ścieżki prowadzącej do nieruchomości) oraz *Fence* (stan płotu), która w przypadku obu zbiorów przekraczała braków, zdecydowano o usunięciu tych zmiennych. Imputacja danych w przypadku tak wielu braków nie przyniosłaby poprawy jakości dopasowania modelu. Usunięto również zmienną *Id* oznaczającą numer porządkowy sprzedawanego domu.

Pozostałe braki danych w zbiorze uczącym występowały w przypadku różnych zmiennych, przy czym z nich były typu ilościowego, a jakościowego. Liczba braków została przedstawiona w tabeli 1.

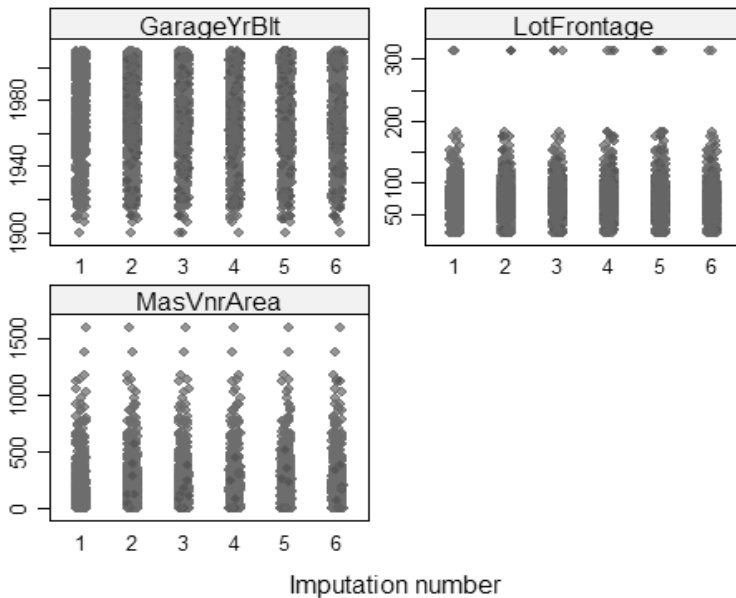
Braki te uzupełniono metodą PMM (*Predictive Mean Matching*), którą można stosować do dowolnego typu danych. Ta metoda imputacji danych polega na sześcio-

Tabela 1 Zmienne, w których występują braki w zbiorze uczącym

Zmienna	Liczba braków	Zmienna	Liczba braków
<i>LotFrontage</i>	259	<i>MasVnrType</i>	8
<i>MasVnrArea</i>	8	<i>BsmtQual</i>	37
<i>BsmtCond</i>	37	<i>BsmtExposure</i>	38
<i>BsmtFinType1</i>	37	<i>BsmtFinType2</i>	38
<i>Electrical</i>	1	<i>FireplaceQu</i>	690
<i>GarageType</i>	81	<i>GarageYrBlt</i>	81
<i>GarageFinish</i>	81	<i>GarageQual</i>	81
<i>GarageCond</i>	81		

Źródło: opracowanie własne.

krokovym postępowaniu. Dla ustalonej zmiennej Y dowolnego typu, która ma braki, buduje się model regresji liniowej, gdzie predyktorami są pozostałe zmienne oznaczane jako X . Do estymacji tego modelu używamy jedynie obserwacji bez braków danych. Parametry wynikające z tej regresji oznaczmy wektorem β . Następnie z Bayesowskiego rozkładu prognostycznego a posteriori losowo wybieramy wektor parametrów $\hat{\beta}$. Przy pomocy obu wektorów generujemy predykcję zmiennej Y . Używając β , wyliczamy Y dla wartości obserwowanych, zaś używając $\hat{\beta}$ – dla obserwacji wybrakowanych.



Rysunek 1 Graficzne przedstawienie imputacji danych dla zmiennych typu ilościowego w zbiorze uczącym

Źródło: opracowanie własne.

Dla każdej wybrakowanej obserwacji sprawdzamy, jaka jest jej wyliczona przez model wartość oraz znajdujemy 5 najbliższych jej, w sensie założonej odległości, wartości. Następnie losowo obieramy jedną z nich jako jej uzupełnienie. W przypadku stosowania wielokrotnej imputacji powyższe kroki są wykonywane wiele razy aż do uzyskania pełnego zbioru danych (Statistical Horizons). Dla zmiennych typu ilościowego sposoby imputacji danych zostały przedstawione na rysunku 1.

W podobny sposób zostały uzupełnione dane w zbiorze testowym. W tym zbiorze danych braki występowały w kolumnach.

Kolejnym krokiem w oczyszczaniu danych było sprawdzenie, czy w zbiorze występują zmienne o wariancji bliskiej zeru (NZV – *Near Zero Variance*). Oznaczają one zmienne, które mają stałą wartość lub takie, w których do obserwacji ma inną wartość niż dominująca. Zmienne o wariancji zerowej usuwa się ze zbioru danych, jednak takie, które mają wariancję bliską zeru są często, ale nie zawsze, pomijane. W zbiorze uczącym wykryto aż takich zmiennych. Podjęto więc próbę stworzenia modelu na danych bez oraz z włączonymi predyktorami o wariancji bliskiej zeru.

Wśród zmiennych objaśniających mogą również występować predyktory będące kombinacjami liniowymi innych zmiennych, czego chcieliśmy uniknąć. Wykryto dwie takie zmienne w zbiorze uczącym, są nimi: ocena jakości wykończenia domu (*OverallQual*) oraz umiejscowienie domu względem różnych kryteriów (*Condition1*). Zostały one usunięte ze zbioru testowego i uczącego.

Kolejnym krokiem w oczyszczeniu danych byłoby przeskalowanie ich oraz ewentualne transformacje, jednakże XGBoost jako algorytm oparty na drzewach decyzyjnych jest odporny na wszelakie transformacje, zatem nie było to niezbędne. Zajęliśmy się więc zmodyfikowaniem danych do postaci, w której można byłoby stworzyć model przy pomocy XGBoost. W modelu tym używa się wyłącznie zmiennych numerycznych oraz jakościowych przedstawionych w postaci *Dummy variable*. Taki sposób kodowania polega na tym, że dla zmiennej nominalnej o n stanach tworzy się $n - 1$ zmiennych binarnych. Wartość występująca dla jednej z tych zmiennych oznacza, że zmienna wyjściowa przyjmowała dany stan. Jeżeli natomiast wartość każdej z nowych zmiennych jest zerowa, wówczas zmienna wyjściowa przyjmowała ostatni, n -ty stan. Takie postępowanie pozwala uniknąć nadmiarowości w liczbie nowostworzonych kolumn.

Posiadając dane, które zostały poddane takiej obróbce, mogliśmy zaimplementować bibliotekę XGBoost. Jest to metoda nadzorowanego uczenia maszynowego, która opiera się na tworzeniu wielu drzew, w naszym przypadku regresyjnych, oraz optymalizowaniu ich tak, aby znaleźć parametry, które w najlepszy sposób będą dopasowywać się do zbioru uczącego oraz zmiennej objaśnianej. Aby nauczyć model, niezbędne jest wybranie odpowiedniego rodzaju zadania oraz funkcji straty. W naszym przypadku obraliśmy regresję ze spierwiastkowanym błędem, zaś funkcją straty był pierwiastek z błędu średniokwadratowego (RMSE), który jest domyślną funkcją dla tego rodzaju zadania. Funkcja celu w takim modelu jest postaci:

$$F(\theta) = L(\theta) + \Omega(\theta),$$

gdzie w przypadku RMSE przyjmuje postać:

$$L(\theta) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}.$$

$\Omega(\theta)$ odpowiada za regularyzację modelu, pomagając kontrolować dopasowywanie jego parametrów. Dobierając parametr regularyzacji, który jest większy od zera, nadajemy karę za większe skomplikowanie drzewa.

Optymalizowanie struktury drzewa ma charakter addytywny, to znaczy, że w każdym kroku uwzględniamy wiedzę z poprzednich oraz dodajemy do tego informacje z następnego drzewa. Jako f_i oznaczamy funkcję zawierającą strukturę drzewa oraz poprawność klasyfikacji w każdym z liści. Wówczas wartość predykcji i -tej wartość w kroku t oznaczamy jako $(\hat{y}_i)^{(t)}$. Wartość tę można wyrazić za pomocą formuły:

$$\hat{y}_i^{(0)} = 0, \quad \hat{y}_i^{(1)} = f_1(x_i) = \hat{y}_i^{(0)} + f_1(x_i), \dots, \quad \hat{y}_i^{(t)} = \sum_{k=1}^t f_k(x_i) = \hat{y}_i^{(t-1)} + f_t(x_i).$$

Liczba drzew, które optymalizujemy w modelu wynika zatem z minimalizacji funkcji postaci:

$$F^{(t)} = \sum_{i=1}^n L(y_i, \hat{y}_i^{(t)}) + \sum_{i=1}^t \Omega(f_i) + C,$$

gdzie n jest liczbą obserwacji, zaś C stałą.

Funkcję Ω w tym modelu nazywamy funkcją złożoności drzewa i wyrażamy wzorem:

$$\Omega(f) = \gamma T + \frac{1}{2} \lambda \sum_{j=1}^T \omega_j^2,$$

gdzie ω – wektor poprawności klasyfikacji w liściu, T – liczba liści w drzewie, λ , γ – parametry regularyzacji (Chen i in. 2016).

Do nauczania modeli zastosowaliśmy siatkę parametrów opisaną w tabeli 2.

Tabela 2. Wykorzystane poziomy parametrów w modelach XGBoost

Parametr	Poziomy	Liczba poziomów
max_depth	2,3,4,5,6	5
eta	0.1,0.3,0.5	3
subsample	0.5,0.75	2
gamma	0,0.5,1,1.5,2	5

Źródło: opracowanie własne.

Parametr *max_depth* oznacza maksymalną głębokość drzewa regresyjnego, jego domyślna wartość to 6. *Eta* zmniejsza wagi kroków w celu uniknięcia zjawiska przeuczenia modelu – nie chcemy, by była ona zbyt niska, bo wtedy potrzeba więcej kroków iteracji do osiągnięcia optimum, ale również nie może być zbyt wysoka, ponieważ wówczas za szybko dojdziemy to optymalnego rozwiązania. *Subsample* to procent danych, które stanowią zbiór uczący, stworzenie takiej podpróby odbywa się losowo w każdym kroku iteracji. *Gamma* jest parametrem minimalnej redukcji funkcji straty, która pozwoli na podzielenie węzła na kolejne liście. Im większe gamma, tym bardziej konserwatywny będzie algorytm.

Taka siatka parametrów liczyła zatem obserwacji. Modele były budowane w oparciu o parametry z tej siatki oraz o dodatkowe, stałe dla wszystkich modeli, parametry. Liczba możliwych kroków iteracji (*nrounds*) została ustawiona na . Przyjęto również liczbę , jako liczbę iteracji, po których działanie algorytmu optymalizacyjnego zakończy się, jeżeli przez kroki nie poprawi się funkcja straty (*early_stopping_rounds*) (XGBoost Documentation).

Dobór optymalnych parametrów odbywał się za pomocą pięciokrotnego sprawdzianu krzyżowego. Oznacza to, że zbiór uczący w każdej iteracji był dzielony na podzbiory, z czego jeden z nich był używany jako zbiór treningowy, a pozostałe jako testowy i tak pięciokrotnie w danej iteracji. Oceną dokładności takiego kroku jest średnia wszystkich z pięciu wykonanych testów (walidacja krzyżowa).

Na rysunku 2 widoczny jest kod optymalizujący parametry z siatki w modelu bez zmiennych NZV. W toku obliczeń zostały ujawnione najlepsze modele dla danych ze zmiennymi o wariancji bliskiej zeru oraz po ich usunięciu.

```

```{r}
siatka <- expand.grid(max_depth=2:6,
 eta=seq(from=0.1, to=0.5, by=0.2),
 subsample=c(0.5,0.75),
 gamma=seq(from=0, to=2, by=0.5))

xgb_train_rmse <- NULL
model_matrix <- model.matrix(SalePrice~-1, data)
model_matrix_train <- model_matrix[1:1460,]
data_train <- xgb.DMatrix(model_matrix_train, label = dt.train.nzv$SalePrice)
model_matrix_test <- model_matrix[1461:2919,]
data_test <- xgb.DMatrix(model_matrix_test, label = dt.test.nzv$SalePrice)

for (j in 1:nrow(siatka)) {
 parametry[["max_depth"]] <- siatka[j,1]
 parametry[["eta"]] <- siatka[j,2]
 parametry[["subsample"]] <- siatka[j,3]
 parametry[["gamma"]] <- siatka[j,4]
 set.seed(555)
 mj_xgb <- xgb.cv(data=data_train, nrounds=1000,
 objective="reg:squarederror",
 early_stopping_rounds = 3,
 nfold = 5,
 params=parametry)
 watchlist = list(train=data_train)
 xgb_train_rmse[j] <- mj_xgb$evaluation_log$train_rmse_mean[mj_xgb$best_iteration]
 cat(j, "\n")
}
siatka[which.min(xgb_train_rmse),]
xgb_train_rmse[50]

```

**Rysunek 2. Fragment kodu ukazujący poszukiwanie najlepszego zestawu parametrów dla modelu bez zmiennych o wariancji bliskiej zeru**

Źródło: opracowanie własne.

### 3. Wyniki

Najbardziej optymalnymi parametrami z założonej siatki okazały się być wartości pokazane w tabeli 3.

**Tabela 3. Optymalne parametry dla modeli**

Model	max_depth	eta	subsample	gamma
1	6	0.1	0.75	1
2	6	0.1	0.75	0.5

Źródło: opracowanie własne.

Pierwszy model jest zbudowany w oparciu o zbiór ze zmiennymi o wariancji bliskiej zero, natomiast drugi na zbiorze bez tych zmiennych. Pierwszy model miał najmniejszą wartość RMSE w przypadku sprawdzianu krzyżowego dla parametru gamma równego. Większa kontrola rozrastania się tego modelu może być spowodowana tym, że jest w nim zmiennych, przy zmiennych w modelu drugim.

**Tabela 4. Porównanie RMSE w modelach optymalnych, przy zastosowaniu sprawdzianu krzyżowego**

Model	RMSE (krosvalidacja)
1	6641.685
2	8696.930

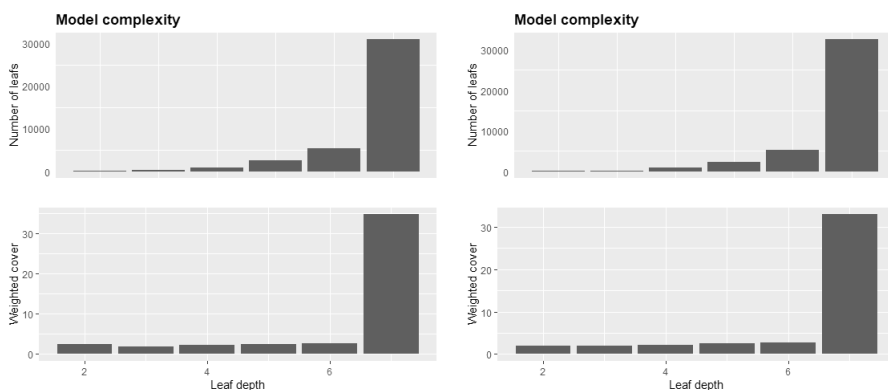
Źródło: opracowanie własne.

Zgodnie z wynikami przedstawionymi w tabeli 4, w warunkach sprawdzianu krzyżowego, to model z włączonymi zmiennymi o wariancji bliskiej zero poradził sobie lepiej, ponieważ pierwiastek z błędu średniokwadratowego jest niższy niż w modelu z usuniętymi zmiennymi.

**Tabela 5. Porównanie RMSE w modelach optymalnych zbudowanych na danych pełnych**

Model	RMSE (pełne dane)
1	16.485895
2	12.783973

Źródło: opracowanie własne.



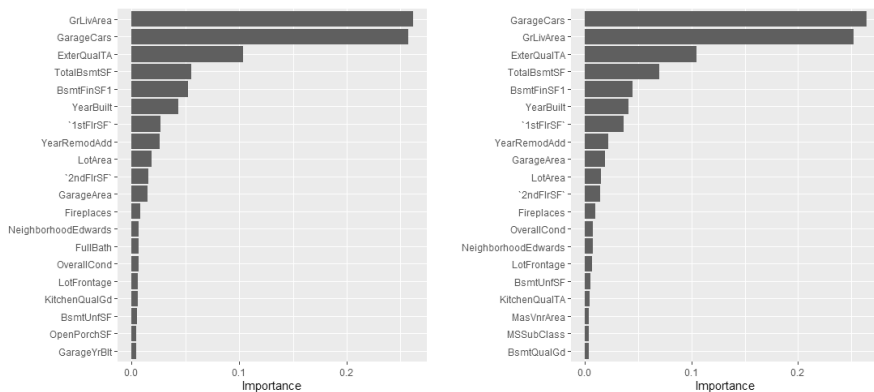
**Rysunek 3. Wykresy złożoności modeli**

Źródło: opracowanie własne.

Jednakże już w przypadku zbudowania modelu na danych pełnych, z tymi samymi optymalnymi parametrami, wyniki przedstawione w tabeli 5 ukazują, że RMSE jest niższe dla modelu z wyłączonymi zmiennymi NZV.

Na rysunku 3 po lewej stronie znajdują się wykresy dla modelu pierwszego, a po prawej dla drugiego. Górne wykresy przedstawiają złożoność wyrażaną w liczbie liści w drzewie w zależności od odległości tego liścia od korzenia drzewa. Dolne wykresy pokazują, ile średnio obserwacji w każdej iteracji trafia do liścia o zadanej głębokości. Jak widzimy z obu wykresów, złożoność drzewa znacząco rośnie przy użyciu modeli o maksymalnej głębokości równej 6.

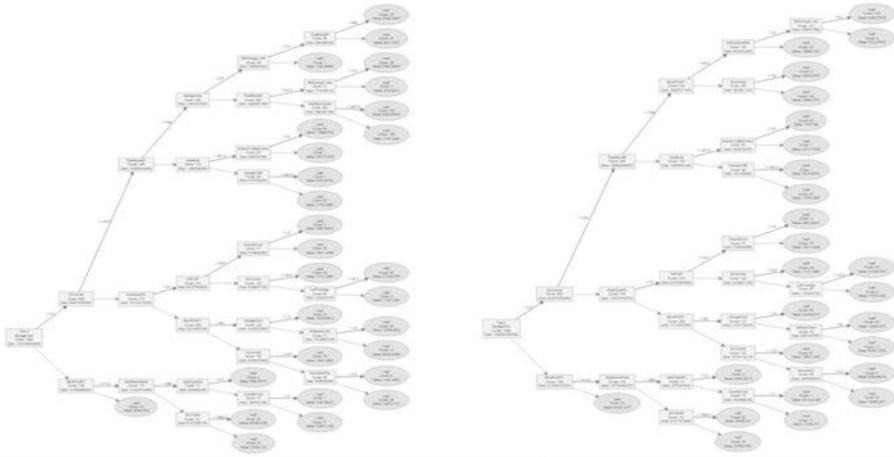
Wykresy na rysunku 4 pokazują 20 najważniejszych w tworzeniu obu modeli zmiennych. Intuicyjnie przez zmienną ważną rozumiemy predyktor, dla którego po zmianie jego wartości pogorszy się jakość dopasowania modelu. Na wykresach widać, iż



**Rysunek 4. Wykresy ważności zmiennych w tworzeniu modeli**

Źródło: opracowanie własne.





**Rysunek 5. Drugie drzewo klasyfikacyjne dla obu modeli**

Źródło: opracowanie własne.

najważniejszą zmienną w tworzeniu modelu pierwszego była liczba stóp kwadratowych powierzchni użytkowej poza podpiwniczeniem (*GrLivArea*), podczas gdy w drugim modelu była ona druga pod względem ważności. Natomiast w drugim modelu najważniejszą zmienną była wielkość garażu wyrażona w liczbie miejsc parkingowych (*GarageCars*). Do trzynastego miejsca na obu wykresach nie ma znaczących różnic w wagach zmiennych, czasem są one jedynie nieznacznie permutowane (R-bloggers). Ponieważ do tej pory wiele cech wyróżniających oba stworzone modele pokrywało się, można się zastanawiać, czy drzewa klasyfikacyjne tworzone w każdej iteracji również są identyczne. Jak widać na rysunku 5 już przy drugiej iteracji występują różnice. W pierwszym modelu liczba liści o odległości od korzenia równej 7 jest równa 9, podczas gdy w drugim modelu takich liści jest 8 (R-bloggers).

Głównym zadaniem modelu było wygenerowanie predykcji na zbiór testowy. W tabeli 6 przedstawiono 10 pierwszych wierszy tych predykcji, a więc jak według modeli kształtowały się ceny opisanych w tym zbiorze nieruchomości.

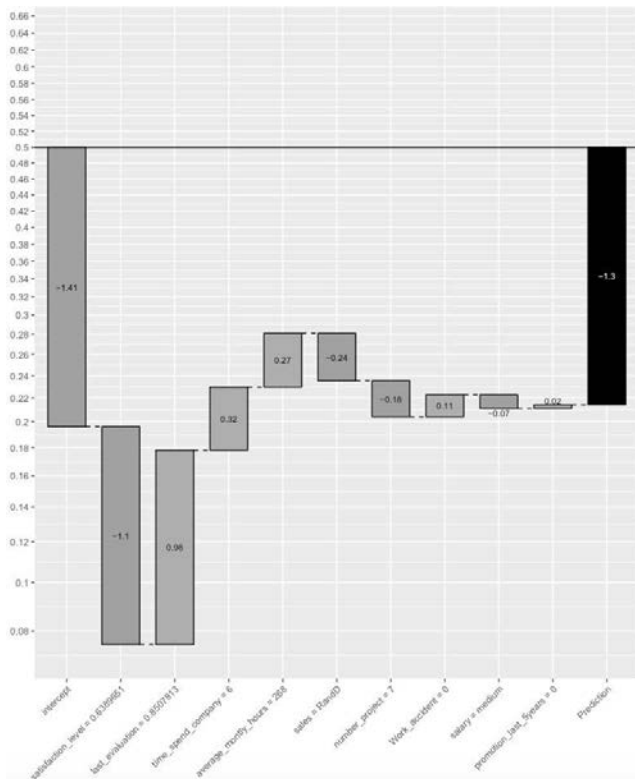
W pierwszych 10 wierszach zbioru testowego ceny przewidywane przez modele wydają się być do siebie zbliżone. Jednakże we wszystkich obserwacjach tego zbioru występują również wiersze, w których różnica w cenie jest znacząca. Największa różnica między predykcjami w zbiorze testowym wynosi 57 513,25 dolarów.

Modele oparte o algorytm XGBoost należą do klasy *black-box*. Oznacza to, że podajemy znane nam parametry wejściowe oraz dane, które są przetwarzane w konkretną odpowiedź modelu, jednakże nie znamy przy tym postaci jawnej tego modelu. Sprawa to, że ze względu na swoją złożoność nie są one w pełni możliwe do interpretacji, tak jak na przykład prosta regresja liniowa, w której znamy postać modelu wyrażoną wzorem. Istnieją jednak pakiety takie, jak *xgboostExplainer*, które starają się umożliwić

**Tabela 6. Porównanie predykcji z obu modeli dla pierwszych 10 obserwacji ze zbioru testowego**

Numer wiersza	Predykcja model 1	Predykcja model 2	Wartość bezwzględna z różnicy predykcji
1	128473.83	128813.65	339.82
2	151216.70	159195.27	7978.57
3	186704.08	198242.86	11538.78
4	200225.25	197108.64	3116.61
5	196705.11	190672.03	6033.08
6	173689.52	174211.67	522.15
7	176194.86	171504.25	4690.61
8	172871.55	173141.00	269.45
9	181467.52	190296.53	8829.01
10	132907.81	130323.91	2583.90

Źródło: opracowanie własne.



**Rysunek 6. Przykładowy wykres wygenerowany w pakiecie xgboostExplainer**

Źródło: <https://medium.com/applied-data-science/new-r-package-the-xgboost-explainer-51dd7d1aa211> (dostęp 05.04.2021 r.)

użytkownikom zrozumienie oraz interpretację wyników. Pakiet ten umożliwia analizę wpływów poszczególnych zmiennych na predykcję zmiennej objaśnianej dla każdego wiersza danych ze zbioru testowego (Applied Data Science; Github).

To rozwiązanie umożliwia również prezentowanie wpływów zmiennych w postaci wykresów, takich jak pokazany na rysunku 6. W przypadku danych o tak wielu zmiennych taki wykres byłby jednak niemożliwy do odczytania i interpretacji. W przypadku modelu regresyjnego funkcja *explainPredictions* dla każdej predykcji zbioru testowego podaje wyraz wolny (*intercept*), czyli wartość bazową ceny nieruchomości oraz wpływ każdej ze zmiennych objaśniających modelu wyrażony liczbowo. Po zsumowaniu tych wpływów i wyrazu wolnego otrzymujemy dokładną wartość predykcji dla danej obserwacji, więc pozwala nam to na określenie, które zmienne były ograniczające, a które stymulujące dla końcowej wartości ceny konkretnej nieruchomości.

Rozważymy pierwszą obserwację ze zbioru testowego oraz rozpatrzmy najbardziej stymulujące i najbardziej ograniczające zmienne dla tego wiersza danych.

**Tabela 7. Najbardziej stymulujące i ograniczające zmienne dla obserwacji pierwszej modelu pierwszego**

Zmienna stymulująca	Wartość wpływu	Zmienna ograniczająca	Wartość wpływu
GarageArea	2655.33	GrLivArea	-24821.93
BsmtFinSF1	2156.243	GarageCars	-10280.04
LotArea	2051.338	ExterQualTA	-4978.524

Źródło: opracowanie własne.

W tabeli 7 przedstawione zostały wartości wpływów najbardziej stymulujących i ograniczających zmiennych dla pierwszej obserwacji w modelu pierwszym. Wartość wyrazu wolnego dla tego modelu wyniosła 180787.4.

**Tabela 8. Najbardziej stymulujące i ograniczające zmienne dla obserwacji pierwszej modelu drugiego**

Zmienna stymulująca	Wartość wpływu	Zmienna ograniczająca	Wartość wpływu
GarageArea	8461.383	GrLivArea	-31534.59
LotArea	2427.0860	GarageCars	-11016.63
LotFrontage	2108.576	ExterQualTA	-5008.259

Źródło: opracowanie własne.

Dla modelu drugiego wyraz wolny, czyli wartość bazowa ceny wyniosła . Wartości wpływów na cenę nieruchomości dla obserwacji drugiej w tym modelu zostały opisane w tabeli 8.

## 4. Dyskusja

XGBoost, będąc obecnie najczęściej wygrywającym konkursy modelem uczenia maszynowego, jest nie tylko algorytmem o szerokim spektrum zastosowań, ale również pozwala optymalizować wydajność sprzętu i oprogramowania. Jest on przez to szybki, ale też bardzo skuteczny, ponieważ stosuje algorytm oparty na drzewach decyzyjnych.

W przypadku obranego przez nas zbioru danych nie jesteśmy niestety w stanie ocenić, który z przedstawionych modeli jest najlepszy, ponieważ w zbiorze testowym nie posiadamy zmiennej zawierającej prawdziwe wartości cen nieruchomości (*Sale-Price*). Gdybyśmy znali prawdziwe wartości zmiennej objaśnianej, byłibyśmy w stanie ocenić jakość predykcji wyliczonych przez nas modeli, ale w tym przypadku jest to niemożliwe i możemy bazować jedynie na jakości dopasowania modelu do danych ze zbioru uczącego. W tym przypadku, gdyby patrzeć na RMSE modeli zbudowanych na pełnym zbiorze, wydaje się, że lepszym modelem byłby model drugi, czyli z usuniętymi zmiennymi o wariancji zbliżonej do zera. Takie rozwiązanie wydaje się również bardziej optymalne ze względu na zmniejszenie liczby zmiennych wchodzących do modelu, a co za tym idzie również jego złożoności. Takie postępowanie z formalnego punktu widzenia nie jest jednakże w pełni uzasadnione, ponieważ w rzeczywistości chcemy, by nauczone modele jak najlepiej dopasowywały się do każdej próby, co w takim przypadku jest niemożliwe do weryfikacji.

Nie oznacza to jednak, że stworzony w ten sposób model jest bezużyteczny. Taki model mógłby bowiem posłużyć jako narzędzie dla sprzedających domy w Stanach Zjednoczonych w stanie Iowa tak, by wypełniając wartości zmiennych objaśniających, mogli przewidzieć przybliżoną cenę, za jaką mogłaby się sprzedać ich nieruchomość, a także dla agentów, którzy chcieliby wycenić nieruchomość do sprzedaży.

## 5. Podsumowanie

W pracy zostały szczegółowo omówione dwa modele regresyjne zbudowane techniką uczenia maszynowego XGboost. Parametry tych modeli były optymalizowane przy pomocy opisanej w pracy siatki parametrów, a ich działanie było testowane pięciokrotnym sprawdzianem krzyżowym. Porównano jakości dopasowania obu modeli na zbiorze uczącym oraz predykcje na zbiorze testowym. Przedstawiono wykresy złożoności modeli oraz wagi poszczególnych zmiennych w tworzeniu modeli. Na jednej z obserwacji sprawdzono również, jakie zmienne mają wpływy stymulujące, a jakie ograniczające na zmienną objaśnianą.

## Bibliografia

- Applied Data Science. NEW R package that makes XGBoost interpretable. <https://medium.com/applied-data-science/new-r-package-the-xgboost-explainer-51dd7d1aa211> (dostęp 05.04.2021 r.).
- Chen, T., Guestrin, C. 2016. XGBoost: A Scalable Tree Boosting System. In Proceedings of the 22nd ACM SIGKDD International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining (pp. 785–794). New York, NY, USA: ACM. <https://doi.org/10.1145/2939672.2939785>.
- Kaggle. House Prices – Advanced Regression Techniques. <https://www.kaggle.com/c/house-prices-advanced-regression-techniques/overview> (dostęp 05.04.2021 r.).
- R-bloggers. R XGBoost Regression 2020. <https://www.r-bloggers.com/2020/11/r-xgboost-regression/> (dostęp 05.05.2021 r.).
- R Core Team 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Statistical Horizons. <https://statisticalhorizons.com/predictive-mean-matching> (dostęp 03.06.2021 r.).
- Walidacja Krzyżowa. <https://aszokalski.github.io/AI/Cross-Validation.html> (dostęp 03.06.2021 r.).
- XGBoost Documentation. <https://xgboost.readthedocs.io/en/latest/index.html> (dostęp 03.06.2021 r.).
- GitHub. <https://github.com/AppliedDataSciencePartners/xgboostExplainer> (dostęp 03.06.2021 r.).

## Abstract

### PREDICTION OF PROPERTY PRICES USING ADVANCED REGRESSION TECHNIQUES

Prices on housing market are characterised by constant fluctuations. Because of that a question arose: can we predict the price of a house taking given values of variables this property is described by? The aim of this study is to answer that question and to identify which of the predictors from the data set have a significant influence on the price of property. This thesis is focused on finding the best model with the XGBoost regression technique and generating a prediction. The model was built on a data set about houses in Ames, Iowa in the United States. The training set consisted of 1459 observations and testing set of 1460. Research enabled to draw conclusions about levels of which variables have a stimulating effect on the price increase, and which have a limiting effect. Moreover, it was examined whether all of the variables should take part in creating the model, or some should be erased. The results can be implemented for property valuation for consumers and estate agents.

**Słowa kluczowe:** uczenie maszynowe, drzewa klasyfikacyjne, XGBoost

**Keywords:** machine learning, classification trees, XGBoost

**Bartosz Pszczółkowski**

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Nauk Technicznych

Studenckie Koło Naukowe Podstawowych Problemów Bezpieczeństwa

Opiekun: Dr inż. Wojciech Rejmer

## **WPŁYW TEMPERATURY PRZETWÓRSTWA NA WŁAŚCIWOŚCI FIZYKO-CHEMICZNE POLILAKTYDU KSZTAŁTOWANEGO W TECHNOLOGII FDM**

**Streszczenie:** Jednym z obecnych problemów ochrony środowiska jest walka z zalegającymi materiałami polimerowymi, których degradacja ani jej charakter nie sprzyjają środowisku naturalnemu. Jednakże jest grupa materiałów biodegradowalnych oraz kompostowalnych, do której zaliczamy polilaktyd, znany również jako poli(kwas mlekowy) czy też PLA (z ang. polylactic acid). Jest to syntetyczny polimer biodegradowalny, odnawialny, wytwarzany z surowców pochodzenia roślinnego. Zaletą przedstawionego materiału jest jego proces degradacji trwający od kilku miesięcy do kilku lat. Dla porównania biorozkład klasycznych polimerów petrochemicznych może wynosić nawet od pięciuset do tysiąca lat, dlatego w pracy przeanalizowano proces wytwarzania elementów z PLA w technologii druku 3d FDM (z ang. fluid deposition modeling). Celem badania było określenie wpływu temperatury przetwarzania na właściwości fizyko-chemiczne drukowanego materiału. Przebadano detale wykonane dla sześciu nastawów temperatury wytwarzania w przedziale od 180 do 230°C z krokiem temperaturowym 10°C. Po wytworzeniu próbek zbadano takie właściwości, jak: gęstość, wodochłonność, temperatury i entalpię przemian fazowych. Przeprowadzone badania wykazały nieliniowe zmiany parametrów w funkcji temperatury. Prawdopodobną przyczyną obserwowanych zmian jest powstawanie wiązań wodorowych między tlenem grupy karbonylowej, a wodorami łańcucha węglowego.

## Wstęp

Tworzywa polimerowe są jednymi z najbardziej powszechnie występujących materiałów w naszym otoczeniu. Znajdują one zastosowanie jako surowce do wytwarzania wszelkich elementów gospodarstwa domowego, jak i części maszyn przemysłowych. Jest to uwarunkowane dobrymi właściwościami mechanicznymi w stosunku do kosztów przetwórstwa. Jedną z głównych zaletą tego typu materiałów jest ich przetwarzanie, stosunkowo proste i nie wymagające dużych nakładów energetycznych, jak to ma miejsce w przypadku metali, dodatkowo przy mniejszym zużyciu wody. Jednakże mimo wielu zalet oraz możliwości zastosowania tworzyw sztucznych występuje problem ciągłego zanieczyszczenia środowiska materiałami poeksploatacyjnymi.

Produkcja tworzyw sztucznych generuje odpady o długim okresie degradacji środowiskowej. W Polsce zużywa się ok. 3 mln ton tworzyw sztucznych rocznie, co przekłada się na ok. 75 kg na osobę. Największa ilość tworzyw, ponad 31%, trafia do przemysłu opakowań do żywności i płynów pitnych, a także towarów nieżywnościowych. Mniej – 28% – wykorzystywane jest w budownictwie na przykład jako materiały izolacyjne, rury wodociągowe i kanalizacyjne, izolacje przewodów, okna; 7% zużywa przemysł samochodowy, 5% – elektryczny i elektroniczny (Borkowski 2015). Zwiększona ilość odpadów z tworzyw sztucznych powoduje ukierunkowanie badań na otrzymywanie materiałów częściowo lub całkowicie biodegradowalnych (Foltynowicz i Jakubiak 2002; Ilyas i in. 2020; Kaczmarek i Bajer 2006; Kohn i in. 2007; Šprajcar i in. 2012). W odpowiedzi na powyższe zapotrzebowanie powrócono do badań nad Poli(kwasem propan-2-olkarboksylowym), w konwencji zwyczajowej określanym mianem polilaktynu [PLA z ang. Poly(lactic acid)]. Technologia produkcji PLA została opracowana w 1932 roku i otrzymuje się go w 90% z kwasu mlekowego pochodzenia roślinnego. Surowiec do produkcji materiału jest otrzymywany w wyniku fermentacji kukurydzy, ziemniaków, trzciny cukrowej, buraków cukrowych lub biomasy o charakterze odpadowym (Nowak i Pająk 2010).

Polilaktyd to błyszczący, transparentny polimer, sztywny i łatwy do formowania urządzeniami termo-przetwórczymi. W porównaniu z polisacharydami i poliproteinami posiada dużą gęstość. Używany jest w technice termoformowania (Grabowska 2010) oraz stanowi ok. 40% wszystkich stosowanych polimerów biodegradowalnych (Furth i in. 2007). Do otrzymywania PLA wykorzystuje się mniej niż połowę paliwa kopalnego w stosunku do polimerów otrzymywanych z ropy naftowej (Grabowska 2010). PLA, będący podmiotem niniejszej pracy, należy do grona surowców biodegradowalnych oraz kompostowalnych (Baran i Erbil 2019).

Jako że termo-przetwórstwo, jak i materiał są bezpieczne dla organizmów żywych, pozwoliły znaleźć mu kolejne zastosowanie. Początek XXI w. okazał się kluczowym czasem dla rozwoju nowoczesnych technik przetwórstwa i wytwarzania. Na przełomie kilku ostatnich lat znacząco rozwinęła się gałąź wytwarzania znana jako techniki

przyrostowe (z ang. additive manufacturing). Technologia ta opiera się na wytwarzaniu elementów poprzez spajanie materiału warstwa po warstwie aż do otrzymania gotowego detalu. Jedną z technik tego typu jest metoda FDM (z ang Fused Deposition Modelling) (Sahmani i in. 2020) it is now possible to produce structures with considerable geometrical complexity. In the current investigation, 3D printing machine is utilized to produce beam-type bone implant made of porous polymers with three different periodic cellular topologies. The stress-strain curves and mechanical properties of the bone implants are extracted experimentally corresponding to each porosity shape with various pore sizes. Scanning electron microscope (SEM). Wprowadzenie tych technologii okazało się kluczowe dla rozwoju niemal wszystkich dziedzin naukowych, w których konieczne było wytwarzanie niestandardowych obiektów o małym nakładzie produkcyjnym bądź też w przypadku wytwarzania konstrukcji prototypowych niskim kosztem w krótkim czasie (Błazucki 2016). Technologie druku 3D znalazły swoich odbiorców w środowisku medycznym, w którym konieczne jest wytwarzanie unikatowych elementów personalizowanych pod wymogi pacjenta, jako że techniki przyrostowe dają możliwość szybkiego wytwarzania złożonych struktur implantów i innych elementów wszelkiego zastosowania.

Kluczowym aspektem okazał się jednak dobór odpowiednich materiałów bezpiecznych dla organizmów żywych. Polilaktyd jest bowiem materiałem biogodnym, czyli może podlegać długotrwałemu kontaktowi z żywymi tkankami oraz płynami ustrojowymi bez negatywnej reakcji organizmu, gdyż nie powoduje reakcji immunologicznej organizmu (Andrzejewska, Topoliński 2015; Bartkowiak-Jowska i in. 2011). Wykorzystanie polilaktydu w medycynie znalazło dość szerokie spektrum zastosowań, począwszy od nici chirurgicznych, stentów lub graftów naczyniowych po wykorzystanie w osteosyntezie (Andrzejewska i Topoliński 2015; Bartkowiak-Jowska i in. 2011; Bose i in. 2013; Milewski i Tajstra 2012).

Dodatkowo polilaktyd znalazł nowe przeznaczenie w farmacji – ma umożliwić opracowanie formy inteligentnego leku, który będzie wprowadzał określoną ilość substancji aktywnej w ściśle określone miejsce organizmu, niekiedy w środowisko ogniskujące procesy chorobowe, tzw. terapia celowana (Meunier i in. 2017). Pozwala to na zredukowanie całkowitej dawki podawanej substancji czynnej do organizmu, a precyzyjnie modelowana forma leku daje lepszą stabilność oraz bardziej efektywne wchłanianie. (Ruśkowski, Gadomska-Gajadhur 2017).

Jak wynika z wielu doniesień literaturowych, materiał będący przedmiotem pracy jest dosyć specyficzny i szeroko stosowany. Z tego względu za cel niniejszej pracy przyjęto wykonanie analizy wpływu temperatury druku 3D w technologii FDM z polilaktydu na właściwości materiału. W oparciu o źródła literaturowe można założyć, że temperatura wpływa na ukształtowanie struktury trzeciorzędowej polimeru, co zarazem przekłada się na jego właściwości fizyko-mechaniczne, które regulują uprzednio opisane implementacje materiału.



## Material i metody

Przedmiotem badań w niniejszej pracy są elementy wykonane z polilaktydu. Próbkę do badań wytworzono w technologii FDM z filamentu o średnicy 1,75 mm. Stałe parametry druku to: średnica dyszy 0,4 mm, temperatura platformy 50°C, skok warstwy 0,2 mm, prędkość druku 1800 mm/min. Zmiennym parametrem procesu była temperatura ekstrudera. Na podstawie przeglądu literatury i zaleceń przetwórczych, opisanych przez większość producentów materiałów, zakres temperatur przetwórstwa został przyjęty w przedziale od 180 do 230°C, przy czym krok temperaturowy wynosił 10°C. Z tak przyjętymi nastawami wytwórczymi przygotowano sześć prób na każdą temperaturę przetwórstwa.

### *Pomiar wodochłonności*

Eksperyment zaplanowano w oparciu o normę PN-72/P-04734 oraz badania S. Pfeifer (Pfeifer 2000). Pomiar wodochłonności polegał na wyznaczeniu wodochłonności względnej oraz zdolności absorpcyjnej materiału. Do analizy wytworzono próbki w kształcie dysku o średnicy 30 mm i wysokości 0,75 mm. Następnie przygotowane próbki, poddano suszeniu w 40°C przez 24 godziny, po tym czasie zbadano masę próbek. Tak przygotowane próbki zanurzono całkowicie w wodzie destylowanej na 12 h w temperaturze 40°C. Następnie wyznaczono przyrost masy próbek wstępnie osuszonych i obliczono wilgotność względną jako stosunek masy wody wchłoniętej do masy próbki aklimatyzowanej, zgodnie ze wzorem (1).

$$W_w = \frac{m_{mn} - m_{an}}{m_{an} - m_n} * 100\% \quad (1)$$

gdzie:

$m_{mn}$  – masa próbki mokrej z naczynkiem wagowym,

$m_{an}$  – masa próbki suszonej z naczynkiem wagowym,

$m_n$  – masa naczynka wagowego.

### *Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC)*

Właściwości termiczne wytworzonych elementów PLA przeprowadzono za pomocą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) na kalorymetrze DSC Phoenix 204 F1 (Netzsch Niemcy). Mierzonym parametrem jest swobodny przepływ ciepła. Niewielkie ilości (ok. 5 mg) aklimatyzowanych próbek z każdej temperatury umieszczono w aluminiowych tyglach, szczelnie zamknięto i ogrzewano w przedziale temperaturowym od 40°C do 200°C z szybkością grzania 5°C/min. Jako odniesienie zastosowano pusty

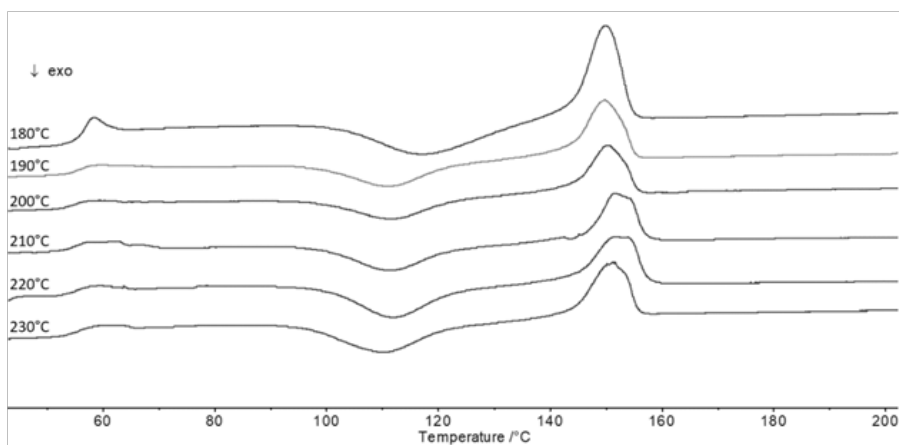
tygiel aluminiowy. Analiza oparta została na pomiarze energii potrzebnej do ustalenia zerowej różnicy temperatur pomiędzy analizowaną próbką a próbką referencyjną. Charakterystyki termiczne, takie jak temperatura zeszklenia ( $T_g$ ), temperatura zimnej krystalizacji ( $T_{cc}$ ), temperatura topnienia ( $T_m$ ), entalpia zimnej krystalizacji ( $\Delta H_{cc}$ ) i entalpia topnienia ( $\Delta H_m$ ) zostały określone z krzywych DSC.

### **Pomiar gęstości**

Gęstość próbek wyznaczono na podstawie pomiaru objętości rzeczywistej, pomiary wykonano na piknometrze gazowym HumiPyc™ Model 1 (InstruQuest Inc. Scientific Instruments R&D, USA). Jako gazu roboczego użyto helu. Pomiary wykonano w temperaturze ok.  $22 \pm 0.1^\circ\text{C}$  i przy stałym ciśnieniu 220 kPa. Próbkom użytym do badań nadano kształt sześcianów o krawędzi 20 mm. Próbki aklimatyzowano w komorze pomiarowej 10 min przed pomiarem w celu stabilizacji temperatury. Pomiar objętości każdej próbki przeprowadzono w sześciu powtórzeniach.

### **Wyniki**

Analiza kolometryczna DSC wykazała wpływ temperatury przetwarzania na zmianę właściwości termicznych materiału. Wraz ze wzrostem temperatury drukowania obserwuje się zanik załamania krzywej DSC związanej z temperaturą zeszklenia ( $T_g$ ). Dodatkowo pik temperatury zimnej krystalizacji ( $T_{cc}$ ) ulega przesunięciu ku niższym temperaturom. Temperatura topnienia ( $T_m$ ) utrzymuje się w przypadku wszystkich temperatur druku na zbliżonym poziomie ok.  $150,9 \pm 1,2^\circ\text{C}$ . Z analizy pików przemian



Rysunek 2. Krzywe DSC dla poszczególnych temperatur druku 3D

Źródło: opracowanie własne.

obserwuje się odstawanie temperatury próbek wytworzonych w 180°C. Na rysunku 2 przedstawiono występowanie poszczególnych przemian w materiale.

Znaczące różnice występują w przypadku analizy entalpii  $\Delta H_{cc}$  i  $\Delta H_m$ , gdzie obserwuje się początkowo spadek energii przemiany ok. 29%. Trend spadkowy utrzymuje się do temperatury 210°C, po czym wzrasta o 23% przy temperaturze 220°C, następnie w 230°C ponownie maleje o 14% i przyjmuje wartość zbliżoną do temperatury 190°C. Entalpia topnienia zachowuje odmienny trend, utrzymuje się na poziomie ok.  $23 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$  dla temperatury 180 i 190°C. Po przekroczeniu 190°C następuje gwałtowny spadek wartość o ok. 34%, który odnotowuje się przy 200°C. Entalpia dla kolejnych układów przyjmuje liniowy trend rosnący wraz z temperaturą ekstruzji, przy czym w ostatnich temperaturach analizy przyrost wynosi ok. 50%, jest mniejszy niż pomiędzy poprzednimi punktami pomiarowymi. Wszystkie dane pomiarowe zestawiono w tabeli 1.

**Tabela 1. Parametry przemian odczytane z krzywych DSC**

Temperatura druku [°C]	T <sub>g</sub> [°C]	T <sub>cc</sub> [°C]	$\Delta H_{cc}$ [J·g <sup>-1</sup> ]	T <sub>m</sub> [°C]	$\Delta H_m$ [J·g <sup>-1</sup> ]
180	57,5	117,5	26,11	150,9	22,73
190	59,9	111,1	20,37	149,7	23,29
200	59,6	111,3	18,9	150,3	15,41
210	61,6	111,4	18,62	151,6	16,94
220	59,6	112,2	24,12	151,7	18,83
230	60,0	109,9	20,51	151,2	19,53

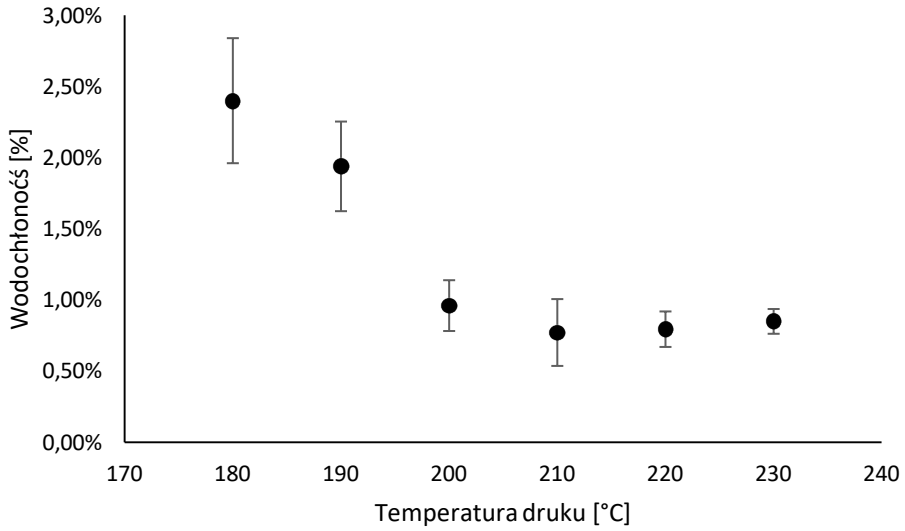
Źródło: opracowanie własne.

Analiza wodochłonności (W%) wykazała, że wraz ze wzrostem temperatury przetwarzania polilaktydu spada poziom absorpcji wody przez materiał. Najwyższą skłonność do dyfundowania plynów wykazuje materiał po przetworzeniu w 180°C, po przekroczeniu tej temperatury następuje spadek parametru W% o ok. 20% przy 190°C i kolejny spadek dla 200°C, gdzie wartość maleje od wartości pierwszej temperatury o 60%, wartość ta utrzymuje się na stałym poziomie dla pozostałych temperatur przetwarzania co przedstawia rysunek 3.

W przypadku analizy gęstości (rys. 4) obserwuje się wyraźny trend spadkowy wraz ze wzrostem temperatury.

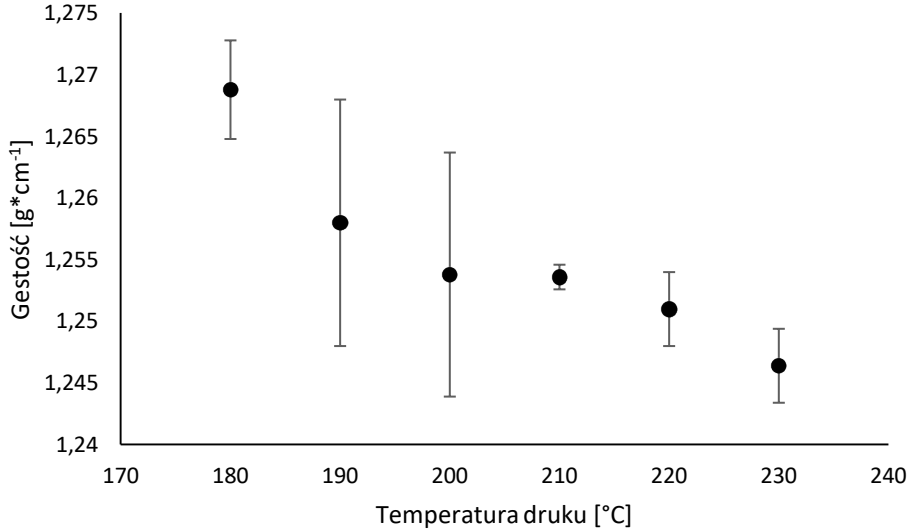
Gęstość materiału maleje o ok. 2%, pomiary dla temperatur 190 i 200°C mieszczą się niemal w zakresie odchyień standardowych. Obserwuje się znaczącą różnicę między temperaturami 180°C, a 210–230°C, gdzie z wyłączeniem temperatur 190 i 200°C można mówić o liniowym trendzie spadkowym. Należy dodatkowo zwrócić uwagę na tendencję do mniejszych odchyień standardowych w wyższych temperaturach druku.

Zestawiając wyniki analiz, można zaobserwować pośrednią zależność między  $\Delta H_m$  a wodochłonnością. W przypadku obydwu badań obserwuje się trend spad-



Rysunek 3. Wpływ temperatury przetwórstwa na zmianę wodochłonności materiału

Źródło: opracowanie własne.



Rysunek 4. Wpływ temperatury przetwórstwa na zmianę gęstości materiału

Źródło: opracowanie własne.

kowy w przedziale 190–200°C, a po przekroczeniu temperatury 200°C w przypadku każdego badania wartości oscylują w zbliżonym zakresie wartości, z wyjątkiem temperatur przemian  $T_g$  i  $T_m$ .

W większości przypadków najwyższe wartości analizowanych parametrów przypadają na temperaturę 180°C, wtedy wraz ze zwiększaniem temperatury parametry ulegają spadkowi. Można dywagować na podstawie badań, że najistotniejsze zmiany w przerwanym polilaktydzie następują w przedziale temperaturowym między 180–200°C.

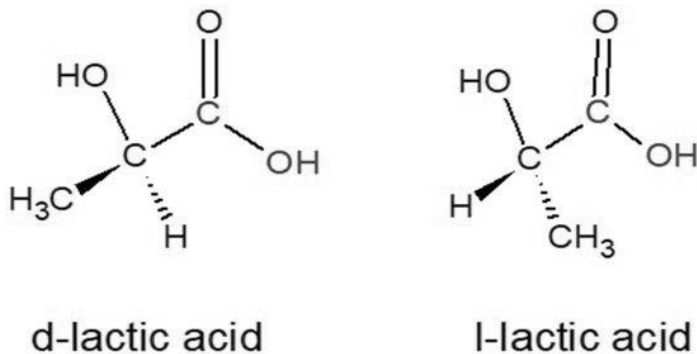
Porównując zmianę gęstości i wodochłonności można stwierdzić, że obydwa czynniki są z sobą skorelowane, jako że przyjmują w obydwu przypadkach trend spadkowy.

## Dyskusja

Z przeprowadzonych badań wynika, że temperatura procesu przetwórstwa polilaktydu wpływa na zmianę entalpii  $\Delta H_{cc}$  i  $\Delta H_m$ . Można to powiązać ze zmianami w budowie polimeru. W wyniku sterowania temperaturą wpłynięto na udział fazy amorficznej do krystalicznej polimeru, tym samym zmieniono właściwości fizyko-chemiczne. Zmiany obserwowane w poszczególnych badaniach wiążą się z doniesieniami literaturowymi opisującymi różne ukształtowanie i konfiguracje makrocząsteczek wewnątrz polimeru (Narladkar i in. 2006; Zhang, Cheng 2020). Podobne zjawisko wpływu energii cieplnej na udział poszczególnych faz opisuje w swoich badaniach R. Malinowski, który udowadnia, że ilość dostarczonego ciepła podczas wygrzewania wpływa na udział fazy krystalicznej (Malinowski i Łubkowski 2010).

Doniesienia literaturowe jednoznacznie wskazują, iż temperatura przetwórstwa wpływa na ukształtowanie ułożenia łańcuchów wewnątrz elementu. Zmiana gęstości w materiale powiązana jest z procesem powstawania załączków krystalizacji. W przypadku niższych temperatur druku masy cząsteczkowe, a zarazem długości łańcuchów są większe. Taka geometria cząstek sprzyja tworzeniu się struktur lamelarnych. Wraz z obniżeniem masy cząsteczkowej i długości makrocząsteczek możliwe jest występowanie innych struktur geometrycznych ułożenia łańcuchów. Strukturami, które w największym stopniu mogą wpłynąć na obniżenie gęstości, są struktury globularne i micelarne. W przeciwieństwie do silnie warstwowej struktury lamelarniej powodują one mniejsze upakowanie łańcuchów polimerowych. Zwłaszcza struktura micelarna sprzyja wzrostowi porowatości, która może skutkować zwiększoną absorpcją wody. Podobne zjawisko zaobserwowali w poli( $\epsilon$ -kapolaktonie) Jie-Xin Yang i inni opisujący w swoich pracach wpływ struktury trzeciorzędowej polimeru na udział poszczególnych faz w materiale (Heald i in. 2001; J. Yang i in. 2016; Yoon, Jang 2010). Polilaktyd jako polimer jest materiałem mogącym tworzyć układy z zsyntetyzowania dwóch enancjomerycznych łańcuchów polilaktydowych zwanych poli(L-laktyd) (PLLA) i poli(D-laktyd) (PDLA)

(rys. 5). Komercyjnie dostępne filamenty polilaktydu są zazwyczaj mieszaniną racemiczną obu enancjomerów (Biela, Brzeziński 2016).



**Rysunek 5. Stereoizomery kwasu mlekowego**

Źródło: Baran, Erbil 2019.

Wspominane ukształtowanie jest bezpośrednio związane z wcześniej opisanym występowaniem fazy amorficznej i krystalicznej, ale również z występowaniem dwóch stereoizomerów, jak i ich lamelnym ułożeniem, o czym w swojej pracy wspomina H. Marubayashi opisujący zjawisko w oparciu o mikroskopię sił atomowych, na której obserwuje się specyfikę zachowania polilaktydu (Marubayashi i in. 2013) the straight-shaped edge-on lamellae were observed. On the other hand, the curved edge-on crystals were able to be seen for the PLLA/PDLA stereocomplexes with nonequivalent molecular weights. It was revealed that the direction of lamellar curvature in the polylactide (PLA). Pod względem chemicznym wszystkie opisane zmiany są determinowane wpływaniem na powstawanie wiązań wodorowych między tlenem grupy karbonylowej a wodorami łańcucha węglowego, o czym wspominają w swojej pracy Sen-lin Yang i Pengju Pan (Pan i in. 2012; S. lin Yang i in. 2008) crosslinking was introduced via chemical treatment of the melt by adding small amounts of crosslinking agent triallyl isocyanurate (TAIC. Dodatkowo można zauważyć, że zwiększona anizotropia materiału reprezentowana przez wyższe wartości entalpi topnienia wpływa na większy rozrzut właściwości sorpcyjnych i stopień porowatości. W związku z tym należy domniemywać, że wyższe temperatury ekstruzji pozytywnie wpływają na właściwości transportowe materiału z polilaktydu, a w celu dalszej ich poprawy należy stosować modyfikacje chemiczne.

## Podsumowanie

Przetwarzając polilaktyd w różnych temperaturach, jesteśmy w stanie wpłynąć na jego strukturę wewnętrzną, co przekłada się na zmianę właściwości fizyko-chemicznych. Wraz ze zwiększaniem temperatury spadają właściwości wodonośne materiału oraz gęstość, co jest związane z powstawaniem wiązań wodorowych między tlenem grupy karbonylowej a wodorami łańcucha węglowego, co przekłada się pośrednio na proces powstawania zarodków krystalizacji i ułożenia merów w struktury bardziej złożone. Można wnioskować, że dzięki dostarczaniu określonej ilości energii cieplnej jesteśmy w stanie otrzymać detale o określonych właściwościach. Niniejsza praca jest innowacyjnym spojrzeniem na aplikację druku 3D we wszelkich gałęziach wytwarzania i prototypowania.

## Bibliografia

- Andrzejewska, A. i Topoliński, T. 2015. Polimery biodegradowalne do zastosowań biomedycznych. *Postępy w Inżynierii Mech.*, 6(3): 5–12.
- Baran, E. i Erbil, H. 2019. Surface Modification of 3D Printed PLA Objects by Fused Deposition Modeling: A Review. *Colloids and Interfaces*, 34(3): 1–25.
- Bartkowiak-Jowska, M., Będziński, R., Chłopek, J., Filipiak, J. i Szaraniec, B. 2011. Comparative analysis of the deformation characteristics of biodegradable polymers considered as a material for vascular stents. *Polimery*, 56(3): 224–231.
- Biel, T. i Brzeziński, M. 2016. Supramolekularne Polilaktydy - Metody Otrzymywania I Wybrane Właściwości. *Polimery*, 61(9): 591–599.
- Błazucki, P. 2016. Additive manufacturing used for prototyping in professional radio-controlled cars industry. *Mechanik*, (12): 1894–1895.
- Borkowski, K. 2015. Przemysł tworzyw sztucznych-materiałów XXI wieku. *Plastics industry-manufacturing materials for 21 st century. mechanik.media.pl*, 4: 278–282.
- Bose, S., Vahabzadeh, S. i Bandyopadhyay, A. 2013. Bone tissue engineering using 3D printing. *Mater. Today*, 16(12): 496–504.
- Foltnowicz, Z. i Jakubiak, P. 2002. Poli(kwas mlekowy) - biodegradowalny polimer otrzymywany z surowców roślinnych. *Polimery*, (T. 47, nr 11–12): 769–774.
- Furth, M.E., Atala, A. i Dyke, M.E. Van. 2007. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials*, 28: 5068–5073.
- Grabowska, B. 2010. Biodegradacja tworzyw polimerowych. *Arch. Foundry Eng.*, 10(2): 57–60.
- Heald, C.R., Stolnik, S., Matteis, C. De, Garnett, M.C. i Illum, L. 2001. Self-consistent field modeling of poly ( lactic acid )– poly ( ethylene glycol ) particles. *Colloids and Surfaces*, 179: 79–91.
- Ilyas, R.A., Sapuan, S.M., Kadier, A., Kalil, M.S., Ibrahim, R., Atikah, M.S.N., ... Ibrahim, M.I.J. 2020. *Properties and Characterization of PLA, PHA, and Other Types of Biopolymer Composites. Advanced Processing, Properties, and Applications of Starch and Other Bio-Based Polymers*. Elsevier Inc.

- Kaczmarek, H. i Bajer, K. 2006. Metody badania biodegradacji materiałów polimerowych. *Polimery*, 51(10): 716–721.
- Kohn, J., Welsh, W.J. i Knight, D. 2007. A new approach to the rationale discovery of polymeric biomaterials. *Biomaterials*, 28(29): 4171–4177.
- Malinowski, R. i Łubkowski, D. 2010. Badania wpływu temperatury i czasu suszenia na wybrane właściwości polilaktydu (PLA). *Inżynieria i Apar. Chem.*, 5(5): 77–78.
- Marubayashi, H., Nobuoka, T., Iwamoto, S., Takemura, A. i Iwata, T. 2013. Atomic force microscopy observation of polylactide stereocomplex edge-on crystals in thin films: Effects of molecular weight on lamellar curvature. *ACS Macro Lett.*, 2(5): 355–360.
- Meunier, M., Goupil, A. i Lienard, P. 2017. Predicting drug loading in PLA-PEG nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 526(1–2): 157–166.
- Milewski, K. i Tajstra, M. 2012. Stenty bioresorbowalne-aktualny stan wiedzy. *Folia Cardiol. Excerpta*, 7(4): 213–219.
- Narladkar, A., Balnois, E. i Grohens, Y. 2006. An AFM study of poly(L-lactic acid) and poly(D-lactic acid) macromolecules and their stereocomplexes at the solid-air interface. *Macromol. Symp.*, 241: 34–44.
- Nowak, B. i Pająk, J. 2010. Biodegradacja polilaktydu (PLA). *Arch. Gospod. Odpad. i Ochr.*, 12(2): 1–10.
- Pan, P., Yang, J., Shan, G., Bao, Y., Weng, Z., Cao, A., ... Inoue, Y. 2012. Temperature-variable FTIR and solid-state <sup>13</sup>C NMR investigations on crystalline structure and molecular dynamics of polymorphic poly(l-lactide) and poly(l-lactide)/poly(d-lactide) stereocomplex. *Macromolecules*, 45: 189–197.
- Pfeifer, S. 2000. Badania wybranych cech użytkowych włókienniczych materiałów wodoodpornych. *Zesz. Nauk. Akad. Ekon. w Krakowie*, 546: 89–100.
- Ruśkowski, P. i Gadomska-Gajadhur, A. 2017. Polilaktyd w zastosowaniach medycznych. *Tworzywa Sztuczne w Przemysle*, 38(2): 32–35.
- Sahmani, S., Khandan, A., Esmaeili, S., Saber-Samandari, S., Ghadiri Nejad, M. i Aghdam, M.M. 2020. Calcium phosphate-PLA scaffolds fabricated by fused deposition modeling technique for bone tissue applications: Fabrication, characterization and simulation. *Ceram. Int.*, 46: 2447–2456.
- Šprajcar, M., Horvat, P. i Kržan, A. 2012. Biopolimery i biotworzywa – tworzywa zgodne z naturą. *PLASTiCE*, ss. 1–32.
- Yang, J., Fan, B., Li, J., Xu, J., Du, B. i Fan, Z. 2016. Hydrogen-Bonding-Mediated Fragmentation and Reversible Self-assembly of Crystalline Micelles of Block Copolymer. *Macromolecules*, 49 (1): 367–372.
- Yang, S. lin, Wu, Z.H., Yang, W. i Yang, M.B. 2008. Thermal and mechanical properties of chemical crosslinked polylactide (PLA). *Polym. Test.*, 27: 957–963.
- Yoon, H.-J. i Jang, W.-D. 2010. Polymeric supramolecular systems for drug delivery. *J. Mater. Chem.*, 20: 211–222.
- Zhang, W.-B. i Cheng, S.Z.D. 2020. Giant is different: Size effects and the nature of macromolecules. *Giant*, 1: 1–9.



## Abstract

**THE EFFECT OF TEMPERATURE PROCESSING ON THE PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF POLYLACTIDE SHAPED FDM TECHNOLOGY**

Poly(lactic acid) or PLA. It is a synthetic, biodegradable, renewable polymer, made from raw materials of plant origin. The advantage of the presented material is its degradation process lasting from several months to several years. For comparison, the biodegradation of classic petrochemical polymers can be as long as 500-1000 years. Therefore, the paper analyzes the process of manufacturing PLA elements in the 3D FDM printing technology (fluid deposition modeling). The aim of the study was to determine the effect of processing temperature on the physical and chemical properties of the printed material. Details made at six production temperatures in the range of 180–230°C with a temperature step of 10°C were tested. After the samples were prepared, properties such as density, water absorption, temperatures and enthalpy of phase transformations were investigated. The conducted tests showed changes of parameters as a function of temperature. The probable cause of the observed changes is different of the formation of hydrogen bonds between the oxygen of the carbonyl group and the hydrogens of the carbon chain. This variety of bond rates leads to formation of different third-degree structures of polymer chains.

**Słowa kluczowe:** PLA, poli(kwas mlekowy), DSC, wodochłonność, druk 3D

**Keywords:** PLA, polylactic acid, DSC, water absorption, 3D printing

**Bernadetta Ryba**

AGH Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie

Koło Naukowe KLIWENT

# **ANALIZA WPŁYWU BRAKU SERWISU URZĄDZEŃ NA DZIAŁANIE INSTALACJI WENTYLACYJNO- -KLIMATYZACYJNYCH**

## **1. Wprowadzenie**

Postęp cywilizacyjny i rozwój społeczeństwa wpływają na wydłużenie czasu, przez jaki człowiek przebywa w pomieszczeniach. Obecnie w krajach rozwiniętych ludzie spędzają nawet 80–90% swojego życia w budynkach, dlatego też tak istotne jest zapewnienie właściwych warunków i wysokiej jakości powietrza wewnętrznego. Wymiana powietrza w pomieszczeniach jest procesem niezbędnym do zapewnienia komfortowych warunków w zakresie stężenia tlenu i dwutlenku węgla. Komfort użytkowników ściśle uwarunkowany jest parametrami fizycznymi powietrza w pomieszczeniach, w tym także jego składem chemicznym i zawartością zanieczyszczeń. Szczególnie istotne jest dostarczenie strumienia powietrza świeżego, utrzymanie parametrów ciepłno-wilgotnościowych, przy jednoczesnym zapewnieniu niskiego poziomu hałasu. Czystość doprowadzonego do pomieszczeń powietrza jest jednym z kluczowych parametrów, które przy obecnej jakości powietrza, szczególnie w dużych aglomeracjach miejskich, ma szczególne znaczenie. Użytkownicy nie chcą odczuwać nieprzyjemnych zapachów i oddychać zanieczyszczonym powietrzem, które negatywnie oddziałuje na ich zdrowie. W nowych obiektach instalacje wentylacji pełnią kluczową rolę ze względu na wysoką szczelność pomieszczeń, co uniemożliwia niekontrolowaną wymianę powietrza. Procesy uzdatniania powietrza są jednak także bardzo kosztowne, a usuwanie ogrzanego powietrza w okresie zimowym jest ekonomicznie nieopłacalne. Niewłaściwie działająca wentylacja w budynkach może negatywnie wpływać na samopoczucie i zdrowie użytkowników, powodując częste bóle głowy, zmęczenie, podrażnienie błon śluzowych, alergie, a nawet choroby układu oddechowego. W związku ze zwiększoną szczelnością

nowo powstałych budynków instalacje wentylacyjno- klimatyzacyjne przewidywane są już na etapie koncepcji projektu budowlanego. Wśród najczęstszych sygnałów niepoprawnie działającego systemu wentylacji można wymienić: pojawienie się grzybów, nieprzyjemny zapach i zwiększony poziom wilgotności powietrza (Żurawski. 2017). Poprawnie działający system wentylacji i klimatyzacji powinien zapewniać skuteczną wymianę powietrza i utrzymanie warunków komfortu użytkowników. Połączenie czynników ekonomicznych i ekologicznych dla producentów i projektantów jest trudnym wyzwaniem, lecz przyczynia się do powstawania nowych rozwiązań umożliwiających zapewnienie warunków komfortu przy niskich nakładach eksploatacyjnych i inwestycyjnych. W przypadku systemów wentylacji grawitacyjnej, obok problemów projektowych i wykonawczych związanych z niewystarczającym ciągiem wentylacyjnym, duże znaczenie ma także zachowanie użytkowników i ich świadomość zasad działania takiego rozwiązania. Niejednokrotnie mieszkańcy nieświadomie ograniczają przepływ powietrza, zamykając nawiewniki okienne lub też zasłaniając ich powierzchnie czynne np. roletami okiennymi (Firląg, Miszczuk 2017).

Wymiana powietrza jest niezbędna w każdym budynku i w zależności od obiektu może być realizowana za pomocą wentylacji naturalnej, mechanicznej lub hybrydowej. Zgodnie ze zmianami do Rozporządzenia Ministra Infrastruktury i Budownictwa z 14 listopada 2017 roku zmieniającymi rozporządzenie w sprawie warunków technicznych, jakim powinny odpowiadać budynki i ich usytuowanie (Dz.U. 2017 r., poz. 2285), w budynkach wysokich i wysokościowych oraz w innych budynkach, w których zapewnienie odpowiedniej wymiany powietrza nie jest możliwe za pomocą wentylacji grawitacyjnej, należy stosować wentylację mechaniczną wywiewną lub nawiewno-wywiewną. Wobec kluczowej roli wymiany powietrza w pomieszczeniach powstało wiele norm i przewodników, które regulują zakres stosowania i sposób działania systemów wentylacji i klimatyzacji oraz zasady ich projektowania i wykonania. Najważniejsze postanowienia określające wymagania w polskim prawie zawarte są w normach PN-73/B-03431 *Wentylacja mechaniczna w budownictwie. Wymagania* oraz PN-83/B-03430 *Wentylacja w budynkach mieszkalnych, zamieszkania zbiorowego i użyteczności publicznej*.

## 2. Cel artykułu

Celem artykułu jest analiza przeglądowa najczęściej występujących błędów pojawiających się podczas użytkowania tych systemów. W związku z zaostrzającymi się przepisami i wymaganiami użytkowników wobec jakości powietrza wewnątrz pomieszczeń zagadnienie to jest szczególnie istotne, zarówno ze względu na komfort, jak również aspekty zdrowotne oraz ekonomiczne. Intensywna urbanizacja i zagęszczenie zabudowy skutkują zwiększeniem popularności systemów wentylacji oraz klimatyzacji.

cji w tym także instalacji bardzo złożonych i rozległych. Złożoność proponowanych rozwiązań przekładać może się na zwiększone prawdopodobieństwo występowania błędów podczas ich montażu. Często spotykanym problemem jest także krótki okres wykonywanej inwestycji, który w obliczu wydarzeń losowych, może spowodować pośpiech w trakcie montażu i możliwość popełniania błędów podczas instalacji. Błędy użytkowe natomiast mogą być spowodowane nieświadomością osób użytkujących instalacje oraz poszukiwaniem oszczędności, np. w zakresie serwisu urządzeń. W artykule scharakteryzowano najczęściej pojawiające się błędy, a także konsekwencje, z jakimi są one związane. Szczególną uwagę zwrócono na aspekt czystości instalacji oraz efektywność instalacji zarówno w kontekście ekonomicznym, jak i uwzględniającym komfort użytkowników.

### **3. Przegląd najczęstszych błędów eksploatacyjnych oraz ich przyczyny**

Obok błędów, które pojawić mogą się na etapie projektowania instalacji, bardzo często na efektywność pracy całego systemu mają wpływ działania podjęte podczas montażu urządzeń i wdrażania projektu, a także podczas eksploatacji całego układu (Borowski i in. 2020). Istotnym czynnikiem jest, czy obiekt będzie eksploatowany przez inwestora czy przeznaczony na sprzedaż. Zarówno przewody, jak i wszystkie poszczególne elementy instalacji, aż do armatury rozpraszającej powietrze, a w szczególności ich stan, są istotnym czynnikiem determinującym skuteczność działania instalacji wentylacji, co za tym idzie, czynnikiem kształtującym utrzymanie komfortu cieplnego w pomieszczeniach. Dlatego bardzo ważne jest, aby wszystkie elementy instalacji zostały zamontowane poprawnie, zgodnie z obowiązującymi przepisami i wiedzą techniczną. Pomocą przy prawidłowym wykonaniu i badaniach instalacji są *Warunki Techniczne Wykonania i Odbioru Instalacji Wentylacji* (Pykacz, Buczyńska-Tytz 2002). Poniżej przedstawiono najczęściej pojawiające się nieprawidłowości eksploatacyjne.

#### **3.1. Nieczyszczone kanały wentylacyjne lub/i brak otworów rewizyjnych**

O skutecznej pracy systemu wentylacji decyduje odpowiednie użytkowanie oraz konserwacja przewodów i urządzeń. Kluczowe jest odpowiednie dbanie o higieniczny stan instalacji, co zapewnia okresowe czyszczenie i dezynfekcja. Część zanieczyszczeń, które pojawiają się w instalacji, osadza się na powierzchniach, a część porywana jest przez przepływające powietrze, tworząc w ten sposób wtórne zanieczyszczenie. Regularne czyszczenie przewodów instalacyjnych jest zatem kluczowe dla utrzymania

nia dobrej jakości dostarczanego powietrza. Minimalną zalecaną częstotliwość kontroli instalacji wentylacyjnych i klimatyzacyjnych, innych niż kuchenne wyciągowe, pokazuje tabela 1.

**Tabela 1. Minimalna zalecana częstotliwość kontroli instalacji wentylacyjnych i klimatyzacyjnych (w miesiącach)**

Klasa czystości	Funkcje budynku	Częstotliwość kontroli				
		jednostka uzdatniania powietrza (*)	filtry (**)	nawilżacze	przewody	urządzenia końcowe
Podstawowa	pomieszczenia o sporadycznej obecności ludzi, takie jak magazyny, pomieszczenia techniczne	24	12	12	48	48
Średnia	biura, hotele, restauracje, szkoły, teatry, obiekty handlowe, budynki mieszkalne, budynki wystawiennicze, obiekty sportowe, szpitale (obszary ogólne)	12	12	6	24	24
Zaawansowana	szczególne obszary produkcyjne w przemyśle, laboratoria, obszary zabiegowe w szpitalach, biura o wysokich wymaganiach dotyczących jakości	12	6	6	12	12

(\*) urządzenia wyposażone w nawilżacz parowy lub system adiabaticznego chłodzenia lub zlokalizowane w obszarze o umiarkowanym lub wilgotnym klimacie powinny być kontrolowane przynajmniej dwa razy w ciągu roku

(\*\*) filtry powinny być kontrolowane i konserwowane zgodnie z zaleceniami producenta, jednocześnie uwzględniając podane w tab. 1 częstotliwości

Źródło: PN-EN 15780:2011E

Nieczyszczone kanały wentylacyjne prowadzą do wzrostu oporów w instalacji, co w konsekwencji wywołuje wzrost energochłonności całej instalacji. Niedopilnowanie czystości przewodów w fazie wykonawczej może być bezpośrednią przyczyną awarii urządzeń. Gruz i pył znajdujące się na wewnętrznej powierzchni przewodów dostają się do łożysk wentylatorów, co skutkuje ich głośną pracą oraz w najgorszym przypadku całkowitym uszkodzeniem.



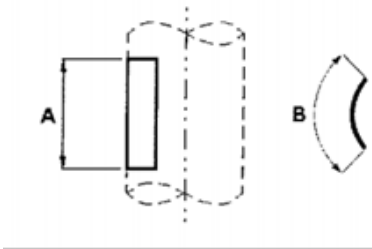
**Rysunek 1. Widok zapyłonego przewodu wentylacyjnego**

Źródło: opracowanie własne.

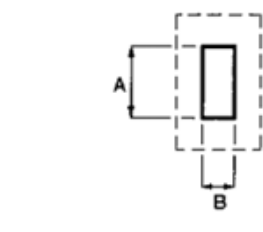
Czyszczenie instalacji powinno być zapewnione przez zastosowanie otworów rewizyjnych w przewodach instalacji lub demontaż elementu składowego instalacji. W normie PN-EN 12097:2007 znajduje się zalecenie, zgodnie z którym elementy wentylacyjne powinny być montowane z uwzględnieniem ich ewentualnego demontażu na potrzeby czyszczenia instalacji. Jeśli nie jest możliwy taki montaż, konieczne są elementy rewizyjne pozwalające na dostęp do wewnętrznych powierzchni przewodu. Analogiczny zapis znaleźć można w Rozporządzeniu Ministra Infrastruktury z 12 kwietnia 2002 roku w sprawie warunków technicznych, jakim powinny odpowiadać budynki i ich usytuowanie (Dz. U. Nr 75, poz. 609 z 2002 r., z późniejszymi zmianami), zgodnie z którym otwory rewizyjne powinny umożliwiać czyszczenie wewnętrznych powierzchni przewodów, a także urządzeń i elementów instalacji, jeśli konstrukcja urządzeń i elementów nie umożliwia ich czyszczenia w inny sposób. W tabeli nr 2 przedstawiono zalecane minimalne wymiary otworów rewizyjnych zarówno w kanałach okrągłych, jak i prostokątnych.

**Tabela 2. Minimalne wymiary otworów rewizyjnych w przewodach okrągłych i prostokątnych (Pykacz, Buczyńska-Tytz 2002)**

Przewody okrągłe		
Średnica przewodu	Minimalne wymiary otworu rewizyjnego w ścianie przewodu	
mm	Mm	
D	A	B
$200 \leq d \leq 315$	300	100
$315 \leq d \leq 500$	400	200
> 500	500	400
<sup>1)</sup>	600	500

Przewody prostokątne		
Wymiary boku przewodu <sup>2)</sup>	Minimalne wymiary otworu rewizyjnego w ścianie przewodu	
mm	Mm	
S	A	B
$\leq 200$	300	100
$200 < s \leq 500$	400	200
> 500	500	400
<sup>1)</sup>	600	500



<sup>1)</sup> Otwór rewizyjny jako właz, gdy czyszczenie związane jest z wejściem do wnętrza przewodu

<sup>2)</sup> Wymiar boku przewodu, w którym wykonano otwór rewizyjny

Źródło: Pykacz, Buczyńska-Tytz 2002.

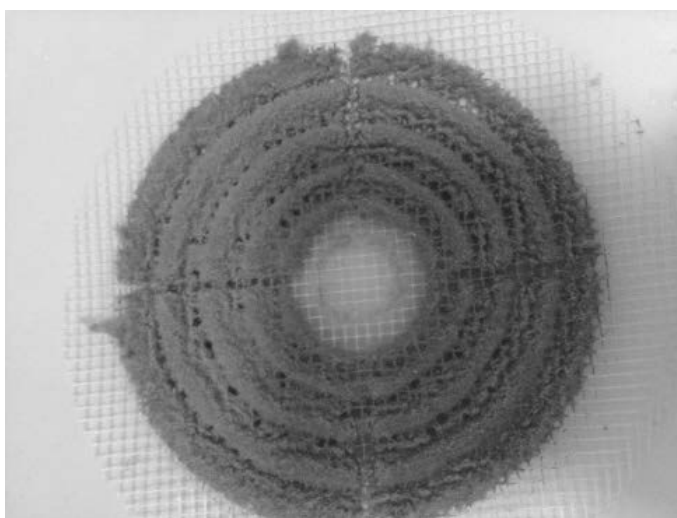
### 3.2. Zabrudzone kratki i inne końcowe elementy nawiewno-wywiewne

Podobnie jak na wewnętrznych powierzchniach przewodów wentylacyjnych, tak i na elementach nawiewnych i wywiewnych osadzają się zanieczyszczenia zawarte w powietrzu przepływającym przez sieć przewodów. Pomimo że każdy producent elementów wentylacyjnych czy urządzeń zwraca uwagę na konieczność regularnego czyszczenia wentylacji, to nie zawsze jest to respektowane przez użytkowników, co widać na poniższych fotografiach (rys. 2 a,b i rys. 3). Zabrudzone nawiewniki nie tylko stanowią nieestetyczny element w pomieszczeniu, ale także są źródłem zanieczyszczeń. W przypadku braku regularnego serwisu urządzeń, czyszczenia instalacji, urządzenia są bardziej energochłonne a zanieczyszczenia mogą powodować ich awarie. W przypadku instalacji nawiewnych zanieczyszczenia przedostają się do powietrza, które dostarcza-  
ne jest do pomieszczenia.

Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Spraw Wewnętrznych i Administracji z 16.08.1999 roku w sprawie warunków technicznych użytkowania budynków miesz-



a) część zewnętrzna



b) część wewnętrzna (siatka zabezpieczająca)

**Rysunek 2. Widok zabrudzonego anemostatu**

Źródło: opracowanie własne.

kalnych (Dz. U. 74/99) określającym warunki techniczne użytkowania budynków mieszkalnych, wraz ze związanymi z nimi instalacjami i urządzeniami technicznymi, w okresie użytkowania należy utrzymać stan techniczny instalacji, który zapewni sprawność i niezawodność działania systemu wentylacji, w tym także utrzymanie pełnego wymaganego przekroju klatek wentylacyjnych.





**Rysunek 3. Widok zabrudzonej czerpni wentylacyjnej**

Źródło: opracowanie własne.

### **3.3. Nieczyszczone lub niewymieniane filtry**

Kolejnym elementem instalacji wentylacji i klimatyzacji, którego czystość wyraźnie oddziałuje na efektywność pracy całego systemu, są filtry. Zabrudzone filtry powodują wzrost oporów przepływu powietrza, zmniejszenie ilości powietrza dostarczanego do strefy przebywania ludzi, co skutkuje obniżeniem komfortu higienicznego użytkowników pomieszczeń (Borowski i in. 2019). Na rysunku 4 przedstawiono widok brudnych filtrów powietrza. Podobnie jak w przypadku powyżej opisanych elementów, zanieczyszczenia osadzone na filtrze mogą stanowić źródło wtórnego zanieczyszczenia powietrza. W ten sposób element, którego głównym zadaniem jest oczyszczenie powietrza, może stać się przyczyną zwiększenia zawartości zanieczyszczeń w powie-



**Rysunek 4. Widok brudnego filtra wentylacyjnego**

Źródło: opracowanie własne.

trzu nawiewanym. Osad na powierzchni filtrów powodować może także nieprzyjemny zapach w pomieszczeniach.

W artykule (Borowski i in. 2019) analizie poddano parametry filtrów wstępnych, plisowanych klasy G3 oraz filtrów kieszeniowych klasy F5 pracujących w zestawie (G3+F5). Pomiarów dokonano w rzeczywistych warunkach pracy centrali klimatyzacyjnej oraz w warunkach laboratoryjnych. Dla jednorazowego pomiaru filtrów w centrali klimatyzacyjnej wykazano, że po dłuższym czasie pracy filtrów nie obserwuje się większej różnicy pomiędzy wartościami spadku ciśnienia na filtrach średnio zabrudzonych oraz mocno zabrudzonych. Oznacza to, że filtry utraciły zdolność do akumulowania zanieczyszczeń pyłowych.

### 3.4. Nieczyszczone wentylatory

Rysunek 5 przedstawia przykład użytkowanego na co dzień wentylatora wyciągowego. Na prośbę Inwestora zgłaszającego problem z „niedziałającą wentylacją” zbadano skuteczność systemu wentylacji. Dla pomieszczeń mokrych, tj. kuchni oraz łazienki, stwierdzono całkowity brak ciągu wentylacyjnego. Przyczyną był brak regularnego czyszczenia oraz serwisu wentylatorów wyciągowych ściennych. Mimo wyraźnych założeń kart gwarancyjnych użytkownicy w ramach oszczędności ignorują czyszczenie



a) część zewnętrzna



b) część wewnętrzna

**Rysunek 5. Widok brudnego wentylatora ściennego**

Źródło: opracowanie własne.

urządzeń wentylacyjnych. Mimo iż nie są to elementy nawiewne, przez które bezpośrednio powietrze wdmuchiwane jest do pomieszczenia, zanieczyszczenia, w postaci np. kurzu, dosłownie zaklejają powierzchnie przepływu powietrza, uniemożliwiając prawidłową pracę urządzenia.

### ***3.5. Brudne, zagniecione, lamele agregatu klimatyzacyjnego***

Układy klimatyzacyjne w szczególności potrzebują przeprowadzania regularnych prac serwisowych. Oczywistością jest, że w jednostce wewnętrznej, poza kurzem i brudem osadzającym się na filtrach, w tacach skropli zlokalizowanych pod parownikami urządzeń tworzą się grzyby. Zarówno lamele jednostek wewnętrznych, jak i zewnętrznych wymagają czyszczenia. Urządzenie klimatyzacyjne przez powierzchnię lamel pobiera lub oddaje ciepło do otoczenia. Zabrudzony parownik i skraplacz zmniejszają wydajności chłodniczą/grzewczą urządzenia, jednocześnie zwiększając zapotrzebowanie na energię elektryczną. Zaśniedziałe miedziane elementy agregatu sprężarkowego z czasem stają się nieszczelne. Jeśli z powodu nieszczelności do układu chłodniczego dostaje się wilgoć z zewnątrz, dochodzi do degradacji rur miedzianych w całej instalacji.



**Rysunek 6. Widok zniszczonych lamel agregatu sprężarkowego układu Multisplit**

Źródło: opracowanie własne.

Po ponownym napełnieniu instalacji czynnikiem chłodniczym bez odpowiedniego wysuszenia i odkwaszenia instalacji oraz oleju w ciągu kilku dni psuje się „serce” urządzenia, tj. sprężarka.

### **3.6. Rozregulowana instalacja wentylacji, zdemontowane, zaklejone anemostaty**

Nagminnym zjawiskiem spotykanym podczas zgłoszeń gwarancyjnych, jest zmniejszanie powierzchni efektywnej elementów nawiewnych i wyciągowych. Na rysunku numer 7 przedstawiono zmniejszenie przekroju kratki wentylacyjnych na skutek zaklejenia taśmą klejącą. W budownictwie mieszkaniowym z działającym układem wentylacji mechanicznej jednorurowej spotkać można zabudowane meblami, zadeklowane lub wymienione anemostaty i kratki wentylacyjne (bez konsultacji z projektantem). Zmniejszając lub całkowicie likwidując zaprojektowane punkty nawiewne/wyciągowe, doprowadza się całą instalację do rozregulowania.



**Rysunek 7. Widok zdemontowanego anemostatu wyciągowego w garażu oraz zaklejonych kratki transferowych**

Źródło: opracowanie własne.

## **4. Ocena wpływu popełnianych błędów eksploatacyjnych na efektywność działania instalacji**

Aby zapewnić odpowiednie parametry powietrza, w tym temperaturę, wilgotność, prędkość oraz czystość i świeżość, niezbędna jest szczegółowa analiza sytuacji przy uwzględnieniu obowiązujących zaleceń i wytycznych. Skutki braku dbałości o instalację w budynku odczuwalne będą dla użytkownika w aspekcie komfortu oraz kosztów napraw. Nieprawidłowości w zakresie ingerencji w przewody wentylacyjne również znacząco mogą oddziaływać na wydajność całego systemu, głównie w zakresie zwiększenia strat ciśnienia w instalacji.

Według analizy Państwowej Inspekcji Pracy przyczyny niesprawności urządzeń to:

- wadliwy projekt – stwierdza się w 66% badanych zakładów,
- zaniedbania w wykonawstwie – stwierdza się w 37% zakładów,
- wadliwa eksploatacja – stwierdza się w 55% zakładów.

Ponadto w 70% zakładów stwierdzono inne nieprawidłowości rzutujące na wzrost stężeń zanieczyszczeń w pomieszczeniach pracy, do których zakwalifikowano przykładowo: użytkowanie starych, wyeksploatowanych urządzeń (Borowski i in. 2020).

Bardzo uciążliwą i często występującą chorobą spowodowaną brakiem prawidłowej wentylacji i klimatyzacji jest tzw. syndrom chorego budynku – Sick Building Syndrome. Charakteryzuje się on zespołem objawów właściwych kilku różnym schorzeniom. W pomieszczeniach zamkniętych średnia optymalna temperatura to 21–22°C, a wilgotność względna powietrza powinna wynosić około 55–60%. Tymczasem w „chorych budynkach” wartości te są znacznie podwyższone: 24°C i ponad 75% wilgotności względnej powietrza. W następstwie tego pojawiają się bóle głowy, podrażnienie błon śluzowych, wysuszenie skóry i choroby gardła. Człowiek czuje się zmęczony i rozkojarzony, ma poczucie, że jest „duszo”. Należy pamiętać, że długotrwałe niedotlenienie może mieć bardzo negatywne skutki zdrowotne. Zbyt wysoka temperatura i wilgotność sprzyja także rozwojowi mikroorganizmów, szczególnie zarodników grzybów pleśniowych.

Poprawnie wykonany projekt i montaż instalacji nie są gwarantem skutecznie działającego systemu. Szczególnie ważne jest, aby uświadamiać użytkownika o zasadzie działania zastosowanego systemu, tak aby uniknąć nieświadomego popełniania błędów w trakcie eksploatacji, które mogą znacznie oddziaływać na zdrowie i komfort.

## 5. Podsumowanie

Współczesna literatura zarówno w postaci poradników, artykułów i wytycznych bardzo obszernie opisuje zalecenia i wskazówki, pozwalające na uniknięcie błędów zarówno na etapie projektu, wykonawstwa, jak także eksploatacji systemów wentylacji i klimatyzacji. Pomimo dostępności tak wielu źródeł wiedzy, nadal spotkać można się z licznymi przykładami niewłaściwie działających instalacji. Regulacje prawne i techniczne w postaci rozporządzeń, norm, aprobat technicznych, dokumentacji techniczno-ruchowych zawierają dokładne wskazówki, w jaki sposób należy projektować, wykonywać oraz użytkować instalacje.

Zanieczyszczenia transportowane systemami wentylacji wpływają na zdrowie osób przebywających w pomieszczeniach, do których się dostają, i wywołują różnego rodzaju dolegliwości, jak np. ból głowy. Wpływają również, przez zwiększenie oporów przepływu powietrza, na efektywność pracy instalacji oraz jej energochłonność. Przewody oraz wszystkie poszczególne elementy instalacji, aż do armatury rozprowadzającej po-

wietrze, a w szczególności ich stan są istotnym czynnikiem determinującym skuteczność działania instalacji wentylacji, a w efekcie czynnikiem kształtującym utrzymanie komfortu cieplnego w pomieszczeniach. Podczas oddawania budynku do użytkownika należy uświadamiać właściciela lokalu, jaka jest zasada działania zastosowanego systemu oraz w jaki sposób ma dbać o zainstalowane urządzenia, np. dotrzymując terminów wykonywania serwisu gwarancyjnego.

## Bibliografia

- Borowski M., Ryba B., Zwolińska K., 2020, „Przegląd błędów projektowych, wykonawczych i eksploatacyjnych w kontekście efektywności pracy systemu wentylacji i jakości dostarczanego powietrza”, *Ciepłownictwo, Ogrzewnictwo, Wentylacja* 51/12:18–24
- Borowski M., Życzkowski P., Łuczak R., Karch M., 2019, „Porównanie strat ciśnienia filtrów powietrza w warunkach laboratoryjnych i rzeczywistych na przykładzie modułowej centrali klimatyzacyjnej”, *Ciepłownictwo, Ogrzewnictwo, Wentylacja* 50(7):271–276
- Firląg S., Miszczuk A., 2017, „Działanie wentylacji grawitacyjnej w ocenie mieszkańców”, *Ciepłownictwo, Ogrzewnictwo, Wentylacja* 48(8):340–344
- PN-73/B-03431 „Wentylacja mechaniczna w budownictwie. Wymagania”
- PN-83/B-03430 „Wentylacja w budynkach mieszkalnych, zamieszkania zbiorowego i użyteczności publicznej. Wymagania”
- PN-EN 12097:2007 Wentylacja budynków. Sieć przewodów. Wymagania dotyczące elementów składowych sieci przewodów ułatwiających konserwację sieci przewodów
- PN-EN 15780:2011E Wentylacja budynków – Sieć przewodów – Czystość systemów wentylacji
- Pykacz S., Buczyńska-Tytz E., 2002, „Warunki techniczne wykonania i odbioru instalacji wentylacyjnych. Wymagania techniczne”, *COBRTI INSTAL, Zeszyt 5*.
- Rozporządzenie Ministra Infrastruktury i Budownictwa z dnia 14 listopada 2017 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie warunków technicznych, jakim powinny odpowiadać budynki i ich usytuowanie (Dz.U. 2017, poz. 2285)
- Rozporządzenie Ministra Infrastruktury z dnia 12 kwietnia 2002 r. w sprawie warunków technicznych jakim powinny odpowiadać budynki i ich usytuowanie.” (Dz.U. Nr 75, poz. 609 z 2002r, z późniejszymi zmianami)
- Rozporządzenie Ministra Spraw Wewnętrznych i Administracji z dn. 16.08.1999 w sprawie warunków technicznych użytkowania budynków mieszkalnych (Dz.U. 74/99)
- Żurawski J. 2017, „Wentylacja w budynku - oczekiwania a wymagania”, *Isolacje* 7/8:92–97.

## Abstract

**ANALYSIS OF THE IMPACT OF THE LACK OF EQUIPMENT SERVICE ON THE OPERATION OF VENTILATION AND AIR CONDITIONING SYSTEMS**

The main task of the ventilation system in the facilities is to ensure the thermal comfort of users. Effective air exchange is an essential element enabling the use of rooms. There are many reasons for inadequate ventilation systems, which can arise from ignorance and cost-cutting in the operation phase of equipment and buildings.

Examples of the effects of the lack of service work were presented, which the author had the opportunity to encounter while conducting expert opinions on the proper operation of ventilation and air conditioning systems. Particular attention was paid to the negative impact of such effects both in terms of user comfort and the efficiency of the entire system. The issues discussed include the impact of the cleanliness of individual elements of the installation on the energy consumption of ventilation and air conditioning systems as well as indoor air parameters.

Contaminants transported through ventilation systems affect the health of people staying in the rooms they get into and cause various types of ailments, e.g. headaches. They also affect the efficiency of the installation and its energy consumption by increasing the air flow resistance (dirty filters, reduced effective area of inlet and exhaust elements). As the article shows, properly made design and assembly of the installation do not guarantee the functioning of the system. It is especially important to make the user aware of the operating principle of the applied system in order to avoid unknowing errors during operation that can significantly affect health and comfort.

**Keywords:** mechanical ventilation, installation cleanliness, air quality, ventilation efficiency

**Słowa kluczowe:** wentylacja mechaniczna, czystość instalacji, jakość powietrza, wydajność wentylacji

**inż. Mateusz Zachariasz, Szymon Sakowicz**  
Politechnika Białostocka  
Studenckie Koło Naukowe Auto-Moto-Club  
Opiekun naukowy: dr hab. inż. Łukasz Derpeński

# **OBLICZENIA NUMERYCZNE STRUKTUR KOMPOZYTOWYCH STOSOWANYCH W KONSTRUKCJACH NOŚNYCH POJAZDÓW KLASY FORMUŁA STUDENT**

## **Wstęp**

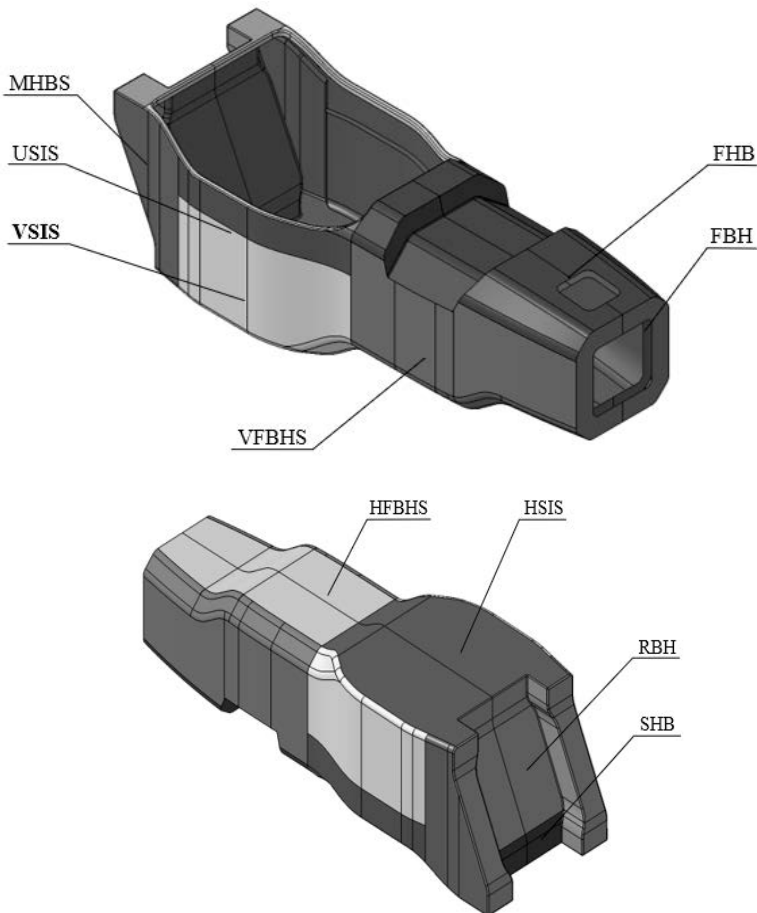
Formuła Student jest serią międzynarodowych zawodów zrzeszających studentów uczelni technicznych z całego świata. Zawody organizowane są corocznie na torach wyścigowych w piętnastu krajach, a ich uczestnikami jest ponad pięćset zespołów studenckich. Ich zadaniem jest zaprojektowanie oraz wykonanie jednomiejscowego bolidu, który rywalizuje o podium w ośmiu konkurencjach. Konkurencje Formuły Student dzielą się na dwie części: statyczne oraz dynamiczne. Konkurencje dynamiczne posiadają zróżnicowany charakter, od jazdy po prostej oceniając przyspieszenie auta, przez jazdę po torze w kształcie „8”, po trasę o długości 22 km sprawdzającą wytrzymałość zarówno auta, jak i kierowcy. Ze względu na ich zróżnicowany charakter wykorzystanie materiałów kompozytowych w budowie bolidów zespołów studenckich ma kluczowe znaczenie. Dzięki nim możliwe jest uzyskanie lekkiej konstrukcji auta zwiększając tym samym jego przyspieszenie przez mniejszą bezwładność. Ponadto wykorzystanie materiałów kompozytowych pozwala na uzyskanie nie tylko lekkiej konstrukcji, a również konstrukcji o wysokiej wytrzymałości i sztywności, co przekłada się na osiągi pojazdu i jego właściwości trakcyjne na torze. Do największych obszarów zastosowań materiałów kompozytowych należą konstrukcje nośne. Stawiane przez regulamin zawodów wymagania ustrojom nośnym i wchodzącym w ich skład strukturom kompozytowym wymuszają na zespołach studenckich odpowiednie podejście. W niniejszej pracy przedstawiona została metodologia projektowania struktur kompozytowych typu *sandwich* stosowanych w autach Formuły Student. Metodologię



tę oparto na badaniach materiałów oraz obliczeniach wytrzymałości z wykorzystaniem metody elementów skończonych.

## Wymagania regulaminu Formuły Student

Podstawowym odniesieniem przy projektowaniu aut Formuły Student jest regulamin zawodów. Określa on wymagania, które muszą zostać spełnione przy projektowaniu poszczególnych elementów bolidu. Wymagania te dotyczą również struktur kompozytowych tworzących konstrukcję nośną. Ustrój nośny, według regulaminu, podzielony



Rysunek 1. Podział sekcji konstrukcji nośnej na przykładzie bolidu CMS-07

Źródło: Opracowanie własne

jest na poszczególne sekcje. Dla każdej z nich konieczne jest wykonanie reprezentatywnego panelu testowego zgodnie z określonymi wytycznymi. Wykonane reprezentacje struktur są następnie poddawane badaniom doświadczalnym w postaci trzy-punktowego zginania. Na podstawie uzyskanych wyników oraz dokumentacji materiałowej oceniana jest zgodność z określonymi wymaganiami. Analizowaną w pracy strukturą jest „VSIS” („Vertical Side Impact Structure”), ze względu na najbardziej rygorystyczne wymagania. Poszczególne sekcje konstrukcji nośnej określane przez regulamin Formuły Student przedstawiono na rysunku 1.

Wymagania określone przez regulamin dotyczące badania doświadczalnego oraz analizowanej struktury przedstawiono poniżej.

Wymagania dotyczące badania doświadczalnego:

- Panel testowy ma zostać poddany trzy-punktowemu zginaniu.
- Odległość pomiędzy podporami ma wynosić co najmniej 400 mm.
- Aplikator obciążenia ma być metalowy i mieć promień równy 50 mm.
- Aplikator ma wystawać poza badaną część, aby zapobiec obciążeniu krawędzi panelu.
- Pomiędzy aplikatorem a badaną strukturą nie może znajdować się żaden materiał.
- Boki panelu testowego nie mogą być zalaminowane (rdzeń musi być widoczny).
- Reprezentatywny panel testowy musi być płaski i posiadać wymiary 275 mm x 500 mm oraz identyczne materiały, ukierunkowanie warstw i metodę wytwarzania, jak w przypadku odpowiedniej sekcji w docelowej konstrukcji nośnej.

Wymagania dotyczące struktury kompozytowej:

- Maksymalna zawartość wagowa równoległych do siebie włókien w stosunku do masy wszystkich włókien w laminacie wynosić może maksymalnie 50%. Przy czym wszystkie włókna ułożone w orientacji  $\pm 10^\circ$  są traktowane jako równoległe względem siebie.
- Wartość pochłoniętej energii przez panel reprezentujący sekcję „Vertical Side Impact Structure” podczas trzy-punktowego zginania musi być równoważna energii pochłoniętej przez element bazowy. Przy czym jej wartość dotyczy obszaru pod krzywą (określającą zależność siły od przemieszczenia) do chwili uszkodzenia panelu lub osiągnięcia 12,7 mm przemieszczenia.
- Wartość sztywności na zginanie panelu reprezentującego sekcję „Vertical Side Impact Structure” musi być równa lub większa niż wartości sztywności na zginanie elementu bazowego, gdzie wysokość sekcji w ustroju nośnym 320 mm.

Elementem bazowym w przypadku analizowanej struktury określa się dwa stalowe profile o przekroju kołowym. Minimalne wartości geometryczne przekroju elementu bazowego przedstawiono w Tabeli 1. Z kolei w Tabeli 2. określono minimalne wymagania dotyczące materiału elementu bazowego.

## Koncepcja analizowanej struktury kompozytowej

Podczas projektowania analizowanej struktury kompozytowej przyjęto, że będzie ona wykonana w formie kompozytu przekładkowego. Do materiałów składowych struktury kompozytowej należały wstępnie przesączone tkaniny z włókna węglowego oraz rdzeń o strukturze plastra miodu wykonany ze stopu aluminium. Zdecydowano o zastosowaniu zarówno tkaniny dwukierunkowej, jak i jednokierunkowej. Natomiast struktura wykonana została przy użyciu metody worka próżniowego, bez dodatkowego ciśnienia zewnętrznego podczas cyklu wygrzewania. Tkanina jednokierunkowa posiada wysoki stosunek parametrów wytrzymałościowych do gęstości, z tego względu stanowiła ona główny element składowy warstw czołowych. Z kolei tkaninę dwukierunkową wybrano nie tylko ze względu na właściwości mechaniczne w obu jej głównych osiach materiałowych, ale też ze względu na jej wizualność. Oznaczenia materiałów warstw czołowych: GG 204T IMP503Z o gramaturze 204 g/m<sup>2</sup> (tkanina dwukierunkowa); DYX HS15/130 DLN2 IMP503 o gramaturze 130 g/m<sup>2</sup> (tkanina jednokierunkowa). W przypadku doboru materiału rdzenia dla analizowanej struktury sugerowano się najwyższą wytrzymałością na ścinanie w stosunku do gęstości. Z tego względu wybrano rdzeń ze stopu aluminium o strukturze „plastra miodu”, o oznaczeniu PAMG-XR1-3.1-3/16-20-P-5056. Z racji wydzielanych związków lotnych przez osnowę materiału lic podczas cyklu wygrzewania ważne było, aby rdzeń posiadał perforacje na ściankach komórek, które znacznie ułatwiają ich usuwanie w trakcie cyklu wygrzewania. W celu zapewnienia odpowiedniej siły adhezji pomiędzy licem a rdzeniem zdecydowano o zastosowaniu filmu adhezyjnego.

Podczas definicji układu poszczególnych warstw struktury kompozytowej, należało wziąć pod uwagę ograniczenia wynikające z regulaminu oraz ograniczenia wynikające z utworzonej geometrii konstrukcji nośnej. W przypadku regulaminu wymagane jest, aby masa włókien równoległych względem siebie nie przekraczała 50% masy wszystkich włókien. Z kolei ograniczenie wewnątrz konstrukcji nośnej definiowało maksymalną grubość analizowanej struktury kompozytowej, wynoszącą 30 mm. Z tego względu dla analizowanej struktury przyjęto rdzeń o grubości 25 mm. Dla lic kompozytu przekładkowego przyjęto sposób ułożenia poszczególnych warstw o charakterze quasi-izotropowym. Przyjęty kąt między poszczególnymi warstwami tkanin z włókna węglowego wynosił 45° ( $\pi/4$ ).

## Pozyskanie danych materiałowych

Badania materiałów warstw czołowych dotyczyły statycznej próby rozciągania, ściskania oraz ścinania, na podstawie wykazu norm: PN-EN ISO 14126:2002, PN-EN ISO 14129:2000, PN-EN ISO 527-1:1998, PN-EN ISO 527-4:2000, PN-EN ISO 527-5:2010. Badania przeprowadzono wykorzystując maszynę wytrzymałościową MTS 809. Zgodnie z wspomnianym wcześniej wykazem norm, wykonano próbki do określenia niezbędnych wartości parametrów mechanicznych. Uśrednione wyniki z badań przedstawione zostały w Tabeli 3. (dla tkaniny jednokierunkowej) oraz w Tabeli 4. (dla tkaniny dwukierunkowej). W przypadku niektórych wartości, których wyznaczenie z przeprowadzonych badań eksperymentalnych było niemożliwe, konieczne było zwrócenie się do literatury. Przykładowe zależności naprężenia od odkształcenia uzyskane w wyniku przeprowadzonych badań eksperymentalnych pokazano na Rysunku 2. oraz Rysunku 3.

**Tabela 3. Wartości parametrów mechanicznych dla tkaniny jednokierunkowej**

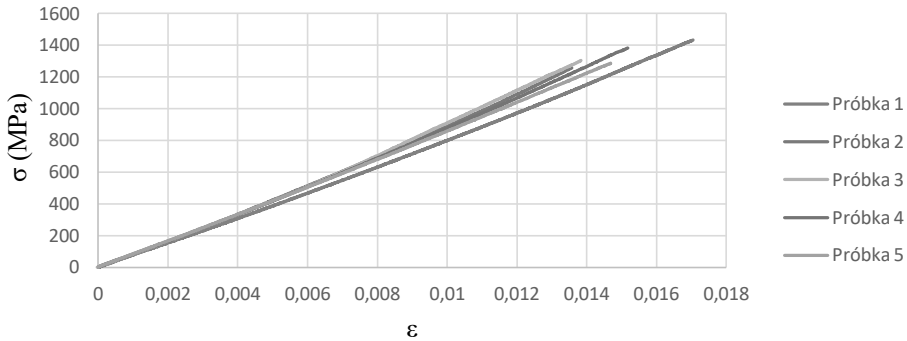
Wartości parametrów mechanicznych DYX HS15/130 DLN2 IMP503					
Moduły Younga		Moduły Kirchhoffa		Współczynniki Poissona	
$E_1$ [GPa]	90,2	$G_{12}$ [GPa]	5,7	$\nu_{12}$	0,31
$E_2$ [GPa]	4,5	$G_{23}$ [GPa]	3,8	$\nu_{23}$	0,4
$E_3$ [GPa]	4,5	$G_{13}$ [GPa]	5,7	$\nu_{13}$	0,31
Wytrzymałość na rozciąganie		Wytrzymałość na ściskanie		Wytrzymałość na ścinanie	
$T_1$ [MPa]	1354	$C_1$ [MPa]	642	$S_{12}$ [MPa]	40,7
$T_2$ [MPa]	21,7	$C_2$ [MPa]	75,4	$S_{23}$ [MPa]	19,9
$T_3$ [MPa]	21,7	$C_3$ [MPa]	75,4	$S_{13}$ [MPa]	40,7

Źródło: Opracowanie własne.

**Tabela 4. Wartości parametrów mechanicznych dla tkaniny dwukierunkowej**

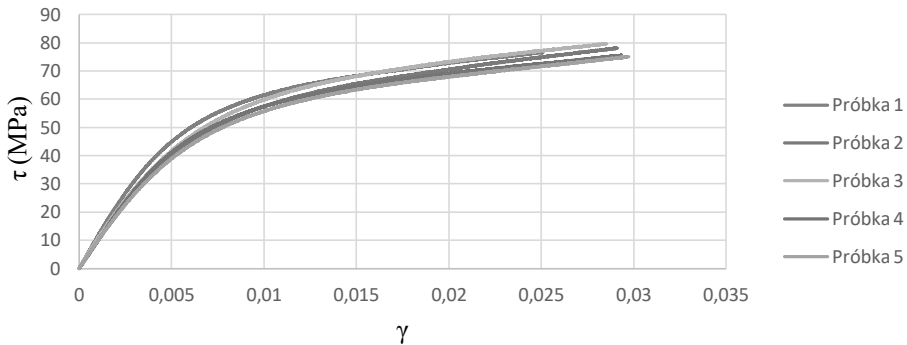
Wartości parametrów mechanicznych GG 204T IMP503Z					
Moduły Younga		Moduły Kirchhoffa		Współczynniki Poissona	
$E_1$ [GPa]	46,6	$G_{12}$ [GPa]	5,6	$\nu_{12}$	0,04
$E_2$ [GPa]	46,6	$G_{23}$ [GPa]	3,7	$\nu_{23}$	0,3
$E_3$ [GPa]	4,6	$G_{13}$ [GPa]	3,7	$\nu_{13}$	0,3
Wytrzymałość na rozciąganie		Wytrzymałość na ściskanie		Wytrzymałość na ścinanie	
$T_1$ [MPa]	652	$C_1$ [MPa]	508	$S_{12}$ [MPa]	38,7
$T_2$ [MPa]	652	$C_2$ [MPa]	508	$S_{23}$ [MPa]	20,1
$T_3$ [MPa]	40,5	$C_3$ [MPa]	135	$S_{13}$ [MPa]	20,1

Źródło: Opracowanie własne.



**Rysunek 2. Zależność naprężenia rozciągającego  $\sigma$  od odkształcenia liniowego  $\epsilon$  dla statycznej próby rozciągania tkaniny jednokierunkowej wzdłuż osi włókien**

Źródło: Opracowanie własne.



**Rysunek 3. Zależność naprężenia ścinającego  $\tau$  od odkształcenia postaciowego  $\gamma$  dla tkaniny jednokierunkowej**

Źródło: Opracowanie własne.

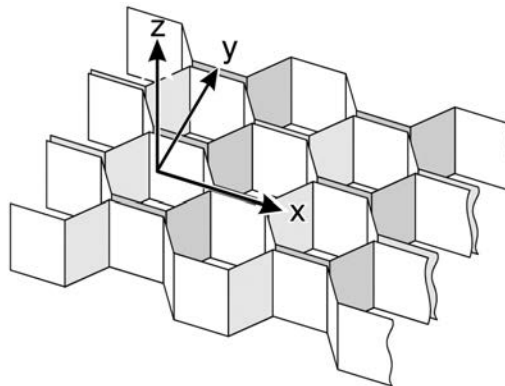
W przypadku materiału rdzenia jego wartości poszczególnych właściwości mechanicznych pozyskane zostały bezpośrednio od jego producenta oraz z literatury. Parametry mechaniczne przekładki przedstawiono w Tabeli 5. Z kolei na Rysunku 4. przedstawiano schemat, który umożliwia poprawną interpretację zestawionych parametrów mechanicznych w poszczególnych kierunkach oraz płaszczyznach.

Minimalne wartości parametrów mechanicznych materiału elementu bazowego są ściśle określone przez regulamin zawodów Formuły Student. Z tego powodu przeprowadzona została statyczna próba rozciągania, w celu wyznaczenia wartości właściwości mechanicznych materiału przyjętego na element bazowy. Wykres ze statycznej próby rozciągania pokazano na Rysunku 5. Uzyskane wartości zestawiono wraz z minimalnymi wymaganiami w Tabeli 6.

Tabela 5. Wartości parametrów mechanicznych dla aluminiowego rdzenia

Wartości parametrów mechanicznych PAMG-XR1-3.1-3/16-20-P-5056					
Moduły kompresji		Moduły Kirchhoffa		Współczynniki Poissona	
$E_1$ [GPa]	-	$G_{12}$ [GPa]	-	$\nu_{12}$	0,49
$E_2$ [GPa]	-	$G_{23}$ [GPa]	0,18	$\nu_{23}$	-
$E_3$ [GPa]	0,669	$G_{13}$ [GPa]	0,34	$\nu_{13}$	-
Wytrzymałość na rozciąganie		Wytrzymałość na ściskanie		Wytrzymałość na ścinanie	
$T_1$ [MPa]	-	$C_1$ [MPa]	-	$S_{12}$ [MPa]	-
$T_2$ [MPa]	-	$C_2$ [MPa]	-	$S_{23}$ [MPa]	1,08
$T_3$ [MPa]	2,76	$C_3$ [MPa]	2,76	$S_{13}$ [MPa]	1,91

Źródło: www.plascore.com



Rysunek 4. Schemat przedstawiający poszczególne kierunki oraz płaszczyzny dla rdzenia o strukturze „plastra miodu”

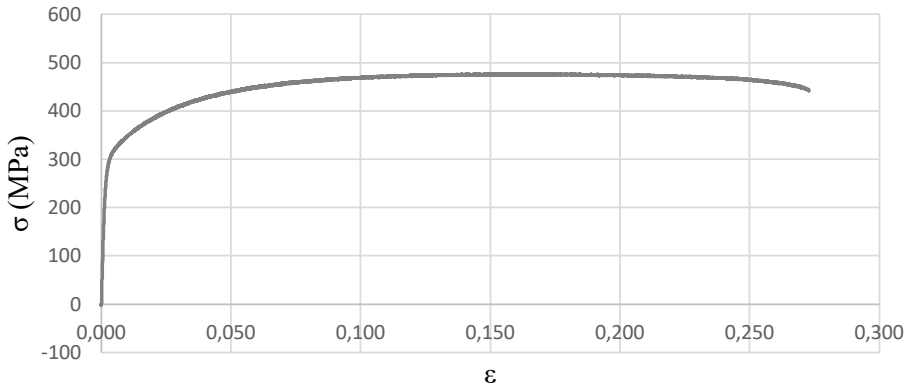
Źródło: Hexcel Composites, (2000), Honeycomb Sandwich Design Technology, HexWeb, No. AGU 075b.

Tabela 6. Porównanie uzyskanych wartości parametrów mechanicznych na podstawie badania z wymaganiami minimalnymi

	Wartości uzyskane	Wymagania minimalne
Moduł Younga E [GPa]	205	200
Granica plastyczności Re [MPa]	305	305
Maksymalna wytrzymałość Rm [MPa]	476	365

Źródło: Opracowanie własne.

W celu wyznaczenia wartości energii pochłoniętej przez element bazowy określony w regulaminie Formuły Student, przeprowadzone zostało badanie doświadczalne



**Rysunek 5. Zależność naprężenia rozciągającego  $\sigma$  od odkształcenia liniowego  $\epsilon$  dla statycznej próby rozciągania materiału przyjętego na element bazowy**

Źródło: Opracowanie własne.

w postaci trzy-punktowego zginania. Na Rysunku 6. przedstawiono schemat przeprowadzonego badania.



**Rysunek 6. Trzy-punktowe zginanie elementu bazowego**

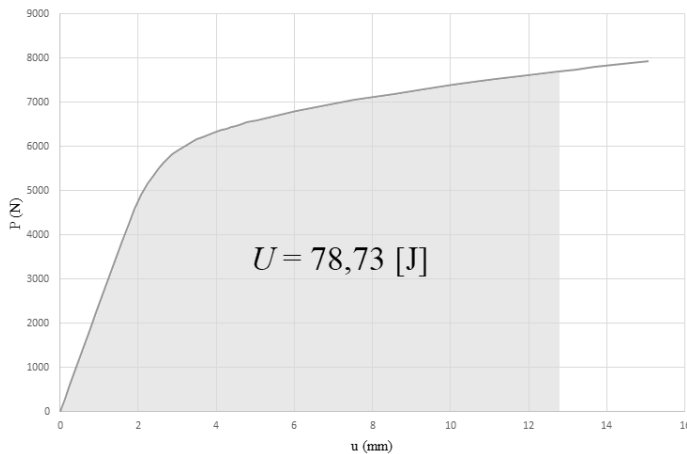
Źródło: Opracowanie własne.

Wyznaczenie wartości pochłoniętej energii  $U$  polegało na obliczeniu pola figury określonej linią przedstawiającą zależność pomiędzy siłą nacisku  $P$  a ugięciem  $u$ . Przy czym, maksymalna wartość ugięcia  $u$  wynosi 12,7 mm. Zależność tą pokazano na Rysunku 7.

**Tabela 7. Wartości parametrów geometrycznych przekroju pojedynczego profilu oraz wymagań minimalnych**

	Wartości uzyskane	Wymagania minimalne
Grubość ścianki $g$ [mm]	1,65	1,2
Pole przekroju $A$ [mm <sup>2</sup> ]	123,1	119
Moment bezwładności $I$ [mm <sup>4</sup> ]	8722,2	8509

Źródło: Opracowanie własne.



**Rysunek 7. Zależność pomiędzy siłą nacisku  $P$  a ugięciem  $u$  dla trzy-punktowego zginania elementu bazowego**

Źródło: Opracowanie własne.

Obliczona wartość energii pochłoniętej  $U$  przez element bazowy do chwili osiągnięcia ugięcia  $u = 12,7$  mm wyniosła 78,73 J. Wyznaczona wartość stanowiła główne kryterium dla obliczeń numerycznych, które przedstawiono w następnym rozdziale.

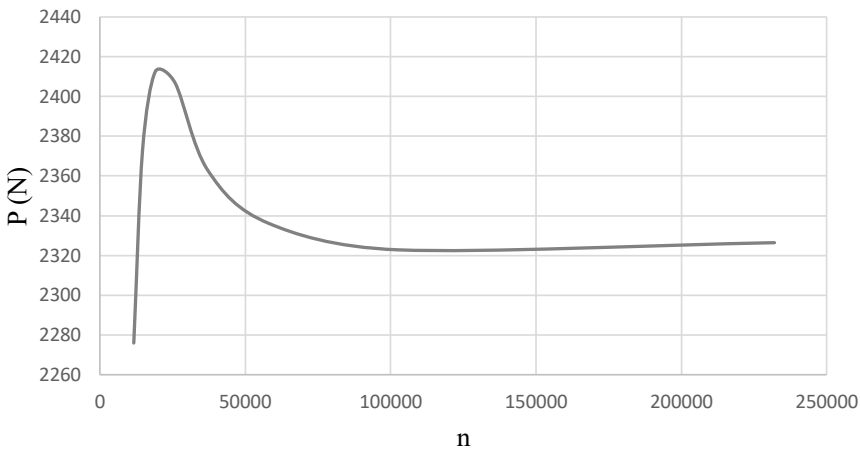
## Obliczenia numeryczne

Obliczenia numeryczne z wykorzystaniem metody elementów skończonych (MES) zostały wykonane za pomocą oprogramowania ANSYS 2020 R2. W tym celu utworzony został model materiałowy analizowanej struktury. Definicja modelu materiałowego polegała na przypisaniu poszczególnym materiałom struktury wartości danym właściwościom na podstawie wyników uzyskanych w badaniach eksperymentalnych, informacji uzyskanych z literatury i od producentów poszczególnych materiałów. Obliczenia oparto o progresywny model degradacji materiału, dzięki któremu wyznaczono



wartość zaabsorbowanej energii przez strukturę kompozytową oraz wartości krytycznych siły nacisku i ugięcia w chwili uszkodzenia jej warstw czołowych lub rdzenia.

W celu dyskretyzacji modelu zastępczego zastosowano powłokowe elementy skończone. Zastosowany typ elementów dotyczył zarówno struktury kompozytowej, jak i podpór wraz z aplikatorem. Do określenia wymaganej liczby elementów skończonych  $n$  przeprowadzono analizę wpływu ich ilości na uzyskiwane wyniki. Szukanym wynikiem dla struktury kompozytowej była wartość siły nacisku  $P$ . Podczas analizy zmniejszano stopniowo rozmiar elementów skończonych, zapisując uzyskane wyniki dotyczące wartości siły nacisku. Ze względu na ograniczenia sprzętowe, przeprowadzono analizę dotyczącą tylko zakresu liniowego. Na podstawie uzyskanych danych utworzony został wykres przedstawiający zależność uzyskiwanej wartości siły nacisku  $P$  od liczby elementów skończonych  $n$  (Rys. 8).



**Rysunek 8.** Wpływ liczby elementów skończonych  $n$  na uzyskiwane wartości siły nacisku  $P$

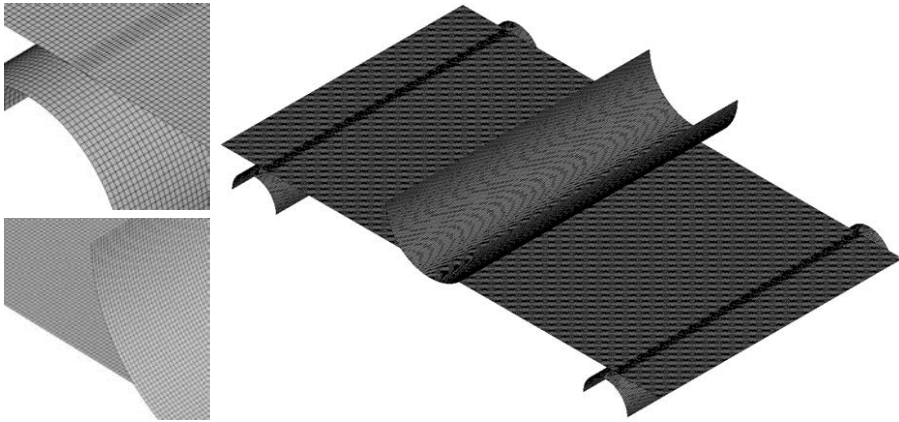
Źródło: Opracowanie własne.

Na podstawie uzyskanego wykresu stwierdzono, że minimalną liczbą elementów skończonych  $n$  potrzebną do dyskretyzacji jest 125000 elementów. W Tabeli 8. zestawiono dane dotyczące utworzonej siatki elementów skończonych dla poszczególnych obiektów ciągłych. Z kolei na Rysunku 9. przedstawiono wygenerowaną siatkę elementów.

**Tabela 8.** Dane utworzonej siatki elementów skończonych

	Struktura kompozytowa	Podpory i aplikator
Liczba elementów skończonych	88000	60480
Liczba węzłów	88621	61455

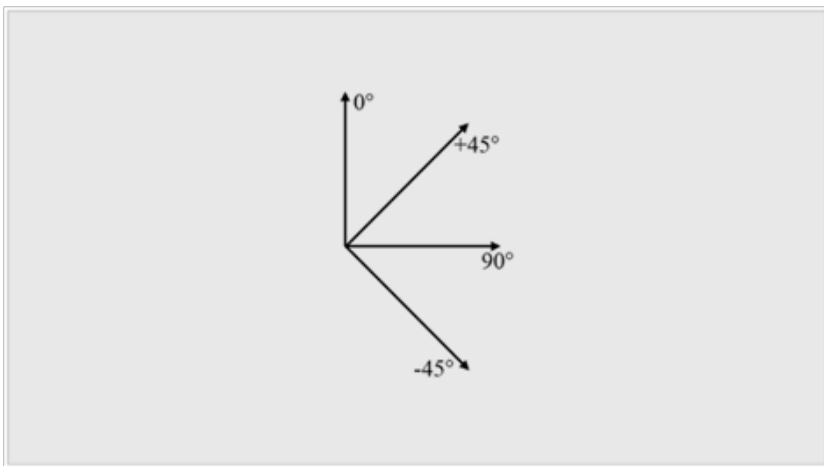
Źródło: Opracowanie własne.



**Rysunek 9. Zdyskretyzowany model**

Źródło: Opracowanie własne.

Po utworzeniu siatki elementów skończonych przystąpiono do definicji układu warstw struktury kompozytowej. Określone zostały kierunki główne kompozytu względem których zdefiniowano orientację każdej z warstw (Rys. 10) oraz utworzony układ poszczególnych warstw struktury kompozytowej (Tabela 9).



**Rysunek 10. Kierunki orientacji poszczególnych warstw**

Źródło: Opracowanie własne.

Kolejny krok obejmował definicję warunków kontaktowych występujących pomiędzy elementami modelu dyskretnego oraz definicję warunków brzegowych będących odzwierciedleniem rzeczywistego badania doświadczalnego. Rozpatrywane zagadnie-

Tabela 9. Układ poszczególnych warstw struktury kompozytowej

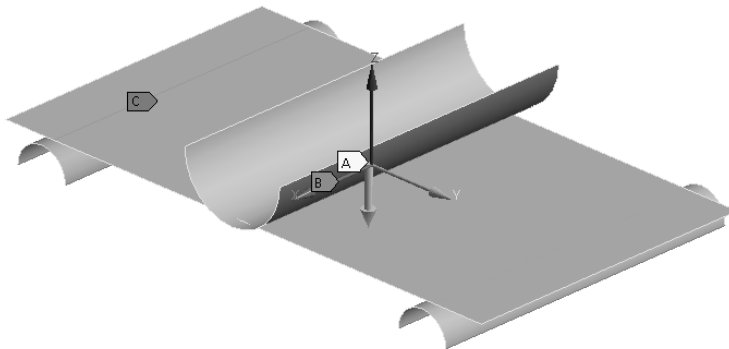
Nr warstwy	Materiał	Orientacja [°]	Grubość [mm]
1	GG 204T IMP503Z	0/90	0,3
2	GG 204T IMP503Z	0/90	0,3
3	DYX HS15/130 DLN2 IMP503	0	0,125
4	DYX HS15/130 DLN2 IMP503	45	0,125
5	DYX HS15/130 DLN2 IMP503	-45	0,125
6	DYX HS15/130 DLN2 IMP503	90	0,125
7	PAMG-XR1-3.1-3/16-20-P-5056	0	25
8	DYX HS15/130 DLN2 IMP503	90	0,125
9	DYX HS15/130 DLN2 IMP503	-45	0,125
10	DYX HS15/130 DLN2 IMP503	45	0,125
11	DYX HS15/130 DLN2 IMP503	0	0,125
12	GG 204T IMP503Z	0/90	0,3
13	GG 204T IMP503Z	0/90	0,3
		<b>Grubość całk. [mm]</b>	27,2

Źródło: Opracowanie własne.

nie wymagało zdefiniowania kontaktu o nieliniowym charakterze, uwzględniającego tarcie pomiędzy strukturą kompozytową a podporami oraz aplikatorem. Współczynnik tarcia zdefiniowany został na poziomie 0,1. Na Rysunku 11. przedstawiono zdefiniowane warunki brzegowe w modelu obliczeniowym.

**B: Static Structural**  
Fixed Rotation  
Time: 1, s

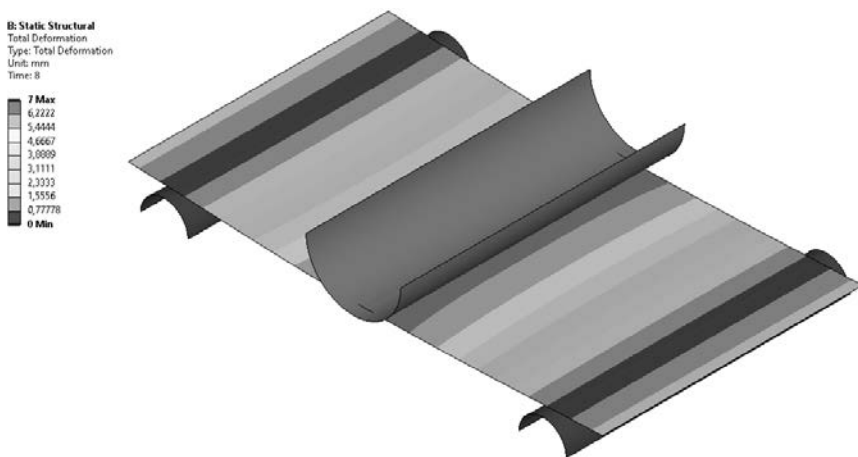
**A** Displacement  
**B** Fixed Rotation: 0, °  
**C** Fixed Support



Rysunek 11. Warunki brzegowe w modelu obliczeniowym

Źródło: Opracowanie własne.

Korzystając z post-procesora wygenerowano wyniki przeprowadzonych obliczeń. Na podstawie uzyskanych zależności siły nacisku od ugięcia obliczono wartość pochłoniętej energii  $U$  przez strukturę kompozytową. Początek inicjacji uszkodzenia struktury kompozytowej nastąpił dla siły  $P = 26142$  N oraz ugięcia  $u = 10,47$  mm.



Rysunek 12. Rozkład wartości przemieszczenia wypadkowego dla zmodyfikowanej struktury kompozytowej

Źródło: Opracowanie własne.

Zgodnie z wytycznymi zawartymi w regulaminie Formuły Student obliczona wartość zaabsorbowanej energii odnosi się do chwili, w której nastąpiło zniszczenie struktury kompozytowej. Na Rysunku 12. przedstawiono rozkłady wartości przemieszczenia wypadkowego dla analizowanej struktury kompozytowej. Obliczona wartość pochłoniętej energii  $U$  wyniosła 136,72 J. Przyrównując uzyskaną wartość do wartości energii zaabsorbowanej przez element bazowy podczas badań eksperymentalnych stwierdzić można, że wymagania regulaminu zostało spełnione. Oprócz wymagania dotyczącego wartości pochłoniętej energii, regulamin określa również wymagania dotyczące sztywności na zginanie  $D$ . Wartość sztywności na zginanie  $D$  struktury kompozytowej w odniesieniu do ustroju nośnego obliczono z równania (1). W przypadku wartości modułu sprężystości warstw czołowych  $E_f$  znajdującej się w równaniu (1), należało skorzystać z przekształconego równania na ugięcie belki poddanej trzy-punktowemu zginaniu (2). Wartości siły nacisku  $P$  oraz ugięcia  $u$  należało przyjąć z zakresu liniowego z zależności siły nacisku od ugięcia uzyskanej z obliczeń numerycznych struktury kompozytowej.

$$D = 2 \cdot E_f \cdot t_f \cdot b \cdot d^2 \quad (1)$$

gdzie:

$D$  – sztywność na zginanie kompozytu przekładkowego [ $\text{Nm}^2$ ],

$E_f$  – moduł sprężystości warstw czołowych [Pa],  
 $t_f$  – grubość warstw czołowych [m],  
 $b$  – szerokość przekroju [m],  
 $d$  – odległość między osiami [m].

$$E_f = \frac{P \cdot l^3}{48 \cdot I_p \cdot u} \quad (2)$$

gdzie:

$P$  – wartość siły dla zakresu linowego podczas zginania panelu testowego [N],  
 $l$  – odległość między podporami w trzy-punktowym zginaniu panelu testowego [m],  
 $I_p$  – moment bezwładności przekroju panelu testowego [m<sup>4</sup>],  
 $u$  – wartość ugięcia dla zakresu linowego podczas zginania panelu testowego [N].

Z kolei wartość sztywności na zginanie elementu bazowego  $D_{e.b.}$  obliczono z równania (3).

$$D_{e.b.} = E \cdot (I \cdot 2) \quad (3)$$

gdzie:

$D_{e.b.}$  – sztywność na zginanie elementu bazowego [Nm<sup>2</sup>],  
 $E$  – moduł Younga materiału przyjętego jako bazy [Pa],  
 $I$  – moment bezwładności przekroju pojedynczego profilu elementu bazowego [m].

Obliczone wartości sztywności na zginanie oraz wartości zaabsorbowanej energii dla zmodyfikowanej struktury kompozytowej i elementu bazowego zostały zestawione w Tabeli 12.

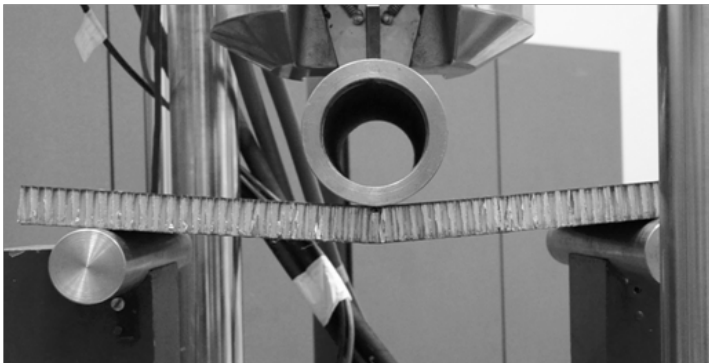
**Tabela 12. Zestawione wartości sztywności na zginanie dla zmodyfikowanej struktury kompozytowej oraz elementu bazowego**

	Analizowana struktura kompozytowa	Element bazowy
Wartość sztywności na zginanie $D$ (Nm <sup>2</sup> )	3921,6	3576,1
Wartość zaabsorbowanej energii $U$ (J)	136,72	78,73
Krytyczna wartość siły nacisku $P$ (N)	26142	-
Krytyczna wartość ugięcia $u$ (mm)	10,46	-

Źródło: Opracowanie własne.

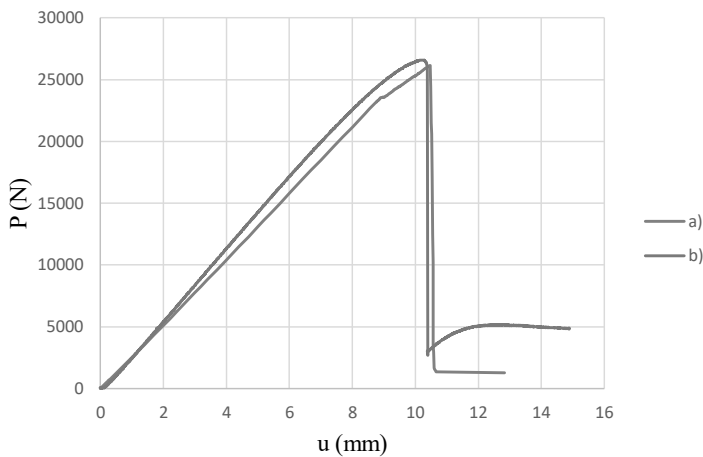
## Walidacja obliczeń numerycznych

W celu walidacji przeprowadzonych obliczeń numerycznych Przygotowaną strukturę kompozytową w postaci panelu testowego poddano badaniu trzy-punktowemu zginaniu, które przeprowadzono na maszynie wytrzymałościowej MTS 322. Na Rysunku 13. przedstawiono panel testowy w trakcie badania doświadczalnego. Dzięki przeprowadzonemu badaniu uzyskano wykres przedstawiający zależność siły nacisku  $P$  od ugięcia  $u$ . Na Rysunku 14 zestawiono wyniki uzyskane za równo z obliczeń numerycznych jak i z badania doświadczalnego.



Rysunek 13. Trzy-punktowe zginanie struktury kompozytowej

Źródło: Opracowanie własne.



Rysunek 14. Zależność siły nacisku  $P$  w funkcji ugięcia  $u$  dla struktury kompozytowej:

- a) uzyskana za pomocą obliczeń numerycznych;
- b) uzyskana na podstawie badania doświadczalnego

Źródło: Opracowanie własne.

W Tabeli 13. zestawiono wartości zaabsorbowanej energii, krytyczne wartości sił nacisku oraz ugięcia dla struktury kompozytowej wyznaczone z obliczeń numerycznych i badania doświadczalnego. Różnica pomiędzy wartością zaabsorbowanej energii uzyskaną na podstawie obliczeń numerycznych a badaniem doświadczalnym wyniosła 20,68%.

**Tabela 13. Zestawione wartości uzyskane na podstawie obliczeń numerycznych oraz badania doświadczalnego**

	Obliczenia numeryczne	Badanie doświadczalne
Wartość zaabsorbowanej energii $U$ (J)	136,72	172,36
Krytyczna wartość siły nacisku $P$ (N)	26142	26582
Krytyczna wartość ugięcia $u$ (mm)	10,46	10,37

Źródło: Opracowanie własne.

## Podsumowanie

Zachowanie wysokiej sztywności i wytrzymałości przy niskiej masie jest kluczowym założeniem przy projektowaniu konstrukcji nośnych pojazdów klasy Formuła Student. Z tego względu wybraną koncepcją analizowanej struktury był kompozyt przekładkowy o warstwach czołowych wykonanych z tkaniny z włókna węglowego, połączonych z aluminiowym rdzeniem o strukturze „plastra miodu”. Spośród rozważanych rozwiązań, wybrane materiały posiadają najwyższy stosunek parametrów wytrzymałościowych do gęstości. Przeprowadzone badania eksperymentalne umożliwiły określenie wartości parametrów mechanicznych zastosowanych materiałów w strukturze kompozytowej. Wyznaczone wartości posłużyły do zdefiniowania modelu materiałowego wykorzystanego w obliczeniach numerycznych. Ponadto, dzięki badaniom eksperymentalnym, określony został minimalny poziom energii jaką musi zaabsorbować analizowana struktura.

Na bazie obliczeń numerycznych wyznaczono układ warstw struktury kompozytowej spełniającej założenia projektowe. Wartości zaabsorbowanej energii uzyskane na podstawie obliczeń numerycznych i badania doświadczanego wykazują różnicę na poziomie 20,68%. Różnica w uzyskanych wynikach ma kilka przyczyn. Jedną z głównych może być dokładność wykonanych próbek, które posłużyły do wyznaczenia wartości parametrów mechanicznych materiałów lic kompozytu przekładkowego. Z kolei parametry mechaniczne rdzenia zostały zaczerpnięte z danych udostępnionych przez producenta oraz z literatury. W celu ich weryfikacji należałoby wykonać próbki oraz odpowiednie badania doświadczalne. Kolejną z przyczyn może być połączenie po-

między warstwami czołowymi a rdzeniem struktury kompozytowej, którego wpływ w modelu obliczeniowym został pominięty.

## Literatura

Ansys Documentation 2020 R2.

Bitzer T.N. 1997. Honeycomb Technology – Materials, Design, Manufacturing and Testing. Springer Science & Business Media, Dublin.

German J. 2001. Podstawy Mechaniki Kompozytów Włóknistych. Politechnika Krakowska, Kraków.

Hexcel Composites. 2000. Honeycomb Sandwich Design Technology. HexWeb, No. AGU 075b. [https://www.plascore.com/download/datasheets/honeycomb\\_data\\_sheets/PLA\\_PAMG-XR1-5056\\_1-29-21.pdf](https://www.plascore.com/download/datasheets/honeycomb_data_sheets/PLA_PAMG-XR1-5056_1-29-21.pdf) (dostęp maj 2021 r.)

Zenkert D. 1997. An Introduction to Sandwich Construction. Emas Publishing, London.

## Abstract

### TYTUŁ ANGIELSKI

The subject of the work was the development of composite structures applicable in the chassis of Formula Student vehicles. This study was based on numerical calculations using the finite element method and on experimental materials research. The selected concept of the composite structure was a sandwich composite. The results of the experimental materials research were used to define the material model used in the numerical calculations. Numerical calculations were carried out in the ANSYS 2020 R2 program, in which a progressive model of material degradation was used. Thanks to this, the values of the pressure force and deflection for which the composite structure was damaged were determined. Based on the obtained results, the value of the energy absorbed by the composite structure until its damage was calculated. The numerical calculations were validated by conducting an experimental test in the form of a three-point bending of the panel representing the analysed composite structure. The difference between results from numerical calculation and experimental tests was 20,68%.

**Słowa kluczowe:** Formuła Student, kompozyt przekładkowy, obliczenia MES.

**Key words:** Formula Student, sandwich composite, FEM calculations.



**Małgorzata Zontek**

Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie  
Koło Naukowe Geodetów „Dahlta”

## **WYKORZYSTANIE ROZSZERZONEJ RZECZYWISTOŚCI W MULTITEMPORALNEJ PREZENTACJI ZABYTKÓW BIELSKA-BIAŁEJ**

**Streszczenie:** Celem niniejszej pracy jest stworzenie aplikacji mobilnej na system Android, która pozwoli odbiorcom na zapoznanie się z dawnym wyglądem zabytków Bielska-Białej. Użytkownik w terenie, w oparciu o dane geolokalizacyjne, prowadzony jest do punktu położenia obiektu zabytkowego, gdzie proszony jest o zlokalizowanie obszaru, po przekroczeniu którego uruchamia się moduł rozszerzonej rzeczywistości. Do zaimplementowania elementów wirtualnych wykorzystano program Unity 3D z wtyczką Vuforia. Aplikacja zawiera elementy grywalizacji i przez swoje podobieństwo do aplikacji typu Pokemon Go stanowi nowoczesne narzędzie w poznawaniu historii miasta.

### **Wstęp**

Za pomocą GIS (ang. Geographic Information System) jesteśmy w stanie gromadzić, przetwarzać, wykorzystywać oraz wyświetlać dane przestrzenne, które odnoszą się do Ziemi (Halik 2018). Sposób, w jaki przedstawiane i wizualizowane są dane geograficzne, wpływa na atrakcyjność ich przekazu. Postęp technologiczny pozwolił na rozwijanie i udoskonalanie technologii rozszerzonej rzeczywistości opartej o technologię GIS (ang. Geographic Information System) na urządzeniach mobilnych. Rozszerzona rzeczywistość jest jedną z najprężniej rozwijających się obecnie technologii. Wygenerowane za pomocą technologii cyfrowych wirtualne elementy, nałożone na otaczający nas świat rzeczywisty, stanowią przede wszystkim źródło dodatkowych informacji o najbliższym otoczeniu. Synergia dwóch wyżej wymienionych metod pozwala przetwarzać dane geoprzestrzenne podczas eksploracji środowiska naturalnego lub antropogenicznego.

## Cel

Celem pracy było wykorzystanie ogólnodostępnych technik rozszerzonej rzeczywistości w oparciu o dane geolokalizacyjne, aby zaprezentować zmiany, jakie zaszły w czasie dla wybranych obiektów historycznych miasta Bielsko-Biała. Dla starszych mieszkańców aplikacja może być okazją do przywołania wspomnień na podstawie obrazów ukazujących, jak kiedyś wyglądały poszczególne miejsca Bielska-Białej. Dla dzieci oraz młodzieży stanowi ona nowoczesne narzędzie do poznawania historii miasta, dzięki zastosowaniu elementu grywalizacji. Aplikacja pozwala zaznajomić się w przystępny i prosty sposób z historią Bielska-Białej, a także stanowi nowatorski przewodnik po mieście.

## Material i metody

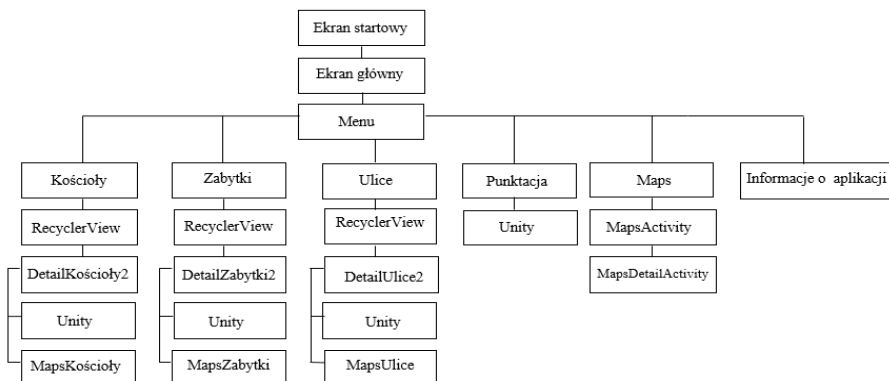
Tworzenie aplikacji podzielono na dwa etapy: pierwszym z nich było stworzenie interfejsu natywnego aplikacji w programie Android Studio, a drugim – elementów wirtualnych. Elementy te zostały zaimplementowane do autorskiej aplikacji za pomocą programu Unity 3D. Jest to wieloplatformowy silnik gry, który służy do tworzenia dwuwymiarowych oraz trójwymiarowych gier w rzeczywistości wirtualnej oraz rzeczywistości rozszerzonej, a także do symulacji (oficjalna strona programu Unity, <https://unity3d.com/get-unity/download/archive>, dostęp 28 listopada 2020 r.).

Po wybraniu odpowiedniego programu stworzono bazę danych, która została użyta w dalszych etapach aplikacji, składającą się z dwóch tabel. Pierwsza z nich przechowuje dane w postaci oznaczeń nazw obiektów, ich opisów oraz linków do źródeł, z których pobrano zdjęcie archiwalne. Tak przygotowaną bazę z 50 obiektami podzielono później na trzy grupy, tworząc kolejne kategorie w klasie Menu. Druga tabela zawiera spis współrzędnych wszystkich miejsc, w których wykonano zdjęcia aktualne. Współrzędne pobrano za pomocą aplikacji mobilnej ArcGIS Collector. W tej aplikacji stworzono trzy warstwy, reprezentujące poszczególne kategorie obiektów historycznych, tj. kościoły, zabytki, ulice. Następnie z poziomu ArcGIS Collector w tych miejscach, gdzie wykonywano zdjęcia aktualne, dodawano zgodny z daną kategorią obiekt na mapie. Miejsca te zostały zaznaczone na mapie. Zgromadzone dane w postaci współrzędnych umożliwiły umieszczenie MapMarkerów na zaimplementowanej mapie Google.

Dla wszystkich zdjęć archiwalnych zrobiono ich aktualne odpowiedniki z możliwie podobnej perspektywy dla uwydatnienia zmian zachodzących w czasie. Wykonanie niektórych zdjęć z podobnej perspektywy nie było możliwe z powodu modernizacji i licznych przebudowań miasta. Część zdjęć aktualnych zostało poddanych obróbce graficznej w programie GIMP 2.18 oraz ACDSee Photo Studio Home 2021.

Stworzenie interfejsu natywnego aplikacji było możliwe dzięki zastosowaniu domyślnych obiektów w programie Android Studio. Autorska aplikacja składa się z kilku

widoków: ekranu startowego, ekranu głównego oraz Menu. Z poziomu Menu możliwa jest nawigacja pomiędzy poszczególnymi podzespołami. Wyróżnia się sześć podzespołów: Kościoły, Zabytki, Ulice, Punktację, Informacje o aplikacji oraz Mapę (rysunek 1).



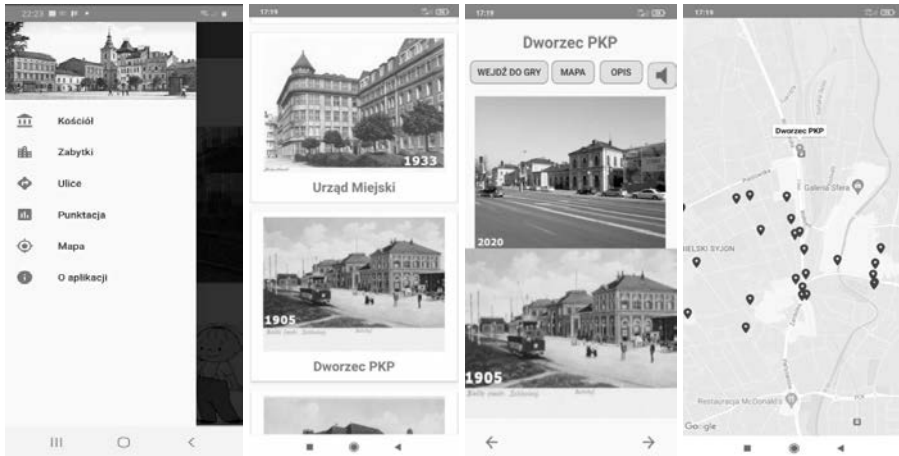
**Rysunek 1. Schemat przedstawiający strukturę poszczególnych widoków, z których zbudowana jest aplikacja**

Źródło: opracowanie własne.

Z poziomu głównego menu użytkownik ma możliwość dwutorowego sposobu poruszania się po aplikacji. Trzy spośród sześciu podkategorii menu, tj. Kościoły, Ulice, Zabytki, zostały skonstruowane w ten sam sposób. Po wybraniu jednego z wcześniej wymienionych podzespołów wyświetla się okno z wieloma zdjęciami historycznymi, które można przeglądać poprzez scrollowanie ekranu. Scrollowanie oznacza przewijanie zawartości ekranu na urządzeniu elektronicznym za pomocą gestów wykonywanych palcami. Klasy te odpowiadają za archiwalną wizualizację obiektów historycznych Bielska-Białej. Dzięki zastosowaniu polecenia CardView po kliknięciu na wybrane zdjęcie możliwe jest przejście do kolejnej klasy (DetailActivity), w której znajduje się zdjęcie aktualne, a pod nim zdjęcie archiwalne wykonane z podobnej perspektywy. Użytkownik ma możliwość dzięki scrollowaniu w poziomie zobaczyć zdjęcia archiwalne przedstawiające ten sam obiekt historyczny w różnych okresach. Dodatkowo na każdym zdjęciu archiwalnym jest podany rok, kiedy zostało ono wykonane, aby odbiorca mógł porównać zmiany zachodzące w czasie na przykładzie danego obiektu historycznego.

U góry ekranu znajdują się cztery przyciski oraz nazwa danego obiektu historycznego. Z poziomu pierwszego przycisku aplikacja włącza program Unity z zaimplementowanym obiektem rozszerzonej rzeczywistości (w postaci prostopadłościanu) wraz z nałożoną na ten obiekt teksturą zdjęcia archiwalnego. Za pomocą drugiego przycisku zostaje uruchomiona wtyczka map Google z podświetlonym MapMarkerem reprezentującym położenie wybranego wcześniej obiektu historycznego na mapie Bielska-Białej. Z tego miejsca użytkownik ma możliwość podglądu innych obiektów z danej kategorii, które znajdują się w pobliżu obecnej lokalizacji (rysunek 2). Trzeci przycisk umożliwia

użytkownikowi przeczytanie krótkiego opisu historycznego na temat danego obiektu historycznego. Ostatni z czterech przycisków włącza syntezę mowy i pozwala na wysłuchanie informacji o danym miejscu.



Rysunek 2. Schemat poruszania się po aplikacji z poziomu podzespołu Zabytków w głównym Menu

Źródło: opracowanie własne.

Po wybraniu menu Punktacja użytkownik ma możliwość podglądu, które obiekty historyczne udało mu się zobaczyć, a które jeszcze zostały „do odszukania”. Ta podkategoria jest połączona z programem Unity, który sprawdza, czy użytkownik znalazł się w obszarze pojawiania się wirtualnego elementu czy też nie (rysunek 3).

Suma punktów: 6/50	
Obiekt historyczny	Punkty
Katedra św. Mikołaja	
Kino Wanda	
+ Kościół św. J. Chrzyciela	
Kościół Marcina Lutra	
Kościół Opatrzności Bożej	
Kościół św. Trójcy	
Kościół św. Barbary	
Kościół św. Stanisława	
+ Kościół Zbawiciela	
Most na Białej	
+ Park Słowackiego	
+ Plac Chrobrego	
Plac Ratuszowy	
Plac Wojska Polskiego	
Plac Wolności	
Pocztą Główną	
Przechód Schodowy	
Ratusz	
Rynek ZWM	
Stacja linii tramwajowej	
Stary Ratusz Szwajc	
+ Studio Filmów Rysunkowych	
Synagoga	
Szpital Ogólny	
Teatr Lalek Białaluka	
Teatr Polski	
ul. 11 Listopada	

Rysunek 3. Widok podkategorii Punktacja przedstawiająca tabelę zdobytych punktów przez użytkownika

Źródło: opracowanie własne.

Wybierając ostatnią z podkategorii menu Mapę, użytkownik otwiera mapę miasta z wieloma MapMarkerami zlokalizowanymi w miejscu położenia danych obiektów historycznych. Po kliknięciu wybranego MapMarkera następuje jego podświetlenie, a nad nim wyświetla się okno InfoWindow reprezentujące aktualne zdjęcie obiektu oraz jego nazwę. W ten sposób użytkownik może zwiedzać miasto, analizując oraz porównując zdjęcia, które wyświetla się nad MapMarkerem z obiektem w rzeczywistości. Po naciśnięciu okna InfoWindow zostaje uruchomiona klasa z odpowiadającym zdjęciem archiwalnym oraz opisem zdjęcia (rysunek 4). Wybierając podkategorię Informacje o aplikacji, użytkownik może zaznajomić się z krótką instrukcją działania aplikacji.



Rysunek 4. Schemat poruszania się po aplikacji z poziomu podzespołu Mapa w głównym Menu

Źródło: opracowanie własne.

W programie Unity prace rozpoczęto od dodania odpowiednio oznaczonych zdjęć archiwalnych do folderu Resources. Zaimplementowano kompatybilną wtyczkę Vuforia oraz wtyczkę ARCore i przystąpiono do tworzenia elementów gry. Utworzono początkowy panel użytkownika dzięki domyślnym narzędziom programu Unity, a także stworzono wirtualny element – kostkę. Do wykonanej kostki (prostopadłościanu) dodano stworzoną teksturę, którą było zdjęcie archiwalne.

Do komponentu, jakim była tekstura otaczająca prostopadłościan, napisano skrypt w języku C#. W skrypcie tym dodano również wzór umożliwiający obliczenie odległości pomiędzy obecną lokalizacją użytkownika a lokalizacją wybranego obiektu. Ponieważ odległości między użytkownikiem a kolejnymi obiektami są mniejsze niż ok. 100 km, przyjęto kulę jako powierzchnię odniesienia. Aby program mógł wyliczyć odległość pomiędzy obecną lokalizacją użytkownika, a lokalizacją wybranego obiektu historycznego, wykorzystano związek między współrzędnymi geograficznymi ( $\phi$ ),

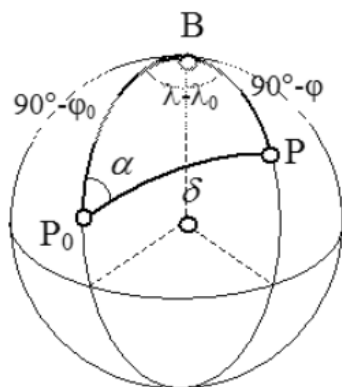
i biegunowymi ( $\alpha$ ,  $\delta$ ) (Zakátow 1959). Obliczenia oparto przede wszystkim na wzorze cosinusowym (Banasik 2015):

Wzór 1 Wzór cosinusowy, za pomocą którego obliczono odległość między obecną lokalizacją użytkownika a wybranym obiektem historycznym

$$\cos \cos(\delta) = \sin \sin(\varphi) \sin \sin(\varphi_0) - \cos(\varphi) \cos(\varphi_0) \cos(\lambda - \lambda_0) \quad (1)$$

gdzie:

- $\varphi$  – to szerokość geograficzna wybranego obiektu historycznego,
- $\varphi_0$  – to obecna szerokość geograficzna użytkownika,
- $\lambda_0$  – to obecna długość geograficzna użytkownika,
- $\lambda$  – to długość geograficzna wybranego obiektu historycznego,
- $\delta$  – to obliczana odległość pomiędzy obecną lokalizacją użytkownika, a lokalizacją wybranego obiektu historycznego.



**Rysunek 5. Zależności zachodzące pomiędzy współrzędnymi geograficznymi ( $\varphi$ ,  $\lambda$ ) oraz biegunowymi ( $\alpha$ ,  $\delta$ ) na kuli**

Źródło: (Banasik P., 2015. Elementy geodezji wyższej i astronomii geodezyjnej w zadaniach. Wydawnictwo AGH, Kraków).

Przy pomocy współrzędnych geograficznych szerokości  $\varphi$ , długości oraz wysokości  $h$  możliwe jest określenie położenia punktu  $P$  na powierzchni Ziemi. „Długość geograficzna jest kątem dwuściennym między płaszczyzną południka zerowego przechodzącego przez Greenwich, a płaszczyzną południka punktu  $P$ . Z kolei szerokością geograficzną  $\varphi$  jest kąt między prostą prostopadłą do kuli poprowadzoną z punktu  $P$ , przechodzącą przez środek kuli  $O$ , a płaszczyzną równika” (Banasik 2015).

Jedną z największych trudności podczas tworzenia aplikacji było stworzenie połączenia pomiędzy programem Unity a programem Android Studio do przekazywania danych. Aby rozwiązać to zadanie, najpierw wyeksportowano gotowy projekt w Unity,

a następnie zaimplementowano go jako bibliotekę .jar w Android Studio. Dopiero po tej procedurze możliwa była wzajemna komunikacja pomiędzy programami. Utrudnienie w postaci przekazywania danych między Android Studio a programem Unity rozwiązano poprzez przesyłanie poszczególnych elementów w listach. W klasach obrazujących szczegóły obiektów (DetailKościoły/DetailZabytki/DetailUlice) dodano dwie listy typu double, zawierające osobno szerokości oraz długości geograficzne poszczególnych obiektów. Stworzono przycisk, po którego naciśnięciu uruchomiony zostaje z poziomu Android Studio program Unity. Wraz z kliknięciem przycisku przekazane zostają cztery argumenty: współrzędne wybranego obiektu (typ double), nazwa obiektu (typu String) oraz wybrana pozycja (typ Integer). Program Unity odbiera przesłane przez Android Studio dane, wyświetlając na ekranie startowym Unity nazwę wybranego obiektu, stan odbioru sygnału GPS oraz odległość do celu, a następnie jeśli spełniony jest warunek (odległość do celu < 30 m), aktywowany zostaje element wirtualny, tj. prostopadłościan z teksturą zdjęcia archiwalnego obiektu. Skrypt w Unity porównuje ze sobą numer zdjęcia wysłanego z programu Android Studio ze zdjęciami zgromadzonymi w folderze Resources. W ten sposób zdjęcie jest podstawiane jako tekstura, która w kolejnym etapie otacza wirtualny prostopadłościan.

W pracy nad programem aktywowanie elementu wirtualnego oparto o dane geolokalizacyjne przy wykorzystaniu wbudowanego w urządzenie odbiornika GPS. Jedną z pierwszych napotkanych trudności było umieszczanie wirtualnego obiektu dokładnie w tym miejscu, z którego wcześniej pobrano współrzędne przy pomocy aplikacji ArcGIS Collector. Za pomocą odbiornika GPS można wyznaczyć określoną pozycję na podstawie pomiarów kodowych i fazowych. Metoda kodowa (wykorzystywana w odbiornikach GPS w Smartfonach) opiera się na pomiarze czasu odbioru kodów C/A i P na jednej lub dwóch częstotliwościach  $L_1$  i  $L_2$ . Czas ten pomnożony przez prędkość rozchodzenia się fal elektromagnetycznych pozwala określić dokładną odległość z punktu na ziemi do satelity (Ben-Moshe i in. 2011). Refrakcja jonosferyczna i troposferyczna oraz odbicia od przeszkód niekorzystnie wpływają na bieg sygnałów pomiarowych, przez co dokładność tej metody wynosi (w zależności od warunków pomiaru i klasy odbiornika) około 3–5 m. Dla celów nawigacyjnych dokładność ta jest wystarczająca (Kryj 2008). Chcąc zwiększyć dokładność oraz wiarygodność pozycji pozyskiwanej z GPS, można zastosować system EGNOS (ang. European Geostationary Navigation Overlay Service). Dokładność odbiornika GPS na urządzeniu użytkownika może się różnić w zależności od jej wersji bądź modelu. Dlatego niemożliwe byłoby osadzenie wirtualnego elementu w konkretnej lokalizacji i wyświetlanie go przez różne urządzenia mobilne w tym samym miejscu. Element pokazałby się w punkcie nieco oddalonym od jego macierzystych współrzędnych lub „skakałby” wokół tego rejonu. Z tego powodu zwiększono obszar pojawiania się wirtualnego prostopadłościanu do okręgu, którego środek jest w wyjściowych współrzędnych obiektu, a promień wynosi 30 metrów (rysunek 6). Wirtualny element pojawi się zatem w obszarze, którego środek wyznaczają współrzędne pobrane za pomocą aplikacji ArcGIS Collector i którego promień wynosi 30 metrów.



**Rysunek 6. Zaznaczony schemat obszaru, w którym pojawia się wirtualny element**

Źródło: opracowanie własne.

Dodatkowo układ odniesienia świata rzeczywistego powinien współgrać z układem odniesienia świata wirtualnego (urządzenia mobilnego). Napotkano kolejną przeszkodę, bowiem aby współgranie dwóch różnych układów było możliwe, powinny mieć one pewien punkt odniesienia. Gdyby do programu Unity podgrano aktualną, rzeczywistą mapę Bielska-Białej z referencyjnymi punktami odniesienia o znanych współrzędnych, wtedy układy z obu światów mogłyby być od siebie zależne. Trudność w synchronizacji układu odniesienia świata rzeczywistego i wirtualnego została rozwiązana przez powiększenie obszaru pojawiania się obiektu wirtualnego do obszaru o promieniu 30 m. Takie założenie rozwiązało następujące problemy:

1. Niedokładności związane z odczytem bieżącej pozycji przez urządzenie zostały ograniczone do „obszaru”, a nie do „punktu”.
2. Użytkownik przez to, że ma trafić w obszar, a nie w punkt, zwiększa swoją szansę na zdobycie punktu.
3. Ponieważ bardzo trudno „osadzić” obiekt wirtualny w konkretnej pozycji – (wiąże się to z trudnością synchronizacji układu odniesienia świata rzeczywistego i układu wirtualnego), przyjęto, że obiekt wirtualny będzie aktywowany przy odległości do celu mniejszej lub równej 30 m. Czyli urządzenie w sposób ciągły przelicza odległość do celu, porównuje ją z założonym promieniem  $R=30\text{m}$  i jeśli spełniony jest ww. warunek – następuje aktywacja obiektu wirtualnego.
4. Synchronizacja układu odniesienia świata rzeczywistego i wirtualnego następuje w chwili aktywacji obiektu wirtualnego. Oznacza to, że właśnie w tym momencie oba ww. układy odniesienia przyjmują wspólny punkt referencyjny.

Doskonałym przykładem na to, jak działają czujniki IMU urządzenia oraz wtyczka ARCore i jak następuje synchronizacja układów we wspólnym punkcie referencyj-



nym, jest aktywacja obiektu wirtualnego tuż na powierzchnią ziemi, a następnie na wysokości ok. 2 m. Wtedy obiekt wirtualny jest zakotwiczony dokładnie w tym miejscu, w którym zastał aktywowany i jego pozycja nie zmienia się w stosunku do świata rzeczywistego. Również skierowanie kamery urządzenia poza obszar widoczności obiektu wirtualnego, nie powoduje jego utraty. Do obiektu wirtualnego możemy się zbliżyć lub oddalić, możemy go obejść dookoła.

## Wyniki

Zastosowano program Unity z kompatybilną wtyczką Vuforia, tworząc namiastkę gry Pokemon Go. Użytkownikowi zbliżającemu się do obiektu (czyli do założonego punktu GPS) na urządzeniu mobilnym pokaże się wirtualny prostopadłościan ze zdjęciem obiektu. Jako że trudno osadzić wirtualny obiekt w określonej pozycji GPS, przyjęto założenie, że użytkownik zbliży się do założonej lokalizacji GPS na wybraną odległość (< 30 m) i wtedy pojawi się mu wirtualny obiekt. Do kodu źródłowego dodatkowo dodano wzór obliczający odległość między użytkownikiem a wybraną lokalizacją obiektu historycznego oraz postawiono warunki do aktywacji wirtualnego obiektu.

## Dyskusja

Prace nad aplikacją wykorzystującą rozszerzoną rzeczywistość przede wszystkim dotyczyły zwizualizowania zmian, jakie zaszły w czasie, na przykładzie wybranych obiektów historycznych Bielska-Białej. Program Android Studio doskonale sprawdza się w procesie tworzenia interfejsu Menu, osadzania zdjęć wraz z opisami, połączenia z Google Maps oraz do przechowywania danych, czyli generalnie do budowania natywnej aplikacji na system operacyjny Android. Z kolei program Unity nadaje się do budowania gier wykorzystujących elementy wirtualnej oraz rozszerzonej rzeczywistości.

Jedną z kluczowych kwestii do rozwiązania w pracy były trudności w przekazywaniu prawidłowych informacji pomiędzy szkieletem aplikacji (programem Android Studio) a wyświetlaniem odpowiednich elementów wirtualnych (programem Unity). Udało się połączyć ze sobą oba programy, budując Unity jako bibliotekę programu Android Studio.

## Podsumowanie

Cel pracy, którym było wykorzystanie ogólnodostępnych technik rozszerzonej rzeczywistości w celu zaprezentowania zmian, jakie zaszły w czasie dla wybranych obiektów historycznych miasta Bielsko-Biała, został zrealizowany w całości. Ostatecznie autorska aplikacja pokazuje, że za pomocą ogólnodostępnych platform do tworzenia obiektów wirtualnych można konstruować rozbudowane aplikacje na system operacyjny Android. Zastosowanie technologii rozszerzonej rzeczywistości, która oparta jest o dane geolokalizacyjne, dowodzi, że możliwe jest stworzenie nowoczesnego narzędzia do poznawania historii wybranych miast. Zaprezentowany produkt końcowy, jakim jest autorska aplikacja, pozwala w ciekawy sposób upowszechnić wiedzę z zakresu geodezji, kartografii i geoinformacji. Wykorzystanie danych geolokalizacyjnych umożliwiło przedstawienie użytkownikom ciekawych miejsc w Bielsku-Białej.

## Bibliografia

- Banasik P., 2015. Elementy geodezji wyższej i astronomii geodezyjnej w zadaniach. Wydawnictwo AGH, Kraków.
- Ben-Moshe B., Elkin E., Levi H., Weissman A., 2011. Improving accuracy of GNSS devices in urban canyons, Proc. 23rd Annu. Can. Conf. Comput. Geom. CCCG 2011, no. January 2011.
- Halik Ł., 2018, "The analysis of visual variables for use in the cartographic design of point symbols for mobile Augmented Reality applications," Geod. Cartogr., vol. 61, no. 1, pp. 19–30.
- Kryj P., 2008. Ogólne Zasady Funkcjonowania Globalnego Systemu Pozycyjnego GPS, Acta Sci. Acad. Ostroviensis, vol. 30, pp. 19–32.
- Oficjalna strona programu Unity, <https://unity3d.com/get-unity/download/archive> (dostęp 28 listopada 2020 r.).
- Zakatow P., 1959. Geodezja wyższa, Państwowe Przedsiębiorstwo Wydawnictw Kartograficznych, no. III, Warszawa.

## Abstract

**THE USE OF ENHANCED REALITY IN THE MULTITEMPORAL  
PRESENTATION OF MONUMENTS IN BIELSKO-BIAŁA**

The aim of this work is to create a mobile application for Android, which allows the recipients to familiarize themselves with the former appearance of the monuments of Bielsko-Biała. The user in the field, based on geolocation data, is guided to the point of location of the historic object, where he is then asked to locate the area, beyond which the augmented reality module is activated. The Unity 3D program with the Vuforia plug was used to implement the virtual elements. The application contains elements of gamification and due to its similarity to *Pokemon Go* applications, it is a modern tool in learning about the history of the city.



**SEKCJA NAUK  
WETERYNARYJNYCH**



**Anna Dowżenko**

**Nikoła Chojnowska**

**Ewa Kaczmar**

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Studenckie Koło Naukowe Technik Obrazowania w Diagnostyce Chorób Małych Zwierząt

Opiekun koła: prof dr hab. Andrzej Rychlik

## **OCENA PRZYDATNOŚCI WYBRANYCH TECHNIK OBRAZOWANIA W DIAGNOSTYCE EKTOPOWYCH MOCZOWODÓW U PSÓW**

### **Wstęp**

Ektopia moczowodów (*Ectopic ureters*) jest wadą wrodzoną wynikającą z dysembriogenezy, w której dochodzi do przemieszczenia bądź nieprawidłowego rozwoju moczowodu pierwotnego – przewodu Wolffa (Elliott, Grauer, Westropp 2017). Podczas embriogenezy dolny odcinek przewodu Wolffa tworzy pęczek moczowodowy, z którego kształtują się moczowody będące częścią drogi wyprowadzającej mocz. Moczowód jest umięśnionym narządem rurowym zbudowanym z trzech warstw: przydanki (zewnątrznej), mięśniówki gładkiej (środkowej) i błony śluzowej wysłanej nabłonkiem przejściowym (wewnętrznej). Znajduje się w przestrzeni pozaotrzewnowej, przyśrodkowo od nerki i kieruje się doogonowo do jamy miednicy, gdzie u samicy wchodzi w więzadło szerokie macicy, a u samca w fałd płciowy. Jego ujście fizjologicznie znajduje się na grzbietowo-bocznej powierzchni pęcherza moczowego w pobliżu jego więzadła bocznego oraz szyjki. Moczowód, wchodząc pod kątem do pęcherza, biegnie przez ok. 2 cm śródściennie (między warstwą mięśniową, a błoną śluzową) aż do osiągnięcia światła pęcherza, gdzie jego ujścia razem z ujściem cewki moczowej tworzą trójkąt pęcherza moczowego (König, Liebich 2014).

W przypadku moczowodów ektopowych ujście znajduje się dystalnie od trójkąta, u suk najczęściej w cewce moczowej lub przedsiönku pochwy, może również uchodzić

do macicy, pochwy lub prostaty, a u samców ujście może znajdować się na całej długości cewki moczowej lub w prostaty. Nieprawidłowość ta może dotyczyć jednego lub obu moczowodów (jedno-, obustronna). Wśród ektopii wyróżniamy przemieszczenie moczowodów śródścienna lub zewnątrzścienna. Najczęściej występuje ektopia śródścienna, w której wejście moczowodu jest w okolicy szyjki pęcherza moczowego, jednak nie znajduje on ujścia w świetle pęcherza tylko kieruje się dystalnie w warstwie podśluzówkowej, uchodząc w dalszej części układu moczowo-płciowego. Sporadycznie obserwuje się zewnątrzścienna przemieszczenie moczowodów, omijające pęcherz moczowy i otwierające się w cewce moczowej, przedsionku pochwy, pochwie, macicy, prostaty (Lew, Kasprowicz 2012).

Ektopowe moczowody diagnozuje się u psów w młodym wieku ze względu na wrodzony charakter tego schorzenia. Zdecydowanie częściej problem ten dotyczy suk, rzadziej samców. Anomalia ta występuje u mieszańców i psów rasowych, jednakże do przemieszczenia moczowodów mają skłonność rasy takie, jak: Border Terrier, Owczarek Francuski, Entlebucher, Foksterrier, Golden Retriever, Griffon, Labrador Retriever, Pudiel Toy, Pudiel miniaturowy, Nowofundland, Husky Syberyjski, Skye Terrier, West Highland White Terrier, Angielski Cocker Spaniel, Pekinńczyk, Buldog Angielski (Bell i in. 2012).

Do gabinetów weterynaryjnych najczęściej zgłaszają się pacjenci z powodu ciągłego lub okresowego nietrzymania moczu (*urinary incontinence*, UI) w trakcie snu, pobudzenia, chodzenia lub zmiany pozycji. W dostępnej literaturze światowej przedstawiono częstotliwość występowania różnych anomalii powiązanych z przemieszczeniem moczowodów u psów: infekcje dróg moczowych (64–85%), agenezja nerki (4,8%), wodniak moczowodu (50%), wodonercze (50%), krótka cewka moczowa (20–40%), hipoplazja pęcherza moczowego (16%), pozostałości po przewodzie przyśródnerczowym – Müllera, przegroda pochwy/pochwa podwójna (93%). Zmiany te występują u ponad 90% przypadków ektopowych moczowodów (Elliott, Grauer, Westropp 2017).

Ważnym elementem w drodze do postawienia prawidłowej diagnozy jest przeprowadzenie dokładnego wywiadu, który zawiera informacje na temat wieku pacjenta, charakterystyki objawów klinicznych, dotychczasowego leczenia i jego efektów. Zebranie pełnego wywiadu umożliwi uwzględnienie w rozpoznaniu różnicowym chorób o podobnym obrazie klinicznym oraz pomoże w dobraniu właściwych badań dodatkowych i metod diagnostycznych. W badaniu klinicznym nie stwierdza się odchyżeń od parametrów fizjologicznych: tętno, oddechy i temperatura pozostają w normie. Jednak oglądając skórę okolicy sromu i napletka u niektórych pacjentów, obserwuje się stan zapalny, który jest wynikiem niekontrolowanego oddawania moczu.

Podczas diagnozowania ektopii moczowodów należy wziąć pod uwagę inne schorzenia związane z układem moczowo-płciowym, w przebiegu których występuje nietrzymanie moczu. UI może być pochodzenia neurogennego (przyczyna leży w układzie nerwowym) lub nieneurogennego jak w przypadku ektopii (przyczyna wynika z zaburzeń anatomicznych lub czynnościowych). Wiek pacjenta może nakierować leka-



rza na rodzaj zaburzenia, z powodu którym pies cierpi na inkontynencje. U pacjentów geriatrycznych bardziej prawdopodobną przyczyną będzie: nabyta dysfunkcja zwieracza cewki moczowej, zakażenie dróg moczowych, choroby nowotworowe w obrębie układu moczowo-płciowego, przerost prostaty lub starcze nietrzymanie moczu. Natomiast u młodych zwierząt należy wykluczyć: hipoplazję pęcherza moczowego lub cewki moczowej, wrodzoną dysfunkcję zwieracza cewki, anomalie budowy sromu i pochwy, przetrwały moczownik (Elliott i in. 2017).

Pierwszym badaniem dodatkowym jest badanie krwi oraz moczu, których wyniki nie zdiagnozują bezpośrednio ektopii ale sugerują niewydolność nerek lub infekcje dróg moczowych, które towarzyszą ponad połowie pacjentów z przemieszczeniem moczowodów. W następnej kolejności przeprowadza się diagnostykę obrazową, do której zaliczamy badanie endoskopowe (cystoskopia), radiografię z użyciem kontrastu, tomografię komputerową oraz rezonans magnetyczny (Kinda i in. 2020). Zalecane jest wykonanie cystoskopii w celu dokładnego zobrazowania przebiegu cewki moczowej, wnętrza pęcherza moczowego i miejsca ujścia moczowodów, badanie to wyklucza inne schorzenia, co umożliwi postawienie jednoznacznej diagnozy. Podczas tego badania możliwy jest natychmiastowy zabieg w postaci korekcji tej wady. Często wykorzystywanymi technikami obrazowania jest urografia i cystografia wstępująca lub pneumocystografia. Badanie urograficzne polega na zobrazowaniu układu moczowego z podaniem kontrastu jodowego dożylnie, a w przypadku cystografii wstępującej środek cieniujący jest podawany bezpośrednio do pęcherza moczowego. W zastosowaniu pneumocystografii wprowadzane jest powietrze do układu moczowo-płciowego. Korzystanie z tak bardzo zaawansowanych technik zapewnia trafną diagnostykę.

W przypadku ektopii moczowodów pacjent nie reaguje na terapię zachowawczą (to dotyczy najczęściej antybiotykoterapii). Jedyną skuteczną metodą leczenia jest korekcja chirurgiczna, a wybór techniki zależy od rodzaju przemieszczenia i stopnia nasilenia zmian wtórnych (Lew, Kaspróvicz 2012). W momencie zdiagnozowania śródściennnej ektopii moczowodów za pomocą lasera wykonuje się ablację ściany moczowodu i repozycje ujścia w miejscu trójkąta pęcherza moczowego, jednak metoda ta wymaga dużego doświadczenia. W przypadku przemieszczenia zewnątrzściennego wykonuje się przemieszczenie moczowodu do pęcherza moczowego. Najczęściej stosowaną metodą operacyjną jest neoureterostomia i ureteroneocystotomia, można przeprowadzić zabieg nefroureterektomii, która jest wykonywana zazwyczaj wtedy, kiedy nerka nie spełnia swojej funkcji fizjologicznej (Lorinson i in. 2009).

## Cel

Celem badania jest ocena przydatności wybranych technik obrazowania, takich jak: badanie RTG, TK, MRI i endoskopowe w diagnostyce ektopowych moczowodów u psów.

## Material i metody

Badania przeprowadzono w Pracowni Endoskopowej Katedry Diagnostyki Klinicznej na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie u sześciu psów w wieku od roku do 5 lat i 5 miesięcy z podejrzeniem ektopii moczowodów. Psy należały do następujących ras: dwa Siberian Husky, dwa Lablatory i dwa Nowofundlandy. Pracownia wyposażona była w zestaw endoskopowy, służący do wziernikowania układu moczowo – pęciowego z możliwością rejestracji obrazu. W trakcie wywiadu i badania klinicznego nie stwierdzono żadnych nieprawidłowości poza nietrzymaniem moczu. Pacjenci przed badaniem poddani byli dwunastogodzinnej głodówce, została wykonana premedykacja dexmedetomidyną w dawce 0,005 mg/kg oraz butorfanolem w dawce 0,1 mg/kg podanymi domięśniowo oraz indukcja znieczulenia propofolem w dawce 4 mg/kg dożylnie. Następnie pacjentom wprowadzono cewnik dobrany odpowiednio względem masy ciała celem opróżnienia pęcherza moczowego. W przypadku badań RTG z kontrastem lub MRI lub TK został podany środek jodowy dożylnie w dawce 400 mg/kg masy ciała w przypadku urografii wydzielniczej oraz 150 mg/kg masy ciała docewnikowo w przypadku cystografii wstępującej/wagino-urotrografii. Badanie rentgenowskie z użyciem kontrastu jodowego zastosowano w projekcjach bocznej oraz strzałkowej. Po przeprowadzeniu badań radiologicznych skierowano pacjentów na badanie endoskopowe. U samców wykonano badanie uretrocystoskopowe przy użyciu fiberouretrokopu URS – F5 Olympus o średnicy 3 mm i długości 60 cm. U suk wykorzystano endoskop sztywny Storz o średnicy 2,7 mm oraz długości 13 cm.

## Wyniki

Na podstawie przeprowadzonego wywiadu z właścicielami ustalono, że u wszystkich psów występuje problem nietrzymania moczu. U starszych dwóch pacjentek zaobserwowano okresowe UI w postaci kropelkowania, natomiast u reszty zwierząt właściciele skarżyli się na ciągłe popuszczanie moczu. W badaniu klinicznym nie stwierdzono żadnych nieprawidłowości poza podrażnieniem skóry okolicy sromu u czterech psów. W badaniach RTG z kontrastem u jednego z sześciu pacjentów stwierdzono ektopię moczowodów zewnątrzścienną jednostronną, u pozostałych badanie nie wykazało nieprawidłowości lub było niejednoznaczne. Wobec tego część pacjentów poddano też badaniu tomografem komputerowym lub rezonansem magnetycznym. Badania te jednak nie pozwalały jednoznacznie potwierdzić lub wykluczyć przyczyn objawów klinicznych. Każdy pacjent został skierowany na badanie endoskopowe w celu postawienia dokładnej diagnozy.

Za pomocą wyżej wymienionych badań u sześciu zwierząt stwierdzono ektopię moczowodów, u jednego psa zaobserwowano obustronne przemieszczenie – jedno śródściennie i drugie zewnątrzściennie dogrzebietowo w okolicy ujścia cewki do pęcherza moczowego. U pozostałych pacjentów moczowody były zlokalizowane śródściennie jedno- i obustronnie. W większości przypadków ujście moczowodów było zlokalizowane w obszarze cewki moczowej, tylko u jednej suki uchodziły one w okolicy szyjki pęcherza moczowego. W trakcie badania endoskopowego u psów stwierdzono pogrubiałą i przekrwioną cewkę moczową oraz pęcherz o cechach zapalenia z widoczną siatką naczyń krwionośnych, w przypadku jednego zwierzęcia pęcherz wykazywał cechy niedorozwoju – zmniejszenia. U jednej z pacjentek zaobserwowano zachyłek, który stanowił prawdopodobnie pozostałość po ektopii moczowodów, w tym wypadku wykonane zostało laserowe przecięcie tego zachyłka.

## Dyskusja

W większości przypadków właściciele pojawiają się w gabinetach, skarżąc się na problem z nietrzymaniem moczu u swojego psa. Jest to objaw niespecyficzny, dlatego jako pierwsze, zwłaszcza w młodym wieku, podejrzewane są zaburzenia behawioralne – inkontynencja na tle stresowym, nieodpowiednia socjalizacja psa lub niewyrobienie odpowiednich nawyków i brak nauki czystości. Mimo dorastania psa problem ten nie znika. Następną możliwością jest zakażenie dróg moczowo-płciowych, jednak wdrażana antybiotykoterapia okazuje się być nieskuteczna. W takim wypadku właściciele często decydują się na podjęcie kolejnych kroków i skorzystanie z bardziej zaawansowanych metod diagnostycznych. Najłatwiej dostępnym i najszybszym badaniem jest badanie ultrasonograficzne, wówczas w obrazie niewidoczne jest ujście moczowodów w trójkącie pęcherza moczowego, ale można zaobserwować powiększenie moczowodu, w wyniku utrudnionego odpływu moczu (Kosiet-Tworus 2019).

W badaniu Lorinson K., Lorinson D., Serwa i Bonecka stwierdzono u 64% pacjentów z ektopią moczowodów infekcje dróg moczowych. Nasze postępowanie wykazało zakażenie cewki moczowej i pęcherza moczowego u 67% badanych psów (Lorinson i in. 2009).

Istotnym elementem postępowania diagnostycznego w rozpoznawaniu ektopii moczowodów u psów jest dokładna analiza wyników diagnostyki obrazowej. Ze względu na wiele możliwości lokalizacji patologicznych ujść moczowodów i ich niewielkich rozmiarów bardzo ważne jest skrupulatne przeprowadzenie badań. W przeprowadzonych badaniach za pomocą cystostoskopii, cystografii wstępującej, urografii wydzielniczej, tomografu komputerowego oraz rezonansu magnetycznego dokładnie zlokalizowano miejsce ujść moczowodów, określono typ ektopii – śródścienna lub zewnątrzścienna, oraz czy jest ona jedno- czy obustronna.

Badanie cystoskopowe jest niezawodną i bezkonkurencyjną metodą obrazowania, która pozwala na ocenę zmian anatomopatologicznych w czasie rzeczywistym. Podczas diagnozowania ektopii endoskopia zapewnia precyzyjne określenie miejsca ujścia moczowodów, możliwe jest dokonanie pomiaru odległości od ujścia cewki moczowej, dodatkowo możemy ocenić stan błon śluzowych przedsionka pochwy, pochwy właściwej, cewki moczowej oraz pęcherza moczowego, a także stopień nasilenia ewentualnych zmian, takich jak: stan zapalny, przekrwienie oraz obrzęk. Nasze badanie wykazało, że jest obecny toczący się stan zapalny w obrębie dróg moczowych, co pomogło w dobraniu odpowiedniej farmakoterapii. Dzięki zastosowaniu tej metody obrazowania możliwe jest dokonanie pełnej diagnostyki różnicowej. W trakcie badania jest możliwa natychmiastowa korekcja zmian, bez konieczności powtórne go znieczulenia pacjenta i narażenia właściciela na dodatkowe koszty. Wykazano 100-procentową korelację między wynikiem badania endoskopowego a tym, co zostało stwierdzone w trakcie zabiegu chirurgicznego korekcji przemieszczonych moczowodów (Sutherland-Smith i in. 2004).

W celu uzyskania precyzyjnej diagnozy badanie RTG oraz TK przeprowadza się z zastosowaniem jodowych środków kontrastowych. Mogą być podawane dożylnie lub drogą wstępującą – w zależności od tego wyróżniamy urografię wydzielniczą i cystografię wstępującą. Bez użycia środków cieniujących tkanka tłuszczowa otaczająca moczowody oraz ich niewielkie rozmiary uniemożliwiają ich zobrazowanie (Holloway, McConnell 2016).

Wykonanie RTG ma duże znaczenie i często jest wskazaniem do dalszego postępowania diagnostycznego. W obrazie radiologicznym można zaobserwować zmiany towarzyszące ektopii, takie jak: powiększenie nerek, megaureter, zmniejszony pęcherz moczowy przy obustronnym przemieszczeniu. Przy przeprowadzeniu urografii wydzielniczej obrazujemy poszerzone moczowody oraz ich nieprawidłowe ujście w obrębie cewki moczowej, pochwy oraz odbytnicy. Natomiast cystografia wstępująca jest używana w celu potwierdzenia patologicznego ujścia moczowodu w obrębie cewki moczowej i powinno się ją stosować w celu uzupełnienia urografii wstępującej. Stosowaną dodatkowo odmianą jest pneumocystografia, w której stosujemy gaz jako środek cieniujący.

Tomografia komputerowa jest niezwykle pomocna w ocenie trudno dostępnych zmian, przeprowadza się ją w przypadkach, kiedy badanie radiologiczne z użyciem środka kontrastowego jest niejednoznaczne (Lew, Kasprowicz 2010). RTG i TK są to porównywalne badania, jednak klinicysta uzyska nieco więcej informacji z tomogramu komputerowego, który ukazuje bardziej szczegółowy obraz z mniejszą ilością artefaktów oraz umożliwia utworzenie rekonstrukcji 3D dolnych dróg moczowych (Elliott, Grauer, Westropp 2017). Ta technika nie jest powszechnie stosowana ze względu na wysoki koszt zakupu i utrzymania, ponadto uzyskanie obrazów o odpowiednich parametrach i ich interpretacja wymaga specjalistycznej wiedzy i umiejętności.

W medycynie ludzkiej według badań Hansona, Gatti, Gittes i Murphy w celu zdiagnozowania ektopii moczowodów stosuje się badanie USG, RTG, TK i badanie endoskopowe. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że najlepszym badaniem jest

badanie tomokomputerowe z użyciem kontrastu (Hanson i in. 2007). Natomiast w medycynie weterynaryjnej, tak jak wykazały nasze badania, najbardziej swoistą i czułą metodą oraz najłatwiej dostępną jest cystoskopia.

## Podsumowanie

Najlepszą z metod obrazowania ektopowych moczowodów okazało się badanie endoskopowe, gdyż nie tylko pozwala na dokładne zlokalizowanie ujścia moczowodów, ale również umożliwia przeprowadzenie natychmiastowej korekcji podczas jednej narkozy. Przeprowadzone badania wykazały, że pozostałe metody: cystografia, tomografia komputerowa oraz rezonans magnetyczny są mniej swoistymi i mniej czułymi technikami obrazowania przemieszczonych moczowodów w porównaniu do cystoskopii, która umożliwia bezpośrednią wizualizację dróg wyprowadzających mocz i ocenę zmian w ich przebiegu.

## Bibliografia

- Atlantic Veterinary Internal Medicine & Oncology, [https://avim.us/ectopic-ureters-dogs/?fbclid=IwAR2TZ3k2j61j5Yu8v6V6B-p7FVXAxRamievLFHakVgVjIv9XI4nR\\_NeLSka0](https://avim.us/ectopic-ureters-dogs/?fbclid=IwAR2TZ3k2j61j5Yu8v6V6B-p7FVXAxRamievLFHakVgVjIv9XI4nR_NeLSka0), (dostęp 10 kwietnia 2021)
- DVM 360, <https://www.dvm360.com/view/correcting-ectopic-ureters-juvenile-dogs> (dostęp 8 kwietnia 2021)
- Elliot J., Grauer G. F., Westropp J.L. 2017. BSAVA Manual of Canine and Feline Nephrology and Urology. British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, s. 28–30, 84, 116, 122–129, 173–176, 330, 338–340
- Holloway A., McConnell J.F. 2013. BSAVA Manual of Canine and Feline Radiography and Radiology A Foundation Manual, British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, s. 186, 221
- Kinda W., Szyłkin W., Durajski A. 2020. Ektopia moczowodów – rzadka przyczyna nietrzymania moczu Weterynaria w Praktyce, 7–8/2017
- Kosiec – Tworus A. 2019. Diagnostyka ultrasonograficzna chorób pęcherza moczowego Psów i kotów, MW, 02/2019
- König E. H., Liebich G. H. 2014. Anatomia zwierząt domowych. Galaktyka, Łódź, s. 453–454
- Lew S., Kasprzowicz A. 2010. Przemieszczenie moczowodów u psów. Weterynaria w Praktyce, 04/2010
- Lew S., Kasprzowicz A. 2012. Wady rozwojowe dolnych dróg moczowych u psów i kotów, MW, 02/2012
- Lhermette P., Sobel D. 2013. BSAVA Manual of Canine and Feline Endoscopy and Endosurgery. British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, s. 142–147, 151–152

- Lorinson K., Lorinson D., Serwa D., Bonecka J. 2009. Wrodzone przemieszczenie moczowodów u młodych psów, *Medycyna Wet.* 65(11)
- Hanson G.R., Gatti J.M., Gittes G.K., Murphy J.P. 2007. Diagnosis of ectopic ureter as a cause of urinary incontinence. *PubMed*, 18947700
- Sikorska – Kopyłowicz A., Jonkisz P., Kurosad A., Dymnicka E. 2017. Nietrzymanie moczu u psów i kotów – najczęstsze błędy w rozpoznawaniu i leczeniu, *MW*, 07–08/2017
- Sutherland – Smith J., Jerram R.M., Walker A.M., Warman C.G.A. 2004. Ectopic ureters and ureteroceles in dogs: presentation cause and diagnosis, *Compendium*, 26/4.

## Abstract

### TYTUŁ

Ureteral ectopia is a congenital defect in which ureters terminate in an abnormal location (other than trigone of the bladder), most commonly the urethra, but occasionally the vagina or rectum. This malformation results in urinary incontinence. The aim of this work was to compare the usefulness of different imaging techniques in diagnosing ectopic ureters. In this study dogs were examined with endoscopy, RTG, TC and MRI. Before each examination all of the six dogs were clinically examined and consulted with an anaesthesiologist. For bitches cystoscopic examination was used Storz 2.7 mm and 130 mm rigid endoscopy and for male endoscopy URS – F5 Olympus 3 mm and 600 mm. In radiographs and tomographs it is necessary to visualize the ureters using an iodine – containing contrast media. There are two options to take the X-Ray scan: an intravenous urogram and a retrograde urethrogram. These cases proves that cystoscopy is the most sensitive and reliable method.

**Keywords:** Ectopic ureters, endoscopy, urinary incontinence

**Słowa klucz:** Ektopia, moczowody, przemieszczenie, endoskopia

**Małgorzata Gugolek\***

**lek. wet. Ewa Kaczmar\*\***

\* Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Medycyny  
Weterynaryjnej

Studenckie Koło Naukowe Technik Obrazowania w Diagnostyce Chorób Małych  
Zwierząt

\*\* Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Medycyny  
Weterynaryjnej, Katedra Diagnostyki Klinicznej

Opiekun koła: prof. dr hab. Andrzej Rychlik

## **OCENA PRZYDATNOŚCI WYBRANYCH TECHNIK OBRAZOWANIA W DIAGNOSTYCE CHORÓB ZĘBÓW U SZYNSZYLI**

### **Wstęp**

Szynszyle (*Chinchilla lanigera*) to niewielkie gryzonie pochodzące z Ameryki Południowej. Zostały udomowione ze względu na swoją wybitnie miękką i gęstą okrywą włosową – na 1 mm<sup>2</sup> ich skóry znajduje się nawet do trzystu włosów. W dodatku zwierzęta charakteryzują się interesującym ubarwieniem: w standardowej, pierwotnej odmianie mają ciemnoszare grzbiety, a brzuch jasny, prawie biały. Te cechy spowodowały, że zaczęto hodować szynszyle na fermach – pionierem ich hodowli był Amerykanin Mathias F. Chapman, który w 1923 roku przywiózł pierwsze zwierzęta tego gatunku do USA. W środowisku naturalnym pozostała ich niewielka liczba, nieliczne populacje można spotkać na terenach Andów, gdzie są objęte ochroną (Barabasz 2001, Valladares i in. 2012). Większość szynszyli żyje obecnie w środowisku stworzonym przez człowieka. Najwięcej jest utrzymywanych na fermach futrzarskich. Wiele osobników to również domowi ulubieńcy. Szynszyle cieszą się ostatnio coraz większą popularnością jako zwierzęta towarzyszące, a co za tym idzie coraz częściej stają się pacjentami w gabinetach weterynaryjnych i lecznicach.

Szynszylki dotyczą różne problemy zdrowotne. Do tych, które dotyczą je jako jedne z najczęstszych, należą patologie uzębienia. Według Sulik i in. (2004) schorzenia zębów

mogą dotyczyć ok. 20% zwierząt, natomiast zdaniem Crossleya (2001) oraz Mansa i Jekla (2016) nawet aż do 35%. Szynszyle mają dwadzieścia zębów. Ich wzór zębowy jest następujący: 2(I 1/1, C 0/0, P 1/1, M 3/3) (Crossley 1995). Zęby przedtrzonowe i trzonowe zwykło się określać mianem „zębów policzkowych”. Charakteryzują się one tym, że zachowują zdolność do wzrostu przez całe życie zwierzęcia. Szynszyla musi więc cały czas je ścierać, by zachować ich odpowiednią długość. Niestety jest wiele czynników, które sprawiają, że dochodzi do sytuacji, w których ścieranie jest zaburzone. Konsekwencją tego jest powstawanie przerostów, które mają bardzo szkodliwy wpływ na zwierzę (Brenner i in. 2005).

Jedną z podstawowych przyczyn problemów z uzębieniem może być nieprawidłowe żywienie zwierząt. Dieta zbyt obfita w węglowodany proste i białko, a zbyt skąpa we włókno surowe ma negatywny wpływ na ścieranie zębów szynszyli (Derbaudrenghien i in. 2010). Wśród najważniejszych cech fizycznych granulatów dla tych zwierząt wyróżnia się twardość – szynszyle preferują twardsze granule, co również ma pozytywny wpływ na stan uzębienia (Barabasz 2001). Istotne jest też zapewnienie szynszylom odpowiedniej ilości witamin oraz minerałów. Prawidłowa suplementacja diety ma pozytywny wpływ na uzębienie tych zwierząt (Wolf i in. 2003). Trzeba zwrócić uwagę zwłaszcza na samice w ciąży oraz te karmiące – może bowiem u nich dojść do zaburzeń gospodarki mineralnej, szczególnie w przypadkach, gdy samice są zbyt młode i wciąż rosną, mają dużo potomstwa lub są zbyt intensywnie użytkowane rozplodowo (Sulik i in. 2004). Braki związków wapnia i fosforu w paszy, ewentualnie nieprawidłowy ich stosunek, mogą bardzo szybko doprowadzić do niekorzystnych zmian w obrębie zębów oraz kości czaszki. Podobnie jest w przypadku niewystarczającej ilości witamin, szczególnie A i D (Sulik i in. 2007). Ignorowanie tych istotnych czynników przez osobę odpowiedzialną za żywienie może sprawić, że u szynszyli pojawią się problemy z zębami. Istotne jest też zapewnienie szynszylom przedmiotów, które będą mogły swobodnie obgryzać, a które im nie zaszkodzą – na przykład kawałków drewna z drzew nietoksycznych dla tych zwierząt. Ważne jest, by zwierzęta miały stały dostęp do siana – wysoka zawartość włókna surowego nie tylko jest potrzebna do prawidłowego działania układu pokarmowego, ale również do ścierania zębów (Derbaudrenghien i in. 2010).

Kolejnym istotnym powodem patologii zębowych u szynszyli są przyczyny genetyczne. Nie zidentyfikowano do tej pory jednoznacznych pierwotnych przyczyn tych schorzeń. Zdarza się, że szynszyle dziedziczą cechy takie, jak: krótsza lub krzywa żuchwa, co wraz z wiekiem zwierzęcia powoduje, że występuje coraz więcej problemów z prawidłowym ścieraniem zębów. Są również teorie, że szynszyle mogą dziedziczyć skłonność do przerostów zębów lub też do demineralizacji kości, czego wtórnym skutkiem są problemy z uzębieniem. Niezwykle ważne jest, by unikać rozmnażania zwierząt, które wykazują skłonności do takich schorzeń i eliminować je z rozrodu (Brenner i in. 2005). Trzeba także pamiętać, że cała populacja hodowlanych szynszyli wywodzi się od jedenastu osobników wywiezionych z Chile przez Chapmana (Barabasz 2001). Ograniczona pula genów może powodować, że choroby zębów tak powszechnie występują (Kraft 1994).



Powodem schorzeń zębów u tego gatunku mogą być również urazy mechaniczne oraz choroby niezwiązane z uzębieniem. Złamania w obrębie kości czaszki, ułamanie zębów lub przemieszczenie zawiązków zębowych powoduje, że w konsekwencji dochodzi do przerostów lub nieprawidłowości przy ich ścieraniu. Często jest to spowodowane tym, że szynszyle gryzą nieodpowiednie przedmioty, na przykład pręty klatki, co jest spowodowane stresem lub nudą (Derbaudrenghien i in. 2010). Choroby, które powodują, że zwierzę przestaje jeść, mogą szybko doprowadzić do poważnych problemów z uzębieniem (Sulik i in. 2004). Obserwuje się też większą skłonność do zapadania na choroby zębów u zwierząt starszych (Oglesbee 2011). Niestety zdarza się również, że problemy z uzębieniem mają bardzo młode zwierzęta – nawet takie, które skończyły ledwo sześć miesięcy (Stroke i in. 1996).

Niezależnie od czynnika, wszystkie choroby zębów szynszyli dają podobne objawy. Zwierzęta przestają jeść, preferują miękkie pokarmy, robią się apatyczne, niechętnie się poruszają, można u nich zaobserwować tak zwaną „śliniaczkę” (ang. *slobber*) – sierść zwierząt jest posklejana i mokra, najpierw w okolicach pyska i szyi, potem także na przednich łapach i klatce piersiowej. W zaawansowanych stadiach choroby może dojść do łysienia podrażnionych obszarów skóry. Można czasem również zaobserwować łzawienie oczu, gdy występuje przerost zębów policzkowych w głąb kości czaszki. Siekacze zmieniają kolor z charakterystycznego pomarańczowo-żółtego na biały. Występuje bolesność i ewentualne obrzęki w rejonach jamy ustnej. Mogą pojawić się także ropnie, owrzodzenia i stany zapalne okostnej (Sulik i in. 2004). Możliwe jest też występowanie skaleczeń błony śluzowej, które spowodowane są przez ostre krawędzie zębów powstałe w wyniku nieprawidłowego ścierania ich powierzchni. Zwierzę zaczyna tracić masę ciała, zmniejsza się ilość wydalanego przez nie kału, przestaje dbać o stan swojej okrywy włosowej. W sytuacjach, gdy interwencja lekarska się opóźni, u szynszyli może dojść do hipoglikemii, śpiączki, a nawet śmierci (Sirois 2016).

Podstawową techniką diagnostyczną w przypadku schorzeń zębów jest badanie kliniczne zwierzęcia oraz badanie jamy ustnej. Badanie kliniczne umożliwia stwierdzenie wcześniej wymienionych objawów ogólnych sugerujących schorzenia zębów. Pobieżne badanie jamy ustnej można wykonać bez większego problemu, umiejętnie przytrzymując zwierzę i rozchylając jego wargi. Do kompleksowego badania zalecane jest jednak poddanie zwierzęcia sedacji i zastosowanie odpowiednich narzędzi, jak na przykład rozwieracze policzkowe, szpatuły językowe, sonda dentystyczna czy też otoskop (Osofsky, Verstraete 2006). Ewentualnie można zastosować również endoskopię jamy ustnej, która pomoże ocenić przerost zębów policzkowych, stan ich krawędzi, a także znaleźć ewentualne ropnie czy też owrzodzenia (Derbaudrenghien i in. 2010). Takie badanie pozwala niestety zdiagnozować tylko te schorzenia, w przebiegu których doszło do przerostu zębów w głąb jamy ustnej.

Badania wykazały, że nawet 94 % zwierząt, u których wykryto zewnętrzne objawy schorzeń uzębienia, może mieć problem z przerastaniem zębów w głąb kości czaszki (Crossley 1995). Jednak by stwierdzić takie patologie, konieczne jest zastosowanie odpowiednich technik diagnostyki obrazowej.

Techniki diagnostyki obrazowej bardzo rozwinęły się w ciągu ostatnich dwudziestu lat. Zwiększyła się ich dostępność, szczególnie w obszarach medycyny weterynaryjnej. Wiele technik jest w powszechnym użyciu dopiero od kilku lat (Krautwald-Junghanns i in. 2011). Do najczęściej używanych obecnie technik diagnostyki obrazowej zalicza się: zdjęcia aparatem rentgenowskim (RTG), tomografię komputerową (TK), ultrasonografię, endoskopię oraz badania rezonansem magnetycznym (Krautwald-Junghanns i in. 2011). W dostępnej literaturze weterynaryjnej jest jednak niewiele prac, który określałyby przydatność technik obrazowania pośredniego w diagnostyce schorzeń zębów u tego gatunku zwierząt.

## Cel pracy

Celem pracy była ocena przydatności metod diagnostyki obrazowej w badaniu chorób zębów u szynszyli. Porównano dwie metody – zdjęcia rentgenowskie oraz tomografię komputerową – by określić, która z nich będzie bardziej użyteczna w diagnostyce schorzeń zębów u tych zwierząt.

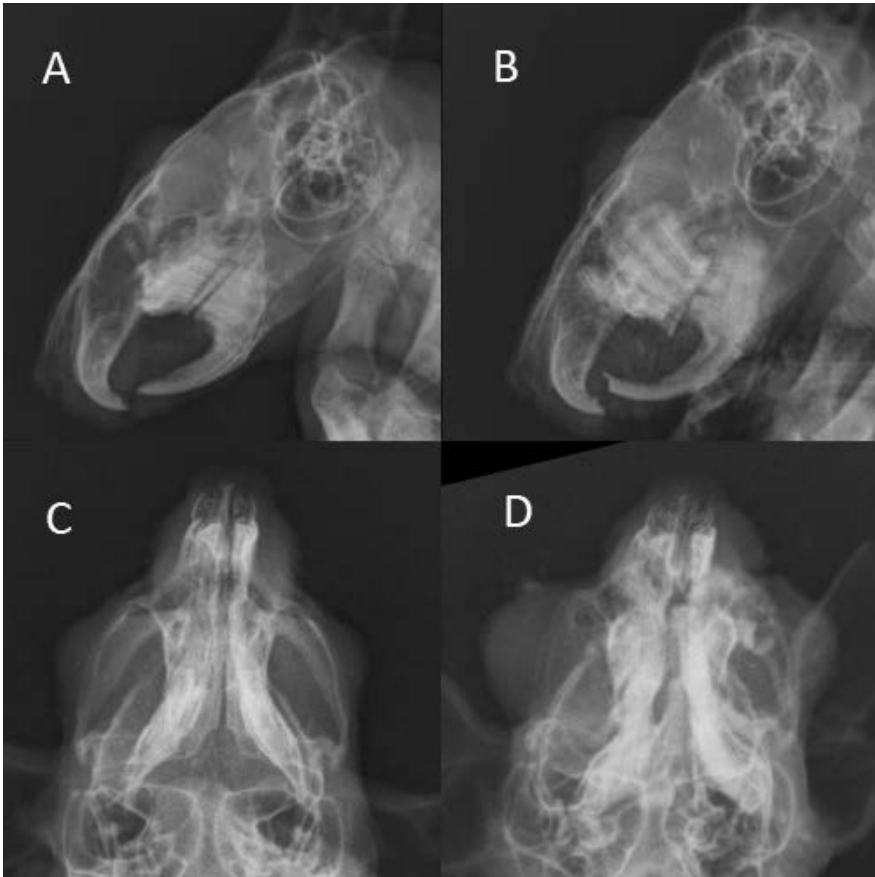
## Materiały i metody

W badaniach uczestniczyło pięć zwierząt, samców szynszyli, w wieku od dziewięciu do dwunastu miesięcy, o średniej masie ciała 500 g, odmiany standard, pochodzących z fermy z okolic Białostoku. Cztery z nich miały zewnętrzne objawy zaawansowanych chorób zębów, piąty nie wykazywał niepokojących symptomów. Zwierzę to było traktowane jako próba kontrolna. Szynszyle zostały poddane badaniom przy użyciu aparatu do zdjęć rentgenowskich oraz tomografu komputerowego w Poliklinice Weterynaryjnej przy Wydziale Medycyny Weterynaryjnej na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie.

Zdjęcia rentgenowskie głów zwierząt wykonano przy użyciu aparatu COMET AG CH-3097, w dwóch projekcjach: bocznej oraz strzałkowej. Zwierzęta były przytrzymywane przez studenta, przy zachowaniu zasad BHP (odpowiedni ubiór ochronny). Badania tomografem komputerowym wykonano przy użyciu aparatu Siemens Somatom CT Scanner znajdującego się na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej UWM. Przed badaniami zwierzęta zostały poddane sedacji z użyciem następujących substancji: ketaminy w ilości 0,05 ml i deksmedetomidyny w ilości 0,15 ml na zwierzę. Umieszczono je w gantrze tomografu komputerowego i wykonano badanie w standardowym protokole „Drobne struktury”.

## Wyniki

Na podstawie wykonanych zdjęć rentgenowskich (fot. 1), potwierdzono stany chorobowe u szynszyli z zewnętrznymi objawami zaawansowanych schorzeń zębów. U zdrowego zwierzęcia zdjęcia rentgenowskie wykazały, że nie ma ono żadnych zmian w obrębie czaszki – w obu projekcjach, bocznej i strzałkowej, obraz był prawidłowy (fot. 1A, fot. 1C).



**Fotografia 1. Zdjęcia rentgenowskie uzębienia szynszyli.**

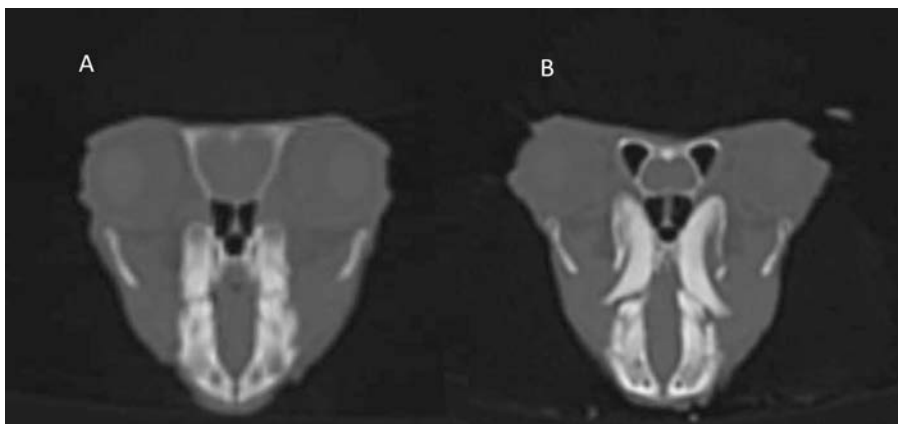
- A – projekcja boczna, osobnik zdrowy (prawidłowe powierzchnie zębów policzkowych wskazano strzałką). B – projekcja boczna, osobnik chory (nieprawidłowe powierzchnie zębów policzkowych wskazano strzałką z gwiazdką, oczodół, w którego przestrzeni znajdują się przerośnięte zęby oznaczono gwiazdką). C – projekcja strzałkowa, osobnik zdrowy. D – projekcja strzałkowa, osobnik chory (gałkę oczną wypchniętą przez przerośnięte zęby policzkowe oznaczono gwiazdką)

Źródło: opracowanie własne.

Na zdjęciach rentgenowskich chorych szynszyli w projekcji bocznej stwierdzono znaczny przerost zębów policzkowych, czyli przedtrzonowych i trzonowych, zarówno do jamy ustnej, jak i w głąb kości czaszki. Zęby sięgały nawet do przestrzeni oczodołów. Widoczny był także przerost siekaczy oraz zmiany na powierzchniach zębów spowodowane nieprawidłowym ich ścieraniem (fot. 1B). W projekcji strzałkowej zaobserwowano, że w wyniku przerostu zmienił się obrys czaszki, co sugerowało, że doszło do zniekształcenia jej kości lub nawet przebicia zębów na zewnątrz. Ponadto widoczne było wyraźne przesunięcie gałki ocznej względem oczodołu – w wyniku przerostu zębów doszło do jej częściowego wysadzenia (fot. 1D). Zaobserwować można było także ubytki cienia kości czaszki oraz zębów, co sugerować mogło ich postępującą demineralizację (fot. 1B).

Na fotografii 2 przedstawiono zdjęcia wykonane tomografem komputerowym. U zdrowej szynszyli badanie potwierdziło, że nie cierpiała ona na żadne schorzenia związane z uzębieniem (fot. 2A).

U zwierząt chorych w badaniach z użyciem tomografu komputerowego stwierdzono znaczny przerost zębów policzkowych do jamy ustnej i w głąb kości czaszki, a także znacznie zmienione powierzchnie tnące tych zębów, co powodowało, że zęby zachodziły na siebie w nieprawidłowy sposób. Wyraźnie widoczne było, że zęby wchodziły na obszar oczodołów, a wręcz w niektórych przypadkach wysadzają gałki oczne (fot. 2B).



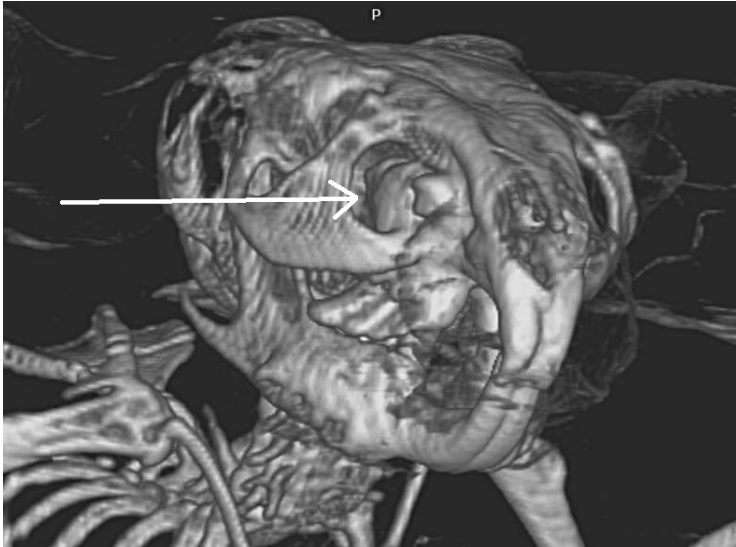
**Fotografia 2. Obraz badania tomografem komputerowym uzębienia szynszyli.**

A – osobnik zdrowy (strzałką oznaczono prawidłowe powierzchnie tnące zębów), B – osobnik chory (gwiazdką oznaczono oczodół, w którego przestrzeni znajduje się przerośnięty ząb, strzałką z gwiazdką oznaczono przerośnięte powierzchnie tnące zębów)

Źródło: opracowanie własne.

Po wygenerowaniu modelu 3D w programie RadiAnt zaobserwować można było również zniekształcone przez przerośnięte zęby kości szczęki – zmiana została wskazana za pomocą strzałki (fot. 3). Wykorzystując opcję „Skalpel” i usuwając przy jego

użyciu fragmenty komputerowo wygenerowanej czaszki, otrzymano obraz pokazujący, jak głęboko zęby wchodziły w tkankę kostną. U jednego z osobników stwierdzono także, że miał on nieprawidłowo ułożoną żuchwę względem szczęki, co powodowało dodatkowe skrzywienie zgryzu.



**Fotografia 3. Komputerowo wygenerowany model 3D czaszki szynszyli na podstawie badania tomografem. (zniekształcone przez przerośnięte zęby kości czaszki zostały wskazane za pomocą strzałki, przerośnięte zęby policzkowe zostały wskazane za pomocą strzałki z gwiazdką)**

Źródło: opracowanie własne.

## Dyskusja

Autorzy zajmujący się problemami związanymi z chorobami zębów u szynszyli podkreślają, jak istotne jest wybranie odpowiedniej techniki obrazowania, by postawić właściwą diagnozę. Większość z nich preferuje zdjęcia rentgenowskie. Derbaudrenghien i in. (2010) w pracy na temat patologii uzębienia u szynszyli uważają radiologię za główną metodę diagnostyczną, choć stwierdzają, że aby miała ona najwyższą skuteczność, należy używać aparatów wyposażonych w lampy z odpowiednio mniejszymi ogniskami. Zdarza się, że drobne patologie czy też te dopiero rozwijające się nie są widoczne na zdjęciach wykonywanych za pomocą aparatu z lampą o większym ognisku.

W badaniu radiologicznym ważne jest, by zawsze wykonać zdjęcia w przynajmniej dwóch projekcjach. Absolutnym minimum jest wykonanie ich w projekcji bocznej

i strzałkowej. Za szczególnie przydatne uznaje się zdjęcia wykonane w projekcji bocznej, ponieważ widoczne są przerosty zarówno zębów policzkowych, jak i siekaczy (Derbaudrenghien i in. 2010). Przeprowadzone na potrzeby pracy badania również wykazały ich szczególną przydatność – zdjęcia w tej projekcji dały najwięcej informacji na temat schorzeń zębów u badanych zwierząt.

Można jednak spotkać się z opinią, że by uzyskać jak najprecyzyjniejsze wyniki, należy wykonać zdjęcia rentgenowskie w aż pięciu projekcjach: strzałkowej, bocznej prawej, bocznej lewej, a także skośnej prawej oraz skośnej lewej (Brenner i in. 2005). Możliwe jest także wykonanie zdjęcia rentgenowskiego wewnątrzustnie. Tego typu projekcje wykonuje się rzadko ze względu na niewielkie rozmiary zwierzęcia (Derbaudrenghien i in. 2010). Podobnie jest ze zdjęciami zgryzowymi, które choć wydają się przydatne, są trudne do uzyskania i do interpretacji (Ososfsky, Verstraete 2006).

Boehmer i Crossley (2009) również przykładają szczególną wagę do zdjęć w projekcji bocznej i strzałkowej. Zalecają też stosowanie w diagnostyce szeregu linii pomocniczych, które po naniesieniu na zdjęcie ułatwiają postawienie diagnozy i odróżnienie prawidłowego uzębienia od patologicznego.

Mimo że radiologia jest uznawana za główną metodę diagnostyczną przy chorobach zębów szynszyli, powszechnie uważa się, że tomografia komputerowa jest lepszym badaniem. W opinii Derbaudrenghiena i in. (2010) ma ona bardzo istotną zaletę, której nie można pominąć – pozwala wykryć patologie dużo wcześniej niż badanie rentgenowskie. Daje to możliwość wyeliminowania zwierząt ze skłonnościami do chorób zębów z rozmnażania. Kolejną ważną cechą tego badania, zdaniem tych autorów, jest fakt, że z jego pomocą dużo łatwiej jest wykryć zmiany w kościach oraz w tkankach miękkich. Za szczególnie użyteczne uważają też wygenerowane komputerowo modele 3D, które dają dodatkowe informacje, pozwalające na dobór leczenia oraz są przydatne w edukowaniu właścicieli zwierząt. Podobną opinię wyrażają też w swojej pracy Capello i Cauduro (2008). Modele wygenerowane za pomocą programu RadiAnt w trakcie badań na potrzeby pracy umożliwiły podgląd na zmienioną strukturę kości, co pozwoliło na dokładniejsze zdiagnozowanie patologicznych zmian.

Podobnie oceniają badania tomografem komputerowym w swojej pracy Brenner i in. (2005). Podkreślają oni, jak istotne jest wykrywanie chorób zębów u szynszyli we wczesnych stadiach oraz fakt, że w badaniu tomografem komputerowym dużo lepiej widoczne są miękkie tkanki, a także zatoki oraz stawy żuchwy.

Badanie tomografem komputerowym wciąż jednak relatywnie dużo kosztuje, szczególnie w porównaniu do kosztów zdjęć rentgenowskich. Ponadto niewiele gabinetów weterynaryjnych posiada tomografy komputerowe. To sprawia, że ustępują one pola znacznie powszechniej występującym aparatom rentgenowskim, mimo że mają wyższą skuteczność (Ososfsky, Verstraete 2006).

Dobra diagnoza daje możliwości skutecznego leczenia. Niestety schorzenia zębów u szynszyli potrafią być śmiertelne dla tych zwierząt, jeżeli nie zaczniesz się działać odpowiednio wcześniej. Dłuższy czas utajone mogą pojawić się niespodziewanie i w krót-

kim czasie sprawić, że zwierzę znacznie podupadnie na zdrowiu, dlatego tak ważne jest, by przy pierwszych podejrzeniach lub też objawach sugerujących problemy z uzębieniem natychmiast wykonać badania diagnostyczne. Ważne są również okresowe badania kontrolne, które powinny się stawać coraz częstsze wraz z wiekiem zwierzęcia.

## Wnioski

Analiza przeprowadzonych badań udowodniła, że obie metody, radiologia i tomografia komputerowa, mają porównywalną przydatność. Jednakże z racji większej dostępności oraz niższego kosztu wykonania badanie radiologiczne jest bardziej powszechne. Wykazuje również zadowalającą czułość diagnostyczną. Zdjęcia rentgenowskie pokazują wszystkie najbardziej istotne elementy, które mogą pomóc w postawieniu diagnozy i zdecydowaniu o dalszym leczeniu zwierząt. Jeżeli jednak istnieje taka możliwość, powinno się wykonywać także badanie tomografem komputerowym. Oferuje ono znacznie większe możliwości diagnostyczne. Za szczególnie użyteczny należy uznać fakt, że tomografia komputerowa pokazuje już pierwsze patologiczne zmiany uzębienia, nim będą one dawały ewidentne objawy. Ważna jest również możliwość wygenerowania modelu 3D czaszki zwierzęcia, co daje jasny obraz stanu pacjenta i pomaga w podjęciu odpowiedniej terapii. Tomografia komputerowa pozwala także na zbadanie, jak przerośnięte zęby wpływają na otaczające je tkanki miękkie. Warto zgłębić możliwości obu technik diagnostycznych i samemu zdecydować, co w danym przypadku będzie bardziej użyteczne.

## Bibliografia

- Barabasz B. 2001. Szynszyle. Hodowla i użytkowanie. PWRiL. Warszawa.
- Boehmer E., Crossley D. Objective interpretation of dental disease in rabbits, guinea pigs and chinchillas. Use of anatomical reference lines. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere*, 37 (4): 250–260.
- Brenner S.Z.G., Hawkins M.G., Tell L.A., Hornof W.J., Plopper Ch.G., Verstraete F.J.M. 2005. Clinical Anatomy, Radiography and Computed Tomography of the Chinchilla Skull. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 27 (12): 933–944.
- Capello V., Cauduro A. 2008. Clinical Technique: Application of Computed Tomography for Diagnosis of Dental Disease in the Rabbit, Guinea Pig, and Chinchilla. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 17 (2): 93–101.
- Crossley D.A. 1995. Clinical aspects of rodent dental anatomy. *Journal of Veterinary Dentistry*, 12 (4): 131–135.
- Crossley D.A. 2001. Dental disease in chinchillas in the UK. *Journal of Small Animal Practice*, 42: 12–19.

- Derbaudrenghien V., Van Caelenberg A., Hermans K., Gielen I., Martel A. 2010. Dental pathology in chinchillas. *Diergeneeskundig Tijdschrift.*, 79: 345–358.
- Kraft H. 1994. Diseases of chinchillas. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- Krautwald-Junghanns M.E., Pees M., Reese S., Tully T. 2011. Diagnostic Imaging of Exotic Pets. Birds, Small Mammals, Reptiles. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Hanower.
- Mans Ch., Jekl V. 2016 Anatomy and Disorders of the Oral Cavity of Chinchillas and Degus. *Veterinary Clinics of North America Exotic Animal Practice*, 19: 843–869.
- Oglesbee B.L. 2011. Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult: Small Mammal, Second Edition. John Wiley & Sons, Columbus.
- Osofsky A., Verstraete F.J.M. 2006. Dentistry in Pet Rodents. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 28 (1): 61–74.
- Sirois M. 2016. Laboratory Animal and Exotic Pet Medicine. Principles and Procedures. Elsevier. Missouri.
- Stroke J.G., Davis L.A., LaRegina M., Boschert K.R. 1996. Handbook of Rodent and Rabbit Medicine. 1st Ed., Elsevier Science Ltd, Oxford.
- Sulik M., Seremak B., Muszczyński Z., Wachowiak M. 2004. Przypadki chorób zębów u szynszyli hodowlanych (*Chinchilla laniger* M.). *Zeszyty Naukowe Przeglądu Hodowlanego*, 72 (6): 141–147.
- Sulik M., Sobolewska E., Seremak B., Ey-Chmielewska H., Fraczak B. 2007. Radiological evaluation of chinchilla mastication organs. *Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy*, 51: 121–124.
- Valladares P., Espinosa M., Torres M., Diaz E., Zeller N., de La Riva J., Grimberg M., Spotorno A. 2012. Nuevo registro de *Chinchilla chinchilla* (Rodentia, Chinchillidae) para la región de Atacama, Chile. Implicancias para su estado de conservación. *Mastozool. Neotrop.* 19: 173–178.
- Wolf P., Schröder A., Wenger A., Kamphues J. 2003. The nutrition of the chinchilla as a companion animal – basic data, influences and dependences. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 87(3–4): 129–133.

## Abstract

### EVALUATION OF USEFULNESS OF SELECTED TECHNICS OF IMAGING IN DIAGNOSTIC OF DENTAL DISEASES IN CHINCHILLAS

Dental diseases in chinchillas are one of the most common problems of those animals. Many of them suffers from elongation of incisors and both coronal and root cheek teeth overgrowth. Elongation of teeth makes difficult for animals to eat, what causes anorexia and even can lead to death. To diagnose those diseases in a right way it's necessary to use technics of imaging. The aim of this work was to compare the usefulness of two imaging techniques: radiological imaging and computed tomography. To achieve that, five chinchillas were subjected to those technics – four of them ill, one healthy. Both radiography and computed tomography were proven very useful in diagnostic of dental diseases. It was decided that radiography is more important technic of imaging because it's more available, cheaper and sufficient in most of the cases. However, CT scan can give many more important information and should be done if there is possibility.

**Słowa kluczowe:** *Chinchilla lanigera*, choroby zębów, RTG, tomografia komputerowa

**Keywords:** *Chinchilla lanigera*, dental disease, RTG, CT scan



**Jakub Jasiak**

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Koło Naukowe „Żywnienie Zwierząt”

Opiekun koła: dr hab. Kazimierz Obrębski, prof. UWM

## **WPŁYW DZIAŁANIA ZEARALENONU NA AKTYWNOŚĆ FOSFATAZY ALKALICZNEJ (ALP) W JELICIE BIODROWYM ŚWIŃ**

### **Wstęp**

Zearalenon (ZEN) jest jedną z najczęściej występujących na świecie mikotoksyn, odgrywającą ważną rolę w gospodarce żywnościowej. Poprzez swoje powinowactwo do receptorów estrogenowych (ER) w organizmie żywym indukuje on efekt estrogeny. Najczęstszym wektorem przenoszącym ZEN są zboża (Pleadin i in. 2012; Streit i in. 2012; Vidal i in. 2013). Pod względem chemicznym ZEN jest  $\beta$ -rezorcyno-laktonem, który w swojej cząsteczce obok pierścienia rezorcynowego zawiera makrocykliczny pierścień laktonowy o układzie przestrzennym zbliżonym do hormonów sterydowych. Duży pierścień laktonowy ZEN jest bardzo trwały, co sprawia, że cząsteczka nie ulega hydrolizie ani redukcji. ZEN cechuje zdolność do łączenia się z receptorami estrogenowymi i wywoływania efektu estrogennego.

Wśród zwierząt gospodarskich świnię są uważane za najbardziej wrażliwe na ZEN. Szczególnie dotyczy to samic prosiąt przed okresem dojrzewania, u których mikotoksyna wywołuje objawy obrzęku macicy, torbiele jajnikowe czy szybsze dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych (Obremski i in. 2005; Fink-Gremmels, Malekinejad 2007; Obremski i in. 2008). W zależności od wysokości przyjętej dawki i czasu narażenia na ZEN u niedojrzałych płciowo świń obserwuje się obrzęk i pogrubienie ściany pochwy i sromu, wzrost masy macicy, atrofię jajników oraz nasiloną proliferacją nabłonka błony śluzowej macicy (Obremski i in. 2003; Kanora, Maes 2009; Zielonka i in. 2009).

Podczas gdy większość biologicznych właściwości ZEN przypisuje się agonistycznemu wpływowi na ER, stwierdzono, że związek wytwarza pewne odpowiedzi biologiczne,

których nie można po prostu wytłumaczyć jego estrogenną aktywnością. Na przykład u szczurów zarażonych doustnie ZEN indukował modyfikacje parametrów hematologicznych i biochemicznych, wskazując na toksyczność wątroby i upośledzenie procesu krzepnięcia krwi (Maaroufi i in. 1996). W innym eksperymencie naciek limfoidalny i ogniskowe zapalenie stwierdzono w wątrobie i nerkach zarażonych myszy (Abbès i in. 2006).

Mechanizmy, które stoją za tymi efektami, wciąż nie są w pełni zrozumiałe, ale jest mało prawdopodobne, że ogólna toksyczność ZEN wynika wyłącznie z jego działania estrogennego. W rzeczywistości ZEN został niedawno sklasyfikowany jako silnie utleniająca mikotoksyna (El Golli-Bennour, Bacha 2011), co sugeruje, że uszkodzenie oksydacyjne może być dominującym efektem toksycznym działania ZEN. Ustalono, że działania ZEN powodujące zaburzenia równowagi oksydoredukcyjnej mogą rzutować na zmiany w ekspresji i równowadze wydzielania cytokin w tkance limfatycznej występującej w obrębie przewodu pokarmowego (GALT – gut-associated lymphoid tissue) (Obremski 2014a).

Obowiązujące w UE zalecenia granicznego narażenia świń na ZEN przewidują limit 250 µg ZEN/kg paszy/dzień dla dorosłych świń i 100 µg ZEN/kg paszy/dzień dla loch i prosiąt w celu ochrony zwierząt przed hiperestrogennym wpływem ZEN (European Commission 2006). Badania morfometryczne sromu i macicy świń narażonych na działanie ZEN pozwoliły ustalić wartość na poziomie NOAEL (no observable effect level), tj. stężenia, które nie wywołuje dających się zaobserwować szkodliwych skutków na poziomie 10,4 µg ZEN/kg mc/dzień dla prosiąt i 40 µg ZEN/kg mc dla dojrzałych pociowo samic świń (EFSA CONTAM Panel 2014).

Fosfataza alkaliczna (AP – Alkaline Phosphatase) to nadrodzina metaloenzymów, o których wiadomo, że katalizują hydrolityczne usuwanie fosforanów z różnych cząsteczek (Bilski i in. 2017). Rodzina AP ssaków składa się z kilku izoenzymów, które można sklasyfikować jako AP niespecyficzne tkankowo (TNAP – Tissue-nonspecific Alkaline Phosphatase), mające swoją ekspresję w kościach, wątrobie i nerkach, oraz AP specyficzne tkankowo, jelitowe, łożyskowe i zarodkowe (Bilski i in. 2017; Yang i in. 2012). Alkaliczna fosfataza jelitowa (IAP – Intestinal Alkaline Phosphatase) wykazuje aktywność biologiczną w warunkach alkalicznych, z największą aktywnością przy pH 9,7 (Lallès 2010). IAP występuje na całym przewodzie pokarmowym, z największą ekspresją w dwunastnicy i w znacznie mniejszym stopniu w jelicie czczym, jelicie krętym i okrężnicy, ale wykryto go również w prostnicy (Fawley, Gourlay 2016). IAP obecny w wierzchołkowych mikrokosmkach rąbka szczoteczki enterocytów i wydzielany zarówno do światła jelita, jak i do krwiobiegu został uznany za czynnik obrony błony śluzowej jelita niezbędny do utrzymania homeostazy jelit (Lallès 2010). Fawley i Gourlay (2016) wykazali, że egzogeny IAP wywiera działanie ochronne przed stanem zapalnym błony śluzowej jelita. Wykazano ponadto, że IAP hamuje aktywację jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B (NF-κB – Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) i jego translokację do jądra, zapobiegając w ten sposób ekspresji cytokin prozapalnych (Fawley, Gourlay 2016).

## Cel pracy

Celem przeprowadzonych badań było ustalenie, jak ekspozycja samic prosiąt na ZEN w dawkach 5 µg/kg m.c. (50% NOAEL), 10 µg/kg m.c. (100% NOAEL) i 15 µg/kg m.c. (150% NOAEL) wpływa na zmiany aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP) w ścianie jelita biodrowego u młodych samic prosiąt.

## Materiał i metody

Wszystkie procedury eksperymentalne z udziałem zwierząt zostały przeprowadzone zgodnie z polskimi przepisami określającymi zasady i warunki doświadczeń na zwierzętach (Zgoda Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach Nr 12/2016 I 45/2016/DLZ z dnia 27 kwietnia 2016 i 30 listopada 2016).

W doświadczeniu wykorzystano łącznie dwadzieścia loszek o masie  $14,5 \pm 2$  kg, które aklimatyzowano przez 1 tydzień w pomieszczeniach doświadczalnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Przez cały okres doświadczenia zwierzęta utrzymano w kojcach ze stałym dostępem do wody, natomiast paszę podawano *ad libitum* dwa razy dziennie o 8:00 i 17:00. Zwierzęta losowo przydzielono do trzech grup eksperymentalnych (każda po  $n=5$ ) i negatywnej grupy kontrolnej ( $n=5$ ). Loszkom grup doświadczalnych ZEN I, ZEN II i ZEN III podawano doustnie ZEN (Z2125–26MG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) w dawce odpowiednio 5 µg, 10 µg i 15 µg ZEN/kg m.c. Odpowiednie dawki analityczne ZEN rozpuszczono w 96-procentowym etanolu (SWW 2442-90, Polskie Odczynniki SA, Polska) i umieszczono na nośniku paszy zamontowanym w żelatynowych kapsułkach. Granulowana pasza podawana wszystkim zwierzętom doświadczalnym była dostarczana przez tego samego producenta i wolna od mikotoksyn.

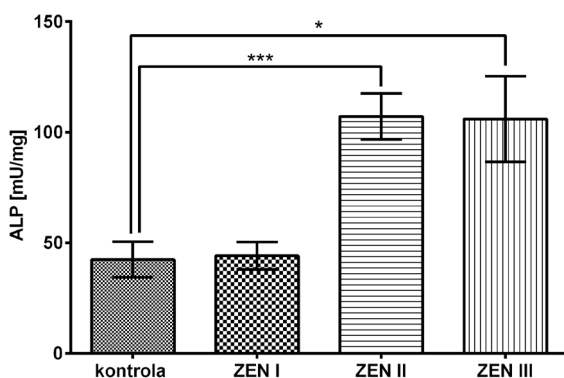
W 28 dniu doświadczenia świnię poddano eutanazji, podając im azaperon (Stresnil, Jansen Pharmaceutica NV, Belgia, 4 mg/kg m.c., im) i po 15 minutach usypiając za pomocą śmiertelnej dawki preparatu Morbital, Biowet Puławy, Polska (pentobarbital sodowy 79,98 mg/kg m.c. i pentobarbital 16,02 mg/kg m.c., i.m.). Bezpośrednio po eutanazji pobrano fragmenty ściany jelita biodrowego (5 cm długości, zawsze to samo miejsce u każdego zwierzęcia), położony 2 cm przed zastawką krętniczko-kątniczą, i przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . Materiał tkankowy o masie 1 g homogenizowano w 2,5 ml buforu do ekstrakcji [PBS (137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ); 0,5% cytrynian sodu; 0,05% (POCH, Poland); Tween 20 (Sigma Aldrich, USA); inhibitorami proteaz (Ref 11 697 498 001, Roche)] za pomocą homogenizatora (Omni-Tips™ Disposable, Omni International), a uzyskany homogenat wirowano (8600g) przez 1 godzinę (wirówka Eppendorf 5804R). Pozyskane próbki supernatantów przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu wykonania oznaczeń.

Oznaczenia aktywności ALP w próbkach homogenatów ściany jelita biodrowego wykonano zmodyfikowaną metodą według Matsushita i in. (2007). Metoda wykrywania aktywności ALP wykorzystuje jako substrat fosforan p-nitrofenylu (pNPP). ALP hydrolizuje pNPP do p-nitrofenolu i nieorganicznego fosforanu. Podczas inkubacji próbki ALP i substratu (pNPP) w 37°C reakcję śledzi się, monitorując wzrost absorbancji przy 405 nm. Na 96-dołkową płytkę naniesiono do odpowiednich dołków próbę ślepą, badaną i kontrolną – bufor reakcyjny (1,0 M dietanoloamina i 0,50 mM chlorek magnezu, pH 9,8), następnie dodano 0,67 M roztwór pNPP (do próby ślepej, badanej i kontrolnej), płytkę podgrzano do temperatury 37°C i uzupełniono o badane próbki. Do dołków z kontrolą enzymu dodano rozcieńczonego roztworu ALP. Natychmiast wymieszano i wykonano pomiar za pomocą spektrofotometru płytkowego (TECAN Infinite M200, Männedorf, Switzerland). Uzyskane wyniki przeliczono na 1 mg białka oznaczonego według metody Bradford (1976).

Uzyskane wyniki pomiarów poddano analizie statystycznej za pomocą programu Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software, USA). Dla wszystkich badanych grup wyliczono wartości średnie i standardowy błąd średniej (SEM), a różnice pomiędzy średnimi analizowano za pomocą testu dwuczynnikowego Anova z analizą post-hoc Tukeya. Wartości  $P < 0,05$  uznano za istotne statystycznie.

## Wyniki

Wyniki oznaczeń aktywności jelitowej ALP w ścianie jelita biodrowego w 28 dniu eksperymentu zamieszczono na rycinie 1. Aktywność ALP grupy kontrolnej wynio-



Rycina 1. Zmiany aktywności ALP w ścianie jelita biodrowego. Grupa kontrolna, ZEN I – 5 µg/kg m.c., ZEN II – 10 µg/kg m.c., ZEN III – 15 µg/kg m.c. Wyniki przedstawiono, jako średnią ± SEM. Różnice istotne statystycznie określono na poziomie \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,001$

Źródło: opracowanie własne.

sła 42,46 mU/mg. W grupie zwierząt, których narażono na dawkę 5 µg ZEN/kg m.c. (ZEN I) aktywność ALP była nieznacznie wyższa od aktywności oznaczonej w grupie kontrolnej i wyniosła  $44,20 \pm 6,16$  mU/mg. U zwierząt narażonych na mikotoksynę w dawce 10 µg i 15 µg ZEN/kg m.c. (ZEN I i ZEN II) aktywność ALP wykazała statystyczny wzrost w porównaniu do grupy kontrolnej, osiągając poziom aktywności odpowiednio  $107,20 \pm 10,33$  mU/mg ( $P < 0,001$ ) i  $106,00 \pm 19,34$  mU/mg ( $P < 0,05$ ).

## Dyskusja

Przeprowadzone badania są pierwszymi, które pokazują zmiany IAP podczas mikotoksykozy zearalenonowej. Należy mieć na uwadze, że podstawową funkcją przewodu pokarmowego jest trawienie, któremu towarzyszy wchłanianie wody i składników odżywczych ze światła przewodu pokarmowego do krwi przez jednowarstwowy nabłonek, który działa selektywnie przeciwko patogenom światła i antygenom pokarmowym (Groschwitz, Hogan 2009; Turner 2009). Jednak homeostaza panująca w przewodzie pokarmowym ulega zaburzeniu w przypadku narażenia organizmu na mikotoksyny obecne w paszy. Powierzchnia nabłonka jelit łączy się z bilionami bakterii, z czego setki gatunków bakterii są ogólnie nieszkodliwe i często pożyteczne, dostarczając witamin i wspomagając procesy trawienne. Jednak te normalnie nieszkodliwe bakterie stanowią bezpośrednie zagrożenie, ponieważ w pewnych okolicznościach mogą powodować infekcje oportunistyczne, przewlekłe stany zapalne i wstrząs septyczny (Geddes, Philpott 2008).

Mikotoksyny wywołują martwicę nabłonka jelitowego (Pinton, Oswald 2014), zaburzają funkcję bariery jelitowej, modulują odpowiedź immunologiczną i pośrednio wpływają na spożycie paszy poprzez osłabienie sygnalizacji hormonu wzrostu (Payros i in 2016). Niektóre mikotoksyny indukują modyfikacje i mutacje DNA w enterocytach (Maresca, Fantini 2010).

Gdy zwierzęta spożywają zanieczyszczoną w ZEN paszę, komórki nabłonka jelit są narażone na jego działanie. Badania *in vitro* wskazują, że ZEN indukuje fragmentację DNA i hamuje syntezę białek w komórkach Caco-2 (Abid, Ee 2010) oraz wpływa na żywotność komórek, oporność przeznabłonkową i syntezę cytokin oraz indukuje stres oksydacyjny w komórkach nabłonka jelit świni (Marin i in. 2015; Taranu i in. 2015). Ponadto badania *in vivo* wykazały, że ZEN uruchamia lokalne mechanizmy obronne w błonie śluzowej jelit świń i indukuje stres oksydacyjny oraz procesy zapalne, niszczy morfologię błony śluzowej jelit oraz upośledza funkcję bariery jelitowej u szczurów (Liu i in. 2014).

Lipopolisacharyd (LPS) jest głównym składnikiem błony zewnętrznej bakterii, który jest w dużej mierze odpowiedzialny za pośredniczenie we wstrząsie septycznym. Godne uwagi jest to, że organizm normalnie nie reaguje na wysokie stężenie LPS,

który jest obecny w świetle jelita. Receptor TLR4 (ang. toll-like receptor 4) wykrywa LPS i inicjuje transkrypcję cytokin prozapalnych, które są kluczowymi regulatorami wstrząsu septycznego. TLR4 ma kluczowe znaczenie dla wykrywania atakujących bakterii i inicjowania odpowiednich odpowiedzi immunologicznych, jednak jego aktywacja musi być ściśle regulowana, ponieważ niewłaściwa aktywacja może prowadzić do masywnego niekontrolowanego stanu zapalnego, takiego jak ten obserwowany we wstrząsie septycznym. Na przykład ekspresja TLR4 jest regulowana przestrzennie, tak że nie występuje na wierzchołkowych powierzchniach komórek nabłonka jelitowego (Ortega-Cava i in. 2003), zapobiegając w ten sposób interakcji z bogatym w LPS środowiskiem jelita. Alternatywnie aktywację TLR4 można złagodzić przez enzymatyczną modyfikację LPS, którą właśnie funkcję przypisuje się jelitowej postaci ALP. Rzeczywiście IAP detoksyfikuje LPS poprzez jego hydrolizę, tak że nie może już on aktywować zależnych od TLR odpowiedzi zapalnych (Bilski i in. 2017).

Rolą IAP w jelicie cienkim jest defosforylacja ligandów drobnoustrojów obecnych w świetle jelita, przez co IAP chroni organizm przed ostrym i przewlekłym stanem zapalnym, umożliwiając rozwój saprofitycznej mikrobioty i utrzymanie homeostazy. Brak lub niedobór IAP zwiększa ryzyko zapalenia jelit. Zachodzi zatem złożona interakcja między IAP, dietą, saprofitami i nabłonkiem jelita. Jednak w przypadku mikotoksykozy zearalenonowej sytuacja w jelitach ulega zmianie. Jak wykazali Obremski i in., długotrwała ekspozycja świń na ZEN w dawkach poniżej wartości NOAEL, która nie powoduje objawów hiperestrogenizmu sromu i macicy, powoduje jednak stan zapalny w jelicie biodrowym, co wpływa na osłabienie funkcji barierowych jelita (Obremski 2014b). W aktualnej literaturze brak danych odnoszących się do wpływu mikotoksyn, w tym ZEN, na aktywność IAP. Jednak, jak pokazują wyniki przeprowadzonego doświadczenia, nawet niskie dawki ZEN, które nie wywołują objawów hiperestrogenizmu u loszek, prowadzą prawdopodobnie do zwiększonej transmisji drobnoustrojów i uruchamiają mechanizmy hydrolizujące LPS poprzez wzrost aktywności jelitowej postaci ALP. Trudno wyjaśnić, z jakiego powodu wyższa aktywność IAP wystąpiła w grupie loszek narażonych na 10 µg ZEN/kg m.c. (ryc. 1). Jednak w przypadku zmniejszenia aktywności IAP może zwiększyć się ryzyko chorób na skutek zmian w mikrobiomie, chorób zapalnych jelita i przepuszczalności jelit. Z uwagi na znaczącą rolę oddziaływania mikotoksyn na funkcje barierowe jelit i istotną rolę IAP jako kluczowego regulatora stanu zapalnego, infekcji i mikroflory jelitowej, głównie przez defosforylację LPS, wymagane jest prowadzenie dalszych badań.

## Podsumowanie

Należy stwierdzić, że ekspozycja samic prosiąt na ZEN w dawkach 50%, 100% oraz 150% wartości NOAEL wpływa na zmiany aktywności ALP w ścianie jelita biodrowe-

go. Indukowany przez ZEN stan wpływa prawdopodobnie na osłabienie funkcji barierowych jelita, ale jednocześnie mobilizuje odpowiedź immunologiczną przez wzrost aktywności ALP nakierowaną na zwiększoną hydrolizę LPS.

## Bibliografia

- Abbès S., Ouanes Z., Salah-Abbès J.B., Houas Z., Oueslati R., Bacha H., Othman O. 2006. The protective effect of hydrated sodium calcium aluminosilicate against haematological, biochemical and pathological changes induced by Zearalenone in mice. *Toxicol.*, 47: 567–574.
- Abid E.S., Ee B.C.B. 2010. Comparative study of toxic effects of zearalenone and its two major metabolites alpha-zearalenol and beta-zearalenol on cultured human Caco-2 cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 23: 233–243.
- Bilski J., Mazur-Bialy A., Wojcik D., Zahradnik-Bilska J., Brzozowski B., Magierowski M., Mach T., Magierowska K., Brzozowski T. 2017. The Role of Intestinal Alkaline Phosphatase in Inflammatory Disorders of Gastrointestinal Tract. *Mediators Inflamm.*, 2017: 9074601.
- Bradford M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.
- EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain) Scientific Opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. 2014. *EFSA J.*, 12: 3916.
- El Golli-Bennour E., Bacha H., 2011. Hsp70 expression as biomarkers of oxidative stress: mycotoxins' exploration. *Toxicology*, 287: 1–7.
- European Commission COMMISSION RECOMMENDATION 2006/576/EC of 17 August 2006 on the 402 presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended 403 for animal feeding. *Off. J. Eur. Union*: 7–9.
- Fawley J., Gourlay DM. 2016. Intestinal alkaline phosphatase: a summary of its role in clinical disease. *J. Surg. Res.*, 202: 225–234.
- Fink-Gremmels J., Malekinejad H. 2007. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 137: 326–341.
- Geddes K., Philpott DJ. 2008. A new role for intestinal alkaline phosphatase in gut barrier maintenance. *Gastroenterology*, 135: 8–12.
- Groschwitz K.R., Hogan S.P. 2009. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 124, 3–20
- Kanora A., Maes D. 2009. The role of mycotoxins in pig reproduction: a review, *Vet. Med.*, 54: 565–576.
- Lallès J.P. 2010. Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. *Nutr. Rev.*, 68: 323–332.
- Liu Q., Wang Y., Gu J., Yuan Y., Liu X., Zheng W., Huang Q., Liu Z., Bian J. 2014. Zearalenone inhibits testosterone biosynthesis in mouse Leydig cells via the crosstalk of estrogen receptor signaling and orphan nuclear receptor Nur77 expression. *Toxicol. In Vitro*, 28: 647–656.
- Maaroufi K., Chekir L., Creppy E.E., Ellouz F., Bacha H. 1996. Zearalenone induces modifications of haematological and biochemical parameters in rats, *Toxicol.*, 34: 535–540.

- Matsushita M., Irino T., Kamiyama K., Muramoto Y., Kawaguchi T., Nakano T., Komoda T., 2007. Evaluation of a method for measuring tissue non-specific alkaline phosphatase activity in healthy subjects. *Ann. Clin. Biochem.*, 44: 544–548.
- Maresca M., Fantini J. 2010. Some food-associated mycotoxins as potential risk factors in humans predisposed to chronic intestinal inflammatory diseases. *Toxicon* 56: 282–294.
- Obremski K. 2014a. Changes in Th1 and Th2 cytokine concentrations in ileal Peyer's patches in gilts exposed to zearalenone, *Pol. J. Vet. Sci.*, 17: 53–59.
- Obremski K. 2014b. The effect of in vivo exposure to zearalenone on cytokine secretion by Th1 and Th2 lymphocytes in porcine Peyer's patches after in vitro stimulation with LPS. *Pol. J. Vet. Sci.*, 17: 625–632.
- Obremski K., Gajęcka M., Zielonka Ł., Jakimiuk E., Gajęcki M. 2005. Morphology and ultrastructure of small intestine mucosa in gilts with zearalenone mycotoxicosis, *Pol. J. Vet. Sci.*, 8: 301–307.
- Obremski K., Gajęcki M., Zwierzchowski W., Zielonka Ł., Otrocka-Domagała I., Rotkiewicz T., Mikołajczyk A., Gajęcka M., Polak M. 2003. Influence of zearalenone on reproductive system cell proliferation in gilts, *Pol. J. Vet. Sci.*, 6: 239–245.
- Obremski K., Zielonka Ł., Gajęcka E., Jakimiuk E., Bakula T., Baranowski M., Gajęcki M. 2008. Histological estimation of the small intestine wall after administration of feed containing deoxynivalenol, T-2 toxin and zearalenone in the pig, *Pol. J. Vet. Sci.*, 11: 339–345.
- Ortega-Cava C.F., Ishihara S., Rumi M.A., Kawashima K., Ishimura N., Kazumori H., Udagawa J., Kadowaki Y., Kinoshita Y. 2003. Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. *J. Immunol.*, 170: 3977–3985.
- Payros D., Alassane-Kpembi I., Pierron A., Loiseau N., Pinton P., Oswald I.P. 2016. Toxicology of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms. *Arch. Toxicol.*, 90: 2931–2957.
- Pinton P., Oswald I.P. 2014. Effect of deoxynivalenol and other Type B trichothecenes on the intestine: A review. *Toxins* 6: 1615–1643.
- Pleadin J., Sokolović M., Peršić N., Zdravec M., Jaki V., Vulić A. 2012. Contamination of maize with deoxynivalenol and zearalenone in Croatia. *Food Control*, 28: 94–98.
- Streit E., Schatzmayr G., Tassi P., Tzika E., Marin D., Taranu I., Tabuc C., Nicolau A., Aprodu I., Puel O., Oswald I.P. 2012. Current situation of mycotoxin contamination and cooccurrence in animal feed-focus on Europe. *Toxins (Basel)*, 4: 788–809.
- Turner J.R. 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 9: 799–809.
- Vidal A., Marín S., Ramos A.J., Cano-Sancho G., Sanchis V. 2013. Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. *Food Chem. Toxicol.*, 53: 133–138.
- Yang Y., Wandler A.M., Postlethwait J.H., Guillemin K. 2012. Dynamic Evolution of the LPS-Detoxifying Enzyme Intestinal Alkaline Phosphatase in Zebrafish and Other Vertebrates. *Front. Immunol.*, 3: 314.
- Zielonka Ł., Gorlo G., Obremski K., Gajęcka M., Jakimiuk E., Gajęcki M. 2009. Histopathology of selected organs of the reproductive tract of pigs supplied with feed containing zearalenone destroyer. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 53: 411–414.



## Abstract

**EFFECT OF ZEARELENONE ON ALKALINE PHOSPHATASE (ALP) ACTIVITY IN THE ILEUM IN PIGS**

The effect of low zearalenone diet concentration on changes in activity of alkaline phosphatase in porcine ileum. Zearalenone (ZEN) is one of the most common mycotoxins found globally, able to induce estrogenic effect. The gastrointestinal lymphoid tissue (GALT) is the first physiological barrier along the ZEN pathway. Alkaline phosphatase (ALP) is a crucial enzyme in maintaining microbiome homeostasis. Its intestinal isoform plays a significant role in inhibiting the inflammatory process in the intestine and regulating permeability. The aim of research was to evaluate influence of 5, 10 and 15 µg/kg bw ZEN doses on alkaline phosphatase activity of ileum wall of young female piglets. Samples of ileum were taken on 28 day of exposition, and enzymes activity was measured using spectrophotometric method. Obtained results showed an increase in ALP activity directly proportional to the dose of zearalenone. Exposure to ZEN affects on changes in activity of ALP in ileum GALT. This action can cause mobilization of the immune response in the pig ileum and the increase in the activity of the factors responsible for the permeability of the intestinal barrier.

**Słowa kluczowe:** zearalenon, loszki, GALT, ALP

**Keywords:** zearalenone, gilts, GALT, ALP

**Magdalena Morawska-Kozłowska**

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Studenckie Koło Naukowe Technik Obrazowania w Diagnostyce Chorób Małych Zwierząt

Opiekun: prof. dr hab. Andrzej Rychlik

## **PRZYDATNOŚĆ WYBRANYCH TECHNIK OBRAZOWANIA W DIAGNOSTYCE CHOROÓB ZĘBÓW PSÓW I KOTÓW**

### **Wstęp**

Stomatologia weterynaryjna jest wąską specjalizacją w leczeniu zwierząt. Z uwagi na rosnącą świadomość właścicieli, dziedzina ta ciągle się rozwija. Stomatologia weterynaryjna dzieli się wtórnie na: stomatologię zachowawczą (profilaktyka próchnicy zębów, leczenie ubytków), endodoncję (leczenie chorób miazgi zębowej, leczenie chorób okołowierzchołkowych), implantologię (umieszczanie implantów zębowych w kośćcu szczęki lub żuchwy), chirurgię szczękową (np. ekstrakcja zęba, usuwanie torbieli zębowych), periodontologię (leczenie zapalenia przyzębia oraz dziąseł, usuwanie kamienia nazębnego) oraz ortodoncję (leczenie wad zgryzu) (Holmstrom 2013).

Psy i koty jak większość ssaków posiadają uzębienie mleczne oraz stałe. Uzębienie mleczne rozwija się czasie embriogenezy i w okresie rozwoju płodowego, natomiast zęby stałe powstają w okresie płodowym i u oseska. Pies ma 42 zęby stałe oraz 28 zębów mlecznych, zaś kot posiada 30 zębów stałych i 26 zębów mlecznych. W układzie tworzącym narząd zębowy wyróżniamy: ząb (*dens*) z więzadłem zęba, przyzębie (*paradontium*), które zbudowane jest z dziąsła (*gingiva*) i ozębnej (*periodontium*), więzadła przyzębia oraz wyrostka zębowego (*processus alveolaris*) kości szczęki lub żuchwy. Każdy ząb ma swój charakterystyczny kształt i wielkość w zależności od gatunku (Tutt 2008).

Z uwagi na wpływ środowiska, złe żywienie i częste zaniedbania właścicielskie, u zwierząt towarzyszących występują liczne schorzenia zębów, przyzębia czy jamy ustnej. Niektóre rasy są szczególnie predysponowane do występowania schorzeń na tle stomatologicznym. Zaliczają się do nich zarówno rasy psów, jak i kotów brachycefalicz-

nych (krótkogłowych). W wyniku selekcji genetycznej i utrwalania cech pożądanых przez hodowców wykształciły się również cechy niepożądane, w tym liczne patologie wrodzone uzębienia i przyzębia, wady zgryzu oraz skłonności do słabej zębiny, złamań, zwichnięć i nadwichnięć tkanki zębowej. Co ciekawe, nawet w obrębie rasy, np. u buldogów francuskich, opisywanych jest wiele różnic anatomicznych w ilości poszczególnych zębów szczęki czy żuchwy (Kupczyńska 2009).

Początkowym etapem w przyjęciu pacjenta do gabinetu przez lekarza weterynarii jest wywiad z opiekunem zwierzęcia. Dobrze przeprowadzona rozmowa z właścicielem może już na etapie wstępnym nakierować dalsze postępowanie diagnostyczne. W stomatologii weterynaryjnej istnieją gotowe kwestionariusze wstępnego wywiadu przesiewowego (Bellows 2017). Każdy pacjent z podejrzeniem choroby aparatu zębowego czy przyzębia musi być w pierwszej kolejności poddany ogólnemu badaniu klinicznemu. Konieczne jest wykluczenie chorób o podobnych objawach klinicznych. Manifestują się one analogicznie jak patologie ze strony aparatu zębowego, a mogą mieć podłoże w przewodzie pokarmowym, układzie naczyniowym, nerwowym czy nawet wskazywać na zakażenie ogólne organizmu (Chisini 2015). Charakterystycznymi objawami dla chorób w patologii stomatologicznej są: apatia, utrata apetytu, zmiana sposobu pobierania pokarmu, chudnięcie, podwyższona wewnętrzna ciepłota ciała, krwawienia z jamy ustnej, zachwianie symetrii twarzoczaszki, nieprzyjemny zapach z jamy ustnej oraz bolesność okolicy przy badaniu palpacyjnym. Ogólne badanie kliniczne obejmuje szczególnie: oglądanie, omacywanie, osłuchiwanie klatki piersiowej w celu oceny pracy serca (nierazadkim powikłaniem chorób przyzębia jest zapalenie osierdzia), zmierzenie wewnętrznej ciepłoty ciała oraz czasu włośniczkowego na błonie śluzowej jamy ustnej (Bunchann 1996). Następnie należy przejść do ogólnego badania stomatologicznego, na które składa się:

1. ocena symetrii głowy oraz wyszukiwanie miejsc o podwyższonej cieplocie regionalnej oraz wzmożonej reakcji na ból – dokonywane przez omacywanie i oglądanie;
2. odchylenie policzków wraz z pobieżną oceną liczby zębów, ich stanu (wstępna ocena płytki nazębnej, ciągłości szkliwa, występowania kamienia nazębnego i uszkodzeń) oraz prawidłowości zgryzu;
3. ocena błony śluzowej jamy ustnej – ewentualna ocena miejsc z uszkodzeniami błony śluzowej oraz z występującym wysiękiem (dodatkowe badanie charakteru wysięku – czy jest surowiczny, śluzowy, śluzowo-ropny czy ropny);
4. badanie tylnej części jamy ustnej oraz migdałków (badanie to ułatwione jest przez wprowadzenie rurki dotchawiczej);
5. badanie biomechaniki żuchwy względem szczęki i stawu skroniowo-żuchwowego (aby wykluczyć przyczynę leżącą u podstawy ortopedii szczękowej).

Do tego momentu, u spokojnych pacjentów, część badania stomatologicznego i wstępne zlokalizowanie problemu można przeprowadzić przy pełnej świadomości pacjenta lub w sedacji. W większości przypadków, jak mówi dobra praktyka stomatologiczna, konieczne jest wprowadzenie pacjenta w stan znieczulenia ogólnego (Gorrel 2011). Następnie, po wprowadzeniu zwierzęcia w stan narkozy, należy zbadać każdy

zęb oddzielnie (stan szkliwa, ubytki, obecność próchnicy, zmiana barwy, przezierności, gładkości, połysku oraz występowanie kamienia nazębnego) wraz z przynależnym przyzębiem (głębokość rowka dziąsłowego, rozpulchnienie, grubość dziąseł). Może do tego służyć sonda periodontologiczna (Human 2003).

Ważnym elementem szczegółowego badania stomatologicznego jest użycie technik obrazowania. Istnieje szereg możliwości tworzenia obrazów diagnostycznych. Służą do tego między innymi: aparat rentgenowski, aparat rentgenowski stomatologiczny, rezonans magnetyczny, tomograf komputerowy. Przy psach dolichocefalicznych możliwe jest użycie endoskopu w celu uwidocznienia tylnego odcinka jamy ustnej. W obrazowaniu z wykorzystaniem promieni X (RTG, TC) ważne jest, aby korzystać z tego samego schematu oceny obrazu. Kolejność opisu struktur zębowych powinna być zawsze ta sama: korona, korzeń/korzenie, przestrzeń więzadeł przyzębia, blaszka zbita, komora zęba, kanał korzeniowy oraz tkanki okołowierzchołkowe (Krzyżostaniak 2012).

Po pełnej diagnostyce i postawieniu rozpoznania można przejść do rozwiązania problemu, czyli do leczenia stomatologicznego. Zabiegi stomatologiczne u psów i kotów wykonywane są w znieczuleniu ogólnym. Z uwagi na częste i dość intensywne krwawienie ze struktur znajdujących się w jamie ustnej oraz wtórne, do tego przepłukiwanie pola zabiegowego podczas wykonywanych czynności stomatologicznych konieczna jest intubacja pacjenta (obowiązkowe jest odpowiednie uszczelnienie mankietu rurki dotchawiczej). Ważne jest, aby pamiętać o zastosowaniu znieczulenia miejscowego, szczególnie przy potencjalnie bolesnym zabiegu. Najczęściej stosowane rodzaje znieczuleń lokalnych to: znieczulenie nerwów szczękowego i zębodołowego dolnego (Bellows 2017).

Pacjent stomatologiczny wymaga dokładnego zbadania i precyzyjnego postawienia diagnozy. Rozpoznanie i opieka nad pacjentem w stomatologii weterynaryjnej zobowiązuje lekarza, w równoważnych proporcjach, do następujących czynników: znajomości anatomii oraz fizjologii, właściwego postawienia diagnozy oraz dostępu do odpowiedniego sprzętu (Asgary 2016). Równie ważnymi elementami są: posiadane doświadczenie kliniczne oraz właściwe przeprowadzenie zabiegu przez lekarza weterynarii. Szczególne znaczenie w rozpoznawaniu stanów patologicznych zębów i przyzębia odgrywają techniki diagnostyki obrazowej. Główną rolę pełnią aparat rentgenowski oraz tomograf komputerowy.

Obraz uzyskany z aparatu rentgenowskiego jest dwuwymiarowy, w przeciwieństwie do tomografa komputerowego, który gwarantuje trójwymiarową wizualizację. Dużą popularnością w stomatologii cieszy się tomografia stożkowa (CBCT – Cone-Beam Computed Tomography), w której wiązka promienia rentgenowskiego przybiera kształt stożka, a uzyskany obraz ma bardzo wysoką rozdzielczość i dobrą jakość (Krzyżostaniak 2012). Przykładem na wykorzystanie TC w stomatologii weterynaryjnej jest leczenie kanałowe. Dzięki uzyskanemu trójwymiarowemu obrazowi można odwzorować nietypowy dla każdego pacjenta przebieg kanału zębowego i zakończyć leczenie pełnym sukcesem. W klasycznym, dwuwymiarowym obrazie wykonanym przy pomocy aparatu rentgenowskiego, uzyskać taki efekt jest trudno (Chisini 2015). Wymaga to większej

wiedzy i doświadczenia lekarza. Tomograf komputerowy jest również wykorzystywany w ortodontji weterynaryjnej, w implantologii oraz w chirurgii szczękowej, czyli w takich dziedzinach, które wymagają szczegółowego uwidocznienia każdej ze struktur. Aparat rentgenowski jest używany rutynowo. Uwarunkowane jest to zapewne aspektem ekonomicznym, ale również prostotą wykonania badania oraz powszechnością występowania aparatów rentgenowskich w klinikach weterynaryjnych. Stomatolodzy weterynaryjni używają RTG do zobrazowania zmian próchnicznych w przypadkach zwichnięcia zębów czy w chorobach przyzębia. Niestety w tej technice diagnostycznej należy wykonać zdjęcia w kilku projekcjach do pełnej diagnostyki. Płaskie, dwuwymiarowe obrazowanie sprawia, że struktury anatomiczne nakładają się na siebie, co utrudnia ocenę radiologiczną (Bellows 2017).

## Cel

Celem pracy była ocena przydatności wybranych technik obrazowania w diagnostyce chorób zębów u psów i kotów.

## Material i metody

W Katedrze Diagnostyki Klinicznej na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie przeprowadzono badanie z udziałem dziesięciu psów i dziesięciu kotów wykazujących typowe objawy chorobowe ze strony aparatu zębowego. Wszystkich pacjentów zbadano klinicznie, a następnie poddano diagnostyce obrazowej za pomocą aparatu rentgenowskiego oraz tomografu komputerowego.

Na początku przeprowadzono wywiad i badanie ogólne kliniczne, po czym wykonano badanie stomatologiczne. Po konsultacji z anestezjologiem, przeprowadzeniu badań krwi (morfologia i biochemia) oraz określeniu przynależności danego pacjenta do danej grupy ASA (skala oceniająca ryzyko związane ze znieczuleniem ogólnym) zwierzęta poddano najpierw premedykacji, a następnie znieczuleniu ogólnemu. Kolejnym etapem było wykonanie zdjęć aparatem rentgenowskim znajdującym się w Katedrze Chirurgii i Rentgenologii z Kliniką oraz tomografem komputerowym przynależnym do Polikliniki Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego. Korzystano z następujących aparatów: rentgen CoMED AG CH-3097 Liebefeld-Bern oraz tomograf komputerowy Siemens Somatom. Podczas badania RTG wykonano zdjęcia w projekcjach skośnych, u każdego z pacjentów minimum dwa. W badaniu TC układano pacjenta w pozycji mostkowej, a następnie wykonano skan komputerowy o szerokości przekroju 1 mm. Po wykonaniu zdjęć i skanów lekarz prowadzący dokonał analizy oraz skrupulatnych opisów radiogramów, na podstawie których stawiał ostateczną diagno-

zę jednostki chorobowej. Kolejnym etapem była analiza opisów technik obrazowania, dzięki czemu można było stwierdzić, czy dana zmiana w danej technice obrazowania jest diagnostyczna. Porównywano dwie projekcje z aparatu RTG do skanu z TC każdego z pacjentów.

## Wyniki

U wszystkich pacjentów występowały objawy wskazujące na patologię ze strony aparatu zębowego. Z wywiadu wynikało, że każde zwierzę miało problem z pobieraniem pokarmu. U sześciu psów występował brak apetytu, natomiast cztery psy wykazywały chęć do pobierania pokarmu, ale podczas próby żucia pacjent albo wypluwał karmę, albo połykał bardzo duże kawałki bez rozdrabniania. Przy pokarmie o półpłynnej,

**Tabela 1. Przedstawienie wyników badań**

Zdiagnozowana patologia	Liczba zwierząt z daną patologią	RTG*	TC**
<b>Pies</b>			
Ubytki próchnicze zęba	3	+	+/-
Zwichnięcie zęba	2	+	+
Zrośnięte korzenie	1	+	++
Ropień okołozębowy	1	-	+
Zmiany w zębach po przebytej nosówce	1	+	+
Ankyloza korzenia	1	+/-	+
Resorpcja kości żuchwy	1	+	++
<b>Kot</b>			
Ubytki próchnicze zęba	4	+	+/-
Resorpcja korzeni	1	+	++
Nowotwór kości żuchwy	1	+	+
Przetoka ustno-nosowa	1	-	+
Przetrwale korzenie po nieudanej ekstrakcji	1	+	+
Martwica mięszi i ropień okołowierzchołkowy	1	+	-
Złamanie korony zęba	1	+	+
Legenda:			
* Obraz diagnostyczny, widoczny na zdjęciu rentgenowskim			
** Obraz diagnostyczny, widoczny na zdjęciu z tomografu komputerowego			
+ Wynik dodatni (obraz mało szczegółowy, zmiany nie były diagnostyczne w danej technice obrazowania)			
++ Wynik dodatni, bardziej szczegółowy obraz, możliwa szczegółowa diagnostyka			
+/- Wynik wątpliwy			
- Wynik ujemny (zmiany nie były diagnostyczne w danej technice obrazowania)			

Źródło: opracowanie własne.

miękkiej konsystencji wszyscy pacjenci z zachowanym apetytem poradzili sobie z pobieraniem karmy. U dziesięciu kotów, nawet przy mocno rozdrobnionym pokarmie, brak było chęci do jedzenia. U czterech psów i ośmiu kotów zachwiana była symetria pyska, natomiast u wszystkich była wzmożona ciepłota okolicznych tkanek. Każdy pacjent uczestniczący w badaniu wykazywał wzmożoną reakcję na dotyk podczas badania palpacyjnego. W każdym przypadku, bez badań obrazowych, można było zlokalizować ogólną przyczynę dolegliwości, wskazującą na aparat zębowy.

Wyniki otrzymane po analizie radiogramów i obrazów z tomografu komputerowego przedstawia tabela 1.

## Dyskusja

Podczas wywiadu właściciele głównie zwracali uwagę na to, że ich pupil przestał jeść lub wykazywał zmniejszony apetyt. Drugim wspólnym punktem była osowiałość oraz niechęć do zabaw. Większość właścicieli sugerowała występowanie choroby w przewodzie pokarmowym jako główny problem w zachowaniu zwierzęcia. Istotne było to, że po zapytaniu o sposób pielęgnacji zębów oraz jamy ustnej u pupila, uzyskano informację, że tylko jeden właściciel kota (z czego koty stanowiły 50% badanych zwierząt) regularnie czyści zęby i chodzi ze zwierzęciem na kontrole stomatologiczne. W przypadku właścicieli psów liczba takich osób wzrosła do sześciu. Wskazuje to na większą świadomość właścicieli psów.

W badaniu przeprowadzonym w Katedrze Diagnostyki Klinicznej wszystkie zwierzęta miały objawy typowe dla schorzeń stomatologicznych. W związku z tym, że jama ustna jest wspólnym elementem dla wielu układów, diagnostyka na podstawie samych objawów klinicznych jest trudna. Utrata apetytu i wyplwanie pokarmu mogą wskazywać na chorobę z przewodu pokarmowego lub nawet z układu naczyniowego czy nerwowego. Ważne jest, aby nie mylić tych objawów z wymiotami, a w szczególności z regurgitacją. Podczas regurgitacji niestrawiony pokarm wydostaje się bez ruchów tłoczni brzusznej na zewnątrz na zasadzie ulewania, co może przypominać wyplwanie pokarmu. Podczas schorzeń ze strony aparatu zębowego zwierzę w momencie jedzenia przechyla głowę na stronę zdrową w celu przesunięcia pokarmu w miejsce mniej bolące. Widoczne jest również nienaturalne ułożenie żuchwy względem szczęki podczas żucia, co może z kolei nasuwać problem w układzie nerwowym. Aby dokładnie zaobserwować te zachowania i zdiagnozować z należytą dokładnością, można wykonać próbę jedzenia: dać pacjentowi w gabinecie smakołyk.

Główną rolę w rozpoznaniu wstępnym problemu stomatologicznego grają: oglądanie jamy ustnej oraz badanie palpacyjne tych okolic. W większości zwierząt uczestniczących w badaniu wstępną diagnostykę można było zakończyć już na tym etapie. Struktury obecne w jamie ustnej, z uwagi na duże ukrwienie, wrażliwe unerwienie oraz

częste narażenie na uszkodzenia mechaniczne, są tak delikatne, że cechy makroskopowe są wyraźnie uwidocznione (Barańska-Grochowska 2004). U każdego psa i kota widać było zaczerwienie błony śluzowej w miejscu problemu, nastrzykanie błony śluzowej naczyniami krwionośnymi, obecność nadżerek oraz innych uszkodzeń błony śluzowej jamy ustnej, wzmożoną produkcję śliny, obecność płytki nazębnej czy też kamienia. Wymienionym zmianom często towarzyszy nieprzyjemny zapach z jamy ustnej.

Mimo że diagnostyka wstępna wskazuje na konkretny problem diagnostyczny, nieocenione są techniki obrazowania w stomatologii weterynaryjnej. U większości pacjentów uczestniczących w badaniu zarówno aparat rentgenowski, jak i tomograf komputerowy pozwoliły postawić ostateczną diagnozę i wdrożyć plan dalszego postępowania. Badanie z użyciem TC, przy dużym odsetku badanych, było dopełnieniem obrazowania z zastosowaniem zwykłego zdjęcia rentgenowskiego. Tomograf komputerowy ukazywał więcej szczegółów. Zależność ta była dobrze widoczna, szczególnie przy chorobach mających swoje podłoże w tkankach kostnej lub zębowej. Przykładem na to mogą być następujące przypadki kliniczne, które pojawiły się w badaniu: zrośnięcie się korzeni zębowych u trzyletniego samca owczarka niemieckiego, resorpcja kości żuchwy u pięcioletniego samca West Highland White Terriera oraz resorpcja korzeni dwóch zębów trzonowych u kotki rasy bengalskiej. W tych przypadkach tomograf komputerowy dał możliwość zaplanowania bardziej dokładnego postępowania leczniczego. Miało to szczególne zastosowanie przy zrośnięciu się korzeni zębowych u owczarka niemieckiego. W tym przypadku obraz w tomografie komputerowym wykazał bardziej zaawansowane zmiany, co pozwoliło chirurgowi zaplanować ekstrakcję bez narażenia na uszkodzenie większej części tkanek miękkich. Przy okazji okazało się, że zasada uzupełniającej roli TC w stosunku do zdjęcia RTG nie jest uniwersalna. W jednostce chorobowej, jaką jest ankyloza korzenia zębowego, aparat rentgenowski miał niepewne zastosowanie diagnostyczne. W tym przypadku należało wykonać aż cztery projekcje, ale mimo to diagnostyka nie była pewna. Wymagało to od lekarza dużego doświadczenia w stomatologii weterynaryjnej. W tym badaniu w rozpoznawaniu ankylozy korzenia zębowego główną rolę odegrał tomograf komputerowy.

Kolejnym przykładem, gdzie badanie RTG nie było wystarczające, żeby postawić ostateczną diagnozę był przypadek ropnia okołozębowego u sześcioletniego mieszańca owczarka niemieckiego. Na radiogramie z aparatu rentgenowskiego w okolicy lewego kła można było dostrzec ubytki cienia oraz nieostre kontury zęba. Mogło to wskazać na proces zapalny, który toczy się w tej lokalizacji (ryc. 1). Niewprawionemu oku trudno byłoby zauważyć te detale. Obraz z tomografu komputerowego pozwolił dokonać precyzyjnej diagnozy. W okolicy korzenia kła lewej szczęki widać było jamę wypełnioną płynem (ryc. 2). Badanie to ułatwiło rozpoznanie jednostki chorobowej. Jest to pomocne szczególnie dla początkujących stomatologów weterynaryjnych.

Zupełnie innym przypadkiem, również odbiegającym od powyższej reguły, jest diagnostyka ubytków próchnicznych. W diagnostyce tego schorzenia lepsze jest badanie rentgenologiczne. W przebiegu procesu próchniczego dochodzi do ubytków substan-

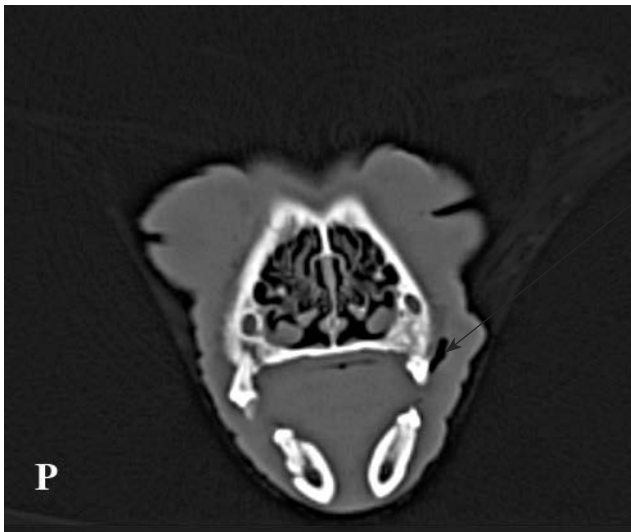




ubytki cienia oraz nieostre kontury zęba (lewy kieł)

**Rycina 1. Zdjęcie rentgenowskie**

Źródło: opracowanie własne.



jama wypełniona płynem (ropień okołożębowy)

**Rycina 2. Obraz z tomografu komputerowego**

Źródło: opracowanie własne.

cji mineralnych, co wykorzystuje diagnostyka rentgenowska. Wiązka promieni X jest osłabiana przez znajdujące się na jej drodze tkanki. Miejsca bez substancji mineralnych lub z mniejszą ich gęstością słabiej zatrzymują promienie rentgenowskie i większa ich część dociera do detektora (pola ciemniejsze na radiogramie – przejaśnienia

radiologiczne). Natomiast zdrowe części zęba są jaśniejsze na polu obrazowania (Krzyżostaniak 2012). W badaniu, które zostało przeprowadzone w Katedrze Diagnostyki, ubytki próchnicze były bardziej uwidocznione w obrazie z aparatu rentgenowskiego niż z tomografu komputerowego. Zależność ta szczególnie była widoczna przy wczesnych zmianach próchnicznych. Przy głębokich ubytkach obie techniki miały porównywalne zastosowanie.

## Podsumowanie

Badanie rentgenowskie pozwala dokonać wstępnej oceny problemu diagnostycznego, tomografia komputerowa jest dopełnieniem tego procesu. Za pomocą aparatu rentgenowskiego otrzymujemy obraz dwuwymiarowy, na którym znajduje się mniej struktury w porównaniu do obrazu z tomografu komputerowego, gdy widzimy wizualizację trójwymiarową z większego obszaru. Mimo to istnieją jednostki chorobowe stanowiące wyjątek od tej reguły. Przykładem są zmiany próchnicze, które w badaniu przeprowadzonym w Katedrze Diagnostyki Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego były najczęściej obserwowaną patologią. Pozwala to wysnuć wniosek, że metoda ta jest metodą referencyjną w stosunku do wczesnego wykrywania ubytków próchnicznych oraz może być wykorzystywana do profilaktyki chorób zębów. Jest to temat do odrębnej analizy.

Porównując badanie z użyciem RTG w stosunku do badania z wykorzystaniem TC, trzeba stwierdzić, że pierwsze jest tańszym rozwiązaniem. Aparat rentgenowski jest również szybszym narzędziem do pracy, co potwierdza fakt, że jest stosowany rutynowo. Dodatkowo metoda ta, nie zawsze wymaga pełnego znieczulenia zwierzęcia, co także ogranicza koszty oraz czas diagnostyki. Tomografia komputerowa jest bardziej szczegółowym badaniem. Używa się jej przy zabiegu umieszczenia implantów zębowych, w schorzeniach stawu skroniowo-żuchwowego, w ocenie uszkodzeń okolicznych tkanek spowodowanych schorzeniem zębów oraz przyzębia lub w diagnostyce wad rozwojowych zębów. W porównaniu do poprzedniej metody ta jest mniej korzystna pod względem ekonomicznym. Dodatkowo w wielu przypadkach nie jest konieczna do postawienia ostatecznej diagnozy.

Badanie potwierdziło, że obie techniki obrazowania są równie ważne w pracowni stomatologicznej. Podstawą do pracy w każdym gabinecie zajmującym się chorobami zębów oraz przyzębia małych zwierząt jest posiadanie aparatu rentgenowskiego. W późniejszym etapie rozwoju przychodni warto jest zaopatrzyć ją w tomograf komputerowy. Będzie on dopełnieniem codziennej pracy stomatologa, a dodatkowo pozwoli na rozszerzenie zakresu świadczonych usług przez gabinet stomatologiczny.

## Bibliografia

- Asgary S., Nourzadeh M., Eghbal M.J. 2016. Miniature Pulpotomy of Symptomatic Mature Permanent Teeth: A Report of Two Cases. *Iranian Endodontic Journal*, t. 11(1): 75–78.
- Barańska-Gachowska M. 2004. Endodoncja wieku rozwojowego i dojrzałego.
- Bellows J. 2017. Podstawy stomatologii weterynaryjnej. Cz. I. *Weterynaria po Dyplomie* Nr 2.
- Bunchann L.S. 1996. One-visit endodontics: a new model of reality. *Dent Today* nr 15: 36–43.
- Chisini L.A., Muniz Conde C., Britto Corea M., Dantas R.V.F., Silva A.F., Pappen F.G., Demarco F.F. 2015. Vital Pulp Therapies in Clinical Practice: Findings from a Survey with Dentist in Southern Brazil. *Brazilian Dental Journal*, t. 26 (6): 566–571.
- Correl C. 2011 *Stomatologia małych zwierząt. Seria: Praktyka lekarza małych zwierząt*, Elsevier Urban & Partner: 13–268
- Harvey C.E., Emily P. P. 1993. *Small Animal Dentistry*. Mosby: 156–196.
- Hauman C.H.J., Love R.M. 2003. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *International Endodontic Journal* 36: 75–85.
- Holland R., Sant'anna Junior A., Souza de V., Otoboni Fihlo J.A., Bernabe P.F.E., Nery M.J., Murata S.S. 2005. Influence of Apical Patency and Filling Material on Healing Process of Dogs' Teeth with Vital Pulp After Root Canal Therapy. *BrazDent Journal* t. 16.
- Holmstrom S.E. 2013. *Veterinary dentistry a team approach*. Elsevier Saunders: 313–325.
- Krzyżostaniak J. 2012. Ocena przydatności badania rentgenowskiego metodą tomografii stożkowej CBCT w diagnostyce wczesnych zmian próchnicowych zębów – warunki in vitro. *Rozprawa doktorska*.
- Kupczyńska M., Barszcz K., Wąsowicz M., Wielądek A. 2009. Uzębienie psów typu brachycefalicznego. *Medycyna Weterynaryjna*, t. 65: 334–339.
- Martins J.N.R., Saura M., Pagona A. 2011. One appointment endodontic procedure on teeth with apical periodontitis: Is this a criterion for success? A literature review. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentaria e Cirurgia Maxilofacial*, t. 52: 181–186.
- Menezes R., Bramante C.M., Letra A., Gomes Carvalho V.G., Brandao Garcia R. 2004. Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements as wound dressing. *OOOOE journal*, t. 98.
- Polakowska I., Orzelski M. 2007. Przypadek pourazowego zwichnięcia zęba u psa. *Medycyna Weterynaryjna*, t.63: 1200–1203.
- Silva da L.A.B., Carvalho de F.K., Nelson-Fihlo P. 2009. Direct pulp capping with self-etching adhesive system: Histopathologic evaluation in dogs' teeth, *OOOOE Journal*, t. 108.
- Tutt C. 2008. *Stomatologia małych zwierząt*. I wyd. polskie, Elsevier Urban & Partner: 4–7, 213–227.

## ABSTRACT

### USEFULNESS OF SELECTED IMAGING TECHNIQUES IN DIAGNOSTICS OF TOOTH DISEASES OF DOGS AND CATS

Veterinary dentistry is a rare specialty in the treatment of animals. Due to the growing awareness of the owners, this field is developing. Dogs and cats, like most mammals, have both milk and

permanent teeth. The deciduous dentition develops during embryogenesis and in the period of fetal development, while permanent teeth are formed in the prenatal and unborn period. A dog has 42 permanent teeth and 28 milk teeth, while a cat has 30 permanent teeth and 26 milk teeth. Each tooth has a characteristic shape and size depending on the species. Due to the influence of the environment, poor nutrition and frequent owner neglect, companion animals suffer from numerous diseases of the teeth, periodontium and oral cavity. The characteristic symptoms of these disorders are: apathy, loss of appetite, change in food intake, weight loss, increased internal body temperature, bleeding from the mouth, craniofacial symmetry disturbance, unpleasant smell from the mouth and sore mouth on palpation. A dental patient requires a thorough examination and precise diagnosis. Of particular importance in the diagnosis of pathological conditions of the teeth and periodontal play a diagnostic imaging technique. The main role is played by the X-ray machine and the computer tomograph. The aim of the study was to evaluate the usefulness of selected imaging techniques in the diagnosis of diseases of the teeth.

In the Department of Clinical Diagnostics at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, a study was carried out on 10 dogs and 10 cats showing typical dental symptoms. All patients were clinically examined and then subjected to imaging diagnostics using an X-ray machine and a computer tomograph.

X-ray examination allows for a preliminary assessment of the diagnostic problem, computed tomography completes this process. Using the X-ray obtain two-dimensional image, which is less compared to the structures of the CT image, where we can see the three-dimensional visualization of a larger area. Nevertheless, X-ray examination is a cheaper solution, faster and used routinely. Computed tomography is a more detailed study. It is used in the procedure of placing dental implants, in diseases of the temporomandibular joint, in the assessment of damage to the surrounding tissues caused by tooth and periodontal disease, or in the diagnosis of malformations of the teeth. The study confirmed that both imaging techniques are equally important in the dental laboratory.

**Słowa klucze:** stomatologia weterynaryjna, aparat rentgenowski, tomograf komputerowy

**Keywords:** veterinary dentistry, x-ray machine, computer tomograph

**Jakub Osypiuk**

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Koło Naukowe „Żywnienie Zwierząt”

Opiekun koła: dr hab. Kazimierz Obremski, prof. UWM

## **WPŁYW NISKICH POZIOMÓW ZEARALENONU NA AKTYWNOŚĆ FOSFATAZY ALKALICZNEJ (ALP) W TRZUSTCE ŚWIŃ**

### **Wstęp**

Zearalenon (ZEN) jest niesteroidową, estrogeną mikotoksyną, biosyntetyzowaną drogą poliketydową przez różne gatunki grzybów polowych, m.in.: *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium cerealis*, czy *Fusarium equiseti* (Bennett, Klich 2003). ZEN jest pełnym agonistą receptora estrogenowego  $\alpha$  (ESR1) oraz częściowym agonistą receptora estrogenowego  $\beta$  (ESR2) (Zinedine i in. 2007). Z tego powodu ZEN i jego analogi stanowią ważną grupę substancji zaburzających gospodarkę hormonalną i podobnie jak  $17\beta$ -estradiol (E2) wpływają na reprodukcję. ZEN jest powodem hyperestrogenizmu i zaburzeń fizjologii w układzie rozrodczym (Obremski i in. 2003; Zwierzchowski i in. 2005), problemów z zapłodnieniem, implantacją zarodka i rozwojem płodu. Kolejnymi skutkami narażenia na ZEN są zakłócenia prawidłowego przebiegu cyklu owulacyjnego oraz redukcja masy ciała zwierząt domowych, szczególnie świń i szczurów (Zinedine i in. 2007). Obecność receptorów estrogenowych w komórkach układu immunologicznego sprawia, że stają się one dla ZEN kolejnym z celów oddziaływania (Marin i in. 2011). Poza działaniem estrogennym liczne badania wykazały, że ZEN jest induktorem stresu oksydacyjnego, nadprodukcji reaktywnych form tlenu (RTF), co w konsekwencji prowadzi do zaburzenia równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej.

W 2006 roku UE wprowadziła zalecenia dotyczące granicznych ilości ZEN w paszach dla zwierząt. Przyjęto dla dorosłych świń wartość 250  $\mu\text{g}$  ZEN/kg paszy/dzień, natomiast dla loch i prosiąt – 100  $\mu\text{g}$  ZEN/kg paszy/dzień (European Commission 2006). Morfometryczne badania sromu i macicy, narządów najbardziej wrażliwych

na oddziaływanie ZEN, umożliwiły ustalenie wartości NOAEL (poziomu niewywołującego dające się zaobserwować szkodliwe skutki, ang. no-observed-adverse-effect level) wynoszącą 10,4 µg ZEN/kg mc/dzień dla prosiąt (EFSA CONTAM Panel 2014).

Trzustka to organ pełniący funkcję wewnątrzwydzielniczą, jak i zewnątrzwydzielniczą. Część wewnątrzwydzielnicza jest przede wszystkim powiązana z kontrolą poziomu glukozy przez obecne w obrębie wysp Langerhansa komórki  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  i PP, które zajmują się produkcją odpowiednio: glukagonu, insuliny, somatostatyny i polipeptydu trzustkowego. Z czynnościami przewodu pokarmowego powiązana jest część zewnątrzwydzielnicza trzustki. Trzustka produkuje ważne dla procesu trawienia enzymy, do których zaliczamy: enzymy trawiące białka (trypsyna, chymotrypsyna i erepsyna) oraz kolagen (elastaza), kwasy nukleinowe (rybonukleaza, dezoksyrybonukleaza), tłuszcze (lipaza), cukry (amylaza trzustkowa) rozkładające poszczególne związki na prostsze substancje, umożliwiając ich wchłanianie w jelicie cienkim. Dodatkowo również wodorowęglany, które mają zdolność neutralizowania, pochodzącej z żołądka, kwaśnej treści pokarmowej (Burnstock, Novak 2013). W większości tkanek organizmu występują receptory estrogenowe, w związku z tym i trzustka jest jednym z obiektów oddziaływania ZEN. (Tiano, Mauvais-Jarvis 2012).

Fosfatazy alkaliczne (ALP) są spotykane zarówno u organizmów prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Są one najczęściej ograniczone do powierzchni komórki. ALP może posiadać ekspresję w prawie wszystkich ssących tkankach, jest wskaźnikiem monitorowanym przy chorobach kości oraz wątroby i specjalizuje się w hydrolizie monofosforanowych estrów przy wysokim optimum pH. Wpływ i zadania ALP w organizmie są więc bardzo szerokie. Fosfataza jelitowa (IAP) pełni istotną rolę w regulowaniu wydzielania wodorowęglanów, regulacji mikrobów jelitowych, defosforylacji prozapalnych nukleotydów oraz unieszkodliwiania lipopolisacharydów (LPS). Zmniejszenie aktywności ALP w jelitach może prowadzić do znacznego zwiększenia ryzyka chorób układu pokarmowego. Wykazano, że egzogenna ALP działa również obronnie przeciwko chorobom ogólnoustrojowym. Parametry biochemiczne są wrażliwym wskaźnikiem zmian spowodowanych działaniem ksenobiotyków i mogą stanowić ważne narzędzie diagnostyczne w badaniach toksykologicznych, dlatego przyjmuje się, że aktywność ALP jest markerem procesów różnicowania zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* dla poszczególnych typów komórek.

## Cel

Celem przeprowadzonych badań było ustalenie, jak ekspozycja samic prosiąt na ZEN w dawkach 5 µg/kg m.c. (50% NOAEL), 10 µg/kg m.c. (100 % NOAEL) i 15 µg/kg m.c. (150% NOAEL) wpływa na aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) w trzustce świń.

## Material i metody

Doświadczenie na loszkach przeprowadzone zostało zgodnie z polskimi przepisami określającymi zasady i warunki doświadczeń na zwierzętach (Zgoda Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach Nr 12/2016 I 45/2016/DLZ z dnia 27 kwietnia 2016 i 30 listopada 2016).

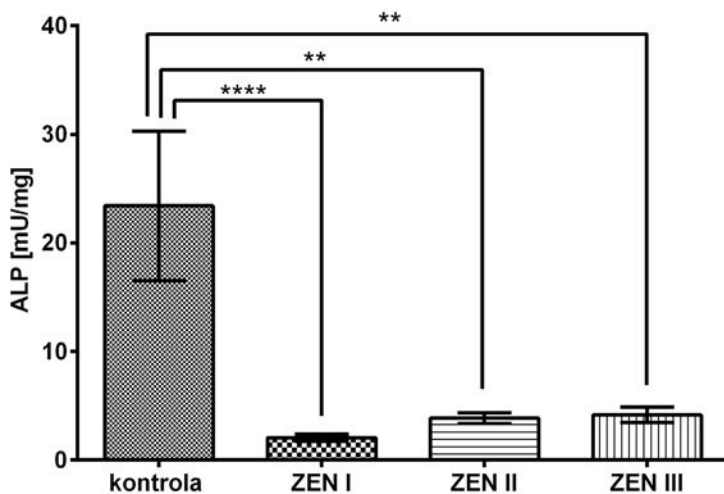
W doświadczeniu użyto 20 sztuk loszek o masie ciała  $14,5 \pm 2$  kg. Świnie aklimatyzowane były przez tydzień w doświadczalnych pomieszczeniach dla zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Zwierzęta utrzymywane w kojcach ze stałym dostępem do wody i paszy podzielono na cztery grupy: kontrolną ( $n=5$ ), która otrzymywała żelatynowe kapsułki pozbawione ZEN, oraz na trzy grupy eksperymentalne (po  $n=5$ ), które otrzymywały po  $5 \mu\text{g}$  ZEN/kg m.c. (dawka I) (Z2125-25MG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),  $10 \mu\text{g}$  ZEN/kg m.c. (dawka II) i  $15 \mu\text{g}$  ZEN/kg m.c. (dawka III). ZEN rozpuszczony był w 96-procentowym etanolu (SWW 2442-90, Polskie Odczynniki SA, Polska), następnie umieszczony na nośniku paszy umieszczonym w żelatynowych kapsułkach.

W dwudziestym ósmym dniu doświadczenia świnie z każdej grupy traktowano azaperonem (Stresnil, Jansen Pharmaceutica NV, Belgia,  $4 \text{ mg/kg}$  masy ciała, im), po 15 minutach uśpiono przy pomocy śmiertelnej dawki pentobarbitalu sodu (Morbital, Biowet Puławy, Polska,  $0,6 \text{ ml/kg}$  masy ciała, iv). Natychmiast po eutanazji fragmenty trzustki zebrano i przechowywano w temperaturze  $-80^\circ\text{C}$  aż do czasu analizy. W celu ekstrakcji ALP pobrano  $1 \text{ g}$  materiału tkankowego trzustki i homogenizowano z  $2,5 \text{ ml}$  buforu do ekstrakcji [PBS ( $137 \text{ mM NaCl}$ ,  $2,7 \text{ mM KCl}$ ,  $8,1 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $1,5 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ );  $0,5\%$  cytrynian sodu;  $0,05\%$  (POCH, Poland); Tween 20 (Sigma Aldrich, USA); inhibitory proteaz (Ref 11 697 498 001, Roche)], za pomocą homogenizatora (Omni-Tips™ Disposable, Omni International). Uzyskany homogenat wirowano ( $8600 \text{ g}$ ) przez godzinę (wirówka Eppendorf 5804R), a uzyskane próbki supernatantów przechowywano w temperaturze  $-80^\circ\text{C}$  do czasu wykonania oznaczeń. Oznaczenia aktywności ALP w próbkach homogenatów wykonano metodą Matsushita i in. (2007), a uzyskane wyniki przeliczono na  $1 \text{ mg}$  białka oznaczonego według metody Bradford (1976).

Uzyskane wyniki pomiarów poddano analizie statystycznej za pomocą programu Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software, USA). Dla wszystkich badanych grup wyliczono wartości średnie i standardowy błąd średniej (SEM), a różnice pomiędzy średnimi analizowano za pomocą testu dwuczynnikowego Anova z analizą post-hoc Tukeya. Wartości  $P < 0,05$  uznano za istotne statystycznie.

## Wyniki

Pomiar aktywności ALP w trzustkach świń przedstawiono na rycinie 1. W przeprowadzonych badaniach zaobserwowany został duży spadek aktywności fosfatazy alkalicznej, zależny od podawanej dawki ZEN. Aktywność ALP u loszek z grupy kontrolnej wyniosła  $23,42 \pm 6,87$  mU/mg. W przypadku grupy pierwszej traktowanej  $5 \mu\text{g ZEN/kg m.c.}$  (dawka I) doszło do spadku aktywności do  $2,06 \pm 0,34$  mU/mg (statystycznie istotny spadek w porównaniu do kontroli,  $P < 0,0001$ ). U loszek z drugiej grupy, traktowanych dawką  $10 \mu\text{g ZEN/kg m.c.}$  (dawka II), doszło do spadku do poziomu  $3,87 \pm 0,48$  mU/mg (statystycznie istotny spadek w porównaniu do kontroli,  $P < 0,01$ ). W trzeciej grupie traktowanej najwyższą dawką zearalenonu  $15 \mu\text{g ZEN/kg m.c.}$  (dawka III) aktywność fosfatazy alkalicznej spadła do poziomu  $4,16 \pm 0,72$  (statystycznie istotny spadek w porównaniu do kontroli,  $P < 0,01$ ).



Rycina 1. Aktywność fosfatazy alkalicznej, ALP (mU/mg) w trzustce loszek: kontrola, ZEN I ( $5 \mu\text{g/kg m.c.}$ ), ZEN II ( $10 \mu\text{g/kg m.c.}$ ) i ZEN III ( $15 \mu\text{g/kg m.c.}$ ). Wyniki przedstawiono, jako średnią  $\pm$  SEM. Różnice istotne statystycznie określono na poziomie \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*\*  $P < 0,0001$ .

Źródło: opracowanie własne.

## Dyskusja

ZEN jest cytotoksyczny (Kouadio i in. 2005) dla wątroby, śledziony (Tiemann i in. 2008), jelit (Liew, Mohd-Redzwan 2018) i komórek krwiotwórczych (Yang i in. 2016). Indukuje wytwarzanie RFT, czego skutkiem jest wewnątrzkomórkowy stres oksyda-



cyjny, który ma następnie działanie cytotoksyczne i genotoksyczne (Pietsch i in. 2014). Wykazano, że RFT regulują indukowane przez ZEN zatrzymanie cyklu komórkowego i apoptozę przez wywoływanie stresu oksydacyjnego w retikulum endoplazmatycznym (ER) (Zheng i in. 2018). Mitochondria są również w stanie indukować apoptozę przez zmianę potencjału redoks komórek przez zwiększenie produkcji RFT (Lee i in. 2018).

Stres w ER prowadzi do aktywacji trzech transbłonowych białek sygnałowych: PERK, IRE1 i ATF6 (Sovolyova i in. 2014). Stres ER aktywuje specyficzny molekularny chaperon GRP78, znany również jako Bip, podczas gdy CHOP jest apoptotycznym czynnikiem transkrypcyjnym, który ulega ekspresji na niskim poziomie przy braku bodźców. Kiedy komórka jest wystawiona na działanie stresora, jakim w naszym przypadku był ZEN, ekspresja CHOP jest podwyższona (Endo i in. 2006). Jeśli stres ER utrzymuje się lub jest zbyt silny, aby powrócić do homeostazy, komórki będą podążać ścieżką proapoptotyczną, którą właśnie uruchamia ZEN (Obremski, Poniatowska-Broniek 2015).

Fosfatazy alkaliczne to nadrodzina metaloenzymów, o których wiadomo, że katalizują hydrolityczne usuwanie fosforanów z różnych cząsteczek (Hoylaerts i in. 1997). Rodzina AP ssaków składa się z kilku izoenzymów, które można sklasyfikować jako AP niespecyficzne tkankowo (TNAP) wykazujące ekspresję w kościach, wątrobie i nerkach oraz AP specyficzne tkankowo, jelitowe, łożyskowe i zarodkowe (Hoylaerts i in. 1997; Yang i in. 2012). Przykładowo alkaliczna fosfataza jelitowa (IAP) wykazuje aktywność biologiczną w warunkach alkalicznych, z największą aktywnością przy pH 9,7 (Lallès 2010). IAP posiada ekspresję w całym przewodzie pokarmowym, z największym nasileniem w dwunastnicy i w znacznie mniejszym stopniu w jelicie czczym, jelicie krętym i okrężnicy, ale wykryto ją również w prostnicy. Wykazano, że IAP hamuje aktywację jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B i jego translokację do jądra, zapobiegając w ten sposób ekspresji cytokin prozapalnych (Martínez-Moya i in. 2012). Powszechnie przyjmuje się NF- $\kappa$ B pośredniczy głównie w aktywacji indukowanej syntezie NO indukowanej przez IL-1 $\beta$  lub inne cytokiny w komórkach  $\beta$  trzustki (Ortis i in. 2006). Trwała aktywacja NF- $\kappa$ B indukuje utrzymujący się spadek ekspresji białek swoistych dla komórek  $\beta$ , w tym insuliny, transporter glukozy GLUT-2 i czynnik 1 promotora insuliny PDX-1, przy jednoczesnym wzroście ekspresji indukowalnej syntetazy tlenu azotu iNOS (Papaccio i in. 2005). IAP jest endogennym czynnikiem przeciwzapalnym, który, jak się uważa, występuje wyłącznie w jelitach. Myszy bez IAP są bardziej podatne na rozwój zespołu metabolicznego i hiperglikemii. Biorąc jednak pod uwagę embriologiczny związek między nabłonkiem jelit a trzustką, zbadaliśmy ekspresję AP w trzustkowych komórkach  $\beta$  świń narażonych na ZEN w dawkach 50%, 100% i 150% wartości NOAEL.

ZEN jest substancją chemiczną, którą zaliczamy do tzw. związków zaburzających gospodarkę hormonalną (EDC), działających bezpośrednio na funkcję układu hormonalnego i mogących hamować uwalnianie i działanie hormonów związanych z metabolizmem organizmu. Przyjmuje się, że EDC ze względu na duże powinowactwo do ER $\alpha$  (Estrogen Receptor Alpha – receptor estrogenowy alfa) i ER $\beta$  (Estrogen Receptor Beta – receptor estrogenowy beta) mogą wpływać na funkcje trzustki.

Jak wcześniej zauważono, ALP ma szczególnie wysoką aktywność w komórkach proliferujących. W trzustce w stanie normalnym jedną z populacji komórek, szczególnie istotną dla prawidłowej fizjologii tkanki, są makrofagi tkankowe, zwane także rezydentnymi, o pochodzeniu embrionalnym i/lub płodowym. Są odpowiedzialne za zarządzanie komórkami budującymi tkankę trzustkową i mają właściwości populacji samoodnawiającej, często ulegającej podziałom (Citro i in. 2021). ZEN jako czynnik toksyczny upośledza działanie tych makrofagów, powodując ich apoptozę, lub zmniejsza intensywność mitotyczną oraz zaburza regenerację narządu. Tym samym spada również aktywność enzymatyczna ALP jako markera komórek proliferujących. Oczywiście stan ten może mieć daleko idące konsekwencje, np. w postaci usuwania komórek nieprawidłowo zbudowanych/funkcjonujących, jak również procesu regeneracji uszkodzeń w trzustce.

## Podsumowanie

Uzyskane wyniki badań pozwalają stwierdzić, że dwudziestoosmiodniowa ekspozycja samic prosiąt na ZEN w dawkach 50%, 100% i 150% wartości NOAEL wpływa na obniżone aktywności ALP w trzustce świń. Znaczący spadek aktywności ALP z uwagi na rolę pełnioną przez ten enzym w procesie proliferacji i różnicowania komórek, poprzez regulację metabolizmu fosforu, może znacząco obniżyć intensywność procesów proliferacyjnych w trzustce. Opierając się na dostępnych danych literaturowych wskazujących na hamujący wpływ ZEN na syntezę białka, można wnioskować, że obniżona aktywność ALP w grupach doświadczalnych jest powodowana oddziaływaniem ZEN.

## Bibliografia

- Bennett J., Klich M. 2003. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16: 497–516.
- Bradford M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.
- Burnstock G., Novak I. 2013. Purinergic signalling and diabetes. *Purinergic Signal.*, 9: 307–324.
- Citro A, Campo F, Dugnani E, Piemonti L. 2021. Innate Immunity Mediated Inflammation and Beta Cell Function: Neighbors or Enemies? *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 8;11:606332.
- EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain)., 2014. Scientific Opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. *EFSA J.*;12: 3916.
- Endo M., Mori M., Akira S., Gotoh T. 2006. C/EBP homologous protein (CHOP) is crucial for the induction of caspase-11 and the pathogenesis of lipopolysaccharide-induced inflammation. *J. Immunol.*, 176: 6245–6253.

- Hoylaerts M., Manes T., Millán J. 1997. Mammalian alkaline phosphatases are allosteric enzymes. *J. Biol. Chem.*, 5: 22781–22787.
- Kouadio J., Mobio T., Baudrimont I., Moukha S., Dano S., Creppy E. 2005. Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology*, 213: 56–65.
- Lallès J.P. 2010. Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. *Nutr. Rev.*, 68: 323–332.
- Lee Y., Lin K., Wu B., Chuang S., Wu W., Lee Y., Ho W., Juan Y. 2018. Epigallocatechin-3-gallate alleviates bladder overactivity in a rat model with metabolic syndrome and ovarian hormone deficiency through mitochondria apoptosis pathways. *Sci. Rep.*, 8: 53–58.
- Liew W., Mohd-Redzwan S. 2018. Mycotoxin: Its Impact on Gut Health and Microbiota. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 26:8: 60.
- Liu M., Gao R., Meng Q., Zhang Y., Bi C., Shan A. 2014. Toxic effects of maternal zearalenone exposure on intestinal oxidative stress, barrier function, immunological and morphological changes in rats. *PLoS ONE*, 9:106412.
- Marin D., Taranu I., Burlacu R., Manda G., Motiu M., Neagoe I., Dragomir C., Stancu M., Calin L. 2011. Effects of zearalenone and its derivatives on porcine immune response. *Toxicol. In Vitro*, 25: 1981–1988.
- Martínez-Moya P., Ortega-González M., González R., Anzola A., Ocón B., Hernández-Chirilaque C., López-Posadas R., Suárez M., Zarzuelo A., Martínez-Augustin O., Sánchez de Medina F. 2012. Exogenous alkaline phosphatase treatment complements endogenous enzyme protection in colonic inflammation and reduces bacterial translocation in rats. *Pharmacol. Res.*, 66: 144–153.
- Matsushita M., Irino T., Kamiyama K., Muramoto Y., Kawaguchi T., Nakano T., Komoda T. 2007. Evaluation of a method for measuring tissue non-specific alkaline phosphatase activity in healthy subjects. *Ann. Clin. Biochem.*, 44: 544–548
- Obremski K., Gajecki M., Zwierzchowski W., Zielonka L., Otrocka-Domagala I., Rotkiewicz T., Mikolajczyk A., Gajecka M., Polak M., 2003. Influence of zearalenone on reproductive system cell proliferation in gilts. *Pol. J. Vet. Sci.*, 6: 239–245.
- Obremski K., Poniatowska-Broniek G. 2015. Zearalenone induces apoptosis and inhibits proliferation in porcine ileal Peyer's patch lymphocytes. *Pol. J. Vet. Sci.*, 18: 153–161.
- Ortis F., Cardozo A., Crispim D., Störling J., Mandrup-Poulsen T., Eizirik D. 2006. Cytokine-induced proapoptotic gene expression in insulin-producing cells is related to rapid, sustained, and nonoscillatory nuclear factor- $\kappa$ B activation. *Mol. Endocrinol.*, 20: 1867–1879.
- Papaccio G., Graziano A., D'Aquino R., Valiante S., Naro F. 2005. A biphasic role of nuclear transcription factor (NF)- $\kappa$ B in the islet beta-cell apoptosis induced by interleukin (IL)-1 $\beta$ . *J. Cell Physiol.*, 204: 124–130.
- Pietsch C., Noser J., Wettstein F.E., Burkhardt-Holm P. 2014. Unraveling the mechanisms involved in zearalenone-mediated toxicity in permanent fish cell cultures. *Toxicol. Off. J. Int. Soc. Toxinology*, 88: 44–61.
- Sovolyova N., Healy S., Samali A., Logue S. 2014. Stressed to death—Mechanisms of ER stress-induced cell death. *Biol. Chem.*, 395:1–13.
- Tiano J., Mauvais-Jarvis F. 2012. Molecular mechanisms of estrogen receptors' suppression of lipogenesis in pancreatic  $\beta$ -cells. *Endocrinology*, 153: 2997–3005.
- Tiemann U., Brussow K., Dannenberger D., Jonas L., Pohland R., Jage, K., Danick, S., Hagemann E. 2008. The effect of feeding a diet naturally contaminated with deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) on the spleen and liver of sow and fetus from day 35 to 70 of gestation. *Toxicol. Lett.*, 179:113–117.

- Tiidus P. 1998. Radical species in inflammation and overtraining. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 76: 533–538.
- Yang L., Yang W., Feng Q., Huang L., Zhang G., Liu F., Jiang S., Yang Z., 2016. Effects of purified zearalenone on selected immunological measurements of blood in post-weaning gilts. *Anim. Nutr.*, 2: 142–148.
- Yang Y., Wandler A., Postlethwait J., Guillemin K. 2012. Dynamic Evolution of the LPS-Detoxifying Enzyme Intestinal Alkaline Phosphatase in Zebrafish and Other Vertebrates. *Front Immunol.*, 12: 314.
- Zheng W., Wang B., Wang L., Shan Y., Zou H., Song R., Wang T., Gu J., Yuan Y., Liu X., Zhu G., Bai J., Liu Z., Bian J. 2018. ROS-Mediated Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induced by Zearalenone in Mouse Sertoli Cells via ER Stress and the ATP/AMPK Pathway. *Toxins (Basel)*, 10: 24.
- Zinedine A., Soriano J., Molto J., Manes J. 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.*, 45: 1–18.
- Zwierzchowski W., Przybyłowicz M., Obremski K., Zielonka Ł., Skorska-Wyszyńska E., Gajęcka M., Polak M., Jakimiuk E., Jana B., Rybarczyk L., Gajęcki M. 2005. Level of zearalenone in blood serum and lesions in ovarian follicles of sexually immature gilts in the course of zearalenone mycotoxicosis. *Pol. J. Vet. Sci.*, 8: 209–218.

## Abstract

### EFFECT OF LOW ZEARELENONE LEVELS ON PORCINE PANCREATIC ALKALINE PHOSPHATASE (ALP) ACTIVITY

Biochemical parameters are a sensitive indicator of changes caused by the action of xenobiotics and can be an important diagnostic tool in toxicological studies. Zearalenone (ZEN) is an estrogenic mycotoxin, often found in animal feed, and therefore the source of many problems in feeding pigs. ALP activity is a marker of differentiation processes, both in vivo and in vitro, for particular cell types.

The aim of the conducted research was to determine how the exposure of female piglets to ZEN in doses of 5 µg/kg BW (50% NOAEL), 10 µg/kg bw (100% NOAEL) and 15 µg/kg BW (150% NOAEL) influence the activity of ALP in the pig pancreas.

In the experiment, 20 gilts with a body weight of  $14.5 \pm 2$  kg were used. Pigs were divided into four groups: control (n = 5) receiving ZEN-free gelatin capsules and three experimental groups (n = 5) receiving 5 µg ZEN/kg BW (dose I), 10 µg ZEN/kg BW (dose II) and 15 µg ZEN/kg BW (dose III). After 28 days of the experiment, fragments of the pancreas were collected from the gilts. Determinations of alkaline phosphatase activity were performed using the spectrophotometric method, and the obtained results were converted into 1 mg of protein determined according to the Bradford method.

In studies, a significant decrease in AP activity was observed in the pancreas of animals exposed to zearalenone. Due to the importance of AP in cell proliferation and differentiation (phosphorus metabolism), a decrease in the intensity of these processes should be noted. According to the literature, ZEN reduces protein synthesis, which may be the cause of the observed changes.

**Słowa kluczowe:** zearalenon, loszka, trzustka, fosfataza alkaliczna

**Keywords:** zearalenone, gilt, pancreas, alkaline phosphatase

**Jakub Osypiuk**

**Jakub Jasiak**

**Szymon Pokrzywka**

Uniwersytet Warmiński-Mazurski w Olsztynie

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Studenckie Koło Naukowe „Żywnienie zwierząt”

Opiekun koła: dr hab. Kazimierz Obremski, prof. UWM

## **ZMIANY AKTYWNOŚCI FOSFATAZY ALKALICZNEJ (ALP) W OKRĘŻNICY ZSTĘPUJĄCEJ ŚWIŃ NARAŻONYCH NA NISKI POZIOM ZEARALENONU**

### **Wstęp**

Mikotoksyny są substancjami szczególnie toksycznymi, które są produkowane głównie przez trzy rodzaje grzybów: *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* (Agriopoulou i in. 2020; Vila-Donat i in. 2018). Mikotoksyny zostały scharakteryzowane jako metabolity wtórne o niskiej masie cząsteczkowej (Vila-Donat i in. 2018). Mogą być patogenne lub saprofityczne i mogą pojawiać się w wielu kategoriach żywności (Ayofemi Olalekan Adeyeye 2020), a także w paszach (Vila-Donat i in. 2018).

Zearalenon (ZEN) to produkowana przez pleśń z rodzaju *Fusarium* mikotoksyna. Jest niesteroidowym metabolitem o właściwościach estrogennych (Richard 2007). ZEN często zanieczyszcza ziarna roślin takich, jak: kukurydza, jęczmień, ryż i pszenica na prawie wszystkich kontynentach (Streit i in. 2012). Budowa mikotoksyny, a zwłaszcza makrocykliczny pierścień laktonowy o układzie przestrzennym zbliżonym do hormonów sterydowych, zapewnia wysoką odporność na hydrolizę i redukcję. ZEN jest częściowym agonistą receptora estrogenowego  $\beta$  (ESR2) i pełnym agonistą receptora estrogenowego  $\alpha$  (ESR1). Wśród zwierząt gospodarskich na jego działanie szczególnie wrażliwe są samice prosiąt przed osiągnięciem dojrzałości płciowej. Po narażeniu na ZEN dochodzi u nich m.in. do obrzęku macicy, torbieli jajnikowych czy atrofii jajników (Jakimiuk i in. 2010). Rodzaj wywołanych efektów w dużym stopniu zależy od dawki mikotoksyny. Trwająca przez długi czas ekspozycja doprowadza do hyperestrogenizmu oraz przyczynia się do znacznego zwiększenia śmiertelności w stadzie. Badania

potwierdzają, że ZEN jest również silnym induktorem stresu oksydacyjnego (Liu i in. 2014). Prowadzi to do zwiększonej produkcji wolnych rodników tlenowych (RFT), które zaburzają mechanizmy regulujące i podstawowe funkcje komórki. W znaczącym stopniu utrudnia to utrzymanie homeostazy w komórkach i tkankach organizmu.

Od 2006 roku na obszarze UE obowiązują zalecenia co do granicznych ilości ZEN w paszach dla różnych gatunków zwierząt. Przyjęto, że dla dorosłych swni jest to wartość 250  $\mu\text{g}$  ZEN/kg paszy/dzień, a dla loch i prosiąt – 100  $\mu\text{g}$  ZEN/kg paszy/dzień (European Commission 2006). Badania morfometryczne narządów najbardziej wrażliwych na ZEN, tj. sromu i macicy, pozwoliły ustalić wartość NOAEL (poziom narażenia niewywołujący dających się zaobserwować szkodliwych skutków, ang. no-observed-adverse-effect level) wynoszący 10,4  $\mu\text{g}$  ZEN/kg mc/dzień dla prosiąt (EFSA CONTAM Panel 2014).

Fosfatazy alkaliczne (ALP) są enzymami spotykanymi zarówno u prokariota, jak i u eukariota, mającymi swoją ekspresję w większości tkanek ssaków (Bilski i in. 2017). Aktywność ALP jest ogólnie przyjętym markerem procesów różnicowania *in vivo*, jak i *in vitro* dla konkretnych typów komórek oraz wskaźnikiem monitorowania chorób zarówno wątroby, jak i kości. Jelitowa fosfataza alkaliczna (IALP) jest obecna w rąbku szczoteczkowym, a jej podstawową rolą jest hydroliza monofosforanowych estrów przy wysokim optimum pH, regulacja wydzielania wodorowęglanów czy defosforylacja nukleotydów prozapalnych (Geddes, Philpott 2008). IALP bierze również udział w regulacji liczebności mikroflory jelitowej oraz detoksykacji tkanek z lipopolisacharydów (LPS). Zmniejszenie aktywności ALP w układzie pokarmowym może przyczynić się do znacznego wzrostu ryzyka chorób układu pokarmowego.

## Cel

Celem doświadczenia było ustalenie, jak ekspozycja niedojrzałych płciowo samic prosiąt na ZEN w dawkach 50% NOAEL (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  m.c.), 100 % NOAEL (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  m.c.) i 150% NOAEL (15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  m.c.) wpływa na aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) w okrężnicy zstępującej.

## Materiał i metody

Doświadczenie uzyskało zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach (Nr 12/2016 i 45/2016/DLZ) i zostało przeprowadzone zgodnie z polskimi przepisami określającymi zasady i warunki doświadczeń na zwierzętach.

W eksperymencie wykorzystano łącznie dwadzieścia sztuk loszek (14,5  $\pm$  2 kg m.c.). Przed rozpoczęciem doświadczenia loszki aklimatyzowano przez siedem dni

w pomieszczeniach doświadczalnych dla zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Zwierzęta utrzymano w zagrodach ze stałym dostępem do wody. Losowo przydzielono je na grupę kontrolną (n=5) i trzy grupy eksperymentalne (ZEN I, ZEN II i ZEN III; n=5) i). Loszkom grupy ZEN I, ZEN II i ZEN III podawano doustnie ZEN (Z2125-26MG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) w dawce odpowiednio 5 µg, 10 µg i 15 µg ZEN/kg m.c. Odpowiednie dla świń dawki ZEN rozpuszczono w 96-procentowym etanolu (SWW 2442-90, Polskie Odczynniki SA, Polska) i umieszczono na nośniku paszy umieszczonym w żelatynowych kapsułkach. Przed podaniem otwarte kapsułki pozostawiono w temperaturze pokojowej celem odparowania etanolu. Kapsułki z ZEN podawano codziennie przed porannym karmieniem. W odstępach tygodniowych zwierzęta ważono w celu dostosowania dawki do osobnika. Przez cały okres eksperymentu loszkom podawano *ad libitum* paszę granulowaną, wolną od zanieczyszczeń mikotoksynami dwa razy dziennie o 8:00 i 17:00.

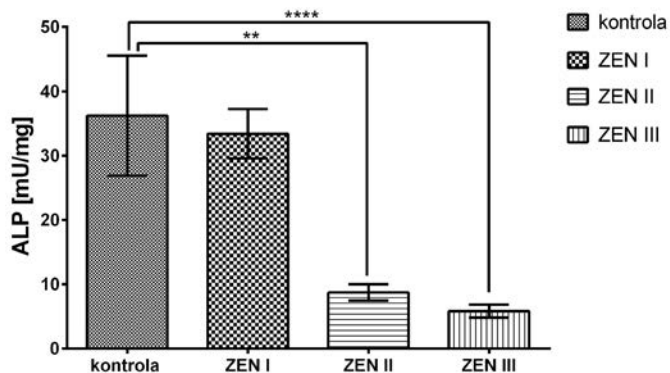
Do badań aktywności ALP wykorzystano próbki okrężnicy zstępującej pobrane od pięciu loszek z każdej z grup w 42 dniu ekspozycji na ZEN. Wcześniej loszki traktowano azaperonem (Stresnil, Jansen Pharmaceutica NV, Belgia, 4 mg/kg masy ciała, im) i po 15 minutach uśpiono za pomocą śmiertelnej dawki pentobarbitalu sodu (Morbital, Biowet Puławy, Puławy, Polska, 0,6 ml/kg masy ciała, iv). Pobrane próbki tkanek przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania analiz. Oznaczenia aktywności ALP w próbkach homogenatów wykonano metodą Matsushita i in. (2007). Oznaczenia zawartości IL-12 przeprowadzono przy użyciu komercyjnego testu ELISA Porcine IL-12/IL-23 p40 DuoSet ELISA, DY912 R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA. Pomiar wykonano spektrofotometrem płytkowym (TECAN Infinite M200, Männedorf, Switzerland), a uzyskane wyniki przeliczono na 1 mg białka oznaczonego według metody Bradford (1976).

Wyniki eksperymentu poddano analizie statystycznej za pomocą programu Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software, USA). Zarówno dla grupy kontrolnej, jak i doświadczalnych wyliczono wartości średnie i standardowy błąd średniej (SEM), a różnice pomiędzy średnimi analizowano za pomocą testu dwuczynnikowego Anova z analizą post-hoc Tukeya. Wartości  $P < 0,05$  uznano za istotne statystycznie.

## Wyniki

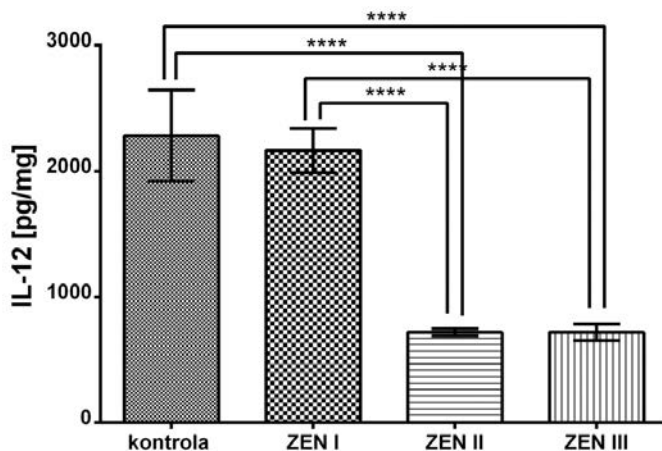
W wynikach badań można zaobserwować znaczący spadek aktywności ALP w okrężnicy zstępującej zależny od podawanej dawki ZEN. Aktywność fosfatazy alkalicznej u loszek z grupy kontrolnej wyniosła  $36,21 \pm 9,32$  mU/mg. W przypadku grupy pierwszej, której podawano 5 µg ZEN/kg m.c. (ZEN I), doszło do spadku aktywności do  $33,41 \pm 3,82$  mU/mg. U loszek z drugiej grupy, traktowanych dawką 10 µg ZEN/kg

m.c. (ZEN II), doszło do spadku do poziomu  $8,74 \pm 1,27$  mU/mg (statystycznie istotny spadek w porównaniu do kontroli,  $P < 0,01$ ). W trzeciej grupie przyjmującej najwyższą dawkę zearalenonu: 15  $\mu\text{g}$  ZEN/kg m.c. (ZEN III), aktywność fosfatazy alkalicznej



Rycina 1. Aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) w okřęnicy zstępującej świni narażonych na ZEN w dawce 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  m.c. (ZEN I), 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  m.c. (ZEN II) i 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  m.c. (ZEN III) (\*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*\*  $P < 0,0001$ )

Źródło: opracowanie własne.



Rycina 2. Stężenie interleukiny 12 (IL-12) w okřęnicy zstępującej świni narażonych na ZEN w dawce 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  m.c. (ZEN I), 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  m.c. (ZEN II) i 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  m.c. (ZEN III) (\*\*\*\*  $P < 0,0001$ )

Źródło: opracowanie własne.



spadła do poziomu  $5,84 \pm 0,99$  mU/mg (statystycznie istotny spadek w porównaniu do kontroli,  $P < 0,0001$ ).

W przebiegu eksperymentu można zaobserwować znaczący spadek stężenia IL-12 w ścianie okrężnicy zstępującej zależny od wysokości narażenia na ZEN. Stężenie IL-12 u loszek z grupy kontrolnej wyniosło  $2283,00 \pm 362,90$  pg/mg. W przypadku grupy ZEN I, której podawano  $5 \mu\text{g ZEN/kg m.c.}$ , doszło do spadku stężenia IL-12 tylko do poziomu  $2164,00 \pm 175,60$  pg/mg. U loszek z drugiej grupy, traktowanych dawką  $10 \mu\text{g ZEN/kg m.c.}$  (ZEN II), doszło do spadku stężenia IL-12 do poziomu  $719,00 \pm 28,72$  pg/mg (statystycznie istotny spadek w porównaniu do kontroli,  $P < 0,0001$ ). W trzeciej grupie przyjmującej najwyższą dawkę ZEN w ilości  $15 \mu\text{g ZEN/kg m.c.}$  (ZEN III) stężenie wydzielanej IL-12 spadło do poziomu  $718,70 \pm 65,48$  pg/mg (statystycznie istotny spadek w porównaniu do kontroli,  $P < 0,0001$ ).

## Dyskusja

Fizjologiczne funkcje jelita obejmują wchłanianie składników odżywczych, wykrywanie patogenów i utrzymanie homeostazy jelitowej (Segrist, Cherry 2020). Z uwagi na nieuniknione narażenie na obce substancje i patogeny drobnoustrojowe, przewód pokarmowy jest również uważany za kluczowe miejsce tworzenia RFT (Bhattacharyya i in. 2014). Jelitowy stres oksydacyjny odgrywa ważną rolę we wczesnym stadium uszkodzenia jelit. Działa jako czynnik aktywujący dysfunkcję bariery jelitowej, wywołując w ten sposób nierównowagę immunologiczną i stan zapalny (Han i in. 2016).

Bariera jelitowa jest złożona, składa się z wielu warstw i stanowi fizyczną oraz funkcjonalną barierę dla transportu treści światła do krążenia ogólnoustrojowego. Podczas gdy warstwa komórek nabłonka i zewnętrzna/wewnętrzna warstwa mucyny stanowią barierę fizyczną i są często określane jako bariera jelitowa, jelitowa ALP wytwarzana przez komórki nabłonkowe i białka przeciwbakteryjne wydzielane przez komórki Pannetha stanowi barierę funkcjonalną. Wiele chorób jelit jest inicjowanych i promowanych przez stres oksydacyjny, taki jak: choroby zapalne jelit (np. IBD), infekcje jelitowe, niedokrwienne uszkodzenie jelit i rak jelita grubego (Bhattacharyya i in. 2014).

Przeprowadzony na niedojrzałych samicach świń w okresie poodsadzeniowym eksperyment z podawaniem *per os* ZEN na poziomie 50%, 100% i 150% wartości NOAEL miał za zadanie ocenić dwa blisko ze sobą powiązane parametry. Były nimi ALP oraz IL-12/23p40. ALP jest enzymem, który uczestniczy w detoksyfikacji LPS oraz metabolizmie fosforu w komórkach, w naszym eksperymencie – w komórkach nabłonka okrężnicy zstępującej. Drugi to IL-12, cytokina wydzielana przez aktywowane za pomocą LPS makrofagi. Przyjmuje się, że wysoka aktywność ALP może również być wynikiem częstej proliferacji komórek, w tym wypadku mogą to być właśnie makrofagi. Zarówno aktywność ALP, jak i reakcja proliferujących makrofagów wydzielających

IL-12 są istotne w utrzymaniu właściwości barierowych nabłonka jelitowego. W doświadczeniu oceniono wpływ ZEN na okrężnicę zstępującą po 42 dniach ekspozycji na mikotoksynę. Zarówno aktywność ALP, jak i poziom IL-12 malały proporcjonalnie do wzrastającej dawki ZEN, co może praktycznie wpłynąć na zmniejszenie funkcji bariery jelitowej.

Funkcja bariery jelitowej ma kluczowe znaczenie dla prawidłowej homeostazy jelit (Vancamelbeke, Vermeire 2017), a uszkodzenie lub dysfunkcja tej bariery wiąże się z lokalnymi i ogólnoustrojowymi konsekwencjami w dużej mierze związanymi z bezpośrednim kontaktem bakterii/produktów bakteryjnych z komórkami nabłonka i ich translokacją do komórek nabłonka i krążenia ogólnoustrojowego. Bezpośredni kontakt z bakteriami/produktami bakteryjnymi prowadzić może do aktywacji komórek odpornościowych przez zależne od TLR4/MyD88 szlaki sygnałowe w błaszcze właściwej błony śluzowej w wyniku interakcji z LPS bakterii jelitowych, co skutkuje wydzielaniem mediatorów prozapalnych, które utrwalają miejscowy stan zapalny. ZEN może zwiększać poziom apoptozy, jak również zmniejszać proliferację komórek (Obremski, Poniatowska-Broniek 2015), a w tym wypadku może to dotyczyć właśnie makrofagów. Mikotoksyny, oddziałując na wewnątrzkomórkowe systemy biochemiczne, mogą hamować cały cykl komórkowy albo uszkadzać struktury wewnątrzkomórkowe. Zazwyczaj pierwotnym etapem działania jest hamowanie syntezy kwasów nukleinowych lub translacji. Taki stan może generować spadek proliferacji komórek, a jednocześnie za spadkiem intensywności mitoz może postępować zwiększona liczba apoptoz/nekroz w miejscu działania ZEN. Koncepcja badań wydała się istotna z powodu braku w literaturze tego typu danych oraz nasuwających się wątpliwości, czy jeżeli uchronimy zwierzęta przed estrogenym wpływem ZEN, to wykluczemy również inne negatywne jego oddziaływanie.

Procesy chemiczne obejmujące reakcję redoks wyzwalają komórkowy stres oksydacyjny i odgrywają kluczową rolę w patofizjologii stanu zapalenia (Liaudet i in. 2009; Nathan, Cunningham-Bussel 2013). Brak równowagi pomiędzy wolnymi rodnikami wytwarzanymi przez mikotoksyny a systemem obrony antyoksydacyjnej wywołuje lawinę szkodliwych efektów (Da Silva i in. 2008). Badania *in vitro* wykazały, że aflatoksyna B1 (AFB1) indukuje spadek ekspresji enzymów antyoksydacyjnych, takich jak: SOD, peroksydaza glutationowa (GSH-Px) i katalaza, powodując wzrost produktów ubocznych peroksydacji lipidów (dialdehyd malonowy; MDA) i poważny spadek związku antyoksydacyjnego, jakim jest glutation (GSH) (Da Silva i in. 2008). Taka sytuacja wskazuje, że niewystarczające zdolności tkanki do usuwania endogennie generowanego nadtlenu są rzeczywiście szkodliwe. Uszkodzenie bariery jelitowej wpływa na wzrost przepuszczalności dla antygenów pochodzących ze światła jelita, w tym bakteryjnych, m.in. LPS, te z kolei powodują pobudzenie reakcji makrofagów i komórek dendrytycznych. Obniżoną aktywność enzymów CAT, SOD, GSH-Px w osoczu i narządach zaobserwowano również, gdy odsadzone świnie karmiono dawką 320 ppb AFB1 (Taranu i in. 2019). Z kolei Ren i in. (2019), hodując limfocyty śledziony z dodatkiem różnych

stężeń DON, ZEA, stwierdzili, że stężenia SOD, CAT, GSH-Px i GSH zmniejszyły się w porównaniu do kontroli nawet w przypadku najniższych dawek.

LPS jest głównym składnikiem błony zewnętrznej bakterii i godne uwagi jest to, że organizm normalnie nie reaguje na wysokie stężenie LPS, który jest obecny w świetle jelita. Receptor TLR4 wykrywa LPS i inicjuje transkrypcję cytokin prozapalnych, które są kluczowymi regulatorami wstrząsu septycznego. TLR4 ma kluczowe znaczenie dla wykrywania atakujących bakterii i inicjowania odpowiednich odpowiedzi immunologicznych; jednak jego aktywacja musi być ściśle regulowana, ponieważ niewłaściwa aktywacja może prowadzić do rozległego niekontrolowanego stanu zapalnego, takiego jak ten obserwowany we wstrząsie septycznym. Na przykład ekspresja TLR4 jest regulowana przestrzennie, tak że nie występuje na wierzchołkowych powierzchniach komórek nabłonka jelitowego (Ortega-Cava i in. 2003), zapobiegając w ten sposób interakcji z bogatym w LPS środowiskiem jelita. Alternatywnie, aktywację TLR4 można złagodzić enzymatyczną modyfikacją przez LPS. W przypadku naszych badań wykazaliśmy, że spadek jelitowej aktywności ALP może stwarzać problem z utrzymaniem prawidłowej homeostazy mikroflory jelitowej i zwiększoną translokacją przez barierę śluzówkową jelita wynikającą ze zmniejszonej integralności bariery jelitowej.

## Podsumowanie

Zaobserwowany spadek aktywności ALP w okrężnicy zstępującej u świń narażonych na ZEN w dawkach NOAEL 50%, 100% i 150% świadczy o upośledzeniu funkcji barierowych w analizowanym fragmencie jelita. Jednocześnie taki stan może mieć wpływ na zaburzenie prawidłowej odpowiedzi immunologicznej w okrężnicy zstępującej świni.

## Bibliografia

- Agriopoulou S., Stamatelopoulou E., Varzakas T. 2020. Advances in Occurrence, Importance, and Mycotoxin Control Strategies: Prevention and Detoxification in Foods. *Foods*, 9: 137.
- Ayofemi Olalekan Adeyeye S. 2020. Aflatoxigenic fungi and mycotoxins in food: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 60: 709–721.
- Bhattacharyya A., Chattopadhyay R., Mitra S., Crowe S. 2014. Oxidative stress: An essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological Reviews*, 94: 329–354.
- Bilski J., Mazur-Biały A., Wojcik D., Zahradnik-Bilska J., Brzozowski B., Magierowski M., Mach T., Magierowska K., Brzozowski T. 2017. The Role of Intestinal Alkaline Phosphatase in Inflammatory Disorders of Gastrointestinal Tract. *Mediators Inflamm.*, 2017:9074601.

- Bradford M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.
- Da Silva E., Bracarense A., Oswald I. 2018. Mycotoxins and oxidative stress: Where are we? *World Mycotoxin J.*, 11: 113–134.
- EC (European Commission) Recommendation (2006) Commission recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Off J Eur Union L229*, 7–9 (23.8.2006).
- EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain)., 2014. Scientific Opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. *EFSA J.*;12: 3916.
- Geddes K., Philpott D.J. 2008. A new role for intestinal alkaline phosphatase in gut barrier maintenance. *Gastroenterology*, 135: 8–12.
- Han X., Yao W., Liu Z., Li H., Zhang Z., Hei Z., Xia Z. 2016. Lipoxin A4 preconditioning attenuates intestinal ischemia reperfusion injury through keap1/Nrf2 pathway in a lipoxin A4 receptor independent manner. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016:2016:9303606.
- Jakimiuk, E., Gajecka M., Jana B., Obremski K., Gajęcki M. 2010. Effect of zearalenone on steroid secretion by porcine follicular cells in mono- and coculture. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 54: 419–423.
- Liaudet L., Vassalli G., Pacher P. 2009. Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways. *Front. Biosci.*, 14: 4809–4814.
- Liu M., Gao R., Meng Q., Zhang Y., Bi C., Shan A. 2014. Toxic effects of maternal zearalenone exposure on intestinal oxidative stress, barrier function, immunological and morphological changes in rats. *PLoS One*. 9:e106412.
- Matsushita M., Irino T., Kamiyama K., Muramoto Y., Kawaguchi T., Nakano T., Komoda T. 2007. Evaluation of a method for measuring tissue non-specific alkaline phosphatase activity in healthy subjects. *Ann Clin Biochem.*, 44: 544–548.
- Nathan C., Cunningham-Bussel A. 2013. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat. Rev. Immunol.*, 13: 349–361.
- Obremski K., Poniatowska-Broniek G. 2015. Zearalenone induces apoptosis and inhibits proliferation in porcine ileal Peyer's patch lymphocytes. *Pol. J. Vet. Sci.*, 18: 153–161.
- Ortega-Cava C., Ishihara S., Rumi M., Kawashima K., Ishimura N., Kazumori H., Udagawa J., Kadowaki Y., Kinoshita Y. 2003. Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. *J. Immunol.*, 170: 3977–3985.
- Ren Z., Deng H., Deng Y., Liang Z., Deng J., Zuo Z., Hu Y., Shen L., Yu S., Cao S. 2017. Combined effects of deoxynivalenol and zearalenone on oxidative injury and apoptosis in porcine splenic lymphocytes in vitro. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 69: 612–617.
- Richard J.L. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – an overview. *Int. J. Food Microbiol.*, 119: 3–10.
- Segrist E., Cherry S. 2020. Using diverse model systems to define intestinal epithelial defenses to enteric viral infections. *Cell Host Microbe.*, 27: 329–344.
- Streit E., Schatzmayr G., Tassi P., Tzika E., Marin D., Taranu I., Tabuc C., Nicolau A., Aprodu I., Puel O., Oswald I. 2012. Current situation of mycotoxin contamination and cooccurrence in animal feed—focus on Europe. *Toxins (Basel)*, 4: 788–809.
- Taranu I., Marin D., Palade M., Pistol G., Chedea V., Gras M., Rotar C. 2019. Assessment of the efficacy of a grape seed waste in counteracting the changes induced by aflatoxin B1 contaminated diet on performance, plasma, liver and intestinal tissues of pigs after weaning. *Toxicon*, 162: 24–31.
- Vancamelbeke M, Vermeire S. 2017. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 11: 821–834.

Vila-Donat P, Marín S., Sanchis V., Ramos A. 2018. A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. *Food Chem. Toxicol.*, 114: 246–259.

Abstract

### **CHANGES IN ALKALINE PHOSPHATASE (ALP) ACTIVITY IN THE DESCENDING COLON OF PIGS EXPOSED TO LOW LEVELS OF ZEARELENONE.**

Zearalenone (ZEN) is one of the most common mycotoxins in the world. Alkaline phosphatase (ALP) is an enzyme belonging to the hydrolase family that catalyzes the breakdown of mono-phosphate esters. Its intestinal isoform plays an important role in inhibiting the inflammatory process in the intestine, maintaining microbiome homeostasis.

The aim of the studies was to assess the effect of ZEN in doses of 5, 10 and 15 µg/kg b.w. on the alkaline phosphatase activity of the descending colon wall of young female piglets. Colon samples were collected from gilts on day 28 of ZEN exposure and stored at -80 °C until analysis. Determination of ALP activity was performed using the spectrophotometric method.

In the studies, a decrease in the activity of ALP was observed, directly proportional to the dose of zearalenone. The activity of ALT showed a statistically significant decrease in the groups of piglets exposed to the dose of 10 and 15 µg ZEN / kg b.w.

Summarizing the above studies, it should be stated that the decrease in the activity of ALP by zearalenone indicates a suppression of the immune response in the pig's descending colon and a decrease in the activity of factors responsible for the tightness of the intestinal barrier.

**Keywords:** zearalenone, alkaline phosphatase, colon

**Urszula Ozga**

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Studenckie Koło Naukowe „Żywnienie zwierząt”

Opiekun koła: dr hab. Kazimierz Obremski, prof. UWM

## **AKTYWNOŚĆ PEROKSYDAZOWA W OKRĘŻNICY ZSTĘPUJĄCEJ ŚWIŃ TRAKTOWANYCH ZEARALENONEM**

### **Wstęp**

Mikotoksyny to toksyczne substancje chemiczne, wytwarzane przez grzyby pleśniowe należące do rodzajów *Aspergillus*, *Penicillium*, *Claviceps*, *Alternaria* i *Fusarium*. Pleśnie te rozwijają się w zbożach i produktach żywnościowych (np. orzechach i suszonych owocach). Obecnie zidentyfikowanych zostało kilkaset rodzajów mikotoksyn, jednakże pod względem ekonomicznym i toksykologicznym w skali europejskiej i światowej za najważniejsze uważane są: aflatoksyna B1, ochratoksyna A, deoksyniwalenol, zearalenon i fumonizyna B1 (Cheli i in. 2013). Mikotoksyny wykazują szerokie spektrum szkodliwego oddziaływania na organizm ludzki i zwierzęcy. Są hepatotoksyczne, nefrotoksyczne, kardiotoxyczne, dermatotoksyczne, immunotoksyczne i wykazują działanie estrogenne. Niektóre grzyby pleśniowe są zdolne do produkcji więcej niż jednej mikotoksyny, a niektóre z nich są produkowane przez więcej niż jeden gatunek pleśni, dlatego często w jednym produkcie występują różne mikotoksyny, co powoduje równoczesne toksyczne działanie wielu metabolitów wtórnych (Zain 2011).

Zearalenon (ZEN), zwany również jako również F-2 toksyna, pod względem chemicznym jest  $\beta$ -rezorcyno-laktonem. W swojej cząsteczce obok pierścienia rezorcynowego zawiera makrocykliczny pierścień laktonowy, którego układ przestrzenny jest podobny do układu hormonów sterydowych, dlatego zearalenon jest klasyfikowany jako niesteroidowy mykoestrogen. ZEN jest trzecią spośród najczęściej spotykanych w tkankach zwierząt i roślin (głównie w kukurydzy, jęczmieniu, owsie i ryżu) mikotoksyną wytwarzaną przez liczne gatunki *Fusarium*, głównie: *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. equiseti*, *F. cerealis*, *F. semitectum*, *F. crookwellense* (Gromadzka i in. 2016).

Pierwszą barierą fizjologiczną na drodze ZEN jest przewód pokarmowy, miejsce bardzo istotne dla organizmu, bo tam odbywa się trawienie i wchłanianie składników pokarmu (Obremski, Poniatowska-Broniek 2015). Stwierdzono, że w poszczególnych odcinkach jelit cienkich występują znaczne różnice w absorpcji ZEN-u i tak w jelicie czczym wchłania się on na poziomie 70–80%, to w jelicie krętym jest absorbowany tylko w ilości 15–30% (Avantaggiato i in. 2003). Metabolizm ZEN odbywa się w wątrobie i błonie śluzowej jelita, gdzie ulega hydroksylacji do  $\alpha$ - i  $\beta$ -zearalenolu (ZEL) oraz w erytrocytach krwi obwodowej (Obremski, Poniatowska-Broniek 2015). ZEN wchłonięty w jelicie cienkim migruje wraz z krwią do wątroby, gdzie jego metabolity są sprzęgane z kwasem glukuronowym i następnie usuwane z kałem i moczem. Krążenie wątrobowo-jelitowe powoduje, że wchłonięty ZEN wraca do jelita z żółcią i ponownie wpływa na tkanki przewodu pokarmowego, przedłużając ekspozycję błony śluzowej na mikotoksynę i jej metabolity (Obremski i in. 2005).

Świnie, a szczególnie loszki przed pierwszą rują są bardzo wrażliwe na działanie estrogenne zearalenonu. Powoduje on obrzęk macicy, wzrost dojrzewania pęcherzyków jajnikowych i obecność torbieli jajnikowych (Obremski i in. 2008). Niskie dawki ZEN (1,5 mg do 2 mg/kg diety) u niedojrzałych płciowo świń wywołują w ciągu trzech do siedmiu dni obrzęk, pogrubienie ściany pochwy i sromu, wzrost masy ciała macicy, atrofię jajników i nasiloną proliferację (Obremski i in. 2003). ZEN wykazuje również działanie hepato- i immunotoksyczne, indukuje apoptozę, powoduje fragmentację DNA i występowanie aberracji chromosomowych (Ayed-Boussema i in. 2007). Badania nad wpływem ZEN na organizm świń pozwoliły ustalić, że wartość NOAEL (no-observed-adverse-effect level), czyli poziomu niewywołującego dające się zaobserwować szkodliwe skutki działania ZEN na srom i macicę prosiąt, wynosi 10,4  $\mu\text{g}$  ZEN/kg m.c./dzień (EFSA CONTAM Panel 2014). Jednak w dostępnej literaturze brak informacji o wpływie ZEN w dawce NOAEL na równowagę oksydoredukcyjną w organizmie świń.

Stres oksydacyjny (SO) jest ważnym mediatorem toksycznych efektów występujących po ekspozycji na ZEN. Niektóre doniesienia wskazują na to, że jest to główny mechanizm szkodliwego działania tego związku (Zhou i in. 2015). SO jest procesem polegającym na zaburzeniu równowagi pomiędzy tempem powstawania reaktywnych form tlenu (RFT) a działalnością układu antyoksydacyjnego. Nadprodukcja reaktywnych form tlenu powoduje liczne uszkodzenia biologiczne, takie jak: peroksydacja lipidów błon komórkowych, liza erytrocytów, utlenianie hemoglobiny, inaktywacja enzymów, białek transportowych, depolimeryzacja kwasu hialuronowego, zaburzenia syntezy proteoglikanów, powstawanie mutacji i transformacja nowotworowa komórek (Jopkiewicz 2018). Nadprodukcja RFT powoduje uaktywnienie wielu mechanizmów mających na celu eliminowanie tych związków, jak również ich pochodnych. Wśród wielu mechanizmów obronnych przed wolnymi rodnikami istotnym elementem enzymatycznej obrony antyoksydacyjnej są peroksydazy glutationowe (GPx). Białka te mają zdolność redukcji nadtlenu nieorganicznego ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i nadtlenu organicznego (ROOH) z wytworzeniem kwasu selenowego jako produktu pośredniego (Li i in.

2000), a wzrost ich aktywności informuje o uruchamianiu mechanizmów obronnych eliminujących RTE.

## Cel

Celem doświadczenia było ustalenie, czy ekspozycja samic prosiąt na ZEN w dawkach 50% NOAEL (5 µg/kg m.c.), 10 µg/kg m.c. (100 % NOAEL) i 15 µg/kg m.c. (150% NOAEL) wpływa na aktywność tkankową enzymów z grupy peroksydaz w okrężnicy zstępującej loszek.

## Material i metody

Procedury użyte w doświadczeniu zostały przeprowadzone zgodnie z polskimi przepisami określającymi zasady i warunki doświadczeń na zwierzętach i uzyskały zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach Nr 12/2016 i 45/2016/DLZ.

W doświadczeniu wykorzystano dwadzieścia loszek o masie ciała  $14,5 \pm 2$  kg, które poddano siedmiodniowej adaptacji do pomieszczeń doświadczalnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, UWM w Olsztynie. Zwierzęta przetrzymywano w kojach ze stałym dostępem do wody. Loszki przydzielono na trzy grupy eksperymentalne (ZEN I, ZEN II i ZEN III;  $n=5$ ) i grupę kontrolną ( $n=5$ ). Loszkom grupy ZEN I, ZEN II i ZEN III podawano doustnie ZEN (Z2125-26MG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) w dawce odpowiednio: 5 µg, 10 µg i 15 µg ZEN/kg m.c. ZEN rozpuszczono w 96-procentowym etanolu (SWW 2442-90, Polskie Odczynniki SA, Polska) i umieszczono na nośniku paszy umocowanym w żelatynowych kapsułkach. Przed podaniem otwarte kapsułki pozostawiono w temperaturze pokojowej celem odparowania etanolu i podawano codziennie przed porannym karmieniem. Zwierzęta ważono co tydzień celem dostosowania dawki ZEN. Granulowaną paszę, wolną od mikotoksyn, podawano *ad libitum* dwa razy dziennie o godz. 8:00 i 17:00.

W 42 dniu doświadczenia pobrano próbki okrężnicy zstępującej po uprzedniej premedykacji azaperonem (Stresnil, Jansen Pharmaceutica NV, Belgia, 4 mg/kg masy ciała, im) i śmiertelnej dawce pentobarbitalu sodu (Morbital, Biowet Puławy, Puławy, Polska, 0,6 ml/kg masy ciała, iv). Próbki tkanek przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu wykonania analiz.

W celu oznaczenia aktywności peroksydazowej i stężenia grup sulfhydrylowych 1 g materiału tkankowego i homogenizowano z 2,5 ml buforu do ekstrakcji [PBS (137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ); 0,5% cytrynian sodu; 0,05% (POCH, Poland); Tween 20 (Sigma Aldrich, USA); inhibitory proteaz (Ref 11 697 498 001, Roche)] za pomocą homogenizatora (Omni-Tips™ Disposable, Omni Interna-



tional). Uzyskany homogenat wirowano (8600 g) przez godzinę (wirówka Eppendorf 5804R), a uzyskane próbki supernatantów przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu wykonania oznaczeń.

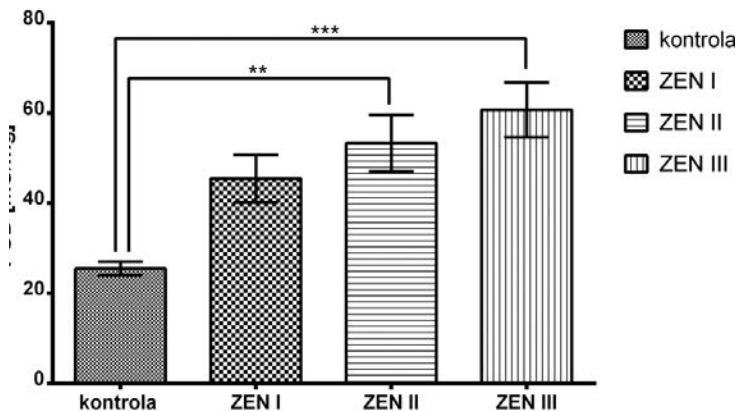
Grupy sulfhydrylowe oznaczono zmodyfikowaną metodą Ellmana opisaną przez Chana i Wassermana (1993). W celu oznaczenia aktywności peroksydazy zastosowano metodę kinetyczną według Bovairda i in. z własnymi modyfikacjami (1983) z użyciem ortofenylenodiaminy OPD oraz nadtlenu wodoru jako substratów dla enzymów.

Oznaczoną aktywność peroksydazową i stężenie grup  $-\text{SH}$  przeliczono na 1 mg białka oznaczonego według metody Bradford (1976).

Uzyskane wyniki pomiarów poddano analizie statystycznej za pomocą programu Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software, USA). Zarówno dla grupy kontrolnej, jak i doświadczalnych wyliczono wartości średnie i standardowy błąd średniej (SEM), a różnice pomiędzy średnimi analizowano za pomocą testu jednoczynnikowa Anova z analizą post-hoc Tukey'a.

## Wyniki

Najniższą aktywność peroksydazową w okrężnicy zstępującej wynoszącą  $25,48 \pm 1,49$  mU/mg odnotowano w grupie kontrolnej. W grupach doświadczalnych wraz z dawką obserwowano wzrost aktywności enzymatycznej od poziomu  $45,48 \pm 5,28$  mM/mg (grupa ZEN I), przez  $53,28 \pm 6,26$  mM/mg (grupa ZEN II) do  $60,73 \pm 6,12$  mM/mg (grupa ZEN III).

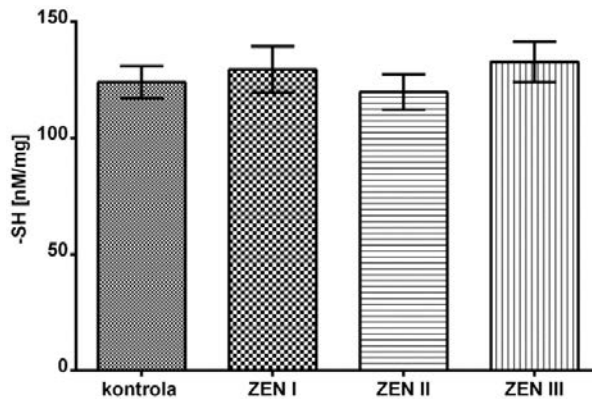


Rycina 1. Aktywność peroksydazowa, POD (mU/mg) okrężnicy zstępującej loszek: kontrola, ZEN I (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  m.c.), ZEN II (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  m.c.) i ZEN III (15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  m.c.). Wyniki przedstawiono jako średnią  $\pm$  SEM. Różnice istotne statystycznie określono na poziomie \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$

Źródło: opracowanie własne.

Wzrost aktywności w grupach ZEN II i ZEN III był statystycznie istotny w odniesieniu do grupy kontrolnej (odpowiednio  $P < 0,01$  i  $P < 0,001$ ).

Oznaczenie stężenia wolnych grup sulfhydrylowych w okrężnicy zstępującej zamieszczono na rycinie 2. Pomiedzy grupami nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie. Stężenie wolnych grup sulfhydrylowych w grupie kontrolnej wyniosło  $124,10 \pm 6,97$  nM/mg, a w grupach doświadczalnych ZEN I, ZEN II i ZEN III odpowiednio:  $129,50 \pm 9,94$  nM/mg,  $119,80 \pm 7,54$  nM/mg i  $132,70 \pm 8,67$  nM/mg.



Rycina 2. Stężenie wolnych grup sulfhydrylowych, -SH (nM/mg) w okrężnicy zstępującej loszek: kontrola, ZEN I (5 µg/kg m.c.), ZEN II (10 µg/kg m.c.) i ZEN III (15 µg/kg m.c.) po 42 dniach narażenia na mikotoksynę. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SEM

Źródło: opracowanie własne.

## Dyskusja

Dane literaturowe dowodzą, że rozwijający się w układzie pokarmowym stres oksydacyjny indukowany przez ZEN powoduje wzrost peroksydacji makromolekuł, prowadzący do uszkodzenia membran lipidowych oraz białek i w konsekwencji obniżenie właściwości barierowych nabłonka jelitowego (Liu i in. 2016). RTF powstałe w procesie peroksydacji lipidów powodują powstawanie malonylodwualdehydu (MDA), trans 4-hydroksy-2-nonenalu (4-HNE), a także propanalu i heksanalu (Devasagayam i in. 2003).

W powyższym przypadku aktywność peroksydazowa wzrastała odpowiednio do dawki, co sugeruje indukcję reakcji stresu oksydacyjnego przez powstające wolne rodniki. Zearalenon jest uznawany jako wyzwalający stres oksydacyjny w komórkach, stąd takie zmiany. Jak podaje literatura, niska aktywność peroksydazy glutationowej (GPx) w organizmie ma tendencję do osłabiania ochrony antyoksydacyjnej, powodując oksydacyjne uszkodzenie funkcjonalnych białek i uszkodzenia neurotoksyczne (Chabory i in. 2009). Stwierdzono również, że niedobór GPx1 zwiększa naczyniowy

stres oksydacyjny i powoduje dysfunkcję śródbłonna (Forgione i in. 2002). Ustalono, że genotyp GPx1 i czynniki związane ze stylem życia mogą wpływać na rozwój raka jelita grubego (Paulsen i in. 2010).

Aby zapobiec niekontrolowanej oksydacyjnej modyfikacji białek, lipidów i DNA oraz chronić komórki przed nieodwracalnymi i toksycznymi uszkodzeniami, komórki wyewoluowały szereg wysoce wydajnych i specyficznych enzymów antyoksydacyjnych. SOD katalizuje konwersję  $O_2^{\bullet -}$  do  $H_2O_2$  i  $O_2$ . Cząsteczki  $H_2O_2$  są dalej eliminowane przez katalazę (CAT), która katalizuje rozkład  $H_2O_2$  do  $H_2O$  i  $O_2$  lub przez peroksydazy tiolowe, takie jak: peroksydazy glutationowe i peroksyredoksyny (Prxs) (Flohe i in. 2011), które katalizują redukcję  $H_2O_2$  i/lub organicznych wodoronadtlenków do wody i odpowiednich alkoholi. (Ursini i in. 1995). W przeciwieństwie do katalaz i dysmutaz ponadtlenkowych peroksydazy wykorzystują mechanizm reakcji oparty na tiolach w celu detoksykacji wodoronadtlenków, a ich stan zredukowany musi zostać przywrócony przez system glutation/reduktaza glutationowa (GSH/GR) lub tioredoksyna/reduktaza tioredoksynowa (Trx/TrxR) (Ursini i in. 1995).

Biochemia siarki grupy tiolowej (-SH) nadaje cysteinom szereg wysoce wyspecjalizowanych i unikalnych cech, które umożliwiają im pełnienie wielu różnych funkcji w komórce. Cysteiny są unikalne wśród naturalnie występujących aminokwasów ze względu na ich łańcuch boczny zawierający tiol, który może podlegać wielu różnym reakcjom nukleofilowym. Najbardziej charakterystyczną cechą tioli cysteinowych jest ich zdolność do ulegania odwracalnym i nieodwracalnym reakcjom utleniania. Deprotonowanie grupy sulfhydrylowej do odpowiedniego anionu tiolanowego zwiększa jej reaktywność w reakcjach nukleofilowych. Wolne tiole (grupy -SH) dokładniej odzwierciedlają systemowy stan redoks *in vivo* w porównaniu z wieloma innymi indywidualnymi czynnikami utleniającymi lub przeciwutleniającymi i ich pochodnymi (Cortese-Krott i in. 2017). W środowisku pozakomórkowym tiole są integralną częścią złożonej i dynamicznej sieci sygnalizacyjnej redoks i posiadają silną aktywność przeciwutleniającą opartą na ich zdolności do szybkiego wychwytywania krążących reaktywnych form (Turell i in. 2013). Z przeprowadzonych badań wynika, że zasób grup tiolowych w okrężnicy ulega ciągłemu odnawianiu i umożliwia organizmowi utrzymanie równowagi oksydoredukcyjnej.

## Podsumowanie

Z wykonanych badań wynika, że narażenie świń na niskie dawki ZEN spowodowało wzrost tkankowej aktywności peroksydazowej w ścianie okrężnicy zstępującej. ZEN, powodując powstawanie zwiększonej ilości RFT, uruchomił mechanizmy obronne, w tym zwiększył ekspresję peroksydaz komórkowych. Ma to na celu zapobiec potencjalnym uszkodzeniom składników funkcjonalnych komórek.

## Bibliografia

- Avantaggiato G., Havenaar R., Visconti A. 2003. Assessing the zearalenone binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamin *in vitro* gastrointestinal model. *Food. Chem. Toxicol.*, 41: 1283–1290.
- Ayed-Boussema I., Ouanes Z., Bacha H., Abid S. 2007. Toxicities induced in cultured cells exposed to zearalenone: apoptosis or mutagenesis? *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 21: 136–144.
- Bovaird J.H., Ngo T.T., Lenhoff H.M. 1983. Optimizing the o-phenylenediamine assay for horseradish peroxidase: Effects of phosphate and pH, substrate and enzyme concentrations, and stopping reagents. *Clin. Chem.* 28: 2423–2426.
- Bradford M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.
- Chabory E., Damon C., Lenoir A., Kauselmann G., Kern H., Zevnik B., Garrel C., Saez F., Cadet R., Henry-Berger J. 2009. Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *J. Clin. Investig.*, 119: 2074–2085.
- Chan K.Y., Wasserman B.P. 1993. Direct colorimetric assay of free thiol groups and disulfide bonds in suspensions of solubilized and particulate cereal proteins. *Cereal Chem.* 70: 22–26.
- Cheli, F., Pinotti L., Rossi L., Dell'Orto V. 2013. Effect of milling procedures on mycotoxin Devasagayam T.P., Bolor K.K., Ramasarma T. 2003. Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 40, 300–308.
- distribution in wheat fractions: a review. *LWT-Food Sci. Technol.*, 54: 307–314.
- Cortese-Krott M.M., Koning A., Kuhnle G.G.C., Nagy P., Bianco C.L., Pasch A., Wink D.A., Fukuto J.M., Jackson A.A., van Goor H., Olson K.R., Feilisch M. 2017. The reactive species interactome: evolutionary emergence, biological significance, and opportunities for redox metabolomics and personalized medicine. *Antioxid Redox Signal.*, 27: 684–712.
- EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), 2014. Scientific Opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. *EFSA J.*;12: 3916.
- Flohe L., Toppo S., Cozza G., Ursini F. 2011. A comparison of thiol peroxidase mechanisms, *Antioxidants Redox Signal.*, 15: 763–780.
- Forgione M.A., Weiss N., Heydrick S., Cap A., Klings E.S., Bierl C., Eberhardt R.T., Farber H.W., Loscalzo J. 2002. Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 282: H1255–H1261.
- Gromadzka K., Górna K., Chełkowski J., Waśkiewicz A. 2016. Mycotoxins and related Fusarium species in preharvest maize ear rot in Poland. *Plant Soil Environ.*, 62: 348–354.
- Jopkiewicz S. 2018. Stres oksydacyjny Część I. Stres oksydacyjny jako czynnik rozwoju chorób cywilizacyjnych. *Medycyna Środowiskowa - Environmental Medicine*, 21: 48–52.
- Li S., Yan T., Yang J.Q., Oberley T.D., Oberley L.W. 2000. The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.*, 60: 3927–3939.
- Liu F., Cottrell J.J., Furness J.B., Rivera L.R., Kelly F.W., Wijesiriwardana U., Pustovit R.V., Fothergill L.J., Bravo D.M., Celi P., Leury B.J., Gabler N.K., Dunshea F.R. 2016. Selenium and vitamin E together improve intestinal epithelial barrier function and alleviate oxidative stress in heat-stressed pigs. *Exp. Physiol.*, 101: 801–810.
- Obremski K., Gajęcka M., Zielonka Ł., Jakimiuk E., Gajęcki M. 2005. Morphology and ultrastructure of small intestine mucosa in gilts with zearalenone mycotoxicosis. *Pol. J. Vet. Sci.*, 8: 301–307.

- Obremski, K., Gajęcki M., Zwierzchowski W., Zielonka Ł., Otrocka-Domagala I.; Rotkiewicz T., Mikołajczyk A., Gajęcka M., Polak M. 2003. Influence of zearalenone on reproductive system cell proliferation in gilts. *Pol. J. Vet.*, 6: 239–245.
- Obremski K., Poniatowska-Broniek G. 2015. Zearalenone induces apoptosis and inhibits proliferation in porcine ileal Peyer's patches lymphocytes. *Pol. J. Vet. Sci.*, 18: 153–161.
- Obremski K., Zielonka Ł., Gajęcka E., Jakimiuk E., Bakula T., Baranowski M., Gajęcki M. 2008. Histological estimation of the small intestine wall after administration of feed containing deoxynivalenol, T-2 toxin and zearalenone in the pig. *Pol. J. Vet. Sci.*, 11: 339–345.
- Paulsen C.E., Carroll K.S. 2010. Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. *ACS Chem. Biol.*, 5: 47–62.
- Turell L., Radi R., Alvarez B. 2013. The thiol pool in human plasma: the central contribution of albumin to redox processes. *Free Radic Biol. Med.*, 65: 244–253.
- Ursini F., Maiorino M., Brigelius-Flohe R., Aumann K.D., Roveri A., Schomburg D., Flohe L. 1995. Diversity of glutathione peroxidases, *Methods Enzymol.*, 252: 38–53.
- Zain. M.E. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals *J. Saudi Chem. Soc.*, 15: 129–144.
- Zhou C., Zhang Y., Yin S., Jia Z., Shan A. 2015. Biochemical changes and oxidative stress induced by zearalenone in the liver of pregnant rats. *Hum. Exp. Toxicol.*, 34: 65–73.

## Abstract

### PEROXIDASE ACTIVITY IN THE DESCENDING COLON OF PIGS TREATED WITH ZEARELENONE

Zearalenone (ZEN) is a mycotoxin able to induce oxidative stress (imbalance between reactive oxygen species (ROS) and antioxidants). Enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) are responsible for removing ROS from the cell. The conducted study aimed to check whether the exposure of piglets to ZEN in doses of 5 µg / kg b.w. (50% NOAEL), 10 µg / kg b.w. (100% NOAEL) and 15 µg / kg b.w. (150% NOAEL) affects the tissue activity of peroxidase enzymes in the descending colon of gilts. Samples of descending colon were exposed to ZEN and stored at -80 °C for 42 days before conducting the analysis. Performed research shows that exposure of pigs to low doses of zearalenone results in an increase in tissue peroxidase activity in the descending colon wall. ZEN causes the formation of an increased amount of ROS and activates defence mechanisms, including increased expression of cellular peroxidases; this happens to prevent potential damage to the functional components of the cells.

**Słowa kluczowe:** zearalenon, loszki, okrężnica zstępująca, aktywność peroksydazowa, stres oksydacyjny

**Keywords:** zearalenone, gilts, descending colon, peroxidase activity, oxidative stress

**Miłosz Pawlak**

**Ewa Kaczmar**

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Koło Naukowe Technik Obrazowania w Diagnostyce Chorób Małych Zwierząt

Opiekun koła: prof. dr hab. Andrzej Rychlik

## **ZASTOSOWANIE CHROMOENDOSKOPII (OBRAZOWANIA W WĄSKIM PAŚMIE) W WYKRYWANIU ZMIAN PATOLOGICZNYCH W ŻOŁĄDKU U PSÓW**

### **Wstęp**

Chromoendoskopia jest diagnostyczną techniką łączącą w sobie endoskopię oraz możliwość wybarwienia badanych tkanek błony śluzowej oraz obserwacji postępujących zmian z wykorzystaniem ultrafioletu. Terminem tym określa się też nowoczesne obrazowanie w wybranych pasmach przy użyciu specjalnych procesorów cyfrowych. W rezultacie uzyskujemy możliwość zaobserwowania zmian chorobowych, które w zwykłej endoskopii (z wykorzystaniem światła białego) są trudno wykrywalne lub wręcz niewidoczne. W praktyce weterynaryjnej dziedzina ta dopiero się rozwija, jednak możliwości jej wykorzystania są naprawdę szerokie. Jedną z najważniejszych takich możliwości, stosowanych w medycynie ludzkiej, jest diagnozowanie nowotworów w bardzo wczesnym stadium oraz identyfikacja tkanek do biopsji i leczenia miejscowego.

Pracę nad chromoendoskopią po raz pierwszy zostały podjęte w Japonii. W trakcie badań nad rozwojem endoskopii początkowo podjęto próbę przyżyciowego barwienia badanych tkanek. Badanie to wykonywano, wprowadzając kaniulę przez kanał roboczy endoskopu i nastrzykując zmiany barwnikami. W rezultacie można było uzyskać efekt w pewnym stopniu podobny do tego, co oferują nam dzisiejsze techniki z użyciem procesorów endoskopowych cyfrowych. To właśnie te pierwsze kroki sprawiły, że dzisiaj, zamiast skomplikowanej procedury związanej z doбором barwników i nastrzykiwaniem zmian, wystarczy nacisnąć jeden przycisk, a dodatkowo metoda ta zapewni nam jeszcze lepszy efekt diagnostyczny dzięki wykorzystaniu odpowiednich fal świetlnych.

Obecnie dysponujemy kilkoma technikami zaawansowanego obrazowania endoskopowego. Pierwsza z nich dotyczy zawężonego widma świetlnego (z ang. Narrow Band Imaging – NBI, Olympus, Tokio, Japonia), druga – skupia się na uwydatnianiu kolorów w obrazowaniu widmowym, nazywana jest też inteligentną chromoendoskopią (z ang. Flexible Spectral Imaging Color Enhancement – FICE, Fujinon, Tokio, Japonia), a w pozostałych technikach wykorzystuje się cyfrowy kontrast, tzw. i-Scan (I-SCAN, Pentax, Tokio, Japonia), obrazowanie autofluorescencyjne (z ang. Autofluorescence Imaging – AFI) oraz laser konfokalny w połączeniu z endomikroskopią (z ang. confocal laser endomicroscopy – CLE).

### **Obrazowanie wąskopasmowe – NBI**

Obrazowanie wąskopasmowe – NBI było pierwszą z dostępnych na rynku technologii o zawężonym spektrum. Technika działa dzięki filtrowaniu światła oświetlającego badane struktury. Czerwony kolor ze standardowej gamy barw: czerwonego, zielonego i niebieskiego (z ang. Red, Green, Blue – RGB), jest odrzucany, a pasmo widmowe filtrów światła niebieskiego i zielonego zostaje wyśrodkowane odpowiednio na 415 i 540 nm. Przychodzące sygnały z urządzenia ze sprzężeniem ładunkowym są łączone przez procesor wideo, aby wytworzyć obraz w zmodyfikowanych kolorach. Hemoglobina wykazuje pik absorpcji przy 415 nm, a zatem silnie pochłania „niebieskie” światło; ponadto te krótsze fale wnikają w błonę śluzową słabiej niż światło czerwone, które prezentuje długość fali 650 nm. Powoduje to zwiększony kontrast dla powierzchniowych mikronaczyń, które wydają się brązowe/czarne, oraz większą wyrazistość struktur powierzchni śluzówek.

### **Cyfrowy kontrast i-Scan (I-SCAN)**

I-SCAN (Pentax, Tokio, Japonia) to kolejna technologia kontrastu, która składa się z trzech funkcji poprawiających: wzmocnienie powierzchni, które wyostrza obraz; kontrast uwydatniający, w którym ciemniejsze (przygnębione) obszary wyglądają bardziej niebiesko; wzmocnienie tonów – forma cyfrowego obrazowania z zawężonym widmem. Kontrastowanie ma pewne podobieństwa do FICE, ponieważ obraz w świetle białym jest podzielony na składowe: czerwoną, zieloną i niebieską. Każdy składnik można następnie niezależnie modyfikować i na ich podstawie uzyskać nowy wizerunek cyfrowy.

## Obrazowanie autofluorescencyjne

Niektóre naturalne cząsteczki tkankowe, takie jak: kolagen, flawiny i fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADPH), są fluorofortami. Znaczący to, że emitują one fluorescencję po wzbudzeniu światła o krótkiej długości fali. Obrazowanie autofluorescencyjne opiera się na wykrywaniu takiej fluorescencji w czasie rzeczywistym.

Sygnal AFI jest zmieniany przez zmiany grubości błony śluzowej, przepływ krwi oraz w fluoroforach tkanek endogennych. Gruba tkanka o zwiększonym przepływie krwi, taka jak w gruczolakach, osłabia zarówno sygnały wzbudzenia, jak i autofluorescencji. Różnice w emisji fluorescencji między nowotworem a tkankami nienowotworowymi są wykrywane przez dodatkowy obraz CCD (z ang. Charge Coupled Device) – czujnik wyposażony w filtr odcinający niebieskie wzbudzenie lekkie. Procesor wideo łączy sygnał autofluorescencji z pewnym odbiciem przez błonę śluzową zielonego światła używanego do oświetlenia, aby wytworzyć obraz w zmodyfikowanych kolorach, w którym tkanki są wizualizowane w czasie rzeczywistym jako kolor fioletowy lub zielony.

## Laserowa endomikroskopia konfokalna (CLE)

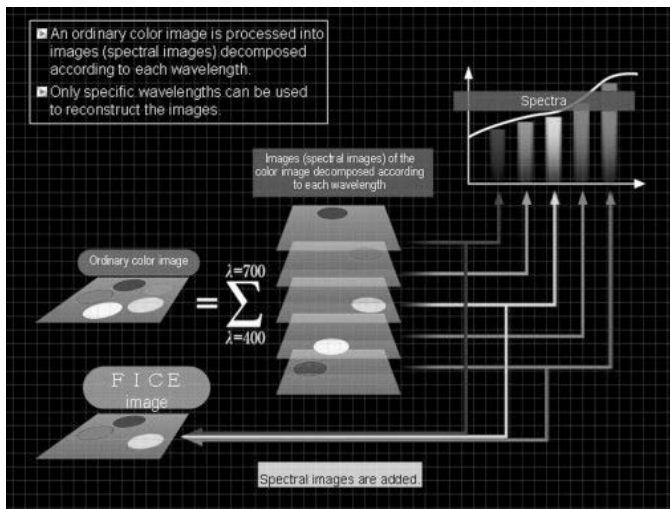
CLE została opracowana do obrazowania komórek oraz obrazowania podkomórkowego do 250 mikrometrów pod powierzchnią błony śluzowej. Laser małej mocy skupia się na jednym mikroskopijnym punkcie. Soczewka jest używana zarówno jako kondensator, jak i obiektyw, zaginając ścieżkę optyczną tak, aby punkt oświetlenia pokrywał się z interesującym punktem w próbce. Światło emanujące z tego punktu skupia się na detektorze przez mały otwór tak, aby światło emanujące z zewnątrz oświetlanego miejsca było zablokowane. Systemy oświetlenia i detekcji znajdują się na tej samej płaszczyźnie ogniskowej i są określane jako „konfokalne”. Kolejne punkty w regionie są skanowane w celu utworzenia zdigitalizowanego obrazu rastrowego. Utworzony obraz jest sekcją optyczną reprezentującą jedną płaszczyznę ogniskową w obrębie badanego preparatu. Obraz pojawia się w odcieniach szarości.

Przydatność większości technologii o zawężonym spektrum może być ograniczona ciemnym polem widzenia. Obrazowanie laserem niebieskim (z ang. Blue Laser Imaging – BLI) może przewyżżyć to ograniczenie, stosując połączenie dwóch laserowych źródeł światła o długości fali 410 nm i 450 nm. Laser 450 nm uderza w luminofor, indukując światło fluorescencyjne, które jest równoważne ksenonowemu źródłu światła. Inny laser zapewnia ulepszone informacje o powierzchni błony śluzowej dzięki zastosowaniu ograniczonego widma długości fali światła niebieskiego 410 nm, podobnie jak w przypadku innych technologii o zawężonym widmie.



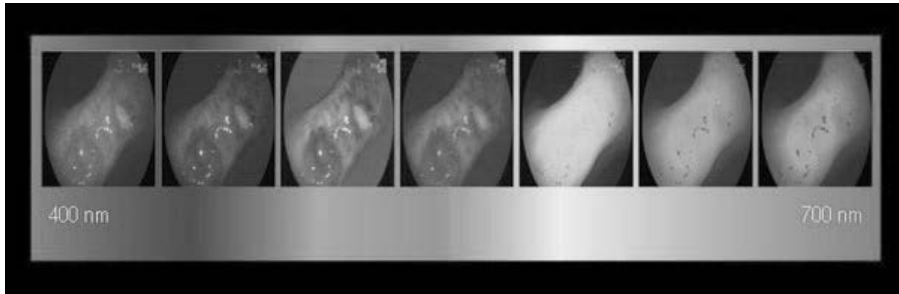
Profesjonalny system poprawy obrazu Storz to kolejny cyfrowy post-processing technologii kontrastu, który wykazuje pewne podobieństwa do I-SCAN i FICE. Brak jednak opublikowanych danych dotyczących przewodu pokarmowego.

W naszych badaniach skupiliśmy się na systemie FICE opracowanym przez profesora Y. Miyake i upowszechnionym przez Fujinon Corporation (Saitama, Japonia) z Uniwersytetu Chiba w Japonii. Jest to technologia postprocesowa, która służy do wzmacniania obrazów tkanek naczyniowych oraz powierzchniowych. Komputer wybiera określone długości fal z danych i wzmacnia je cyfrowo, dzięki czemu może wydźwignąć określone tkanki lub zmiany. Spektrum intensywności kolorów dla każdego piksela obrazu w świetle białym jest analizowane w procesorze wideo. Obrazy można następnie zrekonstruować, piksel po pikselu, używając tylko jednej wybranej długości fali. W efekcie możemy wybrać trzy długości fal, których obrazy są przypisywane do czerwonego, zielonego i niebieskiego koloru. Następnie służą one do wyświetlania obrazu złożonego ze wzmacnionymi kolorami w czasie rzeczywistym. Po zmianie długości fal wirtualnymi filtrami elektronicznymi obraz jest natychmiast zrekonstruowany. Wnikanie światła do błony śluzowej zmienia się w zależności od długości fali: fale z zakresu 400–500 nm są idealne do analizy struktur powierzchniowych (rys. 1), natomiast ze względu na właściwości absorpcyjne hemoglobiny dłuższe fale, około 550 nm, są bardziej skuteczne w wizualizacji naczyń krwionośnych. Dzięki elektronicznej manipulacji długością fali w czasie rzeczywistym można wykorzystać nieskończoną liczbę kombinacji do tworzenia zrekonstruowanych obrazów. Dostępnych jest dziesięć kanałów o różnych predefiniowanych długościach fali absorpcji.



**Rysunek 1. Mechanizm rozkładu światła spektralnego w systemie FICE**

Źródło: "Computed virtual chromoendoscopy system (FICE): A new tool for upper endoscopy?" – Coriat R. i in., 2008. *Gastroenterologie Clinique et Biologique* 32(4), 363–369.



**Rysunek 2. Obrazy wyświetlane różnie w zależności od poziomu długości fali (od 400 do 700 nm)**

Źródło: "Computed virtual chromoendoscopy system (FICE): A new tool for upper endoscopy?" – Coriat R. i in., 2008. *Gastroenterologie Clinique et Biologique* 32(4), 363–369.

Należy jednak zaznaczyć, że w naszych badaniach opieramy się głównie na osiągnięciach medycyny ludzkiej i wiedzy z jej zakresu. Takich wstępnych prac o przydatności nowoczesnych technik obrazowania w medycynie jest bardzo mało. Niewykluczone zatem, że w niedalekiej przyszłości niezbędna będzie weryfikacja wyżej wymienionych długości fal w medycynie weterynaryjnej. Mimo to już dziś wiemy, że w medycynie ludzkiej sprawdza się wykorzystanie tych technik w diagnostyce całego układu pokarmowego – u ludzi często w przypadku przełyku Baretta, wykrywania i oceny zmian w żołądku, dwunastnicy i kolejnych fragmentach jelit, a także w kolonoskopii przy ocenie zmian jelita grubego.

Dwie najbardziej konkurencyjne metody na rynku to głównie NBI oraz FICE, jednak ta druga daje nam tę przewagę, że długość fal możemy ustawić dowolnie i w efekcie uzyskać przekrój większej warstwy tkanek.

## Cel

Celem pracy jest ocena przydatności chromoendoskopii w wykrywaniu zmian patologicznych w żołądku psów. Na podstawie licznych doniesień naukowych z zakresu ludzkiej medycyny wykorzystanie wyżej wymienionej technologii daje spore szanse na poprawienie jakości oraz szybkości diagnozowania zmian patologicznych, pojawiających się nie tylko w żołądku, ale i całym układzie pokarmowym psów czy nawet kotów, zaczynając od przełyku a kończąc na jelicie grubym. W naszych badaniach oceniliśmy przydatność systemu FICE w diagnozowaniu zmian na obszarze błony śluzowej żołądka u pacjentów z podejrzeniem chorób tego narządu.

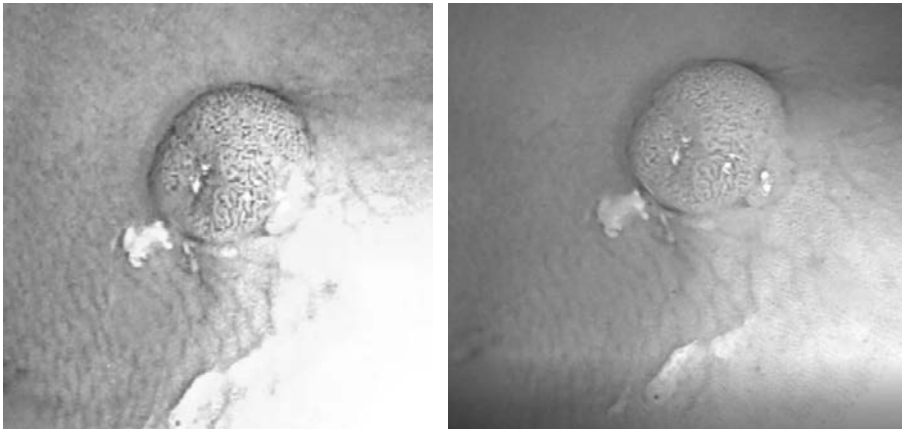
## Materiały i metody

Badanie z zastosowaniem obrazowania w wąskim paśmie tzw. technologii FICE (Flexible Spectral Color Enhancement) z wykorzystaniem wideogastroskopu Fujinon EG-600WR, długości 110 cm, średnicy 9,1 mm, z kanałem roboczym 2,8 mm, przeprowadzono u sześciu pacjentów Pracowni Endoskopowej Katedry Diagnostyki Klinicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Pacjentami były psy z podejrzeniem zmian patologicznych w żołądku na podstawie wcześniejszego wywiadu, badania klinicznego oraz badań dodatkowych, tj. badań morfologicznych i biochemicznych krwi oraz badań ultrasonograficznych (USG). Zwierzęta przed endoskopią poddano 24-godzinnej głodówce oraz 6-godzinemu wstrzymaniu podaży płynów. Przed rozpoczęciem procedury badania endoskopowego wykonano u każdego zwierzęcia badanie kliniczne z pomiarem temperatury, tętna i osłuchaniem klatki piersiowej. Następnie zastosowano premedykację w postaci podania domięśniowo dexmedetomidyny w dawce 0,005 mg/kg masy ciała, butorfanolu w dawce 0,1 mg/kg m.c. oraz midazolamu w dawce 0,1 mg/kg m.c. Potem zwierzęta wprowadzono w stan indukcji znieczulenia za pomocą propofolu w dawce 4 mg/kg m.c. dożylnie, wedle efektu. Dalej przed rozpoczęciem procedury badania endoskopowego zwierzęta zaintubowano rurką dotchawiczą o rozmiarze dobranym odpowiednio do wielkości i masy ciała zwierzęcia. Następnie założono rozwieracz ustno-zębowy. Badania przeprowadzano u każdego zwierzęcia w pozycji leżącej na lewym boku. Każde zwierzę podczas trwania całej procedury było podłączone do kardiomonitora i obserwowane przez lekarza weterynarii anestezjologa. Endoskopię u wszystkich zwierząt przeprowadzał ten sam wykwalifikowany w tym kierunku lekarz weterynarii. Schemat badania był jednakowy dla wszystkich pacjentów: początkowo oceniano przełyk, kolejno żołądek, wpust żołądka w inwersji, tzw. manewrze J, *antrum* i kanał odźwiernika. Po zlokalizowaniu zmian światło białe endoskopu zmieniano na system FICE w dwóch zaprogramowanych falach (400 nm i 550 nm). Następnie pobierano wycinki ze zmian przy pomocy systemu FICE do badania histopatologicznego wedle wytycznych WSAVA, które przekazywano do analizy do Katedry Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Sporządzono protokoły anestezjologiczne oraz endoskopowe po każdym z badań.

## Wyniki

Pacjenci zakwalifikowani do badań gastroskopowych wykazywali objawy kliniczne typowe dla dolegliwości układu pokarmowego, takie jak: wymioty pianą i/lub żółcią, zmniejszenie apetytu, mlaskanie. Badania biochemiczne i morfologiczne krwi nie

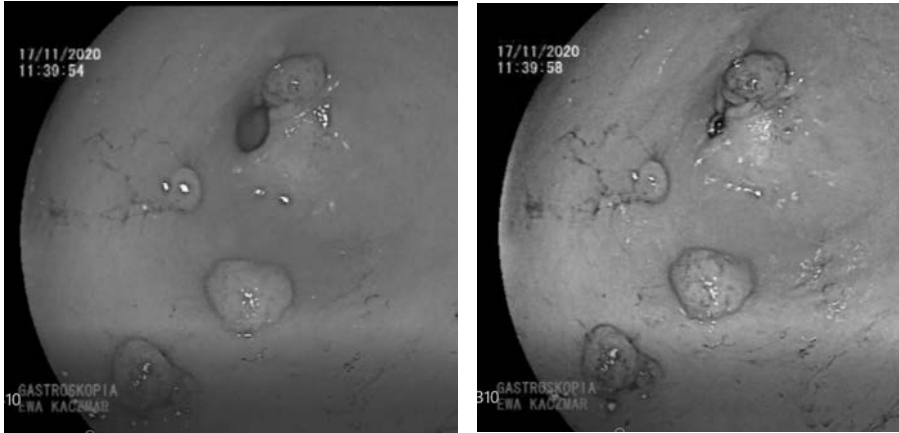
wykazywały istotnych klinicznie odchyień od wartości referencyjnych. W badaniach ultrasonograficznych stwierdzano pogrubienie błony śluzowej żołądka z zatarciem lub bez struktury warstwowej ściany ze zwiększoną echogenicznością. Obraz USG u wszystkich pacjentów wskazywał na stan zapalny żołądka (łac. *gastritis*). Na podstawie badania endoskopowego klasycznego (z zastosowaniem światła białego) potwierdzono u wszystkich zwierząt niewielkie zmiany rozrostowe w części odźwiernikowej żołądka. Zmiany oceniano jako odgraniczone, uszypułowane lub osadzone wyniosłości błony śluzowej o regularnych lub nieregularnych brzegach. W badaniu z użyciem technologii FICE stwierdzone zmiany u czterech z sześciu psów były widoczne jako łagodne zmiany zapalne (polipy) – u jedenastoletniego samca zdiagnozowano dwie zmiany rozrostowe kształtu polipowatego, ukrwione, o wielkości ok. 1,5×1,5 cm oraz 0,5×0,5 cm. Wyżej wymienione zmiany wykazywały widoczny w dwóch programach długości fal (400 nm i 550nm) regularny schemat zabarwienia typowy dla zmian hiperplastycznych, łagodnych lub zdrowej błony śluzowej. U pozostałych dwóch pacjentów obrazowanie w wąskim paśmie pozwoliło podejrzewać zmiany nowotworowe ze względu na uwidocznienie znacznego ukrwienia zmian oraz zaburzony, nieregularny schemat zabarwienia utożsamiany ze zmianami nowotworowymi. Postawione wstępnie rozpoznanie endoskopowe zostało potwierdzone nacelowaną biopsją z uwidocznionych zmian badaniem histopatologicznym w 100%. W przypadku zmian ocenionych na podstawie technologii FICE jako nieukrwione, łagodne histopatologia wykazała



**Ryc. 1. Zmiana łagodna (polip) obrazowana w świetle białym (po lewej) oraz w wąskim paśmie obrazowania (długość fali 550 nm) (po prawej) na terenie kanału odźwiernika żołądka u ośmioletniego psa mieszańca. Widoczny regularny schemat zabarwienia typowy dla zmian hiperplastycznych, łagodnych lub zdrowej błony śluzowej i brak widocznego ukrwienia pozwalało na podstawie obrazu makroskopowego podejrzewać zmianę łagodną. Zostało to potwierdzone histopatologicznie**

Źródło: opracowanie własne.

polipy zapalne, natomiast w przypadku podejrzewanych zmian złośliwych – potwierdzono gruczolakoraka i chłoniaka.



Ryc. 1. Zmiany złośliwe (chłoniak) obrazowane w świetle białym (po lewej) oraz w wąskim paśmie obrazowania (długość fali 550 nm) (po prawej) na terenie kanału odźwiernika żołądka u trzynastoletniego psa mieszańca. Widoczny nieregularny schemat zabarwienia typowy dla zmian nowotworowych, złośliwych co pozwalało na podstawie obrazu makroskopowego podejrzewać takie zmiany. Zostało to potwierdzone histopatologicznie

Źródło: opracowanie własne.

## Dyskusja

W literaturze naukowej jest bardzo mało informacji o wykorzystaniu chromoendoskopii w medycynie weterynaryjnej. Można znaleźć pojedyncze artykuły, jednakże zdecydowanie brakuje badań klinicznych na przypadkach psów lub kotów diagnozowanych z użyciem chromoendoskopii. W związku z tym przeprowadzone badania oraz poszukiwania odpowiedzi na przydatność użycia tej techniki oparto w pracy głównie na publikacjach naukowych z zakresu medycyny ludzkiej. Na temat podobnego wykorzystania chromoendoskopii opublikowana została praca autorstwa Buchner A. w artykule pt. *The Role of Chromoendoscopy in Evaluating Colorectal Dysplasia*. Badania były jednak nie żołądki, a jelita pacjentów pod względem wykrycia dysplazji jelita grubego. Badania te, oparte na około 600 przypadkach, potwierdziły o 57% większą skuteczność wykrywania dysplazji przy użyciu technik chromoendoskopii w porównaniu do zwykłej kolonoskopii z użyciem światła białego. Dodatkowo potwierdzono, że chromoendoskopia umożliwia wstępną ocenę, czy dana zmiana jest nowotworowa czy też nienowotworowa. Jest to niezwykle istotne z punktu widzenia lekarzy klini-

cystów i potencjalnie może wpłynąć na odpowiednią, szybszą decyzję lekarza, co do dalszego postępowania i wyboru metody leczenia: chirurgicznego lub zachowawczego. To z kolei może przyczynić się do ograniczenia liczby błędów lekarskich w tym obszarze. Do podobnych wniosków doszła grupa naukowców pod nadzorem James E. Easta w artykule pt. *Advanced endoscopic imaging: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Technology Review*. Na podstawie ich badań, dotyczących przewodu pokarmowego, ustalono, że zaawansowane obrazowanie endoskopowe może poprawić wizualizację śluzówki i wpłynąć na pewność endoskopowej/makroskopowej diagnozy. Proces ten jednak wymaga przeszkolenia i stosowania zwalidowanych systemów klasyfikacji. W artykule porównywano również skuteczność i przydatność poszczególnych technik chromoendoskopowych w badaniu przewodu pokarmowego. W przypadku żołądka metoda stosowana w naszych badaniach – FICE – została uznana za przydatną w diagnozowaniu metaplazji jelitowej. Brakuje natomiast badań na temat oceny przydatności tej technologii w wykrywaniu wczesnych stadiów nowotworów żołądka i dlatego pozostaje ona wciąż nieokreślona. W wyjaśnieniu porównania autorzy zaznaczyli jednak, że metoda ta przyniosła zwiększoną zgodność diagnozy badania chromoendoskopowego z badaniem histopatologicznym niż zwykła endoskopia. Lepiej w zestawieniu tym wypada jednak technika NBI. Jeśli chodzi o diagnozowanie metaplazji jelitowej, została uznana za bardzo przydatną, zwłaszcza w wykrywaniu wczesnych stadiów nowotworów żołądka. Natomiast na podstawie naszych badań można przypuszczać, że ze względu na możliwość ustawienia odpowiedniej długości fal do obrazowania konkretnych zmian technologia FICE być może przewyższa pod tym względem technologię NBI, w której nie ma takiej możliwości. Podobny wniosek wysnuło w publikacji Coriata i in. Wymaga to jednak zdecydowanie potwierdzenia w dalszych badaniach klinicznych porównujących obie techniki.

Badaniami, które również potwierdzają nasze wyniki, są te opisane w pracy naukowej Taghavi i in. pt. *Comparison of Chromoendoscopy and Conventional Endoscopy in the Detection of Premalignant Gastric Lesions*. W pracy porównywano wartość diagnostyczną biopsji z żołądka w wykrywaniu metaplazji jelitowej. Liczba pozytywnych biopsji z antrum trzonu i dna wyniosła odpowiednio 18, 15 i 7 przy użyciu chromoendoskopii oraz odpowiednio 10, 4 i 2 z tych samych miejsc przy użyciu konwencjonalnej endoskopii. Badania te potwierdziły, że chromoendoskopia przewyższa konwencjonalną endoskopię w wykrywaniu zmian metaplastycznych.

Zarówno nasze badanie, jak i artykuły dotyczące wykorzystania chromoendoskopii do skutecznego diagnozowania zmian w żołądku czy też pozostałych fragmentów przewodu pokarmowego potwierdzają większą skuteczność tej metody w porównaniu do zwykłego badania endoskopowego. Niemniej jednak takich wstępnych prac o przydatności nowoczesnych technik obrazowania w medycynie jest bardzo mało.

Mimo wszystko technika ta wymaga badań z większą ilością pacjentów, w szczególności w świecie medycyny weterynaryjnej. Powyższe przykłady potwierdzają jednak, że jej możliwości mogą być podobne jak w medycynie ludzkiej. Wraz z kolejnymi

badaniami na pacjentach z ryzykiem innych nieprawidłowości histopatologicznych żołądka możliwe będzie całkowite wyjaśnienie roli chromoendoskopii w badaniach przesiewowych, leczeniu endoskopowym oraz kontroli pozabiegowej.

## Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że obrazowanie w wąskim paśmie metodą FICE może być skuteczną metodą odróżniania zmian zapalnych od nowotworowych oraz pozwala na nacelowaną biopsję wykrytych patologii. Wobec tego może być efektywnym narzędziem we wczesnym wykrywaniu zmian patologicznych w żołądku u psów oraz ich różnicowaniu. Ułatwia również wykonywanie biopsji do dalszej diagnostyki histopatologicznej.

## Bibliografia

- Comparison of chromoendoscopy and conventional endoscopy in the detection of premalignant gastric lesions – Taghavi S. i in., 2009. *Can J Gastroenterol* 23(2):105–108.
- Chromoendoscopy - Al-Kawas. F. 2006. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. Feb; 2(2): 101–103.
- The Role of Chromoendoscopy in Evaluating Colorectal Dysplasia Buchner. A. 2017. *Gastroenterology & hepatology*.
- Advanced endoscopic imaging: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Technology Review – East. J. i in., 2016. *Endoscopy*.
- Computed virtual chromoendoscopy system (FICE): A new tool for upper endoscopy? – Coriat R. i in., 2008. *Gastroenterologie Clinique et Biologique* 32(4), 363–369.
- Can we accurately diagnose minute gastric cancers ( $\leq 5$  mm)? Chromoendoscopy (CE) vs magnifying endoscopy with narrow band imaging (M-NBI)- Shoko F. i in., 2014. *Gastric Cancer* 18, 590–596.

Abstract

## USE OF CHROMOENDOSCOPY (NARROW-BAND IMAGING) TO DETECT GASTRIC LESIONS IN DOGS

The aim of the study is to assess the usefulness of chromoendoscopy in detecting pathological changes in the stomach in dogs.

Examination with FICE technology using the videogastroscope was carried out in six patients. The patients were dogs with suspected pathological changes in the stomach based on previous history and clinical examination. Based on classic endoscopic examination, hyperplastic changes in the antral part of the stomach were confirmed in all animals. In a FICE study, the lesions found in four out of six dogs were seen as mild inflammatory lesions (polyps). In the remaining two patients, FICE made it possible to suspect neoplastic changes due to the visualization of significant blood supply to the lesions. They were confirmed by histopathological examination. It has been shown that narrow-band FICE imaging can be an effective method of distinguishing between inflammatory and neoplastic changes and allows for targeted biopsy of detected pathologies.

**Słowa kluczowe:** endoskopia, chromoendoskopia, FICE, pies

**Keywords:** endoscopy, chromoendoscopy, FICE, dog



**Dominika Pływacz**

Uniwersytet Warmiński-Mazurski w Olsztynie

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Studenckie Koło Naukowe „Żywnienie zwierząt”

Opiekun koła: dr hab. Kazimierz Obremski, prof. UWM

## **AKTYWNOŚĆ DYSMUTAZY PONADTLENKOWEJ (SOD) W OKRĘŻNICY ZSTĘPUJĄCEJ ŚWIŃ TRAKTOWANYCH ZEARALENONEM**

### **Wstęp**

Zearalenon (ZEN) to mikotoksyna, będącą produktem wtórnego metabolizmu grzybów z rodzaju *Fusarium* (np. *Fusarium graminearum*, *F. Cerealia*, *F. semitectum*, *F. culmorum*), zanieczyszczający głównie pszenicę i kukurydzę, materiały paszowe powszechnie stosowane w żywieniu świń. ZEN jest uważany za jedną z najczęściej występujących mikotoksyn na świecie (Binder 2007). Wykrywany jest bardzo często w paszach granulowanych, co wynika z wysokiej stabilności ZEN na wysoką temperaturę i ciśnienie (Cheli i in. 2013). ZEN jest szybko wchłaniany po podaniu doustnym i szacuje się, że jego absorpcja jest na poziomie 80–85%. ZEN i jego pochodne są wykrywane we krwi w ok. 30 min po podaniu doustnym (Minervini i in. 2005). Po wchłonięciu do organizmu ZEN jest metabolizowany głównie w systemach mikrosomalnych wątroby zwierząt i ludzi. Metabolity ZEN to:  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZOL),  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZOL),  $\alpha$ -zearalanol ( $\alpha$ -ZAL),  $\beta$ -zearalanol ( $\beta$ -ZAL) oraz zearalanon (ZAN). Uważa się, że istnieją dwie drogi metabolizmu ZEN: hydroksylacja prowadząca do powstania  $\alpha$ - i  $\beta$ -ZOL, katalizowana przez dehydrogenazę 3 $\alpha$ - i 3 $\beta$  hydroksysteroidową (HSD), i koniugacja ZEN oraz jego zredukowanych metabolitów z kwasem glukuronowym, katalizowana przez urydynotransferazę difosforanowo-glukuronylową (UDPGT) (Binder i in 2017). W związku z tym ZEN jest substratem dla 3 $\alpha$ -HSD i 3 $\beta$ -HSD obecnych w wielu tkankach steroidogennych, takich jak: wątroba, nerki, jądro, prostata, podwzgórze, przysadka, jajnik czy jelito. Wykazano, że w biotrasformacji wątrobowej świnię konwertują ZEN głównie w  $\alpha$ -ZOL. Glukuronid ZEN jest wydalany

z żółcią, aby zostać ponownie wchłoniętym i dalej metabolizowanym przez błonę śluzową jelit (głównie w  $\alpha$ -ZOL), po czym ostatecznie przedostaje się do wątroby i krążenia ogólnoustrojowego przez żyłę wrotną (Jakimiuk i in. 2010). Cykl jelitowo-wątrobowy powoduje wydłużenie retencji ZEN i jego pochodnych w układzie krążenia, opóźniając eliminację i wydłużając czas narażenia błon śluzowych układu pokarmowego.

Struktura ZEN jest podobna do steroidów obecnych w organizmie, co wpływa na to, że ZEN wiąże się z receptorami estrogenowymi jako agonista. ZEN i jego pochodne wywołują efekty estrogenowe u różnych gatunków zwierząt (Peraica i in. 1999). Świnie są szczególnie wrażliwe na ten rodzaj mikotoksyny. Może u nich powodować przekrwienie, obrzęk sromu, wypadnięcie pochwy, a nawet wypadnięcie odbytnicy, nimfomanię, ciężę rzekomą, zanik jajników i zmiany w endometrium, a poprzez wywołanie nieprawidłowego działania jajników powoduje bezpłodność loch (Minervini, Dell'Aquila 2008, Cortinovis i in. 2013). W krajach należących do Unii Europejskiej od 2006 roku obowiązują zalecenia co do granicznego zanieczyszczenia pasz w ZEN. Dla dorosłych świń graniczny poziom określono na 250  $\mu\text{g}$  ZEN/kg paszy/dzień, natomiast dla loch i prosiąt jest to 100  $\mu\text{g}$  ZEN/kg paszy/dzień (European Commission 2006). W 2014 roku ustalono dla prosiąt wartość NOAEL (poziom narażenia niewywołujący dających się zaobserwować szkodliwych skutków, ang. no-observed-adverse-effect level) na poziomie 10,4  $\mu\text{g}$  ZEN/kg mc/dzień, który jest dla nich bezpieczny, ponieważ nie wywołuje w macicy i sromie objawów hiperestrogenizmu (EFSA CONTAM Panel 2014).

Stres oksydacyjny to stan braku równowagi między procesem produkcji i eliminacji reaktywnych form tlenu (ROS) (Hussain i in. 2016). ROS – w tym wolne rodniki ROS oraz związki nierodnikowe ROS są niestabilnymi i aktywnymi cząsteczkami tlenowymi. Wzrost wewnątrzkomórkowych ROS prowadzi nie tylko do częstych interakcji ze składnikami komórkowymi takimi, jak: białka, tłuszcze i DNA, ale także wyzwała powiązane szlaki sygnałowe (Bhattacharyya i in. 2014; Finkel, Holbrook 2000). Stres oksydacyjny spowodowany nieproporcjonalną produkcją ROS przyczynia się do wielu chorób jelitowych, sercowo-naczyniowych czy neurodegeneracyjnych (Kim, Sieburth 2018).

Wcześniejsze badania wykazały, że postępujący stres oksydacyjny indukowany przez ZEN w układzie pokarmowym zwiększa peroksydację makrocząsteczek, prowadząc do zmian w błonach lipidowych i białkach (Zhou i in. 2015). Jednym z kluczowych mechanizmów ochrony przed wolnymi rodnikami, na który może oddziaływać ZEN, jest aktywność dysmutazy ponadtlenukowej (SOD), enzymu katalizującego reakcję rozkładu anionorodnika ponadtlenukowego do nadtlenu wodoru i tlenu cząsteczkowego (Ighodaro, Akinloye 2018). SOD jest metaloenzymem i stanowi zasadniczy mechanizm obrony przeciwko toksycznemu oddziaływaniu nadtlenuków w komórkach. Poprzez swoją aktywność enzymy SOD kontrolują poziomy różnych reaktywnych form tlenu (RFT) i reaktywnych form azotu, ograniczając w ten sposób potencjalną toksyczność tych cząsteczek i kontrolując szerokie aspekty życia komórkowego, które są regulowane przez ich funkcje sygnalizacyjne (Wang i in. 2018).

## Cel

Celem doświadczenia była ocena produkcji dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w okrężnicy zstępującej loszek po ekspozycji na ZEN w dawkach: 5 µg, 10 µg i 15 µg ZEN/kg m.c.

## Material i metody

Wszystkie procedury eksperymentalne z udziałem zwierząt zostały przeprowadzone zgodnie z polskimi przepisami określającymi zasady i warunki doświadczeń na zwierzętach (zgoda Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach Nr 12/2016 i 45/2016/DLZ). Do doświadczenia wykorzystano dwadzieścia sztuk loszek ( $14,5 \pm 2$  kg masy ciała). Przed rozpoczęciem doświadczenia świnię aklimatyzowano przez tydzień w pomieszczeniach doświadczalnych dla zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Zwierzęta utrzymywano w zagrodach, a paszę i wodę podawano *ad libitum*.

Loszki losowo przydzielono na trzy grupy eksperymentalne (ZEN I, ZEN II i ZEN III; n=5) i negatywną grupę kontrolną (n=5). Loszkom grupy ZEN I, ZEN II i ZEN III podawano doustnie ZEN (Z2125-26MG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) w dawce odpowiednio 5 µg, 10 µg i 15 µg ZEN/kg m.c. Odpowiednie dla świń dawki ZEN rozpuszczono w 96-procentowym etanolu (SWW 2442-90, Polskie Odczynniki SA, Polska) i umieszczono na nośniku paszy umieszczonym w żelatynowych kapsułkach. Przed podaniem otwarte kapsułki pozostawiono w temperaturze pokojowej celem odparowania etanolu. Kapsułki z ZEN podawano codziennie przed porannym karmieniem. W odstępach tygodniowych zwierzęta ważono celem dostosowania dawki do osobnika. Paszę wolną od mikotoksyn podawano loszkom *ad libitum* dwa razy dziennie o 8:00 i 17:00.

W 42 dniu eksperymentu świniom podano azaperon (Stresnil, Jansen Pharmaceutica NV, Belgia, 4 mg/kg masy ciała, im) i po 15 minutach śmiertelną dawkę pentobarbitalu sodu (Morbital, Biowet Puławy, Puławy, Polska, 0,6 ml/kg masy ciała, iv). Następnie od wszystkich sztuk pobrano próbki okrężnicy zstępującej oraz przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu wykonania analiz.

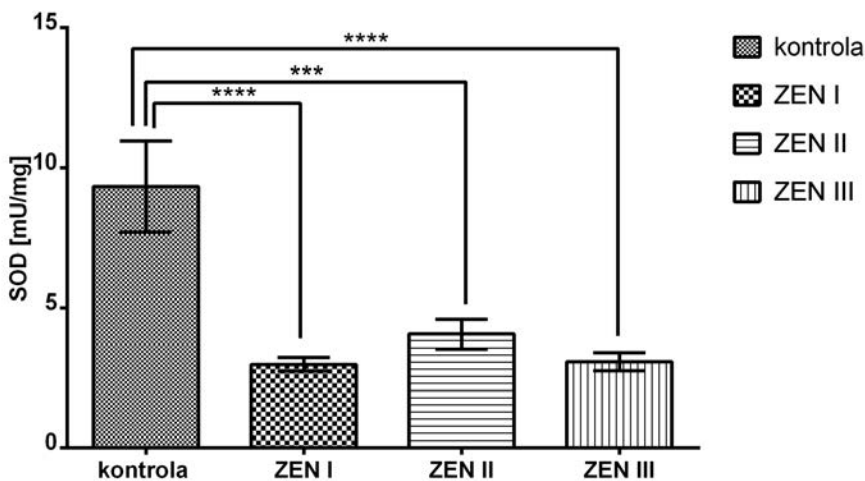
Oznaczanie aktywności SOD wykonano komercyjnym testem według instrukcji producenta Superoxide Dismutase Assay Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Stężenie dialdehydu malonowego (MDA) oznaczono metodą Weitner i in. (2016). Uzyskane wyniki oznaczeń SOD i MDA przeliczono na 1 mg białka oznaczonego według metody Bradford (1976). Uzyskane wyniki pomiarów poddano analizie statystycznej za pomocą programu Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software, USA). Zarówno dla grupy kontrolnej, jak i doświadczalnych wyliczono wartości średnie i stan-

dardowy błąd średniej (SEM), a różnice pomiędzy średnimi analizowano za pomocą testu dwuczynnikowego Anova z analizą post-hoc Tukeya. Wartości  $P < 0,05$  uznano za istotne statystycznie.

## Wyniki

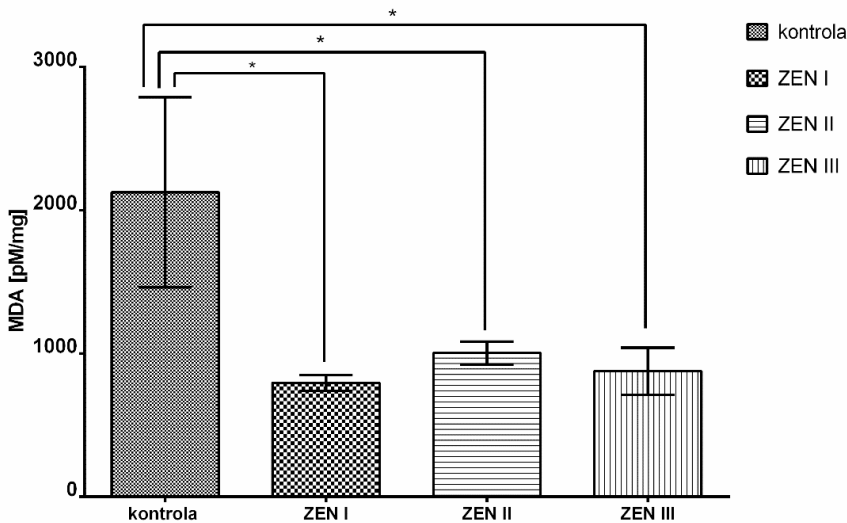
Wyniki dotyczące aktywności SOD w okrzężnicy zstępującej zwierząt zamieszczono na rycinie 1. Grupa kontrolna charakteryzowała się statystycznie wyższą aktywnością SOD w odniesieniu do grup doświadczalnych i wynosiła  $9,33 \pm 1,62$  mU/mg. Grupy ZEN I, ZEN II i ZEN III odnotowały statystycznie niższe aktywności SOD w odniesieniu do grupy kontrolnej i wyniosły odpowiednio  $2,98 \pm 0,24$  mU/mg ( $P < 0,0001$ ),  $4,06 \pm 0,53$  mU/mg ( $P < 0,001$ ) i  $3,08 \pm 0,32$  mU/mg ( $P < 0,0001$ ).

Wyniki oznaczenia stężenia MDA w ścianie okrzężnicy zstępującej zobrazowano na rycinie 3. Stężenie MDA w grupie kontrolnej było statystycznie wyższe od tych oznaczonych w grupach doświadczalnych i wyniosło  $2125,00 \pm 664,00$  pM/mg ( $P < 0,05$ ). W grupach doświadczalnych ZEN I, ZEN II i ZEN III wyniosły odpowiednio:  $794,50 \pm 55,06$  pM/mg,  $1004,00 \pm 79,54$  pM/mg i  $876,20 \pm 165,50$  pM/mg.



Rycina 1. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, SOD (mU/mg) w okrzężnicy zstępującej loszek: kontrola, ZEN I (5  $\mu\text{g/kg m.c.}$ ), ZEN II (10  $\mu\text{g/kg m.c.}$ ) i ZEN III (15  $\mu\text{g/kg m.c.}$ ) po 42 dniach narażenia na mikotoksynę. Wyniki przedstawiono jako średnią  $\pm$  SEM. Różnice istotne statystycznie określono na poziomie \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*\*  $P < 0,0001$

Źródło: opracowanie własne.



Rycina 3. Stężenie malondialdehydu, MDA (pM/mg) w okrężnicy zstępującej loszek: kontrola, ZEN I (5 µg/kg m.c.), ZEN II (10 µg/kg m.c.) i ZEN III (15 µg/kg m.c.) po 42 dniach narażenia na mikotoksynę. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SEM. Różnice istotne statystycznie określono na poziomie \*  $P < 0,05$

Źródło: opracowanie własne.

## Dyskusja

Niewielkie ilości reaktywnych form tlenu (RFT) są stale wytwarzane w komórkach w wyniku normalnych procesów fizjologicznych. Toksyczne substancje w pożywieniu lub zanieczyszczenia środowiskowe, w tym ZEN po wchłonięciu przez komórki ssaków, mogą przyczynić się do zwiększenia wytwarzania RFT (Ferrer i in. 2009; Tatay i in. 2016). Komórki posiadają komórkowe mechanizmy ochronne przed biologicznymi reaktywnymi produktami pośrednimi, ksenobiotykami (w tym mikotoksynami) i produktami przemiany materii. SOD, katalaza (CAT) i peroksydaza glutationowa (GPx) są ważnymi enzymami obronnymi dla przeżycia komórek w obliczu stresu oksydacyjnego, a glutation (GSH) zapewnia ochronę antyoksydacyjną przed zdarzeniami oksydacyjnymi (Deponte 2013). Gdy występuje nierównowaga między wytwarzaniem utleniających cząsteczek molekularnych a obecnością komórkowych środków przeciwutleniających na korzyść prooksydantów, mogą wystąpić zmiany w sygnałach komórkowych i pewne rodzaje uszkodzeń. Nadprodukcja RFT może zmieniać przepuszczalność i strukturę błony oraz wywoływać mutacje DNA (Guo i in. 2013). Mitochondria zawierają własne DNA, które jest szczególnie podatne na działanie RFT związanych ze stresem oksydacyjnym (Guo i in. 2013). Intensywna ekspozycja na RFT może spowodować zatrzymanie produkcji energii w mitochondriach (Prosperini i in. 2013).

W innych badaniach ZEN i jego metabolity indukowały stres oksydacyjny poprzez wytwarzanie RFT w komórkach HepG2. ZEN i  $\beta$ -ZOL wykazały mniejszą produkcję RFT niż  $\alpha$ -ZOL. Ponadto ZEN i  $\beta$ -ZOL indukowały wytwarzanie RFT w sposób zależny od dawki podczas i czasu narażenia (Ferrer i in. 2009). Wyniki te dowodzą, że  $\alpha$ -ZOL może być głównym czynnikiem przyczyniającym się do całkowitej produkcji RFT.

SOD jest metaloenzymem i stanowi zasadniczy mechanizm obrony przeciwko toksycznemu oddziaływaniu nadtlenu w komórkach (Wang i in. 2017). Występuje w dwóch postaciach: wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej. Wyróżniamy trzy izoformy SOD. Postać wewnątrzkomórkowa zlokalizowana jest w cytoplazmie i zawiera w centrum aktywnym miedź i cynk (Cu/Zn-SOD; SOD-1) oraz w macierzy mitochondrialnej z manganem w centrum aktywnym (Mn-SOD; SOD-2). Na zewnątrz komórek znajduje się pozakomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa EC-SOD; SOD-3 (EC-extra-cellular), zawierająca również miedź i cynk. W badaniach własnych zaobserwowano spadek SOD oraz obniżenie stężenia MDA. Podobne wyniki uzyskano w badaniach na ciężarnych szczurach, w których wykazano, że zearalenon powoduje obniżenie aktywności SOD zarówno w surowicy, jak i w wątrobie. (Wu i in. 2014; Zhou i in. 2015). Spadek aktywności SOD zanotowany w powyższych badaniach jest jednocześnie powiązany ze spadkiem tworzenia się produktu peroksydacji tłuszczów, MDA, który może powstawać pod wpływem anionorodnika ponadtlenkowego lub nadtlenu wodoru. Nie wyklucza to jednak tworzenia się innych RFT, w tym także tlenku azotu. Zaobserwowane zjawisko może świadczyć o reakcji obronnej organizmu. Nie ma jednak w literaturze jasnych przesłanek co do istoty tego zjawiska.

Pewne przesłanki co do inhibicji wywołanej przez zearalenon jest praca Wanga i wsp. dotycząca wywołaniu autofagii w komórkach Sertolego szczurów. Autorzy zbadali, że ZEN blokuje szlak sygnałowy kinaz PI3K/AKT/m-TOR, który zatrzymuje cykl komórkowy oraz związane z tym reakcje metaboliczne (kinaz mTOR) (Wang i in. 2018). Podziałom komórkowym towarzyszy stres oksydacyjny, więc możliwe, że obserwowany w naszej pracy spadek aktywności SOD może wynikać właśnie z blokowania kinaz regulujących metabolizm i procesy proliferacji.

## Podsumowanie

Narażenie loszek na ZEN powoduje upośledzenie antyoksydacyjnego układu ochrony, wpływając na właściwości barierowe nabłonka okrężnicy zstępującej. Spadek aktywności SOD upośledza zmiatanie anionorodnika ponadtlenkowego, przyczyniając się do wzrostu peroksydacji lipidów błon biologicznych.

## Bibliografia

- Bhattacharyya A., Chattopadhyay R., Mitra S., Crowe S.E. 2014. Oxidative stress: An essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol. Rev.*, 94: 329–354.
- Bergmeyer H.U., Horder M. 1980. IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes, Part3 IFCC Method For Alanine Aminotransferase. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 18: 521–534.
- Binder E.M. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. 2007. *Anim. Feed Sci. Technol.*,133: 149–166.
- Binder S.B., Schwartz-Zimmermann H.E., Varga E., Bichl G., Michlmayr H., Adam G., Berthiller F. 2017. Metabolism of Zearalenone and Its Major Modified Forms in Pigs. *Toxins (Basel)*, 9: 56.
- Bradford M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.
- Cheli F., Battaglia D., Gallo R., Dell'Orto V. 2014. EU legislation on cereal safety: An update with a focus on mycotoxins. *Food Control*, 37: 315–325.
- Cortinovis C., Pizzo F., Spicer L.J., Caloni F. 2013. Fusarium mycotoxins: effects on reproductive function in domestic animals: a review. *Theriogenology* 80, 557–564.
- Deponte M. 2013. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1830: 3217–3266.
- EC (European Commission) Recommendation (2006) Commission recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Off J Eur Union L229*, 7–9 (23.8.2006).
- EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), 2014. Scientific Opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. *EFSA J*;12: 3916.
- Ferrer E., Juan-García A., Font G., Ruiz M.J. 2009. Reactive oxygen species induced by beauvericin, patulin and zearalenone in CHO-K1 cells. *Toxicol. In Vitro* 23: 1504–1509.
- Finkel T., Holbrook N.J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408: 239–247.
- Guo C., Sun L., Chen X., Zhang D. 2013. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res.*, 8: 2003–2014.
- Hussain T., Tan B., Yin Y., Blachier F., Tossou M.C.B., Rahu N. 2016. Oxidative Stress and Inflammation: What polyphenols can do for us? *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2016: 7432797.
- Ighodaro O.M., Akinloye O.A. 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J. Med.*, 54: 287–293.
- Jakimiuk E., Gajęcka M., Jana B., Obremski K., Gajęcki M. 2010. Effect of zearalenone on steroid secretion by porcine follicular cells of ovaries in mono- and coculture *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 54, 419–423.
- Kim S., Sieburth D. 2018. Sphingosine kinase regulates neuropeptide secretion during the oxidative stress-response through intertissue signaling. *J. Neurosci.*, 38: 8160–8176.
- Minervini F., Dell'Aquila M.E. 2008. Zearalenone and Reproductive Function in Farm Animals. *Int. J. Mol. Sci.*, 9: 2570–2584.
- Minervini F., Giannoccaro A., Cavallini A., Visconti A. 2005. Investigations on cellular proliferation induced by zearalenone and its derivatives in relation to the estrogenic parameters. *Toxicol. Lett.*, 159: 272–283.
- Peraica M., Radić B., Lucić A., Pavlović M. 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull. World Health Organ.*, 77: 754–766.

- Prosperini A., Juan-García A., Font G., Ruiz M.J. 2013. Beauvericin-induced cytotoxicity via ROS production and mitochondrial damage in Caco-2 cells. *Toxicol. Lett.*, 222: 204–211.
- Tatay E., Font G., Ruiz M.J. 2016. Cytotoxic effects of zearalenone and its metabolites and antioxidant cell defense in CHO-K1 cells. *Food Chem. Toxicol.*, 96: 43–49.
- Wang B.J., Zheng W.L., Feng N.N., Wang T., Zou H., Gu J.H., Yuan Y., Liu X.Z., Liu Z.P., Bian J.C. 2018. The Effects of Autophagy and PI3K/AKT/m-TOR Signaling Pathway on the Cell-Cycle Arrest of Rats Primary Sertoli Cells Induced by Zearalenone. *Toxins (Basel)*, 28;10(10): 398.
- Wang Y., Branicky R., Noë A., Hekimi S. 2018. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signalling. *J. Cell Biol.*, 217: 1915–1928.
- Weitner T., Inić S., Jablan J., Gabričević M., Domijan A. 2016. Spectrophotometric determination of malondialdehyde in urine suitable for epidemiological studies. *Croat. Chem. Acta*, 89: 133–139.
- Wu K., Liu X., Fang M., Wu Y., Gong Z. 2014. Zearalenone induces oxidative damage involving Keap1/Nrf2/HO-1 pathway in hepatic L02 cells. *Mol. Cell. Toxicol.* 10: 451–457.
- Zhou C., Zhang Y., Yin S., Jia Z., Shan A. 2015. Biochemical changes and oxidative stress induced by zearalenone in the liver of pregnant rats. *Hum. Exp. Toxicol.*, 34: 65–73.

## Abstract

### SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD) ACTIVITY IN THE DESCENDING COLON OF PIGS TREATED WITH ZEARELENONE

Pigs descending colon connects the transverse colon with the rectum. Its major function is to store food debris digested in the previous parts of the digestive tract and form them into stools. Although it does not produce digestive enzymes, it does produce antioxidant enzymes which are part of the antioxidant defense system. They are responsible for preventing formation of oxidative stress caused by free radicals. Free radicals are produced in the body in physiological metabolic processes as a result of the action of various endogenous and exogenous factors. Under normal conditions, there is balance between the formation and removal of free radicals, but disturbance towards oxidation causes arising of oxidative stress. Zearalenone (ZEN) is exogenous substance that influence the antioxidant protection system. It is a mycotoxin commonly found in feed grains. Pigs are animals that are sensitive to this type of toxin, and it causes many diseases, especially those related to the reproductive system. The aim of the experiment was to evaluate the production of superoxide dismutase (SOD) in the descending colon of gilts after exposure to ZEN in the following doses: 5 µg, 10 µg and 15 µg ZEN / kg b.w. Descending colon sections were collected from gilts on day 42 of experiment. SOD enzymatic activity in the descending colon of ZEN-treated animals was significantly lower compared to the control group. Exposure of gilts to ZEN disrupts the antioxidant protection system, affecting the barrier properties of the descending colon epithelium. The decrease in SOD activity impairs the scavenging of the superoxide radical anion, contributing to an increase in the lipid peroxidation of biological membranes.

**Słowa kluczowe:** zearalenon, loszki, okrężnica zstępująca, aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, stres oksydacyjny

**Keywords:** zearalenone, gilts, descending colon, superoxide dismutase activity, oxidative stress



**Szymon Pokrzywka**

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Koło Naukowe „Żywność Zwierząt”

Opiekun: dr hab. Kazimierz Obremski, prof. UWM

## **WPŁYW PODAWANIA ZEARALENONU NA AKTYWNOŚĆ FOSFATAZY ALKALICZNEJ (ALP) JELITA ŚRODKOWEGO PSTRĄGA**

### **Wstęp**

Pstrąg tęczowy to gatunek ryby z rodziny łososiowatych. Naturalnym obszarem jego występowania jest Ameryka Północna, jednak obecnie, w wyniku sztucznego rozpowszechnienia występuje niemal we wszystkich krajach świata (Woźny i in. 2013). Pstrąg tęczowy jest rybą drapieżną, odżywiającą się w naturze pokarmem zwierzęcym. Produkcja ryb hodowlanych w ostatnich dziesięcioleciach znacznie wzrosła, co zwiększyło zapotrzebowanie producentów pasz na surowce roślinne. Popyt ten wynika z ograniczonych zasobów ryb i wynikającego z tego wzrostu kosztów wytwarzania mączki rybnej i oleju rybnego. Tym samym produkty roślinne stały się ważnym źródłem białka i lipidów dla hodowlanych ryb łososiowatych. Jednak stosowanie dodatków roślinnych jako składników paszy dla ryb wzbudza obawy dotyczące zdrowia, wzrostu i reprodukcji ryb hodowlanych, na które potencjalnie może mieć wpływ obecność mikotoksyn w ich diecie (Gonçalves i in. 2020; Pietsch 2020). Liczne badania potwierdziły, że ZEN jest obecny w materiałach paszowych i gotowych paszach stosowanych do hodowli popularnych gatunków ryb oraz krewetek w akwakulturze (Woźny i in. 2013; Gonçalves i in. 2018). Wiedza na temat biologicznych skutków ZEN w gatunkach akwakultury jest niezbędna, aby lepiej zrozumieć potencjalne zagrożenia wynikające z korzystania z ryb hodowanych na paszach pochodzenia roślinnego.

Zearalenon (ZEN), czyli makrocykliczny  $\beta$ -rezorcylinowy kwas laktonowy jest niesteroidową estrogeną mikotoksyną produkowaną jako wtórny metabolit przez liczne gatunki pleśni z rodzaju *Fusarium*. Są one obecne na niemal wszystkich kontynentach i mogą infestować zarówno przed, jak i po zbiorach pszenicę, jęczmień, ryż,

kukurydzą i inne rośliny (Zinedine i in. 2007). Jednak najczęstszym wektorem przenoszącym ZEN są zboża (Pleadin i in. 2012; Streit i in. 2012), gdyż jak podaje literatura, w Europie na 5010 przebadanych próbek mieszanek zbożowych 32% było ZEN pozytywnych (Hueza i in. 2014). Stwierdza się jego obecność nie tylko w świeżych roślinach, ale również w produktach przetworzonych, np. w paszach granulowanych, co jest konsekwencją odporności jego cząsteczki na podwyższoną temperaturę i ciśnienie (Cheli i in. 2014). ZEN ulega szybkiemu wchłanianiu w przewodzie pokarmowym, a następnie jest hydroksylowany w ścianie jelita i w wątrobie do  $\alpha$ - i  $\beta$ -zearalenolu i  $\alpha$ - i  $\beta$ -zearalenalu. Nie powoduje zatruc ostrych, ale ze względu na strukturalne podobieństwo do 17beta-estradolu ma zdolność do wpływu na układ hormonalny przez estrogenizację i wywoływanie zmian w układzie rozrodczym ssaków i ryb (Walczak i in. 2018). Poza działaniem nefrotoksycznym i hepatotoksycznym potwierdzono jego udział w powstawaniu reaktywnych form tlenu, co zaburza równowagę oksydo-redukcyjną, wywołując stres oksydacyjny (SO) w konsekwencji prowadzący do uszkodzenia lipidów, białek i DNA (Jia i in. 2014). Coraz więcej dowodów potwierdza rolę SO w patofizjologii chorób związanych z mikotoksynami.

Systemy antyoksydacyjne i detoksykacyjne glutationu (GSH) odgrywają główną rolę w antyoksydacyjnej funkcji komórek. Narażenie ludzi na mikotoksyny wymaga produkcji GSH w zależności od potrzeb. Badania sugerują, że mikotoksyny mogą ograniczać tworzenie GSH ze względu na zmniejszoną ekspresję genów enzymów potrzebnych do jego tworzenia, zakłócenie jego produkcji związane z mikotoksynami może skutkować nadmiernym SO, który prowadzi do uszkodzenia tkanek i chorób ogólnoustrojowych. Chociaż przeprowadzono wiele badań nad mechanizmami uszkodzeń związanych z mikotoksynami, związek między metabolizmem, toksycznością i rakotwórczością mikotoksyn pozostaje nie w pełni poznany (Ellis 2009). Mikotoksyny, występujące w małych dawkach, nie powodują problemów zdrowotnych, ponieważ wiążą się z glutationem poprzez interakcję z enzymem S-transferazy glutationowej, który ułatwia wydalanie mikotoksyn (Roebuck i in. 2009). Zatem zarówno dostępność zredukowanego glutationu, jak i enzymów GSH są ważne w zapobieganiu patologii związanej z mikotoksynami.

Fosfataza alkaliczna (ALP) jest hydrolazą związaną z rąbkiem szczoteczki błony śluzowej jelita, której aktywność wskazuje na stopień różnicowania enterocytów (Hashimoto, Shimizu 1993). Badania wykazały, że ALP jest zdolny do defosforylacji i detoksykacji lipopolisacharydu (LPS) (Beumer i in. 2003), a powstały produkt, LPS z ugrupowaniem monofosforylolipidu A, jest nietoksyczny (Schromm i in. 1998) i może nawet antagonizować działanie LPS (Astiz i in. 1995). Badania *in vitro* prowadzone na linii komórkowej Caco-2 pokazują, że mikotoksyny wpływają na obniżenie aktywności ALP w komórkach (Kasuga i in. 1998).

Zgodnie z aktualną rekomendacją Komisji Europejskiej zawartość ZEN w paszy oraz karmie dla zwierząt nie powinna przekraczać 2 mg/kg, z wyjątkiem kukurydzy i jej produktów ubocznych (EC, 2006). Ta wartość została ustalona na podstawie opinii

naukowej, którą podano bez odniesienia do żadnych konkretnych danych dotyczących biologicznych skutków ZEN u ryb.

## Cel

Celem badania było określenie wpływu ZEN na aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) jelita środkowego oraz stężenie glutationu (GSH) w ścianie jelita środkowego pstrąga tęczowego karmionego paszą zawierającą dopuszczalną przez zalecenia Komisji Europejskiej dawkę ZEN.

## Material i metody

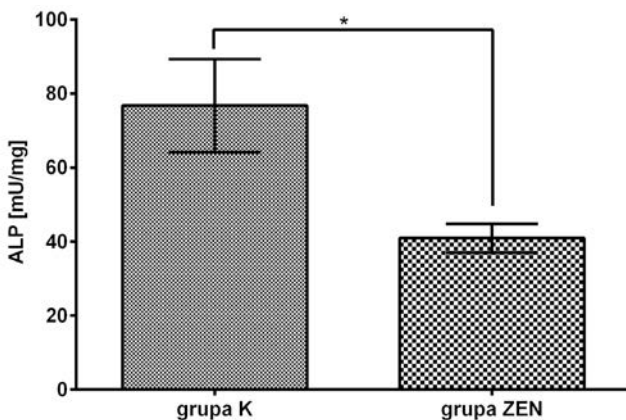
Hodowlę i ekspozycję ryb prowadzono w Zakładzie Badań Ryb Łososiowatych w Rutkach (Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie; Polska). Doświadczenie przeprowadzone zostało zgodnie z polskimi przepisami określającymi zasady i warunki doświadczeń na zwierzętach. Eksperyment uzyskał aprobatę Lokalnej Komisji Etycznej w Olsztynie (uchwała nr 74/2014 z dnia 10 grudnia 2014 r.). Przez dwadzieścia trzy tygodnie do momentu wyklucia pstrągom podawano ZEN w dawce 2 mg/kg paszy. Po okresie ekspozycji od ryb grupy kontrolnej (grupa K, n=10) i ryb karmionych paszą z ZEN (grupa ZEN, n=10) poddanych sedacji pobrano wycinki jelita środkowego i przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  aż do czasu analizy.

W celu ekstrakcji ALP pobrano 1 g materiału tkankowego i homogenizowano z 2,5 ml buforu do ekstrakcji [PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ); 0,5% cytrynian sodu; 0,05% (POCH, Poland); Tween 20 (Sigma Aldrich, USA); inhibitory proteaz (Ref 11 697 498 001, Roche)], za pomocą homogenizatora (Omni-Tips™ Disposable, Omni International). Uzyskany homogenat wirowano (8600g) przez godzinę (wirówka Eppendorf 5804R), a uzyskane próbki supernatantów przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu wykonania oznaczeń. Oznaczenia aktywności ALP w próbkach homogenatów wykonano metodą Matsushita i in. (2007), a oznaczenia stężenia GSH wykonano komercyjnym testem według instrukcji producenta Glutathione Colorimetric Detection Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Uzyskane wyniki przeliczono na 1 mg białka oznaczonego według metody Bradford (1976).

Uzyskane wyniki pomiarów poddano analizie statystycznej za pomocą programu Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software, USA). Dla wszystkich badanych grup wyliczono wartości średnie i standardowy błąd średniej (SEM), a różnice pomiędzy średnimi analizowano za pomocą testu t-Studenta. Wartości  $P < 0,05$  uznano za istotne statystycznie.

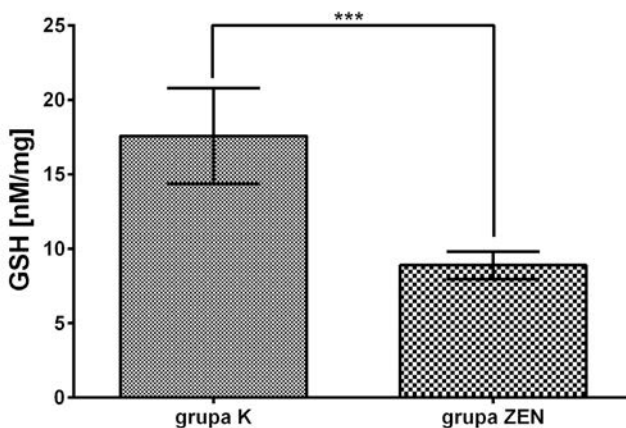
## Wyniki

Uzyskane wyniki badań zamieszczono na rycinie 1 i 2. W próbkach wykonanych z odcinków jelit pobranych od osobników z grupy żywionej paszą z dodatkiem ZEN ak-



Rycina 1. Zmiany stężenia ALP w jelicie środkowym pstrąga tęczowego: grupa kontrolna (grupa K) oraz grupa tworzona przez osobniki narażone na ZEN w dawce 2 mg/kg paszy (grupa ZEN). Wyniki przedstawiono, jako średnią  $\pm$  SEM. Różnice istotne statystycznie określono na poziomie \*  $P < 0,05$

Źródło: opracowanie własne.



Rycina 2. Zmiany stężenia GSH w jelicie środkowym pstrąga tęczowego: grupa kontrolna (grupa K) oraz grupa tworzona przez osobniki narażone na ZEN w dawce 2mg/kg paszy (grupa ZEN). Wyniki przedstawiono jako średnią  $\pm$  SEM. Różnice istotne statystycznie określono na poziomie \*\*\*  $P < 0,001$

Źródło: opracowanie własne.

tywność fosfatazy alkalicznej wynosiła  $40,92 \pm 3,93$  mU/mg i była niemal o połowę niższa od aktywności zmierzonej w próbkach pobranych od zwierząt z grupy kontrolnej ( $76,72 \pm 12,54$  mU/mg,  $P < 0,05$ ).

Stężenie GSH w jelicie środkowym pochodzącym od osobników narażonych na ZEN wystąpiło i wynosiło  $8,89 \pm 0,92$  nM/mg i było o ponad połowę niższe ( $P < 0,001$ ) od tego zmierzonego u osobników z grupy kontrolnej ( $17,58$  nM/mg).

## Dyskusja

Uszkodzenia oksydacyjne tkanek u ryb są ściśle związane z nieenzymatycznymi przeciwutleniaczami, takimi jak metaboliczne grupy -SH, i enzymatycznymi, takimi jak katalaza czy peroksydaza glutationowa (Jayaseelan i in. 2014). Głównym donorem grup sulfhydrylowych w komórkach są reszty cysteinowe białek oraz glutation (GSH). Zapotrzebowanie na GSH jest zawsze wysokie, gdyż jest on zużywany pod wpływem wielu bodźców, dlatego GSH jest niezbędny dla organizmu. GSH jest złożony z glutaminy, cysteiny oraz glicyny i wykorzystywany jako przeciwutleniacz. GSH jest głównym niebiałkowym tiolem odpowiedzialnym za homeostazę komórkową i utrzymanie komórkowej równowagi redoks (Wu i in, 2004; Forman i in. 2009).

Mikotoksyny są grupą związków, które wykazują zdolność obniżania stężenia GSH w komórkach. I tak ekspozycja na ochratoksynę A (OTA) może zmniejszać powstawanie ligazy  $\gamma$ -glutamylcysteiny (GCLC – Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit), enzymu ograniczającego szybkość syntezy GSH, co powoduje zmniejszenie wewnątrzkomórkowego poziomu GSH (Huang i in. 2001). Ostatnie badania wykazały, że aflatoksyna B1 (AFB1) powoduje zmiany w wewnątrzkomórkowych mechanizmach antyoksydacyjnych, takich jak ekspresja czynnika transkrypcyjnego Nrf2, wiążącego się z elementem odpowiedzi antyoksydacyjnej (ARE) jądrowego DNA, dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), peroksydaza glutationowa (GPx) i katalaza CAT (Liu, Wang i in.; 2016; Wang i in. 2017), hamując enzymy antyoksydacyjne i powodując wzrost peroksydacji lipidów (LPO) oraz spadek poziomu GSH (Maurya, Trigun, 2016). Jak się również okazuje podawany pstrągom przez dwadzieścia trzy tygodnie ZEN w dawce uznawanej za bezpieczną również prowadzi do obniżenia komórkowej puli GSH.

Jelitowa fosfataza alkaliczna (IALP) jest ewolucyjnie konserwowanym enzymem, który odgrywa kluczową rolę w kontrolowaniu stanu zapalnego w jelicie. Jego główne właściwości, zasadniczo odkryte u ssaków lądowych, obejmują regulację pH powierzchni enterocytów, detoksykację prozapalnych składników drobnoustrojów, modulację mikroflory jelitowej i kontrolę wchłaniania składników odżywczych (np. wapnia, fosforu, kwasów tłuszczowych) (Lallès 2019). IALP jest bardzo ważny przy wytwarzaniu (immunologicznej) tolerancji na drobnoustroje w czasie kolonizacji jelit. Odgrywa również kluczową rolę w utrzymywaniu pod kontrolą stanu zapalnego, zarówno jelito-

wego, jak i ogólnoustrojowego, defosforylacji szeregu składników drobnoustrojowych i endogennych (np. lipopolisacharydu-LPS; adenozynotrójfosforanu -ATP). Dane w przypadku ryb są ograniczone, ale potwierdzają fundamentalną rolę IALP w tworzeniu tolerancji w stosunku do mikroflory jelitowej i kontroli stanu zapalnego u organizmach wodnych (Bates i in. 2006; Bates i in. 2007). Tak więc, zdolność IALP do skutecznej defosforylacji i detoksykacji składników prozapalnych wydaje się być głównym zachowanym ewolucyjnie, choć bardzo prostym mechanizmem przeciwzapalnym (Yang i in. 2012). Jak dowodzą badania, na ekspresję IALP w jelitach może wpływać wiele różnych czynników, m.in. żywienie czy system odchowu (Wu i in. 2009; Xiao i in. 2017). Przeprowadzony przez nas eksperyment dowodzi, że narażenie pstrągów na ZEN wpływa na obniżenie aktywności jelitowej fosfatazy alkalicznej.

## Podsumowanie

Nabłonek jelita ryb jest tkanką, w której zachodzi intensywnie mitozą i znajdują się komórki macierzyste enterocytów. Poza faktem, że ALP jest istotnym enzymem w metabolizmie fosforu detoksykują LPS, jego aktywność jest związana z procesami proliferacji i różnicowania się komórek. Ponieważ ZEN jest mikotoksyną o właściwościach cytotoxycznych i prooksydacyjnych, hamuje syntezę białek i obniża stężenie GSH w błonie śluzowej jelita. Wykazany w badaniach spadek jelitowej aktywności ALP zaburza procesy fizjologiczne błony śluzowej jelita środkowego pstrągów i może być przyczyną problemów z utrzymaniem prawidłowej homeostazy mikroflory jelitowej i zwiększeniem translokacji drobnoustrojów przez barierę jelitową.

## Bibliografia

- Astiz M.E., Rackow E.C., Still J.G., Howell S.T., Cato A., Von Eschen K.B., Ulrich J.T., Rudbach J.A., McMahon G., Vargas R. 1995. Pretreatment of normal humans with monophosphoryl lipid A induces tolerance to endotoxin: a prospective, double-blind, randomized, controlled trial. *Crit. Care Med.*, 23: 9–17.
- Bates J.M., Akerlund J., Mittge E., Guillemin K. 2007. Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota. *Cell Host Microbe*, 2: 371–382.
- Bates J.M., Mittge E., Kuhlman J., Baden K.N., Cheesman S.E., Guillemin K. 2006. Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Developmental Biology*, 297: 374–386.

- Beumer C., Wulferink M., Raaben W., Fiechter D., Brands R., Seinen W. 2003. Calf intestinal alkaline phosphatase, a novel therapeutic drug for lipopolysaccharide (LPS)-mediated diseases, attenuates LPS toxicity in mice and piglets. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 307: 737–744.
- Bradford M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.
- Cheli F., Pinotti L., Rossi L., Dell'Orto V. 2013. Effect of milling procedures on mycotoxin distribution in wheat fractions: a review. *LWT-Food Sci. Technol.*, 54: 307–314.
- EC (European Commission), 2006: Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Official Journal of the European Union* 23.8.2006, L 229/7–9.
- Ellis E.M. 2009. Protection against aflatoxin B1 in rat—A new look at the link between toxicity, carcinogenicity, and metabolism. *Toxicol. Sci.*, 109: 1–3.
- Forman H.J., Zhang H., Rinna A. 2009. Glutathione 2009. Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Asp. Med.* 30: 1–12.
- Gonçalves R.A., Hofstetter U., Schatzmayr D., Jenkins T. 2018. Mycotoxins in southeast Asian aquaculture: plant-based meals and finished feeds. *World Mycotoxin J.* 11: 265–275.
- Gonçalves R.A., Schatzmayr D., Albalat A., Mackenzie S. 2020. Mycotoxins in aquaculture: feed and food. *Rev. Aquac.* 12: 145–175.
- Hashimoto K., Shimizu M. 1993. Epithelial properties of human intestinal Caco-2 cells cultured in a serum-free medium. *Cytotechnology* 3: 175–184.
- Huang Q., Dunn R.T., Jayadev S., DiSorbo O., Pack, F.D., Farr S.B. Stoll R.E., Blanchard, K.T. 2001. Assessment of cisplatin-induced nephrotoxicity by microarray technology. *Toxicol. Sci.* 63: 196–207.
- Hueza I.M., Raspantini P.C., Raspantini L.E., Latorre A.O., Górniak S.L. 2014. Zearalenone, an estrogenic mycotoxin, is an immunotoxic compound. *Toxins (Basel)* 6: 1080–1095.
- Jayaseelan C., Rahuman A.A., Ramkumar R., Perumal P., Rajakumar G., Kirthi A.V. 2014. Effect of sub-acute exposure to nickel nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 107: 220–228.
- Jia Z., Liu M., Qu Z., Zhang Y., Yin S., 2014. Shan A., Toxic effects of zearalenone on oxidative stress, inflammatory cytokines, biochemical and pathological changes induced by this toxin in the kidney of pregnant rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 37: 580–591.
- Kasuga F., Hara-Kudo Y., Saito N., Kumagai S., Sugita-Konishi Y. 1998. In vitro effect of deoxynivalenol on the differentiation of human colonic cell lines Caco-2 and T84. *Mycopathologia*, 142: 161–167.
- Lallès J.P. 2019. Intestinal alkaline phosphatase in the gastrointestinal tract of fish: biology, ontogeny, and environmental and nutritional modulation. *Reviews in Aquaculture*, 1–27.
- Liu Y., Wang W.J. 2016. Aflatoxin B1 impairs mitochondrial functions, activates ROS generation, induces apoptosis, and involves in Nrf2 signal pathway in primary broiler hepatocytes. *Animal Science Journal*, 87: 1490–1500.
- Matsushita M., Irino T., Kamiyama K., Muramoto Y., Kawaguchi T., Nakano T., Komoda T. 2007. Evaluation of a method for measuring tissue non-specific alkaline phosphatase activity in healthy subjects. *Ann Clin Biochem.*, 44: 544–548.
- Maurya B.K., Trigun S.K. 2016. Fisetin modulates antioxidant enzymes and inflammatory factors to inhibit aflatoxin B1 induced hepatocellular carcinoma in rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016: 1972793.
- Pietsch C. 2020. Risk assessment for mycotoxin contamination in fish feeds in Europe. *Mycotoxin Res.*, 36: 41–62.
- Pleadin J., Sokolović M., Peršić N., Zadravec M., Jaki V., Vulić A. 2012. Contamination of maize with deoxynivalenol and zearalenone in Croatia. *Food Control* 28: 94–98.

- Roebuck B.D., Johnson D.N., Sutter C.H., Egnier P.A., Scholl P.F., Friesen M.D., Baumgartner K.J., Ware N.M., Bodreddigari S., Groopman J.D., Kensler T.W., Sutter T.R. 2009. Transgenic expression of aflatoxin aldehyde reductase (*akr7a1*) modulates aflatoxin B1 metabolism but not hepatic carcinogenesis in the rat. *Toxicol. Sci.*, 109: 41–49.
- Schromm A.B., Brandenburg K., Loppnow H., Zähringer U., Rietschel E.T., Carroll S.F., Koch M.H., Kusumoto S., Seydel U. 1998. The charge of endotoxin molecules influences their conformation and IL-6-inducing capacity. *J. Immunol.*, 161: 5464–5471.
- Streit E., Schatzmayr G., Tassi P., Tzika E., Marin D., Taranu I., Tabuc C., Nicolau A., Aprodu I., Puel O., Oswald I.P. 2012. Current situation of mycotoxin contamination and cooccurrence in animal feed—focus on Europe. *Toxins (Basel)*, 4: 788–809.
- Walczak M., Jedziniak P., Reichert M. 2018. Wpływ mikotoksyn na zdrowie ryb, *Medycyna Weterynaryjna*, 74: 161–166.
- Wang W.J., Xu Z.L., Yu C., Xu X.H. 2017. Effects of aflatoxin B1 on mitochondrial respiration, ROS generation and apoptosis in broiler cardiomyocytes. *Animal Science Journal*, 2017: 1561–1567.
- Woźny M., Obremski K., Jakimiuk E., Gusiatiu M., Brzuzan P. 2013. Zearalenone contamination in rainbow trout farms in North-Eastern Poland. *Aquaculture*, 416–417: 209–211.
- Wu G., Fang Y.Z., Yang S., Lupton J.R., Turner N.D. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.*, 134: 489–492.
- Wu R.X., Hong W.S., Zhang Q.Y., Chen S.X. 2009. Comparative enzyme activities of the intestinal brush border membranes of the herbivorous mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris* and the carnivorous Chinese black sleeper *Bostrichthys sinensis*. *Journal of Applied Ichthyology*, 25: 571–575.
- Xiao W., Jiang W., Feng L., Liu Y., Wu P., Jiang J. 2017. Supplementation of enzyme-treated soy protein saves dietary protein and promotes digestive and absorptive ability referring to TOR signaling in juvenile fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 43: 1657–1675.
- Yang Y., Wandler A.M., Postlethwait J.H., Guillemin K. 2012. Dynamic evolution of the LPS-detoxifying enzyme intestinal alkaline phosphatase in zebrafish and other vertebrates. *Frontiers in Immunology*, 3: 314.
- Zinedine A., Soriano J., Molto J., Manes J. 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem, Toxicol.*, 45: 1–18.

## Abstract

### EFFECT OF ZEARALENONE ADMINISTRATION ON MIDDLE INTESTINE ALKALINE PHOSPHATASE (ALP) ACTIVITY IN TROUT

Zearalenone (ZEN) is a mycotoxin produced by many species of *Fusarium* mold that infest many species of crops. Rainbow trout is a farmed fish, often grain-fed, which can be a source of ZEN in their diet. According to the current recommendation of the European Commission, the ZEN content in fish feed should not exceed 2 mg/kg.

The aim of the study was to determine the effect of ZEN on the activity of alkaline phosphatase (ALP) in the middle intestine of trout fed with feed containing the dose of ZEN permitted by the recommendations of the European Commission.



For a period of 23 months from hatching, the trouts in the feed were given ZEN at a dose of 2 mg / kg of feed. After the exposure period fishes from control group (group K, n = 10) and group fed with ZEN fodder (group ZEN, n = 10) were euthanized. Then midgut biopsy samples were taken from them to measure ALP activity. The obtained results were converted into 1 mg of protein determined according to the Bradford method. Statistical analysis of the obtained mean values of enzymatic activity was performed using the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

The activity of alkaline phosphatase in the middle intestine of fish fed with the addition of zearalenone was significantly lower than in the intestinal samples of fish from the control group.

**Słowa kluczowe:** zearalenon, pstrąg tęczowy, jelito środkowe

**Keywords:** zearalenone, rainbow trout, midgut

**Zuzanna Polak**

**Milena Kupa**

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Koło Naukowe Położników

Opiekun koła: dr n. wet. Andrzej Jurczak

## **ANALIZA LEKOWRAŻLIWOŚCI NAJCZĘŚCIEJ IZOLOWANYCH BAKTERII Z PRÓBEK MLEKA ĆWIARTKOWEGO OD KRÓW Z KLINICZNYM MASTITIS**

### **Wstęp**

Słowo „mastitis” pochodzi z języka greckiego od „mastos”, oznaczającego pierś, i przyrostka „itis”, określającego stan zapalny. Mastitis, czyli zapalenie gruczołu mlekowego, występuje w dwóch postaciach – podklinicznej i klinicznej. Kliniczne zapalenie wymienia charakteryzuje się miejscowym stanem zapalnym, obrzękiem, lokalnie podwyższoną temperaturą, zaczerwienieniem skóry, bolesnością podczas omacywania oraz zmianą konsystencji, barwy i składu mleka (Philpot, Nickerson 2006). W przebiegu postaci klinicznej stanu zapalnego wymienia objawom lokalnym może towarzyszyć również pogorszenie stanu ogólnego zwierzęcia. Mastitis powoduje znaczne obniżenie wydajności mlecznej, jednocześnie pogarszając jakość mleka, przez co negatywnie wpływa na ekonomię stada (Smulski 2013).

Stan zapalny wymienia najczęściej powodowany jest przez проникnięcie drobnoustrojów patogennych do jego wnętrza. Do patogenów wywołujących mastitis zaliczyć możemy przede wszystkim bakterie, które są najczęstszą przyczyną stanu zapalnego, ale również drożdżaki, grzyby, glony i wirusy. Drobnoustroje wywołujące stan zapalny w wymieniu można podzielić na środowiskowe oraz zakaźne. Bakterie środowiskowe można podzielić na trzy główne grupy: *Streptococcus sp.* (inne niż *Streptococcus agalactiae*), bakterie Coli-podobne oraz *Enterococcus sp.*. Do patogenów zakaźnych zalicza się: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovis* oraz *Mycoplasma bovis* (Philpot, Nickerson 2006). Z kolei Klaas i Zadoks stwierdzili, że wie-

le drobnoustrojów, takich jak *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae*, można określić jako patogeny środowiskowe, nawet jeśli są zwykle klasyfikowane w literaturze jako zakaźne (Klaas, Zadoks 2018). Są to najczęściej izolowane patogeny, jednakże do tej pory zidentyfikowano ponad 190 różnych drobnoustrojów będących przyczyną mastitis i liczba ta nadal wzrasta (Abdi i in. 2021).

Podstawą leczenia mastitis jest identyfikacja czynnika wywołującego stan zapalny. W tym celu próbkę mleka należy poddać badaniu mikrobiologicznemu. Z racji, że najczęstszą przyczyną klinicznego zapalenia wymienia jest infekcja bakteryjna, z próbki mleka wykonuje się posiew bakteriologiczny pozwalający na zidentyfikowanie patogenu. Powszechnie izolowanymi bakteriami z mleka ćwiartkowego są gronkowce koagulazo-dodatnie i ujemne, paciorkowce i bakterie Gram-ujemne, w tym *Escherichia coli* (Contreras, Rodríguez 2011).

Następnie kluczowym dla skutecznego leczenia jest dobór właściwego antybiotyku. W tym celu wykonywany jest antybiogram, służący ocenie zdolności do hamowania wzrostu bakterii przez daną substancję czynną. Celowane postępowanie terapeutyczne na podstawie wyników antybiogramu jest zalecanym sposobem leczenia mastitis (Barański 2015). Dzięki wdrożeniu tego postępowania jesteśmy w stanie wyleczyć chore zwierzę, ograniczając jednocześnie zjawisko lekooporności, będącej obecnie szeroko dyskutowanym zagadnieniem.

Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe jest powszechnym problemem w produkcji bydła mlecznego. Brak skutecznych chemioterapeutyków i antybiotyków oraz trudności w produkcji nowych substancji czynnych to problem globalny, dlatego też ważne jest odpowiednie dobranie substancji przeciwbakteryjnej, która efektywnie zwalczy infekcję gruczołu mlekowego. Głównymi mechanizmami antybiotykoodporności jest nabywanie zdolności do produkcji enzymów rozkładających cząsteczki antybiotyku lub uniemożliwienie wnikania antybiotyku do wnętrza komórki (Lin i in. 2015). Przyczynia się to do wzrostu zachorowalności i śmiertelności zwierząt gospodarskich przy proporcjonalnym powiększeniu kosztów produkcji dla hodowców (Mathew i in. 2007). Około 60–70% wszystkich środków przeciwdrobnoustrojowych podawanych w gospodarstwach mlecznych służy do zapobiegania i leczenia mastitis (Cobirka i in. 2020). Wynika z tego konieczność stosowania nacelowanej terapii, by zmniejszyć zużycie antybiotyków i ograniczyć ryzyko powstania lekooporności, co umożliwi poprawę dobrostanu zwierząt (Stevens i in. 2016).

## Cel

Celem pracy było dokonanie analizy lekowrażliwości bakterii najczęściej izolowanych z próbek mleka ćwiartkowego pochodzącego od krów klinicznie chorych na zapalenie gruczołu mlekowego.

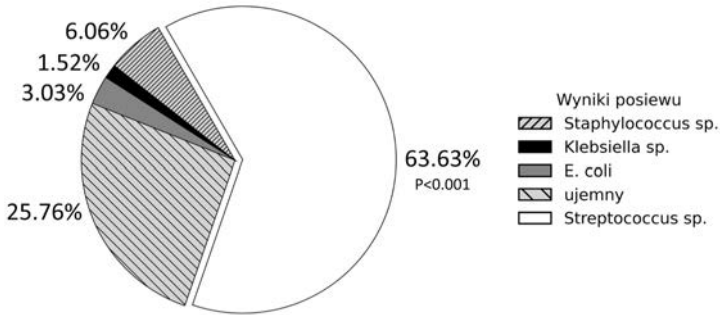
## Materiały i metody

Próbki mleka ćwiartkowego pobierano od lutego 2020 roku do marca 2021 roku od krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej z trzech gospodarstw mlecznych z województwa warmińsko-mazurskiego, o średniej wydajności 9000 litrów, będących pod opieką Polikliniki Wjazdowej Katedry Rozrodu Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Olsztynie. Krowy, od których pobierane było mleko ćwiartkowe, wykazywały objawy klinicznego zapalenia gruczołu mlekowego. Zwracano uwagę przede wszystkim na zmiany makroskopowe wydzieliny gruczołu mlekowego, obrzęk ćwiartki wymienia oraz obniżenie wydajności mlecznej. Przed pobraniem próbki dokonywano mycia i osuszenia skóry wymienia, zdojenia początkowych strug mleka na przedzda-jacz kubkowy i dezynfekcji ujęcia strzyku przy użyciu alkoholu. Kolejno do opisanej próbki pobierano w sposób aseptyczny 10 ml mleka z ćwiartki objętej stanem zapalnym. Każdą pobraną próbkę schłodzono do 4° oraz dostarczano w ciągu czterech godzin na Katedrę Mikrobiologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Olsztynie, gdzie wykonano posiewy bakteriologiczne oraz w przypadku pozytywnego wyniku hodowli – antybiogramy. Próbki mleka były posiewane na podłoże agarowe z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi owczej, a następnie poddawane ocenie mikrobiologicznej (Kaczorek-Łukowska i in. 2021). Ocenę wrażliwości drobnoustrojów wykonano na podłożu Mueller Hinton, zgodnie z rekomendacjami Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). W antybiogramie wrażliwość na poszczególne substancje czynne oznaczano następująco: niewrażliwe 0, nisko wrażliwe +, wysoko wrażliwe +++.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej, wytypowano najczęściej izolowane patogeny oraz oceniono lekowrażliwość. Łącznie pobrano 66 próbek mleka ćwiartkowego od 45 krów. Każda próbka była traktowana jako jednostka eksperymentalna w celu obliczenia częstości występowania patogenów. Do określenia różnicy w występowaniu poszczególnych patogenów użyto testu Chi-kwadrat dobroci dopasowania. Porównanie lekowrażliwości na poszczególne substancje czynne lub ich kombinacje przeprowadzono w stosunku do substancji wykazującej najwyższą skuteczność przy pomocy testu Chi-kwadrat. Analiza statystyczna oraz wykresy zostały wygenerowane przy użyciu języka programowania Python 3 (Python Software Foundation, Delaware, Stany Zjednoczone).

## Wyniki

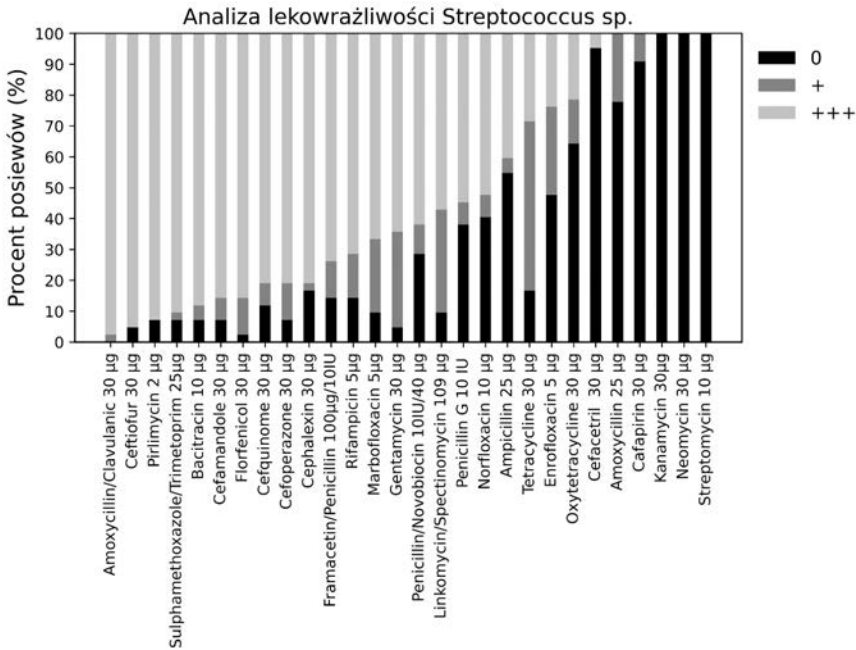
Najczęściej izolowanym patogenem z próbek mleka ćwiartkowego u krów wykazujących objawy klinicznego mastitis były bakterie z rodzaju *Streptococcus sp.*, które identyfikowano w 63,63% przypadków (42 próbki,  $P < 0.001$ ). Posiew bakteriologiczny był ujemny w 25,76% przypadków (17 próbek). Z pozostałych siedmiu próbek izolowano *Staphylococcus sp.*, *E. coli* lub *Klebsiella sp.*, co stanowiło łącznie 10,61% przypadków (wykres 1).



Wykres 1. Częstość występowania poszczególnych bakterii w próbkach mleka ćwiartkowego

Źródło: opracowanie własne.

Analiza lekowrażliwości na podstawie antybiogramów dotyczyła bakterii *Streptococcus sp.*, które były najczęstszą przyczyną zapalenia gruczołu mlekowego u badanych krów. Stwierdzono, że najwyższą wrażliwość bakterie te wykazywały na amoksylinyę z kwasem klawulanowym (97,6% szczepów wrażliwych), której skuteczność nie różniła



Wykres 2. Wrażliwość bakterii *Streptococcus sp.* na poszczególne substancje czynne lub ich kombinacje przedstawiona jako 0 – niewrażliwe oraz w skali wrażliwości od nisko wrażliwych + do wysoce wrażliwych +++

Źródło: opracowanie własne.

się istotnie ( $P > 0.05$ ) w porównaniu do ceftiofuru (95,2%), pirlimycyliny (92,9%), sulfametoksazolu z trimetoprimem (90,5%), bacytracyną (88,1%). Natomiast skuteczność amoksycyliny z kwasem klawulanowym była istotnie wyższa ( $P < 0.05$ ) niż cefamandolu (85,7%), florfenikolu (85,7%), cefquinomu (80,9%), cefoperazonu (80,9%), cefaleksyny (80,9%) oraz wysoce istotnie wyższa ( $P < 0.01$ ) w wypadku pozostałych substancji czynnych bądź ich kombinacji. Bakterie *Streptococcus sp.* całkowitą oporność wykazały na kanamycynę, neomycynę i streptomycynę (wykres 2).

## Dyskusja

Szereg gatunków bakterii z rodzaju *Streptococcus sp.* ma zdolność do infekowania gruczołu mlekowego krów. Gatunki zakaźne w ciągu ostatnich lat straciły na znaczeniu, ponieważ przyjęto bardziej higieniczne metody pozyskiwania mleka, stosowanie lepszego zarządzania ryzykiem oraz rozwój metod terapeutycznych. Coraz częstszym problemem stają się paciorkowce środowiskowe (Cobirka i in. 2020).

Badanie przeprowadzone przez Lassa i in. (2013) dotyczące antybiotykowrażliwości wykazało najwyższą wrażliwość paciorkowców na amoksycylinę – 99,2% oraz wysoką – powyżej 90% na bacytracynę, cefquinom oraz cefapirynę. Wyniki przeprowadzonych badań własnych były zbliżone w odniesieniu do bacytracyny – 88,1% szczepów wysoko wrażliwych i cefquinomu – 81% wysoko wrażliwych. Jednak tylko 22,2% paciorkowców wykazywało niską wrażliwość na amoksycylinę, pozostałe szczepy były odporne. W przypadku cefapiryny jeszcze mniej prób, 9,09%, wykazało niską wrażliwość, natomiast pozostałe – oporność. Streptomycyna i neomycyna są substancjami czynnymi wykazującymi niską skuteczność hamowania wzrostu *Streptococcus sp.* Badania Piecha i in. (2015) pokazały, że w okresie analizowanym, tj. od roku 2007 do 2011, doszło do wzrostu oporności paciorkowców, szczególnie w odniesieniu do tych dwóch antybiotyków.

Badania Bolte i in. (2020) przeprowadzone w Niemczech dowiodły, że gronkowce wykazują wzrost minimalnych stężeń hamujących (MIC) na amoksycylinę z kwasem klawulanowym oraz cefapirynę, co świadczy o rosnącej oporności na te substancje. Zaobserwowano również większą oporność wśród paciorkowców w gospodarstwach dużych, posiadających więcej niż 80 krów w porównaniu z małymi, nieprzekraczającymi 20 osobników. Wskazując na  $\beta$ -laktamy jako substancje charakteryzujące się dużą skutecznością w leczeniu paciorkowcowego zapalenia wymienia, zaobserwowano również nieznacznie podwyższone minimalne stężenia hamujące, określone dla tych antybiotyków. Może to sugerować pojawienie się wśród paciorkowców zdolności do wytwarzania  $\beta$ -laktamazy. Trzynaście procent spośród wszystkich *Streptococcus sp.* wykazuje oporność na wiele antybiotyków. Dlatego też oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe paciorkowców powinna być regularnie badana (Minst i in. 2012).

Wyniki przeprowadzonych badań własnych wykazały bardzo dużą oporność na cefapirynę, natomiast amoksyacyna z kwasem klawulanowym okazała się najskuteczniejsza według antybiogramu.

Z analizy przeprowadzonej przez Makoveca wynika, że około 10–40% przypadków klinicznego zapalenia wymienia dają „brak znaczącego wzrostu” w rutynowych testach kultur (Makovec, Ruegg 2003). W wykonanej przez nas analizie posiewy bakteriologiczne ujemne stanowiły 25,76%. Brak identyfikacji mikroorganizmów w przypadkach klinicznego zapalenia wymienia może mieć wiele przyczyn, np. błędy podczas pobrania próbki, transportu, przechowywania, a także niezapewnienie odpowiednich warunków wzrostu. Otrzymanie wyniku ujemnego może świadczyć również, że czynnikiem etiologicznym nie jest bakteria (Kuehn i in. 2013).

Skuteczność danej substancji czynnej *in vitro* nie odpowiada całkowicie skuteczności *in vivo* ze względu na rozbieżność warunków, w których oddziałuje na bakterie (Sharun et al. 2021). Należy brać pod uwagę, że dany antybiotyk wykazujący wysoką skuteczność w antybiogramie może być mało skuteczny bądź nie oddziaływać w ogóle na wzrost bakterii podczas leczenia. Dotyczy to przede wszystkim *Staphylococcus aureus* ze względu na jego wewnątrzkomórkową lokalizację czy przyczynianie się do powstawania mikroropni i zwłóknień (Rainard i in. 2018). Efekty leczenia w stadzie powinny być także monitorowane w przypadku każdego innego patogenu. Nie ma antybiotyku, który możemy określić jako uniwersalny, a wysoka skuteczność tej samej substancji *in vitro* może różnić się w zależności od regionu (Smulski 2017). Stała kontrola wrażliwości bakterii i stosowanej terapii jest więc kluczowa w postępowaniu z mastitis.

Wielu autorów poszukuje alternatywnych strategii dla stosowania antybiotyków w terapii mastitis. Proponowane są nowe metody leczenia, między innymi użycie bakteriocyn, bakteriofagów, chitosanu czy substancji pochodzenia roślinnego (Porter i in. 2016), (Varela-Ortiz i in. 2018), (Asli i in. 2017), (Fratini i in. 2014). Sugeruje się zastosowanie szeroko zakrojonych badań terenowych, mogących potwierdzić ich skuteczność (Cheng, Han 2020).

Nie należy zapominać również o profilaktyce, tak aby do stanów zapalnych wymienia dochodziło jak najrzadziej. Prawidłowa higiena doju i dbałość o dobrostan krów są kluczowe w ograniczaniu mastitis.

## Podsumowanie

Przedstawione wyniki i ich konfrontacja z wcześniejszymi badaniami mają na celu zwrócenie uwagi na konieczność ciągłej analizy antybiotykooporności oraz tego, jak kształtuje się wrażliwość bakterii w danym regionie na stosowane chemioterapeutyki. Takie obserwacje są źródłem cennych informacji na temat zarówno stosowanych antybiotyków, jak i oporności na nie u poszczególnych mikroorganizmów, gdyż dotyczy to

także bakterii zoonotycznych. Określenie substancji, na którą izolowane bakterie były najbardziej wrażliwe, może być wskazówką przy postępowaniu w stadzie.

Leczenie klinicznego mastitis bez określenia lekowrażliwości, tak zwane leczenie na ślepo, może być nieskuteczne. Przyczyna niepowodzenia może wynikać z oporności bakterii na zastosowaną substancję lub niebakteryjnej etiologii zapalenia. Wskazuje to na potrzebę wykonania posiewu bakteriologicznego w przypadku klinicznego mastitis, szczególnie w świetle czekających nas zmian dotyczących racjonalnego stosowania antybiotyków.

## Bibliografia

- Abdi R.D., Gillespie B.E., Ivey S., Pighetti G.M., Almeida R.A., Kerro Deogo O. 2021. Antimicrobial Resistance of Major Bacterial Pathogens from Dairy Cows with High Somatic Cell Count and Clinical Mastitis. *Animals : an open access journal from MDPI*, 11, 131.
- Asli A., Brouillette E., Ster C., Ghinet M.G., Brzezinski R., Lacasse P., Jacques M., Malouin F. 2017. Antibiofilm and antibacterial effects of specific chitosan molecules on *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *PLoS One* 12(5).
- Barański W. 2015. Bezpieczne ale nie mniej skuteczne stosowanie antybiotyków w terapii mastitis. *Lecznica dużych zwierząt* 2/2015, s.116–12.
- Bolte J., Zhang Y., Wente N., Krömker V. 2020. In Vitro Susceptibility of Mastitis Pathogens Isolated from Clinical Mastitis Cases on Northern German Dairy Farms. *Vet Sci.* Jan 20;7(1):10.
- Cheng W. N., Han S. G. 2020. Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments – A review. *Asian-Australas J Anim Sci*, 33, 1699–1713.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved Standard 3rd ed. CLSI document M31–A3. CLSI, Wayne, USA.
- Cobirka, M., Tancin V., Slama P. 2020. Epidemiology and Classification of Mastitis. *Animals*, 10, 2212.
- Contreras, G.A., Rodríguez J.M. 2011. Mastitis: comparative etiology and epidemiology. *J. Mammary Gland Biol Neoplasia*, 16, 339–56.
- Fratini F., Casella S., Leonardi M., Pisseri F., Ebani V.V., Pistelli L., Pistelli L. Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of their main constituents against some strains supporting livestock mastitis. *Fitoterapia*. 2014 Jul; 96: 1–7.
- Kaczorek-Łukowska E., Małaczewska J., Wójcik R., Naumowicz K., Blank A., Siwicki A.K. 2021. Streptococci as the new dominant aetiological factors of mastitis in dairy cows in north-eastern Poland: analysis of the results obtained in 2013–2019. *Irish Veterinary Journal*, 74, 2.
- Klaas I.C., Zadoks R.N., 2018. An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65, 166–185.
- Kuehn J.S., Gorden P.J., Munro D., Rong R., Dong Q., Plummer P.J., Wang C., Phillips G.J. 2013. Bacterial community profiling of milk samples as a means to understand culture-negative bovine clinical mastitis. *PLoS One*. Apr 25;8(4).
- Lassa H., Kubiak J., Małkińska-Horodyska M. 2013. Bakterie najczęściej izolowane z klinicznych postaci mastitis u krów oraz ich wrażliwość na antybiotyki. *Życie Weterynaryjne*. 88(8), 651 R.N. 653.



- Lin J., Nishino K., Roberts M. C., Tlomasky M., Aminov R. I., Zhang L. 2015. Mechanisms of antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* 6, 34.
- Makovec, J.A., Ruegg P.L., 2003. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *J Dairy Sci*, 86, 3466 P.L. 72.
- Mathew A. G., Cissell R., Liamthong S. 2007. Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. *Foodborne Pathog Dis*, 4, 115 P.L. 33.
- Minst K., Märtlbauer E., Miller T., Meyer C. 2012. Short communication: Streptococcus species isolated from mastitis milk samples in Germany and their resistance to antimicrobial agents. *Journal of Dairy Science*, 95, 6957–6962.
- Philpot W.N., Nickerson S.C. 2006. Zwyciężyć w walce z mastitis. *Westfalia Surge Polska Sp. Z o. o., Bydgoszcz*.
- Piech T., Wawron W., Bochniarz M., Krakowski L., Brodzki P. 2015. Oporność na antybiotyki patogenów izolowanych z przypadków mastitis u krów. *Med. Weter.* 71 (2), 114–117.
- Porter J., Anderson J., Carter L., Donjacour E., Paros M. 2016. In vitro evaluation of a novel bacteriophage cocktail as a preventative for bovine coliform mastitis. *J Dairy Sci. Mar*; 99(3): 2053–2062.
- Rainard P., Foucras G., Fitzgerald J.R., Watts J.L., Koop G., Middleton J.R. 2018. Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. *Transbound Emerg Dis.* 65: 149–165.
- Sharun, K., Dhama K., Tiwari R., Gugjoo M.B., Iqbal Yatoo M., Patel S.K., Pathak M., Karthik K., Khurana S.K., Singh R., Puvvala B., Amarpal, Singh K.P., Chaicumpa W., 2021. Advances in therapeutic and managemental approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. *Vet Q*, 41, 107–136.
- Smulski S. 2013. Wpływ mastitis na wydajność mleczną krów. *Weterynaria w terenie.* 7(1): 50–53.
- Smulski S. 2017. Antybiotykooporność mastitogennych bakterii izolowanych z mleka. *Weterynaria w terenie.* 11(1): 32–39.
- Stevens M., Piepers S., De Vliegher S. 2016. Mastitis prevention and control practices and mastitis treatment strategies associated with the consumption of (critically important) antimicrobials on dairy herds in Flanders, Belgium. *Journal of Dairy Science*, 99, 2896–2903.
- Varela-Ortiz D.F., Barboza-Corona J.E., González-Marrero J., León-Galván M.F., Valencia-Posadas M., Lechuga-Arana A.A., Sánchez-Felipe C.G., Ledezma-García F., Gutiérrez-Chávez A. J. 2018. Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis cases and in vitro efficacy of bacteriophage. *Vet Res Commun* 42, 243–250.

## Abstract

### ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING OF MOST FREQUENTLY ISOLATED BACTERIA FROM QUARTER MILK IN COWS WITH CLINICAL MASTITIS

The objective of this study was to analyze the antimicrobial susceptibility of bacteria most frequently isolated from quarter milk samples. The material was obtained from 3 herds in Warmia and Masuria voivodeship, where cows with clinical mastitis were identified. In total 66 milk samples from 45 cows were collected to prepare bacteriological cultures and antibiograms. Re-

sults showed that the most frequently isolated bacteria were *Streptococcus sp.* (63.63%). These bacteria showed the highest susceptibility to amoxicillin with clavulanic acid, ceftiofur, pirlimycin, sulfamethoxazole with trimethoprim, and bacitracin (more than 88% of susceptible isolates). Strains resistant to some mentioned above antimicrobials were also identified, which confirms the need of taking into account increasing antimicrobial resistance. This study concludes that microbiological identification of bacteria in milk samples and implementing targeted therapy are vital for efficient mastitis treatment.

**Keywords:** clinical mastitis, antimicrobial susceptibility, *Streptococcus sp.*

**Słowa kluczowe:** mastitis kliniczne, lekowrażliwość, *Streptococcus sp.*

**Julia Wielka**

**Antonina Galicka**

**Ewa Kaczmar**

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Studenckie Koło Naukowe Technik Obrazowania w Diagnostyce Chorób Małych Zwierząt

Opiekun koła: prof dr hab. Andrzej Rychlik

## **OCENA PRZYDATNOŚCI TOMOGRAFII KOMPUTEROWEJ ORAZ BADANIA ENDOSKOPOWEGO W DIAGNOSTYCE ASPERGILOZY JAMY NOSOWEJ U PSÓW**

### **Wstęp**

Schorzenia jamy nosowej u psów są bardzo częstymi przypadkami w praktyce lekarsko-weterynaryjnej. Trudności w ustaleniu etiopatogenezy przysparza fakt, iż wiele z nich charakteryzuje się podobnymi lub nawet takimi samymi objawami. Niejednokrotnie okazuje się, że konieczne jest wykonanie specjalistycznych badań diagnostycznych w celu stwierdzenia przyczyny takiego stanu.

Do bardzo powszechnych problemów w jamie nosowej u psów należą zakażenia grzybicze. Odnotowano, że zapalenia na tle grzybiczym stanowią 12–34% wszystkich zapaleń w obrębie jamy nosowej u psów (Saunders i van Bree 2003), a predysponowane do nich są przede wszystkim rasy dolichocefaliczne. Najczęściej czynnikiem etiologicznym jest *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*), chociaż niekiedy dochodzi też do zmian związanych z *A. flavus*, *A. niger* oraz *A. nidulans* (Benitah 2006). Są to grzyby z rodziny kropidlakowatych. Należy pamiętać, że drobnoustroje te są elementem prawidłowej mikrobioty na terenie jamy nosowej psa i rzadko powodują pierwotne zakażenia, a znacznie częściej stanowią czynnik wikłający. Chociaż proces chorobowy w istocie zaczyna się w jamie nosowej u psów, bardziej właściwe wydaje się być użycie nazwy aspergiloza górnych dróg oddechowych i zatok (SNA – ang. sinonasal asper-

gillosis), ponieważ proces ten najczęściej obejmuje również zatoki czołowe (Peeters i Clercx 2007).

Psy, u których stwierdzano występowanie SNA, w większości nie wykazywały ogólnoustrojowej immunosupresji, a jedynie osłabienie lokalnych mechanizmów odpornościowych na terenie jamy nosowej (Peeters i Clercx 2007). Taka sytuacja może się zdarzyć na przykład w obecności zmian nowotworowych czy ciał obcych w jamie nosowej psów. Potwierdza to też fakt, że zakażenie nie przenosi się zazwyczaj na dolne drogi oddechowe i rozwija się jedynie w obrębie nosa oraz zatok czołowych.

Zmiany rozwijają się początkowo w obrębie błony śluzowej jamy nosowej, a mechanizmy odpornościowe powodują powstanie stanu zapalnego. U psów z SNA stwierdzono dominację odpowiedzi warunkowanej przez limfocyty Th1, które produkowały zwiększoną ilość IFN- $\gamma$ , oraz przez makrofagi wytwarzające cytokiny prozapalne (IL-6, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ ). Silna odpowiedź ze strony komórek limfocytarnych Th1 powinna być wystarczająca, aby zatrzymać proces w obrębie śluzówki jamy nosowej. U pacjentów z SNA jednak występuje też nasilona ekspresja mRNA kodującego przeciwzapalną interleukinę IL-10, co może być powodem hamowania silnej reakcji obronnej oraz rozprzestrzeniania zapalenia do zatok czołowych.

Aspergilozę górnych dróg oddechowych i zatok u psów opisuje się jako inwazyjną, mając na uwadze, że izoluje się strzępki grzyba występujące głównie na oraz w obrębie nabłonka, rzadziej w głębszych strukturach błony śluzowej. U prawie każdego pacjenta z SNA odnotowuje się zniszczenie małżowin nosowych, natomiast kontynuacją takiego stanu może być silna erozja kości nosowych, kości czołowych, tkanek okołogałkowych czy kości sitowej oraz objęcie infekcją tkanki nerwowej mózgu. Przyczyną silnej destrukcji tkanek jednak nie jest sam grzyb, ale silny proces zapalny inicjowany przez mechanizmy odpornościowe organizmu w odpowiedzi na patogen, czego indykatorem może być brak strzępek grzybni w tkance kostnej objętej lizą (Saunders i van Bree 2003).

Uważa się również, że udział w patogenezie mogą mieć toksyny wytwarzane przez *A. fumigatus*, czyli gliotoksyny, aflatoksyny czy rybotoksyny. Mają one negatywny wpływ na rzęski nabłonka błony śluzowej jamy nosowej, powodując obniżenie ich aktywności, intensywności ruchów, a także hamując opsonizację drobnoustrojów i mechanizmy fagocytozy przeprowadzanej przez neutrofile (Amitani i in. 1995).

W zależności od czasu trwania zakażenia zmiany towarzyszące aspergilozie stwierdza się na bardzo różnym stopniu zaawansowania. U wielu pacjentów chorobę tę diagnozuje się dosyć późno, dlatego też można zaobserwować częste powikłania związane z obniżeniem odporności lokalnej i brakiem leczenia. Czasem, przy bardzo nasilonych skutkach zakażenia, może dochodzić do nawrotów choroby po jej początkowym opanowaniu. Naturalnie, im dłużej trwa proces, tym zmiany są intensywniejsze, a szanse pacjenta na powrót do całkowitego zdrowia maleją. Dlatego tak istotny jest wybór odpowiednich badań, które pozwolą na trafną i szybką diagnozę oraz wdrożenie skutecznego leczenia.

Wziernikowanie jamy nosowej za pomocą endoskopu, czyli badanie rinoskopowe należy do bezpośrednich metod obrazowania. Rinoskopia jest bardzo przydatnym narzędziem w diagnostyce jednostki chorobowej, jaką jest aspergiloza. Badanie wykonuje się za pomocą sztywnego endoskopu do uwidocznienia obrazu nozdrzy przednich oraz rinoskopu giętkiego, aby obejrzeć okolice nozdrzy tylnych i nosową część gardła. W bezpośrednim obrazie można odnotować stan jamy nosowej oraz, co bardzo istotne, pobrać próbki do badań histopatologicznych za pomocą kanału roboczego oraz właściwego narzędzia. Najczęściej obserwowaną endoskopowo zmianą w przebiegu aspergilozy jest obecność białych lub zielonkawych grzybni na błonie śluzowej w formie nalotów, częściowe lub całkowite zniszczenie małżowin nosowych oraz duża ilość nagromadzonej ropnej wydzieliny w jamie nosowej.

Kolejnym badaniem stosowanym w diagnostyce tej jednostki chorobowej jest tomografia komputerowa jamy nosowej i zatok. Dzięki trójwymiarowemu obrazowi tkanek znajdujących się na terenie głowy lekarz otrzymuje dokładny obraz stopnia zaawansowania procesu chorobowego, czyli m.in. tego, jak głęboko położonych tkanek dotyczą zmiany. Dzięki temu można jak najdokładniej ustalić etapy leczenia pacjenta. Dodatkowo na podstawie interpretacji obrazu można stwierdzić pośrednio charakter zmian na podstawie różnic w wychwycie kontrastu i zmian tzw. densywności struktur, co determinuje dalsze postępowanie i pozwala decydować o wyborze sposobu leczenia pacjenta.

## Cel

Celem niniejszej pracy jest określenie przydatności badania endoskopowego oraz tomografii komputerowej w diagnostyce aspergilozy jamy nosowej u psów.

## Materiał i metody

W pracowni endoskopowej, należącej do Katedry Diagnostyki Klinicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim, przeprowadzono badanie rinoskopowe u sześciu psów w wieku od 3 do 13 lat. Grupa zwierząt złożona została z psów właścicielskich różnych ras (m.in. Owczarek Australijski, Golden Retriever), które były pacjentami pracowni endoskopowej Katedry Diagnostyki Klinicznej ze zdiagnozowaną aspergilozą jamy nosowej. Pracownia ta wyposażona była w zestaw wideoendoskopowy, służący do wziernikowania początkowego odcinka układu oddechowego, z możliwością rejestracji obrazu. W badaniu posłużono się rinoskopem sztywnym firmy Karl Storz (Niemcy) o kącie widzenia 30°, długości

13 cm i średnicy 2,7 mm do badania nozdrzy przednich. Endoskop był wyposażony w płaszcz endoskopowy z kanałem roboczym umożliwiającym wprowadzenie manipulatorów o średnicy 2,2 mm w celu pobrania biopsji lub usunięcia ciał obcych. Do badania nozdrzy tylnych i części nosowej gardła wykorzystano endoskop giętki Olympus URF-P5, firmy Olympus (Japonia) wprowadzany przez jamę ustną o średnicy 3 mm oraz długości 70 cm z kanałem roboczym 1 mm w przypadku zwierząt o masie ciała do 10 kg. Natomiast w przypadku psów powyżej 10 kg używano wideoendoskopu Fujinon EG-600 WR długości 110 cm oraz średnicy 9,4 mm z kanałem roboczym o średnicy 2,8 mm.

U pacjentów wykonano również badanie tomografii komputerowej w pracowni należącej do Polikliniki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie za pomocą tomografu Siemens Somatom. Zwierzęta odpowiednio wcześniej poddano badaniom podstawowym krwi: morfologicznym oraz biochemicznym, celem zakwalifikowania do endoskopii oraz oceny ryzyka anestezjologicznego według pięciostopniowej skali ASA (z ang. American Society of Anaesthesiology). Zwierzęta poddano przed badaniem dwunastogodzinnej głodówce oraz sześciogodzinnemu odstawieniu płynów. Przed procedurą badania endoskopowego przeprowadzono u każdego zwierzęcia ogólne badanie kliniczne z pomiarem temperatury, badaniem obwodowych węzłów chłonnych oraz osłuchiowaniem serca i płuc. Następnie każdy z pacjentów został poddany premedykacji anestezjologicznej z zastosowaniem domięśniowo deksmedetomidyny w dawce 0,005 mg/kg masy ciała, butorfanolu w dawce 0,1 mg/kg m.c. oraz midazolamu w dawce 0,1 mg/kg m.c. Następnie zwierzęta wprowadzono w stan indukcji znieczulenia za pomocą propofolu w dawce 4 mg/kg m.c. dożylnie, wedle efektu. Dalej przed rozpoczęciem procedury badania endoskopowego zwierzęta zaintubowano rurką dotchawiczą o rozmiarze dobranym odpowiednio do wielkości i masy ciała zwierzęcia. Następnie założono specjalistyczny rozwieracz ustno-zębowy w formie tzw. ramki.

Badania przeprowadzano u każdego pacjenta w pozycji mostkowej. Każde zwierzę podczas trwania całej procedury było podłączone do kardiomonitora i obserwowane przez lekarza weterynarii anestezjologa. Endoskopię u wszystkich zwierząt przeprowadzał ten sam wykwalifikowany w tym kierunku lekarz weterynarii. Sporządzono odpowiednie protokoły anestezjologiczne oraz endoskopowe. Schemat badania był jednakowy dla wszystkich pacjentów. Początkowo przeprowadzano badanie nozdrzy tylnych za pomocą endoskopu giętkiego, a następnie oceniano nozdrza przednie z wykorzystaniem endoskopu sztywnego. Na końcu badania pobierano biopsję za pomocą kleszczyków biopsyjnych wprowadzanych do kanału roboczego endoskopu w formie wycinków w liczbie co najmniej 4 sztuk od każdego pacjenta. Następnie biopaty przekazywano zanurzone w 4-procentowej formalinie do badania histopatologicznego w laboratorium Katedry Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie.

## Wyniki

U wszystkich sześciu pacjentów występowały objawy takie, jak: stałe, umiarkowane do masywnych wypływy z nosa o charakterze ropnym lub ropno-śluzowym, jedno- bądź obustronne, często z domieszką krwi oraz obszary depigmentacji lusterka nosa, a u trzech z nich występowały okresowe masywne krwawienia z nosa.

U pierwszego pacjenta (pies, rasa: Terier Australijski, samiec, 13 lat) w badaniu rinoskopowym nozdrzy tylnych światło przewodów okazało się być nieprawidłowe, w rusztowaniu chrzęstnym widoczne były ubytki tkanek, a w świetle prawego przewodu nosowego – owalny otwór (ziarniak grzybni). Błona śluzowa była krucha, delikatna, o cechach przewlekłego stanu zapalnego. W badaniu endoskopowym nozdrzy przednich błona śluzowa była pokryta niewielką ilością wydzieliny śluzowo-surowiczej. W części przedniej jamy nosowej właściwej nozdrza lewego uwidocznione zostały fałdy przegrody nosa: dobrzuszny, podstawny, skrzydłowy i prosty o cechach hipertrofii, silnie obrzęknięte oraz powiększone.

Układ fałdów i małżowin u tego pacjenta był całkowicie zmieniony, nastąpiła przebudowa jamy nosowej. Błona śluzowa nozdrzy przednich została oceniona przez endoskopistę podobnie jak w nozdrzach tylnych jako krucha, delikatna z cechami przewlekłego stanu zapalnego. W części przedniej jamy nosowej właściwej nozdrza prawego utrudnione było wprowadzenie rinoskopu do przewodów nosowych nozdrza prawego ze względu na częściowe zwężenie, a dokładnie przez zrost skrzydełka nosowego. Z obu nozdrzy pobrano wycinki do badania histopatologicznego.

Obraz u drugiego oraz trzeciego pacjenta obraz w badaniu endoskopowym był bardzo zbliżony. Wykazano niezachowany układ małżowin i fałdów nosowych, widoczne pozostałości chrzęstne małżowin. Błona śluzowa krucha, miejscami pokryta białawymi nalotami. Z obu nozdrzy pobrano wycinki do badania histopatologicznego.

W badaniu endoskopowym nozdrzy tylnych czwartego pacjenta (pies, Bulterier, samiec, 3 lata) uwidoczniono nieprawidłowe światło przewodów nosowych z ubytkami tkanek w rusztowaniu chrzęstnym. Stwierdzono kruchą błonę śluzową o cechach przewlekłego stanu zapalnego. W badaniu endoskopowym nozdrzy przednich przedsionek nosa pokryty dużą ilością wydzieliny o charakterze surowiczo-krwawym. W części przedniej jamy nosowej właściwej nozdrza lewego i prawego widoczne fałdy przegrody nosa: dobrzuszny, podstawny, skrzydłowy i prosty o cechach hipertrofii, silnie obrzęknięte, powiększone. Układ fałdów oraz małżowin całkowicie zmieniony z przebudową jamy nosowej. Błona śluzowa została oceniona jako krucha, o cechach przewlekłego stanu zapalnego.

Piątym badanym był pies rasy Golden Retriever, samiec, w wieku 13 lat. Podczas badania rinoskopowego nozdrzy tylnych widoczna była przegroda nosa z nieprawidłowym światłem przewodów nosowych. Występowało intensywne krwawienie z przewodu nosowo-gardłowego lewego. W badaniu rinoskopowym nozdrzy przednich

obraz był jak u poprzednich pacjentów. Dodatkowo widoczne skrzepy i intensywne krwawienie z przewodu nosowo-gardłowego. Tak samo opisano badanie endoskopowe szóstego pacjenta. Od obu psów pobrano wycinek do badania histopatologicznego.

Badanie histopatologiczne u wszystkich pacjentów potwierdziło w wycinkach obecność strzępek grzybni należących do drobnoustroju z rodzaju *Aspergillus*.

W badaniu tomografem komputerowym oceniono stopień zaawansowania zmian całego aparatu jamy nosowej właściwej oraz nozdrzy tylnych z okolicą kości sitowej oraz zatokami. U czterech z sześciu pacjentów potwierdzano udział zatok w procesie chorobowym. Stwierdzano niepowietrzność obustronną lub jednostronną zatok czołowych spowodowaną nagromadzeniem materiału o gęstości tkanek miękkich, co sugerowało najczęściej obecność płynu zapalnego. U wszystkich sześciu psów obserwowano również cechy ubytku rusztowania chrzęstno-kostnego błazek małżowin nosowych oraz kości przynosowych, w tym przegrody jamy nosowej.

## Dyskusja

Aspergiloza jest jednostką chorobową, z której diagnozą spotyka się wiele pacjentów, a jej powszechność warunkuje podejście opiekunów zwierząt do kwestii z nią związanych. Pomyślnie terapie i dostępność skutecznie działających produktów leczniczych weterynaryjnych może stanowić przyczynę pewnego lekceważenia tej jednostki, co może prowadzić do poważnych powikłań. Dobra reakcja na stosowane preparaty jest zdecydowanie bardzo pożądana, należy jednak pamiętać, jak istotne jest wczesne i trafne zdiagnozowanie zmian, ponieważ jedynie wtedy leczenie będzie w pełni skuteczne i da pacjentowi duże szanse na powrót do całkowitego zdrowia. Aspergiloza może prowadzić do wielu nieodwracalnych zmian, a te z kolei przyczyniają się do znacznego obniżenia jakości życia, późniejszej większej wrażliwości na infekcje górnych dróg oddechowych oraz w skrajnych przypadkach, do objawów nerwowych związanych ze stanem zapalnym obejmującym kość sitową i przylegającą do niej tkankę nerwową mózgowia.

Zawsze należy zacząć od poprawnego przeprowadzenia wywiadu. Kluczowe w przebiegu aspergilozy jest określenie czasu trwania objawów i ich nasilenie, a także stwierdzenie, czy jest to pierwsza interwencja lekarsko-weterynaryjna z tym związana, czy może były wcześniej podejmowane próby leczenia bez wykorzystania zarówno tomografii komputerowej, jak i badania rinoskopowego. Bardzo ważne przed rozpoczęciem badania jest określenie dokładnych objawów, takich jak wypływ z jamy nosowej. Czasem nie jest się w stanie zbadać tego w gabinecie, wówczas należy bezwzględnie zapytać właściciela o charakter wydzieliny, którą zauważył, oraz o to, czy wypływ jest jedno- czy dwustronny. Taka wstępna informacja jest w stanie dostarczyć danych o prawdopodobnej lokalizacji i zwrócić uwagę na konkretne obszary podczas badania, co przyspiesza proces diagnostyczny.



Podczas wywiadu nie powinno się oczywiście zapomnieć o ewentualnych innych obecnych schorzeniach lub o takich, które zdarzyły się w niedalekiej przeszłości, a które mogą mieć wpływ na rozwój infekcji grzybiczej. Każda z tych informacji pomaga lekarzowi weterynarii w planowaniu ewentualnej terapii, która w przypadku grzybicy jamy nosowej oraz zatok może być bardzo długotrwała.

Podczas badania klinicznego ważne jest dokładne określenie drożności otworów nosowych u psa z zamkniętym pyskiem, co można wykonać za pomocą fragmentów wacika lub zimnego szkiełka podstawowego przyłożonego niedaleko lusterka nosa pacjenta (Benitah 2006). Następnie należy dokonać omacywania całej czaszki. Umożliwia to odnalezienie miejsc ewentualnego bólu spowodowanego zmianami grzybiczymi, ale też wszelkich wyczuwalnych zmian w tkankach. Dzięki temu badania specjalistyczne mogą być bardziej ukierunkowane. Następnie wykonuje się wyżej opisaną rinoskopię, która jak badanie wykazało, potwierdza lub wyklucza występowanie aspergillozy za pomocą badania histopatologicznego wycinków pobranych podczas jej trwania.

Według niektórych autorów wykrywalność strzępek grzyba w bioptacie pobranym z jamy nosowej od psów z SNA wynosi nawet sto procent (White 2006). W wyniku endoskopii jam nosowych u pacjentów zauważono szereg powtarzających się zmian: wykazano kruchą, delikatną, o cechach przewlekłego stanu zapalnego błonę śluzową często pokrytą białawymi nalotami (grzybnią), fałdy przegrody nosa były obrzęknięte i powiększone, o cechach hipertrofii, układ fałdów oraz małżowin był zmieniony z przebudową jamy nosowej. Badanie za pomocą tomografu komputerowego pozwala z kolei określić stopień zaawansowania zmian w kościach i zatokach przynosowych, a więc również rozległość procesu chorobowego poza przewodami jamy nosowej (Benitah 2006). Tomografia komputerowa nie jest w stanie jednak potwierdzić charakteru zmian i nie ma pewności, że byłyby to zmiany grzybicze.

Trudność w procesie diagnostycznym tejże jednostki stanowi przede wszystkim fakt, iż u pacjenta występują bardzo niespecyficzne objawy i nie sposób jest z całą pewnością stwierdzić przyczyny ich pojawienia się bez zastosowania opisanych badań dodatkowych (Saunders 2003). Aby sprecyzować opis danego przypadku należy, według dostępnej literatury, wykonać zarówno badanie endoskopowe (wraz z pobraniem wycinków do badania histopatologicznego), które zapewnia lekarzowi bezpośredni obraz w czasie rzeczywistym, jak także badanie tomografem komputerowym w celu określenia nasilenia zmian.

Na podstawie przeprowadzonego badania można stwierdzić, że przeprowadzone jedynie badanie endoskopowe nie dostarcza informacji o tym, czy zajęte są zatoki czołowe ani inne okoliczne tkanki, co ma bezpośredni wpływ na wybór i skuteczność leczenia. Natomiast kierując się jedynie badaniem tomografii komputerowej, nie mamy pewności, jak rzeczywiście wyglądają zmiany, w jakim stopniu zaawansowania jest stan zapalny oraz co bardzo ważne, nie ma możliwości pobrania tkanek do badania histopatologicznego, co również rzutuje na określenie i powodzenie terapii (Benitah 2006). W takim wypadku nie można ze stuprocentową pewnością powiedzieć, że to infekcja

grzybicza. Diagnoza aspergillozy górnych dróg oddechowych i zatok musi być oparta zarówno na szczegółowym wywiadzie i badaniu klinicznym, jak i na endoskopii oraz tomografii komputerowej. Pominięcie któregośkolwiek z tych elementów skutkuje niepełnym zestawem informacji, przez co leczenie może nie być skuteczne, a długotrwałe, obciążające finansowo dla właściciela i powodować dłuższe cierpienie zwierzęcia.

## Podsumowanie

Aspergiloza najczęściej ma charakter wtórny i długo się rozwija. Stanowi dużą część chorób jamy nosowej i zatok u psów, ale nie wykazuje jednoznacznych i patognomicznych objawów klinicznych. Bardzo wczesna diagnostyka jest ważna dla skuteczności leczenia i uniknięcia nieodwracalnych zmian. Nasze wyniki potwierdzają, że zarówno badanie rinoskopowe, jak i tomografia komputerowa są bardzo przydatne i każde z tych badań daje inne możliwości. Wyłączając jedno z tych badań, otrzymuje się jedynie częściowe informacje o stanie psa. Nie powinno wybierać się jednego z nich, ale oba obligatoryjnie włączyć w proces diagnostyczny tej jednostki chorobowej, gdyż tylko przy takim ich zastosowaniu otrzymuje się pełny obraz choroby, co skutkuje dobrze zaplanowaną terapią i prognozą dla pacjenta.

## Bibliografia

- Amitani R., Taylor G., Elezis E.N., et al. Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infect Immun* 1995;63(9):3266–71
- Benitah N.: Canine nasal aspergillosis. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 2006, 21, 82–88
- Peeters D., Day M.J., Clercx C. An immunohistochemical study of canine nasal aspergillosis. *J Comp Pathol* 2005;132(4):283–8
- Peeters D., Clercx C.: Update on canine sinonasal aspergillosis. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* 2007, 37, 901–916
- Saunders J.H., van Bree H. Diagnostic modalities of canine nasal aspergillosis. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 2003;72:399–408
- White, D.: Canine nasal mycosis – light at the end of a long diagnostic and therapeutic tunnel. *Journal of Small Animal Practice* 2006, 47(6), 307–307
- Windsor R.C., Johnson L.R., Herrgesell E.J., et al. Idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis in dogs: 37 cases (1997–2002). *J Am Vet Med Assoc* 2004;224(12):1952–7

## Abstract

**USEFULNESS OF COMPUTED TOMOGRAPHY AND ENDOSCOPIC EXAMINATION IN NASAL ASPERGILLOSIS DIAGNOSIS IN DOGS**

Due to local immunodeficiency of nasal cavity in dogs a fungal infection may occur. The most common agent is *Aspergillus fumigatus* which is a microbiome component of the nasal cavity and causes mostly secondary infections. Symptoms do not allow diagnosing the disease without fail since they are very unspecific and may appear in many disorders. Therefore using specialistic diagnosing methods is crucial to make a proper diagnosis. The point of the research was to determine the usefulness of computed tomography and endoscopic examination in nasal aspergillosis diagnosis in dogs. Six dogs showing symptoms of nasal discharge and epistaxis participated in the research. They have been examined clinically. After consulting an anaesthesiologist, the patients have been anesthetized and subjected to a rhinoscopy examination. Afterwards, a computed tomography examination of the head has been conducted. Rhinoscopy provides a possibility of watching the inside of the nasal cavity in real time, which is very helpful in describing severity of the disease. Apart from that, samples for histopathological examination may be taken. Computed tomography, however, shows the advancement of aspergillosis in the entire head, which is crucial in planning a treatment. In summary, both of these specialistic examinations should be involved in the diagnosing process.

**Słowa kluczowe:** aspergiloza, endoskopia, tomografia komputerowa

**Keywords:** aspergillosis, endoscopy, computed tomography

**Aleksandra Wilkosz**

**Ewa Kaczmar**

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Studenckie Koło Naukowe Technik Obrazowania w Diagnostyce Chorób Małych Zwierząt

Opiekun koła: prof dr hab. Andrzej Rychlik

## **CIAŁA OBCE W PRZEŁYKU I ŻOŁĄDKU U PSÓW: WYSTĘPOWANIE, CZYNNIKI RYZYKA – PRZEGLĄD PRZYPADKÓW**

### **Wstęp**

Obecność ciał obcych u psów to wynik przypadkowego lub celowego ich połknięcia. Są na to narażone wszystkie osobniki, niezależnie od wieku. U psów młodych zdarza się to jednak znacznie częściej niż u psów starszych (Patil i in. 2010).

Lokalizacja ciał obcych obejmuje głównie okolice przełyku i żołądka. Z uwagi na powikłania, jakie niesie ich obecność w przewodzie pokarmowym, stanowią bezpośrednie zagrożenie zdrowia i życia zwierzęcia, dlatego zaleca się jak najszybsze ich usunięcie.

Psy, u których doszło do połknięcia ciała obcego i związanego z nim, całkowitego zamknięcia światła przełyku, będą wykazywały nadmierne ślinienie się, dławienie się, ciągłe przelżykanie, regurgitację czy wymioty występujące zaraz po jedzeniu. Dodatkowo może pojawić się niepokój, letarg i anoreksja (Tilley, Smith Jr. 2016). W przypadku częściowej obstrukcji przełyku u pacjentów będą występować przewlekłe wymioty, zwłaszcza po zjedzeniu większego posiłku.

Najczęściej stwierdzanym ciałem obcym w przełyku psów są kości (Hutchinson, Robinson 2015), które zazwyczaj są ostro zakończone. Połknięcie takich ciał obcych może doprowadzić do wystąpienia perforacji przełyku. Z kolei przedmioty o tępych krawędziach mogą spowodować wystąpienie skurczu mięśni, stanu zapalnego i martwicy błony śluzowej. Stan zapalny może rozszerzyć się na długość całego przełyku, doprowadzając do zapalenia opłucnej czy zapalenia śródpiersia.

Przy podejrzeniu obecności ciała obcego w przełyku należy zbadać jamę ustną, gardło i szyję zwierzęcia. Wskazane jest również wykonanie prześwietlenia rentge-

nowskiego. W przypadku ciał obcych nieprzepuszczających promieni rentgenowskich możliwe jest określenie ich lokalizacji bez podawania kontrastu.

Usunięcie ciała obcego z przełyku powinno nastąpić jak najszybciej od momentu jego połknięcia, aby ograniczyć wystąpienie perforacji. Psa w takim przypadku podaje się znieczuleniu ogólnemu i intubuje. Aby usunąć ciało obce, najlepiej zastosować endoskop i za pomocą kleszczy chwytających wyciągnąć połknięty obiekt. Niesie to za sobą jednak ryzyko wystąpienia krwotoku i przerwania ściany przełyku (Juvet i in. 2010). Jeśli nie jest możliwe bezpieczne usunięcie ciała obcego za pomocą kleszczy i endoskopu przez jamę ustną, zaleca się zepchnięcie go do żołądka. W sytuacji, gdy ciało obce nie może zostać usunięte z przełyku lub zepchnięte do żołądka z wykorzystaniem endoskopu, konieczna jest interwencja chirurgiczna.

Obecność ciał obcych w żołądku może prowadzić do podrażnienia błony śluzowej żołądka, wzdęcia czy niedrożności żołądka, które zazwyczaj powodują wymioty. Zdarza się jednak, że zlokalizowane tam ciała obce nie wywołują żadnych objawów klinicznych u zwierzęcia. Z tego powodu ciała obce, które trafiają do żołądka stanowią mniejsze zagrożenie niż te zatrzymane w przełyku. Nie powinno się jednak lekceważyć ciał obcych w żołądku, ponieważ ich zbyt długa obecność będzie podrażniać błonę śluzową i wtórnie doprowadzać do powstania wrzodów. Jeśli jest to możliwe, połknięte przedmioty należy jak najszybciej usunąć. Najczęściej dokonuje się tego za pomocą endoskopu, podobnie jak w przypadku ciała obcego w przełyku. W zależności od rodzaju połkniętego przedmiotu należy wziąć pod uwagę różne możliwe powikłania, które mogą wystąpić podczas zabiegu. Ostre przedmioty mogą spowodować perforację żołądka. Wiele ciał obcych zawiera szkodliwe dla organizmu psa substancje, np. monety, rośliny, ludzkie jedzenie, kosmetyki, środki czystości.

Nie zawsze występuje wskazanie usunięcia ciała za pomocą badania endoskopowego czy interwencji chirurgicznej, ponieważ niektóre ciała obce o niewielkich rozmiarach mogą przejść przez przewód pokarmowy psa i zostać naturalnie wydalone z organizmu. Skuteczne może okazać się również wywołanie wymiotów, ale tylko w wypadku, gdy występuje pewność co do połkniętego obiektu, którą może zapewnić badanie RTG, USG czy endoskopowe. Jeśli niezbędny okaże się zabieg chirurgiczny, warto mieć na uwadze, że chirurgiczne usunięcie ciała obcego z żołądka wiąże się z mniejszym ryzykiem niż zabieg na przełyku. Żołądek po takiej interwencji będzie goił się znacznie szybciej niż przełyk (Fossum 2013).

## **Cel badań**

Celem badania jest przegląd przypadków i opisanie występowania ciał obcych w przełyku i żołądka u psów oraz związane z tym czynniki ryzyka.

## **Materiały i metody badań**

Badanie przeprowadzono na 29 psach – pacjentach Katedry Diagnostyki Klinicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie zgłoszonych z podejrzeniem połknięcia ciała obcego w latach 2017–2021. Psy te należały do różnych grup wiekowych – od 9 tygodni do 14 lat, były obu płci i należały do różnych ras. Z właścicielami psów przeprowadzono wywiad, aby ustalić, czy rzeczywiście mogło dojść do połknięcia ciała obcego, oraz u każdego zwierzęcia wykonano ogólne badanie kliniczne. Zwierzętom wykonano również badania dodatkowe, tj. USG, RTG lub RTG z kontrastem celem weryfikacji podejrzeń. Następnie przeprowadzono konsultację z anestezjologiem w celu określenia ryzyka anestezjologicznego pacjentów według systemu ASA (z ang. American Society of Anesthesiologists). Potem zwierzęta poddano znieczuleniu ogólnemu i przeprowadzono badanie endoskopowe w celu ostatecznego potwierdzenia występowania ciała obcego. Procedurę wykonano w Pracowni Endoskopowej Katedry Diagnostyki Klinicznej. Do endoskopii użyto wideoendoskopu Olympus GIF-145 oraz wideoendoskopu Fujinon EG-600WR. W przypadku 12 pacjentów ze stwierdzonym ciałem obcym pobrano biopsję do badania histopatologicznego. Otrzymane wycinki przekazano do Katedry Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Wyniki badań pozwoliły na dokładniejsze określenie powstałych powikłań spowodowanych przez ciała obce.

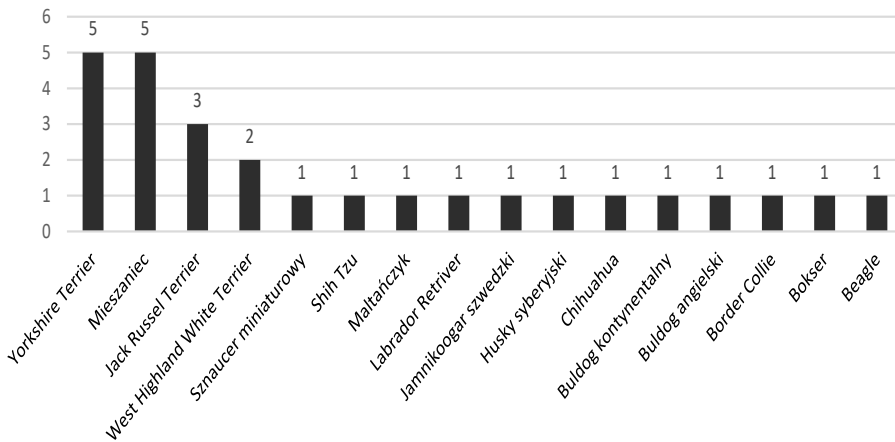
## **Wyniki badań**

Wstępne rozpoznanie ustalono na podstawie wywiadu przeprowadzonego z właścicielem zwierzęcia oraz badań RTG i USG. Obecność ciała obcego lub ciał obcych potwierdzono u 27 z 29 pacjentów. U 6 (22%) znajdowało się ono w przełyku, natomiast u 21 (78%) psów trafiło do żołądka, w tym u jednego z nich ciało obce znajdowało się w okolicy dna żołądka i przechodząc przez odźwiernik, sięgało do dwunastnicy. Przy użyciu odpowiednich manipulatorów i pod kontrolą endoskopu udało się usunąć ciała obce u 25 pacjentów. Dwa psy z powodu braku możliwości bezpiecznego usunięcia ciała obcego z żołądka za pomocą endoskopu zostały skierowane na zabieg laparotomii. U żadnego z badanych psów nie nastąpiło zejście śmiertelne w czasie trwania zabiegu.

Zdecydowaną większość przyjętych pacjentów, u których potwierdzono obecność ciała obcego, stanowiły psy rasowe (81%), pozostała część to psy mieszańce (19%). Wśród nich najwięcej było psów małych ras (15). Psy ras średnich (4) i dużych (3) stanowiły mniejszość. Pozostali pacjenci to mieszańce (5). W tej grupie psów nie uży-

skano danych dotyczących wielkości zwierząt. Liczbę pacjentów z rozróżnieniem na rasy przedstawiono na rycinie nr 1.

Najwięcej odnotowano ciał obcych wśród psów rasy Yorkshire Terrier (5) oraz mieszaniców (5). U trzech pacjentów rasy Yorkshire Terrier ciało obce zlokalizowano w przełyku, a w żołądku u dwóch. U psów mieszaniców zdiagnozowano jeden przypadek ciała obcego w przełyku i cztery w żołądku. Wiek pacjentów zawierał się w przedziale 9 tygodni – 14 lat. Średnia wieku wszystkich pacjentów wyniosła 4 lata. Najliczniejszą grupę stanowiły psy młode, poniżej 1 roku (10), następnie psy w wieku 1–5 lat (8) oraz w podobnej liczbie psy starsze – 5–10 lat (4) i powyżej 10 lat (5). Pod względem płci samice stanowiły 41%, a samce 59% przyjętych psów, u których wykazano obecność ciała obcego. Większość ciał obcych w przełyku zatrzymała się w części piersiowej (67%), pozostała w części szyjnej (33%).



**Rycina 1. Wykres przedstawiający liczbę pacjentów, u których stwierdzono ciało obce ze względu na rasę psa**

Źródło: opracowanie własne.

Wśród połkniętych ciał obcych najczęściej pojawiały się kości (6), elementy drewniane, takie jak: kora drzewa, patyki (5), czy materiały z plastiku (4). Największa liczba kości zatrzymała się w przełyku (4). Do żołądka trafiły głównie elementy drewniane (5). Nie zaobserwowano obecności ciała obcego jednocześnie w przełyku i żołądku u tego samego pacjenta.

Badanie endoskopowe u wszystkich psów wykazało podrażnienie błony śluzowej przewodu pokarmowego. U jednego z psów na wysokości zalegającego ciała obcego stwierdzono martwicę błony śluzowej przełyku. Odnotowano jeden przypadek pacjenta z ciałem obcym w przełyku, u którego stwierdzono zapad tchawicy oraz zachyłkowe zapalenie płuc. Jeden pacjent został zdiagnozowany z przepukliną okołoprzełykową. Ciała obce u dwóch psów spowodowały perforację ściany przełyku. U dwóch kolej-

**Rycina 2. Tabela przedstawiająca rodzaje ciał obcych i ich lokalizację**

Ciało obce	Przełyk	Żołądek	Łącznie
Kości	4	2	6
Elementy drewniane	0	5	5
Elementy plastikowe	0	4	4
Bielizna	0	2	2
Fragmety jedzenia	2	1	3
Nitki	0	1	1
Żdźbła trawy	0	2	2
Bezoar	0	1	1
Zabawki	0	2	1
Haczyk	0	2	1
Kasztan	0	1	1
Nieokreślone	0	2	2

Źródło: opracowanie własne.

nych nieznacznie uszkodziły błonę śluzową, bez naruszania ciągłości dalszych tkanek. Błona śluzowa przełyku lub żołądka u 22 psów podczas badania wykazała cechy stanu zapalnego. Najczęściej stan zapalny pojawiał się w okolicy fałdów żołądkowych (7). Stwierdzono również refluks żołądkowo-przełykowy u 8 psów, z czego 4 z nich były poniżej 2 roku życia. Żołądek 7 pacjentów wykazywał zmiany charakterystyczne dla gastritis II stopnia (4) i III stopnia (2) oraz o stopniu nieokreślonym (1) według systemu Sydney. Przerost błony śluzowej żołądka stwierdzono w 8 przypadkach. U 4 badanych psów występowały nadżerki błony śluzowej żołądka, a u 2 zdiagnozowano wrzody. Błona śluzowa żołądka u 6 pacjentów wykazywała cechy charakterystyczne dla infekcji *Helicobacter spp.*

U 12 pacjentów pobrano biopsję do badania histopatologicznego. Infekcję bakteryjną *Helicobacter spp.* potwierdzono u 7 pacjentów, z czego u 4 bakterie występowały w dużej ilości, a u 3 pozostałych w postaci drobnych skupisk lub pojedynczo. U pozostałych pacjentów wykluczono obecność bakterii. Za pomocą badania histopatologicznego rozpoznano również u jednego psa niewielkiego stopnia zapalenie błony śluzowej żołądka z przekrwieniem oraz wynaczynieniami krwi, u 9 było to zapalenie limfocytarne-plazmocytarne błony śluzowej żołądka. Kolejny pies miał przewlekłe do zaostrzającego się zapalenie błony śluzowej żołądka. Przewlekłą przerostową gastropatię odźwiernika z zapaleniem zdiagnozowano u jednego pacjenta.

Do usunięcia ciał obcych zastosowano manipulatory endoskopowe, takie jak: kleszcze biopsyjne (3), koszyczek endoskopowy (3), kleszcze do ciał obcych (2) czy cewnik Foley'a razem z kleszczami (1).



**Rycina 3. Tabela zbiorcza podsumowująca uzyskane wyniki (dane podano w postaci liczby psów)**

Pacjenci	Potwierdzone ciała obce	Ciała obce w przełyku	Ciała obce w żołądku	Usunięte ciała obce pod kontrolą endoskopu	Pacjenci skierowani na zabieg laparotomii
29	27	6	21	25	2
Psy, u których potwierdzono ciało obce					
Psy rasowe			Mieszzańce		
22			5		
Psy ras małych	Psy ras średnich		Psy ras dużych		Mieszzańce
15	4		3		5
Wiek				Płeć	
Poniżej 1 roku	1–5 lat	5–10 lat	Powyżej 10 lat	Samice	Samce
10	8	4	5	11	16
Lokalizacja w przełyku					
Część piersiowa			Część szyjna		
4			2		
Powikłania					
Martwica błony śluzowej przełyku	Zapad tchawicy i zachyłstowe zapalenie płuc	Perforacja ściany przełyku	Uszkodzenie błony śluzowej bez naruszenia ciągłości tkanek	Błona śluzowa przełyku lub żołądka o cechach stanu zapalnego	Refluks żołądkowo-przełykowy
1	1	2	2	22	8
Gastritis II, III stopnia oraz o stopniu nieokreślonym	Przerost błony śluzowej żołądka	Nadżerki błony śluzowej żołądka	Wrzody żołądka	Pobrana biopsja do badania histopatologicznego	Potwierdzenie infekcji <i>Helicobacter</i> spp.
7	8	4	2	12	7

Źródło: Opracowanie własne.

## Dyskusja

Na podstawie zebranych przypadków można stwierdzić, że występowanie ciał obcych w żołądku jest częstsze niż w przełyku. Pokrywa się to także z poprzednimi badaniami (Šmit i in. 2018; Abramowicz i in. 2016). U dwóch pacjentów nie było możliwe usunięcie ciał obcych za pomocą endoskopu. W pierwszym przypadku wynikało to z utrudnionego dostępu, ponieważ przedmiot przechodził przez odźwiernik do dwunastnicy. Natomiast u drugiego pacjenta ciało obce w żołądku było zbyt duże, aby mogło zostać bezpiecznie usunięte za pomocą metod endoskopowych. Tych pacjentów skierowano na zabieg chirurgiczny w celu otwarcia jamy brzusznej i wyciągnięcia ciała obcego.

Biorąc pod uwagę rozmiar psa – najwięcej przypadków dotyczyło psów ras małych, co zgadza się ze wcześniejszymi badaniami na ten temat (Šmit i in. 2018). Może to wynikać z mniejszej średnicy przewodu pokarmowego niż u psów ras średnich i dużych, która będzie predysponować do częstszego zatrzymywania się ciał obcych. Najmniej liczną grupę badaną stanowiły psy ras średnich i dużych, które ze względu na swój większy rozmiar mogły mieć mniejsze szanse na zatrzymanie się u nich ciała obcego. U psów mieszańców nie można było określić przynależności do żadnej z grup z racji braku informacji o ich wielkości.

W przeciwieństwie do innych publikacji, w których najwięcej pacjentów stanowiły jedynie psy mieszańce (Šmit i in. 2018; Abramowicz i in. 2016) lub psy rasy West Highland White Terrier (Juvet i in. 2010; Luthi, Neiger 1998), w Katedrze Diagnostyki 18% z badanych psów z potwierdzeniem połknięcia ciała obcego stanowiły psy rasy Yorkshire Terrier. Dokładnie tyle samo stanowiły mieszańce, natomiast rasa West Highland White Terrier była trzecią najliczniejszą grupą. Zmiana w rozkładzie ras może wynikać ze słabnącej popularności psów rasy West Highland White Terrier, która według listy najbardziej popularnych ras publikowanej przez American Kennel Club w 2020 roku znalazła się na 44 miejscu, podczas gdy rasa Yorkshire Terrier zajęła miejsce 13 (dane dotyczą USA). Dodatkowo na częste przypadki połknięcia ciał obcych terierów może mieć wpływ ich budowa anatomiczna z dużą głową i małym tułowiem. W przypadku mieszańców przewaga w zestawieniu najprawdopodobniej wynika z ich liczniejszego występowania w Polsce i na świecie oraz stosunkowo łatwego nabycia takiego psa, na przykład ze schroniska.

Średnia wieku wszystkich pacjentów z potwierdzonym ciałem obcym wyniosła 4 lata, co pokrywa się z innym badaniem (Gianella i in. 2009). Najwięcej zgłoszonych przypadków podejrzenia ciała obcego odnotowano u psów młodych poniżej 1 roku życia (10), może to wynikać z wyzynania się zębów stałych i przypadkowego połknięcia przedmiotu w trakcie gryzienia, chęcią zabawy oraz brakiem wyuczenia odpowiednich zachowań.

Rozkład płci zwierząt przyjętych do Katedry Diagnostyki, u których występowało ciało obce, wskazywał na znaczą przewagę samców (59%) nad samicami (41%), co różni się od innych badań, gdzie podział płci był na podobnym poziomie (Šmit i in. 2018; Abramowicz i in. 2016).

Ciała obce zlokalizowane w przełyku miały tendencję do zatrzymywania się głównie w części piersiowej (67%), a rzadziej w części szyjnej (33%). Jest to związane z budową anatomiczną przewodu pokarmowego, gdzie w części piersiowej w okolicach wpustu do klatki piersiowej, podstawy serca oraz rozworu przełykowego występuje zwężenie światła przełyku (Luthi, Neiger, 1998).

W przełyku psów najczęściej zatrzymywały się kości, podobnie jak stwierdzono w innych pracach (Šmit i in. 2018; Abramowicz i in. 2016; Juvet i in. 2010; Gianella i in. 2009). Jest to najprawdopodobniej spowodowane nawykami żywieniowymi psów oraz rozmiarem i ostrymi krawędziami kości, które często klinują się w ścianie przełyku.

Ciała obce u wszystkich psów podrażniły błonę śluzową przewodu pokarmowego, co w konsekwencji u wielu z nich dawało objawy w postaci wymiotów. W przypadku jednego pacjenta zaobserwowano martwicę błony śluzowej przełyku, spowodowaną przez zbyt długie zaleganie przedmiotu w jednym miejscu. Gdyby nie podjęto interwencji, martwica mogłaby spowodować perforację ściany. Perforacja przełyku wystąpiła u dwóch pacjentów i u obu z nich była spowodowana przez ostre krawędzi kości, które często są podawane przez opiekunów. Pacjentom tym zalecono stosowanie odpowiednich substancji leczniczych, m.in. sukralfatu w zawiesinie oraz antybiotyku, i przejście na dietę mokrą. Wszystkie podjęte interwencje usunięcia ciała obcego przy pomocy manipulatorów endoskopowych w przypadku naszych pacjentów zakończyły się sukcesem oraz spokojnym wybudzeniem psów z podanej narkozy. U jednego z pacjentów, u którego ciało obce również znajdowało się w przełyku, zdiagnozowano zapad tchawicy i zachyłkowe zapalenie płuc. Podobnie jak w poprzednich przypadkach ciało obce mogło mieć wpływ na taki stan psa, powodując rozszerzenie przełyku i uciskanie na ścianę tchawicy. Dodatkowo wywoływane podrażnienie prowokowało wymioty i refluks treści do dróg oddechowych, powodując ich stan zapalny.

Do żołądka, zgodnie z innym badaniem (Šmit i in. 2018), w większości trafiły ciała obce niejadalne. Jednak w przeciwieństwie do prac wcześniejszych (Šmit i in. 2018; Abramowicz i in. 2016) w głównej mierze były to elementy drewniane. Drewno jest bardzo niebezpieczne ze względu na możliwość powstania drzazg, które mogą uszkadzać ścianę przewodu pokarmowego. U ponad 41% psów z obcym ciałem w żołądku wystąpił refluks żołądkowo-przełykowy i przerost błony śluzowej. Jest to związane z dłuższym przebywaniem ciała obcego, które oddziałuje na śluzówkę żołądka, wywołując jej podrażnienie. Dodatkowo 7 pacjentów miało w żołądku zmiany świadczące o gastritis z różnymi stopniami nasilenia, które mogły spowodować zalegające ciała obce oraz różnego rodzaju bakterie czy grzyby znajdujące się na połkniętych przedmiotach. Prawdopodobnie obecność różnych przedmiotów w żołądku doprowadziła u 4 psów do pojawienia się nadżerek błony śluzowej, a u 2 doszło do wystąpienia wrzodów żołądka. Mogło być to także spowodowane towarzyszącą im infekcją *Helicobacter spp.*, którą zaobserwowano u 6 pacjentów. Ciała obce prawdopodobnie nasiliły zakażenie tą bakterią, ponieważ spowodowały mobilizację gruczołów żołądka do zwiększonej produkcji soku żołądkowego, w tym kwasu solnego, którego nadmiar przyczynia się do powstawania wrzodów żołądka. W związku z widocznymi zmianami u 12 pacjentów pobrano fragment błony śluzowej żołądka i wysłano do oceny histopatologicznej. Badania histopatologiczne potwierdziły występowanie *Helicobacter spp.* u 7 psów, mimo że podejrzewano ją podczas badania endoskopowego jedynie u 6. Może to wynikać z tego, że u jednego z tych psów infekcja dopiero się rozwijała, ponieważ w preparacie biopsyjnym stwierdzono tylko pojedyncze bakterie *Helicobacter spp.*

Przy ekstrakcji ciał obcych z przełyku największą skuteczność miały sztywne kleszcze równolegle wprowadzone do endoskopu. W przypadku małych przedmiotów znajdujących się w żołądku lepiej sprawdziły się kleszcze do usuwania ciał obcych lub

koszyczek endoskopowy wprowadzane przez kanał roboczy, które pozwalają na precyzyjne złapanie przedmiotów. W jednym przypadku zastosowano razem z kleszczami cewnik Foleya, który standardowo służy do odprowadzania moczu z pęcherza moczowego, jednak w tych przypadkach posłużył do rozszerzenia przełyku w celu ułatwienia usunięcia ciała obcego. Badania udało się przeprowadzić bez większych komplikacji z prawidłowym przebiegiem znieczulenia. Dwóch pacjentów przetransportowano od razu na zabieg laparotomii. Pacjentom z perforacją przełyku zalecono przez pierwsze 48 godzin odżywianie pozajelitowe, później przejście na dietę mokrą oraz podawanie sukralfatu przed jedzeniem w celu zapewnienia dodatkowej ochrony błony śluzowej przełyku i żołądka. Dodatkowo przepisano stosowanie antybiotykoterapii – amoksyliny z kwasem klawulanowym w standardowej dawce 12,5 mg/kg.

Pacjentom po badaniu zalecono stosowanie sukralfatu w zawiesinie w dawce 2 ml na zwierzę jako środka osłaniającego żołądek oraz diety mokrej, niskotłuszczowej, aby zapewnić prawidłową regenerację podrażnionego przewodu pokarmowego.

## Podsumowanie

Przeprowadzone badania wykazały, że ciała obce najczęściej występują u psów ras małych, o drobnej budowie anatomicznej. Znaczenie ma także wiek, ponieważ psy młode, które dopiero się uczą odpowiedniego zachowania mają tendencję do połykania różnych przedmiotów. Otrzymane wyniki pokazują, że szczególną ostrożność należy zachować także w doborze diety psa ze względu na duże niebezpieczeństwo perforacji przełyku i żołądka, jakie niesie ze sobą między innymi podawanie do jedzenia kości. Dotyczy to szczególnie ras małych.

W diagnostyce ciał obcych niezwykle ważne jest podjęcie wczesnej interwencji, gdyż opóźnione działanie może prowadzić do poważnych konsekwencji, mogących mieć wpływ na późniejsze zdrowie psa. Badania RTG i USG umożliwiły zdiagnozowanie lub stwierdzenie podejrzenia obecności ciała obcego. Badanie endoskopowe pozwoliło ostatecznie potwierdzić lub wykluczyć diagnozę i w większości przypadków usunąć ciało obce.

## Bibliografia

- Abramowicz B., Buczek K., Staniec M. 2016. Ciała obce w przełyku i żołądku psów i kotów – przegląd 35 przypadków. *Med. Weter.*, 72 (4), s. 259–262.

- Fossum T.W. 2019. Small animal surgery, fifth edition, [w:] Surgery of the Digestive System. Elsevier, s. 416–418
- Gianella, P., Pfammatter, N. S., Burgener, I. A. 2009. Oesophageal and gastric endoscopic foreign body removal: complications and follow-up of 102 dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 50, s. 649–654.
- Hutchinson T., Robinson K. 2015. BSAVA Manual of Canine Practice: A Foundation Manual, [w:] Regurgitation, vomiting and diarrhoea. British Small Animal Veterinary Association, s. 210.
- Juvet F., Pinilla M., Shiel R.E., Mooney C.T. 2010. Oesophageal foreign bodies in dogs: factors affecting success of endoscopic retrieval. *Ir Vet J.*, 63(3):163–168.
- King L.G., Boag A. 2017. BSAVA Manual of Canine and Feline Emergency and Critical Care – Second Edition, [w:] Acute abdominal and gastrointestinal surgical emergencies. British Small Animal Veterinary Association, s. 177–181.
- Lhermette P., Sobel D. 2013. BSAVA Manual of Canine and Feline Endoscopy and Endosurgery, [w:] Flexible endoscopy: upper gastrointestinal tract. British Small Animal Veterinary Association, s. 63.
- Luthi C., Neiger R. 1998. Esophageal foreign bodies in dogs: 51 cases (1992–1997). *Eur. J. Comp. Gastroenterol*, 3, s. 7–11.
- Patil D. B., Parikh P. V., Jhala S. K., Tiwari D. K., Mehraj D.D. 2010. Gastric Foreign Bodies in Dogs – A Report of Five Cases. *Intas Polivet*, 11, s. 297–298.
- Šmit I., Crnogaj M., Brkljačić M., Potočnjak D., Torti M., Kiš I., Mrljak V., Jović I., Matijatk V. 2018. Endoscopic removal of esophageal and gastric foreign bodies in dogs: the prevalence, risk factors and efficacy of removal. *Veterinarski Arhiv*, 88(4), s. 481–496.
- Tilley L.P., Smith Jr. F. 2016. Blackwell's five-minute veterinary consult – Sixth edition. John Wiley & Sons, Inc.

## Abstract

### FOREIGN BODIES IN ESOPHAGUS AND STOMACH IN DOGS: PREVALENCE, RISK FACTORS – REVIEW OF CASES

Foreign bodies in dogs are often localized in esophagus or stomach. They are direct risk to animal's health and life. Therefore, they should be removed as soon as possible to minimize their harmful effects. The aim of this study was revision of cases with describing the prevalence and risk factors of foreign bodies in esophagus and stomach of dogs. The examination was conducted in 29 patients with suspicion of swallowing the foreign body. They have been anesthetized and prepared for endoscopic examination. Foreign bodies were diagnosed in esophagus of 6 patients, and in stomachs of 21. 2 patients were sent away for laparotomy, in the rest it was possible to perform endoscopic removal. In 2 patients esophagus perforation occurred. Small breed dogs swallowed foreign bodies more often than medium and large breeds. Bones were found the most often in esophagus and wood elements were more common in stomach. Endoscopic examination showed how dangerous foreign bodies can be for any dog. It is essential to act as soon as we start to suspect swallowing of foreign body by any dog.

**Słowa kluczowe:** ciała obce, psy, czynniki ryzyka, endoskopia

**Keywords:** foreign bodies, dogs, risk factors, endoscopy



**SEKCJA NAUK  
ZOOTECNICZNYCH  
I RYBACTWA**





**Nikodem Choszcz**

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
Naukowe Koło Hodowców Koni i Jeździectwa „Togo”

## **WYBRANE METODY FIZJOTERAPII KONI**

### **Wstęp**

Fizjoterapia to dział medycyny, który obejmuje ocenę stanu fizycznego pacjenta oraz dobór odpowiednich technik terapeutycznych. Cieszy się zainteresowaniem zarówno u ludzi, jak i u zwierząt, u których jest stale rozwijającą się dziedziną. Metody przeprowadzania zabiegów fizjoterapeutycznych u naszych czworonożnych przyjaciół opierają się na stosowanych w medycynie człowieka. Działania, które podejmuje się w ramach fizjoterapii, poprawiają komfort życia pacjentów, pozwalają im wrócić do zdrowia, niekiedy nawet uniknąć operacji. Przynosi ona korzyść nie tylko pupilom, ale również właścicielom ze względu na szybszy powrót zwierząt do wykonywanych zajęć, np. do zawodów sportowych (Kaczor, Grymel-Kulesza 2017). Należy podkreślić, że praca fizjoterapeuty często dopełniana jest leczeniem farmakologicznym, zaleceniami i wskazówkami lekarza weterynarii, co przyczynia się do osiągnięcia lepszych efektów terapeutycznych (McGowan, Goff 2016).

### **Cel pracy**

Celem pracy było przedstawienie wybranych metod fizjoterapii u koni.

### **Materiał i Metody**

Badania zostały oparte na literaturze naukowej i popularno-naukowej. Pod uwagę wzięto takie metody fizjoterapii, jak: masaż, stretching, laseroterapia, magnetoterapia i kinesiотaping. Wyniki przedstawiono w formie opisowej.

## Wyniki badań i dyskusja

Jedną z najstarszych metod fizjoterapii koni jest masaż, praktykowali go już starożytni Chińczycy i Rzymianie. Polega on na manipulacji tkanek miękkich między innymi w celu zapewnienia drenażu, relaksacji oraz pozbycia się problemów układu mięśniowego. Dodatkowo poprawia krążenie i prowadzi do lepszego ukrwienia oraz odżywienia tkanek. Dostrzeżono również pozytywny wpływ masażu na układ nerwowy i redukcję stresu, co wspomaga autoregulację psychofizjologiczną między ciałem a umysłem (Hourdebaigt 2007). Wyróżniamy masaż: leczniczy głęboki, relaksacyjno-pobudzający i powierzchowny. Ten ostatni stosuje się jako rozgrzewkę przed treningiem lub po nim, przeprowadza się go równoległe do przebiegu włókien mięśniowych. Jego celem jest relaksacja mięśni bez zmian w ich długości, wpływa na przywrócenie prawidłowego tonusu, dodatkowo usprawnia detoksykację. Masaż leczniczy przeprowadza się w poprzek włókien mięśniowych, skutkuje to ich rozciągnięciem, umożliwia on odbudowę mikrowłókien, które wcześniej doznały urazu. Praktyka ta wpływa na tonus tkanek, rozmieszczenie włókien kolagenowych i mięśniowych, zwiększa ukrwienie danej okolicy, uniemożliwia sklejanie się mięśni z podwiązami, a to niesie ze sobą bardziej efektywny skurcz i hipoałgezę (Guzowska, Albera-Łojek 2018).

Jednym z ważniejszych aspektów, które musimy brać pod uwagę, decydując się na tę formę fizjoterapii, jest znalezienie specjalisty, gdyż znajomość anatomii końskiego ciała i jego zachowania jest kluczem do sukcesu terapeutycznego. Podczas pierwszych zabiegów zwierzęta często okazują niepokój, niekiedy zaciekawienie. Duże znaczenie ma tutaj temperament konia i jego wcześniejsze doświadczenia, więc wskazana jest cierpliwość i delikatność w stosunku do nowego pacjenta, która później owocuje zamierzonym skutkiem – odprężeniem. Czas trwania masażu należy uzależnić od konkretnego przypadku, niektóre zwierzęta bardzo dobrze znoszą długie sesje, a inne przestają odczuwać satysfakcję wcześniej. Masaż ma bardzo szerokie zastosowanie u koni – można za jego pomocą pozbyć się m.in.: obrzęków czy zgromadzonego kwasu mlekowego, możemy działać nim na słabe i silne mięśnie, niwelować przewlekłe przykurcze, skurcze, rozgrzać zwierzę. Osiągane skutki zależą od zastosowanej techniki i czasu trwania zabiegu (Hourdebaigt 2007). Z badań prowadzonych przez Kędzierskiego wynika zależność między częstotliwością zabiegów, a lepszymi wynikami w zawodach, największe postępy zauważono u koni masowanych codziennie, ale poprawę obserwowano również w przypadku zwierząt, u których tę metodę stosowano raz na trzy tygodnie (Kędzierski i in. 2017).

Kinezyterapia to gałąź fizjoterapii, która polega na wykorzystywaniu ćwiczeń ruchowych. W tej metodzie to ruch wykazuje pozytywny wpływ na cały organizm i staje się środkiem leczniczym (Zielińska i in. 2018). Zakres ruchów u zwierząt może ulec zmianie z uwagi na wystąpienie stanów patologicznych, np.: bólu, zapalenia mięśni, opuchlizny stawów lub stanu zapalnego kości bądź stawów (Jastrzębska, Brzyszczyk 2019). Jedną z form kinezyterapii jest stretching.

Stretching to naturalny system ćwiczeń polegających na rozciąganiu mięśni w celu ich lepszego ukrwienia, zwiększenia elastyczności oraz zapobieganiu urazom, a także łagodzenia bólu w momencie wystąpienia. W przypadku koni wyróżniamy podział stretchingu na:

- aktywny – zwierzę nakłaniane jest do wykonywania określonych ruchów i wygięć, podczas których dochodzi do rozciągnięcia danych partii ciała. Taka forma ćwiczeń jest bezpieczna dla konia, ponieważ wykonuje je sam i to on decyduje o tym, na ile jest w stanie się rozciągnąć. W celu zachęcenia do wykonania danej czynności zwierzę często motywuje się smakołykiem;
- pasywny – ma miejsce w przypadku użycia siły przez fizjoterapeutę, to on fizycznie porusza danymi partiami ciała konia w celu ich rozciągnięcia. Nieumiejętne wykonywanie takich ćwiczeń może doprowadzić do kontuzji, dlatego korzystniejsze jest wykonywanie u koni stretchingu w sposób statyczny, czyli wolno rozciągając mięsień do granicy, w której nastąpi przejawianie oznak bólu i utrzymanie takiej pozycji do kilkudziesięciu sekund (Guzowska, Albera-Łojek 2018). Rozciąganie należy wykonywać powoli, w celu zmaksymalizowania wydłużenia tkanki w obrębie zwłóknienia lub skróconych tkanek miękkich okołostawowych. Trwałe rozciąganie przy niskim obciążeniu jest skuteczniejsze od szybkiego rozciągania z dużym obciążeniem (Haussler 2009).
- Do ćwiczeń stosowanych w ramach stretchingu pasywnego zaliczmy m.in.:
  - górne rozciąganie szyi,
  - dolne rozciąganie szyi,
  - boczne rozciąganie szyi,
  - rozciąganie kończyny przedniej, staw nadgarstkowy wyprostowany,
  - przywodzenie i odwodzenie kończyny przedniej, staw nadgarstkowy prosty,
  - rozciąganie przywodzicieli i odwodzicieli kończyny przedniej, staw nadgarstkowy pod kątem 90 stopni,
  - rozciąganie kończyny przedniej, staw nadgarstkowy zgięty pod kątem 90 stopni,
  - rozciąganie kończyny przedniej, podciąganie do tyłu, staw nadgarstkowy zgięty,
  - rozciąganie kończyny miedniczej (Wojtecka i in. 2018).

Niezależnie od tego, jaką formę stretchingu zastosujemy, należy pamiętać o tym, że zabieg może być wykonywany jedynie na rozgrzanych mięśniach konia. Dlatego przed przystąpieniem do ćwiczeń, należy przeprowadzić rozgrzewkę. Jeżeli mamy do czynienia z koniem, który nie jest trenowany regularnie, to przed rozciąganiem należy zapewnić mu np. spacer aktywnym stępem przez 20 minut lub pracę na lonży.

Kolejnym ważnym elementem ćwiczeń rozciągających jest bezpieczeństwo ich wykonywania oraz regularność. Przyjmuje się, że dla uzyskania efektów sesje powinny odbywać się co najmniej trzy razy w tygodniu. Bezpieczny stretching to taki, w trakcie którego nie dojdzie do uszkodzeń tkanek u konia oraz nie pojawi się zagrożenie dla zdrowia fizjoterapeuty pracującego z pacjentem (Zielińska i in. 2018). Badanie przeprowadzone na dziewięcioletniej klaczy, którą poddano 12 zabiegom rozciągania,

wykazało, że efektem była poprawa ruchomości szyi i kończyn. Dodatkowo nastąpiło wyeliminowanie różnic pomiędzy obszernością wykroku kończyn miedniczych. Największe efekty zauważono w przypadku wykroku zadniej lewej kończyny, dla której odnotowano 3-/4-krotny wzrost w przypadku przemieszczania się w przód oraz dwukrotny – w tył (Guzowska, Albera-Łojek 2018).

Dla uzyskania bezpiecznego i efektywnego stretchingu niezbędne jest posiadanie wiedzy z zakresu budowy anatomicznej układu mięśniowo-szkieletowego, sposobu poruszania oraz procesów fizjologicznych zachodzących we włóknach mięśniowych konia. Poprawne, a także regularne wykonywanie ćwiczeń u koni sportowych, jak i u koni rekreacyjnych ma pozytywny wpływ na narząd ruchu dzięki zwiększaniu elastyczności włókien mięśniowych. Stretching zapewnia komfort zwierzęciu, co w efekcie skutkuje jego lepszą dyspozycją (Zielińska i in. 2018).

Kolejną metodą jest **laseroterapia**. Polega ona na wykorzystaniu dla celów leczniczych i regeneracyjnych wiązki promieniowania laserowego, doprowadzanego do uszkodzonych tkanek i komórek organizmu (Soroko, Zielińska 2018). Wiązka lasera powoduje drgania atomów w leczonych komórkach i tkankach, nie narażając tych struktur na uszkodzenia, przenika ona w ich głąb nawet do kilku centymetrów. Światło lasera poprawia ukrwienie tkanek oraz usprawnia regenerację układu krwionośnego i limfatycznego (Jastrzębska, Brzyszczyk 2019). Leczenie tą metodą jest szczególnie skuteczne na wczesnym etapie urazu, gdy występują liczne podziały komórek (McGowan, Goff 2016).

Z uwagi na klasę zastosowanego lasera opisywana metoda została podzielona na:

- laseroterapię wysokoenergetyczną (HILT) – wykorzystywanie laserów klasy 4 o mocy powyżej 0,5 W,
- laseroterapię niskoenergetyczną – wykorzystywanie laserów klasy 3B o mocy do 0,5 W (Zielińska 2018).

W przypadku medycyny koni częściej dostrzegamy stosowanie laserów wysokoenergetycznych. HILT jest metodą nieinwazyjną oraz bezbolesną dla pacjenta. Bazuje na wykorzystywaniu wiązki lasera dzięki fali elektromagnetycznej, której długość wynosi 790-1100 nanometrów (Godlewska i in. 2020). Główne korzyści wynikające ze stosowania laseroterapii wysokoenergetycznej to m.in.: zwiększenie odporności, działania przeciwzapalne oraz przeciwbólowe, zmniejszenie obrzęków. Opisywana metoda w ortopedii koni wykorzystywana jest w przypadku schorzeń grzbietu, urazów ścięgienowych i więzadłowych, osteoartrozy, pęknięć i złamań kości oraz zmian w kopytach.

W celu uzyskania zadowalających efektów terapii ważne jest prawidłowe rozpoznanie dolegliwości, a następnie zastosowanie odpowiedniego leczenia. HILT należy przeprowadzać jako serię kilku, nawet kilkunastu zabiegów odbywających się w określonych odstępach czasu. Dla ciężkich i długotrwałych urazów stosuje się terapię skojarzoną, czyli oprócz laseroterapii wysokoenergetycznej wykorzystuje się również masaż leczniczy, co często owocuje całkowitym wyleczeniem konia.

Skuteczność stosowania omawianej metody fizjoterapii została potwierdzona doświadczalnie. Badaniu poddano jedenastoletnią klacz (koń sportowy, skaczący przez przeszkody), u której po wstępnych oględzinach oraz diagnostyce obrazowej stwierdzono pierwsze objawy choroby zwyrodnieniowej kręgosłupa. U pacjenta wdrożono serię sześciu zabiegów laseroterapii wysokoenergetycznej, po ich zakończeniu w odstępach 7–12 dni wykonano dwa całościowe masaże głębokie. Zastosowane metody pozwoliły na skuteczne wyeliminowanie zdiagnozowanych objawów, dzięki temu klacz mogła wrócić do pracy pod siodłem (Soroko, Zielińska 2018).

Laseroterapia z uwagi na swoją skuteczność oraz dobrą tolerancję przez zwierzęta cieszy się coraz większą popularnością i zainteresowaniem. W Polsce leczenie tą metodą u zwierząt stanowi 44% wykonywanych zabiegów (Kaczor, Grymel-Kulesza 2017).

**Zmienne pole magnetyczne** wykazuje działanie na jony i cząstki, które są naładowane elektrycznie, mają nie zrównoważony ładunek elektryczny. Ta forma fizykoterapii wyróżnia się tym, że może przenikać przez wszystkie części składowe organizmu, więc efekty, jakie ze sobą niesie, nie skupiają się na miejscowym działaniu, ale mogą przynosić korzyści ogólnoustrojowe. Zmienne pole magnetyczne wykazuje wpływ między innymi na syntezę DNA oraz białek, pobudza oddychanie wewnątrzkomórkowe, a więc wytwarzanie energii niezbędnej do procesów naprawczych oraz wpływa na aktywność ATP-azozależnej pompy Na/K, a z jej działaniem wiąże się wnikanie jonów wapnia do komórki (Kasprzak 2010). Magnetoterapia powoduje analgezję, relaksację oraz rozluźnienie mięśni, działa przeciwzapalnie, immunostymulująco, rozszerza naczynia krwionośne, poprawia odpływ chłonki, przez co zmniejsza obrzęki oraz przyspiesza naprawę tkanek i zrastanie się kości (Sieroń 1994). W magnetoterapii wykorzystuje się pole magnetyczne o częstotliwości nie przekraczającej 50 Hz oraz natężeniu od 0,1 do 20 mT. U koni do zabiegu często wykorzystuje się derki oraz ochraniacze magnetyczne (Jastrzębska, Brzyszc 2019). Z badań prowadzonych na dwudziestu ośmiu koniach różnych ras w kierunku rehabilitacji ścięgien wynika, że pulsacyjne pole magnetyczne o niskiej częstotliwości łagodziło objawy bólowe, zmniejszyło obrzęk tkanek oraz kulawiznę, obraz USG potwierdzał redukcję uszkodzenia ścięgien zginaczy palców. Dużym atutem tej metody fizjoterapii jest łatwość jej wykonania, otóż nawet właściciele zwierząt mogą przeprowadzać ją z zadowalającym efektem (Brzozowska 2019).

Kolejnym przykładem potwierdzającym leczniczy wpływ magnetoterapii jest dwudziestotrzyletnia klacz, którą użytkowano do nauki jazdy, zabiegi wykonywano przez godzinę z jednodniowymi przerwami. Badania krwi przeprowadzane przed i po terapii wykluczały jej negatywny wpływ na kondycję zwierzęcia, do tego zauważono relaksujący i uspokajający efekt magnetoterapii na konia. Po każdej kuracji badano temperaturę powierzchni ciała poddanej działaniu pola magnetycznego i stwierdzono jej podwyższenie, co wskazywało na zwiększenie przepływu krwi w tej okolicy, a ma to istotne znaczenie w rekonwalescencji (Jastrzębska 2021).

Ostatnią z przedstawionych metod jest **kinesiotaping**, zwany również plastrowaniem dynamicznym, wynaleziony w latach 70. XX wieku przez japońskiego chiropraktyka dr Kenzo Kase (Śliwiński i in. 2014). Kinesiotaping może być stosowany samodzielnie bądź wspomagać inne metody fizjoterapii. Jego zaletą jest prowadzenie ciągłej terapii, która może jednorazowo trwać nawet pięć dni, nie powodując w tym czasie dyskomfortu u pacjenta. Opisywana metoda jest nieskomplikowana, gdyż do jej praktyki wykorzystywane są specjalne plastry – lekkie, elastyczne, pokryte klejem (najczęściej akrylowym). Zbudowane są z polimeru (niezawierającego lateksu) z bawełnianymi elementami, które zapewniają hipoalergiczną, niwelują wilgotność oraz umożliwiają sprawne wysuszenie plastra (Mikołajewska 2007).

W przypadku koni istnieje wiele wskazań do stosowania kinesiotapingu, między innymi:

- urazy więzadeł i ścięgien,
- zachwiana równowaga mięśniowa,
- wady postawy,
- zaburzenia układu krwionośnego i limfatycznego,
- patologiczne stany układu nerwowego związane np. z układem ruchu,
- duże blizny,
- ostry i przewlekły ból,
- zrosty powięzi.

Jednak wyżej opisywanej metody nie należy stosować przy aktywnym zapaleniu tkanki łącznej, infekcjach skóry, otwartych ranach oraz w złośliwych schorzeniach skóry. Należy zachować szczególną ostrożność w przypadku zaburzeń endokrynologicznych i metabolicznych, przy chorobach nerek oraz w zastoinowej niewydolności serca (Molle 2016).

Skuteczność i długość aplikacji w dużej mierze uzależniona jest od przygotowania pacjenta – w miejscu, w którym będzie zastosowany plaster, należy usunąć owłosienie, oczyścić skórę (nie powinny znajdować się na niej żadne olejki, balsamy). Dla obszaru narażonego na kontakt z wilgocią należy zastosować odpowiedni, wodoodporny produkt (Kase 2005).

Wyróżniamy kilka technik naklejania plastrów:

- technika mięśniowa – stosowana w celu poprawy mikrokrążenia oraz zapewnienia odpowiedniej dyspozycji mięśniowej. Plastrowanie przebiega wzdłuż maksymalnie rozciągniętego mięśnia od przyczepu stałego do przyczepu ruchomego. Do zbliżenia przyczepów mięśnia, którego celem jest zapewnienie większego napięcia mięśniowego – aplikacja plastra następuje od przyczepu proksymalnego do przyczepu dystalnego. Natomiast dla zmniejszenia napięcia mięśniowego plaster naklejany jest od dalszego końca mięśnia do bliższego w celu oddalenia przyczepów od siebie;
- technika powięziowa – bardzo istotny przy tej metodzie jest fakt, iż aplikacja plastra powinna mieć miejsce 2 cm od powięzi poddawanej działaniu. Naprężenie

plastrów przy tej technice wynosi 25–50%, działa ona mobilizująco na powięź, poprawia komfort pacjenta poprzez zmniejszenie bólu;

- technika więzadłowo-ścięgnowa – rezultatem stosowania tej techniki jest poprawa czucia głębokiego, poprawa napięcia tkanki oraz zmniejszenie ucisku na więzadła i ścięgna. W celu zwiększenia stabilności ścięgna plastry naklejane są nad ścięgnem z naprężeniem 25–75%. Natomiast napięcie plasterów od 50–70% stosowane jest w przypadku więzadeł;
- technika przestrzenna – pozwala na zwiększenie ukrwienia oraz przyspiesza gojenie stanów zapalnych. Stosowana jest bezpośrednio na zmienionej powierzchni w celu zmniejszenia ucisku. Napięcie plastra uzależnione jest od występującego bólu i obrzęku, im większe wymienione dolegliwości, tym stosowane jest mniejsze napięcie plastra (napięcie wynosi 25–75%);
- technika limfatyczna – zapewnia poprawne krążenie krwi i limfy, zmniejsza obrzęki oraz stany zapalne. Aplikacja plastra może nastąpić bezpośrednio po wystąpieniu urazów. W przypadkach dużej bolesności naprężenie plastra wynosi maksymalnie 10%;
- technika funkcjonalna – jest to połączenie kilku technik aplikacji plasterów. Zapobiega występowaniu ponownych urazów dzięki zmniejszeniu rozciągliwości tkanki oraz ograniczeniu ruchu w stawie (Jastrzębska i in. 2017).

Kinesiotaping ma szerokie zastosowanie w medycynie weterynaryjnej. Natomiast z uwagi na fakt, iż jest ona nową metodą w tej dziedzinie, wciąż prowadzone są badania kliniczne w celu zwiększenia zakresu jej wykorzystania i efektywności w rehabilitacji koni (Molle 2016).

## Wnioski

Na podstawie przeprowadzonej analizy zgromadzonych materiałów źródłowych wynika, iż fizjoterapia to stale udoskonalana dziedzina wykorzystywana w medycynie koni. Wszystkie opisane metody korzystnie wpływają na rekonwalescencję pacjenta. Należy pamiętać, że skuteczność zabiegów w ogromnej mierze zależy od wiedzy i doświadczenia specjalistów. Często w czasie leczenia stosuje się kilka metod fizjoterapii jednocześnie. Dzięki licznym badaniom możemy oczekiwać, że w przyszłości spektrum skuteczności tych form znacząco wzrośnie i będziemy mogli poznać jeszcze inne ich zastosowania.

## Bibliografia

- Brzozowska M. 2019. Zastosowanie zmiennego pulsacyjnego pola magnetycznego niskich częstotliwości w rehabilitacji ścięgien u koni. Praca doktorska wykonana na Wydziale Biologii i Hodowli Zwierząt Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu.
- Godlewska M., Soroko M., Zielińska P. i Dudek K. 2020. Badanie pilotażowe nad zastosowaniem techniki termograficznej w ocenie działania laseroterapii wysokoenergetycznej u koni wyścigowych. *Med. Weter.*, 76(10), s. 593–596.
- Guzowska K. i Albera-Łojek A. 2018. Terapia manualna koni – studia przypadków. *Przegląd hodowlany*, 86(6), s. 24–31.
- Haussler K.K. 2009. Review of Manual Therapy Techniques in Equine Practice. *Journal of Equine Veterinary Science*, 29(12), s. 849–869.
- Hourdebaigt J.-P. 2007. *Equine Massage: A Practical Guide*, 2nd Edition. Hoboken (New Jersey) Wiley Publishing.
- Jastrzębska E. 2021. Use of magnetic field in equine physiotherapy a preliminary study. *Med. Weter.*, 77(3), s. 137–141.
- Jastrzębska E. i Brzyszc A. 2019. Czy warto sięgnąć po zoofizjoterapię?. *Przegląd hodowlany*, 6/2019, s. 15, 17.
- Jastrzębska E., Wadas E. i Kamińska J. 2017. Zastosowanie kinesiotapingu w rehabilitacji koni. *Przegląd hodowlany*, 85(5), s. 17–18.
- Kaczor D. i Grymel-Kulesza E. 2017. Analiza porównawcza w prowadzeniu fizjoterapii u ludzi i zwierząt. *Choroby XXI wieku - wyzwania w pracy fizjoterapeuty*, s. 273–274, 280, 287.
- Kase K. 2005. *Kinesio Illustrated Taping New 4th Edition*. Tokyo KEN'I KAI INFORMATION.
- Kasprzak W. 2010. *Fizjoterapia kliniczna*. 1 red. Warszawa PZWL.
- Kędzierski W., Janczarek I., Stachurska A. i Wilk I. 2017. Comparison of Effects of Different Relaxing Massage Frequencies and Different Music Hours on Reducing Stress Level in Race Horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 53, s. 100–107.
- McGowan C. i Goff L. 2016. *Animal Physiotherapy Assessment, Treatment and Rehabilitation of Animals*, 2nd Edition. Wiley-Blackwell.
- Mikołajewska E. 2007. *Kinesiotaping. Rozwiązania wybranych problemów funkcjonalnych*. Warszawa PzWL.
- Molle S. 2016. *Kinesio Taping Fundamentals for the Equine Athlete*. The Veterinary clinics of North America. *Equine practice*, s. 112.
- Sieroń A. 1994. Zastosowanie zmiennych pól magnetycznych w medycynie. *Zeszyty Naukowe Politechniki Śląskiej*, s. 177–178.
- Soroko M. i Zielińska P. 2018. *Fizjoterapia koni – klucz do zdrowia twojego konia*. Wrocław EQUINE MASSAGE – Szkoła rehabilitacji koni Marii Soroko. <http://eqma.pl/> (dostęp 30 maj 2021 r.).
- Śliwiński Z., Krajczyk M., Szczegielniak J. i Senderka T. 2014. *Dynamiczne plastrowanie podręcznik Kinesiology Taping*. 1 red. Markmed – Rehabilitacja s.c.



## Abstract

**CHOSEN METHODS OF EQUINE PHYSIOTHERAPY**

While caring for the well - being of our four - legged companions, we should not only provide them with a properly balanced diet or adequate living conditions, but it is equally important to minimize stress stimuli and take preventive care of various injuries and diseases. As the awareness of breeders and owners grows, the number of physiotherapeutic treatments is increasing. It is a really important issue within this group of animals, which are often exposed to extensive exploitation, among others, due to intensive training, competitions and a dynamically developing form of physical rehabilitation for children and adults - hippotherapy. The most common forms of physiotherapy involving horses are: massage, stretching, laser therapy, magnetotherapy and kinesiotaping. The aim of the study was to present the above - mentioned methods and, among other things, explain how to perform them and show the benefits of practicing them. The research was based on scientific and popular science literature. The results of numerous experiments applying these methods encourage to use them even more often in the future. The outcome of physiotherapeutic treatments allows us to broaden knowledge about its effectiveness, shows what impact on the animal's bodies it has and gives a chance to improve the ways these procedures are performed.

**Słowa kluczowe:** fizjoterapia, metody, konie

**Keywords:** physiotherapy, methods, horses

**Zuzanna Kulawik**

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
Naukowe Koło Hodowców Koni i Jeździectwa „Togo”

## **WYBRANE ZIOŁA I ICH ZASTOSOWANIE W LECZNICTWIE KONI**

### **Wstęp**

Zioła oraz surowce roślinne od dawna stanowią niezwykle cenne źródło substancji leczniczych stosowanych przez ludzi. Wykorzystywane są nie tylko w leczeniu wielu schorzeń, ale i w profilaktyce. Były głównym panaceum na wiele schorzeń aż do XX wieku, kiedy nastąpił przełom w chemii i w konsekwencji rozwój przemysłu farmaceutycznego. W wyniku tego ziołolecznictwo zaczęło tracić na znaczeniu i preparaty roślinne zostały zastąpione przez syntetyczne bądź półsyntetyczne związki chemiczne. Obecnie możemy zaobserwować wzrost zainteresowania lekami pochodzenia roślinnego. Głównym powodem jest znacznie mniejsza ilość efektów ubocznych występujących po stosowaniu ziół niż przy lekach farmaceutycznych (Studzińska-Sroka i in. 2018). Ważnym aspektem wpływającym na ponowny powrót do ziołolecznictwa jest także szerokie spektrum działania oraz możliwość wykorzystania ziół synergistycznie z leczeniem konwencjonalnym, zwiększając jego działanie. Dzięki dużemu zainteresowaniu i ponownemu wprowadzaniu substancji pochodzenia roślinnego do metod leczenia odkryto oraz zaczęto stosować zioła także u zwierząt, zarówno gospodarskich, jak i towarzyszących.

### **Cel pracy**

Celem pracy było przedstawienie działania i zastosowania wybranych ziół w leczeniu koni.

## Metodyka

Badania oparto na literaturze naukowej, popularno-naukowej oraz własnym doświadczeniu. Pod uwagę wzięte zostały właściwości lecznicze roślin takich, jak: hakorośl rozesłana, lawenda wąskolistna, aloes, wiązówka błotna, jeżówka purpurowa i łopian większy. Wyniki zostały przedstawione w formie opisowej.

## Wyniki

Jednym z ziół o szerokim spektrum działania jest hakorośl rozesłana (*Harpogophytum procumbens*). Ta wywodząca się z Afryki roślina znana jest w Polsce pod nazwą czarciego pazura. Surowiec roślinny stanowią wtórne bulwy korzeniowe, wyrastające na mięsistych korzeniach, niezwykle bogate w składniki czynne. Zawierają one glikozydy irydoidowe, fenylotanoidowe i fenylowe, flawonoidy, fenolokwasy, triterpeny oraz fitoestrole. Wyciągi z korzenia czarciego pazura wykazują właściwości przeciwreumatyczne, przeciwzapalne, przeciwbólowe oraz antyoksydacyjne. Posiadają również działanie żółciopędne, pobudzają produkcję soków trawiennych, co skutkuje poprawą ogólnych funkcji trawiennych (Rymarz 2017). Działanie przeciwzapalne wynika z blokowania przez *Harpogophytum procumbens* szlaku przemian kwasu arachidonowego, którego końcowe produkty są mediatorami zapalnymi. Liczne badania *in vitro* na myszach wykazały nie tylko działanie inhibicyjne na szlak kwasu arachidonowego, ale także hamowanie czynnika TNF- $\alpha$  oraz cytokin prozapalnych IL-1 $\beta$ , IL-6 wytwarzanych przez makrofagi (Baraniak, Kania 2011).

Podobny mechanizm działania występuje przy zastosowaniu niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Niestety przy stosowaniu tej gamy leków trzeba się liczyć z wieloma efektami ubocznymi. Do jednych z głównych efektów ubocznych należą tworzenie się wrzodów żołądka czy upośledzenie syntezy proteoglikanów. Niesteroidowe leki przeciwzapalne wykorzystywane są przy reumatyzmie, zapaleniach stawów ścięgien oraz chorobach zwyrodnieniowych u koni. W przypadku długotrwałej terapii zaleca się leczenie uzupełniające polegające na podawaniu ekstraktu z hakorośli (Axmann i in. 2018). Przeglądowe badania przeprowadzone w 2006 roku wskazywały na przeciwbólowy wpływ czarciego pazura w przypadku zapalenia kości i stawów. W porównaniu do grup, u których stosowano niesteroidowe leki przeciwzapalne, kulawizna u koni, które otrzymywały hakorośl *per os*, była mniejsza. Z uwagi na niestuprocentową obiektywność przy pobieraniu wyników wymagane są dalsze badania kliniczne. Dodatkowo poruszona została kwestia bezpieczeństwa stosowania tej rośliny u koni (Brien i in. 2006). Najnowsze badania wskazują jednak na brak efektów ubocznych, takich jak podrażnienie układu pokarmowego, przy stosowaniu czarciego pazura (Axmann i in. 2018).

Lawenda wąskolistna (*Lavandula angustifolia*), znana pod nazwą lawenda lecznicza, jest rośliną o szeregu zastosowań. To zioło należące do rodziny jasnotowatych pochodzi z terenów śródziemnomorskich, obecnie jest uprawiana na terenie całej Europy, a także Ameryki Północnej. Początkowo jej popularność związana była z intensywnym zapachem, dopiero z biegiem czasu odkryto inne lecznicze zastosowania. Obecnie surowcem głównie wykorzystywanym jest olejek eteryczny będący jednym ze składników kwiatu lawendy (Dobros i in. 2018). W jego składzie znajdują się takie substancje, jak: linalol, octan linalolu, limonen, kampfore oraz borneol. Dodatkowo występują w nim flawonoidy, fitoestrole, triterpeny oraz kwasy fenolowe – głównie kwas rozmarynowy i jego pochodne (Matławska 2008). Lawenda oraz pozyskiwany z niej olejek eteryczny, pomimo licznych publikacji, wciąż cieszy się dużym zainteresowaniem wśród badaczy, w związku z czym wciąż odkrywane są nowe zastosowania tej rośliny i surowców z niej pozyskiwanych (Adaszyńska i in. 2013).

Jednym ze sposobów wykorzystania *Lavandula angustifolia* jest aromaterapia. Koni wyścigowe ze względu na bardzo restrykcyjne regulacje mogą otrzymywać tylko wąski wachlarz środków farmakologicznych. Surowce z lawendy natomiast są środkami dopuszczonymi do użytku, a badania przeprowadzone na grupie koni dowiodły, że zwierzęta, które były wystawione na działanie olejku eterycznego w sytuacjach stresowych miały nie tylko obniżone tętno oraz ilość oddechów, ale spadkowi ulegał także poziom kortyzolu we krwi. Wiąże się to z bezpośrednim oddziaływaniem na układ nerwowy, a dokładniej pobudzaniem układu współczulnego przez olejek lawendowy (Elghandour i in. 2018). Badania na myszach wykazały dodatkowo działanie antyhiperestezyjne, ze względu na pobudzanie przez *Lavandula angustifolia* receptorów opioidowych, pozwalając na otrzymanie efektu przeciwbólowego, co może zostać zastosowane przy leczeniu bóli przewlekłych (Donatelloa i in. 2020). Wyniki wielu badań wskazują także na działanie przeciwbakteryjne olejku z lawendy wąskolistnej. Wpływa on bakteriobójczo oraz bakteriostatycznie na *Staphylococcus aureus* (Giovannini i in. 2016; Vuuren, Viljoen 2006). Ponadto wrażliwe na niego są szczepy *Escherichia coli* oraz *Pseudomonas aeruginosa* (Moussii i in. 2020).

Olejki eteryczne, w tym lawendowy, są wykorzystywane do zwalczania zakażeń grzybiczych. Do grzybów podatnych na działanie terpenów zawartych w lawendowym olejku eterycznym należą przedstawiciele rodziny *Candida*, *Aspergillus*, *Trichophyton* oraz *Microsporum gypseum* (Adaszyńska-Skwirzyńska, Swarczewicz 2014). Bakterie te są przyczyną chorób skórnych u koni, takich jak: onychomykoza, keratomytoza, dermatofitoza (Gnat, Łagowski 2021). Olejek lawendowy posiada również właściwości repelentne. Jednym z pasożytów wrażliwych na jego związki jest *Hyalomma marginatum* (Mkolo, Magano 2007). Kleszcz ten jest żywicielem ostatecznym dla *Theileria equi*, która wywołuje teilerozę u koni, będącą chorobą bardziej zjadliwą od babeszjozy, mogącą zakończyć się nawet śmiercią zwierzęcia (Zygner 2008).

Aloes (*Aloe vera*) jest sukulentem rodzimym dla terenów Afryki, obecnie uprawianym na wszystkich terenach, których klimat na to pozwala (Zamiara 2010). Aloes jest

jedną z najbogatszych pod względem substancji czynnych rośliną wykorzystywaną przez człowieka. Jego sucha masa zawiera około 270 składników biologicznie czynnych. Tak w medycynie, jak i przemyśle kosmetycznym wykorzystywany jest żel z aloesu. Znajdziemy w nim: flawonoidy, saponiny, enzymy, witaminy, antrachinony, minerały, hormony, polisacharydy. W związku z tym *Aloe vera* wywiera działanie antyoksydacyjne, przeciwbakteryjne, przeciwzapalne, zwiększa poziom insuliny, w wyniku czego obniża poziom glukozy we krwi. Ponadto ma działanie przeciwnowotworowe oraz pobudzające i modulujące na układ immunologiczny przeciwnowotworowe (Matejczyk i in. 2017). Liczne badania *in vivo* wskazują na korzystny wpływ aloesu na gojące się rany. Obiektami badań były psy rasy Beagle, świnki morskie, króliki oraz szczury. Wpływ ten jest wynikiem hipertoniczności oraz lekko kwasowego pH żelu aloesowego oraz pobudzania aktywności enzymów glikolitycznych, co zwiększa ilość wytwarzanej energii przez komórkę i w efekcie przyspiesza gojenie się ran (Jamil 2020). Pozytywne wyniki zostały także osiągnięte przy leczeniu koni po wypadku, w którym uszkodzeniu uległy partie mięśni kończyny tylnej. Terapia była w początkowym etapie wspierana przez antybiotyki oraz leki przeciwkrwotoczne ze względu na rozległy obszar uszkodzenia (Salazar i in. 2017). Działanie immunostymulujące występujące u koni zostało potwierdzone już w 1996 roku. Grupa czternastu koni została poddana, jak na tamte czasy, eksperymentalnej terapii leukocytopeni oraz letargu za pomocą żelu aloesowego stosowanego *per os*. Jedenaście na czternaście osobników po pięciu tygodniach od rozpoczęcia kuracji wykazało poprawę stanu zdrowia. Zwiększeniu uległa ilość leukocytów krążących we krwi, dodatkowo konie wykazywały większą wydolność organizmu podczas treningów (Green 1996). W przypadku stosowania żelu z aloesu jako remedium na grzybicę wywołaną przez liszaj obrączkowy oraz egzemę pęcin wyleczenie pacjentów następowało w takim samym czasie, co po zastosowaniu tradycyjnych środków przeciwgrzybiczych czy antybiotyków (Green 1996). Podobne wyniki otrzymał Ferdowski wraz z zespołem przy zastosowaniu żelu aloesowego na skórę koni w połączeniu z czosnkiem podawanym w tabletkach (Ferdowski i in. 2012). W przypadku cieląt z grzybicą strzygącą skóry, które otrzymały kurację w postaci żelu z aloesu oraz octu, efekty leczenia były lepsze niż przy zastosowaniu medycyny konwencjonalnej (Antikchi i in. 2009).

Kolejnym ziołem o zastosowaniach leczniczych jest rodzima dla polskich terenów wiązówka błotna (*Filipendula ulmaria*). Bylina ta występuje na terenie Północnej i Środkowej Europy oraz Azji. Ta rosnąca na brzegach zbiorników wodnych roślina jest jednym z głównych naturalnych źródeł kwasu salicylowego wraz z wierzbą białą (*Salix alba*) (Mowszowicz 1997). Substancjami przeważającymi w częściach naziemnych *Filipendula ulmaria* są salicylany, w tym: salicyna, aldehyd salicylowy i salicylan metylu, które w układzie pokarmowym utleniają się do kwasu salicylowego (Wynn, Fougère 2007). Współczesne badania wykazały obecność flawonoidów, glikozydów fenolowych oraz garbników. Wykryto także heparyno-podobną substancję, rozrzedzającą krew. Wiązówka tradycyjnie wykorzystywana była przy gorączkach, przeciwbólowo

oraz przeciwzapalnie (Lans i in. 2006). Właściwości przeciwzapalne zostały potwierdzone przez grupę serbskich badaczy poprzez przeprowadzenie testów na szczurach. Przeprowadzone w 2017 roku dodatkowe testy prowadzone *ex vivo* ukazały także działanie przeciwwrzodowe (Samardžić i in. 2018).

Wiązówka błotna u koni zalecana jest głównie przy problemach z układem pokarmowym, szczególnie przy wrzodach żołądka i ich profilaktyce, niestrawnościach, biegunkach, stanach reumatycznych, zapaleniach żołądka czy okrężnicy (Wynn, Fougère 2007). Ważnym działaniem, jakie odkryto i potwierdzono badaniami *in vivo*, są właściwości przeciwkancerogenne wiązków błotnej. Nowotwory jelita grubego, które zostały chemicznie indukowane u szczurów, wykazywały mniejszy współczynnik podziałów bądź w ogóle nie występowały u osobników otrzymujących roztwór z *Filipendula ulmaria* (G.Bespalov i in. 2018). W przypadku badań przeprowadzonych na ludziach, gdy zastosowano maść z wiązką błotną na 45 kobietach, u 32 wykazano pozytywną reakcję na zastosowanie terapii i zmniejszenie dysplazji, natomiast u 25 wystąpiła kompletna regresja zmian nowotworowych (Lans i in. 2006).

Ziołem powszechnie stosowanym zarówno wśród zwierząt towarzyszących, jak i gospodarskich jest jeżówka purpurowa (*Echinacea purpurea*). Jest to roślina należąca do rodziny astrowatych, pochodząca z Ameryki Północnej, tradycyjnie w tamtych rejonach stosowana jako remedium na wszelkie dolegliwości. Wraz z *Echinacea purpurea* powszechnie stosowane są też *Echinacea angustifolia* oraz *Echinacea pallida* (Bergero, Valle 2006). Obecnie jeżówka purpurowa jest wykorzystywana na całym świecie, choć najczęściej spotykana jest w Ameryce Północnej. Stosuje się ją jako środek pobudzający i stymulujący układ immunologiczny. Jeżówka bogata jest w polisacharydy, glikoproteiny, alkamidy oraz kwas cykoriowy, będący pochodną kwasu kawowego (Elghandour i in. 2018). W badaniach *in vivo* wykazano, że wyżej wymienione związki czynne stymulują tworzenie interferonu oraz properdyny, będących proteinami osocza neutralizującymi bakterie oraz wirusy. Dodatkowo zwiększają ruchliwość oraz ilość białych krwinek, stymulują i pobudzają fagocytozę fibroblastów oraz hamują aktywność hialuronidazy tkankowej i bakteryjnej. Dzięki temu zwiększa ona odporność organizmu na infekcje wirusowe i bakteryjne.

Jeżówka wykazuje ponadto działanie przeciwzapalne oraz posiada właściwości antyoksydacyjne (Matławska 2008). Badania przeprowadzone przez O'Neila i jego grupę badawczą potwierdziły, że u koni skuteczną leczniczą wykazuje także jeżówka wąskolistna (*Echinacea angustifolia*). U zwierząt, które otrzymywały wyciąg z jeżówki, nastąpiło pobudzenie układu immunologicznego: wzrost liczby limfocytów, neutrofilów i makrofagów. Dodatkowo u części zwierząt wzrósł poziom hemoglobiny oraz ogólnej liczby erytrocytów. Dzięki zwiększonej ilości czerwonych krwinek wzrasta podaż tlenu w organizmie, co bezpośrednio wpływa na jego wydolność. Efekt ten wykorzystywany jest u koni sportowych (O'Neill i in. 2002). Dostępne na chwilę obecną wyniki badań wskazują też na zwiększony przyrost masy, lepsze zużycie paszy oraz poprawę jakości mięsa u drobiu i trzody chlewnej po podawaniu jeżówki purpurowej w wodzie bądź

paszy. Zaobserwowano też u nich, a także u koni i bydła stymulację układu immunologicznego (Nasir, Grashorn 2009).

## Wnioski

W związku z coraz większą popularnością substancji leczniczych pochodzenia roślinnego w najbliższych latach możemy spodziewać się przełomowych odkryć w dziedzinie fitoterapii. Wciąż odkrywane są nowe zastosowania dla znanych nam do tej pory ziół oraz roślin, które dotąd nie posiadały zastosowania leczniczego. Ilość badań przeprowadzana na koniach wciąż jest ograniczona ze względu na przynależność do innego rzędu systematycznego, wiele badań przeprowadzanych na ludziach bądź gryzoniach nie może zostać przełożona na te nieparzystokopytne, np. ze względu na odmienną budowę układu pokarmowego. Jednak fitoterapia i suplementacja ziołami coraz częściej jest spotykana na terenie stajni. Substraty roślinne mogą stanowić alternatywę bądź uzupełnienie dla medycyny konwencjonalnej.

## Bibliografia

- Adaszyńska M., Swarczewicz M. i Markowska-Szczupak A. 2013. Porównanie składu chemicznego i aktywności. *Postępy Fitoterapii*, 2:90–96.
- Adaszyńska-Skwirzyńska M. i Swarczewicz M., 2014. Skład chemiczny i aktywność biologiczna. *Wiadomości chemiczne* 68:11–12.
- Antikchi M. i inni, 2009. A comparison between effects of Aloe vera, Vinegar and Salvia officinalis, and Pine cone on treatment process of dermatophytosis in calves. *International J Vet Res* 1:2–4.
- Axmann S. i inni, 2018. Pharmacokinetics of harpagoside in horses after intragastric administration of a Devil's claw (*Harpagophytum procumbens*) extract. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 42:37–44.
- Baraniak J., Kania M., 2011. Wybrane surowce zielarskie o działaniu przeciwbólowym, przeciwzapalnym i przeciwreumatycznym. *Postępy Fitoterapii*, 2:94–99.
- Bergero D., Valle E., 2006. A critical analysis on the use of herbs and herbal extracts. *Pferdeheilkunde*, 5:550–557.
- Brien S., Lewith G.T., McGregor G., 2006. Devil's Claw (*Harpagophytum procumbens*) as a Treatment for Osteoarthritis: A Review of Efficacy and Safety. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 12:981–993.
- Dobros N., Zawada K., Zielińska A., 2018. Związki biologicznie czynne i właściwości antyoksydacyjne ekstraktów z kwiatów lawendy wąskolistnej (*Lavandula angustifolia* Miller.). W: *Analiza, produkcja i zastosowanie substancji oraz komponentów pochodzenia roślinnego*. Lublin :Wydawnictwo Naukowe TYGIEL str.111–123.

- Donatello N., Emer N., Salm A.A., Ludtke D., 2020. Lavandula angustifolia essential oil inhalation reduces mechanical hyperalgesia in a model of inflammatory and neuropathic pain: The involvement of opioid and cannabinoid receptors. *Journal of Neuroimmunology*, 340:1–10.
- Elghandour M.M., Reddy P.R.K., Salem A.Z., Reddy P.P.R., 2018. Plant Bioactives and Extracts as Feed Additives in Horse Nutrition. *Journal of Equine Veterinary Science*, 69:66–77.
- Ferdowski H., Afshar S., Rezakhani A., 2012. A comparison between the routine treatment of equine dermatophytosis and treatment with Garlic. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research*, 3:2258–2261.
- G.Bespalov V. i inni, 2018. The inhibitory effect of Filipendula ulmaria (L.) Maxim. on colorectal carcinogenesis induced in rats by methylnitrosourea. *Journal of Ethnopharmacology*, 227:1–7.
- Giovannini D. i inni, 2016. Lavandula angustifolia Mill. Essential Oil Exerts Antibacterial and Anti-Inflammatory Effect in Macrophage Mediated Immune Response to Staphylococcus aureus. *Immunol Invest*, 45:11–28.
- Gnat S. i Łagowski D., 2021. Zakażenia grzybicze u koni. Część I. Dermatomykozy i keratomykozy. *Życie Weterynaryjne*, 94:260–267.
- Green P., 1996. Aloe vera extract in equine clinical practice. *Veterinary Times*, Tom 26.
- Jamil M., 2020. Effect of Aloe vera on Wound Healing. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 63B:48–61.
- Lans C., Turner N., Brauer G., Lourenco G., 2006. Ethnoveterinary medicines used for horses in Trinidad and in. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2.
- Matejczyk M., Golonko A., Chilmon E., 2017. ALOE VERA – WYBRANE WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE. *Civil and Environmental Engineering*, 8:191–195.
- Matławska I., 2008. *Farmakognozja*. Poznań, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.
- Mkolo N., Magano S., 2007. Repellent effects of the essential oil of Lavandula angustifolia against adults. *Journal of the South African Veterinary Association*, 78:149–152.
- Moussii I., Nayme K., Timinouni M., Jamaledine J.J., 2020. Synergistic antibacterial effects of Moroccan Artemisia herba alba. *Synergy*, 10:1–7.
- Mowszowicz J., 1997. *Pospolite rośliny naczyniowe Polski*. Łódź: PWN.
- Nasir Z., Grashorn M., 2009. Echinacea: A potential feed and water additive in poultry and swine production. *Arch.Geflügelk.*, 73:227–236.
- O'Neill W., McKee S., Clarke A., 2002. Immunological and haematinic consequences of feeding a standardised Echinacea (Echinacea angustifolia) extract to healthy horses. *EQUINE VETERINARY JOURNAL*, 34:222–227.
- Rymarz D., 2017. Właściwości lecznicze *Harpagophytum procumbens* I *Pelargonium sidoides* – roślin pochodzących z afryki południowej. W: *Nauka nie jedno ma imię... TOM IV*. Bydgoszcz: Wydawnictwo Uczelniane Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy, str. 189–198.
- Salazar R. i inni, 2017. Uso de la sábila (Aloe vera) en la regeneración muscular de un equino. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 18:1–12.
- Samadzić S. i inni, 2018. Antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotective activity of Filipendula ulmaria (L.) Maxim. and Filipendula vulgaris Moench. *Journal of Ethnopharmacology*, 213:132–137.
- Studzńska-Sroka E., Dudek M., Makuch D., Czapska I., 2018 Zastosowanie roślin w profilaktyce i leczeniu zwierząt hodowlanych. *Wiadomości Zootechniczne*, 3:66–78.
- Vuuren S.F., Viljoen M., 2006. A Comparative Investigation of the Antimicrobial Properties of Indigenous South African Aromatic Plants with Popular Commercially Available Essential Oils. *Journal of Essential Oil Research*, 8:66–71.
- Wynn S.G., Fougère B.J., 2007. *Veterinary Clinical Uses of Medicinal Plants*. St. Louis: MOSBY INC.



Zamiara K., 2010. Aloes – jego tajemnicza moc. *HISTORIA FARMACJI*, 66:495–497.  
Zygner W., 2008. Piroplazmozy koni. *Życie Weterynaryjne*, 83:732–735.

Abstract

### SELECTED HERBS AND THEIR USE IN HORSE TREATMENT

The subject of this publication is to present the effects of selected herbs and their use in horse medicine. In recent years, both in human and animal medicine, a significant increase in interest in natural methods of treatment, especially herbal medicine, can be observed. Alternative methods of treatment are used not only in farm animals, in which this is due to the imposition of restrictions related to the use of antibiotics, as well as in companion and sports animals. Currently, phytotherapy in the case of horses is experiencing a revival. Owners are more and more willing to use natural methods of dealing with various diseases to support treatment. With the help of herbs, you can treat a wide range of ailments from skin ailments, through arthritis or problems with the respiratory system. The herbs used in the case of horses include, among others: devil's claw, English lavender, aloe, meadowsweet, purple echinacea. The effectiveness of their action meant that they can be found both in the composition of feed additives and ointments. Due to their availability, they are more and more often used in the form of self-prepared decoctions or infusions eagerly eaten by horses. This publication is based on scientific and popular science literature.

**Keywords:** herbal medicine, narrow-leaved lavender, aloe, phytotherapy

**Kamila Lutkiewicz**

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Bioinżynierii Zwierząt

Naukowe Koło Hodowców Trzody Chlewnej

Opiekun naukowy: dr inż. Dorota Bugnacka

## **WPŁYW DODATKU HEMOGLOBINY DO MIESZANKI PEŁNOPORCJOWEJ TYPU PRESTARTER NA WYNIKI ODCHOWU PROSIĄT SSĄCYCH**

### **Wstęp**

Na efektywność produkcji trzody chlewnej składa się wiele czynników. Potencjał genetyczny zwierząt to bazowy, ale nie jedyny czynnik oddziałujący na wyniki produkcji. Czynniki środowiskowe, w tym żywienie jako czynnik o najwyższej ekspresji, mają bardzo duży wpływ na wzrost i rozwój zwierząt. Na poziom czynników środowiskowych wrażliwe są szczególnie prosięta. Rodzą się z niewykształconym mechanizmem termoregulacji oraz z niedostatecznie wykształconymi mechanizmami odporności (Nowacka i Piątkowski 2016). W aspekcie wpływu żywienia zdecydowanie najistotniejsze jest prawidłowe dokarmianie prosiąt ssących. Błędy popełnione na tym etapie produkcji w wyraźny sposób przekładają się na wyniki w dalszych etapach odchowu.

Pierwszym pokarmem, który jest pobierany przez ssaki, jest siara. Każdy producent powinien dopilnować, aby zwierzęta pobrały odpowiednią jej ilość (Lipiński 2010). Potrzeby pokarmowe prosiąt zmieniają się dynamicznie, rosnąc z dnia na dzień. Z kolei w trzecim tygodniu laktacji mleczność loch zaczyna spadać. Powoduje to zmniejszenie podaży składników pokarmowych dostępnych z mleka matki przy wzrastającym zapotrzebowaniu prosiąt. Ograniczona ich podaż wpływa negatywnie na efektywność wzrostu i rozwoju młodych zwierząt (Kozera 2020). Absolutnie niezbędne jest zatem wczesne dokarmianie prosiąt. Wprowadzenie paszy stałej do diety prosiąt ssących jest bardzo dużym wyzwaniem ze względu na specyfikę pracy ich przewodu pokarmowego, a także fakt, że błędy, które mogą wystąpić na tym etapie będą miały odzwierciedlenie w późniejszych etapach życia tych zwierząt. Najlepszym

momentem rozpoczęcia podawania pasz stałych prosiętom jest 5–7 dzień ich życia. Odpowiednio dobrana pasza pod względem zapotrzebowania zwierząt na składniki pokarmowe oraz odpowiednio dobrane komponenty paszowe z uwzględnieniem wieku zwierząt są bardzo ważnym elementem (Bugnacka 2019). Stosowanie różnych dodatków paszowych w tym okresie jest bardzo często spotykane. Probiotyki, prebiotyki, synbiotyki, preparaty ziołowe oraz enzymatyczne, zakwaszacze, są substancjami, które mają usprawnić procesy trawienne, a także podnieść zdrowotność prosiąt. Jednak trzeba pamiętać, że muszą być dozowane bardzo dokładnie i stosowane ściśle według zaleceń, ponieważ nieodpowiednie postępowanie w tym zakresie może nie przynieść oczekiwanych skutków (Szostak 2015).

Jednym z dodatków paszowych, które mogą być stosowane jako komponent mieszanki dla prosiąt, jest hemoglobina, która dzięki swoim właściwościom może się przyczynić do stymulacji wzrostu i rozwoju prosiąt. Hemoglobina jest łatwo dostępnym materiałem paszowym zawierającym znaczną ilość białka, a jej dodatkowym atutem jest wysoki stopień wysycenia żelazem hemowym. Funkcją hemoglobiny jest transport tlenu z płuc do tkanek oraz transport dwutlenku węgla z tkanek do płuc (Minakowski i Weinder 2005). Z tego względu wydaje się ona być godnym uwagi dodatkiem do mieszanki pełnoporcjowej dla prosiąt ssących, które ze względu na szybkie tempo wzrostu wykazują wysokie zapotrzebowanie na białko oraz na żelazo ze względu na niską zawartość tego pierwiastka w mleku lochy. Wykonywano już doświadczenia, w których badano prosięta z niedoborem żelaza i podawano im paszę zawierającą dodatek hemoglobiny, aby zbadać wpływ jej stosowania na rozwój niedokrwistości.

Doświadczenie wykonane przez Staronia i in. (2017) prowadzone było na trzech grupach prosiąt. Ich dokarmianie rozpoczęto od trzeciego dnia życia paszą Prestarter Wigor 1 Plus. Prosięta z grupy I nie otrzymywały dodatku żelaza, grupa II otrzymała w 3. i 21. dniu życia pozajelitowo dawkę dekstranu żelaza, natomiast prosięta z grupy III otrzymywały dodatek hemoglobiny bydłczej do paszy. Badania krwi zwierząt z grupy III nie wykazały objawów anemii w przeciwieństwie do prosiąt z grupy I. Niestety poziom hemoglobiny we krwi u prosiąt z grupy III był niski w porównaniu z prosiętami z grupy II. Jednak podaż żelaza u prosiąt z grupy III była niska pomiędzy 3. a 9. dniem życia ze względu na niskie pobranie paszy stałej przez prosięta ze wszystkich grup. Badania te pozwoliły wywnioskować, że czynnikiem ograniczającym możliwość suplementacji żelaza za pomocą hemoglobiny jest ograniczone pobranie paszy w pierwszych dniach życia prosiąt. W doświadczeniu wykazano także, że prosięta, które były suplementowane żelazem w postaci hemoglobiny do mieszanki typu prestarter, wykazały szybsze tempo przyrostu masy ciała niż prosięta, które nie miały suplementowanego żelaza (Staroń i in. 2017).

W doświadczeniu Lee i in. (2008) badano skuteczność stosowania różnych form żelaza podawanych prosiętom odsadzonym *per os*. Wyznacznikami skuteczności, czy też jej braku przy stosowaniu poszczególnych form żelaza, były badania parametrów krwi prosiąt, ich wzrost, stężenie minerałów w tkankach, a także stan jelita cienkiego.

Odsadzone prosięta podzielono na cztery grupy. Grupę kontrolną stanowiły prosięta, których dieta nie zawierała żadnych dodatkowych źródeł żelaza. Każda z następujących grup otrzymywała dodatkową porcję żelaza wynoszącą 100 mg Fe/kg, z tym, że w grupie II żelazo podawano w formie siarczanu (VI) żelaza, w grupie III w formie glicynowego chelatu żelaza, a w grupie IV w formie hemu. W badaniach stwierdzono, że świnię, którym podawano glicynowy chelat żelaza lub hem, wykazywały znacznie wyższą zawartość żelaza w surowicy krwi w porównaniu ze świnią, u których nie stosowano suplementacji żelaza lub podawano siarczany (VI) żelaza. Prosięta z tych dwóch grup charakteryzowały się także wyższą zawartością żelaza w wątrobie. Suplementacja żelazem spowodowała, że zwiększyła się wysokość kosmków oraz głębokość krypt w dwunastnicy. Przedstawione wyniki pozwalają na sformułowanie wniosku, iż suplementacja żelaza jest zabiegiem celowym, lecz najlepsze efekty daje stosowanie żelaza w formie żelazowego chelatu glicynowego lub hemu (Lee i in. 2008).

Suplementacja żelazem nie musi odbywać się drogą pozajelitową lub drogą *per os*. Istnieje bowiem możliwość połączenia tych dwóch metod. Skuteczność mieszanej suplementacji żelazem badano w doświadczeniu przeprowadzonym przez Szudzik i in. (2020). Prosięta zostały tu podzielone na cztery grupy, przy czym każda grupa była wyrównana pod względem masy ciała, a warunki środowiska były identyczne. Grupę I i III stanowiły prosięta rasy wielka biała polska, a grupę II i IV prosięta linii syntetycznej 990. Prosięta każdej z grup od 5. do 45. dnia życia otrzymywały mieszankę Prestarter Wigor 1 Plus. Zawartość żelaza w wymienionej paszy wynosiła 238 mg Fe/kg paszy. Prosięta z wszystkich grup w 3. dniu życia otrzymały domięśniowo dekstran żelaza, lecz dawka żelaza dla prosiąt z grupy I i II wynosiła 100 mg Fe/kg m.c., a dla prosiąt z grupy III i IV – 40 mg Fe/kg m.c. Dodatkowo prosięta z grupy III oraz IV otrzymywały hemoglobinę bydlęcą *per os*. Zawartość żelaza w paszy wzbogaconej o hemoglobinę, którą podawano wyłącznie prosiętom z grupy III i IV, wynosiła 612 mg Fe/kg paszy. Spożycie paszy w każdej z grup było na podobnym poziomie.

Wyniki badań krwi prosiąt wykazały, że parametry RBC (liczba krwinek czerwonych) prosiąt każdej z grup nie różniły się w sposób istotny statystycznie. Ponadto poziom żelaza w osoczu krwi świń obu ras był na zbliżonym poziomie, niezależnie od metody jego suplementacji. Świnię, u których stosowano suplementację mieszaną i które wykazywały stan lekko anemiczny na początku doświadczenia, charakteryzowały się korzystniejszymi parametrami RBC. Chociaż parametry RBC nie różniły się znacząco, to suplementacja jednoetapowa domięśniowa okazała się skuteczniejsza w zapobieganiu niedokrwistości. Po osiągnięciu masy ciała 110 kg, każde ze zwierząt poddano ubojowi i rozbiorowi tusz. W badaniu poubojowym stwierdzono, iż nerki, śledziona oraz wątroba świń, u których stosowano suplementację żelaza mieszaną, były mniej zasobne w ten pierwiastek. Z kolei mięśnie szkieletowe charakteryzowały się podobną zawartością tego pierwiastka w porównaniu do mięśni świń, u których stosowano suplementację jednoetapową. Najistotniejszym wnioskiem sformułowanym na podstawie tych badań było to, że świnię rasy wielka biała polska niezależnie

od sposobu suplementacji żelazem wykazują podobny potencjał wzrostowy, czego nie można powiedzieć o świnich linii syntetycznej 990, ponieważ suplementacja mieszana wpłynęła na obniżenie potencjału wzrostowego tych świń. Według autorów, zjawisko to wiąże się ze zwiększonym zapotrzebowaniem na żelazo zwierząt linii syntetycznej 990 (Szudzik i in. 2020).

Tempo wzrostu oraz rozwój prosiąt ssących jest bardzo ważnym etapem życia tych zwierząt. Im bardziej dostosowujemy poziom życia i żywienia prosiąt do ich potrzeb, tym lepsze efekty produkcyjne osiągają one w dalszych etapach rozwoju. Hipoteza badawcza zakładała, że dodatek hemoglobiny do mieszanki typu prestarter spowoduje poprawę tempa wzrostu prosiąt ssących. Celem prowadzonych badań było określenie podstawowych parametrów zootechnicznych odchovu prosiąt ssących żywionych mieszanką pełnoporcjową zawierającą dodatek hemoglobiny.

## Metodyka

Trwające 42 dni badania, obejmujące cały okres odchovu prosiąt ssących, przeprowadzono w chlewni towarowej produkującej trzodę chlewną w cyklu zamkniętym.

Materiał do badań stanowiły 94 prosięta, które pochodziły z ośmiu miotów uzyskanych od loch mieszańców  $F_1$  (wbp x pbz) inseminowanych nasieniem knura rasy pietrain. Lochy do badań były wybierane wyłącznie na podstawie terminu oproszenia. Mioty podzielono na dwie grupy (4 mioty w grupie kontrolnej i 4 mioty w grupie doświadczalnej), biorąc pod uwagę zastosowany schemat żywienia zwierząt:

- grupa kontrolna (K) – 47 prosiąt ssących dokarmianych od 8. dnia życia mieszanką pełnoporcjową typu prestarter;
- grupa doświadczalna (D) – 47 prosiąt ssących dokarmianych od 8. dnia życia mieszanką pełnoporcjową typu prestarter zawierającą w swoim składzie 2,49% hemoglobiny wieprzowej.

Na dwa dni przed porodem lochy umieszczone zostały w porodówce i otrzymywały jednakową mieszankę standardowo stosowaną w badanej chlewni. Pasza zadawana była ręcznie dwa razy dziennie, a dostęp do wody był nieograniczony dzięki zastosowaniu poidel smoczkowych. Doświadczenie przeprowadzono w czterech etapach. 04.05.2019 roku w gospodarstwie miały miejsce dwa oproszenia. Tego samego dnia dokonano ważenia prosiąt z grupy kontrolnej oraz z grupy doświadczalnej. Do ważenia prosiąt użyto wagi elektronicznej, a ważenie odbywało się z dokładnością do dwóch cyfr po przecinku. Te same czynności powtórzono w kolejnych dniach: 07.05.2019, 11.05.2019 i 17.05.2019 roku, w każdym z tych dni miały miejsce oproszenia dwóch loch – jeden miot był dołączony do grupy kontrolnej, a drugi do grupy doświadczalnej. Przez cały okres trwania doświadczenia prosięta miały nieograniczony dostęp do sutków lochy oraz do poidel miseczkowych. Zapewniono im te same warunki termiczno-wilgotnoś-

**Tabela 1. Zestawienie terminów narodzin, rozpoczęcia dokarmiania i zakończenia laktacji oraz liczebności prosiąt z grupy kontrolnej i doświadczalnej**

Cecha	Grupa kontrolna				Grupa doświadczalna			
	Miot 1	Miot 2	Miot 3	Miot 4	Miot 1	Miot 2	Miot 3	Miot 4
Data porodu	04,05	07,05	11,05	17,05	04,05	07,05	11,05	17,05
Liczebność miotu w 8. dniu życia	12	12	10	13	12	10	12	13
Data rozpoczęcia dokarmiania	12,05	15,05	19,05	25,05	12,05	15,05	19,05	25,05
Data zakończenia laktacji	16,06	19,06	23,06	29,06	16,06	19,06	23,06	29,06

Źródło: opracowanie własne.

ciowe. Wszystkie prosięta zostały poddane tym samym zabiegom zootechniczno-weterynaryjnym. Zwrócono szczególną uwagę, by zabiegi te odbywały się w określonym dniu życia prosiąt.

Dokarmianie mieszanką pełnoporcjową typu prestarter rozpoczęto w 8. dniu życia prosiąt. Daty porodów, rozpoczęcia dokarmiania prosiąt oraz zakończenia laktacji zestawiono w tabeli 1. Skład mieszanek doświadczalnych przedstawiono w tabeli 2. Mieszanka stosowana do dokarmiania prosiąt z grupy doświadczalnej wzbogacona była o dodatek hemoglobiny kosztem zmniejszenia udziału procentowego śrutę poekstrakcyjnej sojowej, w porównaniu do składu mieszanki podawanej prosiętom z grupy kontrolnej. Pozostałe komponenty mieszanki kontrolnej oraz doświadczalnej, a także ich udział procentowy w składzie mieszanek nie różniły się. Zastosowana w doświadczeniu suszona hemoglobina to produkt pochodzenia wieprzowego, wyprodukowany przez firmę BAS-Pol, oznakowany jako AP 301P/GS – wieprzowe. Materiał charakte-

**Tabela 2. Skład komponentowy (%) mieszanek pełnoporcjowych stosowanych w doświadczeniu**

Komponent	Mieszanka kontrolna	Mieszanka doświadczalna
Śruta pszenna	39,89	39,89
Śruta jęczmienna	36,89	36,89
Śruta poekstrakcyjna sojowa	12,46	9,97
MPU-Wipasz Piglet Premium	3,99	3,99
Hemoglobina	0,00	2,49
Serwatka w proszku	1,99	1,99
Mączka rybna	2,49	2,49
Olej sojowy	1,99	1,99
Zakwaszacz	0,30	0,30

Źródło: opracowanie własne.

ryzował się sypką konsystencją, ciemnobrązową barwą oraz mięsnym zapachem. Skład omawianego komponentu przedstawiono w tabeli 3.

Mieszanka pełnoporcjowa dla prosiąt dozowana była ręcznie do umieszczonych na ruszcie autokarmników firmy Polnet. Zawartość autokarmników była uzupełniana w miarę wyczerpywania się zawartości. Każdorazowo z autokarmnika usuwane były niewyjady oraz ewentualne zanieczyszczenia. Nie notowano ilości pobieranej paszy, lecz dwa razy dziennie kontrolowano stan napełnienia autokarmnika, by w miarę potrzeby uzupełnić zasobnik.

W dniu zakończenia laktacji, tj. w 42. dniu odchowu prosiąt, dokonano ponownego ważenia prosiąt. Zastosowano tę samą metodę ważenia, co w dniu ich narodzin. W tym dniu zakończono też badania, a prosięta odsadzone zostały przeniesione do sektora warchlaków.

**Tabela 3. Skład materiału paszowego – AP 301P/GS – wieprzowe**

Składnik	Zawartość
Białko min. [%]	92,00
Popiół maks. [%]	5,00
Chlor [%]	0,60
Fosfor [%]	0,35
Sód [%]	0,40
Potas [%]	1,10
Wapń [%]	0,02
Włókno surowe [%]	< 0,30
Tłuszcz surowy [%]	< 0,30
Energia strawna [kcal/kg]	4483,00
Energia metaboliczna [kcal/kg]	4270,00
Żelazo [ppm]	2700,00

Źródło: opracowanie własne.

## Wyniki i ich omówienie

W tabeli 4 przedstawiono liczbę prosiąt w badanych grupach, średnią liczbę prosiąt w jednym miocie w każdej z grup, średnią masę ciała prosiąt w dniu urodzenia, średnią masę ciała prosiąt w 42. dniu ich życia oraz średnie dobowe przyrosty masy ciała prosiąt w okresie od 1. do 42. dnia życia. Średnia liczba prosiąt w miocie w grupie kontrolnej i doświadczalnej była wyrównana i wynosiła odpowiednio: 11,75 i 11,70. W trakcie trwania badania nie zanotowano upadków badanych prosiąt.

Analiza statystyczna wykazała, że średnia masa ciała prosiąt należących do grupy kontrolnej i doświadczalnej w dniu urodzenia była wyrównana i wynosiła odpowiednio:

1,52 oraz 1,53 kg. Zbliżone wyniki w zakresie masy ciała prosiąt noworodków uzyskano w badaniach Milewski i in. (2016). Średnia masa ciała prosiąt z grupy A (♀ pbz x ♂ linia syntetyczna P76) oraz prosiąt z grupy B (♀ wbp x pbz x ♂ wbp) w dniu urodzenia wynosiła odpowiednio: 1,65 i 1,47 kg. Oznacza to, że średnia masa ciała prosiąt w dniu urodzenia w badaniach własnych była nieznacznie niższa w porównaniu do średniej masy ciała prosiąt z grupy A oraz nieznacznie wyższa w porównaniu do średniej masy ciała prosiąt z grupy B wyżej wspomnianego doświadczenia.

**Tabela 4. Średnia masa ciała i przyrosty dzienne badanych prosiąt**

Wyszczególnienie	Miary statystyczne	Grupa		Ogółem
		K	D	
Liczba prosiąt w grupie ogółem (szt.)	n	47	47	94
Liczba prosiąt w 1. miocie na początku badań (szt.)	$\bar{x}$	11,75	11,70	11,75
	s	1,259	1,258	1,165
	v	10,71	10,75	9,91
Masa ciała 1. prosięcia w 1. dniu życia (kg)	$\bar{x}$	1,52	1,53	1,53
	s	0,128	0,109	0,118
	v	8,42	7,12	7,71
Masa ciała 1. prosięcia w 42. dniu życia (kg) (odsadzenie)	$\bar{x}$	15,06 <sup>B</sup>	15,90 <sup>A</sup>	15,48
	s	0,448	0,521	0,641
	v	2,97	3,28	4,14
Przyrosty dzienne w okresie laktacji (g) (1.-42. dzień odchowu)	$\bar{x}$	322 <sup>B</sup>	342 <sup>A</sup>	332
	s	82,6	109,1	138,3
	v	25,65	31,90	41,66

Źródło: opracowanie własne.

Średnia masa ciała jednego prosięcia z grupy kontrolnej w 42. dniu życia, a więc w dniu odsadzenia lochy, wynosiła 15,06 kg, natomiast wartość tej cechy w przypadku prosiąt z grupy doświadczalnej – 15,90 kg. Średnia masa ciała prosiąt w 42. dniu życia w grupie doświadczalnej okazała się wysoko istotnie wyższa, w porównaniu do średniej masy ciała prosiąt z grupy kontrolnej. Różnica ta wynosiła 0,84 kg, co oznacza, że prosięta dokarmiane mieszanką pełnoporcjową typu prestarter z dodatkiem hemoglobiny charakteryzowały się masą ciała średnio o 0,84 kg wyższą niż prosięta dokarmiane mieszanką kontrolną bez dodatku hemoglobiny.

Milewska i in. (2016) podają, że średnia masa ciała 42-dniowych prosiąt w cytowanych już badaniach wynosiła 9,10 kg. Różnica pomiędzy średnią masą ciała prosiąt z grupy kontrolnej i grupy doświadczalnej w badaniach własnych a masą ciała prosiąt z doświadczenia Milewskiej i in. (2016) była bardzo znacząca i wynosiła odpowied-



nio 5,96 kg i 6,8 kg. Z kolei Eriksson (2006) analizowała zmiany masy ciała prosiąt w okresie od 1. do 9. tygodnia ich życia. W 6. tygodniu życia prosiąt ich średnia masa ciała wynosiła 14,9 kg. Podana masa ciała jest zbliżona do średniej masy ciała prosiąt w badaniach własnych.

W tabeli 4 przedstawiono także wyniki badanych prosiąt w zakresie ich tempa wzrostu w okresie trwania całego doświadczenia. Prosięta dokarmiane kontrolną mieszanką pełnoporcjową typu prestarter (grupa K) przyrastały średnio 322 g/dzień, a prosięta dokarmiane mieszanką z dodatkiem hemoglobiny (grupa D) – 342 g/dzień. Oznacza to, że średnie dzienne przyrosty masy ciała prosiąt z grupy doświadczalnej był o 20 g wyższe w porównaniu do wartości tej cechy zanotowanej w przypadku prosiąt z grupy kontrolnej, a różnica ta była wysoko istotna statycznie. Średni dzienny przyrost masy ciała prosiąt w okresie od 1. do 42. dnia ich życia w badaniach Milewskiej i in. (2016) wynosił średnio 178 g i był zdecydowanie niższy w stosunku do średniego dziennego przyrostu prosiąt obu grup w badaniach własnych. Przyrosty masy ciała prosiąt analizowali także Václavková i in. (2012), badając wpływ masę ciała prosiąt w dniu urodzenia na intensywność ich wzrostu w późniejszych etapach odchovu. Średni dzienny przyrost masy ciała prosiąt, których masa ciała w dniu urodzenia wynosiła więcej niż 1,5 kg w okresie od 1. do 28. dnia życia, wynosił tu średnio 309,52 g. Przyrost ten jest nieznacznie niższy niż średni przyrost masy ciała prosiąt badanych w niniejszym doświadczeniu, lecz przy porównywaniu tych wyników należy wziąć pod uwagę fakt, iż potencjał wzrostowy prosiąt zmienia się wraz z ich wiekiem.

## Wnioski

1. Masa ciała prosiąt przy urodzeniu była wyrównana w badanych grupach (K – 1,52 kg, D – 1,53 kg) i nie różniła się istotnie statystycznie.
2. Stwierdzono, że prosięta z grupy doświadczalnej, dokarmiane mieszanką pełnoporcjową typu prestarter z dodatkiem 2,49% hemoglobiny, w dniu odsadzenia charakteryzowały się wysoko istotnie wyższą masą ciała, w porównaniu do masy ciała prosiąt z grupy kontrolnej (odpowiednio 15,90 kg w grupie D i 15,06 kg w grupie K).
3. Stwierdzono, że dodatek hemoglobiny do mieszanki dla prosiąt z grupy doświadczalnej spowodował wyższe średnie tempo ich wzrostu w porównaniu do prosiąt z grupy kontrolnej (odpowiednio 342 g/dzień w grupie D i 322g/dzień w grupie K).
4. Dodatek hemoglobiny w żywieniu prosiąt ssących może być brany pod uwagę jako czynnik efektywnie stymulujący ich wzrost.

## Bibliografia

- Bugnacka D. 2019. Stymulowanie pobrania paszy przez prosięta. *Hodowca trzody chlewnej*, 11-12:10–21.
- Eriksson M. 2006. Behaviour and growth of piglets weaned at 5 and 7 weeks of age in an organic environment. *Sveriges Lantbruksuniversitet SLU*, 278.
- Kozera W. 2020. Aktualne problemy i nowe wyzwania w zakresie żywienia świń. W: *Podstawowe zagadnienia w zakresie chowu i hodowli trzody chlewnej – aktualne problemy i nowe wyzwania* (red. Pawłowski R.). Warmińsko-Mazurski Ośrodek Doradztwa Rolniczego z siedzibą w Olsztynie, Olsztyn, 64–66.
- Lee S.H., Shinde P., Choi J., Park M., Ohh S., Kwon I.K., Pak S.I., Chae B.J. 2008. Effects of dietary iron levels on growth performance, hematological status, liver mineral concentration, fecal microflora, and diarrhea incidence in weanling pigs. *Biol Trace Elem Res*, doi: 10.1007/s12011-008-8209-5.
- Lipiński K. 2010. Możliwości pokrycia potrzeb energetycznych prosiąt ssących. *Trzoda chlewna*, 4:34–38.
- Milewska W., Falkowski J., Karpiesiuk K., Kozera W., Bugnacka D. (2016). Wpływ masy ciała prosiąt przy urodzeniu na tempo ich wzrostu do odsadzenia w wieku 5 lub 7 tygodni. *Wiadomości Zootechniczne*, R. LIV, 1: 19–26.
- Minakowski W., Weinder S. 2005. (red.) *Biochemia kręgowców*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Nowacka M., Piątkowski S. (red.) 2016. *ABC w odchowie prosiąt*. Kujawsko-Pomorski Ośrodek Doradztwa Rolniczego w Minikowie, Minikowo.
- Staroń R., Lipiński P., Lenartowicz M., Bednarz A., Gajowiak A., Smuda E., Krzeptowski W., Pieszka M., Karolonek T., Hamza I., Swinkels D., Van Swelm Rachel P.L., Starzyński R.R. 2017. Dietary hemoglobin rescues young piglets from severe iron deficiency anemia: Duodenal expression profile of genes involved in heme iron absorption. *PLoS One* 12(7), doi:10.1371/journal.pone.0181117.
- Szostak B. 2017. Enzymy paszowe w żywieniu świń. *Trouw i MY*, 4(52):4–7.
- Szudzik M., Lipiński P., Jończy A., Mazgaj R., Pieszka M., Kamyczek M., Smuda E., Starzyński R.R. 2020. Long-term Effect of Split Iron Dextran/Hemoglobin Supplementation on Erythrocyte and Iron Status, Growth Performance, Carcass Parameters, and Meat Quality of Polish Large White and 990 Line Pigs. *Biological Trace Element Research*, doi.org/10.1007/s12011-019-01950-w.
- Václavková E., Daněk P., Rozkot M. 2012. The influence of piglet birth weight on growth performance. *Research in pig breeding*, 6(1): 1–3.

## Abstract

### THE EFFECT OF HEMOGLOBIN ADDITION TO PRESTARTER DIET ON SUCKLING PIGLETS REARING

The aim of the research was to determine the basic zootechnical parameters of rearing suckling piglets fed with a complete mixture containing hemoglobin. A total of 94 piglets from 8 litters were tested in the experiment. 4 litters were assigned to both the control and experimental groups.

The piglets were fed from the 8th day of their life. Piglets from the control group received the standard mixture, and the piglets from the experimental group received the same mixture, but additionally containing 2.49% hemoglobin in its composition. The birth weight of piglets and their body weight on the end of lactation, that is on the 42nd day of life, were recorded. On this basis, the mean daily weight gain of piglets from the control and experimental groups was calculated over the period 1-42 days. The mean body weight of the piglets on the day of birth was balanced in both groups and amounted to 1.52 kg in the control group and 1.53 kg in the experimental group, respectively. It was found that the body weight of piglets fed the prestarter mix with hemoglobin on day 42 was significantly higher compared to the body weight of piglets fed with the same mixture without hemoglobin, and the difference between the average body weight of piglets from the experimental group and the control was 0.84 kg. The average daily weight gain of piglets in the experimental group was 342 g and was significantly higher compared to the average daily weight gain of piglets in the control group, which was 322 g. The results of the experiment showed that the addition of hemoglobin to the complete prestarter mix for suckling piglets improves the parameters their rearing.

**Słowa kluczowe:** hemoglobina, dokarmianie prosiąt, przyrost dzienny masy ciała

**Keywords:** hemoglobin, feeding piglets, daily weight gain

**Julia Matusiak**

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Naukowe Koło Hodowców Trzody Chlewnej

Opiekun: dr inż. Dorota Bugnacka

## **WPŁYW PŁODNOŚCI RZECZYWISTEJ I KOLEJNEGO CYKLU ROZPŁODOWEGO LOCHY NA DŁUGOŚĆ OKRESU JAŁOWIENIA**

### **Wstęp**

Chów i hodowla trzody chlewnej mają bardzo duże znaczenie w produkcji zwierzęcej, o czym świadczy największy udział wieprzowiny w strukturze światowego rynku mięsa (Zawadzka i Skarżyńska 2019). Aby osiągać jak najlepsze wyniki produkcyjne, stale prowadzi się doskonalenie genetyczne świń. Prace selekcyjno-hodowlane odbywają się nie tylko w zakresie cech tucznych i rzeźnych, ale również w zakresie cech użytkowości rozplodowej. Ich wysoka wartość stanowi bowiem podstawę sukcesu w produkcji trzody chlewnej, a wysoka płodność i plenność loch są czynnikami decydującymi o efektywności produkcji (Rekiel i in. 2019).

Na cykl rozplodowy lochy składa się: ciąża, laktacja oraz okres jałowienia (zasuszenia). Długość ciąży jest cechą stałą dla gatunku i nie ma możliwości jej skrócenia. Zatem aby poprawić wskaźniki rozrodu, należy regulować długość okresu laktacji i jałowienia (Segura-Correa i in. 2014). Ostatnia składowa cyklu rozplodowego, ale w praktyce najważniejsza, to okres jałowienia. Jest to czas od odsadzenia prosiąt do momentu, kiedy locha zostanie zapłodniona. W stadach o wysokim poziomie cech rozplodowych trwa on zwykle 3–7 dni, jednak nie da się dokładnie przewidzieć jego długości. W celu uzyskania jak najlepszych wyników produkcyjnych, właściciele ferm powinni dążyć do tego, aby okres zasuszenia loch trwał jak najkrócej. Możliwe jest to jedynie dzięki zapewnieniu zwierzętom odpowiednich warunków bytowych, ich dokładnej obserwacji i pielęgnacji (Jasek 2007). Z praktyki produkcyjnej wiadomo także, że odchowanie przez lochę bardzo licznego miotu często wpływa na wydłużenie okresu jałowienia.

Zagadnienie długości okresu jałowienia u loch jest tematem trudnym, wymagającym prowadzenia jeszcze wielu badań.

## Cel

Zależność pomiędzy płodnością rzeczywistą a długością okresu jałowienia nie jest częstym tematem prac naukowych. Celem niniejszej pracy była analiza wpływu liczby prosiąt żywo urodzonych w miocie (płodności rzeczywistej) oraz kolejnego cyklu rozplodowego na długość okresu jałowienia u loch.

## Materiał i metody

Badania przeprowadzono w gospodarstwie rolnym należącym do Pana Kamila Komorowskiego, które położone jest w województwie mazowieckim, w gminie Płonia-wy-Bramura w miejscowości Węgrzynowo. Gospodarstwo specjalizuje się w chowie trzody chlewnej rasy pbz w cyklu zamkniętym. Lochy stadne inseminowane są nasieniem knurów rasy pbz, zakupywanym w Stacji Unasienniania Loch Mazowieckiego Centrum Hodowli i Rozrodu Zwierząt Sp. z o.o. w Łowiczu.

Badaniami objęto łącznie osiem loch rasy polska biała zwisłoucha (pbz). Analizowano 38 cykli rozplodowych tych loch. Wyodrębniono cztery grupy doświadczalne w zależności od liczby prosiąt żywo urodzonych w miocie: I. < 10 prosiąt – 10 miotów, II. 10–12 prosiąt – 9 miotów, III. 13–15 prosiąt – 11 miotów, IV. >15 prosiąt – 8 miotów.

Analizy wykonano na podstawie dokumentacji stada podstawowego z okresu lat 2016–2021 prowadzonej przez właściciela chlewni. Analizowano następujące cechy: liczba prosiąt urodzonych w miocie (ogółem, żywo i martwo), liczba prosiąt odsadzonych z miocie, śmiertelność prosiąt, kolejność cyklu rozplodowego (kolejność urodzonego miotu), długość okresu jałowienia loch.

Otrzymane dane opracowano statystycznie wyliczając wartość średniej, odchylenia standardowego i zmienności dla badanych cech. Wykonano jednoczynnikową analizę wariancji w układzie nieortogonalnym. Istotność różnic pomiędzy badanymi grupami określono za pomocą testu Duncana. W opracowaniu statystycznym wykorzystano program STATISTICA 13.1 PL.

## Wyniki i ich omówienie

W tabeli 1 przedstawione zostały dane dotyczące średniej wartości analizowanych cech użyteczności rozplodowej w badanej populacji loch.

Średnia liczba prosiąt żywo urodzonych w jednym miocie (płodność rzeczywista) była zadowalająca i wynosiła 12,47 szt. Po trwającej 8 tygodni laktacji odsadzano śred-

**Tabela 1. Charakterystyka wybranych cech użytkowości rozplodowej badanych loch**

Wyszczególnienie	Miary statystyczne		
	$\bar{x}$	S	V
Średnia liczba prosiąt żywo urodzonych w jednym miocie (płodność rzeczywista) (szt.)	12,47	3,923	31,45
Średnia liczba prosiąt odsadzonych z jednego miotu (szt.)	9,29	2,837	30,54
Średnia śmiertelność w odchowcie (%)	23,12	16,678	72,14
Średnia długość okresu jałowienia (dni)	17,37	14,485	83,39

Źródło: opracowanie własne.

nio 9,29 szt. prosiąt w jednym miocie. Płodność rzeczywista była zbliżona do wartości tej cechy osiągananej przeciętnie w Polsce dla loch pbz (12,50 szt.), z kolei liczba prosiąt odsadzonych w miocie była znacznie niższa od średniej (11,54 szt.) uzyskanej w kraju. (Wyniki oceny trzody chlewnej 2019).

Średnia śmiertelność prosiąt kształtowała się na poziomie 23,12%, i można ją uznać za bardzo wysoką. Jak podaje Bugnacka i in. (2019), śmiertelność w granicach 5–10% jest dopuszczalna w produkcji towarowej, jednak ta wynosząca 15% i więcej jest krytyczna, gdyż wskazuje na konieczność szczególnego zainteresowania się problemem oraz natychmiastowe podjęcie działań minimalizujących straty prosiąt w odchowcie.

Analizując średnią długość okresu jałowienia u badanych loch, można stwierdzić, że cecha ta kształtowała się na niezadowalającym poziomie. Okres jałowienia wynoszący średnio 17,37 dnia znacząco przewyższa optimum (5–7 dni jałowienia) wynikające z fizjologii tych zwierząt (Tummaruk i in. 2010).

W tabeli 2 przedstawiono dane dotyczące długości okresu jałowienia w zależności od płodności rzeczywistej badanych loch. Stwierdzono, że najwięcej było miotów o wysokiej (13–15 prosiąt) oraz bardzo niskiej (<10 prosiąt) liczebności. Jednak osiem analizowanych miotów było bardzo licznych (hiperplodność), co świadczy o dużym zróżnicowaniu wartości tej cechy rozplodowej w danej chlewni.

**Tabela 2. Wpływ płodności rzeczywistej badanych loch na ich długości okresu jałowienia po odsadzeniu od prosiąt**

Grupa doświadczalna (płodność rzeczywista) (szt.)		Liczba miotów	Miary statystyczne		
			$\bar{x}$	S	V
1.	< 10	10	20,9	13,31	63,7
2.	10–12	9	18,0	16,59	92,2
3.	13–15	11	16,0	17,08	106,8
4.	> 15	8	14,1	10,79	76,6

Źródło: opracowanie własne.

Z przeprowadzonej analizy (tab. 2) wynika także, że liczba prosiąt żywo urodzonych w miocie (płodność rzeczywista) nie miała istotnego statystycznie wpływu na długość okresu jałowienia u loch. Jednakże zanotowano tendencję, że najkrócej jałowiły te lochy, które urodziły powyżej 15 prosiąt w miocie, zaś najdłużej te, które urodziły poniżej 10 prosiąt w miocie. Falkowski i Groszkowska (1994) w swoich badaniach również nie zaobserwowali zależności pomiędzy płodnością rzeczywistą a długością okresu jałowienia u loch. Z kolei Jarczyk (1991) stwierdził, że lochy, które odchowują większą liczbę prosiąt (>9 prosiąt) w miocie, jałowią dłużej. Autor ten stwierdził jednak, że zależności te mogą wynikać z kondycji i stanu odżywienia loch przed zapłodnieniem. Mabry i in. (2006) również wykazali istotnie statystyczną zależność pomiędzy płodnością rzeczywistą a długością okresu jałowienia.

Wyniki otrzymane w badaniach własnych mogły być spowodowane dużą zmiennością (63,7–106,8) badanej cechy oraz organizacją sektora rozrodu w tej chlewni, która jest obiektem tradycyjnym. Wpływ na zmienność wyników mogła mieć także długość laktacji badanych loch, która trwała aż 8 tygodni. Według Mabry'ego i in. (2016), zbyt długi okres laktacji wpływa niekorzystnie na wyniki użytkowości rozplodowej i ogólnie na wyniki produkcyjne. Według cytowanych autorów, najlepszy czas na odsadzenia loch od prosiąt to 22–27 dzień laktacji.

**Tabela 3. Wpływ płodności rzeczywistej badanych loch na śmiertelność prosiąt w okresie laktacji**

Grupa doświadczalna (płodność rzeczywista) (szt.)		Liczba miotów	Miary statystyczne		
			$\bar{x}$	S	V
1.	< 10	10	14,55 <sup>A</sup>	15,939	109,5
2.	10 –12	9	18,30	11,366	62,1
3.	13–15	11	27,58	10,047	36,4
4.	> 15	8	34,98 <sup>B</sup>	22,541	64,4

A, B – różnice wysoko istotne statystycznie

Źródło: opracowanie własne.

W badaniach (tab. 3) potwierdzono zależność pomiędzy liczbą prosiąt żywo urodzonych w miocie (płodnością rzeczywistą loch) a śmiertelnością prosiąt w okresie ich odchovu przy lochach (różnice wysoko istotne statystycznie). Najmniejszą śmiertelność odnotowano wśród loch rodzących mniej niż 10 prosiąt w miocie, zaś największą w przypadku loch bardzo płodnych (płodność rzeczywista >15). Liczniejsze mioty charakteryzują się niższą średnią masą ciała rodzących się prosiąt, co ma wpływ na dalszy ich wzrost i rozwój, a tym samym na liczbę prosiąt odchowanych z jednego miotu (Rekiel i in. 2014). Badania Bocian i in. (2011) wskazały, że w miotach loch o wysokiej płodności, wśród prosiąt o niższej masie ciała (<1,2 kg), występowała znacznie wyż-

sza śmiertelność (36,73%). W odchowie prosiąt ssących największe straty występują w pierwszym tygodniu życia. W analizowanej chlewni główną przyczyną upadków prosiąt były przygniecenia, rzadziej biegunki. Wskazuje to na zaniedbania ze strony właściciela oraz złą organizację sektora odchovu prosiąt.

**Tabela 4. Wpływ kolejnego cyklu rozplodowego na długość okresu jałowienia badanych loch**

Kolejny cykl rozplodowy	Liczba miotów	Miary statystyczne		
		$\bar{x}$	s	V
1.	8	29,6	15,18	309,8
2.	7	14,6	12,10	82,8
3.	5	7,2	1,30	18,1
4.	5	22,2	22,21	100,0
5.	4	16,0	12,25	7,8
6.	3	20,7	12,70	61,3
7.	2	6,5	0,70	10,7
8.	2	7,0	0,00	0,0
9.	2	10,5	6,36	60,6

Źródło: opracowanie własne.

W tabeli 4 przedstawiono dane dotyczące długości okresu jałowienia loch w zależności od kolejnego cyklu rozplodowego (od 1. do 9. miotu). Nie wykazano wpływu kolejności cyklu rozplodowego (wieku lochy) na długość okresu jałowienia. Najkrótsze okresy jałowienia odnotowano u loch po odchowaniu 3. (7,2 dnia), 7. (6,5 dnia) i 8. (7 dni) miotu. Zdecydowanie najdłużej jałowiły młode lochy po odsadzeniu 1. miotu (29,6 dnia), co potwierdzają także badania Tantasuparak i in. (2001). Długim jałowieniem odznaczały się także lochy po odchowaniu 4. (22,2 dnia) oraz 6. (20,7 dnia) miotu. W badaniach Szostaka (2006) notowano najkrótsze okresy jałowienia u loch w okresie od 3. do 7. cyklu rozplodowego. Z kolei w badaniach Falkowskiego i Groszkowskiej (1994) stwierdzono, że okres jałowienia u loch wydłużał się od 2. do 7. cyklu rozplodowego, zaś od 8. do 10. uległ z kolei znacznemu skróceniu.

W badaniach wykazano wpływ kolejnego cyklu rozplodowego (tab. 5) na liczbę prosiąt żywo urodzonych. Najniższą płodność rzeczywistą zanotowano u loch pierwiastek (9,25 prosięcia), zaś najwyższą u loch w 5. cyklu rozplodowym (17,0 prosiąt). Lochy do 5. miotu rodziły coraz więcej prosiąt, w miocie 6. i 7. płodność była wciąż wysoka, ale od 6. cyklu rozplodowego liczba prosiąt żywo urodzonych w miocie konsekwentnie zmniejszała się wraz z wiekiem loch. Schwarz i in. (2009) również wykazali w swoich badaniach, że płodność rzeczywista loch statystycznie istotnie zwiększała się do 5. miotu, a od miotu 6. liczba prosiąt żywo urodzonych była coraz niższa. Grudniewska (1998) twierdzi, że wraz z wiekiem loch wzrasta także liczba prosiąt martwych w miocie.



**Tabela 5. Wpływ kolejnego cyklu rozplodowego na liczbę prosiąt żywo urodzonych**

Kolejny cykl rozplodowy	Liczba miotów	Miary statystyczne		
		$\bar{x}$	s	V
1.	8	9,25 <sup>B</sup>	3,240	35,0
2.	7	11,14	2,116	18,9
3.	5	13,40	5,029	37,5
4.	5	12,60	3,049	24,2
5.	4	17,00 <sup>A</sup>	2,160	12,7
6.	3	15,67 <sup>A</sup>	3,055	19,5
7.	2	15,50 <sup>A</sup>	3,535	22,8
8.	2	12,00	0,000	0,0
9.	2	11,00	7,072	64,3

A, B-różnice wysoko istotne statystycznie

Źródło: opracowanie własne.

**Tabela 6. Wpływ kolejnego cyklu rozplodowego na śmiertelność prosiąt**

Kolejny cykl rozplodowy	Liczba miotów	Miary statystyczne		
		$\bar{x}$	s	V
1.	8	20,14	15,003	74,5
2.	7	13,33	15,545	116,6
3.	5	20,52	3,532	17,2
4.	5	24,21	17,588	72,6
5.	4	43,19	28,083	65,0
6.	3	29,81	16,234	54,5
7.	2	25,43	3,323	13,1
8.	2	29,17	17,678	60,6
9.	2	14,59	2,948	20,2

A, B-różnice wysoko istotne statystycznie

Źródło: opracowanie własne.

Nie wykazano istotnego wpływu kolejnego cyklu rozplodowego (wieku lochy) na śmiertelność prosiąt (tab. 6), co mogło być spowodowane niewielką liczebnością materiału badawczego oraz wysoką zmiennością badanej cechy. Schwarz i in. (2009) wykazali, że wraz z wiekiem lochy zmienia się wartość wielu cech rozplodowych, w tym zwiększa się śmiertelność prosiąt. Mimo iż w pracy nie wykazano zależności pomiędzy badanymi cechami, stwierdzić należy, że śmiertelność prosiąt w badanym obiekcie była bardzo wysoka. Najwyższą śmiertelność prosiąt zanotowano u loch w 5. cyklu rozplodowym, wynosiła ona 43,19%, zaś najniższą w 2. miocie badanych loch (13,33%), jednak wciąż jest to śmiertelność wysoka. We wszystkich pozostałych cyklach rozplod-

dowych śmiertelność prosiąt wynosiła ponad 20%. Wyniki takie świadczą o bardzo dużym problemie w sektorze porodu oraz laktacji i wskazują na konieczność natychmiastowego szukania przyczyn tak wysokich upadków prosiąt oraz podjęcia jak najszybszych działań naprawczych.

## Wnioski

1. Nie wykazano wpływu liczby prosiąt żywo urodzonych w miocie (płodności rzeczywistej) na długość okresu jałowienia badanych loch.
2. W badaniach wykazano zależność pomiędzy liczbą prosiąt żywo urodzonych w miocie (płodnością rzeczywistą loch) a śmiertelnością prosiąt w okresie ich odchowu przy lochach. Wysoko istotnie niższą śmiertelność odnotowano w miotach loch rodzących mniej niż 10 prosiąt, w porównaniu do loch bardzo płodnych (płodność rzeczywista >15).
3. Nie wykazano wpływu kolejnego cyklu rozplodowego (wieku lochy) na długość okresu jałowienia loch. Jednakże zanotowano tendencję, że najdłuższym okresem jałowienia odznaczały się lochy pierwiastki.
4. Stwierdzono wpływ kolejnego cyklu rozplodowego na liczbę prosiąt żywo urodzonych w miocie. Zanotowano różnice wysoko istotnie statystycznie pomiędzy 1. a 5., 6. i 7. miotem. Zauważono również tendencję, że płodność rzeczywista loch wzrastała do 5. miotu, a w 6. i kolejnych miotach była coraz niższa.
5. Nie odnotowano istotnego wpływu kolejnego cyklu rozplodowego (wieku lochy) na śmiertelność prosiąt.
6. Biorąc pod uwagę powyższe, należy zalecić, aby w celu poprawy wyników użytkowości rozplodowej loch w obiekcie, w którym prowadzono badania, skrócić długość laktacji (do 28–35 dni) oraz wprowadzić rozwiązania zmniejszające śmiertelność prosiąt.

## Bibliografia

- Bocian M., Jankowiak H., Grajewska S., Kapelańska W., Włodarski W. 2011. Wpływ masy ciała prosiąt przy urodzeniu na efekty ich odchowu i wyniki tuczu. *Roczniki Naukowe Zootechniki*, 38: 189–195.
- Bugnacka D., Kozera W., Rząsa A. 2019. Odchów prosiąt ssących i odsadzonych. W: *Hodowla i chów świń* (red. Rekiel. A., Szwaczkowski T., Eckert R.). Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego, Poznań, 377–420.

- Falkowski J., Groszkowska A., 1994. Obserwacje nad wpływem kolejnego oproszenia, sezonu i liczby prosiąt odsadzonych w miocie na długość jałowienia loch. *Acta Academiae Agriculturae Technicae Olstenensis. Zootechnica*, 40: 55–61
- Grudniewska B. (red.). 1998. Hodowla i użytkowanie świń. Wydawnictwo ART, Olsztyn.
- Jarczyk A. 1991. Użytkowość rozplodowa loch córek i wnuczek pochodzących od matek (babeek) o różnej płodności z uwzględnieniem wpływu innych cech i czynników. *Acta Academiae Agriculturae Technicae Olstenensis. Zootechnica. Supplementum D*, 34: 1–47.
- Jasek S. 2007. Czynniki warunkujące wysoką produktywność loch. *Hodowca Trzody Chlewnej*, 1: 16–20.
- Mabry, J.W., Culbertson, M.S., Reeves D. 1996. Effects of lactation length on weaning-to-first-service interval, first-service farrowing rate, and subsequent litter size. *Swine Health and Production*, 4: 185–188.
- Rekiel A., Kondracki S., Więcek J., Wysokińska A., Rząsa A. 2019. Rozród świń. W: *Hodowla i chów świń* (red. Rekiel A., Szwaczkowski T., Eckert R.). Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego, Poznań, 151–216.
- Rekiel, A., Bartosik, J., Więcek, J., Batorska, M., Kuczyńska, B., Łojek, A. (2014). Effect of piglet birth weight on selected characteristics of pork. *Annals of Animal Science*, 14(4): 967–975.
- Rekiel, A., Bartosik, J., Więcek, J., Batorska, M., Kuczyńska, B., Łojek, A. (2014). Effect of piglet birth weight on selected characteristics of pork. *Annals of Animal Science*, 14(4): 967–975.
- Schwarz T., Nowicki, J., Tuz R. 2009. Reproductive performance of polish large white sows in intensive production – effect of parity and season. *Annals of Animal Science*, 9(3): 269–277.
- Segura-Correa, J.C., Herrera-Camacho, J., Pérez-Sánchez, R.E., Gutiérrez-Vázquez E. 2014. Effect of lactation length, weaning to service interval and farrowing to service interval on next litter size in a commercial pig farm in Mexico. *Livestock Research for Rural Development*, 26(1): 12.
- Tantasuparuk W., Lundeheim N., Dalin A.-M., Kunavongkritt A., Einarsson S. 2001. Weaning-to-service interval in primiparous sows and its relationship with longevity and piglet production. *Livestock Production Science*, 69(2): 155–162.
- Tummaruk P., Tantasuparuk W., Techakumphu M., Kunavongkritt A. 2010. Influence of repeat-service and weaning-to-first-service interval on farrowing proportion of gilts and sows. *Preventive Veterinary Medicine*, 96(3-4): 194–200.
- Wyniki oceny trzody chlewnej w 2019 roku. Polski Związek Hodowców i Producentów Trzody Chlewnej „POLSUS”. 2020. Warszawa.
- Zawadzka D., Skarżyńska A. 2019. Ekonomiczne aspekty chowu świń. W: *Hodowla i chów świń* (red. Rekiel A., Szwaczkowski T., Eckert R.). Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego, Poznań, 655–681.

## Abstract

### THE INFLUENCE OF NUMBER OF PIGLETSBORN AND THE PARITY ON THE LENGTH OF THE WEANING-TO-SERVICEINTERVAL OF SOW

The aim of research was analysis the effect of number of piglets born a live and the parity on the length of the weaning-to-service interval of sows. Material consisted 8 sows of the Polish Landrace breed (used within the years 2016–2021). 38 reproduction cycles were analyzed. Four experimental groups were distinguished in dependence on number of piglets born alive of lit-

ter: I. < 10 piglets – 10 litters, II. 10–12 piglets – 9 litters, III. 13–15 piglets – 11 litters, IV. > 15 piglets – 8 litters.

There was no influence of number of piglets born alive and the parity on the length on the weaning-to-service interval of sows. The tendency that weaning-to-service interval of primiparous sows was longer compared to multiparous sows, was noticed. The correlation between number of piglets born alive and mortality of piglets was found. A significantly lower mortality of piglets was noticed in sows with fewer than 10 piglets per litter, compared to hyperprolific sows (>15 piglets). The influence of the parity on the number of piglets born alive per litter was found. A highly statistically significant differences between 1. and 5., 6., 7. litter was noticed. The tendency that number of piglets born alive of sows increased to the 5th litters, and in the 6th and the following litters was lower, was observed. It should be recommended to improve the performance of the reproduction traits of sows in the facility where the study was conducted, to shorten the lactation length (to 28-35 days) and to introduce measures to reduce piglet mortality.

**Słowa kluczowe:** płodność rzeczywista, cykl rozplodowy, okres jałowienia, użytkowanie rozplodowe

**Keywords:** number of piglets born alive, reproduction cycle, wean-to-service interval, reproduction traits