

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
Wydział Chemii



NAUKA I PRZEMYSŁ

lubelskie spotkania studenckie



WYDAWNICTWO UNIWERSYTETU MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
Wydział Chemii

NAUKA I PRZEMYSŁ

lubelskie spotkania studenckie

Praca zbiorowa
pod redakcją prof. dr hab. Doroty Kołodyńskiej



WYDAWNICTWO UNIwersYTETU MARIi CURIE-SKŁODOWSKIEJ
LUBLIN 2024

Recenzenci:

dr hab. inż. Jerzy Gęga, prof. PCz
dr Ewelina Grabias-Blicharz
dr hab. inż. Agata Jakóbiak-Kolon, prof. PŚ
dr hab. Małgorzata Teresa Kaczmarek, prof. UAM
dr hab. Monika Kalinowska, prof. PB
prof. dr hab. Joanna Karpińska
dr hab. Łukasz Kłapiszewski, prof. PP
dr hab. inż. Joanna Kluczka, prof. PŚ
dr Joanna Kończyk
dr Magdalena Myga-Nowak, prof. UJD
dr hab. inż. Magdalena Regel-Rosocka, prof. PP
dr Ilona Sadok
prof. dr hab. inż. Mariola Saternus
prof. dr hab. Renata Siedlecka
dr hab. Karolina Wieszczycka, prof. PP
dr hab. Dariusz Błażej Wyrzykowski, prof. UG

Opracowanie redakcyjne i skład:

Dr hab. Agnieszka Gładysz-Płaska

Wydrukowano z materiałów powierzonych przez Autorów,
bez opracowania redakcyjnego wykonanego
przez Wydawnictwo UMCS.

© Wydawnictwo UMCS, Lublin 2024

ISBN 978-83-227-9806-5

WYDAWNICTWO UNIwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej
20-031 Lublin, ul. Idziego Radziszewskiego 11
tel. 81 537 53 04
www.wydawnictwo.umcs.eu
e-mail: sekretariat@wydawnictwo.umcs.lublin.pl

DZIAŁ HANDLOWY

tel./fax 81 537 53 02, 81 537 53 03
e-mail: wydawnictwo@umcs.eu
Księgarnia internetowa: www.wydawnictwo.umcs.eu

Szanowni Młodzi Naukowcy,

Zapraszamy Was do odkrycia fascynującego świata nauki, który kryje przed Wami bogactwo możliwości rozwoju intelektualnego i zawodowego. Jesteśmy przekonani, że Wasza pasja i zaangażowanie będą kluczowe dla ciągłego postępu w Waszych dziedzinach naukowych.

W dzisiejszym dynamicznym świecie rozwój nauki i przemysłu idą w parze. Wasze badania i odkrycia mają potencjał przekształcania teorii w praktyczne innowacje, które wpływają na jakość życia i środowisko. To właśnie Wy, młodzi naukowcy, macie wyjątkową zdolność do kreowania nowatorskich rozwiązań i wspierania postępu technologicznego.

Dlatego z radością prezentujemy Wam najnowsze osiągnięcia naukowe, badawcze i techniczne w formie monografii. Mamy nadzieję, że tematyka prezentacji spełni Wasze oczekiwania i inspiruje do pogłębiania wiedzy, prowadzenia fascynujących dyskusji oraz wymiany poglądów na temat najnowszych osiągnięć naukowych.

Życzę Wam przyjemnej lektury i satysfakcji płynącej z eksploracji nowych perspektyw.

Dorota Kołodyńska

SPIS TREŚCI

S. Szalkowska, B. Tarasiuk, B. Podkościelna	10
Synteza, modyfikacja i struktura polimerowych mikrosfer ze skrobią	
M. Maciejewska, M. Grochowicz	14
Funkcjonalizacja mikrosfer polimerowych liniowym polimerem RAFT	
P. Konopka, K. Koroniak-Szejn, R. Jastrząb	18
Synteza wybranych peptydów oraz fluorowanych peptydomimetyków w celu scharakteryzowania ich potencjału jako stabilizatorów nanocząstek srebra	
A. Kiczor, P. Mergo	21
Synteza kropek kwantowych CdSe w dwóch rozpuszczalnikach o różnych temperaturach wrzenia do zastosowań w technologii światłowodów polimerowych	
M. Józwicki, W. Józwicka, P. Mergo	25
Optymalizacja procesu wytwarzania połączenia trwałego pomiędzy światłowodem standardowym a światłowodem z otworem powietrznym	
M. Grzesiak, K. Poturaj, M. Makara, P. Mergo	29
Porównanie technologii domieszkowania szkła krzemionkowego fluorem i borem	
P. Banaszek, M. Podgórski	33
Charakterystyka polimerów dynamicznych zawierających estry fosforanowe	
A. Dowbysz, M. Samsonowicz, B. Kukfisz, J. Pešta, V. Mózer, F. Wald	38
Ocena cyklu życia laminatów poliestrowo-szklanych modyfikowanych wybranymi środkami uniepalniającymi	
A. Wawszczak, M. Czemińska, A. Jarosz-Wilkolazka, D. Kołodyńska	42
Analiza termiczna i morfologiczna matryc biopolimerowych z alginianu wapnia	
M. Tyszko, M. Majewska	46
Tolerancja kadmu przez szczepy <i>Pseudomonas luteola</i> wyizolowane z nieskażonych gleb	
J. Tarasiuk, B. Kowalczyk, K. Pastuszak, M. Jurak, M. Palusińska-Szys	50
Szlaki syntezy fosfatydylocholiny u bakterii z rodzaju <i>Legionella</i>	
E. Pluta, W. Jędrzej, K. Gdula, M. Kutyla, M. Trytek	54
Skryning grzybów mezofilnych w reakcjach katalizowanych przez lipazy	
W. Piątek-Golda, M. Osińska-Jarozuk, J. Sulej	58
Zastosowanie różnych czynników sieciujących do immobilizacji dehydrogenazy celobiozowej	

K. Pastuszak, M. Jurak, J. Tarasiuk, M. Palusińska-Szysz	62
Porównanie właściwości modelowych błon bakteryjnych wybranych gatunków <i>Legionella</i>	
M. Przybyło, K. Namroży, A. Konieczna, N. Mierzwa, W. Noskowicz, D. Rochowska, M. Krasowska, E. Wąsewicz, E. Szewczyk, Y. Vozdihan, W. Bielecka, K. Wlizio	66
Szczep grzybowy <i>Pleurotus djamor</i> jako nowe źródło egzopolisacharydów	
K. Młynarczyk, B. Podkościelna, M. Jaszek, M. Osińska-Jaroszuk	70
Badania stabilności termicznej i potencjału przeciwdrobnoustrojowego kompozytów zawierających modyfikatory nieorganiczne	
K. Łuszczak, K. Zamłyńska, A. Choma	74
Badania poziomu chlorofilu w celu określenia wpływu bakterii endofitycznych na rośliny	
O. Kwiatkowska, I. Jonik, I. Sadok, K. Rachwał	78
Skład mikrobiologiczny i chemiczny napoju kombucha w zależności od temperatury procesu fermentacji	
N. Kutyrjewa-Nowak, A. Leszczuk, A. Zdunek	82
Metody molekularne i mikroskopowe w badaniach ściany komórkowej	
M. Kassem, A. Gluszyńska, J. Kosman	86
Zastosowanie dnazymów a aktywność peroksydazy w badaniu oddziaływań G-kwadruplkes/ligand	
D. Jaglenc, J. Kutkowska	91
Metody oznaczania wrażliwości na antybiotyki	
S. Graba, N. Jaszek, A. Batyra, M. Kutyla, M. Trytek	95
Skrining grzybów psychrofilnych w reakcjach katalizowanych przez lipazy	
K. Gorzkiewicz, J. Kutkowska	99
Wyzwania związane z opornością bakterii <i>Enterobacteriaceae</i> na antybiotyki β -laktamowe	
B. Fokt, M.A. Karaś	103
Ramnolipidy – wpływ metod produkcji na ich strukturę i aktywność biologiczną	
J. Dziedzic, K. Tokarska, M. Marek-Kozaczuk, W. Sokolowski, S. Wdowiak-Wrobel	107
Charakterystyka bakterii z rodzaju <i>Leuconostoc</i> i <i>Gluconobacter</i> wyizolowanych produktów spożywczych	

J. Zawada, I. Kruczek, D. Stoś, M. Kutyla, M. Trytek	111
Wpływ rodzaju induktora na aktywność katalityczną grzybni nitkowatej w reakcji estryfikacji alkoholi terpenowych	
G. Tyniecka	115
Kompleksy kobaltu i niklu z kwasem fenoksyoctowym	
K. Stachowiak, M. Zabiszak, R. Jastrząb	119
Badanie reakcji kompleksowania w układzie urydyno-5'-difosfoglukoza, jony miedzi(II)	
P. Sadowska, R. Bregier-Jarzębowska, R. Jastrząb	123
Wpływ pH na tworzenie związków kompleksowych w układzie binarnym jonów miedzi(II) z adrenaliną w roztworze wodnym	
J. Frymark, M. Zabiszak, R. Jastrząb	127
Potencjometryczne oraz spektroskopowe badania związków kompleksowych ampicyliny	
J. Barańska, K. Koroniak-Szejn, M. Zabiszak, R. Jastrząb	131
Synteza i właściwości kompleksujące pochodnych porfiryny	
B. Wawrzaszek, B. Charmas, K. Jedynek	135
Wpływ modyfikacji mechanochemicznej na strukturę i właściwości biowęgla z odpadów organicznych	
S. Kukowska, P. Nowicki, I. Komaniecka, K. Szewczuk-Karpisz	139
Substancje polimerowe jako modyfikatory zdolności sorpcyjnych węgla aktywnego otrzymanego ze skórek pomarańczy wobec jonów metali	
P. Krzewski, D. Fila, Z. Hubicki	143
Wpływ procesu sieciowania na właściwości sorpcyjne hydrożeli alginianowych	
M. Grzelka, E. Grabias-Blicharz, B. Płaska, M. Majdan, A. Maximeko, A. Gładysz-Płaska	147
Wykorzystanie synchrotronu w badaniach kompleksów uranu i toru z ligandami zawierającymi fosfor na różnych stopniach utlenienia	
K. Kowalska, M. Barczak, T.J. Bandosz, P. Borowski	151
Adsorpcja wybranych farmaceutyków na funkcjonalizowanych powierzchniach grafenowych	
M. Gęca, M. Wiśniewska, P. Nowicki	155
Zastosowanie węgla aktywnych uzyskanych z prekursorów roślinnych do adsorpcji poli(kwasu akrylowego) oraz polietylenoiminy	
A. Sokołowski, B. Czech	159
Wpływ dodatku biowęgla do gleby na ilość ftalanów pobieranych przez rośliny	

M. Parcheta	163
Właściwości termiczne kopomilerów diwinylobenzenu i metakrylanu glicydylu przed i po sorpcji błękitu metylenowego	
K. Zinkowska, Z. Hubicki, G. Wójcik	167
Badanie przydatności sorbentu impregnowanego do usuwania jonów metali szlachetnych	
K. Morlo, J. Dobrzyńska, R. Dobrowolski	171
Poszukiwania skutecznych metod usuwania pozostałości leków przeciwnowotworowych na bazie platyny ze ścieków szpitalnych	
A. Wawruch, M. Grabarczyk	175
Woltamperometryczna metoda oznaczania Pb(II) przy użyciu elektrody sitodrukowanej modyfikowanej nanorurkami i błonką miedzi	
S. Stefanek, G. Janusz	178
Oczyszczanie oksydazy alkoholowej z wykorzystaniem metod chromatograficznych	
K. Staniec, K. Tyszczyk-Rotko, A. Keller, D. Gorylewski	180
Wykorzystanie czujników sitodrukowanych w woltamperometrycznej procedurze oznaczania związku przeciwwirusowego - acyklowiru	
N. Żuk, E. Grabias-Blicharz, M. Pizoń, J. Flieger	184
Zastosowanie metody nanocząsteczkowej SNAPC (Silver Nanoparticle Antioxidant Capacity) w ocenie aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów roślinnych.	
K. Wojdat, J. Karasiewicz, J. Krawczyk	189
Badanie właściwości objętościowych wybranych funkcjonalizowanych siloksanów	
K. Wrześcińska, J. Czerwiński	193
Oznaczenie cytostatyków metaloorganicznych w ściekach szpitalnych z wykorzystaniem HPLC-ICP-MS	
A.N. Pawlak, A. Nosal-Wiercińska	197
Rodzaj surfaktantów a kinetyka elektroredukcji jonów bizmutu w roztworach elektrolitów wodno-organicznych: nowe spojrzenie na zastosowanie reguły „CAP-PAIR” w obliczu wyzwań współczesnego świata	
K. Oźga, I. Sadok	201
Analityczne wykorzystanie reakcji estryfikacji na przykładzie oznaczania wybranych metabolitów szlaku kinureninowego metodą LC-MS	
E. Wlazłowska, M. Grabarczyk, M. Fialek	205
Elektrody bizmutowe jak czujniki elektrochemiczne do oznaczania cyny w próbkach rzeczywistych	

M. Nesterak, A. Swatek, I. Komaniecka	209
Identyfikacja metabolitów przy użyciu chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas	
K. Morawska, C. Wardak, M. Wardak, M. Czichy, P. Janasik	213
Nowe rozwiązania w elektrodach jonoselektywnych ze stałym kontaktem – polimery perinonowe jako warstwa mediacyjna	
K. Koronkiewicz, M. Joka-Yildiz, M. Kalinowska, G. Świdorski	217
Analiza termograwimetryczna modyfikowanych wycieków z jabłek	
A. Keller, K. Tyszczyk-Rotko, D. Gorylewski, K. Staniec	221
Woltamperometryczne procedury oznaczania kurkuminy	
D. Gorylewski, K. Tyszczyk-Rotko, K. Staniec, A. Keller	224
Wykorzystanie czujnika na bazie mezoporowatych węgla aktywnych impregnowanych diklofenakiem w woltamperometrycznej analizie związku arsenoorganicznego roksarsonu	
K. Sieczkowska, M.A. Karaś	228
Wpływ metody otrzymywania substancji biologicznie aktywnych z liści <i>Jacaranda mimosaeifolia</i> na zawartość wybranych związków	
B. Płaska, I. Łuczowska, A. Danilczuk	232
Porównanie fluorodeoksyglukozy fluoru-18 oraz galu 68-DOTATATE na przykładzie pacjenta z guzem neuroendokrynym	
W. Pakaszewski, A. Szabelska, A. Wójcik, B. Podkościelna	236
Modyfikacja i badania fizykochemiczne kompozytów na bazie akrylanów do zastosowań w protetyce	
W. Józwicka, G. Świetlicka, M. Józwicki, P. Malinowska, M. Goliszek, W. Sofińska-Chmiel	240
Identyfikacja chemiczna kamieni nerkowych	
N. Gruszkiewicz, B. Płaska, K. Szwed, J. Mandziuk-Nizińska	245
Badania przesiewowe a średnia długość życia ludzi	
W. Gawryś, A. Zajac	249
Potencjał zastosowania nanocząsteczek złota w celu poprawy skuteczności terapii fotodynamicznej w leczeniu nowotworów	
J. Czerwonka, A. Wiater, M. Kutyla, K. Tyśkiewicz, G. Florkowki, M. Trytek	253
Otrzymywanie ekstraktów z wycieków winogron do zastosowania w profilaktyce próchnicy zębów	

W. Jarosz, K. Zamłyńska	258
Znaczenie obrazowania techniką rezonansu magnetycznego (MRI, MR) w diagnostyce nowotworów	
A. Biedrzycka, E. Skwarek	262
Różnokierunkowe zastosowanie kompozytów na bazie hydroksyapatytu	
K. Kowalska, V. Paientko, E. Skwarek	266
Kompozyty bazujące na glince zielonej, hydroksyapatycie, krzemionce, TiO ₂ , ZnO oraz pyłku pszczelim jako nowe nośniki witaminowe	
A. Wawszczak, J. Bąk, R. Panek, D. Kołodyńska	269
Filmy alginianowe do zastosowań środowiskowych	
J. Górską, J. Sitarski, J. Nowosad, J. Tomasik, A. Gryboś, A. Bartkowska, W. Płaska	273
Skład pokarmu wydry w otulinie poleskiego parku narodowego	
K. Burdzy, M. Suchora	276
Analiza wioślarkowa (Cladocera) osadów jeziornych - chitynowy wehikuł czasu paleolimnologia	
A. Bilokinna, R. Łopucki, K. Zieliński, M. Skowronek, I. Sadok	280
Mapa występowania antybiotykoopornych szczepów bakterii na placach zabaw w Lublinie	
K. Gołębiowska, E. Grządka	284
Mikro- i nanoplastiki w środowisku – zagrożenia, analiza i sposoby usuwania	
A. Krzyszczak-Turczyn, B. Czech, I. Sadok	288
Wpływ matrycy na usuwanie związków perfluorowanych z próbek środowiskowych	
J. Nowosad, J. Tomasik, A. Gryboś, J. Górską, J. Sitarski, A. Bartkowska, W. Płaska	292
Ocena wpływu zanieczyszczeń drogowych na jakość wody w zbiornikach odwadniających drogę ekspresową S17	
D. Sobociński, R. Zagrodnik	296
Glicerol jako surowiec do produkcji bioetanolu w procesie fermentacyjnym	
Spis autorów	300

SYNTEZA, MODYFIKACJA I STRUKTURA POLIMEROWYCH MIKROSFER ZE SKROBIĄ

S. SZALKOWSKA, B. TARASIUK, B. PODKOŚCIELNA, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Chemii, Instytut Nauk Chemicznych, Katedra Chemii Polimerów, ul. Gliniana 33, 20-614 Lublin

Abstrakt: Celem niniejszej pracy jest synteza polimerowych mikrosfer na bazie octanu winylu (OW) i dimetakrylanu etylenu (DME) z dodatkiem skrobi rozpuszczalnej lub skrobi modyfikowanej kwasem borowym. Przy użyciu analizy ATR/FT-IR potwierdzono strukturę uzyskanych mikrosfer oraz modyfikowanej skrobi. Wykonano również zdjęcia mikrosfer za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM).

Wprowadzenie: Skrobia to polisacharyd, który powstaje pośrednio w procesie fotosyntezy i z tego powodu jest ona określana jako surowiec odnawialny. Skrobia stanowi główne źródło energii dla ludzi na całym świecie i jest produkowana jako węglowodan zapasowy w roślinach. Najważniejszymi jej źródłami dla ludzi są różnorodne zboża, kłącza, korzenie i bulwy. Skrobia magazynowa jest produkowana w amyloplastach jako dyskretne granulki o różnej morfologii w różnych roślinach, od okrągłych, owalnych lub wydłużonych do płaskich, soczewkowatych lub wielościennych. Granulki skrobi składają się prawie w całości z dwóch głównych polisacharydów, a mianowicie amylozy i amylopektyny. Oba składają się z łańcuchów α -(1,4)-D-glukofuranozylowych, które są wzajemnie połączone poprzez wiązania α -(1,6)-D-glikozydowe, tworząc w ten sposób rozgałęzienia w polimerach. Chociaż amyloza jest tradycyjnie uważana za liniową, rozgałęzione cząsteczki amylozy zawierają niewiele rozgałęzień, ale zarówno rozgałęziona, jak i liniowa amyloza mają długie łańcuchy z kilkuset lub nawet tysiącami jednostek glukozydowych, podczas gdy amylopektyna jest silnie rozgałęziona i ma stosunkowo krótkie łańcuchy. Krótkie łańcuchy amylopektyny tworzą podwójne helisy, które krystalizują i przyczyniają się do półkryształicznej natury granulek skrobi. W większości "normalnych" granulek skrobi amylopektyna stanowi główny składnik wagowy, podczas gdy amyloza stanowi 15-30%; istnieje jednak wiele wyjątków. Skrobie woskowe, nazwane tak ze względu na woskowy wygląd bielma w zbożach woskowych zboża woskowe, nie zawierają amylozy lub zawierają jej bardzo mało. Ze względu na zdolności przekształcania właściwości oraz szerokiej gamy dostępnych modyfikacji, skrobia znajduje zastosowanie we wszystkich sferach życia. Wraz z rozwojem technologicznym wzrasta jej wykorzystanie oraz zapotrzebowanie [1,2,3]. W ramach realizacji badań wykonano syntezę, określono strukturę i potwierdzono sferyczny kształt polimerowych mikrosfer ze skrobią.

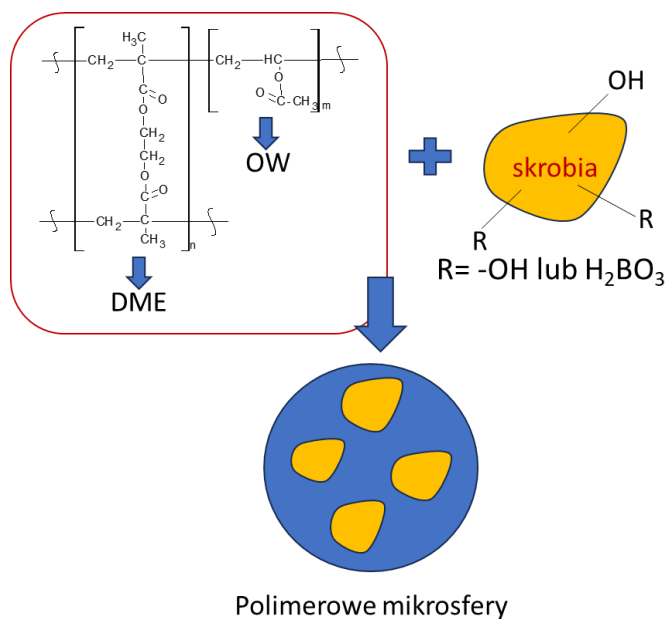
Część eksperymentalna: Rozpuszczalną skrobię modyfikowano mechanochemicznie z kwasem borowym ucierając substraty dokładnie w moździerzu, a następnie ogrzewano mieszaninę przez 20 min. w temp. 95°C. Operację powtórzono pięciokrotnie. Mikrosfery polimerowe otrzymano metodą polimeryzacji emulsyjnej stosując jako jedną z faz roztwór wodny poli(alkoholu winylowego) i chlorku wapnia. Natomiast drugą fazą była mieszanina monomerów: octan winylu (OW) i dimetakrylan etylenu (DME), inicjatora

polimeryzacji – α, α' -azobis(izobutyronitryl) w ilości 1,1% w stosunku do monomerów i rozpuszczalnej skrobi lub skrobi modyfikowanej kwasem borowym, w alkoholu benzylowym. Kopolimeryzację prowadzono przez 10 godzin w temperaturze 78-85°C. Otrzymane mikrosfery przemyto 1000 ml wody destylowanej i następnie suszono w temperaturze 85°C do stałej wagi. Otrzymano kształtne mikrosfery o wymiarach ϕ w granicach 35 - 160 μm . Skład otrzymanych mikrosfer polimerowych przedstawiono w Tabeli 1.

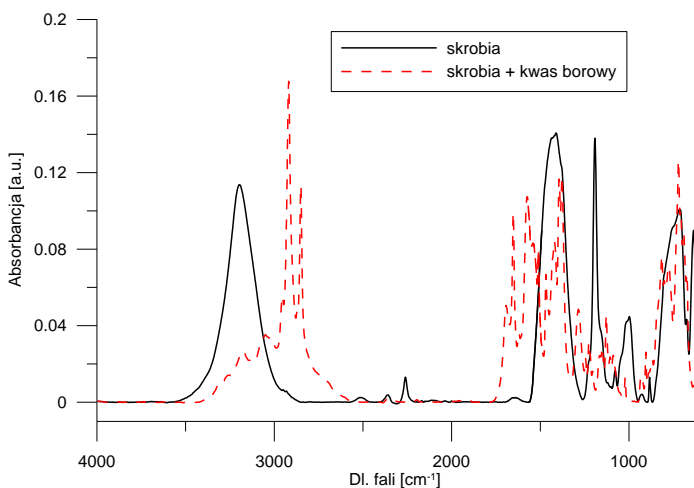
Tabela 1. Skład mikrosfer polimerowych.

Nr	OW [g]	DME [g]	Skrobia [g]	Skr-H ₂ BO ₃ [g]
1	4,30	9,90	-	-
2	4,30	9,90	3,55	-
3	4,30	9,90	-	3,55
4	4,30	9,90	-	2,13

Na rysunku 1 przedstawiono fragment struktury kopolimeru tworzący główną część mikrosfery.

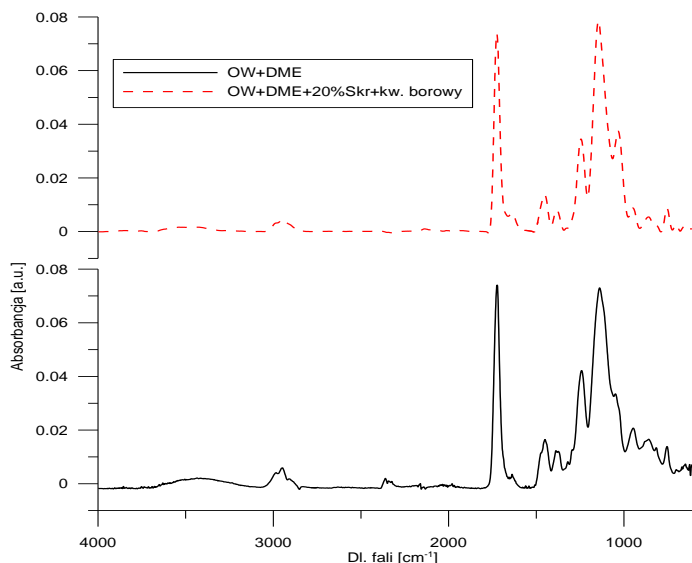


Rys. 1. Proponowany fragment struktury kopolimeru OW-DME.

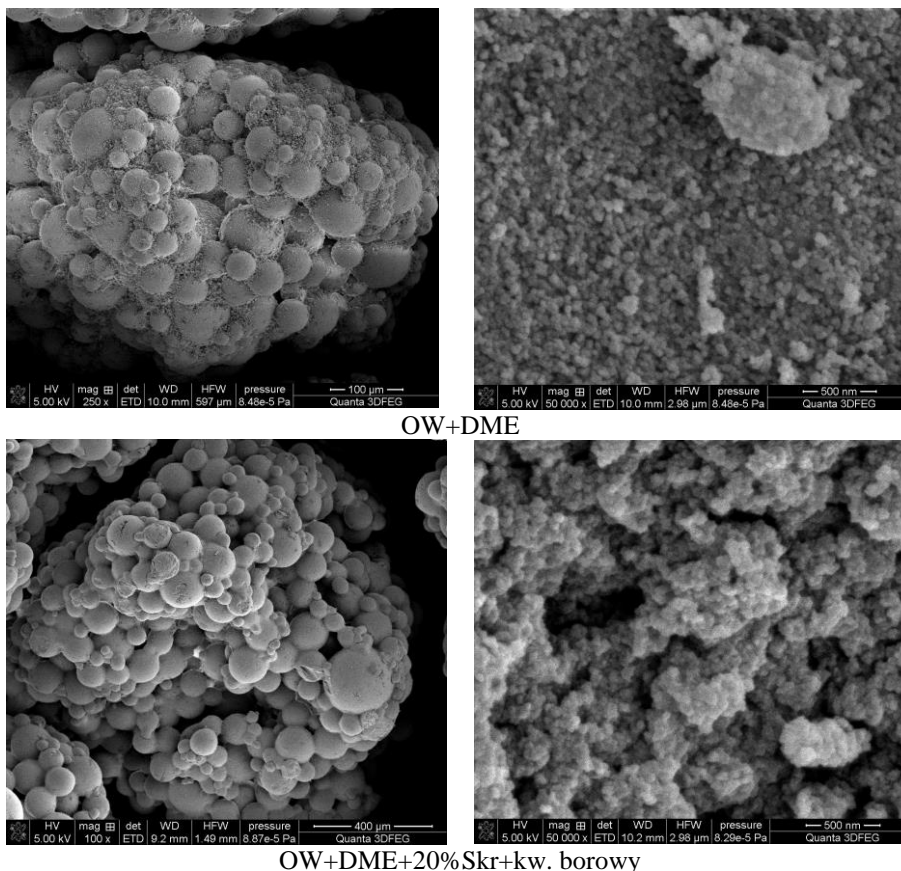


Rys. 2. Widmo ATR-FTIR dla skrobi przed i po modyfikacji kwasem borowym.

Na rysunku 2 przedstawiono widmo ATR-FTIR dla skrobi przed i po modyfikacji kwasem borowym. W zakresie 3500-3000 cm⁻¹ obserwuje się praktycznie zanik pasma pochodzącego od grupy -OH oraz pojawienie się nowych sygnałówm.in. od grup -CH₂ co potwierdza prawidłowy przebieg modyfikacji. Na rysunku 3 przedstawione są widma dla otrzymanych kopolimerów. W tym przypadku nie obserwujemy znaczących różnic w przebiegu widm, jedynie widoczne jest zmniejszenie się intensywności pasm pochodzących od grup -OH.



Rys. 3. Widmo ATR-FTIR dla kopolimeru OW+DME oraz kopolimeru z modyfikowaną skrobią.



Rys. 4. Zdjęcia SEM badanych materiałów.

W celu potwierdzenia sferycznego kształtu mikrosfer wykonane zostały zdjęcia przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) (Rys. 4).

Wnioski: Przy użyciu szybkiej i efektywnej metody (mechanochemii) otrzymano skrobię modyfikowaną kwasem borowym. Następnie, stosując polimeryzację suspensyjną otrzymano polimerowe mikrosfery na bazie octanu winylu i dimetakrylanu etylenu z 20 lub 15%-owym dodatkiem skrobi i/lub modyfikowanej kwasem borowym. Z wykorzystaniem techniki ATR/FT-IR potwierdzono strukturę otrzymanych materiałów. W kolejnym etapie badań otrzymane materiały zastosowane zostaną jako adsorbenty barwnych związków organicznych, które pomogą ustalić czy modyfikacja, przyniosła korzystne efekty.

Literatura:

1. T. Oniszczuk, S. Muszyński, A. Kwaśniewska, *Przem. Chem.*, 94 (2015) 1752.
2. J.I. Enrione, S.E. Hill, J.R. Mitchell, *J. Agricult. Food Chem.*, 55 (2007) 2956.
3. T. Jiang, Q. Duan, J. Zhu, H. Liu, L. Yu, *Adv. Ind. Engin. Polym. Res.*, 3 (2020) 8.

FUNKCJONALIZACJA MIKROSFER POLIMEROWYCH LINIOWYM POLIMEREM RAFT

M. MACIEJEWSKA, M. GROCHOWICZ, UMCS, Wydział Chemii, Katedra Chemii Polimerów, ul. Gliniana 33, 20-614 Lublin

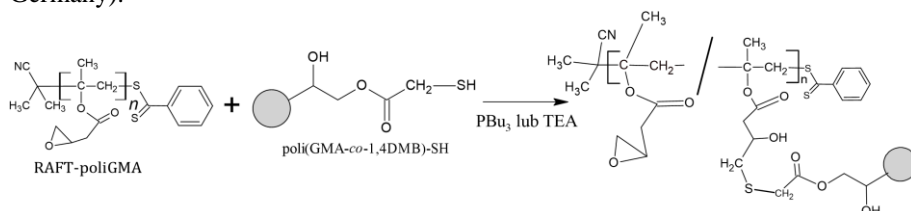
Abstrakt: W pracy przedstawiono metodę funkcjonalizacji mikrosfer polimerowych za pomocą liniowego polimeru. Mikrosfery na bazie metakrylanu glicydydu (GMA) oraz środka sieciującego: 1,4-dimetakryloiloksybenzenu (1,4DMB) otrzymano za pomocą polimeryzacji jednokrotnego spęczniania, a następnie poddano procesowi funkcjonalizacji z wykorzystaniem liniowego poli(metakrylanu glicydydu) (poliGMA). Strukturę chemiczną otrzymanych polimerów potwierdzono przy użyciu spektroskopii FTIR z wykorzystaniem techniki osłabionego całkowitego odbicia (ATR) oraz spektroskopii Ramana. Dodatkowo zbadano właściwości termiczne otrzymanych materiałów.

Wprowadzenie: Mikrosfery polimerowe ze względu na różnorodność właściwości można stosować do sorpcji metali ciężkich czy też jako sorbenty w wypełnieniach chromatograficznych. Funkcjonalizację mikrosfer polimerowych można prowadzić na drodze modyfikacji chemicznej czy też bezpośredniej syntezy z monomerów zawierających grupy funkcyjne [1-3]. W celu wprowadzenia grup funkcyjnych do struktury mikrosfer można wykorzystać także łańcuchy polimerowe otrzymane za pomocą kontrolowanych żyjących metod polimeryzacji rodnikowej. Zastosowanie polimeryzacji z addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem łańcucha (RAFT) umożliwia otrzymanie polimerów o wąskim rozrzucie średnich mas molowych oraz pozwala na wprowadzenie funkcjonalności na końcu łańcucha polimerowego. Polimeryzacja RAFT opiera się na wykorzystaniu odwracalnego przeniesienia łańcucha w wyniku reakcji ze związkiem ditiokarbonylowym. Etap inicjacji i terminacji przebiegają tak samo jak w tradycyjnej polimeryzacji rodnikowej [4].

W pracy przedstawiono syntezę mikrosfer polimerowych funkcjonalizowanych liniowym poliGMA w środowisku tributylfosfiny (PBu_3) lub trietyloaminy (TEA). Następnie scharakteryzowano strukturę chemiczną oraz właściwości termiczne otrzymanych materiałów polimerowych.

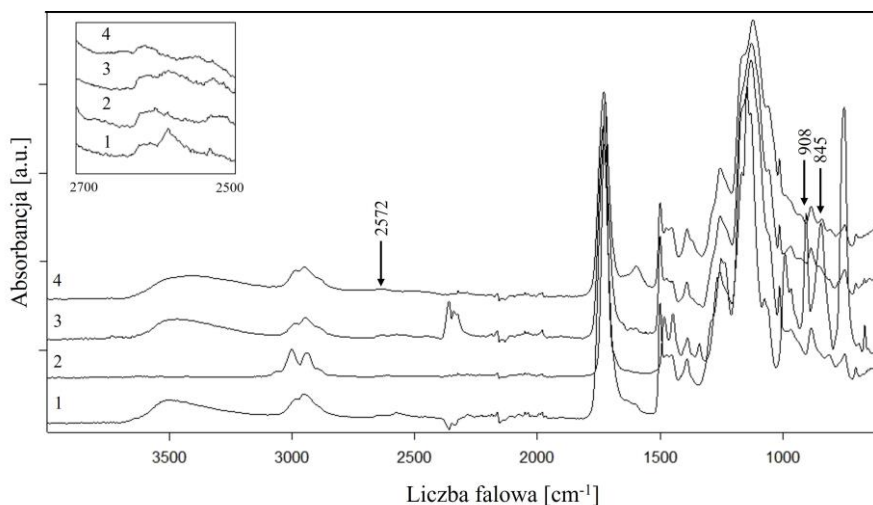
Część eksperymentalna: Mikrosfery polimerowe otrzymano z wykorzystaniem monomeru funkcyjnego GMA oraz monomeru sieciującego 1,4DMB za pomocą polimeryzacji jednokrotnego spęczniania. Następnie na powierzchnię mikrosfer wprowadzono grupy tiolowe na drodze otwierania pierścienia oksiranowego za pomocą kwasu tioglikolowego [5]. Szczepienie poliGMA ($M_n = 6800$ Da) na powierzchni mikrosfer poli(GMA-co-1,4DMB)-SH przeprowadzono w środowisku tetrahydrofuranu, w obecności katalitycznych ilości PBu_3 lub TEA (Rys.1). Reakcję szczepienia prowadzono w atmosferze ochronnej azotu w temperaturze otoczenia w stanie ciągłego mieszania (150 rpm) przez 5 godzin. Widma FTIR potwierdzające strukturę chemiczną badanych polimerów otrzymano wykorzystując spektrometr FTIR Tensor 27 wyposażony w przystawkę ATR (Bruker, Niemcy). Analiza Ramana została wykonana za pomocą mikroskopu Via Reflex Raman (Renishaw, UK). Badanie właściwości termicznych wykonano za pomocą

analizy termogravimetrycznej przy użyciu urządzenia STA 449 F1 Jupiter (Netzsch, Germany).



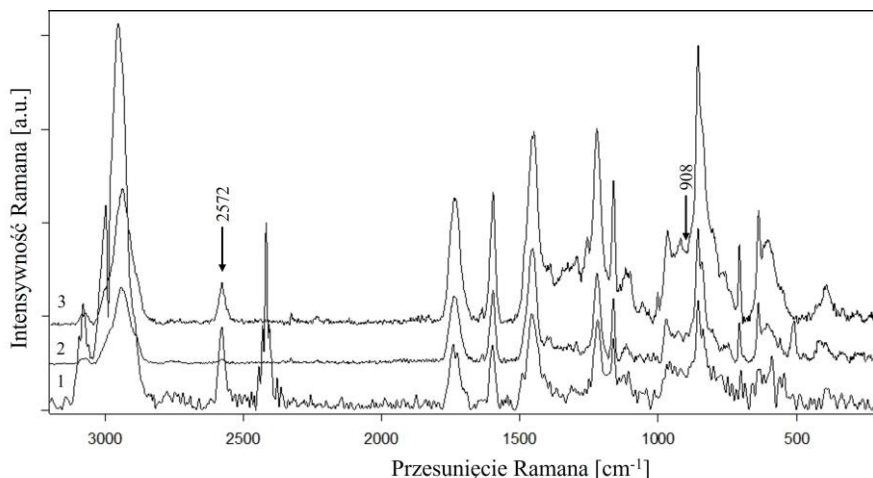
Rys.1. Schemat funkcjonalizacji mikrosfer polimerowych za pomocą polimeru liniowego poliGMA.

Wyniki: Strukturę chemiczną otrzymanych polimerów potwierdzono przy użyciu spektroskopii FTIR/ATR oraz Ramana. Widma dla otrzymanych polimerów przedstawiono na Rys. 2 i 3. Na widmach FTIR widoczne są zmiany w zakresie $800\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ związane z drganiami pierścienia oksiranowego. Wyjściowe mikrosfery poli(GMA-co-1,4DMB)-SH nie zawierają w swojej strukturze ugrupowań oksiranowych, natomiast w wyniku reakcji szczepienia poliGMA grupy oksiranowe zostały wprowadzone na ich powierzchni. Świadczy o tym pojawiające się na widmie FTIR dla polimerów szczepionych pasmo przy 845 cm^{-1} . Dodatkowo na widmach Ramana widoczne jest też pasmo przy 908 cm^{-1} wynikające z drgania pierścienia oksiranowego. Ponadto na widmach FTIR i Ramana obserwuje się zmiany intensywności pasma przy 2572 cm^{-1} pochodzącego od drgań grupy -SH. Grupa tiolowa obecna w strukturze mikrosfer wyjściowych została wykorzystana w reakcji otwierania pierścienia oksiranowego w poliGMA. Dlatego też na widmach mikrosfer funkcjonalizowanych w środowisku TEA pasmo przy 2572 cm^{-1} całkowicie zanikło, a w przypadku użycia PBu_3 obserwuje się spadek intensywności tego pasma.



Rys.2. Widma FTIR/ATR dla poli(GMA-co-1,4DMB)-SH (1), RAFT-poliGMA (2), RAFT-poliGMA-poli(GMA-co-1,4DMB) z PBu_3 (3), RAFT-poliGMA-poli(GMA-co-1,4DMB) z TEA (4).

Właściwości termiczne polimerów określono za pomocą analizy termogravimetrycznej (TG). W tabeli 1 podano temperatury 5% i 50% ubytku masy ($T_{5\%}$, $T_{50\%}$), temperatury maksymalnego ubytku masy (T_{\max}) oraz odpowiadające im ubytki masy (Δm). Krzywe TG i DTG przedstawiono na Rys. 4.

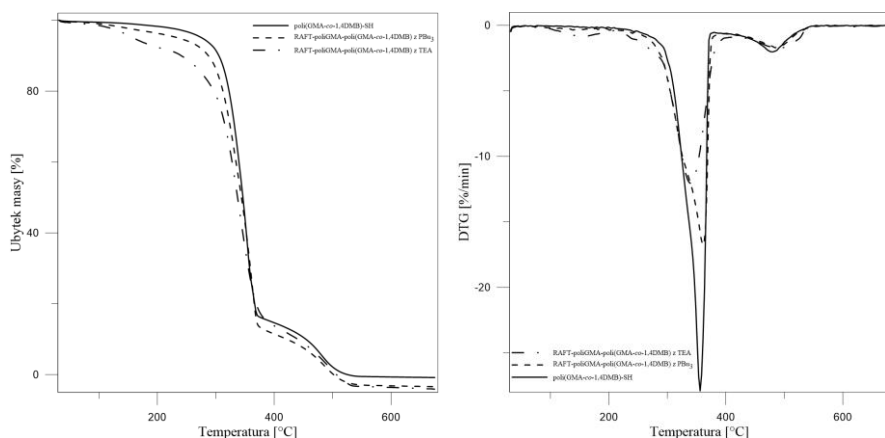


Rys. 3. Widma Ramana dla poli(GMA-co-1,4DMB)-SH (1), RAFT-poliGMA-poli(GMA-co-1,4DMB)-SH z TEA (2), RAFT-poliGMA-poli(GMA-co-1,4DMB)-SH z PBU₃ (3).

Tabela 1. Dane TG i DTG dla otrzymanych polimerów.

Nazwa próbki	$T_{5\%}$ [°C]	$T_{50\%}$ [°C]	$T_{\max 1}$ [°C]	Δm_1 [%]	$T_{\max 2}$ [°C]	Δm_2 [%]
RAFT-poliGMA-poli(GMA-co-1,4DMB)-SH z PBU ₃	236	344	361	88	485	12
RAFT-poliGMA-poli(GMA-co-1,4DMB)-SH z TEA	159	337	340	78,8	491	16,4
poli(GMA-co-1,4DMB)-SH	276	347	356	84,4	479	15,6

Z przebiegu krzywych DTG wynika, że degradacja termiczna mikrosfer wyjściowych i szczepionych przebiega w dwóch etapach. Stabilność termiczna poli(GMA-co-1,4DMB)-SH wynosi 276°C, o czym świadczy wartość $T_{5\%}$, natomiast po funkcjonalizacji polimerem liniowym stabilność termiczna spada. Pierwsze maksimum rozkładu obserwuje się dla mikrosfer przed i po funkcjonalizacji w zakresie 340-360°C przy ubytku masy w granicach 80-90%. Natomiast drugie maksimum obserwowane jest w zakresie 480-490°C z ubytkiem masy od 12-16%.



Rys. 4. Krzywe TG i DTG dla poli(GMA-*co*-1,4DMB)-SH, RAFT-poliGMA-poli(GMA-*co*-1,4DMB)-SH z TEA oraz RAFT-poliGMA-poli(GMA-*co*-1,4DMB)-SH z PBU₃ w atmosferze powietrza.

Wnioski: Stosując reakcję otwierania pierścienia oksiranowego przez grupy tiolowe otrzymano mikrosfery polimerowe funkcjonalizowane liniowym poliGMA, co zostało potwierdzone za pomocą spektroskopii FTIR/ATR oraz Ramana. Wykazano, że reakcja ta przebiega z większą wydajnością w przypadku zastosowania TEA jako katalizatora. Zbadano również stabilność termiczną otrzymanych polimerów. Materiały charakteryzują się dwustopniowym procesem degradacji, o czym świadczą krzywe DTG. Stabilność termiczna mikrosfer szczepionych poliGMA jest mniejsza niż mikrosfer wyjściowych, co jest spowodowane mniejszą stabilnością termiczną polimeru liniowego.

Literatura:

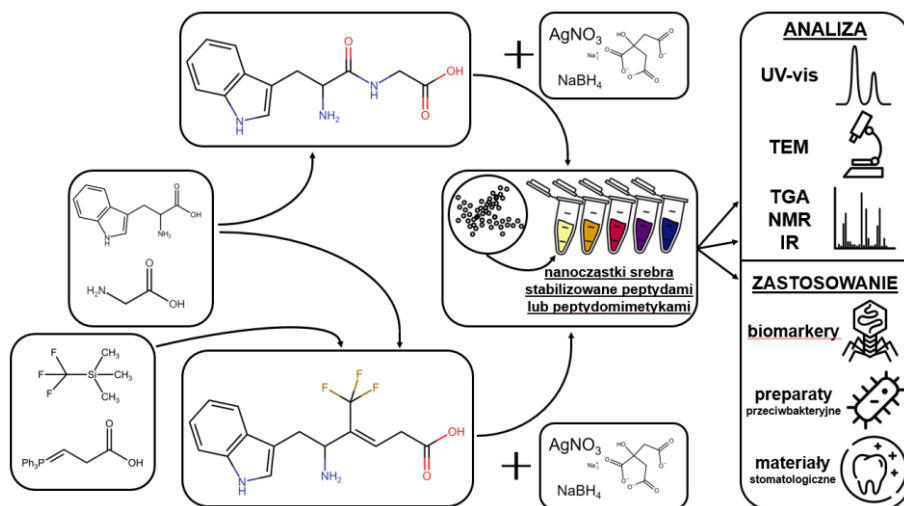
1. B. Podkościelna, D. Kołodyńska, Polym Advan Technol, 24 (2013) 866.
2. R. Tank, U. Pathak, A. Singh, A. Gupta, D.C. Gupta, React Funct Polym, 69 (2009) 224.
3. J. M. Becht, A. Wagner Ch. Mioskowski, Tetrahedron Lett., 45 (2004) 7031.
4. E. Rizzardo, G. Moad, S. H. Thang, Aust J. Chem., 65 (2012) 985.
5. M. Maciejewska, M. Grochowicz, J. Therm. Anal. Calorim., 148 (2023) 4195.

SYNTEZA WYBRANYCH PEPTYDÓW ORAZ FLUOROWANYCH PEPTYDOMIMETYKÓW W CELU SCHARAKTERYZOWANIA ICH POTENCJAŁU JAKO STABILIZATORÓW NANOCZĄSTEK SREBRA

P. KONOPKA, K. KORONIAK-SZEJN, R. JASTRZĄB, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii, Zakład Chemii Koordynacyjnej, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań

Abstrakt: Praca podejmuje tematykę syntezy peptydów oraz fluorowanych peptydomimetyków w celu scharakteryzowania ich potencjału jako stabilizatorów nanocząstek srebra. Nanocząstki metali szlachetnych, w tym również srebra, wzbudzają szerokie zainteresowanie badawcze ze względu na swoje interesujące właściwości oraz liczne zastosowania praktyczne w medycynie, elektronice oraz przemyśle farmaceutycznym. W literaturze przedmiotu dobrze scharakteryzowane zostało wykorzystanie peptydów jako stabilizatorów nanocząstek srebra, podczas gdy nie weryfikowano dotychczas potencjalnego zastosowania w tym celu fluorowanych peptydomimetyków.

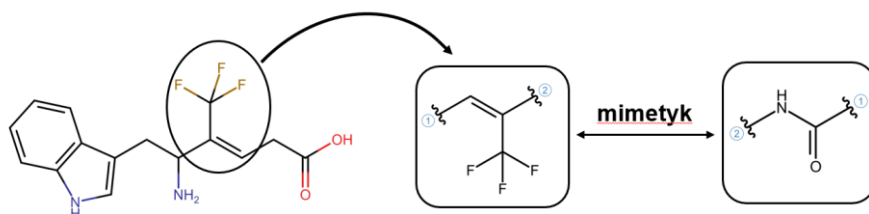
Wprowadzenie: Nanocząstki metali szlachetnych ze względu na swoje wyjątkowo szerokie zastosowania praktyczne są przedmiotem intensywnych badań prowadzonych w ostatnich latach.



Rys. 1. Graficzna prezentacja prac badawczych na przykładzie dipeptydu Trp-Gly oraz peptydomimetyku, będącego jego analogiem, oraz potencjalnych zastosowań nanocząstek srebra.

W literaturze wskazuje się na wykorzystywanie nanocząstek srebra w medycynie między innymi jako składników preparatów antybakteryjnych [1] i przeciwrzybiczych [2], kolorymetrycznych biomarkerów umożliwiających detekcję patogenów [3], czy substancji pomocniczych przy produkcji materiałów stomatologicznych [4]. Pozamedyczne

zastosowania nanosrebra obejmują między innymi produkcję klejów elektroprowadzących oraz tuszów do drukarek [5] (Rys.1). Nanocząstki srebra mogą być otrzymywane metodami chemicznymi, fizycznymi oraz biologicznymi [6]. Chemiczna metoda syntezy nanosrebra opiera się na redukcji azotan(V) srebra(I) (AgNO_3) za pomocą borowodoru sodu (NaBH_4) w obecności cytrynianu trisodu, który umożliwia wzrost cząstek [7]. Tak uzyskane nanocząstki srebra mogą podlegać dalszym modyfikacjom za pomocą stabilizatorów. W literaturze szeroko opisane zostały nanocząstki metali szlachetnych stabilizowane naturalnie występującymi peptydami [8], niniejszy projekt opiera się zaś na stabilizacji nanocząstek srebra za pomocą fluorowanych peptydomimetyków (Rys. 1). Wiązanie podwójne C=C z podstawnikiem w postaci grupy trifluorometylowej ($-\text{CF}_3$) posiada właściwości zbliżone pod pewnymi względami do wiązania peptydowego (Rys. 2). Podobieństwo to wynika między innymi z faktu obecności wiązania podwójnego, gdyż wiązanie C-N w wiązaniu peptydowym również posiada częściowy charakter wiązania podwójnego [9]. Schemat prowadzonych badań oraz potencjalnych zastosowań nanocząstek srebra został przedstawiony graficznie na rysunku 1.



Rys. 2. Struktura przykładowego peptydomimetyku – analogu dipeptydu Trp-Gly.

Szeroki zakres zastosowań nanocząstek srebra, aktualna problematyka oraz otwarte pole badawcze w zakresie wykorzystania fluorowanych peptydomimetyków jako stabilizatorów nanocząstek srebra uzasadniają prowadzenie intensywnych badań w tym przedmiocie.

Część eksperymentalna: Synteza dipeptydów oraz odpowiadających im peptydomimetyków zakłada wykorzystanie jako substratów dostępnych aminokwasów. Zastosowany plan syntezy peptydów obejmuje w pierwszej kolejności chemiczne zablokowanie grupy aminowej pierwszego aminokwasu w sekwencji dipeptydu za pomocą grupy *tert*-butyloksykarbonylowej (*t*-Boc) oraz zablokowanie grupy karboksylowej drugiego peptydu w sekwencji dipeptydu poprzez syntezę estru metylowego odpowiedniego aminokwasu. W kolejnych etapach synteza dipeptydu obejmuje aktywowanie grupy karboksylowej pierwszego aminokwasu z wykorzystaniem *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC), a następnie kondensację dwóch pochodnych aminokwasów. Ostatni etap syntezy dipeptydów stanowi usunięcie chemicznej blokady grup aminowej oraz karboksylowej. Plan syntezy fluorowanych peptydomimetyków, będących analogami dipeptydów, w pierwszej kolejności obejmuje chemiczne zablokowanie grupy aminowej pierwszego aminokwasu w sekwencji peptydomimetyku za pomocą grupy ftalimidowej oraz grupy karboksylowej tego samego aminokwasu za pomocą grupy metoksylowej (synteza estru

metylowego). Otrzymana pochodna aminokwasu poddawana jest reakcji z odczynnikiem Rupperta-Prakasha (trifluorometylotrimetylosilan). Otrzymany w ten sposób fluorowany związek zostaje poddany reakcji Wittiga z odpowiednim ylidem fosforowym. Ostatni etap zakłada usunięcie grup ochronnych na grupie aminowej i grupie karboksylowej. Inna metodyka zakłada wykorzystanie jako grupy ochronnej grupy aminowej grupę *tert*-butyloksykarbonylową (*t*-Boc). Wykorzystując tę ścieżkę syntetyczną również konieczne jest przekształcenie grupy karboksylowej w grupę estrową, a następnie przeprowadzenie reakcji redukcji grupy estrowej do pochodnej alkoholowej. Otrzymany aminoalkohol następnie zostaje utleniony z wykorzystaniem odczynnika Dess-Martina do pochodnej aldehydowej. Powstały aldehyd w reakcji z odczynnikiem Rupperta-Prakasha przekształcony zostaje w trifluorometylowany aminoalkohol. Po kolejnym utlenieniu grupy hydroksylowej do pochodnej aldehydowej analogicznie jak w przypadku proponowanej syntezy z grupą ftalimidową przeprowadzona zostaje reakcja Wittiga prowadząca do pochodnej dipeptydu. W ostatnim etapie następuje usunięcie grup ochronnych.

Wyniki: Według opisanego powyżej planu syntezy przeprowadzono reakcje z wykorzystaniem tryptofanu jako substratu wyjściowego. W przypadku pierwszej z opisanych powyżej metod syntezy peptydomimetyków otrzymano dotychczas trifluorometylowany keton, który w kolejnym etapie poddany zostanie reakcji Wittiga z ylidem fosforowym. Podobnie, w obrębie drugiej z zaprezentowanych ścieżek syntezy peptydomimetyków również otrzymano trifluorometylowany keton. Zasadnym jest przeprowadzenie dalszych syntez oraz zaimplikowanie opisanego powyżej schematu syntezy do otrzymywania peptydów oraz odpowiadających im fluorowanych peptydomimetyków z wykorzystaniem innych aminokwasów białkowych w celu ich dalszego wykorzystania w toku syntezy nanocząstek srebra.

Wnioski: Wyniki uzyskane w toku niniejszych badań uzasadniają ich kontynuowanie oraz dalszy rozwój badań w tym kierunku. W celu wykorzystania fluorowanych peptydomimetyków jako stabilizatorów nanocząstek srebra konieczne jest udoskonalenie istniejących metod syntezy tychże związków, a tym samym umożliwienie otrzymywania ich w dostatecznie dużych ilościach z satysfakcjonującą wydajnością.

Literatura:

1. K. Tripathi, S. Kesharwani, K. Saxena, D. Singh, R. Kautu, A. Sharma, S. Pandey, A. Chopra, S. Ballabh, *ChemMedChem*, 18 (5) (2023) 23.
2. M. Bajaj, S. Pandey, S.K. Nain, T. Brar, S.K. Singh, P. Singh, N. Wangoo, *Colloid. Surf. B: Biointerfaces*, 158 (2017) 397.
3. M. Retout, Y. Mantri, Z. Jin, J. Zhou, G. Noël, B. Donovan, *ACS Nano*, 16(4) (2022) 6165.
4. L. Xu, Y. Wang, J. Huang, C.Z. Chen, Z.X. Wang, H. Xie, *Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and Biosafety. Theranostics*, 10(20) (2017) 8996.
5. A. Hawa Jasni, A. Akbar Ali, S. Sagadevan, Z. Wahid, *Silver Micro-Nanoparticles - Properties, Synthesis, Characterization, and Applications*. 2021; <https://doi.org/10.5772/intechopen.96105>.
6. A. Almatroudi, *Open Life Sciences*, 15(1) (2020) 819.
7. S. Agnihotri, S. Mukherji, S. Mukherji, *RSC Adv.*, 4(8) (2014) 3974.
8. R. Kulkarni, S. Harip, A.R. Kumar, D. Deobagkar, S. Zinjarde, *Colloid. Surf. A: Physicochem. Engin. Aspec.*, 555 (2018) 180.
9. E. Stollar, D.P. Smith, *Uncovering Protein Structure. Essays in Biochemistry*, 64 (2020) 649.

SYNTEZA KROPEK KWANTOWYCH CdSe W DWÓCH ROZPUSZCZALNIKACH O RÓŻNYCH TEMPERATURACH WRZENIA DO ZASTOSOWAŃ W TECHNOLOGII ŚWIATŁOWODÓW POLIMEROWYCH

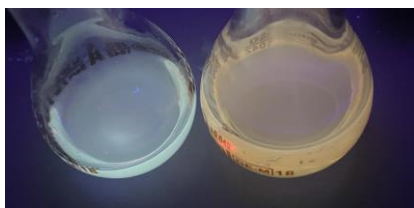
A. KICZOR, P. MERGO, UMCS, Wydział Chemii, Pracownia Technologii Światłowodów, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin

Abstrakt: Kropki kwantowe CdSe zostały wytworzone przy użyciu dwóch rozpuszczalników organicznych, które różnią się temperaturami wrzenia - heksanu (niskowrzący rozpuszczalnik o temperaturze wrzenia 69°C) i 1-oktadeken (wysokowrzący rozpuszczalnik o temperaturze wrzenia 315°C). Niniejsza praca ma na celu sprawdzenie, czy rodzaj rozpuszczalnika stosowanego do otrzymywania kropek kwantowych wpływa na możliwości domieszkowania struktur polimerowych, z których można następnie wytworzyć aktywne światłowody polimerowe.

Wprowadzenie: Materiały polimerowe znajdują wiele zastosowań w różnych gałęziach przemysłu. Podejmowane są wysiłki, aby uzyskać struktury o coraz lepszych właściwościach. Konieczne jest nie tylko uzyskanie nowych materiałów, ale także modyfikacja istniejących struktur. Taka sytuacja ma miejsce również w przypadku światłowodów polimerowych. Powszechne zastosowanie światłowodów polimerowych jest niemożliwe ze względu na ich bardzo wysokie straty optyczne w porównaniu do światłowodów szklanych. Rozwiązaniem tego problemu może być produkcja polimerowych światłowodów aktywnych. Włókna aktywne są podstawowymi elementami wzmacniaczy światłowodowych i laserów, które umożliwiają bezpośrednie wzmocnienie światła wewnątrz włókna. Aby ich działanie było jak najbardziej efektywne, konieczne jest zastosowanie domieszek. Najczęściej stosowane są jony lantanowców wyizolowane z sieci polimerowej, aktywne barwniki organiczne i kropki kwantowe. Domieszki te charakteryzują się bardzo wysoką luminescencją i długim czasem świecenia.

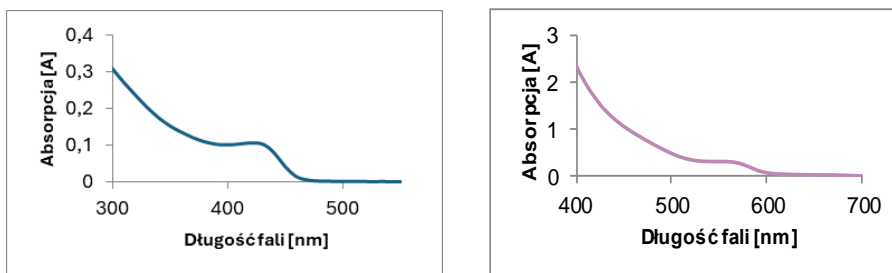
Część eksperymentalna: Syntezę przeprowadzono w oparciu o dane literaturowe [1], ale do dokładnego wymieszania substratów użyto mieszadła elektrycznego. Ponadto obniżono temperaturę wtrysku prekursora jonów selenu. Roztwór zawierający prekursor jonów selenu sporządzono w kolbie płaskodennej. Do kolby wprowadzono 0,03 g sproszkowanego selenu, 0,4 cm³ trioktylofosfiny i 5 cm³ 1-oktadekenu. Całą mieszaninę dokładnie wymieszano i otrzymano bezbarwny roztwór TOPSe. Do kolby okrągłodennej z trzema szybkami dodano 0,013 g tlenku kadmu, 0,6 cm³ kwasu oleinowego i 5 cm³ 1-oktadekenu. Całą mieszaninę umieszczono w czaszy grzewczej i ogrzewano do całkowitego rozpuszczenia tlenku kadmu w temperaturze około 160°C. Układ do przeprowadzania syntezy zawierał dodatkowo termoparę do ciągłej kontroli temperatury i mieszadło magnetyczne. Po tym czasie dodano 1 mL wcześniej przygotowanego roztworu zawierającego jony selenu. Natychmiast nastąpiła stopniowa zmiana koloru z bezbarwnego na żółty, pomarańczowy i czerwony, aż do bordowego. Próbkę zostały pobrane w trakcie procesu po 60, 120, 300, 600, 1800 i 3600 s od wstrzyknięcia TOPSe. Próbkę pobrana po 300 sekundach została użyta do dalszych badań. Podobnie, syntezę

przeprowadzono przy użyciu heksanu jako rozpuszczalnika organicznego. Należy jednak pamiętać, że temperatura wrzenia heksanu wynosi 69°C , więc reakcję przeprowadzono w temperaturze znacznie niższej. Jak największa ilość niskowrzącego rozpuszczalnika została odparowana, aby nie powodował niedoskonałości w późniejszym przetwarzaniu polimerów. Próbka pobrana po 300 sekundach została również użyta do późniejszej analizy (Rys.1) [2].



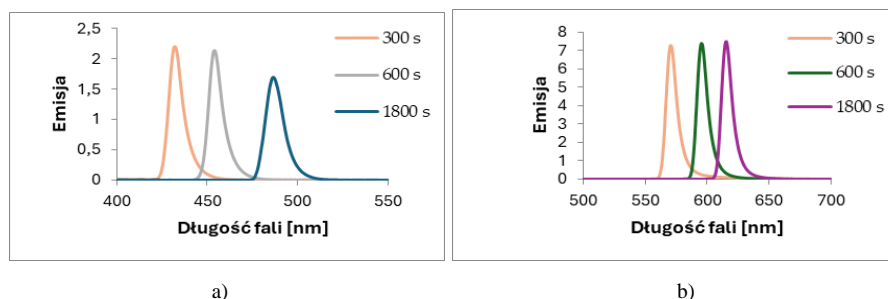
Rys. 1. Roztwory koloidalnych kropek kwantowych CdSe wykonane przy użyciu heksanu (roztwór niebieski) i 1-oktadecenu (roztwór pomarańczowy)

Wyniki: Przy użyciu spektrofluorymetru Hitachi F-7000 i spektrofotometru Agilent Cary 60 UV-VIS wykonano charakterystyki widm absorpcji i emisji roztworów wytworzonych kropek kwantowych CdSe. Widma absorpcji CdSe QDs wykonane przy użyciu heksanu jako rozpuszczalnika organicznego wykazały pik pojawiający się przy 435nm , odpowiadający niebieskiemu kolorowi. Kropki kwantowe wykonane przy użyciu 1-oktadecenu wykazały wyraźny pik przy 575nm , odpowiadający barwie czerwonej (Rys. 2).



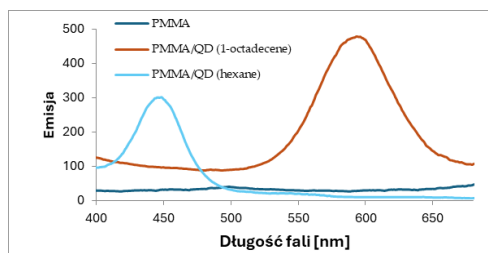
Rys. 2. Wykresy absorpcji kropek kwantowych CdSe przygotowanych przy użyciu heksanu oraz 1-oktadecenu z powiększonym fragmentem zawierającym pik absorpcji.

Widma emisyjne wykonano dla 3 próbek pobranych w różnym czasie po wstrzyknięciu prekursora jonów selenu, tj. po 300, 600 i 1800 sekundach. Rysunek 3 przedstawia widma emisyjne otrzymanych struktur. W obu przypadkach można zauważyć, że im dłużej trwała synteza, tym bardziej maksimum emisji jest przesunięte w kierunku dłuższych fal. Piki są wąskie i dobrze zdefiniowane. Widma kropek kwantowych wytworzonych przy użyciu 1-oktadecenu charakteryzują się bardzo silną luminescencją. Widma zostały wykonane przy użyciu tych samych parametrów, w celu wiarygodnego porównania intensywności emisji.



Rys. 3. Wykresy emisji dla trzech próbek CdSe QD otrzymanych po różnych czasach syntezy z (a) heksanem oraz (b) 1-oktadecenem.

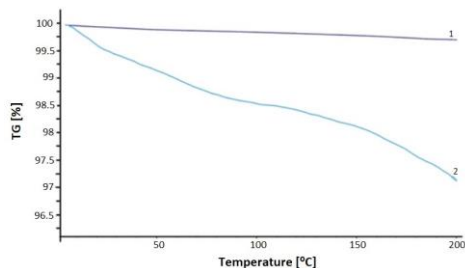
Za pomocą termicznej polimeryzacji wolnorodnikowej wytworzono czysty PMMA (polimetakrylan metylu) i PMMA/mieszaninę. Nadtlenek benzoilu został użyty jako inicjator, a kwas tioglikolowy TGA jako czynnik przenoszący łańcuch. Otrzymane wcześniej kropki kwantowe CdSe dodano do mieszaniny polimeryzacyjnej, która zawierała również metakrylan metylu i poddano procesowi polimeryzacji. Otrzymano czysty PMMA, PMMA z kropkami kwantowymi CdSe wytworzonymi przy użyciu 1-oktadecenu oraz PMMA z kropkami kwantowymi wytworzonymi przy użyciu heksanu. Wykonano widma fotoluminescencji czystego PMMA, PMMA z dodatkiem kropek kwantowych wykonanych z heksanu oraz PMMA z dodatkiem kropek kwantowych wykonanych z 1-oktadecenu (Rys. 4). Można zauważyć, że piki emisji dla próbek PMMA z kropkami kwantowymi odpowiadały odpowiednio pikom emisji roztworów samych kropek kwantowych CdSe. Pokazuje to, że kropki kwantowe CdSe zamknięte w strukturze polimerowej nadal wykazywały bardzo dobre właściwości luminescencyjne. Uzyskano dobrze zdefiniowane piki emisji o symetrycznym kształcie. Próbką czystego PMMA była praktycznie liniowa.



Rys. 4. Porównanie widm emisji próbek PMMA (ciemna niebieska linia), PMMA z QD wykonanymi z heksanu (jasnoniebieska linia) i PMMA z QD wykonanymi z 1-oktadecenu (pomarańczowa linia).

Analizę termogravimetryczną (TG) otrzymanych struktur przeprowadzono przy użyciu aparatu STA 449 F1 Jupiter NETZSCH przy szybkości ogrzewania 10°C/min w zakresie temperatur 0-200°C. Próbką nr 1 oznaczała próbkę wykonaną z PMMA domieszkowanego CdSe QD przy użyciu 1-oktadecenu jako wysokowrzącego rozpuszczalnika organicznego. Widoczny jest bardzo niewielki procentowy spadek masy próbki. Wykres był praktycznie prosty, ze spadkiem 0,3%. Jest to doskonały wynik, potwierdzający, że próbka ta jest stabilna termicznie i stanowi dobry materiał do dalszego wykorzystania jako polimerowy światłowod. Próbką nr 2 wykazała procentowy spadek masy próbki

wraz ze wzrostem temperatury. W temperaturze 200°C wynosił on prawie 3%. Nie był to duży spadek, ale wystarczający, aby odrzucić tę próbkę jako materiał do dalszej modyfikacji (Rys. 5).



Rys. 5. Wykres TG PMMA/QD CdSe wykonanego w 1-oktadecenie [1-fioletowa linia]; wykres TG PMMA/QD CdSe wykonanego w heksanie [2-niebieska linia].

Wnioski: W pracy wykazano, że powstałe struktury oparte na matrycy PMMA umożliwiając tworzenie nowych optycznych włókien polimerowych o właściwościach luminescencyjnych. Przedstawiono porównanie między użyciem rozpuszczalnika o wysokiej temperaturze wrzenia, ODE, a rozpuszczalnikiem o niskiej temperaturze wrzenia, wysoce lotnym, heksanem. Widma emisyjne wykazały, że otrzymane próbki charakteryzowały się wysoką luminescencją. Im dłużej trwała synteza, tym bardziej pik emisji był przesunięty w kierunku większych długości fal. Taką sytuację można zaobserwować w obu typach próbek. Piki emisji były wąskie i dobrze scharakteryzowane, co jest charakterystyczne dla kropek kwantowych. Potwierdzono, że im dłuższy czas syntezy, tym większe kropki kwantowe otrzymano, których widma emisji miały coraz większą długość fali. Wykresy TG wykazały znacznie wyższą stabilność termiczną kropek kwantowych CdSe wytworzonych przy użyciu 1-oktadecenu niż przy użyciu heksanu jako rozpuszczalnika organicznego. Należy zauważyć, że podczas obróbki światłowodów temperatura może osiągnąć 200 °C. Utrata masy do 1% sprawia, że materiał ten jest bardzo dobry do wyciągania polimerowych włókien światłowodowych. Ponadto daje nam gwarancję, że podczas przetwarzania nie będą tworzyć się pęcherzyki powietrza, wpływające na właściwości i przewodzenie sygnału wewnątrz światłowodu. Wszystkie te wyniki pokazują, że uzyskano materiał o wysokim potencjale luminescencyjnym do zastosowań obejmujących polimerowe światłowody (POF).

Literatura:

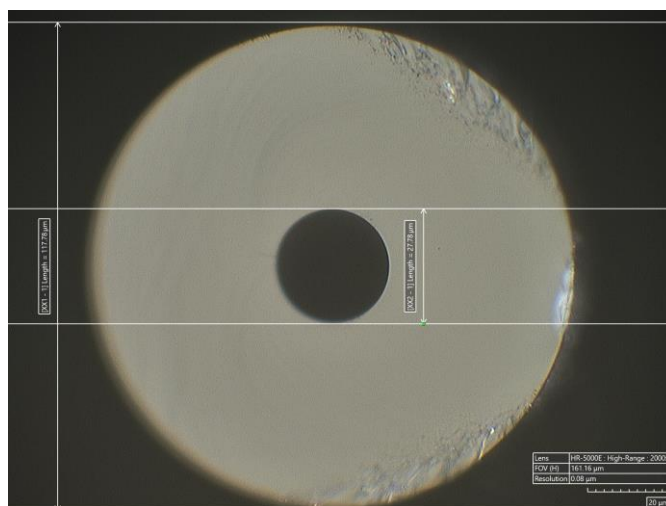
1. S. Asokan, i in., Nanotechnology, 16 (2005) 2000.
2. A. Kiczor, P. Mergo, Materials, 17 (2024) 227.

OPTIMALIZACJA PROCESU WYTWARZANIA POŁĄCZENIA TRWAŁEGO POMIĘDZY ŚWIATŁOWODEM STANDARDOWYM A ŚWIATŁOWODEM Z OTWOREM POWIETRZNYM

M. JÓZWICKI, W. JÓZWICKA, P. MERGO, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Pracownia Technologii Światłowodów, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin

Abstrakt: W artykule przedstawiono wyniki optymalizacji parametrów procesu spawania takich jak: moc żarnika, czas trwania procesu oraz przesunięcie miejsca grzania w stronę jednego z łączonych światłowodów. Po przeprowadzonym procesie spawania następnie połączone światłowodów przeniesiono do modułu badającego wytrzymałość połączeń, gdzie zmierzono wartość siły rozciągania, przy której nastąpiło przerwanie połączenia pomiędzy światłowodem standardowym, a światłowodem z otworem powietrznym o średnicy ok. 25µm.

Wprowadzenie: Światłowodów z otworami powietrznymi (na rys.1 przedstawiono łączony światłowód z otworem powietrznym) wykorzystywane mogą być przy konstrukcjach czujników światłowodowych.



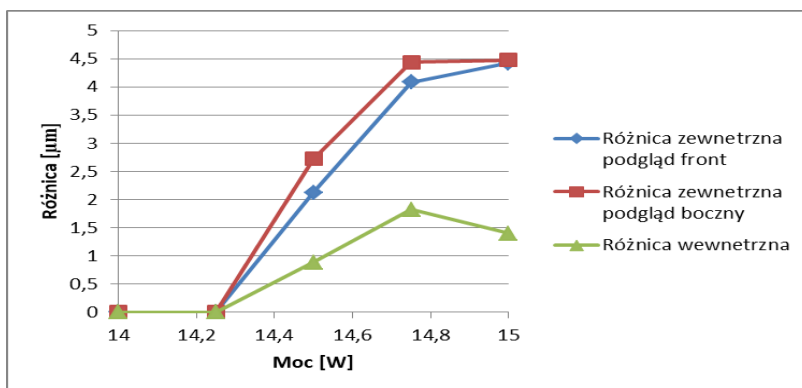
Rys. 1. Światłowód z otworem powietrznym o średnicy około 25µm.

Czujniki takie mogą mierzyć np. ciśnienie lub stężenie gazów po pokryciu jego powierzchni metaliczną powłoką. Połączenie takich włókien światłowodowych wymaga przeprowadzenia procesu optymalizacji warunków procesu spawania, ponieważ wykorzystując parametry przy spawaniu standardowych światłowodów następuje zniszczenie

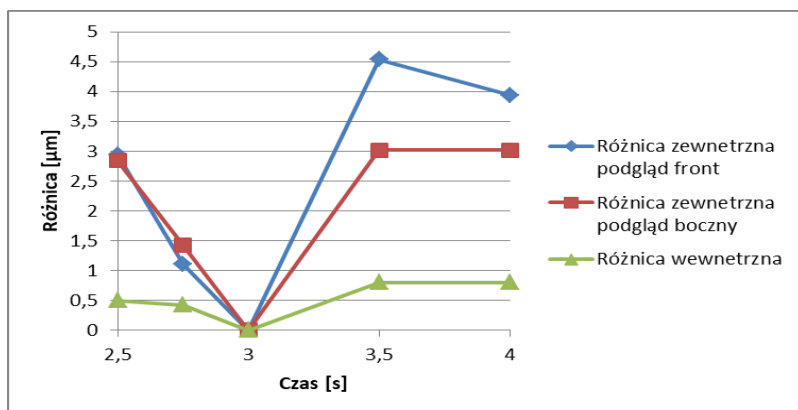
ich wewnętrznej konstrukcji tj. otwór się za zasklepiea. Stosując w tym celu spawarkę żarnikową dobrze kontrolują się ciepło dostarczane w miejsce połączeń.

Część eksperymentalna: Proces spawania przeprowadzono wykorzystując spawarkę światłowodową Vytran FFS2000 zmieniając parametry wejściowe: moc żarnika w zakresie 14-15W, czas procesu 2,5-4s, przesunięcie miejsca grzania od -200 do 200 μ m. Wytrzymałość spawów zmierzono poprzez pomiar siły rozciągania połączonych światłowodów przy pomocy modułu do badania wytrzymałości połączeń znajdującym się w wyżej wymienionej spawarce.

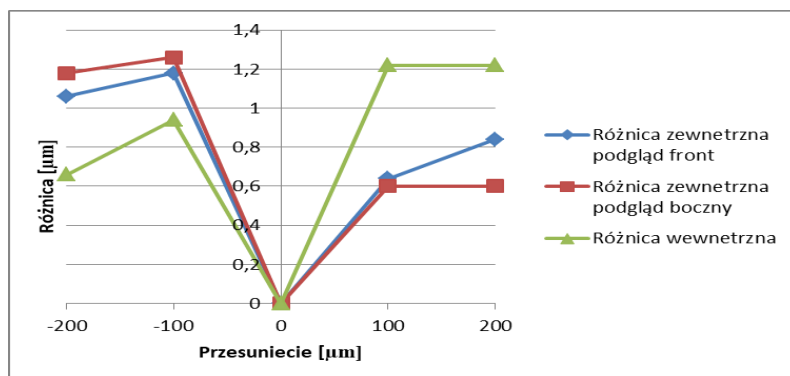
Wyniki: Analizując zdjęcia przed i po procesie spawania zrobione za pomocą podglądu miejsca spawania w spawarce wykonano wykresy różnicy średnicy zewnętrznej światłowodów oraz różnicy średnicy otworu. Wyniki tę pokazano na rys. 2-4.



Rys. 2. Wykres określonej różnicy przed i po procesie spawania światłowodu z otworem powietrznym o średnicy 25 μ m przy zmianie parametru mocy żarnika.

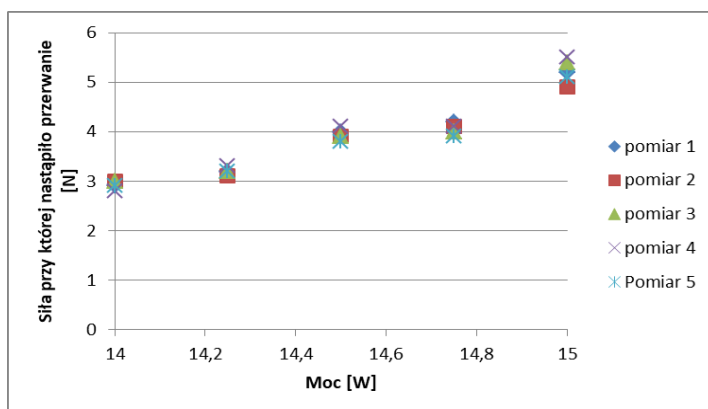


Rys. 3. Wykres określonej różnicy przed i po procesie spawania światłowodu z otworem powietrznym o średnicy 25 μ m przy zmianie parametru czasu procesu.

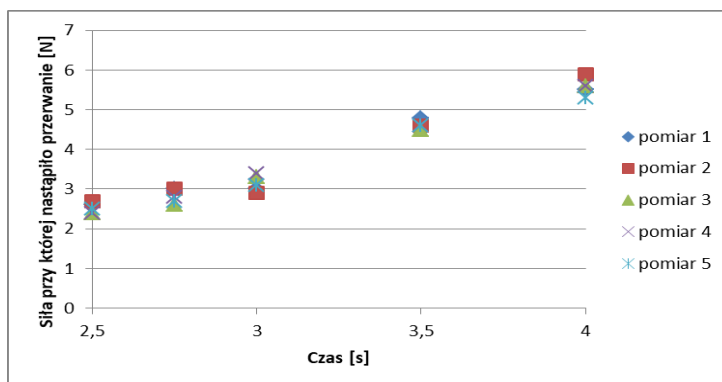


Rys. 4. Wykres określonej różnicy przed i po procesie spawania światłowodu z otworem powietrznym o średnicy $25\mu\text{m}$ przy zmianie parametru przesunięcia włókna w stronę światłowodu standardowego.

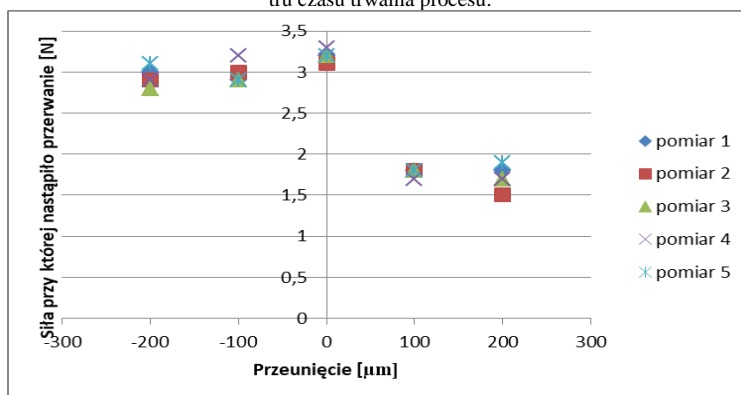
Z rysunków 2-4 wynika że granicznymi wartościami wyznaczonymi eksperymentalnie są: moc żarnika $14,25\text{W}$, czas procesu 3s oraz brak przesunięcia miejsca grzania. W przypadku wyznaczenia czasu procesu oraz przesunięcia miejsca grzania ustalono warunki w których nie zauważono zasklepienia otworu natomiast przy wyznaczeniu mocy żarnika ustalono parametr graniczny przy którym nie zaobserwowano zasklepienia. Ponadto wyniki pomiarów z modułu wytrzymałościowego spawarki Vytran FFS2000 zamieszczono na rys. 5-7.



Rys. 5. Wykres siły przy której nastąpiło przerwanie połączenia wytworzonego przy danej wartości parametru mocy żarnika.



Rys. 6. Wykres siły przy którym nastąpiło przerwanie połączenia wytworzonego przy danej wartości parametru czasu trwania procesu.



Rys. 7. Wykres siły przy którym nastąpiło przerwanie połączenia wytworzonego przy danej wartości parametru przesunięcia włókna w stronę światłowodu standardowego.

Analizując wykresy z rys.5-7 wynika że im większa moc żarnika oraz czas trwania procesu tym wytrzymałość połączenia światłowodów wzrasta. Ponadto wynika że przesunięcie miejsca grzania w stronę światłowodu standardowego niż w stronę światłowodu z otworem powietrznym zwiększa wytrzymałość połączenia.

Wnioski: Na podstawie analizy zdjęć przed oraz po procesie spawania i uwzględnieniu pomiarów z modułu wytrzymałościowego określono optymalne parametry na wartości: moc żarnika 14,25W, czas trwania procesy 3s oraz bez przesunięcia miejsca grzania w stronę żadnego ze spawanych światłowodów.

Literatura:

1. A. D. Yablon, Optical Fiber Fusion Splicing, Springer Berlin, Heidelberg, 2005.
2. M. Ł. Józwicki, P. Mergo, „Optymalizacja połączenia trwałego pomiędzy światłowodem standardowym a światłowodem mikrostrukturalnym”, w Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie, Wydawnictwo UMCS, Lublin 2022, s. 91.
3. W. Józwicka, M. Ł. Józwicki, P. Mergo, „Optymalizacja połączenia trwałego pomiędzy światłowodem standardowym a światłowodem d-shape”, w Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie, Wydawnictwo UMCS, Lublin 2022, s. 99.
4. C. Zhang, Z. Zhang, J. Song, Ch. Wu, N. Song, Optical Fiber Technology, 22 (2015) 102.

PORÓWNANIE TECHNOLOGII DOMIESZKOWANIA SZKŁA KRZEMIONKOWEGO FLUOREM I BOREM

M. GRZESIAK, K. POTURAJ, M. MAKARA, P. MERGO, UMCS w Lublinie, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Pracownia Technologii Światłowodów, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin

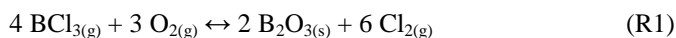
Abstrakt: Dobór odpowiednich materiałów jest istotny podczas projektowania światłowodów. W niniejszej pracy przedstawione zostało porównanie technologii domieszkowania szkła krzemionkowego fluorem i tlenkiem boru, które są domieszkami zmniejszającymi współczynnik załamania światła. Ich odmienny charakter chemiczny oraz wpływ na właściwości mechaniczne determinuje charakter projektowanego światłowodu.

Wprowadzenie: Światłowody są głównie wytwarzane ze szkieł nieorganicznych takich jak szkło krzemionkowe (SiO_2), wieloskładnikowe szkła tlenkowe (np. B_2O_3 , Al_2O_3 , Ga_2O_3 , SiO_2 , GeO_2), szkła fluorkowe (ZrF_4 , LnF_3), szkła chalkogenkowe (As_2S_3 , As_2Se_3 , GeS_2), oraz inne tzw. „miękkie” szkła. Najpopularniejszym ze szkieł ze względu na swoje właściwości takie jak wysoka temperatura zeszklenia ($1100\text{ }^\circ\text{C}$) oraz niski współczynnik rozszerzalności cieplnej ($5,4 \cdot 10^{-7}\text{ }1/\text{K}$) jest syntetyczne szkło krzemionkowe (ang. *Fused Silica*) otrzymywane metodami osadzania z par (CVD – ang. *Chemical vapor deposition*) [1]. W celu modyfikacji właściwości szkła krzemionkowego stosuje się wybrane domieszki, głównie w postaci innych tlenków takich jak: GeO_2 , B_2O_3 , TiO_2 , P_2O_5 , Al_2O_3 . Specyficzną domieszką stosowaną w technologii światłowodów głównie w celu zmniejszenia współczynnika załamania światła jest fluor, którego technologia domieszkowania jest zupełnie odmienna niż w przypadku domieszek tlenkowych [2]. Inną domieszką, która powoduje zmniejszenie współczynnika załamania światła szkła krzemionkowego jest tlenek boru (B_2O_3) [3]. W kontekście światłowodów wykorzystujących warstwy szkła o obniżonym współczynniku załamania światła istotny jest odpowiedni wybór domieszki ze względu na ich odmienną technologię domieszkowania oraz wpływ na właściwości szkła, które będą miały znaczenie podczas projektowaniu światłowodu.

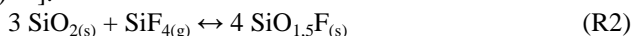
Część eksperymentalna: Stałe równowagi reakcji oraz równowagę termodynamiczną procesów otrzymywania szkła krzemionkowego domieszkowanego fluorem lub tlenkiem boru obliczono w programie HSC Chemistry 10. Równowagę termodynamiczną układu obliczono metodą minimalizacji Energii Gibbsa, w którym układ reakcyjny przyjęto jako mieszaninę idealną w warunkach ciśnienia 1 bar i zakresie temperatur $1000 - 2000\text{ }^\circ\text{C}$. Do obliczeń użyto danych termodynamicznych dostępnych w bazie danych dołączonej do oprogramowania. Wpływ rodzaju domieszki na właściwości światłowodów przedstawiono za pomocą symulacji komputerowych metodą elementów skończonych (FEM – ang. *Finite Element Method*) w oprogramowaniu COMSOL Multiphysics z modułami Wave Optics i Structural Mechanics. Symulowane światłowody typu W charakteryzowały się dużą domieszką GeO_2 (35 %mol) w rdzeniu oraz warstwą o obniżonym współczynniku załamania domieszkowaną F (3,09 %mol) lub B_2O_3 (11 %mol). Ilość domiesz-

ki fluoru i tlenku boru została dobrana tak, aby ich wpływ na zmniejszenie współczynnika załamania światła był jak najbardziej podobny.

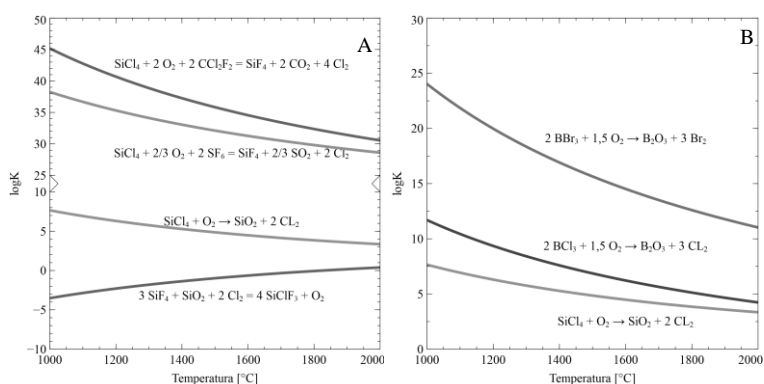
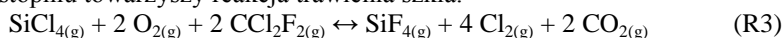
Wyniki: W przypadku metod osadzania wewnętrznego (np. MCVD), tlenek boru (B_2O_3) otrzymuje się w reakcji utleniania halogenków takich jak BCl_3 lub BBr_3 (np. R1). Reakcja ta jest analogiczna do reakcji utleniania $SiCl_4$, z którego otrzymuje się czyste szkło krzemionkowe będące podstawowym składnikiem światłowodów szklanych. Z tego względu otrzymywanie szkła krzemionkowego domieszkowanego B_2O_3 jest chemicznie mniej skomplikowane, a reakcje biorące w niej udział mają mniejszy wzajemny wpływ na siebie.



Odwrotna sytuacja jest w przypadku domieszkowania fluorem, które przebiega w zupełnie inny odmienny sposób. Szkło domieszkowane fluorem występuje w dwóch postaciach jako $SiO_{1,5}F$ oraz SiO_2F . W strukturze szkła w większym stopniu dominuje związek $SiO_{1,5}F$, a reakcję jego otrzymywania przedstawia reakcja (R2). Procent domieszki fluoru w szkłe krzemionkowym jest proporcjonalny do stężenia (ciśnienia cząstkowego) SiF_4 , $\Delta n \approx (P_{SiF_4})^{0,25}$.

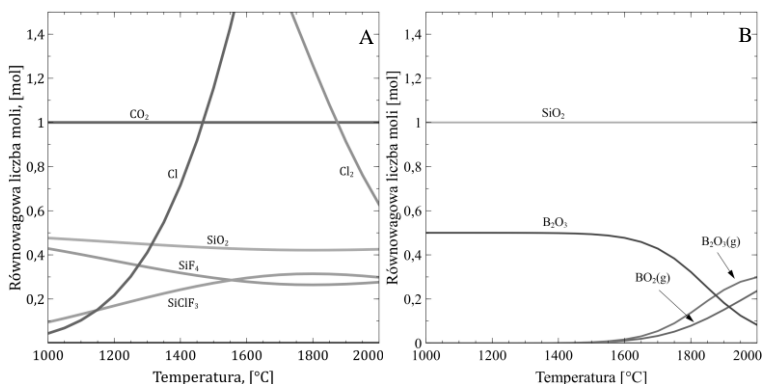


Substancją fluorującą szkło krzemionkowe jest czterofluorek krzemu (SiF_4), który do układu reakcyjnego można wprowadzić na dwa sposoby. Pierwszy z nich wymaga zastosowania prekursorów fluorujących takich jak: CCl_2F_2 , $C_2Cl_3F_3$, CF_4 , SF_6 , natomiast drugi polega na bezpośrednim użyciu SiF_4 . Użycie prekursorów wiąże się z reakcją wytwarzania SiF_4 na drodze reakcji prekursora z obecnym w układzie reakcyjnym $SiCl_4$ (np. R3). Konsekwencją tej reakcji jest zmniejszenie ilości wytwarzanego szkła krzemionkowego, co ogranicza maksymalną domieszkę fluoru ograniczoną pewnym stosunkiem molowym prekursora do $SiCl_4$. Ponadto reakcji domieszkowania zawsze w pewnym stopniu towarzyszy reakcja trawienia szkła.



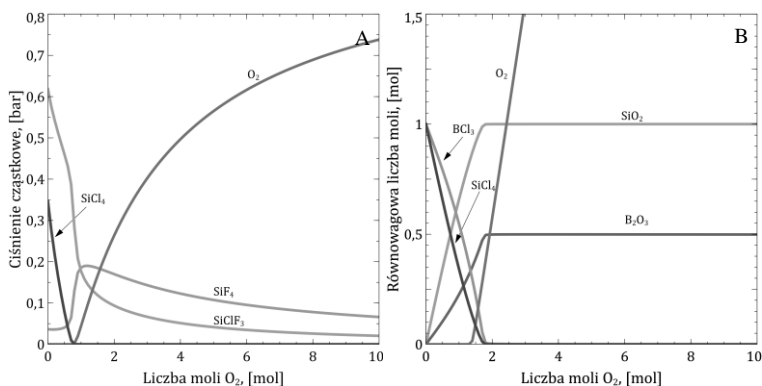
Rys. 1 Zależności temperaturowe logarytmów stałych równowagi reakcji najważniejszych reakcji biorących udział w trakcie syntezy szkła krzemionkowego domieszkowanego fluorem (A) lub tlenkiem boru (B).

Na rysunku 1 przedstawione są zależności logarytmów stałej równowagi reakcji od temperatury, dla głównych reakcji zachodzących w trakcie wytwarzania szkła krzemionkowego domieszkowanego F lub B₂O₃. Zauważalne jest zmniejszanie się stałej równowagi reakcji tworzenia półproduktów i produktów wraz ze zwiększeniem temperatury. Odwrotna zależność występuje w przypadku trawienia szkła krzemionkowego podczas domieszkowania fluorem. Z tego względu zalecane jest domieszkowanie fluorem w niższych temperaturach.



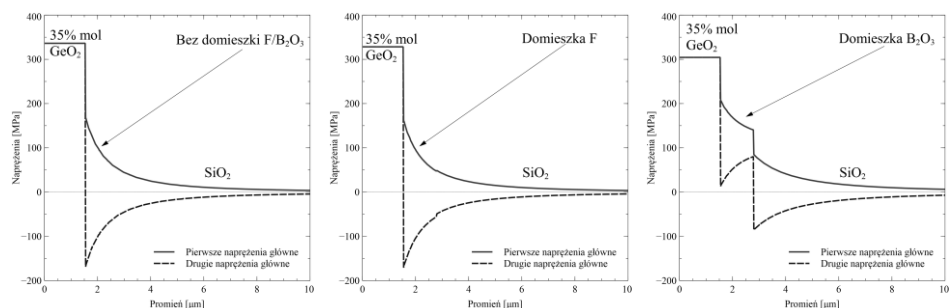
Rys. 2 Zależności temperaturowe równowagowej liczby moli głównych reagentów biorących udział w trakcie syntezy szkła krzemionkowego domieszkowanego fluorem – CCl₂F₂ (A) lub tlenkiem boru – BCl₃ (B). Początkowa ilość reagentów: n_{SiCl₄} = 1 mol; n_{CCl₂F₂} = 1 mol; n_{O₂} = 4 mol - (A); n_{SiCl₄} = 1 mol; n_{BCl₃} = 1 mol; n_{O₂} = 10 mol - (B).

Rysunek 2 przedstawia wpływ temperatury procesu na ilość reagentów w trakcie reakcji domieszkowania fluorem (A) i tlenkiem boru (B). W obu przypadkach podwyższona temperatura zmniejsza ilość domieszek. Ze względu na to, że ilość domieszki fluoru zależy od ciśnienia cząstkowego SiF₄ niekorzystny jest duży nadmiar tlenu w układzie reakcyjnym (Rys. 3A). W przypadku syntezy szkła domieszkowanego tlenkiem boru wpływ nadmiaru reagentów na ilość domieszki jest znikomy (Rys. 3B).



Rys. 3 Wpływ ilości tlenu na ilość reagentów biorących udział w reakcji domieszkowania fluorem przy użyciu SiF₄ (A) i tlenkiem boru przy użyciu BCl₃ (B). Początkowa ilość reagentów: n_{SiCl₄} = 1 mol; n_{SiF₄} = 1 mol - (A); n_{SiCl₄} = 1 mol; n_{BCl₃} = 1 mol - (B).

Podczas projektowania światłowodów, szczególnie w przypadku niektórych struktur istotne są naprężenia generowane podczas wytwarzania preformy światłowodowej. Wynikają one z różnicy właściwości mechanicznych sąsiednich warstw szkła, a w szczególności różnicą we współczynniku rozszerzalności termicznej. Zbyt duże naprężenia mogą spowodować pęknięcia i zniszczenie szklanej preformy. W niektórych przypadkach np. w światłowodach dwójłomnych naprężenia w rdzeniu są pożądane, ponieważ zwiększają ich dwójłomność. Wybór domieszki obniżającej współczynnik załamania światła jest ważny, ze względu na różny wpływ tych domieszek na szkło krzemionkowe. Rysunek 4 przedstawia naprężenia główne w światłowodzie typu W, bez i z domieszkami fluoru lub tlenku boru. Widoczny jest niewielki wpływ fluoru na naprężenia, natomiast w przypadku tlenku boru, zmiana naprężeń jest znaczna. Naprężenia generowane w warstwie domieszkowanej tlenkiem borem powodują relaksację naprężeń w rdzeniu światłowodu. Różnica między wpływem obu domieszek wynika głównie z większego współczynnika rozszerzalności termicznej szkła domieszkowanego tlenkiem boru, które dla 11 %mol domieszki wynosi $15,83 \cdot 10^{-7}$. Fluor ma nieznaczny wpływ na zmianę właściwości mechanicznych szkła krzemionkowego.



Rys. 4 Rozkład naprężeń głównych w światłowodzie osiowosymetrycznym (okrągły rdzeń) bez oraz z warstwą szkła domieszkowanego fluorem lub tlenkiem boru.

Wnioski: Dobór odpowiedniej domieszki ma istotne znaczenie w trakcie projektowania światłowodu. Mimo podobnego wpływu fluoru i tlenku boru na współczynnik załamania światła szkła krzemionkowego, lepszym wyborem jest fluor. Wynika to ze znikomego wpływu na właściwości mechaniczne domieszkowanego szkła. Z chemicznego punktu widzenia domieszkowanie tlenkiem boru jest mniej skomplikowane od fluoru, ale naprężenia generowane w przypadku dużej domieszki tlenku boru mogą powodować uszkodzenia preformy oraz pogorszenie właściwości światłowodu.

Literatura:

1. R. Paschotta, article on "Fused Silica" in the RP Photonics Encyclopedia, retrieved 2024-02-26, <https://doi.org/10.61835/d1v>
2. J. Kirchhof, S. Unger, J. Non-Crystal. Solid., 354 (2008) 540.
3. M. Islam, J. Mater. Eng. Perform. (JMPEP), 21 (2011) 202.

CHARAKTERYSTYKA POLIMERÓW DYNAMICZNYCH ZAWIERAJĄCYCH ESTRY FOSFORANOWE

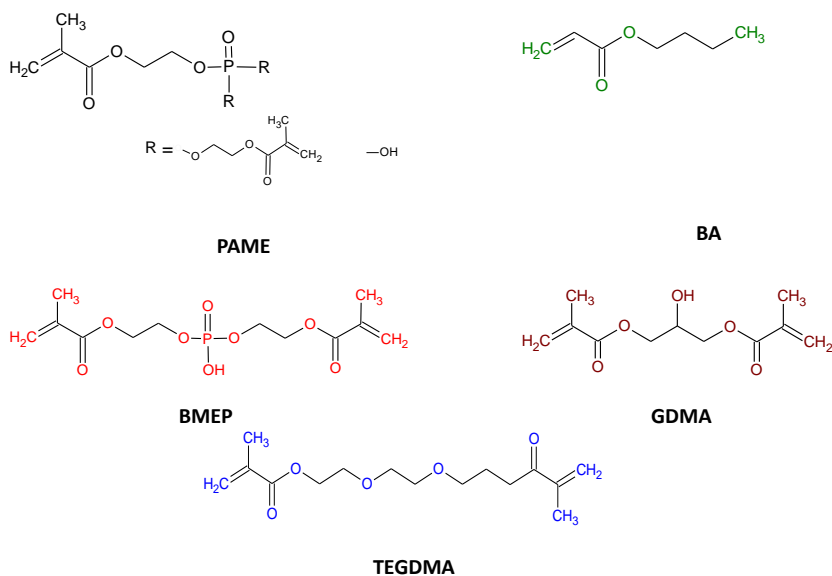
P. BANASZEK, M. PODGÓRSKI, UMCS, Wydział Chemii, Katedra Chemii Polimerów, ul. Gliniana 33, 20-614 Lublin

Abstrakt: W ostatnich latach przedmiotem wielu badań stały się polimery dynamiczne zawierające w swoim składzie estry fosforanowe zdolne do reorganizacji sieci na skutek reakcji transestryfikacji. Celem poniższej pracy było otrzymanie fotokopolimerów estru monometakrylowego kwasu fosforowego i akrylanu butylu z dodatkiem 5% różnego środka sieciującego oraz zbadanie ich wpływu na właściwości termomechaniczne i dynamiczne polimerów.

Wprowadzenie: Rozwój nowoczesnych technologii sprzyja pracy nad konstruowaniem coraz bardziej zaawansowanych materiałów. Polimery dynamiczne stanowią grupę polimerów usieciowanych, w sieci których oprócz trwałych wiązań kowalencyjnych tworzących się w wyniku polimeryzacji występują połączenia odwracalne, które pod wpływem bodźców takich jak, np. temperatura czy pH odpowiadają za zdolność do reorganizacji sieci. Taka budowa sprawia, że polimery dynamiczne traktowane są jak „most” pomiędzy termoplastami i duroplastami ze względu na dobre właściwości mechaniczne w szerokim zakresie temperatury (cecha duroplastów) i przetwarzalność (cecha termoplastów). Reakcje odwracalne, które występują w sieciach mogą zachodzić przede wszystkim na skutek wymiany i addycji. W literaturze można spotkać szereg przykładów reakcji tego typu, do których należą, m. in. reakcja Michaela, transestryfikacja, wymiana tiol-tioester, tiol-disulfid, mocznik-amina czy metateza olefin [1,2]. W ostatnich latach na popularności zyskały polimery dynamiczne zawierające w swojej budowie estry fosforanowe, z udziałem których w podwyższonej temperaturze i w obecności grup hydroksylowych może zachodzić transestryfikacja prowadząca do reorganizacji sieci. Co więcej, aby zaszła reakcja transestryfikacji, nie jest potrzebny katalizator zewnętrzny, ze względu na kwasowy charakter grup fosforowych. Wykazano, że materiały takie mają zdolność do adaptacji kształtu, relaksacji naprężeń oraz recyklingu. W literaturze zostały przebadane różne układy zawierające estry fosforanowe. W jednej z prac do stworzenia sieci dynamicznej wykorzystano fosforan trifenylu jako środek sieciujący oraz politetrahydrofuran jako źródło grup hydroksylowych [3,4]. W publikacji [5] sieć została utworzona z eteru glicydylowego bisfenolu A oraz monometakrylanu fosforowego, natomiast w pracy [2] wykorzystano biomonomery w postaci kwasu fitowego i kwasu itakonowego. W niniejszej pracy zbadano właściwości sieci składającej się fosforanu metakrylowego z dodatkiem różnych monomerów sieciujących.

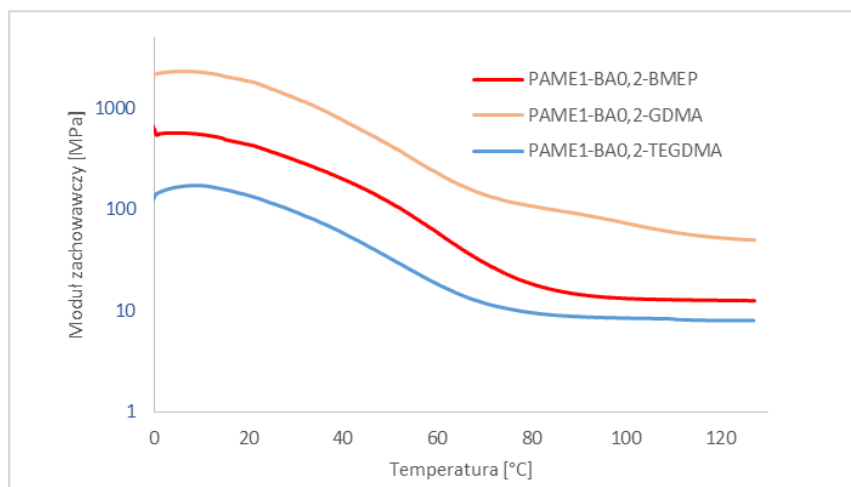
Część eksperymentalna: Badaniu poddano polimery fosforanu metakrylanu 2-hydroksyetylu (PAME), które rozcieńczono akrylanem butylu (BA) w stosunku molarowym 1:0,2, z dodatkiem 5%wg środka sieciującego w postaci glikolu trietylenowego (TEGDMA), dimetakrylanu glicerolu (GDMA) i fosforanu bis(2-metakryloiloksy)etylu (BMEP). Każdy z nich przygotowano poprzez odważenie do zlewki szklanej odpowiedniej ilości fosforanu metakrylanu 2-hydroksyetylu, akrylanu butylu oraz odpowiedniego

monomeru sieciującego. Następnie dodano 0,2% wagowych fotoinicjatora (2,2-dimetoksy-2-fenylacetofenonu), po czym dokładnie wymieszano zawartość zlewki do całkowitego rozpuszczenia fotoinicjatora. Mieszaninę umieszczono pomiędzy dwoma szkiełkami mikroskopowymi pokrytymi od wewnątrz folią polietylenową. Całość naświetlano światłem UV o długości fali 365 nm i natężeniu ok. 20 mW przez minutę z każdej strony. Otrzymane próbki miały postać prostopadłościennych kształtek.



Rys. 1. Struktury wykorzystanych monomerów.

Wyniki: Właściwości termomechaniczne zbadano wykorzystując instrument DMA Q800 V7.5 Build 127. Podczas analizy próbki prostopadłościenne były ogrzewane od 0°C do 130 °C z przyrostem temperatury 3°C/min i poddawane rozciąganiu z amplitudą oscylacji równą 15 μm. Rysunek 2 przedstawia przebieg krzywych modułu zachowawczego w funkcji temperatury.

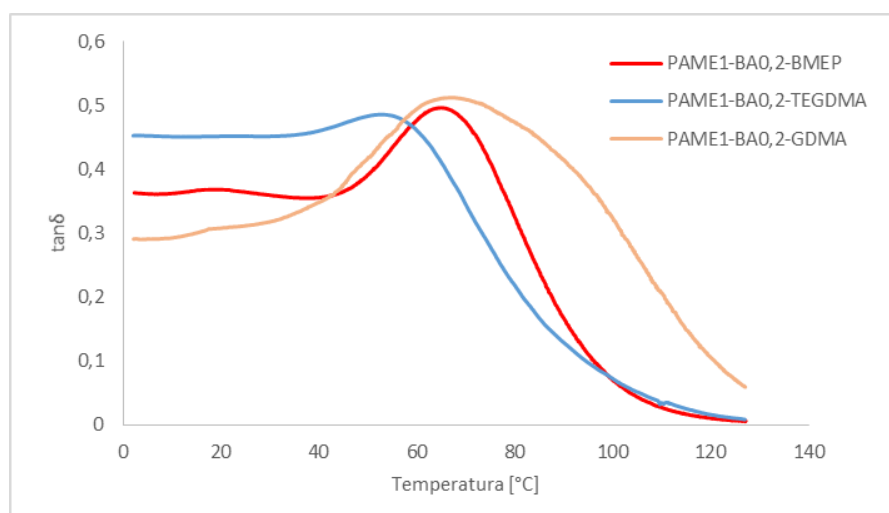


Rys. 2. Zmiana modułu zachowawczego w funkcji temperatury.

Tabela 1. Wartości modułu zachowawczego w temperaturze $\sim 0,5^{\circ}\text{C}$, modułu równowagowego i temperatur zeszklenia poszczególnych kopolimerów.

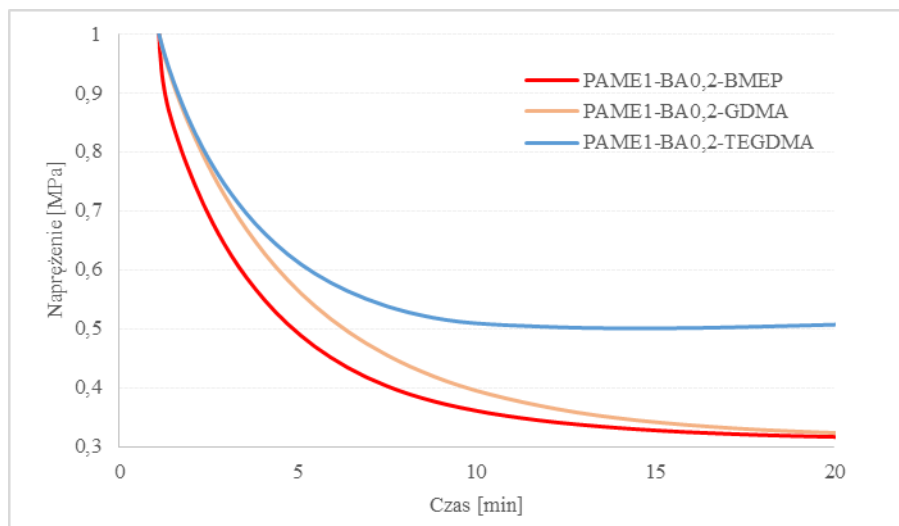
	Moduł w temperaturze $\sim 0,5^{\circ}\text{C}$ [MPa]	Moduł równowagowy [MPa]	T _g [°C]
PAME1-BA0,2-TEGDMA	143	8	53
PAME1-BA0,2-BMEP	553	12	65
PAME1-BA0,2-GDMA	2180	50	68

Każdy z trzech z polimerów charakteryzuje się różną wartością zarówno modułu zachowawczego w stanie szklistym jak i modułu równowagowego (Tabela 1.). Największe wartości modułów oraz osiągnięto w przypadku zastosowania GDMA, co może świadczyć o dobrych właściwościach sieciujących tego związku.



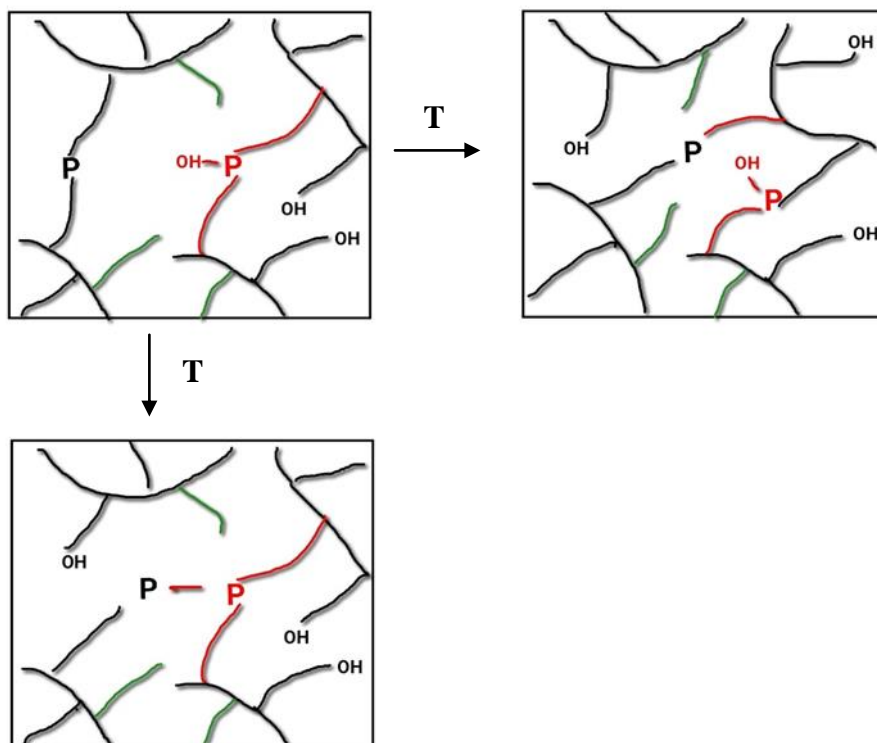
Rys. 3. Krzywe tangensa kąta przesunięcia fazowego.

Analiza tangensa kąta przesunięcia fazowego pozwoliła na wyznaczenie temperatur zeszklenia poszczególnych polimerów, które zostały przedstawione w Tabeli 1. Otrzymane wartości są zbliżone dla materiałów zawierających monomery z grupą OH. Krzywa kopolimeru z BMEP charakteryzuje się najbardziej regularnym kształtem i najmniejszą szerokością połówkową, wskazującą na większą jednorodność próbki. Analizy relaksacji naprężeń dokonano wykorzystując również instrument DMA Q800 V7.5 Build 127. Pomiary zostały przeprowadzone na próbkach prostopadłościennych, techniką rozciągania i w temperaturze 140°C przy odkształceniu 2%.



Rys. 4. Krzywe relaksacji naprężeń w temperaturze 140°C.

Powyższe krzywe dowodzą, że każdy z badanych materiałów jest zdolny do relaksacji naprężeń, jednak w różnym stopniu. Blisko 67% redukcji naprężeń (relaksacji) obserwowane jest przypadku próbek zawierających BMEP i GDMA, które zawierają grupy hydroksylowe, w odróżnieniu od TEGDMA, które takich grup nie posiadają. Wymiana z udziałem BMEP zachodzi najłatwiej ze względu na obecność fosforu, który sprzyja transestryfikacji (Rys.5.), natomiast w przypadku GDMA wymiana prawdopodobnie jest poprzedzona kondensacją PAME. W przypadku, gdy monomer sieciujący nie zawiera grupy OH (TEGDMA), relaksacja jest możliwa ze względu na grupy OH w głównym monomerze, która również może być poprzedzona kondensacją.



Rys. 5. Schemat reakcji wymiany na przykładzie sieci PAME1-BA0,2-BMEP.

Wnioski: Na podstawie powyższych danych można stwierdzić, że otrzymane polimery mimo takiej samej zawartości monomeru sieciującego wykazują różne właściwości. Analizowane w pracy materiały posiadają właściwości dynamiczne, jednak nie są zdolne do całkowitej relaksacji. Jednakże dodatek 5%wg monomeru zawierającego grupy hydroksylowe, biorące udział w transestryfikacji, korzystnie wpływa na stopień relaksacji.

Literatura:

1. M. Podgórski, B.D. Fairbanks, B.E. Kirkpatrick, M. McBride, A. Martinez, A. Dobson, N.J. Bongiardina, C.N. Bowman, *Adv. Mater.*, 32 (2020) 1906876.
2. Y. Liu, B. Wang, S. Ma, X. Xu, J. Qiu, Q. Li, S. Wang, N. Lu, J. Ye, J. Zhu, *European Polymer J.*, 144 (2021) 110236.
3. S. Majumdar, H. Zhang, M. Soleimani, R. A. T. M. van Benthem, J. P. A. Heuts, R.P. Sijbesma, *ACS Macro Lett.*, 9 (2020) 1753.
4. K. Deng, X. Feng, H. Yang, C. Yan, *European Polymer J.*, 196 (2023) 112286.
5. X. Feng, G. Li, *Chem. Eng. J.*, 417 (2021) 129132.

OCENA CYKLU ŻYCIA LAMINATÓW POLIESTROWO-SZKLANYCH MODYFIKOWANYCH WYBRANYMI ŚRODKAMI UNIEPALNIAJĄCYMI

A. DOWBYSZ¹, M. SAMSONOWICZ¹, B. KUKFISZ², J. PEŠTA³, V. MÓZER⁴, F. WALD⁴, ¹Politechnika Białostocka, Wydział Budownictwa i Nauk o Środowisku, Katedra Chemii, Biologii i Biotechnologii, Wiejska 45E, 15-351 Białystok, ²Akademia Pożarnicza, Instytut Inżynierii Bezpieczeństwa, Słowackiego 52/54, 01-629 Warszawa, ³Politechnika Czeska w Pradze, Uniwersyteckie Centrum Energooszczędnych Budynków, Trinecká 1024, 273-43 Buštěhrad, Czechy, ⁴Politechnika Czeska w Pradze, Wydział Inżynierii Ładowej, Thákurova 2077/7, 166-29 Praga, Czechy

Abstrakt: Celem pracy jest ocena cyklu życia procesu wytwarzania laminatów poliestrowo-szkłanych modyfikowanych wybranymi środkami uniepalniającymi. Analizę przeprowadzono zgodnie z normami ISO 14040/44 przy użyciu metody śladu środowiskowego. Badania wykazały wzrost negatywnego oddziaływania na środowisko procesu wytwarzania laminatów modyfikowanych w stosunku do niemodyfikowanych oraz wskazały na elementy systemu, które w największym stopniu wpływają na zwiększenie wskaźników kategorii wpływu.

Wprowadzenie: Środki uniepalniające, wykorzystywane jako dodatki m.in. do tworzyw sztucznych, wpływają na zmniejszenie palności materiałów, a co za tym idzie na zwiększenie bezpieczeństwa pożarowego. Istnieje kilkanaście grup środków uniepalniających, spośród których najczęściej stosowane są związki zawierające azot i fosfor, a także bor, magnez, cynę czy cynk [1]. Obecnie wiele uwagi poświęca się środkom uniepalniającym, które nie wykazują negatywnego wpływu na zdrowie ludzi i środowisko, w tym środkiem pochodzenia naturalnego [2], w związku z zagrożeniami, jakie wybrane środki uniepalniające mogą stwarzać po przedostaniu się do wody czy osadów [3]. Ocena cyklu życia LCA (ang. *Life Cycle Assessment*) stanowi narzędzie do analizy wpływu danego produktu czy procesu na środowisko. Przegląd badań nad LCA środków uniepalniających przeprowadzony przez Samani i in. [4] wskazuje na częste pomijanie dodatku środka uniepalniającego w LCA tworzyw sztucznych i kompozytów, pomimo ich istotnego wpływu na wyniki przeprowadzanych analiz. Celem pracy jest porównanie wpływu na środowisko procesów wytwarzania laminatu poliestrowo/szklanego modyfikowanego wybranymi środkami uniepalniającymi, tj. kwasem borowym (KB) oraz wodoro-fosforanem amonu (WA).

Część eksperymentalna: Ocenę cyklu życia przeprowadzono zgodnie z PN-EN ISO 14040 [5] i PN-EN ISO 14044 [6] z wykorzystaniem programu SimaPro wersja 9.4 (PRé Sustainability B.V, Netherlands) oraz bazy danych Ecoinvent wersja 3.10. W analizie uwzględniono częściowy cykl życia produktu (od kołyski do bramy), w tym produkcję surowców, transport i wytworzenie kompozytu. Jednostką funkcjonalną analizy stanowi płyta laminatu o wymiarach 60 cm x 20 cm wykonana metodą kontaktową z wykorzystaniem nienasyconej żywicy poliestrowej, utwardzacza i pięciu warstw maty szklanej o gramaturze 450 g/m². W przypadku laminatów modyfikowanych dodatkiem

środka uniepalniającego modyfikacja żywicy następowała przed przygotowaniem laminatu. Diagram przepływu dla procesu wytwarzania laminatu modyfikowanego środkiem uniepalniającym przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Diagram przepływu dla technologii wytwarzania laminatu modyfikowanego środkiem uniepalniającym.

Bilans materiałowy składów laminatów, w tym niemodyfikowanego (L), modyfikowanego dodatkiem KB (LKB) w ilości 10 % wag., oraz modyfikowanego dodatkiem WA (LWA) w ilości 10 % wag. przedstawiono w Tabeli 1. Określenie zbioru wejść i wyjść oparto na danych eksperymentalnych przeprowadzonych w skali laboratoryjnej. Proces wytwarzania obejmował dodatkowo cięcie włókna szklanego, wykorzystanie rozdzielacza, mieszanie żywicy ze środkiem uniepalniającym oraz utwardzaczem, a także odpowiedzenie żywicy (zużycie energii elektrycznej w ilości 0,805 kWh i 0,826 kWh odpowiednio dla laminatu niemodyfikowanego oraz laminatów modyfikowanych). Oceny oddziaływania laminatów na środowisko dokonano według metody śladu środowiskowego. Wskaźniki kategorii oddziaływania wraz z jednostkami przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 1. Składy laminatów poliestrowo-szklanych poddawanych analizie.

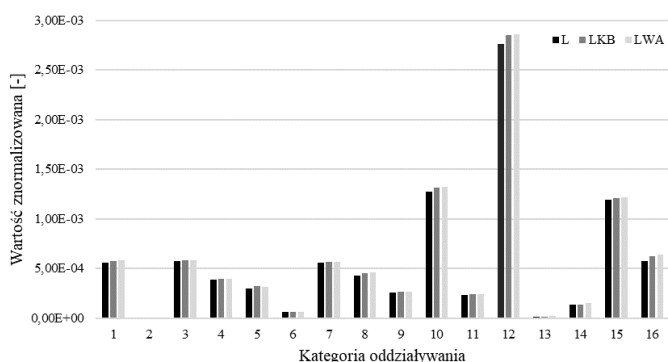
Składnik [g]	Laminat		
	L	LKB	LWA
Nienasycona żywica poliestrowa	632,81	632,81	632,81
Utwardzacz	12,66	12,66	12,66
Mata szklana	316,41	316,41	316,41
Kwas borowy	-	63,28	-
Wodorofosforan amonu	-	-	63,28

Tabela 2. Wskaźniki kategorii oddziaływania wg metody oceny śladu środowiskowego [7].

Lp	Kategoria oddziaływania	Skrót	Jednostka
1	Zmiana klimatu ogółem	GWP100	kg ekwiwalentu CO ₂
2	Zubożenie warstwy ozonowej	ODP	kg ekwiwalentu CFC-11
3	Działanie toksyczne dla ludzi, rakotwórcze	CTU _h	CTU _h
4	Działanie toksyczne dla ludzi, inne niż rakotwórcze	CTU _h	CTU _h
5	Cząstki stałe	-	zachorowalność
6	Promieniowanie jonizujące, zdrowie człowieka	U ²³⁵	kBq ekwiwalentu U ²³⁵
7	Fotochemiczne powstawanie ozonu, zdrowie człowieka	-	kg ekwiwalentu NMLZO
8	Zakwaszenie	-	ekwiwalent mola H ⁺

9	Eutrofizacja lądowa	-	ekwiwalent mola N
10	Eutrofizacja wód słodkich	P	kg ekwiwalentu P
11	Eutrofizacja wód morskich	N	kg ekwiwalentu N
12	Ekotoksyczność dla wody słodkiej	CTU _e	CTU _e
13	Użytkowanie gruntów	-	wielkość bezwymiarowa
14	Zużycie wody	-	ekwiwalent ilości wody, jakiej pozbawiony został użytkownik, w m ³
15	Wykorzystywanie zasobów, minerały i metale	ADP	kg ekwiwalentu Sb
16	Wykorzystywanie zasobów, surowce kopalne	ADP – surowce kopalne	MJ

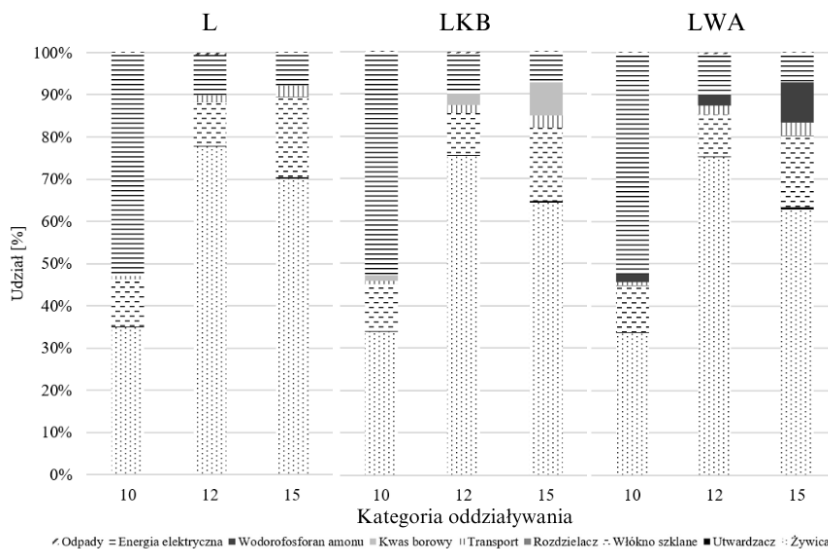
Wyniki: Wyniki porównawczej oceny wpływu procesów wytwarzania laminatów przedstawiono na rysunku 2. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że wytworzenie laminatu LWA wykazuje największy negatywny wpływ na środowisko w większości kategorii. Niższe wartości uzyskał on w kategoriach cząstki stałe oraz eutrofizacja wód słodkich i słonych, w których to wytwarzanie LKB wykazuje największe oddziaływanie. Wytwarzanie laminatów modyfikowanych powoduje wzrost wskaźników kategorii oddziaływań w zakresach 1,3-8,9 % (LKB) oraz 1,9-30,3 % (LWA). Najwyższy wzrost odnotowano dla LWA w kategorii oddziaływania użytkowanie gruntów. Wszystkie laminaty wykazały największy wpływ na ekotoksyczność dla wody słodkiej, przy czym wzrosty dla wytwarzania LKB i LWA wyniosły odpowiednio 3,3 % i 3,4 %. Procesy wytwarzania laminatów wykazują najmniejsze oddziaływanie w kategoriach zubożenia warstwy ozonowej, użytkowania gruntów oraz promieniowania jonizującego. Porównanie procesów wytwarzania wszystkich laminatów wskazuje, że wytworzenie niemodyfikowanego laminatu charakteryzuje się najmniejszym wpływem na środowisko we wszystkich kategoriach.



Rys. 2. Znormalizowane wartości oddziaływań procesów wytwarzania laminatów we wszystkich kategoriach wpływu (numeracja zgodnie z Tab. 1).

Na podstawie rysunku 3 porównującego udziały poszczególnych elementów systemu w trzech kategoriach oddziaływań, w których wykazano największe negatywne oddzia-

ływanie na środowisko stwierdzono, że wykorzystana żywica, włókno szklane oraz zużycie energii stanowią elementy o wysokim wpływie na wysokość wskaźników.



Rys. 3. Udział procentowy elementów systemu w wybranych kategoriach oddziaływania (numeracja zgodnie z Tab. 1).

Wnioski: Badania dowiodły, że wytwarzanie laminatów modyfikowanych wykazuje wyższy negatywny wpływ na środowisko w porównaniu do laminatu niemodyfikowanego, a modyfikacja wodorofosforanem amonu może stanowić większe obciążenie dla środowiska niż dodatek kwasu borowego. Warto zaznaczyć, że badania dotyczyły procesu wytwarzania laminatów w warunkach laboratoryjnych, a ich wytwarzanie w skali przemysłowej może wpłynąć na zmniejszenie negatywnego oddziaływania. W związku z wysokim udziałem żywicy, maty szklanej oraz zużycia energii elektrycznej we wskaźniki wpływu, przyszłe badania powinny skupić się na poszukiwaniu bardziej zrównoważonych rozwiązań w zakresie tych elementów systemu.

Badania zrealizowano w ramach: pracy badawczej WI/WB-IIŚ/8/2022 i współfinansowano z subwencji przekazanej przez Ministra Edukacji i Nauki, oraz przez rządy Czech, Węgier, Polski i Słowacji poprzez Granty Wyszehradzkie z Międzynarodowego Funduszu Wyszehradzkiego.

Literatura:

1. A. Dowbysz, M. Samsonowicz, B. Kukfisz, *Materials*, 14 (2021) 1.
2. A. Dowbysz, M. Samsonowicz, B. Kukfisz, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 19 (2022) 1.
3. A. Dowbysz, M. Samsonowicz, B. Kukfisz, *J. Water Land Dev.*, 59 (2023) 44.
4. P. Samani, Y. van der Meer, *J. Clean. Prod.*, 274 (2020) 1.
5. PN-EN ISO 14040:2009 Zarządzanie środowiskowe - Ocena cyklu życia - Zasady i struktura.
6. PN-EN ISO 14044: 2009 Zarządzanie środowiskowe - Ocena cyklu życia – Wymagania i wytyczne.
7. Sprostowanie do zalecenia Komisji (UE) 2021/2279 z dnia 15 grudnia 2021 r. w sprawie stosowania metod oznaczania śladu środowiskowego do pomiaru efektywności środowiskowej w cyklu życia produktów i organizacji oraz informowania o niej (Dz.U. L 471 z 30.12.2021).

ANALIZA TERMICZNA I MORFOLOGICZNA MATRYC BIOPOLIMEROWYCH Z ALGINIANU WAPNIA

A. WAWSZCZAK¹, M. CZEMIERSKA², A. JAROSZ-WILKOŁAZKA², D. KOŁODYŃSKA¹, ¹UMCS, Wydział Chemii, Katedra Chemii Nieorganicznej, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 2, 20-031 Lublin, ²UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademicka 19, 20-033 Lublin

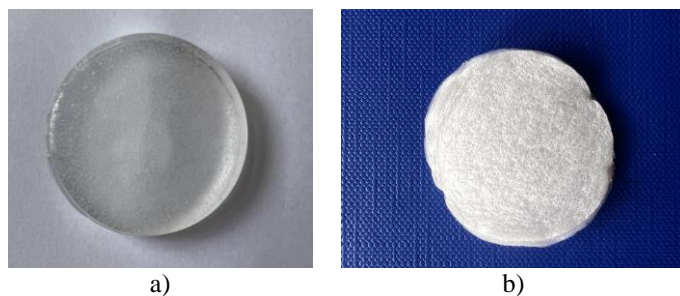
Abstrakt: Alginian, czyli polimer pochodzący ze ścian komórkowych alg brunatnych, wyróżnia się wyjątkową zdolnością do tworzenia żelu pod wpływem jonów wapnia. Ceniony za swoją biokompatybilność, biodegradowalność i zdolność do kapsułkowania szerokiej gamy substancji, czyni go nieocenionym materiałem w różnych dziedzinach, takich jak biomedycyna, technologia żywności i inżynieria środowiska. W świetle stopniowo rosnącej popularności tego typu związków podjęto się kompleksowej charakterystyki fizykochemicznej alginianu wapnia koncentrując się wokół wykorzystania zaawansowanych technik analitycznych, w tym analizy termogravimetrycznej (TG, DTG), skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) oraz porozymetrii (ASAP). Ich zastosowanie pozwoliło na ustalenie stabilności fizykochemicznej, kinetyki rozkładu termicznego oraz morfologii powierzchni matryc biopolimerowych na bazie alginianu wapnia.

Wprowadzenie: W ostatnim czasie obserwuje się wzmożone zainteresowanie biopolimerami, co wynika z ich fundamentalnego znaczenia dla rozwoju technologii zrównoważonych oraz ich korzystnych właściwości ekologicznych i biologicznych. Naturalne polimery, dzięki swojej biodegradowalności, biokompatybilności oraz braku toksyczności, stanowią kluczowe komponenty w pionierskich rozwiązaniach technologicznych. Jednym z przedstawicieli biopolimerów jest alginian, pozyskiwany z brunatnych alg morskich [1]. Składa się z reszt mannuronianu i guluronianu oraz posiada zdolność sieciowania w obecności jonów wapnia, w wyniku czego powstaje hydrożel [2]. Odpowiednio zaprojektowana struktura alginianu wapnia pozwala na zastosowanie tego typu związków jako nośników w biotechnologii [3], do kapsułkowania farmaceutyków [4], w inżynierii tkankowej [5] lub jako bioadsorbentów do usuwania zanieczyszczeń [6], a nawet w rolnictwie. W pracy przedstawiono badania nad syntezą matryc z alginianu sodu o trzech różnych stężeniach tj. 1%, 3% i 5%, wykorzystując metodę jonowego sieciowania wewnętrznego. Otrzymane matryce zostały poddane analizie morfologicznej i termogravimetrycznej.

Część eksperymentalna: W procesie syntezy matryc biopolimerowych zastosowano alginian sodu, węglan wapnia, glukono- δ -lakton oraz etanol. Roztwory wodne alginianu sodu przygotowano w stężeniach masowych wynoszących odpowiednio 1%, 3% i 5%. W trakcie procesu rozpuszczania alginianu sodu w wodzie zastosowano niewielką ilość etanolu w początkowej fazie mieszania. Dodatek etanolu został użyty w celu ułatwienia homogenizacji roztworów wodnych alginianu sodu. Następnie do mieszaniny wprowadzono odważkę węglanu wapnia w określonym stosunku do alginianu sodu, oznaczonym jako 0,15:1 m/m. Węglan wapnia zdyspergowano przy użyciu mieszadła magnetycznego. W kolejnym kroku dodano glukono- δ -lakton, a całość przelano do wcześniej przygotowanych form, gdzie pozostawiono do usieciowania na okres jednej doby. Uformowane

w ten sposób żele poddano następnie procesowi zamrażania, a później liofilizacji, w celu osiągnięcia porowatej struktury.

Wyniki: Matryce otrzymane z alginianu sodu o stężeniu 3% po usieciowaniu i po liofilizacji przedstawiono na rys.1.



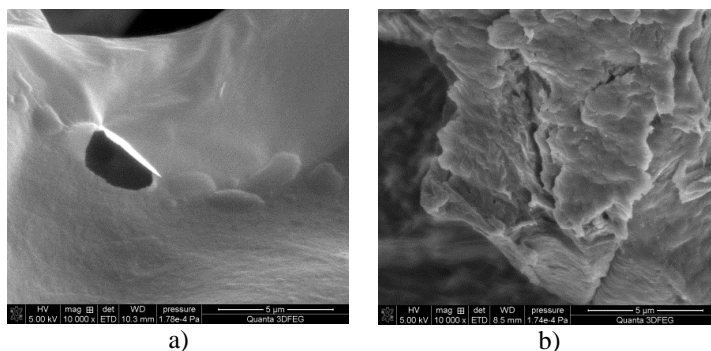
Rys.1. Matryce otrzymane z alginianu sodu o stężeniu 3% po usieciowaniu a), po liofilizacji b).

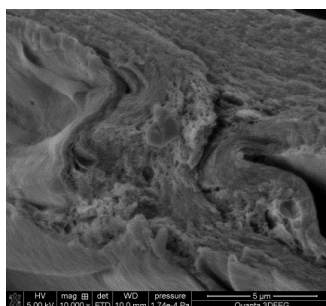
W Tab. 1, na podstawie wyznaczonych izoterm adsorpcji azotu oszacowano i przedstawiono podstawowe parametry strukturalne charakteryzujące porowatość otrzymanych matryc.

Tabela 1. Charakterystyki strukturalne matryc otrzymanych z alginianu sodu o stężeniu: 1% - ALG1, 3% - ALG3, 5% - ALG5

Próbka	S_{BET} [m^2/g]	V [cm^3/g]	R_{sr} [nm]
ALG1	3,62	0,019	13,37
ALG3	11,02	0,077	18,85
ALG5	11,13	0,071	16,93

gdzie: S_{BET} – powierzchnia właściwa wyznaczona metodą BET, V – całkowita objętość porów, R_{sr} – średni rozmiar porów

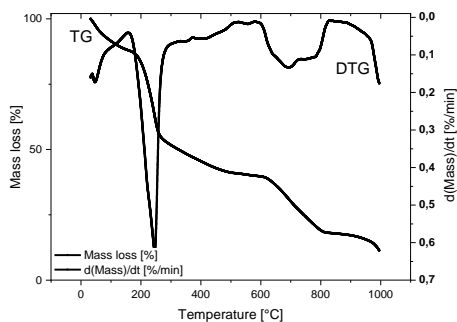




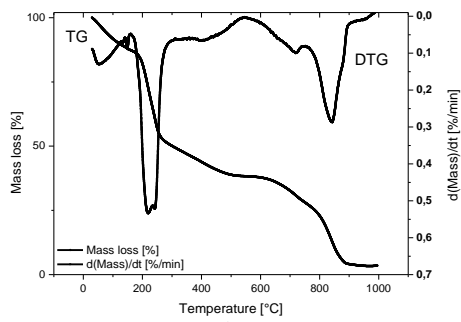
c)

Rys. 2. Zdjęcia mikroskopowe SEM o powiększeniu $\times 10\,000$ matryc otrzymanych z alginianu sodu o stężeniu a) 1%, b) 3% oraz c) 5%.

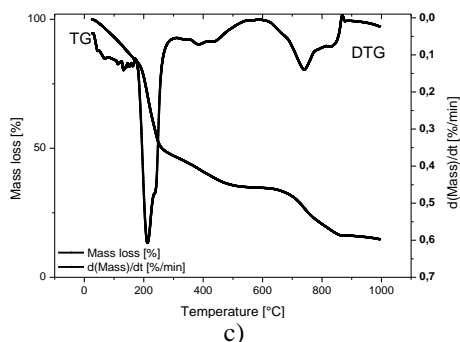
Zdjęcie SEM odpowiadające matrycy otrzymanej z 1% alginianu sodu wskazuje na heterogeniczną budowę otrzymanego materiału z otwartymi porami o nieregularnych wielkościach (rys.2a). Taka struktura może sprzyjać lepszej adsorpcji substancji bioaktywnych, jednakże może to również wpływać na obniżoną stabilność mechaniczną matrycy. Porowatość matrycy otrzymanej z 3% alginianu sodu (rys.2b) jest większa niż w przypadku próbek otrzymanych z 1% alginianu sodu. Zdjęcie SEM przedstawione na rys.2c pozwala zauważyć złożoną, gęstą strukturę o wyraźnie warstwowym układzie, przypominającą gąbczastą substancję. Rozmiary porów są zredukowane, a ich dystrybucja jest bardziej jednorodna, co jest charakterystyczne dla matryc o zwiększonej zawartości polimeru. Taki układ może odgrywać istotną rolę w zastosowaniach wymagających większej stabilności mechanicznej, także w kontekście przedłużonego uwalniania leków.



a)



b)



Rys. 3. Krzywe TG i DTG dla matryc otrzymanych z alginianu sodu o stężeniu a) 1%, b) 3% i c) 5%.

W początkowej fazie analizy termogravimetrycznej zanotowano 5% ubytek masy matryc ALG1 przy 64°C, ALG3 przy 71°C oraz ALG5 przy 83°C. Największy spadek masy (40%) dla ALG3 i ALG5 wystąpił przy 196°C, a dla ALG1 (40%) przy 210°C. Ubytek masy na poziomie około 20% zarejestrowano dla temperatur: 693°C (ALG1), 719°C (ALG3) oraz 741°C (ALG5). Dla matrycy otrzymanej z 1% alginianu sodu początkowa utrata masy jest przypisywana odparowaniu zarówno wody powierzchniowej jak i tej związanej wewnątrz struktury. Kolejny etap rozkładu związany jest z pękaniem wiązań glikozydowych, dekarboksylacją i dekarbonylacją, które są typowe dla rozkładu polisacharydów. Ostatni etap degradacji termicznej może być związany z dekompozycją najbardziej termicznie stabilnych składników matrycy, w tym pozostałych reszt węglowych. Analogiczne zjawiska można zaobserwować w matrycach otrzymanych z alginianu sodu o stężeniach 3% i 5%. Zauważalne jest, że zwiększenie stężenia alginianu sodu prowadzi do wyższej stabilności termicznej.

Wnioski: Stwierdzono zależność morfologiczną i termogravimetryczną od stężenia alginianu sodu zastosowanego do syntezy matryc, gdzie wyższe stężenia sprzyjały formowaniu zwartych i jednolitych struktur porowatych. Takie właściwości strukturalne są obiecujące w kontekście zastosowań, które zyskują na wyższej integralności mechanicznej oraz na możliwościach precyzyjnego dawkowania uwalnianych leków. Z drugiej strony, matryce o większej średnicy porów, mogą być preferowane w aplikacjach wymagających zwiększonej przepuszczalności i adsorpcji. Ponadto, mogą być wykorzystywane w inżynierii tkankowej, gdzie przestrzenie międzykomórkowe mogą wspierać wzrost i infiltrację komórek.

Literatura:

1. H. Bojorges, A. López-Rubio, A. Martínez-Abad, M.J. Fabra, Trends Food Sci. Technol., 140 (2023) 104142.
2. I. Donati, B.E. Christensen, Carbohydr. Polym., 321 (2023) 121280.
3. E. Hubenova, M. Mitov, Y. Hubenova, Bioelectrochemistry, 150 (2023) 108354.
4. S. Giri, T.S. Markandeywar, Z. Irfan, S. Manna, Food Hydrocoll. Health, 4 (2023) 100156.
5. N. Farshidfar, S. Irvani, R.S. Varma, Mar. Drugs, 21 (2023) 189.
6. A.N. Doyo, R. Kumar, M.A. Barakat, J. Taiwan Inst. Chem. Eng., 151 (2023) 105095.

TOLERANCJA KADMU PRZEZ SZCZEPY *PSEUDOMONAS LUTEOLA* WYZIOLOWANE Z NIESKAŻONYCH GLEB

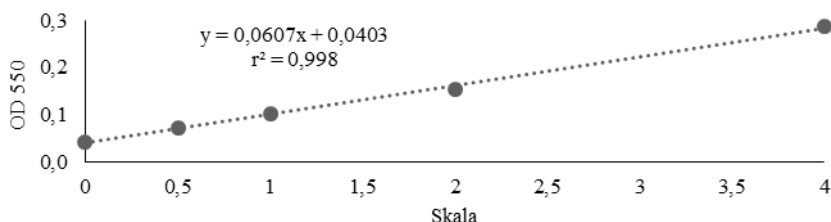
M. TYSZKO, M. MAJEWSKA, UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Abstrakt: Metale ciężkie działają jako czynnik selekcyjny i powodują istotne zmiany w strukturze i aktywności społeczności mikroorganizmów glebowych. Zdolność tolerancji metali ciężkich występuje prawie u wszystkich mikroorganizmów izolowanych z miejsc skażonych, ale jest możliwa nawet u izolatów pochodzących ze środowisk nieskażonych. Wybrane do badań szczepy *Pseudomonas luteola* (14 izolatów) zostały wyizolowane z gleb inicjalnych (Ziemia Wedla Jarlsberga, Spitsbergen) nie będących pod wpływem czynników antropogenicznych. Bakterie te produkowały charakterystyczny dla tego gatunku żółty i fluoryzujący barwnik. Badania wykazały, że pomimo przynależności to jednego gatunku, szczepy tolerowały różne stężenia kadmu w podłożu. Najwyższe stężenie Cd było tolerowane przez *P. luteola* 43, 44 i 46 (200 µg/ml Cd). Pozostałe szczepy można uszeregować według rosnącej tolerancji Cd w następujący sposób: 17 i 67 (60 µg/ml Cd); 29, 31, 79 i 80 (80 µg/ml Cd); 9, 11 i 23 (100 µg/ml Cd); 27 i 84 (150 µg/ml Cd).

Wprowadzenie: Kadm (Cd) występuje w stężeniu od 0,5 mg·kg⁻¹ w glebach czystych do 16 mg·kg⁻¹ w glebach obszarów przemysłowych. Jednak te wartości mogą być wielokrotnie wyższe (>100 mg·kg⁻¹) w glebach wokół kopalń i hut przetwarzających rudy metali [1]. Toksyczność metali ciężkich należy do grupy stresów chemicznych [1, 2]. Liczne mechanizmy oporności i tolerancji, w tym też adaptacji, jakie występują u organizmów dają im możliwość funkcjonowania w warunkach stresowych. Każdy organizm cechuje określony próg tolerancji na czynnik toksyczny. Tolerancja konstytutywna jest efektem naturalnych procesów metabolicznych, natomiast w wyniku indukcji może dojść do znaczącego podwyższenia jej poziomu (tolerancja indukowana) [2]. Dzięki selekcji i presji środowiskowej formują się społeczności mikroorganizmów opornych na coraz wyższe stężenia metali. Zdolność ich tolerancji można stwierdzić wśród kilku procent izolatów pochodzących z miejsc czystych, do prawie 100% izolatów ze środowisk silnie zanieczyszczonych [3]. Założono, że mikroorganizmy zasiedlające gleby na obszarach nie będących pod wpływem działalności człowieka, tj. Ziemia Wedla Jarlsberga na Spitsbergenie, również będą odporne na Cd. Badania Hanaka i innych [4] wykazały obecność Cd w tych glebach w stężeniu 0,02 - 0,59 mg·kg⁻¹. Celem badań było określenie poziomu tolerancji Cd przez losowo wybrane szczepy *Pseudomonas luteola* wyizolowane z inicjalnych gleb Spitsbergenu, wskazanie letalnej dawki Cd oraz kontrolującej długość fazy adaptacji komórek do warunków wzrostu (tzw. lag fazy).

Część eksperymentalna: Do badań wybrano 14 szczepów należących do gatunku *P. luteola* będących w kolekcji bakterii wyizolowanych z gleb północno-zachodniej części Ziemi Wedla Jarlsberga na Spitsbergenie [4, 5]. Ich przynależność gatunkowa została określona na podstawie testów biochemicznych API20NE zgodnie z instrukcją producenta (BioMérieux). Szczepy były przechowywane w temp. -80°C w formie zawie-

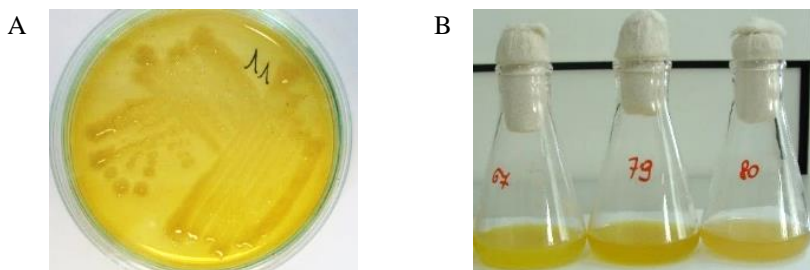
sin w buforze fosforanowym (pH 7,0) z dodatkiem glicerolu (50%). Po rozmrożeniu, 0,2 ml zawiesiny każdej bakterii zostało naniesione na powierzchnię agaru odżywczego i inkubowane przez 4 dni w temperaturze 28°C [6]. Po sprawdzeniu czystości przechowywanych kultur namnożono je w płynnym podłożu bulionowym (2 dni, 28°C). Po tym czasie hodowle zebrano metodą wirowania (15 minut, 10 000 rpm), biomasę przepłukano i zawieszono w roztworze soli fizjologicznej (0,9% NaCl). Określono gęstość komórek bakteryjnych bazując na spektrofotometrycznym pomiarze OD ($\lambda = 550$ nm) oraz skali McFarlanda (Rys. 1). Przygotowane zawiesiny bakterii rozcieńczono tak, aby uzyskać gęstość komórek 0,5 w skali McFarlanda. Zawiesiny te służyły do inokulacji podłóż hodowlanych.



Rys. 1. Krzywa wzorcowa, równanie prostej oraz współczynnik determinacji liniowej r^2 wyrażające zależność pomiędzy zmniejszeniem próby (OD 550) a skalą McFarlanda.

Bakterie hodowano na płynnych podłożach (skład: 5 g glukozy, 1 g peptonu, 1 g NaNO_3 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g ekstraktu drożdżowego, 1000 ml H_2O , pH 6,4) z dodatkiem kadmu ($\text{CdCl}_2 \times 2,5 \text{H}_2\text{O}$) w stężeniu od 0 do 200 $\mu\text{g/ml}$ Cd. Inkubację prowadzono w temp. 28°C. Po 24, 48 i 96 godzinach wykonano pomiar OD ($\lambda = 550$ nm) i obliczono liczbę komórek w 1 ml hodowli.

Wyniki: Szczepy *P. luteola* wydzielały do podłoża żółty, fluoryzujący barwnik (Rys. 2). Różniły się między sobą zdolnością do upłynniania żelatyny oraz możliwością asymilacji kwasu dekanowego i fenyllooctowego (Tabela 1). Siedem szczepów (11, 17, 23, 27, 31, 79 i 80) posiadało aktywną proteazę odpowiedzialną za hydrolizę żelatyny. Natomiast szczepy *P. luteola* 11, 31 i 44 wykorzystywały jako jedyne źródło węgla i energii kwas dekanowy, a szczep *P. luteola* 23 kwas fenyllooctowy. Dla tych szczepów poziom identyfikacji biochemicznej był znacznie niższy (92,5%) niż dla pozostałych szczepów *P. luteola* (> 99%).



Rys. 2. Wzrost *P. luteola* 11 na agarze odżywczym przez 4 dni (A) oraz *P. luteola* 67, 79, 80 na płynnym podłożu bulionowym przez 2 dni (B) w temperaturze 28°C.

Tabela 1. Charakterystyka biochemiczna szczepów *P. luteola*.

Szczep	Poziom identyczności [%]	Denitryfikacja	Produkcja indolu	Fermentacja glukozy	Aktywność enzymów							Asymilacja									
					Hydrolaza argininy	Ureaza	Glukozydaza	Żelatynaza	Galaktozydaza	Oksydaza	Glukozy	Arabinozy	Mannozy	Mannitolu	Acetyloglukozaminy	Maltozy	Glukonianu potasu	Kw. dekanowego	Kw. adypinowego	Kw. jabłkowego	Cytrynianu sodu
9	99,8	+	—	+	—	—	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	—
11	92,5	+	—	+	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—
17	92,5	+	—	+	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	—
23	92,5	+	—	+	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+
27	92,5	+	—	+	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	—
29	99,8	+	—	+	—	—	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	—
31	98,8	+	—	+	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—
43	99,8	+	—	+	—	—	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	—
44	99,5	+	—	+	—	—	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—
46	99,8	+	—	+	—	—	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	—
67	99,8	+	—	+	—	—	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	—
79	92,5	+	—	+	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	—
80	92,5	+	—	+	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	—
84	99,8	+	—	+	—	—	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	—

+ wynik pozytywny, — wynik negatywny

Szczepy *P. luteola* różniły się wrażliwością na Cd wprowadzony do podłoża wzrostu. Stężenie 20 µg/ml Cd wyraźnie obniżyło gęstość 24-godzinnych hodowli *P. luteola* w porównaniu do hodowli kontrolnych (bez dodatku Cd), z wyjątkiem szczepu 9 i 84. Jednak dłuższy kontakt tych bakterii z Cd spowolnił ich namnażanie i w drugiej dobie ich gęstość była niższa niż w hodowli kontrolnej. Profile tolerancji Cd wyznaczone po 24 godzinach różniły się od tych określonych po 48 godzinach (Tabela 2). Natomiast wydłużenie inkubacji o kolejne 2 doby (do 96 godzin) już nie zmieniło ich profili (dane nieprezentowane). Stwierdzono, że najwyższe stężenie kadmu (200 µg/ml) było tolerowane przez *P. luteola* 43, 44 i 46 niezależnie od czasu prowadzenia hodowli. Stężenia Cd 150, 100 oraz 80 µg/ml zahamowały całkowicie wzrost, odpowiednio *P. luteola* 9, *P. luteola* 31 i 79 oraz *P. luteola* 17 i 67 również niezależnie od czasu prowadzenia hodowli. Można przypuszczać, że dla tych szczepów były to letalne dawki metalu. W przypadku pozostałych szczepów zaobserwowano adaptację do wyższych stężeń Cd trwającą około 48 godzin. Po 24 godzinach nie obserwowano wzrostu *P. luteola* 23, 29 i 80 w obecności 80 µg/ml Cd, ale po wydłużeniu hodowli do 48 godzin wzrost tych bakterii był widoczny przy tych dawkach Cd, a w przypadku *P. luteola* 23 nawet przy 100 µg/ml. Szczepy *P. luteola* 27 i 84 rosły w obecności, odpowiednio 80 i 100 µg/ml Cd, a po wydłużeniu hodowli również w obecności, odpowiednio 100 i 150 µg/ml Cd.

Bardzo ciekawym szczepem był *P. luteola* 11. Po 24 godzinach wzrost stwierdzono tylko w hodowli kontrolnej i zawierającej 20 µg/ml, a po 48 godzinach wzrost stwierdzono także w hodowlach zawierających od 40 do 100 µg/ml Cd.

Tabela 2. Gęstość hodowli *P. luteola* po 24 i 48 godzinach inkubacji w podłożu kontrolnym (bez Cd) oraz z dodatkiem Cd w stężeniu od 20 do 200 µg/ml; 0,0 – brak wzrostu.

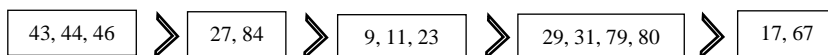
Szczep	24 godzinna inkubacja								48 godzinna inkubacja							
	0	20	40	60	80	100	150	200	0	20	40	60	80	100	150	200
	µg Cd ml ⁻¹								µg Cd ml ⁻¹							
9	2,1	2,1	1,8	0,8	0,7	0,7	0,0	0,0	2,5	2,1	1,8	1,1	1,1	1,1	0,0	0,0
11	2,2	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	0,0	0,0
17	2,1	1,9	1,7	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2	1,8	1,8	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0
23	2,8	1,8	0,8	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	2,9	2,2	2,1	1,3	1,3	1,3	0,0	0,0
27	2,9	1,6	1,4	1,4	1,1	0,0	0,0	0,0	2,2	1,7	1,7	1,5	1,5	1,4	0,9	0,0
29	2,7	1,2	1,2	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3	1,2	1,9	1,8	1,1	0,0	0,0	0,0
31	2,2	1,6	1,6	1,5	1,4	0,0	0,0	0,0	2,5	1,4	1,0	1,0	1,0	0,0	0,0	0,0
43	2,7	2,5	2,2	2,2	2,2	2,0	2,0	0,7	3,2	2,6	2,4	2,3	2,3	2,1	2,1	1,7
44	2,8	2,6	2,2	2,2	2,2	2,2	1,0	0,6	3,2	3,0	2,8	2,8	2,8	2,8	2,6	1,6
46	2,9	2,3	2,2	2,2	2,2	1,9	1,0	0,5	3,0	2,5	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	1,5
67	2,3	1,8	1,5	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	2,9	2,0	2,0	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0
79	2,6	1,5	1,5	1,5	1,5	0,0	0,0	0,0	2,5	1,6	1,6	1,6	1,5	0,0	0,0	0,0
80	2,2	1,3	1,3	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8	1,5	1,5	1,5	0,6	0,0	0,0	0,0
84	2,2	2,2	1,6	1,6	1,4	1,3	0,0	0,0	2,8	2,3	1,6	1,6	1,5	1,5	1,4	0,0

SKALA

3,5	3,0	2,5	2,0	1,0	0,5	0
-----	-----	-----	-----	-----	-----	---

 ×10⁸ komórek ml⁻¹

Wnioski: Badane szczepy wykazywały biochemiczne podobieństwo do gatunku *P. luteola* (poziom identyczności 92,5 - 99,8%). Produkowały żółty, fluoryzujący barwnik, jednak nie wszystkie były zdolne do asymilacji kwasu dekanowego lub fenyllooctowego oraz upłynniania żelatyny. Charakteryzowały się opornością oraz adaptacją do różnych stężeń Cd. Na podstawie tolerowanych, maksymalnych stężeń tego metalu szczepy *P. luteola* można uszeregować w następujący sposób:



Literatura:

1. A. Kabata-Pendias, B. Szteke, Pierwiastki śladowe w geo- i biosferze. Wydawnictwo IUNG-PIB, Puławy 2012.
2. M. Wierzbička, Ekotoksykologia: rośliny, gleby, metale, Wydawnictwo UW, Warszawa 2015.
3. S. Silver, L. Phung, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 32 (2005) 587.
4. A. Hanaka, A. Plak, P. Zagórski, E. Ozimek, A. Rysiak, M. Majewska, J. Jaroszuk-Ścisiel, Plant Soil 436 (2019) 49.
5. A. Hanaka, E. Ozimek, M. Majewska, A. Rysiak, J. Jaroszuk-Ścisiel, Int. J. Mol. Sci. 20 (2019) 1207.
6. M. Majewska, A. Hanaka, E. Ozimek, 54 Konferencja Mikrobiologiczna pt. Mikroorganizmy różnych środowisk, Lublin (2021) 96.

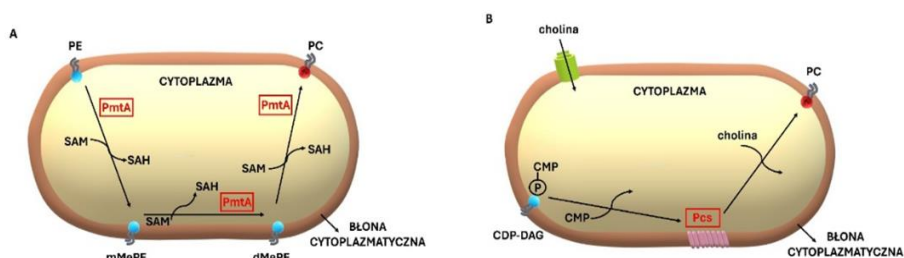
SZLAKI SYNTEZY FOSFATYDYLOCHOLINY U BAKTERII Z RODZAJU *LEGIONELLA*

J. TARASIUK¹, B. KOWALCZYK¹, K. PASTUSZAK², M. JURAK²,
M. PALUSIŃSKA-SZYSZ¹, ¹UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Genetyki
i Mikrobiologii, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin; ²UMCS, Wydział Chemii, Katedra
Zjawisk Międzyfazowych, Pl. M. Curie-Skłodowskiej 3, 20-031 Lublin

Abstrakt: Powszechnie występujące w środowisku wodnym pałeczki *Legionella*, po zakażeniu układu oddechowego człowieka poprzez skontaminowany aerozol, wywołują ciężkie zapalenie płuc, zwane chorobą legionistów. Głównymi składnikami okrywy komórkowej są lipidy, w tym fosfatydylocholina (PC). PC w komórkach bakterii *Legionella* spp. syntetyzowana jest za pośrednictwem dwóch szlaków: szlaku trzykrotnej *N*-metylacji fosfatydyloetanolaminy (PE) (szlak PMT) oraz w szlaku syntazy PC (PCS). U bakterii *L. pneumophila* dominującym szlakiem biosyntezy PC jest szlak PCS. Pozyskiwanie egzogennej choliny przez bakterie *L. pneumophila* na drodze PCS wpływa na zmianę syntezy PC, PE oraz kardiolipiny (CL) w porównaniu z bakteriami hodowanymi na podłożu bez dodatku choliny.

Wprowadzenie: PC jest głównym fosfolipidem błonowym wchodzącym w skład komórek eukariotycznych, który stanowi około połowę względnej zawartości wszystkich lipidów komórki [1]. Dominującymi zaś składnikami błon organizmów prokariotycznych jest fosfatydyloglicerol (PG), PE oraz CL, chociaż u niektórych bakterii występują również fosfatydyloinozytol (PI) oraz PC [1]. Szacuje się, że około 15% przedstawicieli domeny *Bacteria* ma zdolność do syntezy PC [2]. Zawartość procentowa PC w membranach komórek bakteryjnych mieści się w zakresie od kilku procent (*P. aeruginosa*) do 73% (*A. aceti*) [2]. Bakterie produkują PC za pośrednictwem czterech szlaków (PCS, PMT, szlak zależny od glicerolfosfocholiny (GPC) oraz szlak zależny od difosfocytydiny-choliny (CDP-choliny)). PC w komórkach bakterii głównie jest syntetyzowana w szlaku PMT i PCS. Podobnie jak u eukariontów, bakterie w pierwszym z wymienionych szlaków syntetyzują PC w wyniku trzykrotnej metylacji PE. Proces konwersji PC odbywa się przy udziale jednej lub kilku *N*-metylotransferaz fosfolipidowych (Pmt) [3-5]. Związkami pośrednimi są monometylofosfatydyloetanolamina (mMePE) i dimetylofosfatydyloetanolamina (dMPE), a donorem grup metylowych jest *S*-adenozylometionina (SAM). Podczas transmetylacji SAM ulega konwersji do *S*-adenozylhomocysteiny (SAH). Pomimo cech wspólnych w głównych etapach syntezy PC, enzymy Pmt katalizujące poszczególne reakcje charakteryzują się odmiennymi sekwencjami, jak również liczba tych enzymów jest zmienna. U bakterii wyodrębniono co najmniej dwie rodziny *N*-metylotransferaz, typ *Sinorhizobium* (Sm-PmtA) oraz typ *Rhodobacter* (Rs-PmtA). Enzymy typu Sm-PmtA wykazują homologię do metylazy rRNA, natomiast enzymy typu Rs-PmtA do metylotransferazy zaangażowanej w biosyntezę ubichinonu/menachinonu [6, 7]. Na podstawie analiz genomów bakteryjnych przypuszcza się, że występuje również Pmt o typie *Zymomonas* [2, 8]. W szlaku PCS zachodzi jedna reakcja, w której syntaza fosfatydylocholiny (Pcs) katalizuje przekształcenie diacyloglicerolo-5'-difosfocytydiny (CDP-DAG) i choliny do PC. Produktem tej reakcji jest monofosfocytydyna (CMP). Enzym Pcs jest wysoce hydrofo-

bowym białkiem utworzonym z 6 do 8 transbłonowych helis, które wykazują strukturalne podobieństwo z innymi fosfatydylotransferazami CDP-alkoholowymi [2]. Struktura enzymu Pcs zawiera charakterystyczny dla fosfatydylotransferaz CDP-alkoholowych motyw D-G-X2-A-R-X8-G-X3-D-X3-D [2]. Warto pokreślić, że szlak PCS występuje wyłącznie w domenie *Bacteria* i jest on energetycznie bardziej korzystny niż trzykrotna metylacja PE [9]. Kolejnym prokariotycznym szlakiem biosyntezy PC jest szlak CDP-choliny po raz pierwszy opisany u krętka *Treponema denticola* [10]. Pierwsze dwa etapy szlaku CDP-choliny katalizowane są przez dwufunkcyjny enzym LicCA (ang. CTP:phosphocholine cytidylyltransferase/choline kinase), odpowiedzialny za tworzenie CDP-choliny, który wykazuje częściową homologię sekwencji aminokwasowej do kinazy cholinowej *Saccharomyces cerevisiae* [11-13]. Enzym odpowiedzialny za katalizowanie ostatniego etapu szlaku prowadzącego do powstawania PC u krętka *T. denticola* nie został jeszcze zidentyfikowany. Prokariotyczny szlak CDP-choliny różni się od eukariotycznego szlaku Kennedy'ego, ponieważ co najmniej w dwóch pierwszych etapach szlaku wykorzystywane są inne enzymy. Opisano także czwarty szlak biosyntezy PC, wykryty po raz pierwszy w bakteriiach *Xanthomonas campestris*. Szlak ten zależny jest od glicerolofosfocholiny (GPC) wykorzystywanej jako substrat w dwuetapowej reakcji katalizowanej przez acylotransferazę [14]. Szlak biosyntezy PC zależny od GPC opisano także dla komórek drożdży *S. cerevisiae* [15]. Przez długi czas sądzono, że PC jest produkowana wyłącznie przez wyspecjalizowane bakterie np. wewnątrzkomórkowe patogeny, które są bezpośrednio związane z eukariotycznymi gospodarzami, obecnie wiadomo, że ta klasa fosfolipidów występuje u wielu filogenetycznie odmiennych drobnoustrojów [2]. Do bakterii, które są zdolne do syntezy PC należą wewnątrzkomórkowe patogeny z rodzaju *Legionella*. Bakterie te w środowisku naturalnym namnażają się w słodkowodnych pierwotniakach, a po przedostaniu się do organizmu człowieka proliferują w makrofagach płuc, powodując atypowe zapalenie zwane chorobą legionistów. Spośród czterech poznanych dotąd bakteryjnych szlaków biosyntezy PC, bakterie *Legionella* spp. syntetyzują PC na drodze dwóch niezależnych szlaków: szlaku PMT oraz szlaku PCS [1] (Rys. 1).



Rys. 1. Szlaki biosyntezy PC *L. pneumophila*: **A)** szlak *N*-metylacji PE (PMT); **B)** szlak syntazy PC (PCS). PC – fosfatydylocholina; PE - fosfatydyloetanolamina; mMePE - monometylofosfatydyloetanolamina; dMePE - dimetylofosfatydyloetanolamina; SAM - S-adenozynometionina; SAH - S-adenozylhomocysteina; CMP - monofosforan cytydyny; CDP-DAG - diacyloglicerolo-5'-difosfocytydina; Pcs - syntaza fosfatydylocholiny; PmtA - fosfolipidowa *N*-metylotransferaza [1].

Enzym PmtA *L. pneumophila* należy do typu Rs-Pmt [16]. Geny *pmtA* *Legionella* spp. kodują białka o aktywności *N*-metylotransferazy, które zostały przyporządkowane do klasy enzymatycznej EC 2.1.1.17 [27]. Długość tych białek wynosi od 208 do 218 aminokwasów, a domena katalityczna zawiera 9-aminokwasowy motyw V/ILE/D-X-G-X-G-X-G zaangażowany

żowany w wiązanie donora grypy metylowej - SAM [6, 7]. Analiza topologii błony wskazuje na cytoplazmatyczne umiejscowienie enzymu PmtA *Legionella* spp., a także możliwość jego wiązania z błoną wewnętrzną [17]. Gen *psc* *L. pneumophila* koduje wysoce hydrofobowe białko zbudowane z 255 aminokwasów, zawierające 8 transmembranowych helis z N- i C- końcami zlokalizowanymi wewnątrz komórki bakteryjnej. N-końcowa domena odpowiedzialna za aktywność enzymatyczną zawiera 27 aminokwasowy motyw D-G-X2-A-R-X8-P-X3-G-X3-D-X3-D. Gatunki należące do rodzaju *Legionella* wykazują znaczny stopień homologii sekwencji nukleotydowych genu *psc* (64%-98%) [17]. Szlak PCS stanowi dominujący szlak biosyntezy PC *L. pneumophila* [16]. Wykorzystanie egzogennej choliny przez *Legionella* spp. jako substratu w szlaku PCS prowadzi do zmiany zawartości poszczególnych klas fosfolipidów. *L. pneumophila* hodowana na podłożu z dodatkiem chlorku choliny syntetyzuje odpowiednio o 6% i 3% więcej PC i PE oraz o 9% mniej CL w porównaniu z bakteriami hodowanymi na podłożu bez choliny [17]. W przypadku innych gatunków *L. anisa*, *L. longbeachae*, *L. micdadei* bakterie hodowane na podłożu z dodatkiem i bez dodatku egzogennej choliny miały taką samą zawartość PC [17]. Dominującym szlakiem syntezy PC u *L. micdadei* był szlak PCS, a fosfolipid ten był wbudowywany głównie do membrany zewnętrznej. Dodatek choliny do podłoża spowodował zwiększenie zawartości PC w obu błonach *L. gormanii*, przy czym większy wzrost wystąpił w błonie wewnętrznej. Analiza porównawcza profilu PC *L. gormanii* oraz *L. micdadei* wykazała, że jest on charakterystyczny zarówno dla błony zewnętrznej jak i błony wewnętrznej, a dodatek choliny nie wpływał na zmianę długości i stopnia nienasycenia kwasów tłuszczowych budujących PC, ale decydował o różnicach ilościowych [17]. Zawartość i struktura fosfatydylocholin syntetyzowanych w szlaku PCS wpływa na poziom indukcji prozapalnych cytokin. Bakterie *L. anisa*, *L. longbeachae*, *L. gormanii* i *L. pneumophila* hodowane na pożywce z egzogenną choliną indukowały w makrofagach linii THP-1 znacznie niższą produkcję czynnika martwicy nowotworów (TNF- α) w porównaniu z bakteriami hodowanymi bez dodatku choliny. Dodatek choliny do podłoża wzrostowego *L. pneumophila*, *L. longbeachae* i *L. anisa* wpłynął na zmniejszenie produkcji interleukiny (IL-6) przez makrofagi stymulowane tymi bakteriami. Pałeczki *Legionella* w warunkach dostępności choliny słabiej pobudzają syntezę prozapalnych cytokin, zatem są mniej rozpoznawalne dla układu immunologicznego [17]. PC *L. pneumophila* jest niezbędna do wiązania się tych bakterii z makrofagami poprzez receptor czynnika aktywującego płytki (receptor PAF, ang. platelet-activating factor receptor), a efektywność tego procesu zależy od zawartości PC. Adhezja *L. pneumophila* do makrofagów jest blokowana przez antagonistę receptora PAF. Mutanty *L. pneumophila* defektywne w syntezie PC wykazują słabą zdolność przyłączania się do makrofagów i funkcjonowania systemu sekrecji typu IV (T4SS) Dot/Icm (ang. defective in organelle trafficking/intracellular multiplication), który jest kluczowy do wewnątrzkomórkowego namnażania się tych bakterii. Ze względu na chemiczne podobieństwo PC i PAF, PC może naśladować PAF i wiążąc się z jego receptorem zwiększać szansę na wychwytywanie bakterii przez makrofagi.

Wrażliwość bakterii *Legionella* na białka i peptydy przeciwdrobnoustrojowe może być również związana ze składem kwasów tłuszczowych oraz ich rozmieszczeniem (pozycja *sn-1/sn-2*) w strukturze fosfolipidów błonowych. Bogatym źródłem białek i peptydów odpornościowych jest hemolimfa gąsienic *Galleria mellonella*. *L. gormanii* była wrażliwa zarówno na ekstrakt hemolimfy oraz wyizolowana z hemolimfy apolipoporyna III (apoLp-III). Bakteriobójcza dawka apoLp-III była 8-krotnie niższa dla *L. gormanii* w porównaniu

do *L. dumoffii*, a gatunek *L. micdadei* nie był wrażliwy na działanie apoLp-III [18]. Wyższa wrażliwość *L. gormanii* na apoLp-III w porównaniu z innymi gatunkami *Legionella* wskazuje, na zróżnicowaną podatność tych bakterii na naturalne, przeciwdrobnoustrojowe białka, wynikająca z różnic w strukturze i fizyko-chemicznych właściwościach składników powierzchniowych komórek *Legionella*. Komórki *L. gormanii* po zadziałaniu apoLp-III wykazywały wzrost chropowatości powierzchni, której przyczyną mogło być pęknięcie komórki. Zaburzenia w regularnej strukturze powierzchni bakterii prawdopodobnie wynikały z wiązania się apoLp-III z fosfolipidami i/lub lipopolisacharydem *L. gormanii*. Tworzenie takich kompleksów zostało wykazane dla *L. dumoffii* [19]. Jedno-etapowy szlak syntezy PC pozwala bakteriom *Legionella* szybko dostosować fizjologię błony do adaptacji do zmieniających się warunków środowiska. Szlak PCS syntezy PC może pełnić rolę sensora środowiska, ponieważ prekursor biosyntetyczne obecne w tkance płuc wpływają na wirulencję *L. pneumophila* poprzez wbudowywanie PC do okrywy komórkowej tych bakterii [16]. Wiedza na temat szlaków syntezy PC bakterii *Legionella* jest istotna z terapeutycznego punktu widzenia, w szczególności blokowanie syntezy enzymu Pcs może stanowić potencjalny cel w opracowywaniu nowych leków do zwalczania legionellozy.

Literatura:

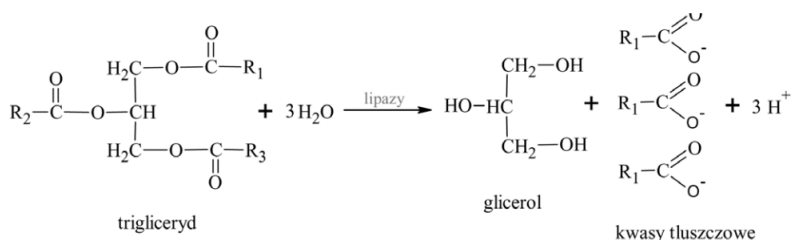
1. F. Martínez-Morales, M. Schobert, I.M. López-Lara, O. Geiger, *Microbiology*, 149 (2003) 3461.
2. Ch. Sohlenkamp, M.I. López-Lara, O. Geiger, *Prog. Lipid Res.*, 42 (2003) 115.
3. K.E. de Rudder, I.M. López-Lara, O. Geiger, *Mol. Microbiol.*, 37 (2000) 763–772.
4. S. Hacker, C. Sohlenkamp, M. Aktas, O. Geiger, F. Narberhaus, *J. Bacteriol.*, 190 (2008) 571.
5. A.C. Minder, K.E. de Rudder, F. Narberhaus, H.M. Fischer, H. Hennecke, O. Geiger, *Mol. Microbiol.*, 39 (2001) 1186.
6. S.F. Haydock, J.A. Dowson, N. Dhillon, G.A. Roberts, J. Cortes, P.F. Leadlay, *Mol. Genet. Genom.*, 230 (1991) 120.
7. D. Ingrosso, A.V. Fowler, J. Bleibaum, S. Clarke, *J. Biol. Chem.*, 264 (1989) 20131.
8. M. Aktas, M. Wessel, S. Hacker, S. Klüsener, J. Gleichenhagen, F. Narberhaus, *Eur. J. Cell Biol.* 12 (2010) 888.
9. O. Geiger, M.I. López-Lara, Ch. Sohlenkamp, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1831 (2013) 503.
10. C. Kent, P. Gee, S.Y. Lee, X. Bian, J.C. Fenno, *Mol. Microbiol.* 51 (2004) 471.
11. C.O. Rock, R.J. Heath, H.W. Park, S. Jackowski, *J. Bacteriol.*, 183 (2001) 4927.
12. H.A. Campbell, C. Kent, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1534 (2001) 85.
13. B.Y. Kwak, Y.M. Zhang, M. Yun, R.J. Heath, Ch.O. Rock, S. Jackowski, H-W. Park, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 4343.
14. R. Moser, M. Aktas, F. Narberhaus, *Mol. Microbiol.*, 91 (2014) 736.
15. K. Stalberg, A.C. Neal, H. Ronne, S. Ulf, *J. Lipid Res.*, 49 (2008) 1794.
16. G.M. Conover, F. Martínez-Morales, M.I. Heidtman, Z.Q. Luo, M. Tang, C. Chen, O. Geiger, R.R. Isberg, *Cell Microbiol.*, 10 (2008) 514.
17. M. Palusińska-Szys, A. Zdybicka-Barabas, B. Pawlikowska-Pawłęga, P. Mak, M. Cytryńska, *Int. J. Mol. Sci.*, 12 (2012) 17048.
18. M. Palusińska-Szys, A. Szuster-Ciesielska, M. Janczarek, S. Wdowiak-Wróbel, J. Schiller, E. Reszczyńska, W.I. Gruszecki, B. Fuchs, *Pathog Dis.*, 77 (2019) ftz065.
19. M. Palusińska-Szys, A. Zdybicka-Barabas, E. Reszczyńska, R. Luchowski, M. Kania, N. Gisch, F. Waldow, P. Mak, W. Danikiewicz, W.I. Gruszecki, M. Cytryńska. *Biochim. Biophys. Acta.*, 7(2016) 617.

SKRINING GRZYBÓW MEZOFILNYCH W REAKCJACH KATALIZOWANYCH PRZEZ LIPAZY

E. PLUTA, W. JĘDRYS, K. GDULA, M. KUTYŁA, M. TRYTEK, UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej, Akademicka 19, 20-031 Lublin

Abstrakt: W niniejszym badaniu przeprowadzono skryning grzybów mezofilnych pod kątem ich zdolności do katalizowania reakcji z udziałem lipaz. Przeprowadzone badania mają wykazać aktywność grzybów mezofilnych w reakcjach katalizowanych przez lipazy. Enzymy te są szeroko wykorzystywane w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym oraz kosmetycznym ze względu na ich zdolność do katalizowania reakcji estryfikacji, transestryfikacji i hydrolizy. W celu zidentyfikowania potencjalnych producentów lipaz, przetestowano wybrane gatunki grzybów mezofilnych. W kontekście przeprowadzonych badań wybrano cztery modelowe reakcje biokatalityczne: reakcję aminolizy, epoksydacji limonenu, estryfikacji alkoholu pierwszorzędowego monocyklicznego i bicyklicznego. Na podstawie przeprowadzonych badań wnioskowano, że niektóre gatunki grzybów mezofilnych wykazują wysoką aktywność katalityczną, co umożliwi ich potencjalne zastosowanie w przemyśle biotechnologicznym.

Wprowadzenie: Organizmy mezofilne obejmują gatunki grzybów, bakterii oraz archea przystosowanych do życia w środowiskach o umiarkowanych temperaturach w przedziale 20-45°C. Optymalna temperatura wzrostu mezofili 30-39°C umożliwia im wzrost w temperaturze ciała człowieka, powodując że stanowią one poważną grupę organizmów patogennych. Organizmy mezofile wykazują również szerokie zdolności w biodegradacji materii organicznej [1]. Lipazy (E.C.3.1.1.3), nazywane również acylohydrolazami triacyloglicerolowymi, to enzymy należące do klasy hydrolaz wykazujące zdolność do katalizowania reakcji hydrolizy trójglicerydów do glicerolu i wolnych kwasów tłuszczowych (Rys. 1). Enzymy te posiadają zdolność do katalizowania różnych reakcji chemicznych, w tym hydrolizy, transestryfikacji, interstryfikacji oraz syntezy estrów w środowisku bezwodnym [2]. Lipazy mają różnicowany charakter i są obecne w komórkach roślin, zwierząt oraz mikroorganizmów. Szczególnie lipazy pochodzące od drobnoustrojów stały się przedmiotem zainteresowania przemysłowego, głównie ze względu na ich zdolność do katalizowania szerokiej gamy reakcji, zarówno w środowisku wodnym, jak i niewodnym; możliwość funkcjonowania w szerokim zakresie temperatury i pH; stabilność w rozpuszczalnikach organicznych oraz selektywność względem budowy chemicznej, regionów w cząsteczkach i enenacjomerów [2, 3]. W przemyśle stosowane są głównie lipazy izolowane z komórek grzybowych. Wykorzystuje się je m.in. w przemyśle spożywczym, mleczarskim, farmaceutycznym, syntezie polimerów, produkcji detergentów i biodiesla oraz w rekultywacji odpadów. Jednakże koszt izolacji, oczyszczania i immobilizacji enzymów jest wysoki, co podnosi koszty produkcji [4]. Z tego względu coraz większym zainteresowaniem cieszy się wykorzystanie lipaz jako biokatalizatorów w formie enzymu związanego z hydrofobowymi strukturami grzybni [5,6].



Rys. 1. Hydroliza trójglicerydu katalizowana przez lipazę.

Część eksperymentalna: Badane gatunki grzybów mezofilnych: *Trichoderma harzianum* CBS, *Aspergillus oryzae*, *Rhizomucor miehei*, *Aspergillus wentii*, *Trichoderma harzianum* CBS 415.68, *Rhizopus oryzae* PSM 63539, *Fusarium solani* v. *radicule*, *Rhizopus oryzae* 3613, *Trichoderma harzianum* CBS 688.94, *Trichoderma reesei* F560, *Trichoderma harzianum* CBS 416.96. Grzyby hodowano w kolbach Erlenmeyera o poj. 300 mL w 100 mL jałowego płynnego podłoża podstawowego przez 4 dni w temp. 30°C (150 rpm) [6]. Po zakończeniu hodowli grzybnie oddzielono od płynu hodowlanego przez wirowanie przy 10 000 g przez 15 minut w temperaturze 4°C. Biomasa grzybni zamrożono w temperaturze -20°C przez noc, a następnie liofilizowano przez 24 godziny. Liofilizowane grzybnie zmielono i zastosowano jako biokatalizatory poszczególnych reakcji. Wymienione powyżej gatunki grzybów poddano analizie w kontekście czterech reakcji katalizowanych przez lipazy.

Reakcja aminolizy: Do 50 mg grzybni dodano 2 mL heksanu, 2,9 µL (10 mM) heksanianu metylu oraz 4,6 µL (20 mM) amylaminy. Fiolki szczelnie zamknięto i inkubowano w temperaturze 40°C przez 24 godziny.

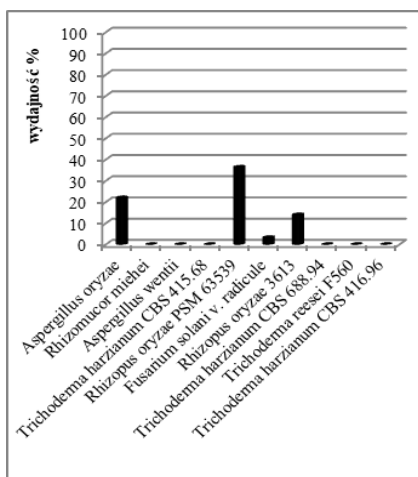
Reakcja epoksydacji limonenu: Do 50 mg grzybni dodano 2 mL octanu metylu, 23 µL limonenu, 93,1 µL 30% H₂O₂ oraz 35 µL kwasu octowego. Następnie szczelnie zamkniętą fiolkę inkubowano w temperaturze 55°C przez 4 godziny.

Reakcja estryfikacji alkoholu pierwszorzędowego monocyklicznego – alkoholu perylowego: Do 50 mg grzybni dodano 2 mL heptanu, 9,2 µL (50 mM) kwasu masłowego oraz 32 µL (100 mM) alkoholu perylowego. Następnie fiolki inkubowano w temperaturze w 40°C przez 24 godziny.

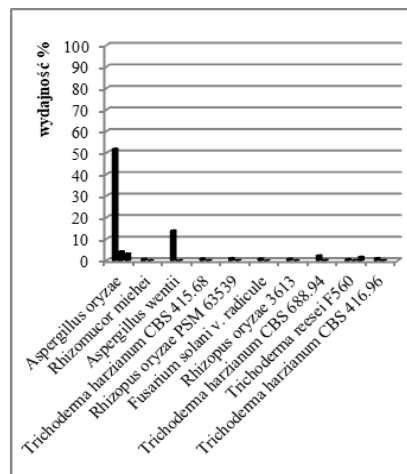
Reakcja estryfikacji alkoholu pierwszorzędowego bicyklicznego-myrlenolu: Do 50 mg grzybni dodano 2 mL heptanu, 9,2 µL (50 mM) kwasu masłowego oraz 32 µL (100 mM) myrlenolu. Następnie mieszaninę umieszczono w inkubatorze (40°C) na 24 godziny. Po upływie czasu inkubacji próbki przygotowano do chromatografii gazowej. W tym celu do fiolki chromatograficznej dodano 0,9 mL heksanu oraz 0,1 mL mieszaniny poreakcyjnej. Wydajność reakcji przedstawiono jako procent konwersji substratu do produktu poszczególniej reakcji.

Wyniki: W reakcji aminolizy największą wydajnością wykazał się *Rhizopus oryzae* PSM 63539 (36,4%), *Aspergillus oryzae* (22%), *Rhizopus oryzae* 3613 (14%), *Fusarium solani* v. *radicule* (3,27%) (Rys. 2). Natomiast w reakcji epoksydacji limonenu największą wydajność wykazał szczep *Aspergillus oryzae* (produkt 1 – 52%, produkt 2 – 4,6%, produkt 3 – 3,3%), *Aspergillus wentii* (produkt 1 – 1,4%, produkt 2 – 0,15%) (Rys. 3). Wydajność procentowa estryfikacji alkoholu perylowego wynosiła najwięcej u *Rhizopus*

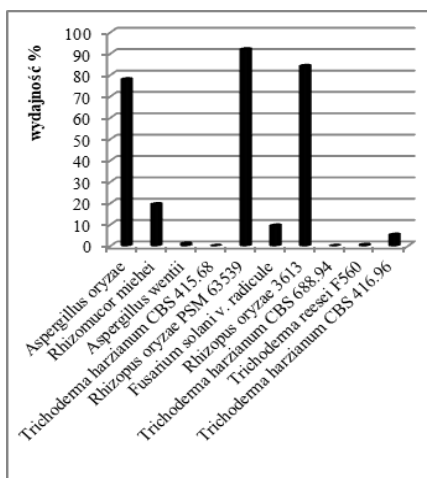
oryzae PSM 63539 (92%), *Rhizopus oryzae* 3613 (84,2%), *Aspergillus oryzae* (77,9%) i *Rhizomucor miehei* (19,5%) (Rys. 4). Największą wydajność procentową estryfikacji myrtenolu wykazał *Rhizopus oryzae* PSM 63539 (74%), *Rhizopus oryzae* 3613 (69%) *Aspergillus oryzae* (45%) i *Aspergillus wentii* (19,5%) (Rys. 5).



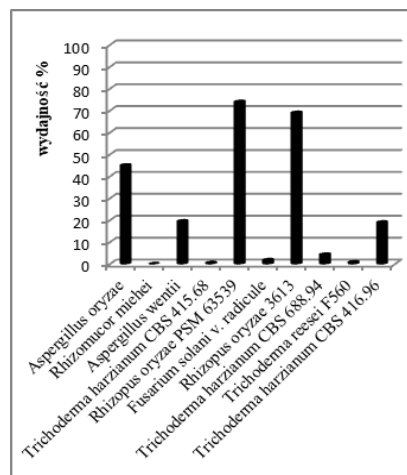
Rys. 2. Wydajność procentowa aminolizy katalizowanej przez liofilizowaną grzybnię grzybów mezofilnych.



Rys. 3. Wydajność procentowa epoksydacji limonenu katalizowanej przez liofilizowaną grzybnię grzybów mezofilnych.



Rys. 4. Wydajność procentowa estryfikacji alkoholu perylowego katalizowanej przez liofilizowaną grzybnię grzybów mezofilnych.



Rys. 5. Wydajność procentowa estryfikacji myrtenolu katalizowanej przez liofilizowaną grzybnię grzybów mezofilnych.

Wnioski: Z uzyskanych wyników można wnioskować, że najbardziej wydajnym grzybem mezofilnym wykazującym najwyższą aktywność katalityczną we wszystkich reakcjach jest *Aspergillus oryzae*. W większości reakcji szczególnie wysoką aktywność wykazują również *Rhizopus oryzae* PSM 63539 oraz *Rhizopus oryzae* 3613. Do najaktywniejszych grzybów mezofilnych w reakcji aminolizy zalicza się *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oryzae* PSM 63539 oraz *Rhizopus oryzae* 3613. W przypadku reakcji epoksydacji limonenu największą aktywność wykazuje *Aspergillus oryzae*. Podczas reakcji estryfikacji alkoholu perylowego największą wydajność katalityczną wykazały grzybnie *Aspergillus oryzae* oraz *Rhizopus oryzae* PSM 63539. W ostatniej reakcji estryfikacji myrtenolu najwyższą aktywność katalityczną wykazały *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oryzae* PSM 63539 oraz *Rhizopus oryzae* 3613.

Literatura:

1. E. Lasoń, J. Ogonowski, *Chemik*, 64 (2010) 2
2. J. L. Adrio, A. L. Demain, *International Microbiology*, 6 (2003) 191.
3. K. Geoffry, R.N. Achur, *Biocat. Agricult. Biotechnol.*, 14 (2018) 241.
4. G. Rabbani, E. Ahmad, A. Ahmad, R.H. Khan, *Int. J. Biol. Macromolecul.*, 225(2023) 822.
5. G.K. Meghwanshi, A. Vashishtha, *Biotechnology of fungal lipases. Fungi and their role in sustainable development: Current perspectives*, 2018.
6. M. Kutyla, N. Jaszek, W. Jędryś, S. Graba, E. Pluta, K. Gdula, A. Batyra, A. Szczepańska, A. Śliwa, L. Cieślak, A. Marzec-Grządziel, M. Trytek, *Biochem. Eng. J.*, 204 (2024).

ZASTOSOWANIE RÓŻNYCH CZYNNIKÓW SIECIUJĄCYCH DO IMMOBILIZACJI DEHYDROGENAZY CELOBIOZOWEJ

W. PIĄTEK-GOŁDA, M. OSIŃSKA-JAROSZUK, J. SULEJ, UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych, Katedra Biochemii i Biotechnologii, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Abstrakt: Dehydrogenaza celobiozowa (CDH) to zewnątrzkomórkowa hemoflawoproteina produkowana przez grzyby rozkładające drewno. Ze względu na unikalną budowę oraz właściwości, CDH wykazuje ogromny potencjał aplikacyjny w wielu gałęziach przemysłu. Aby w pełni wykorzystać możliwości tego biokatalizatora, niezbędne jest unieruchomienie go na odpowiednim nośniku. Celem pracy była ocena wydajności procesu immobilizacji dehydrogenazy celobiozowej z *Phanerochaete chrysosporium*, na makrosferach chitosanowych, po zastosowaniu różnych czynników sieciujących.

Wprowadzenie: Dehydrogenaza celobiozowa (CDH; EC1.1.99.18) jest zewnątrzkomórkowym flawohemoenzymem wytwarzanym przez dużą liczbę grzybów odpowiedzialnych za degradację drewna. Zawiera dwa kofaktory (FAD i hem) połączone proteolitycznie wrażliwym łącznikiem peptydowym [1,2]. CDH katalizuje reakcje utleniania sacharydów, zawierających wiązanie β -1,4-glikozydowe, takich jak celobioza i laktoza, do odpowiednich laktonów spontanicznie przekształcanych w kwasy aldonowe [3]. Ze względu na swoje unikalne właściwości dehydrogenaza celobiozowa znalazła zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu, np. w przemyśle spożywczym, mleczarskim, petrochemicznym czy w biomedycynie [2]. W ostatniej dekadzie zespoły naukowe skupiają się na badaniu działania przeciwdrobnoustrojowego i przeciwutleniającego tego biokatalizatora. Dużym ograniczeniem w prowadzonych badaniach jest zastosowanie wolnych enzymów. W celu poprawy właściwości katalitycznych i stabilności badanych biokatalizatorów stosuje się proces immobilizacji (unieruchamiania) enzymu na stałej, nierozpuszczalnej w środowisku reakcji matrycy [4]. Unieruchomienie biokatalizatora znacząco poprawia stabilność jego struktury, w różnych warunkach reakcji, czego efektem może być m.in. zwiększona termostabilność, a tym samym odporność na działanie czynników denaturujących. Ponadto, takiego układu enzymatycznego można użyć wielokrotnie bez utraty jego aktywności, biokatalizator w łatwy sposób może zostać odzyskany z mieszaniny reakcyjnej, a otrzymany produkt odznacza się wysoką czystością [4,5]. Do immobilizacji stosuje się nośniki nieorganiczne takie jak szkło o kontrolowanej porowatości czy żel krzemionkowy oraz matryce organiczne pochodzenia syntetycznego np. poli(alkohol winylowy) i poli(kwas akrylowy) oraz naturalnego, w tym alginian, żelatynę czy chitosan [4,5,6]. Chitosan jest naturalnym polimerem hydrofilowym z dużą ilością pierwszorzędowych grup aminowych. Charakteryzuje się brakiem toksyczności, wysoką biokompatybilnością i reaktywnością chemiczną, a także łatwym wiązaniem enzymu [7]. Stanowi on doskonałą matrycę do immobilizacji biokatalizatorów, ponieważ jest rozpuszczalny w lekko kwaśnym roztworze wodnym, odporny na degradację chemiczną, powszechnie dostępny na rynku i niedrogi [8]. W celu zwiększenia wydajności procesu immobilizacji, jak również stabilności enzymów związanych z matrycą, stosuje się określone substan-

cje sieciujące [9]. Powszechnie używanym związkiem aktywującym jest aldehyd glutarowy (GA), jednak ze względu na jego wysoką toksyczność konieczne jest znalezienie alternatywy, która będzie odznaczać się wysoką wydajnością, nie stanowiąc przy tym zagrożenia dla środowiska [10,11]. Przykładem takich substancji są genipina (GEN) oraz polietylenoimina (PEI) [12]. Badania pokazują, że związki te są bezpieczne zarówno dla ludzi jak i środowiska, a stosowanie ich jako czynników sieciujących w sektorze biomedycznym wskazuje na możliwość zastosowania tych substancji w procesie immobilizacji także w innych aplikacjach biotechnologicznych [13,14].

Część eksperymentalna: Materiał do badań stanowiła dehydrogenaza celobiozowa pozyskana ze szczepu grzyba *Phanerochaete chrysosporium* (FCL236) zdeponowanego w kolekcji grzybów Katedry Biochemii i Biotechnologii UMCS. Jako nośnika do immobilizacji użyto makrosfer chitosanowych (kulek). Proszek chitosanu rozpuszczono w 2% roztworze kwasu octowego i mieszano na mieszadle magnetycznym (25°C/1 godz.). Odpowietrzony roztwór wkraplano przy ciągłym mieszaniu do zlewki zawierającej 1M NaOH. Makrosfery przechowywano przez 24 godziny w temperaturze 4°C. Po tym czasie kulki przemyto wodą dejonizowaną w celu zobojętnienia. Nośnik aktywowano przez działanie na niego jednym z trzech, badanych czynników sieciujących (Tab. 1) w określonych warunkach (25°C, 350 obr./min, 24 godz.) [15].

Tabela 1. Substancje sieciujące wraz ze stężeniami użyte do procesu aktywacji makrosfer (kulek) chitosanowych.

Substancja sieciująca	Badane stężenia	Oznaczenie próby
Aldehyd glutarowy (GA)	5,0 %	5% GA
	2,0 %	2% GA
	0,5 %	0,5% GA
Polietylenoimina (PEI)	5,0 %	5% PEI
	2,0 %	2% PEI
	0,5 %	0,5% PEI
Genipina (GEN)	2,0 %	2% GEN
	1,0 %	1% GEN
	0,5 %	0,5% GEN

Po aktywacji kulki kilkakrotnie przemyto wodą dejonizowaną. Nośnik zmieszano z roztworem zawierającym dehydrogenazę celobiozową (CDH236). Po 3 godzinach wytrząsania w temperaturze 25°C, mieszaninę pozostawiono w lodówce na noc. Następnie kulki chitosanu oddzielono od roztworu zawierającego enzym i przepłukano trzykrotnie wodą w celu usunięcia niezwiązanego białka. Wydajność procesu immobilizacji obliczono z zastosowaniem metody pośredniej. Procent enzymu związanego na nośniku obliczono według poniższego wzoru [14]:

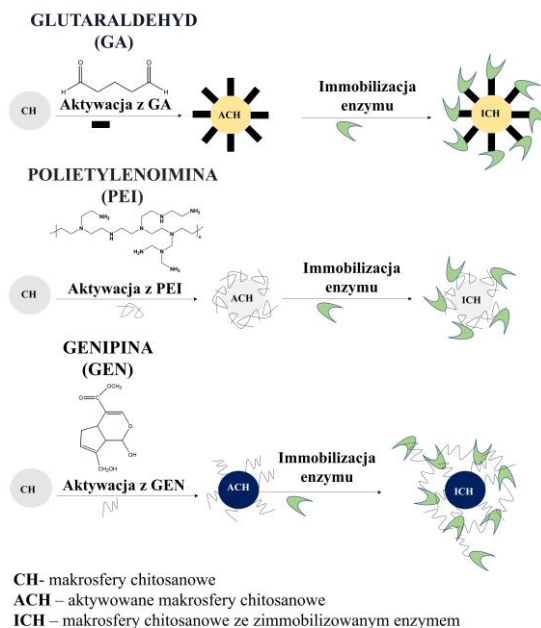
$$P = A_{CDH236(nosnik)} (U/g \text{ nośnika}) / A_{CDH236(immobilizacji)} (U/g \text{ nośnika}) \times 100 \%,$$

Gdzie:

$A_{CDH236(nosnik)}$ (U/g nośnika) - aktywność CDH236 związanego z nośnikiem,

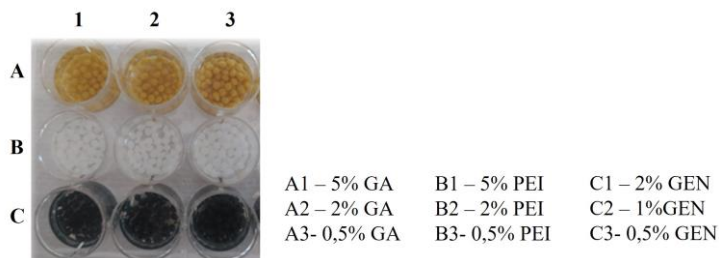
$A_{CDH236(immobilizacji)}$ (U/g nośnika) - aktywność CDH236 użytego do procesu immobilizacji.

Ogólny schemat procesu przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Aktywacja makrosfer chitosanowych przy użyciu trzech, różnych substancji sieciujących oraz immobilizacja enzymu (CDH236) na nośniku.

Wyniki: Celem niniejszej pracy było sprawdzenie wydajności procesu immobilizacji dehydrogenazy celobiozowej (CDH236) na makrosferach chitosanowych po zastosowaniu trzech czynników sieciujących o różnych stężeniach. Jak wykazano we wcześniejszych badaniach, CDH236 może być unieruchamiane na matrycach organicznych pochodzenia naturalnego, w tym na chitosanie. W naszych badaniach po raz pierwszy zdecydowaliśmy się na przetestowanie dwóch, nowych substancji sieciujących tj. GEN i PEI. Kulki poddane aktywacji zostały przedstawione na rysunku 2.



Rys. 2. Aktywacja kulek chitosanowych przy użyciu trzech substancji sieciujących o różnych stężeniach.

Uzyskane wyniki dowodzą, że CDH236 może być immobilizowane na makrosferach chitosanowych (Tabela 2). We wszystkich badanych próbach wydajność procesu nie była niższa niż 96%. Wyjątkiem była próba, w której nośnik był aktywowany 2% PEI, gdzie wydajność immobilizacji wynosiła 88,5%.

Tabela 2. Wydajność procesu immobilizacji CDH236 na makrosferach chitosanowych.

Badana próba	Aktywność CDH236 przed immobilizacją [U/g nośnika]	Aktywność CDH236 związanego z nośnikiem [U/g nośnika]	Wydajność immobilizacji [%]
5% GA	1,23	1,23	99,38
2% GA	1,23	1,22	99,05
0,5% GA	1,23	1,23	99,60
5% PEI	1,23	1,13	91,19
2% PEI	1,23	1,09	88,50
0,5% PEI	1,23	1,21	97,84
2% GEN	1,23	1,19	96,68
1% GEN	1,23	1,21	97,90
0,5% GEN	1,23	1,21	98,08

Wnioski: Przeprowadzone badania potwierdziły wysoką wydajność immobilizacji CDH236 na makrosferach chitosanowych niezależnie od użytego związku sieciującego. Uzyskane wyniki pozwalają na dobranie najlepszych warunków prowadzenia kolejnych eksperymentów. Niezbędne są dalsze badania w celu lepszego poznania właściwości unieruchomionych biokatalizatorów.

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego nr 2023/49/N/NZ9/00375 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

Literatura:

1. F. Csarman, L. Wohlschlager, R. Ludwig, *The Enzymes*, 47 (2020) 457.
2. K. Olszewska, A. Olszewska, J. Rogalski, J. Sulej, *Postępy Mikrobiologii*, 59 (2020) 75.
3. G. Henriksson, V. Sild, G. Pettersson, G. Johansson, *Biochim. Biophys. Acta*, 1383 (1998) 48.
4. J. Łobarzewski, G. Ginalska, *Biotechnologia*, 1 (1994) 44.
5. C. Spahn, S. D. Minter, S. D. Recent patents on engineering, 2.3 (2008) 195.
6. J. Zdarta, A. S. Meyer, T. Jesionowski, M. Pinelo, *Catalysts*, 8 (2018) 92.
7. K. Wang, *Chitosan-Based Hydrogels*, 18 (2011) 339.
8. Y. Bai, Z. Jing, R. Ma, X. Wan, J. Liu, W. Huang, *Bioprocess Biosystem. Eng.*, 46 (2023) 1539.
9. R. A. Sheldon, *Adv. Synthes. Catal.*, 349 (2007) 1289.
10. O. Barbosa, C. Ortiz, Á Berenguer-Murcia, R. Torres, R. C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, *Rsc Adv.*, 4 (2014) 1583.
11. E. Zeiger, B. Gollapudi, P. Spencer, *Mutat. Res./Rev. Mutation Res.*, 589 (2005) 136.
12. J. Sulej, W. Piątek-Golda, M. Grząd, K. Szałapata, P. Waško, E. Janik-Zabrotowicz, M. Osińska-Jaroszuk, *J. Funct. Biomater.*, 14 (2023) 383.
13. Y. Yu, S. Xu, S. Li, H. Pan, *H. Biomater. Sci.*, 9 (2021) 1583.
14. G. Lin, J. Huang, M. Zhang, S. Chen, M. Zhang, *Nanomaterials*, 12 (2022) 584.
15. J. Sulej, M. Osińska-Jaroszuk, M. Jaszek, A. Olszewska, A. Belcarz, W. Piątek-Golda, *Int. J. Molec. Sci.*, 24 (2023) 4535.

PORÓWNANIE WŁAŚCIWOŚCI MODELOWYCH BŁON BAKTERYJNYCH WYBRANYCH GATUNKÓW *LEGIONELLA*

K. PASTUSZAK¹, M. JURAK¹, J. TARASIUK², M. PALUSIŃSKA-SZYSZ²

¹UMCS, Wydział Chemii, Katedra Zjawisk Międzyfazowych, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin, ²UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Abstrakt: Bakterie *Legionella*, należące do rodziny *Legionellaceae*, występują powszechnie w glebie oraz systemach wodnych. Te Gram-ujemne pałeczki stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka. Kluczowym czynnikiem decydującym o zjadliwości tych bakterii oraz oporności na antybiotyki jest budowa ściany komórkowej, a w szczególności skład ilościowy oraz rozmieszczenie fosfolipidów (PL) w membranach. Czynniki zewnętrzne, takie jak obecność choliney w pożywce, mogą modyfikować kompozycję fosfolipidów, wpływając na fizykochemiczne właściwości powierzchni komórki. Celem przedstawionych badań było scharakteryzowanie modelowych błon bakteryjnych imitowanych przez monowarstwy Langmuira. Zostały one utworzone z fosfolipidów wyizolowanych z bakterii *Legionella micdadei*, *Legionella dumoffii* i *Legionella gormanii*, hodowanych na pożywce z lub bez dodatku egzogennej choliney. Przy użyciu wanny Langmuira wyposażonej w symetryczne bariereki przeprowadzono kompresję monowarstw, rejestrując zależności ciśnienia powierzchniowego od średniej powierzchni przypadającej na cząsteczkę (izotermi π -A). Na ich podstawie wyznaczono moduł ściśliwości (C_s^{-1}). Wyniki analiz wykazały, że właściwości fizykochemiczne membran bakteryjnych, takie jak upakowanie i uporządkowanie cząsteczek znacząco się różnią, w zależności od składu fosfolipidów, modyfikowanego przez obecność choliney w pożywce, na której hodowano badane gatunki bakterii.

Wprowadzenie: Bakterie *Legionella* spp., mimo iż powszechnie występują w wodach i glebie, charakteryzują się specyficznymi wymaganiami odżywczymi. Przeżycie drobnoustrojów jest możliwe niemal wyłącznie w organizmie eukariotycznym, np. w pierwotniakach lub komórkach ssaków. Z tego względu bakterie *Legionella* spp. wykształciły mechanizmy pozwalające na wzrost i replikację w organizmie żywiciela [1], umożliwiające im infekowanie także organizmu ludzkiego. Po dostaniu się do układu oddechowego człowieka, bakterie mogą namnażać się w makrofagach pęcherzyków płucnych, prowadząc do rozwoju zakażeń o różnym stopniu nasilenia [2]. Zarówno *L. micdadei*, jak również *L. dumoffii* i *L. gormanii*, są odpowiedzialne za wywoływanie zapalenia płuc. Wszystkie wspomniane gatunki charakteryzują się występowaniem czterech klas fosfolipidów (PL) w membranach – fosfatydylocholiney (PC), fosfatydyloetanolaminy (PE), fosfatydyloglicerolu (PG) oraz kardiolipiny (CL), jednakże wzajemne proporcje tych związków oraz długości łańcuchów kwasów tłuszczowych i ich stopień nasycenia różnią się. Ponadto, bakterie *Legionella* spp. pobierają cholinę ze środowiska, w którym się znajdują i wykorzystują ją do syntezy PC, zmieniając tym samym skład ilościowy PL w błonach [1]. Fosfolipidy są głównymi składnikami budującymi membranę *Legionella* spp., a ich procentowa zawartość oraz rozmieszczenie w błonie wpływają na oddziaływanie z komórkami gospodarza oraz modulują wrażliwość na antybiotyki. Celem pracy

było porównanie właściwości modelowych błon bakteryjnych utworzonych przez fosfolipidy wybranych gatunków *Legionella* spp., przy wykorzystaniu techniki monowarstw Langmuira.

Część eksperymentalna: Bakterie *L. micdadei*, *L. dumoffii* oraz *L. gormanii* hodowano na pożywce BCYE, z lub bez dodatku egzogennej choliny. Lipidy wyekstrahowano z komórek drobnoustrojów zgodnie z procedurą Bligh i Dyer [3], a następnie oczyszczono, stosując chromatografię cienkowsarstwową w układzie rozpuszczalników chloroform/metanol/kwas octowy (9,8 mL/0,2 mL/0,1 mL), wysuszono i zważono. Tak przygotowane fosfolipidy rozpuszczono w mieszaninie chloroformu ($\geq 99,9\%$, Avantor Performance Materials Poland S.A.) i metanolu ($\geq 99,9\%$, ROMIL Chemicals Ltd.) w stosunku objętościowym 4:1 tak, aby stężenie roztworu wynosiło 1 mg/mL. Stosując wannę Langmuira (KSV Nima, Biolin Scientific) wyposażoną w wagę z płytką Wilhelmię oraz symetryczne bariery, wyznaczono zależność ciśnienia powierzchniowego (π) od średniej powierzchni przypadającej na cząsteczkę (A), tzw. izotermę π - A . Do przygotowania subfazy we wszystkich pomiarach zastosowano 99,7% kwas octowy (Avantor Performance Materials Poland S.A.), który rozcieńczono ultraczystą wodą do stężenia 0,01%. Określone objętości roztworów fosfolipidów nanoszono na powierzchnię subfazy wypełniającej wannę Langmuira przy użyciu mikrostrzykawki (Hamilton). Naniesione roztwory pozostawiono na powierzchni cieczy przez 10 minut w celu odparowania rozpuszczalników, po czym rozpoczęto kompresję monowarstwy z prędkością 10 mm/min. Pomiarzy prowadzono w stałej temperaturze 20°C kontrolowanej przy użyciu termostatu Lauda Alpha RA 8.

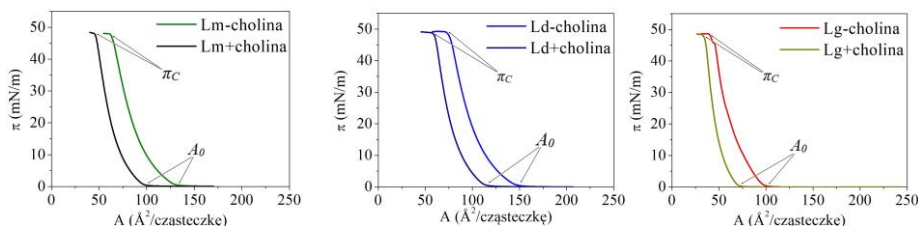
Wyniki: Jak już wspomniano, bakterie *Legionella* modyfikują skład ilościowy lipidów błonowych wykorzystując egzogenną cholinę do syntezy PC, co wpływa na właściwości fizykochemiczne błon oraz ich oddziaływania z komórkami żywiciela i antybiotykami. W Tabeli 1 przedstawiono zmiany w składzie fosfolipidowym *L. micdadei* (Lm), *L. dumoffii* (Ld) i *L. gormanii* (Lg) wywołane suplementowaniem choliną, jak również różnice w zawartości poszczególnych klas między wybranymi gatunkami [4-6].

Tabela 1. Udział procentowy poszczególnych klas fosfolipidów w mieszaninach wyizolowanych z bakterii *L. micdadei* (Lm), *L. dumoffii* (Ld) i *L. gormanii* (Lg) hodowanych na podłożu z (+cholina) i bez (-cholina) dodatku egzogennej choliny [4-6].

	PC	PE	PG	CL
Lm-cholina	47%	37%	3%	13%
Lm+cholina	48%	34%	2%	16%
Ld-cholina	31%	43%	≈0%	26%
Ld+cholina	42%	34%	≈0%	24%
Lg-cholina	26%	50%	3%	21%
Lg+cholina	47%	38%	3%	12%

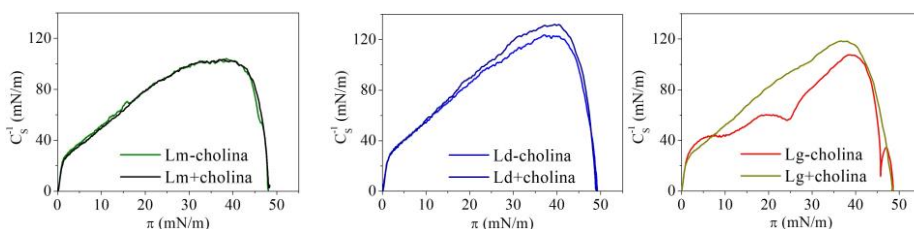
Największe zmiany, spowodowane obecnością choliny w pożywce do hodowli bakterii zaobserwowano w przypadku *L. gormanii*, która wykazuje spadek zawartości PE oraz wzrost ilości PC. *L. dumoffii* charakteryzuje się zmianami ilościowymi PC oraz PE rzędu 9-11%. Z kolei dla *L. micdadei* stwierdza się wzrost zawartości CL i PC oraz redukcję

PE. W celu określenia wpływu różnic w składzie fosfolipidów na fizykochemiczne właściwości utworzonych z nich modelowych błon bakteryjnych, zastosowano technikę monowarstw Langmuira. Zarejestrowane zależności ciśnienia powierzchniowego w funkcji średniej powierzchni przypadającej na cząsteczkę, tzw. izoterm π - A zestawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Izoterm π - A zarejestrowane dla monowarstw fosfolipidów wyizolowanych z bakterii *L. micdadei* (Lm), *L. dumoffii* (Ld) i *L. gormanii* (Lg), hodowanych na podłożu bez (-choлина) lub z (+choлина) dodatkiem egzogennej choliny.

Izoterm π - A wyznaczone dla mieszanin fosfolipidów wyekstrahowanych z bakterii suplementowanych choliną (+choлина) są przesunięte w stronę mniejszych powierzchni przypadających na cząsteczkę. Przebieg zależności oraz wartości ciśnienia załamania (π_c), przy którym następuje przejście struktur dwuwymiarowych w trójwymiarowe nie ulegają zmianom, co wskazuje na zbliżoną stabilność analizowanych monowarstw. Rozważając powierzchnię A_0 , przy której następuje widoczny wzrost ciśnienia powierzchniowego ($\sim 0,5$ mN/m), zmiany dla *L. micdadei*, *L. dumoffii* i *L. gormanii* wynoszą kolejno 25, 23 i 28%. Wyniki te wskazują, że w monowarstwach „+choлина” występują mniejsze odległości międzycząsteczkowe w porównaniu do „-choлина”, co sugerowałoby także większy stopień ich upakowania. Aby potwierdzić powyższe przypuszczenie, na podstawie danych z izoterm π - A wyznaczono moduł ściśliwości według równania $C_s^{-1} = -A(d\pi/dA)_{p,T}$ [4]. Wartości modułu definiują stopień upakowania i uporządkowania cząsteczek w monowarstwie (jej elastyczność) (Rys. 2).



Rys. 2. Zależności modułu ściśliwości w funkcji ciśnienia powierzchniowego wyznaczone dla monowarstw fosfolipidów wyizolowanych z bakterii *L. micdadei* (Lm), *L. dumoffii* (Ld) i *L. gormanii* (Lg) hodowanych na podłożu bez (-choлина) lub z (+choлина) dodatkiem egzogennej choliny.

Obserwowane przesunięcie izoterm π - A w kierunku mniejszych powierzchni (Rys. 1) koreluje z większymi maksymalnymi wartościami modułu ściśliwości (Rys. 2), potwierdzając mniejszą elastyczność monowarstw „+choлина” w porównaniu do „-choлина”. Największe zmiany, są widoczne dla monowarstw *L. gormanii*, podczas gdy wartości modułu dla *L. micdadei* oraz *L. dumoffii* wzrastają. Wszystkie badane monowarstwy

osiągają wartości C_S^{-1} przekraczające 100 mN/m, co według kryterium Daviesa i Rideala [7] oznacza, że występują w stanie cieczy skondensowanej (LC). Analizując przedstawione zależności można zauważyć, że przyrost ilości PC oraz obniżenie zawartości PE i związków anionowych (PG i CL) prowadzi do ściślejszego upakowania cząsteczek w monowarstwach. Skrócenie odległości międzycząsteczkowych może być efektem wzmocnienia sił Lifshitz-van der Waalsa, które towarzyszy wzrostowi długości i/lub stopnia nasycenia łańcuchów kwasów tłuszczowych [5]. Dla *L. gormanii* wykazującej największe różnice w składzie ilościowym membran „-cholina” i „+cholina” (Tabela 1) obserwuje się także duże zmiany powierzchni przypadającej na cząsteczkę (Rys.1) i modułu ściśliwości (Rys. 2). Podobnie w membranach *L. dumoffii* znaczny wzrost ilości PC, powoduje wyraźnie większe upakowanie, a tym samym mniejszą elastyczność monowarstwy.

Wnioski: Obecność choliny w pożywce do hodowli bakterii *Legionella* spp. wpływa na skład fosfolipidowy oraz profil kwasów tłuszczowych, modyfikując tym samym fizykochemiczne właściwości badanych membran modelowych (monowarstw Langmuira). Efekt zachodzących zmian uwidacznia się w organizacji cząsteczek fosfolipidów w monowarstwie, stopniu jej upakowania i uporządkowania (elastyczności). Zawartość długołańcuchowych i/lub nasyconych kwasów tłuszczowych oraz wzrost ilości PC sprzyja tworzeniu monowarstw ściślej upakowanych, co wynika odpowiednio ze wzmocnienia sił Lifshitz-van der Waalsa oraz cylindrycznego kształtu cząsteczek tej klasy fosfolipidów.

Literatura:

1. B. Kowalczyk, E. Chmiel, M. Palusińska-Szys, Int. J. Mol. Sci., 22 (2021) 1487.
2. J.L. Yang, D. Li, X.Y. Zhan, Microorganisms, 11(1) (2022) 74.
3. E.G. Bligh, J.W. Dyer, Can. J. Biochem. Physiol., 37 (1959) 37 911.
4. M. Palusińska-Szys, A. Zdybicka-Barabas, E. Reszczyńska et al., Biochim. Biophys. Acta, 1861 (2016) 617.
5. M. Palusińska-Szys, M. Jurak, N. Gisch et al., Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Biol. Lipids, 1867(6) (2022) 159138.
6. K. Pastuszak, E. Chmiel, B. Kowalczyk et al., Membranes, 13 (2023) 356.
7. J.T. Davies, E.K. Rideal. Interfacial Phenomena; Academic Press: New York, NY, USA, 1963.

SZCZEP GRZYBOWY *PLEUROTUS DJAMOR* JAKO NOWE ŹRÓDŁO EGZOPOLISACHARYDÓW

M. PRZYBYŁO, K. NAMROŻY, A. KONIECZNA, N. MIERZWA,
W. NOSKOWICZ, D. ROCHOWSKA, M. KRASOWSKA, E. WĄSEWICZ,
E. SZEWCZYK, Y. VOZDIHAN, W. BIELECKA, K. WLIZŁO, UMCS, Wydział
Biologii i Biotechnologii, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej
i Środowiskowej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Abstrakt: Egzopolisacharydy (EPS) to polimery, produkowane przez różne organizmy w tym grzyby wielkoowocnikowe. Ze względu na wysoki potencjał biotechnologiczny wciąż poszukuje się nowych źródeł tych cząsteczek. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że szczep grzybowy *Pleurotus djamor* może być źródłem egzopolisacharydów. Jest on zdolny do ich wytwarzania zarówno na pożywce mineralnej (B) jak i organicznej (C), na których uzyskano największe ilości EPS między 4. a 7. dobą hodowli. Skład pożywek wpływał na ilość produkowanej biomasy, której znacznie wolniejszy przyrost uzyskano na pożywce B. Ze względu na wytwarzanie porównywalnych ilości EPS na obu pożywkach i mniejszej produkcji biomasy na pożywce B, tę pożywkę wybrano jako optymalną do uzyskania EPS.

Wprowadzenie: Egzopolisacharydy to biomakromolekuły występujące szeroko w przyrodzie, wytwarzane zarówno przez bakterie jak i grzyby [1,2]. Wśród badanych grzybów w literaturze dominują gatunki z typu Ascomycota, natomiast gatunki typu Basidiomycota stanowią zdecydowanie mniejszą grupę [2]. Niemniej jednak znajdziemy w nim takie gatunki, jak *Schizophyllum commune* czy *Lentinula edodes*, wytwarzające odpowiednio, schizofylian i lentinan, które to cząsteczki mają szerokie, udowodnione działanie lecznicze i prozdrowotne [3]. Oprócz potencjalnego zastosowanie w dziedzinie medycznej, EPS mogą być stosowane w branży kosmetycznej, materiałowej, spożywczej, w farmacji czy w ochronie środowiska [4]. Każdy EPS jest charakterystyczny dla danego gatunku a o właściwościach decyduje struktura cząsteczki [2,3]. Stąd też poszukiwanie nowych źródeł EPS daje możliwości odkrycia cząsteczki o nowych właściwościach lub o właściwościach silniejszych niż dotychczas zbadane. W niniejszej pracy zbadano możliwość wytwarzania EPS przez egzotyczny gatunek z rodzaju *Pleurotus* jako nowego źródła tego rodzaju polimeru.

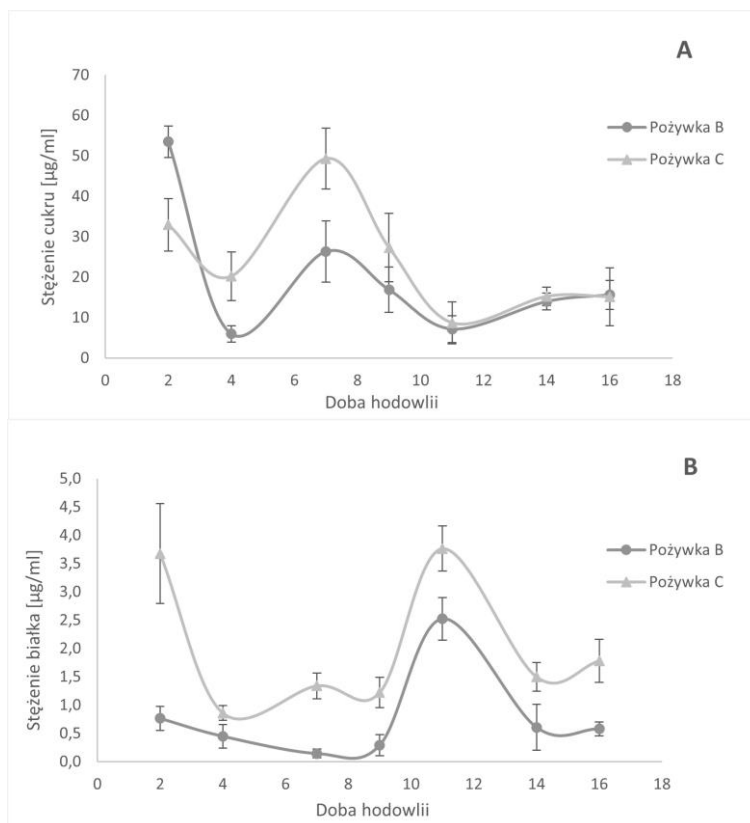
Część eksperymentalna: Hodowlę *Pleurotus djamor* w celu pozyskania *inoculum* prowadzono w 100 ml kolbach stożkowych na 50 ml płynnego podłoża PDB zaszczerpionego trzema krążkami grzybni o średnicy 0,5 cm. Hodowle prowadzone były stacjonarnie w temperaturze 28°C aż do porośnięcia pożywki przez grzybnię. Hodowle wytrząsane *Pleurotus djamor* prowadzone były w 100 ml kolbach stożkowych na 50 ml płynnej pożywce mineralnej B lub pożywce organicznej C o składzie przedstawionym w tabeli 1, których pH doprowadzono do wartości 4,5 przy pomocy 0,1 M HCl. Hodowle zaszczerpiono zawiesiną inokulatu a jej stężenie w pożywce wynosiło 3%. Warunki jakie stosowano w hodowli to temperatura 28°C, 120 RPM i czas wzrostu 16 dni.

Tabela 1. Skład pożywki B oraz C stosowanych w hodowli wytrząsanej *Pleurotus djamor*.

Rodzaj pożywki	Składnik pożywki	Stężenie [g/l]
Pożywka B	Glukoza	30
	NaNO ₃	1
	KH ₂ PO ₄	0,5
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01
	KCl	0,5
Pożywka C	Glukoza	30
	Pepton	1
	Ekstrakt drożdżowy	0,5
	NaCl	0,5

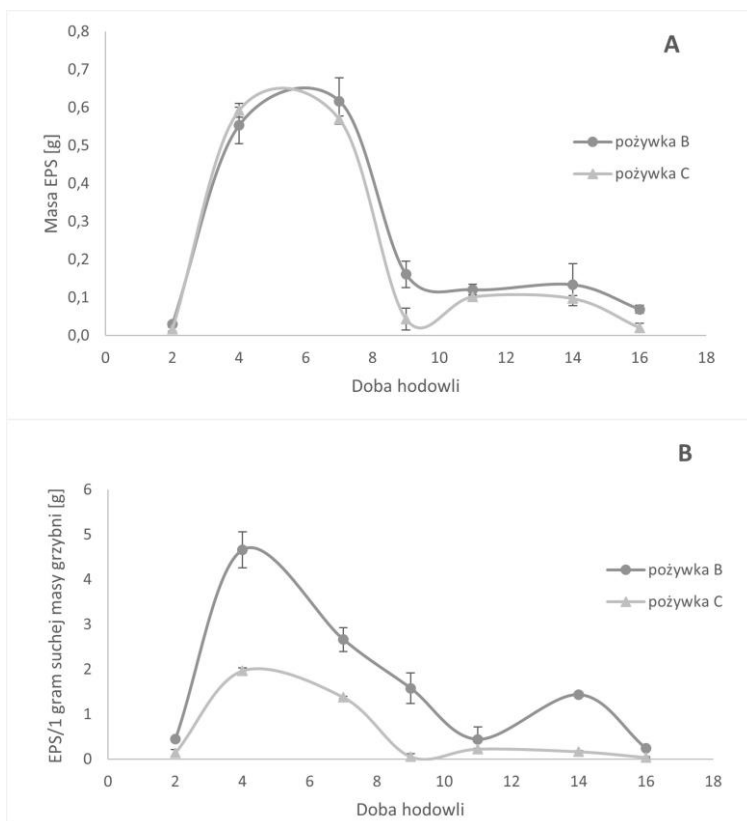
W dniach 2., 4., 7., 9., 11., 14., 16. likwidowano po 3 kolby hodowli prowadzonych na pożywce B oraz C. Płyn pohodowlany oddzielono od grzybni za pomocą sączka Miracloth. Płyn pohodowlany oraz grzybnie przechowywano w falkonach 15 lub 50 ml w temperaturze -18°C do momentu analizy. Zamrożoną biomasę grzybową liofilizowano w falkonach przez 72 godziny, a następnie ważono w celu określenia suchej masy. Natomiast z przemrożonego płynu pohodowlanego zbierano wytrącony EPS a pozostałe jego ilości w płynie pohodowlanym wytrącano z 25 ml próby dodatkiem alkoholu etylowego w stosunku objętościowym płyn:etanol 1:2 i pozostawiono na 24 godziny w celu całkowitego wytrącenia EPS-u. EPS odwirowano w falkonach o pojemności 50 ml, (15 minut przy 10 000 RPM) i suszono w temperaturze 60°C przez 24 godziny a następnie ważono, aby określić suchą masę EPS. Oznaczenie stężenia cukru wykonano metodą Dubois. W tym celu do 200 µl próby badanej dodano 600 µl 95% H₂SO₄ i 120 µl 5% fenolu. Następnie próbę ogrzewano przez 5 minut we wrzącej łaźni wodnej. Po tym czasie mierzono absorbancje przy długości fali 490 nm. W ten sam sposób wykreślono także krzywą wzorcową w zakresie stężeń 5-50 µg/ml. Z kolei oznaczenie stężenia białka prowadzono metodą Bradford. Do 1000 µl roztworu roboczego Bradford dodano 100 µl próby badanej i całość wymieszano. Po 2 minutach mierzono absorbancje na długości fali 595 nm. Na bazie absorbancji wykreślono także krzywą wzorcową dla kolejnych stężeń albuminy wołowej (25 – 200 mg/ml).

Wyniki: Wyniki analizy stężenia cukrów całkowitych w płynie pohodowlanym w kolejnych dniach hodowli prowadzonej na pożywce B i C wykazały podobne zależności. Obserwowano szybki spadek stężenia glukozy użytej jako źródło węgla, do 4. dnia hodowli, który następnie wzrastał do 7. doby hodowli i znów stopniowo spadał osiągając w przypadku obu pożywek zbliżoną wartość ok. 10 µg/ml. Mimo podobnych zależności i takiego samego stężenia wyjściowego źródła węgla, stężenie cukrów całkowitych między 4. i 11. dobą hodowli było niemal dwukrotnie wyższe w pożywce C w porównaniu do pożywki B (rys. 1A). Wyniki zależności stężenia białka w kolejnych dniach hodowli w płynie pohodowlanym również wykazały podobne zależności dla obu pożywek, szczególnie między 9. a 14. dobą hodowli, kiedy stężenie białka było najwyższe. Przez cały okres trwania hodowli stężenie białka utrzymywało się na wyższym poziomie w pożywce C w porównaniu do pożywki B, co było najbardziej zauważalne już w 2. dobie (rys. 1B).



Rys. 1. Oznaczenia biochemiczne stężenia cukrów (A) i białka (B) w płynie pohodowlanym *Pleurotus djamor* w wybranych dobach 16-dniowej hodowli wytrząsanej.

W przypadku wytwarzania EPS nie zaobserwowano różnic w jego ilości w zależności od użytej pożywki. Zarówno w hodowli na pożywce B jak i pożywce C stwierdzono szybki przyrost ilości EPS już od 4. doby hodowli i gwałtowny jej spadek w 9. dobie hodowli. Ilości EPS otrzymanego w obu hodowlach wyrażone w gramach suchej masy były niemal identyczne. W dobie 4. było to 0,553 g i 0,592 g EPS oraz w dobie 7. 0,617 g i 0,569 g EPS otrzymanego odpowiednio z pożywki B i C (rys. 2A). Istotne różnice zaobserwowano natomiast w wynikach przyrostu biomasy w trakcie hodowli. Wyniki EPS przeliczone na jeden gram suchej biomasy grzybowej wykazały 2,5-krotnie większe wytwarzanie EPS w hodowli *P. djamor* prowadzonej na pożywce B, w której ilość otrzymanej biomasy była mniejsza w porównaniu do biomasy otrzymanej na pożywce C (rys. 2B).



Rys. 2. Zawartość suchej masy egzopolisacharydów (EPS) w płynie pohodowlanym *Pleurotus djamor* (A) w wybranych dobach 16-dniowej hodowli wytrząsanej oraz przeliczenie wydajności wytwarzania EPS w przeliczeniu na 1 gram suchej masy grzybnia (B).

Wnioski: Szczep *P. djamor* wytwarza egzopolisacharydy zarówno na pożywkę mineralną jak i organiczną. Skład pożywki nie wpływa bezpośrednio na ilość wytworzonego EPS w hodowli *P. djamor*, ale wpływa na przyrost biomasy w hodowli oraz stężenie cukrów i białek w płynie pohodowlanym. Pożywką wydajniejszą do wytwarzania EPS w hodowli *P. djamor* przy jednoczesnym niskim wytwarzaniu biomasy jest mineralna pożywka B a optymalny czas hodowli wynosi od 4 do 7 dni.

Literatura:

1. A.A. Wao, S. Singh, A. Pandey, G. Kant, K. Choure, K.T.T. Amesho, *Helyion* 9 (2023) 9.
2. S. Mahapatra, D. Banerjee, *Microbiology Insights*, 6 (2013) 6.
3. R. Stoica, M. Moscovici, E.S. Lakatos, L.I. Cioca, *Processes*, 1 (2023)11.
4. O.O. Osemwegie, C.O. Adetunji, E.A. Ayeni, O.I. Adejobi, R.O. Arise, C.O. Nwonuma, A. Oghenekaro, *Helyion*, 3 (2020) 6.

BADANIA STABILNOŚCI TERMICZNEJ I POTENCJAŁU PRZECIWDROBNOUSTROJOWEGO KOMPOZYTÓW ZAWIERAJĄCYCH MODYFIKATORY NIEORGANICZNE

K. MŁYNARCZYK¹, B. PODKOŚCIELNA¹, M. JASZEK², M. OSIŃSKA-JAROSZUK², ¹UMCS, Wydział Chemii, Katedra Chemii Polimerów, ul. Gliniana 33, 20-614 Lublin, ²UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Biochemii i Biotechnologii, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Abstrakt: W pracy przedstawiono syntezę i badania stabilności termicznej kompozytów zawierających dimetakrylan bisfenolu A i akrylan 2-etyloheksylu jako główne monomery. Kompozyty modyfikowano tlenkiem cynku i siarczanem(VI) miedzi(II) – nieorganicznymi związkami posiadającymi potwierdzone literaturowo właściwości przeciwdrobnoustrojowe. W kolejnym etapie dokonano oceny potencjału przeciwdrobnoustrojowego kompozytów wobec bakterii Gram-ujemnej (*Pseudomonas aeruginosa*) i Gram-dodatniej (*Staphylococcus aureus*).

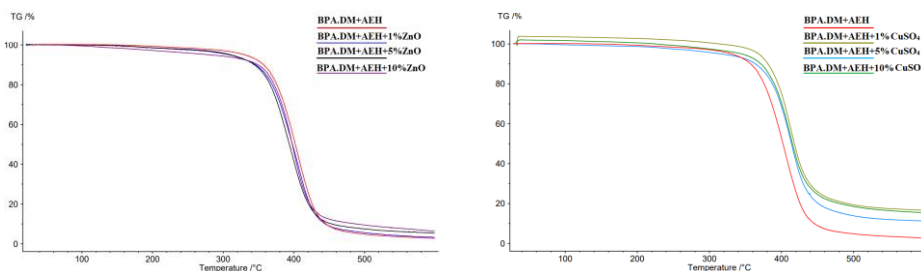
Wprowadzenie: Tlenek cynku jest jednym z najbardziej znanych i szeroko badanych materiałów należących do tlenków metali. Badania sugerują, że jest on bardzo funkcjonalny, z szerokim potencjałem do zastosowania w wielu dziedzinach. Nanocząstki ZnO o różnych kształtach charakteryzują się odmiennymi właściwościami. Obejmują one stabilność chemiczną i fotochemiczną, działanie przeciwzapalne i korzystny wpływ na gojenie się ran. Tlenek cynku ma zdolność filtrowania promieniowania ultrafioletowego, co pozwala na stosowanie go w środkach kosmetycznych lub balsamach przeciwsłonecznych. Ponadto ma bardzo dobre właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze [1-3]. Siarczan(VI) miedzi(II) posiada właściwości wysuszające i biobójcze. Te cechy pozwoliły na wykorzystanie soli zarówno w wielu aspektach życia codziennego, jak i w przemyśle. Od dziesięcioleci związek ten stanowi składnik preparatów przeciwgrzybowych o wysokiej skuteczności. Stosowany jest do zabezpieczania drewna przed chorobami, a także w profilaktyce chorób grzybiczych bydła i koni. Miedź jest jednym z najlepszych materiałów do pokrywania powierzchni codziennego użytku, umożliwiających walkę z drobnoustrojami patogennymi [4].

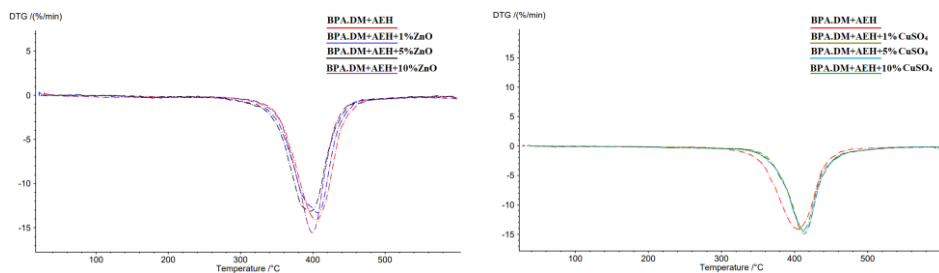
Celem pracy była synteza kompozytów na bazie dimetakrylanu bisfenolu A i akrylanu 2-etyloheksylu z tlenkiem cynku i siarczanem(VI) miedzi(II). Otrzymane kompozyty zbadano pod kątem ich stabilności termicznej oraz potencjału przeciwdrobnoustrojowego wobec bakterii Gram-ujemnej (*Pseudomonas aeruginosa*) i Gram-dodatniej (*Staphylococcus aureus*).

Część eksperymentalna: 8,4 g dimetakrylanu bisfenolu A (BPA.DM) i 3,6 g rozcieńczalnika aktywnego (akrylan 2-etyloheksylu AEH) umieszczono w szklanej zlewce o pojemności 50 ml. Mieszaninę monomerów umieszczono w komorze grzewczej w temperaturze 65°C w celu odpowietrzenia. Do mieszaniny dodano odpowiednie ilości modyfikatora w postaci tlenku cynku lub siarczanu(VI) miedzi(II), które wynosiły 1, 5 i 10% wag. Dla porównania przygotowano również kompozyt, który nie zawierał modyfikatora. Zawartość zlewek wymieszano i dodano inicjator UV, którym był IQ

(2,2-dimetoksy-1,2-difenyloetan-1-on) w ilości 1% wagowych dla kompozytu bez dodatku modyfikatora i dla dodatku 1% modyfikatora, 2% IQ dla 5% dodatku i 3% IQ dla 10% dodatku. Mieszaninę dokładnie wymieszano i przeniesiono do szklanej formy o wymiarach 12x10x0,2 cm, składającej się z dwóch szklanych płytek pokrytych środkiem nieprzywierającym, pomiędzy którymi umieszczono teflonową przekładkę. Formy umieszczono w komorze wyposażonej w lampy rtęciowe o mocy 160 W na 30 minut. Następnie kompozyty przeniesiono do komory grzewczej w celu ich dosięciowania (przez 3 godziny w temperaturze 85°C). Analizę termogravimetryczną (TG/DTG) przeprowadzono z wykorzystaniem urządzenia STA 449 Jupiter F1, Netzsch (Selb, Niemcy) w następujących warunkach pomiaru: szybkość ogrzewania, 10°C/min; dynamiczna atmosfera helu (20 mL/min) w zakresie temperatur 25-600 °C; masa próbki – około 10 mg; jako odniesienie zastosowano pusty tygiel z tlenku glinu. Na podstawie badań screeningowych, do badań mikrobiologicznych wybrano kompozyty zawierające 10% wagowych modyfikatora. Jako próby kontrolne wykorzystano próbki bez dodatków specjalnych. Do badań mikrobiologicznych właściwości przeciwdrobnoustrojowych kompozytów użyto szczep bakterii Gram-ujemnej: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), a także bakterię Gram-dodatnią: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). 20 ml sterylnego podłoża Mueller-Hinton Agar umieszczono w płytce Petriego i pozostawiono do zestalenia. Przygotowano młodą kulturę bakteryjną (24 h) o stężeniu $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. 200 mikrolitrów tej zawiesiny przeniesiono na płytkę hodowlaną z podłożem i rozprowadzono po powierzchni. Na przygotowanych w ten sposób płytkach umieszczono kompozyty o wymiarach 1x1cm. Hodowle prowadzono przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Po tym czasie kompozyty usunięto i zmierzono strefy zahamowania wzrostu patogenów wokół fragmentu kompozytu.

Wyniki: Na podstawie danych uzyskanych dla analizy termogravimetrycznej można stwierdzić, iż próbki zawierające tlenek cynku, jak też modyfikowane siarczanem(VI) miedzi(II) rozkładają się jednostopniowo (rys. 1). Proces rozkładu zachodzi w zakresie temperatur od 330°C do 470°C, maksimum rozkładu przypada na zakres 380-430°C. Masa produktu, która pozostała po procesie ogrzewania wahała się w zakresie 2,73-16,66%. Wyższe wartości pozostałości obserwowane były dla kompozytów zawierających CuSO_4 .


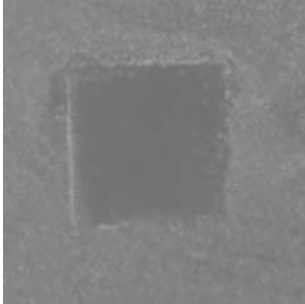
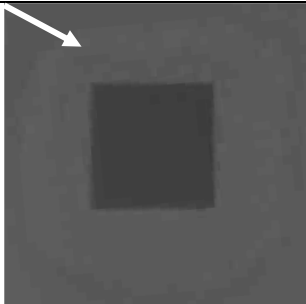
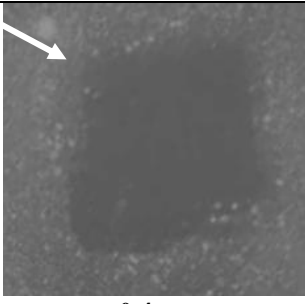


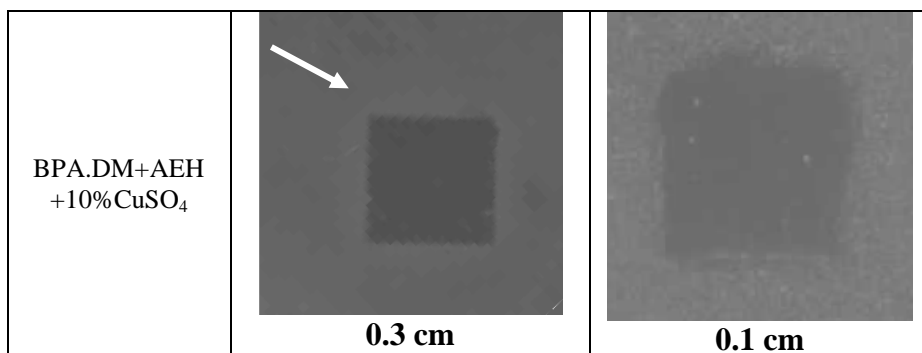


Rys. 1. Krzywe TG/DTG próbek zawierających tlenek cynku i siarczan(VI) miedzi(II).

W tabeli 1 przedstawiono skany płytek, białą strzałką oznaczono strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół powierzchni, na której znajdował się kompozyt. Zarówno materiały bez zawartości nieorganicznego modyfikatora, jak również te zawierające tlenek cynku i siarczan(VI) miedzi(II) hamowały wzrost bakterii *P. aeruginosa* i *S. aureus*. Dla kompozytów stanowiących kontrole działanie hamujące wzrost było widoczne jedynie w miejscu ich kontaktu z komórkami bakteryjnymi. Większe strefy zahamowania wzrostu były widoczne w przypadku kompozytów zawierających ZnO w kontakcie z bakterią Gram-ujemną.

Tabela 1. Strefy zahamowania wzrostu patogenów.

Mikroorganizm/ kompozyt	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
BPA.DM+AEH	 0 cm	 0 cm
BPA.DM+AEH +10% ZnO	 0.7 cm	 0.4 cm



Wnioski: W wyniku polimeryzacji UV otrzymano kompozyty składające się z dimetakrylanu bisfenolu A i akrylanu 2-etyloheksylu. Badania termogravimetryczne potwierdziły bardzo dobrą stabilność termiczną kompozytów. Ich rozkład przebiegał jednostopniowo, w zakresie temperatur 380-430°C. Masy resztkowe produktów pozostałych po ogrzewaniu wynoszą 2,73-16,66%. Materiały kompozytowe wykazywały właściwości przeciwdrobnoustrojowe wobec *P. aeruginosa* i *S. aureus*. W przypadku kompozytów modyfikowanych tlenkiem cynku i siarczanem(VI) miedzi(II) widoczne były strefy zahamowania wzrostu wokół powierzchni, na której znajdował się kompozyt. Można stwierdzić, iż lepsze właściwości przeciwbakteryjne obserwowane były w przypadku bakterii Gram-ujemnych.

Literatura:

1. N. Jones, B. Ray, K.T. Ranjit, A.C. Manna, FEMS Microbiol. Lett., 279 (2008) 71.
2. J. Liu, X. Feng, L. Wei, L. Chen, B. Song, L. Shao, Crit. Rev. Toxicol., 46 (2016) 348.
3. H. Wang, D. Wingett, M. H. Engelhard, K. Feris, K. M. Reddy, P. Turner, J. Layne, C. Hanley, J. Bell, D. Tenne, C. Wang., J. Mater. Sci.: Mater. Med., 20 (2009) 11.
4. J. Hamerliński, K. Niciński, Acta Poligraphica., 16 (2020) 5.

BADANIA POZIOMU CHLOROFILU W CELU OKREŚLENIA WPLYWU BAKTERII ENDOFITYCZNYCH NA ROŚLINY

K. ŁUSZCZAK, K. ZAMŁYŃSKA, A. CHOMA, UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Akademicka 19, 20-033 Lublin

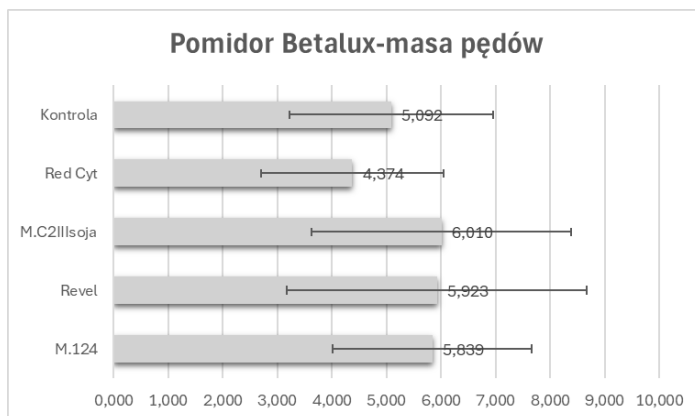
Abstrakt: Fotosynteza jest podstawowym procesem metabolizmu roślin. Zapewnia roślinie substancje organiczne niezbędne do jej wzrostu i rozwoju. Efektywność fotosyntezy zależy od czynników zewnętrznych (egzogennych), wewnętrznych (endogennych) i biotycznych. Wśród czynników egzogennych najczęściej wymienia się: natężenie światła, temperaturę, dostępność wody i dwutlenku węgla. Do endogennych zalicza się m.in. strukturę liścia, ilość chloroplastów w tkance asymilacyjnej oraz zawartość chlorofilu. Do czynników biotycznych należy m.in. obecność w glebie bakterii stymulujących wzrost roślin lub/i bakterii chorobotwórczych dla roślin – fitopatogenów [1, 2].

Wprowadzenie: Chlorofil to związek organiczny, występujący w roślinach, algach i bakteriach przeprowadzających proces fotosyntezy. Odkryto jego wiele odmian chemicznych, różniących się podstawnikami układu porfirynowego (od typu a do typu f). Rośliny zdolne do fotosyntezy oksygenicznej zawsze zawierają chlorofil a, podczas gdy u roślin wyższych występuje także chlorofil b. Cząsteczka chlorofilu posiada pięciopierścieniową porfirynę, zwaną feoporfiryną, do której poprzez wiązanie estrowe przyłączona jest reszta fitolu. Za pośrednictwem tej reszty chlorofil jest zakotwiczony w błonie tylakoidu w chloroplastach, gdzie zachodzi faza świetlna fotosyntezy [3]. Cztery pierścienie pirolowe połączone są z atomem magnezu, który m.in. uczestniczy w agregacji cząsteczek chlorofilu. Dzięki temu ułatwione jest przekazywanie energii wzbudzenia pomiędzy cząsteczkami. Układ wiązań sprzężonych pierścieni pirolowych oraz obecność atomu magnezu w centrum porfirynowym sprawiają, że chlorofil posiada zdolność absorpcji promieniowania elektromagnetycznego w zakresie światła widzialnego. Pochłonięta przez chlorofil energia świetlna, jest przekazywana do centrów reakcji fotosystemu II (PS II) i fotosystemu I (PS I). Tam częściowo jest wykorzystywana w procesie fotosyntezy. Pozostała część energii jest zużywana do emisji światła fluorescencyjnego lub tracona w postaci ciepła [4]. Badanie poziomu chlorofilu w roślinie jest wykorzystywane do oceny wydajności fotosyntezy oraz oceny kondycji danej rośliny. Jednym z najpopularniejszych instrumentów stosowanych do określania poziomu chlorofilu a w roślinie są fluorymetry, które rejestrują poziom fluorescencji tego związku. Aparat ten jest przenośny, co umożliwi wykonanie nieinwazyjnych i w miarę szybkich pomiarów bezpośrednio w środowisku wzrostu roślin. Dzięki temu, że chlorofil posiada zdolność absorpcji promieniowania elektromagnetycznego, jego zawartość w tkankach można oznaczyć metodą spektrofotometryczną. Technika ta należy do inwazyjnych metod laboratoryjnych i wymaga ekstrakcji chlorofilu z tkanki roślinnej za pomocą odpowiednich rozpuszczalników organicznych [5, 6]. Celem niniejszej pracy jest określenie poziomu chlorofilu w liściach pomidorów, szczepionych wybranymi endofitami z rodzaju *Methylobacterium*, należącymi do bakterii PGPR (ang. Plant Growth Promoting Rhizobacteria) w stosunku do roślin kontrolnych, których nie zaszczepiono bakteriami.

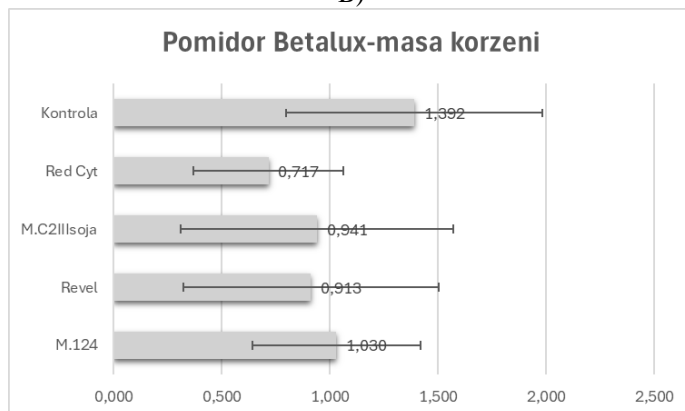
Część eksperymentalna: W pierwszym etapie badań przeprowadzono doświadczenie doniczkowe. *Solanum lycopersicum* odmiana Betalux uprawiano w szklarni w doniczkach 24 dołkowych, wypełnionych jałową glebą przez okres 6 tyg. W trakcie uprawy rośliny były dwukrotnie szczepione (w odstępach co 2 tygodnie) 1 ml zawiesiny odpowiedniego szczepu metylobakterii [OD₆₀₀ zawiesiny było ustawione na 0,2]. Szczepiono kolejno: 1. kontrola (H₂O); 2. *M. Red cyt.*; 3. *M. C2 III soja*; 4. *M. Revel*; 5. *M. 124*. Do doświadczenia zostały wykorzystane szczepy metylobakterii wyizolowane przez pracowników Katedry Genetyki i Mikrobiologii UMCS z brodawek korzeniowych roślin strączkowych (*Cytisus albus*, *Soya max*, *Trifolium repens*) rosnących w Polsce wschodniej. Po upływie 6 tyg. rośliny zebrano i zważono świeżą masę pędów i korzeni, po czym zamrożono w ciekłym azocie. W kolejnym etapie badań oznaczono spektrofotometrycznie zawartość chlorofilu w liściach pomidora. Z zamrożonych roślin losowo pobrano fragmenty liści, osuszono i zważono. Przygotowane naważki roz tarto w moździerzu zawierającym 95% alkohol etylowy, szczyptę CaCO₃ i korund. Otrzymany macerat przeniesiono do probówek wirówkowych. Próby wirowano w temperaturze pokojowej przy 9 000 rpm przez 10 min. Klarowny supernatant przeniesiono do nowych probówek. Pomiar absorpcji wykonano na czytniku płytek wielodołkowych (96-dołków) niosząc po 150 µl do każdego dołka. Pomiar wykonano w trzech powtórzeniach. Absorbancję mierzono przy długości fali 654 nm. Na podstawie otrzymanych wyników wyliczono zawartość chlorofilu w roślinach [5].

Wyniki: Z doświadczenia doniczkowego wynika, że rośliny pomidora szczepione izolatami: *Methylobacterium C2III soja*, *M. Revel* oraz *M. 124* posiadały nieznacznie wyższą średnią świeżą masę pędów w stosunku do roślin kontrolnych. Podczas gdy rośliny szczepione *M. Red cyt.* wykazywały niższą świeżą masę pędów w stosunku do roślin traktowanych *M. C2III soja*, *M. Revel*, *M. 124* i kontrolnych (Rys. 1A). Analizując świeżą masę korzenia zaobserwowano, że wszystkie rośliny szczepione metylobakteriami wykazują niższą średnią masę korzenia w porównaniu do roślin kontrolnych (Rys. 1B). Na podstawie danych dotyczących zawartości chlorofilu w roślinach pomidora, stwierdzono, że rośliny traktowane wyżej wymienionymi metylobakteriami posiadają wyższą zawartość tego barwnika w stosunku do roślin kontrolnych (Tab.1). Jednak nie widać jednoznacznych zależności pomiędzy zawartością chlorofilu w roślinach szczepionych metylobakteriami, a świeżą masą ich pędów i korzeni. Należy wnosić, że wprowadzanie do gleby bakterii określanych jako PGPR (izolaty metylobakterii) nie zawsze prowadzi do istotnego wzrostu plonów (tutaj - wzrost masy pomidorów).

A)



B)



Rys. 1. Świeża masa A) pędów i B) korzeni *Solanum lycopersicum* (pomidor zwyczajny) odmiana Betalux infekowanych różnymi szczepami metylobakterii.

Tabela 1. Zawartość chlorofilu w liściach *Solanum lycopersicum* odmiana Betalux szczepionych metylobakteriami. Wyniki różniące się statystycznie (przy $p=0,05$) zaznaczono *.

Nazwa szczepu metylobakterii	Uśredniona zawartość chlorofilu [mg/g świeżej masy liści]	±SD [mg/g świeżej masy liści]
M. C2IIIsoja	1,19	0,13
M. Revel	1,44*	0,03
M. Red cyt	1,64*	0,03
M. 124	1,28*	0,03
kontrola	0,98*	0,03

Wnioski: Na podstawie otrzymanych wyników wykazano, że badane izolaty metylobakterii (*M. C2III*soja, *M. Revel*, *M. 124* i *M. Red* cyt.) zasiedlające ryzosferę pomidorów nie wywierają znaczącego wpływu na przyrost masy (wegetację) *Solanum lycopersicum* odmiana Betalux. Równocześnie obecność metylobakterii w środowisku wzrostu pomidorów powoduje znaczący wzrost ilości barwników fotosyntetyzujących w liściach tych roślinach. Wyjaśnienie powyższych wyników wymaga dalszych analiz.

Literatura:

1. V. Zaika, T. Bondarenko, Forest Research Papers, 79 (1) (2018) 23.
2. H. Yang, P. Luo, Int. J. Mol. Sci., 22 (16) (2021) 8865.
3. M. Sulkiwicz, I. Ciereszko, Kosmos, 65/310 (2016) 103.
4. M.D. Cetner, P. Dąbrowski, I.A. Samborska, I. Łukasik, T. Swoczyk, S. Pietkiewicz, W. Bąba, H. Kalaji, Kosmos, 65/311 (2016) 197.
5. D.I. Arnon, Plant Physiology, 24 (1949) 1.
6. P.T. Lacava, J.I. Azevedo, red. Maheshwari D., Saraf M., Aeron A., Bacteria in Agrobiolology, wyd. Springer, Verlag Berlin Heidelberg (2013).

SKŁAD MIKROBIOLOGICZNY I CHEMICZNY NAPOJU KOMBUCHA W ZALEŻNOŚCI OD TEMPERATURY PROCESU FERMENTACJI

O. KWIATKOWSKA¹, I. JONIK², I. SADOK², K. RACHWAŁ³, ¹KUL, Wydział Medyczny, ul. Konstancyń 1H, 20-708 Lublin, ²KUL, Wydział Medyczny, Instytut Nauk Biologicznych, Katedra Chemii, ul. Konstancyń 1J, 20-708 Lublin, ³UP, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywnienia Człowieka, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin

Abstrakt: Zbadano zmiany składu biochemicznego napoju kombucha w zależności od temperatury prowadzenia procesu fermentacji. Fermentację napoju prowadzono w trzech temperaturach przez 14 dni. Próbkę napoju pobierano w różnym dniu fermentacji i wykonano posiewy mikrobiologiczne na trzech podłożach: agar na brzeczce, MRS i agar odżywczy, aby wyznaczyć ogólną liczbę mikroorganizmów. Identyfikację bakterii i grzybów drożdżopodobnych prowadzono techniką spektrometrii mas z użyciem desorpcji/ jonizacji laserowej wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu (MALDI-TOF MS). Metodą spektrofotometryczną oznaczono całkowitą zawartość polifenoli i flawonoidów.

Wprowadzenie: Fermentacja to jedna z głównych, ale też najstarszych metod wytwarzania i konserwacji żywności. Na proces fermentacji składają się przemiany chemiczne, obejmujące rozkład złożonych substancji organicznych na prostsze związki w wyniku działania naturalnie występujących enzymów i drobnoustrojów fermentujących, takich jak bakterie, drożdże, pleśnie [1]. Podczas tego procesu zachodzi wiele istotnych zmian biochemicznych wpływających na poziomy składników odżywczych i w konsekwencji na właściwości końcowego produktu [2].

Kombucha jest to słodko - kwaśny napój powstały w warunkach tlenowych w wyniku fermentacji słodzonej czarnej lub zielonej herbaty z grzybkim herbacianym tzw. „SCOBY” (z ang. *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts*), czyli symbiotycznej kultury bakterii i drożdży [3]. „SCOBY” to galaretowata warstwa zawierająca bakterie i drożdże osadzone w matrycy polisacharydowej utrzymującej mikroorganizmy w bliskim kontakcie z tlenem. Jest to konsorcjum bakterii i drożdży koniecznych do przeprowadzenia procesu fermentacji [3-4]. Najczęściej występującym konsorcjum jest *Acetobacter xylinum* (odpowiedzialny za tworzenie celulozy bakteryjnej) z drożdżami z rodzaju *Saccharomyces*, np. *cerevisiae* [3]. Obecne mogą być również inne gatunki bakterii kwasu octowego oraz bakterie fermentacji mlekowej [3,5]. Skład chemiczny kombuchy zależy głównie od kompozycji mikrobiologicznej napoju, a także ilości dodanego cukru, rodzaju herbaty, czasu fermentacji oraz temperatury w jakiej prowadzony jest proces. Każde zmiany warunków prowadzenia fermentacji mają wpływ na skład końcowego produktu. Jednakże, na ogólny skład chemiczny kombuchy składają się kwasy organiczne, witaminy, minerały, aniony, cukry. [2, 5].

Część eksperymentalna: W celu przygotowania kombuchy odważono po 3,5 g liściastej herbaty zielonej i czarnej oraz 100 g cukru. Mieszanek herbat zalano 1 L wrzątku

i zaparzano przez ok. 60 min. Następnie herbatę przelano przez sitko do sterylnej pojemnika, przykryto przykrywką (bez warstwy bawełnianej) i pozostawiono do ostygnięcia. Do nowego pojemnika odłano 800 mL naparu herbaty, wsypano cukier i wymieszano. Następnie dodano 200 mL kultury starterowej (kombuchy po poprzedniej fermentacji), całość wymieszano i umieszczono grzybek herbaciany. Pojemnik zamknięto przykrywką z warstwą bawełnianą i prowadzono fermentację przez 14 dni w cieplarni laboratoryjnej w trzech temperaturach 17°C, 22°C i 25°C. Do badań wykorzystano próbki napoju kombucha pobrane w 6 (lub 7) oraz w 12 dniu procesu fermentacji.

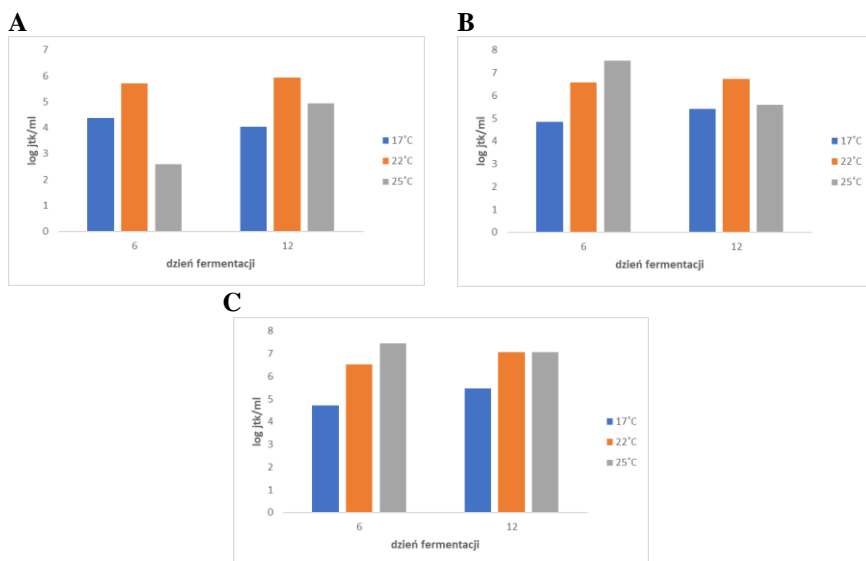
Posiewy mikrobiologiczne i wyznaczenie ogólnej liczby mikroorganizmów. Ogólną liczbę mikroorganizmów określono metodą seryjnych rozcieńczeń na płytkach Petriego z agarem odżywczym, agarem na brzeźce lub agarem MRS. Płytki inkubowano następująco: podłoże MRS: 37°C przez 3 dni, podłoże z agarem na brzeźce: 28°C przez 5 dni, podłoże z agarem odżywczym: 37°C przez 2 dni. Liczbę żywych komórek określono poprzez obliczenie miana bakterii i grzybów w oparciu o liczbę wyrosłych kolonii i wyrażono w jtk/mL (jtk – jednostki tworzące kolonie).

Oznaczenie całkowitej zawartości polifenoli (TPC). Krzywą kalibracyjną przygotowano z wykorzystaniem wodnych roztworów kwasu galusowego o stężeniach w zakresie od 5 do 250 mg/L. W celu pomiaru TPC w napoju kombuchy, 0,3 mL próbki odwirowywano przez 6 min (13 200 rpm), a następnie supernatant 4-krotnie rozcieńczono wodą. Kolejnym krokiem było dodanie 1,25 mL 10-krotnie rozcieńzonego odczynnika Folina-Ciocalteu do 125 µL roztworu wyjściowego i badanych próbek. Po 20 min mierzono absorbancję za pomocą spektrofotometru HITACHI U-2900 ($\lambda = 750$ nm).

Oznaczenie całkowitej zawartości flawonoidów (TFC). Krzywą kalibracyjną wyznaczono z użyciem roztworów katechiny na poziomach stężeń w zakresie 5-200 mg/L. Następnie, próbki napoju (0,5 mL) odwirowywano przez 6 min (13 200 rpm). Kolejnym krokiem było dodanie do 125 µL roztworu wyjściowego i badanych próbek po 0,55 mL wody i innych odczynników: 37,5 mL 15% (wag./obj.) NaNO₂ (odczekano 6 min); 37,5 mL 10% (wag./obj.) AlCl₃ (odczekano 6 min); 0,5 mL 4% (wag./obj.) NaOH (odczekano 15 min). Po 27 min zmierzono absorbancję za pomocą spektrofotometru HITACHI U-2900 ($\lambda = 510$ nm).

Identyfikacja mikroorganizmów techniką MALDI-TOF MS. Pojedyncze kolonie pobierano z hodowli na podłożu stałym i bezpośrednio nanoszono na płytkę MALDI. Następnie, każdy spot z próbką pokrywano 1 µL 70% wodnym roztworem kwasu mrówkowego, a po wyschnięciu dodatkowo 1 µL roztworu matrycy zawierającej kwas α -cyjano-4-hydroksy-cynamonowy w rozpuszczalniku organicznym. Do kalibracji spektrometru użyto standardu bakteriynego (Bruker). Płytkę umieszczono w komorze spektrometru MALDI-TOF/TOF ultraflex firmy Bruker Daltonik GmbH sterowanym z użyciem oprogramowania flexControl (wersja 3,4) rejestrując masy w zakresie od 2800 do 20000 Da (energia lasera: 65-75%). Uzyskane widma mas porównywane były z widmami referencyjnymi dostępnymi w bazie oprogramowania MALDI BioTyper Compass (wersja 4,1).

Wyniki: Zmiany ogólnej liczby mikroorganizmów na różnych pożywkach w zależności od dnia i temperatury prowadzenia procesu fermentacji kombuchy zestawiono na Rys. 1. Po inkubacji na podłożu MRS spodziewaną grupą drobnoustrojów były bakterie kwasu mlekowego. Agar na brzeźce jest podłożem stosowanym do hodowli głównie grzybów i drożdży. Natomiast agar odżywczy stosowano do hodowli bakterii bez specyficznych wymagań, m.in. *Gluconobacter*.



Rys. 1. Zmiany liczby kolonii mikroorganizmów na podłożu (A) agar odżywczy, (B) MRS, (C) agar na brzezce w zależności od temperatury i dnia fermentacji kombuchy.

Tabela 1. Przykłady zidentyfikowanych bakterii i grzybów drożdżopodobnych w próbkach napoju kombucha techniką MALDI-TOF MS.

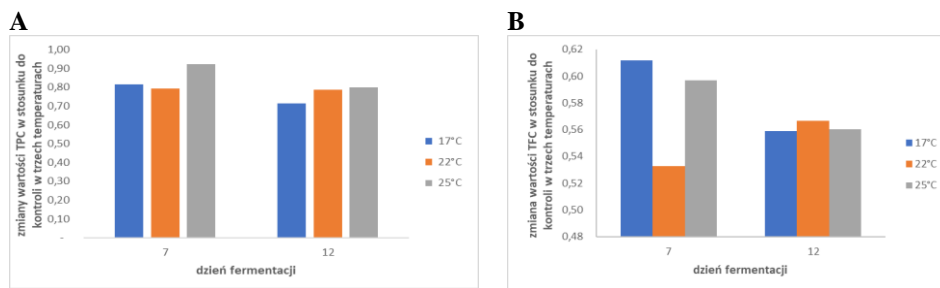
Numer próbki	Opis	Kategoria*	Pierwsze najlepsze dopasowanie		Drugie najlepsze dopasowanie	
			Mikroorganizm	WD	Mikroorganizm	WD
1	17 °C, 6 dzień, podłoże AO	(+) B	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.8	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.76
2	17 °C, 6 dzień, podłoże MRS	(+) B	<i>Gluconacetobacter intermedius</i>	1.72	NWI	1.36
3	22 °C, 6 dzień, podłoże AB	(++) A	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	2.22	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	1.93
4	22 °C, 6 dzień, podłoże MRS	(+) B	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	1.8	NWI	1.54
5	25 °C, 6 dzień, podłoże MRS	(++) A	<i>Gluconacetobacter intermedius</i>	2.2	NWI	1.33

*(+++) A – dobra identyfikacja rodzaju i prawdopodobna identyfikacja gatunkowa, (+) B – prawdopodobna identyfikacja rodzaju; AB – podłoże agar na brzezce; AO – podłoże agar odżywczy; NWI – niewiarogodna identyfikacja; WD – wskaźnik dopasowania

W przypadku pożywki agar odżywczy, największą ogólną ilość mikroorganizmów wyznaczono dla kombuchy fermentowanej w 22°C (6 i 12 dzień fermentacji). Największą liczbę drożdży odnotowano w 6 dniu fermentacji w 25°C, ale ich wysoki poziom utrzymywał się również w 12 dniu procesu w 22 i 25°C (Rys. 1C). Na pożywce MRS odnotowywano podobne zawartości bakterii w 6 i 12 dniu fermentacji w 22 °C (Rys. 1B). Natomiast w 25 °C maksymalne najwyższe wartości wyznaczono w 6 dniu fermentacji. W 17 °C, z reguły obserwowano niższe ilości mikroorganizmów niezależnie od zastosowanego podłoża. Analiza MALDI-TOF MS nie potwierdziła obecności bakterii kwasu

mlekowego w próbkach pobranych z płytek z podłożem MRS (Tabela 1). Stwierdzono natomiast obecność *Gluconacetobacter intermedius* i *Zygosaccharomyces bailii* – bakterii i drożdży typowych dla napoju kombucha. W próbkach napoju z fermentacji prowadzonej w 17°C stwierdzono dodatkowo obecność *Staphylococcus epidermidis* – patogennej bakterii, która w normalnych warunkach kolonizuje skórę człowieka, jednakże może stanowić zagrożenie dla bezpieczeństwa żywności. Infekcje *S. epidermidis* rzadko stanowią zagrożenie dla życia, jednak ich częstotliwość i fakt, że są trudne do leczenia, stanowią poważne obciążenie dla systemu zdrowia publicznego [6].

Wartości TPC były porównywalne niezależnie od temperatury prowadzenia fermentacji i czasu procesu (Rys. 2A). W przypadku TFC z reguły odnotowywano niewielki spadek poziomu flawonoidów w 12 dniu fermentacji (Rys. 2B). TPC w trakcie fermentacji napoju mogą być związane z aktywnością metaboliczną społeczności drobnoustrojów tworzących „SCOBY”.



Rys. 2. Zmiany (A) TPC i (B) TFC w napoju kombucha w stosunku do wyjściowego naparu herbaty w zależności od temperatury prowadzenia procesu fermentacji.

Wnioski: Wyższa temperatura procesu fermentacji gwarantuje bogatszy skład mikrobiologiczny i polifenolowy napoju kombucha. Zaobserwowano również zmiany liczebności poszczególnych grup mikroorganizmów z czasem fermentacji. Analiza MALDI-TOF MS potwierdziła obecność *G. intermedius* i *Z. bailii*, które są znanymi i pożądanymi członkami społeczności mikroorganizmów w kombuchy. W próbkach pochodzących z fermentacji prowadzonej w niskiej temperaturze (17 °C) stwierdzono obecność *S. epidermidis*, która jest bakterią patogenną.

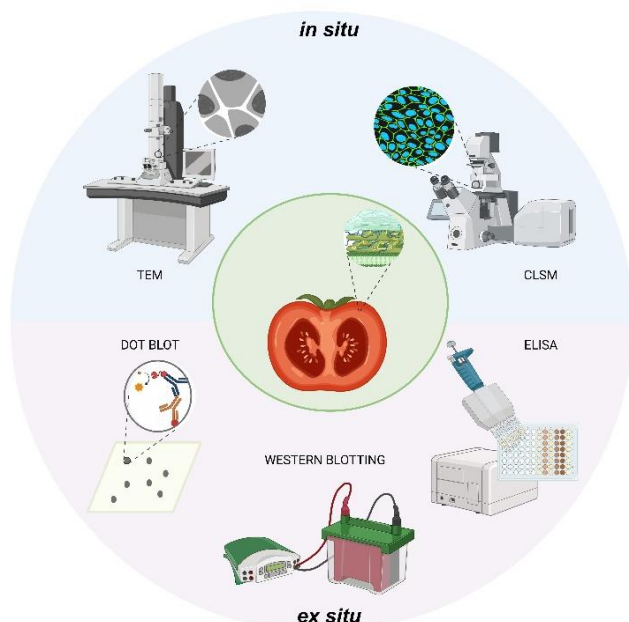
Literatura:

1. M. Šikić-Pogačar, D.M. Turk, S. Fijan, BMC Public Health, 1695 (2022) 2.
2. S.A. Villarreal-Soto, S. Beaufort, J. Bouajila, J.P. Souchard, P. Taillandier, J. Food Sci, 83(3) (2018) 580.
3. J.A. Jarrell, N. Walia, D. Nemergut, A. Agadi, J.W. Bennett, Microbiol. Res, 13 (2022) 128.
4. J. De Roos, L. De Vuyst, Curr. Opin. Biotechnol, 49 (2018) 115.
5. K. Modrzejewska, E. Bogusławska-Wąs, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 27(4) (2020) 39.
6. M. Otto, Nat Rev Microbiol., 7(8) (2009) 555.

METODY MOLEKULARNE I MIKROSKOPOWE W BADANIACH ŚCIANY KOMÓRKOWEJ

N. KUTYRIEVA-NOWAK, A. LESZCZUK, A. ZDUNEK, Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk, Zakład Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, Polska

Abstrakt: Metody molekularne i mikroskopowe odgrywają ważną rolę w badaniach struktur komórkowych, w tym w analizie architektury ściany komórkowej. Ściana komórkowa owoców składa się z mikrofibryli celulozowych połączonych z polisacharydami, białkami i proteoglikanami. Badania nad interakcjami pomiędzy składnikami ściany komórkowej pozwalają na uzyskanie kluczowych informacji na temat ich funkcji oraz zachodzących zmian podczas rozwoju, dojrzewania i przechowywania owoców. Ze względu na specyficzną strukturę tkanek owocowych, znane metody analityczne wymagają modyfikacji i dostosowania do charakterystycznych cech badanego materiału. Celem niniejszej pracy było zoptymalizowanie technik biologii molekularnej oraz metod mikroskopowych, które mogą posłużyć w badaniach procesów fizjologicznych owoców (Rys. 1). Uzyskano precyzyjne narzędzia pozwalające na charakterystykę ilościową i jakościową poszczególnych składników ściany komórkowej w warunkach *in situ* i *ex situ*.



Rys. 1. Techniki molekularne i mikroskopowe wykorzystywane w badaniach ściany komórkowej owoców. Rysunek wykonano na podstawie pracy [1] z wykorzystaniem narzędzi BioRender.com.

Wprowadzenie: Ściana komórkowa zbudowana jest z celulozy, polisacharydów i białek (w tym białek arabinogalaktanowych, AGP) [2]. Modyfikacje poszczególnych składników ściany komórkowej mają znaczący wpływ na zachodzące przemiany fizjologiczne, w tym na proces rozwoju i dojrzewania owoców. Ze względu na złożony skład i strukturę ściany komórkowej, do jej analizy konieczne jest zastosowanie precyzyjnych narzędzi molekularnych i mikroskopowych. Techniki immunocytochemiczne bazujące na zastosowaniu przeciwciał pierwszo- (Tab. 1) i drugorzędowych stanowią kluczowe rozwiązanie w jakościowej i ilościowej charakterystyce montażu ściany komórkowej [3]. Metody *ex situ*, m.in. technika Western blotting i ELISA, umożliwiają detekcję i identyfikację poszczególnych epitopów komponentów ściany komórkowej. Metody *in situ*, takie jak znakowanie immunofluorescencyjne i technika immunozłotowa, pozwalają na wizualizację dystrybucji składników ściany komórkowej na poziomie komórkowym (wykorzystując obrazowanie z użyciem mikroskopii konfokalnej, CLSM) i subkomórkowym (wykorzystując mikroskopię elektronową transmisyjną, TEM). Działanie wszystkich wymienionych metod opiera się na tworzeniu wiązań pomiędzy antygenem a przeciwciałem zaś protokoły technik składają się z kilka głównych etapów: (1) preparatyka próbki, (2) inkubacja z przeciwciałem pierwszorzędowym, (3) inkubacja z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym, (4) detekcja sygnału oraz (5) analiza danych [1, 4].

Tabela 1. Wybrane przeciwciała pierwszorzędowe wraz ze strukturą znakowanych epitopów [1].

Nazwa przeciwciała	Struktura epitopu
JIM13	β -GlcA(1 \rightarrow 3)- α -GalA(1 \rightarrow 2)- α -Rha (AGP)
LM1	ekstensyna
LM2	β -D-GlcA (AGP)
LM11	arabinoksylan
LM14	arabinogalaktan typu II
LM16	ramnogalakturonan typu I (RG-I)
LM19	nieestryfikowany homogalakturonan (HG)
LM20	estryfikowany homogalakturonan (HG)

W niniejszej pracy opisano wybrane modyfikacje preparatyki, niezbędne do zoptymalizowania protokołów metod molekularnych i mikroskopowych. Zastosowane zmiany w procedurach technik immunocytochemicznych pozwalają na analizę wybranych składników ściany komórkowej w modelowym materiale badawczym – tkance owoców pomidora (*Solanum lycopersicum* L.).

Część eksperymentalna: Zastosowanie technik immunocytochemicznych w celu identyfikacji i wizualizacji poszczególnych komponentów ściany komórkowej owoców ma swoje wady i zalety. Główną zaletą jest ich wysoka specyficzność. Do wad można zaliczyć etap przygotowania próbki, gdyż wysoki poziom uwodnienia tkanki owoców, zwłaszcza w stadiach kończącego się procesu dojrzewania, wymusza jej odpowiednie przygotowanie. W tym celu wykonano utrwalanie w 2% roztworze paraformaldehydu i 2,5% aldehydu glutarowego, z następnym etapem dehydratacji w serii roztworów alko-

holu etylowego (30-99,8%). Etap polimeryzacji próbki wymaga zastosowania żywicy, np. żywicy akrylowej. Utrwalone i utwardzone próbki poddano sekcjonowaniu, odpowiednio na półcienkie (1 μm) i ultracienkie (70 nm) skrawki za pomocą ultramikrotomu. Tak przygotowane próbki, osadzone na szkiełkach mikroskopowych pokrytych warstwą polilizyny, bądź osadzone na siatkach niklowych z forwarem poddawano reakcjom immunocytochemicznym. Po kluczowym etapie optymalizacji stężenia roztworu przeciwciał, tkanki owoców inkubowano z przeciwciałem pierwszorzędowym (CLSM – 1:50, TEM – 1:10) oraz właściwym do wykorzystywanej metody przeciwciałem drugorzędowym. W technice immunofluorescencyjnej stosowano przeciwciała sprzężone z fluorochromem w rozcieńczeniu 1:200, a w technice immunozłotowej – przeciwciała sprzężone z nanocząstkami złota, 1:50. Przedstawione stężenia przeciwciał zostały odpowiednio dobrane do analizowanych próbek, co pozwoliło na uzyskanie wysokiej jakości wizualizacji składników ściany komórkowej w warunkach *in situ*. Dodatkowo w technice immunozłotowej przeprowadzono krytyczne kontrastowanie za pomocą octanu uranylu i cytrynianu ołowiu [1].

Metody molekularne opierają się na badaniach materiału wyizolowanego z tkanek owoców. W tym celu wykorzystano zmodyfikowany bufor ekstrakcyjny Laemmliego [5], zawierający 5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 700 mM β -merkaptotoetanol i inhibitory proteaz. Zastosowanie buforu Laemmliego pozwala na utrzymanie odpowiedniego pH, siły jonowej i stabilności składników ściany komórkowej, głównie białek i proteoglikanów. W tak przygotowanych próbkach analizowano obecność poszczególnych epitopów wykorzystując techniki immunoblottingu. Przeprowadzenie szybkiego testu dot blot pozwoliło na dobranie stężeń przeciwciał do następných analiz poprzedzonych elektroforetycznym rozdziałem próbki. W technice Western blotting zastosowano znacząco niższe stężenie przeciwciał pierwszorzędowych (1:500). Dodatkowo zmodyfikowano stężenia buforu blokującego z albuminą surowicy bydlęcej w celu zablokowania niespecyficznych miejsc wiązania przeciwciał. Drugą metodą molekularną pozwalającą na oznaczenie ilości epitopów poszczególnych komponentów ściany komórkowej owoców jest test immunoenzymatyczny ELISA (*ang. enzyme-linked immunosorbent assay*). W celu zoptymalizowania techniki do badań tkanki owoców wybrano test pośredni (*ang. indirect ELISA*). Procedurę rozpoczęto od zmodyfikowanego etapu immobilizacji próbki do fazy stałej (37°C przez 72 godziny), a następnie przeprowadzono opłaszczenie warstwą przeciwciał. W tym celu zastosowano rozcieńczenie przeciwciała pierwszorzędowego 1:20 oraz 1:500 dla przeciwciała skoniugowanego z enzymem i skierowanego przeciw pierwszorzędemu przeciwciału detekcyjnemu. Kolorymetryczna detekcja sygnału, zależnego od ilości powstałych wiązań antygen-przeciwciała, została uwidoczniiona dzięki reakcji barwnej, zachodzącej pomiędzy skoniugowanym z immunoglobulinami enzymom i odpowiednich dla nich substratom (NBT oraz BCIP).

Wyniki: Otrzymane dane dotyczące cech strukturalnych tkanki owoców pozwoliły na stworzenie detalicznego opisu montażu ściany komórkowej, z nadrzędną rolą związkowych polisacharydowych. Na uwagę zasługują rezultaty analiz jednego ze składników macierzy zewnątrzkomórkowej – AGP. AGP są proteoglikanami o swoistej strukturze molekularnej, charakteryzując się obecnością domeny białkowej i łańcuchów węglowodanowych (około 90-95% masy cząsteczkowej). AGP mają unikalne cechy, takie jak obecność łańcuchów arabinogalaktanu typu II (AG) przyłączonych do rdzenia białkowe-

go złożonego z reszt Hyp, Pro, Ala, Ser i Thr. Dodatkowo, w części cukrowej odnotowano obecność reszty ramnozy, fukozy, ksylozy, kwasu glukuronowego oraz kwasu galakturonowego [7]. Ich specyficzna struktura molekularna i dystrybucja przyczynia się do funkcjonalnej różnorodności, konsekwentnie wpływając na przebieg licznych procesów fizjologicznych, w tym procesu rozwoju i dojrzewania owoców. Badania mikroskopowe owoców na różnych stadiach dojrzewania wykazały, że w początkowym stadium procesu (*ang. breaker*) epitopy AGP znajdują się w ścianie komórkowej w bezpośrednim sąsiedztwie z błoną komórkową. Wraz z postępem procesu dojrzewania (*ang. red ripe*) określono obecność badanych epitopów AGP w całej przestrzeni macierzy zewnątrzkomórkowej, w tym w kompartmentach cytoplazmatycznych. Należy podkreślić, że przeprowadzone metody *in situ*, obok opisu jakościowego lokalizacji AGP w tkance owoców pozwoliły na charakterystykę ilościową występowania AGP w owocach. Wykazano najwyższą zawartość AGP w początkowych stadiach procesu dojrzewania, tuż po zakończeniu procesów rozwojowych owoców oraz degradację ich łańcuchów cukrowych wraz z postępującym procesem dojrzewania [6]. Analizy *ex situ* tkanek owoców unaocniły liczne zmiany w strukturze molekularnej AGP. Potwierdzono najwyższą zawartość epitopów LM2 (β -D-GlcA), przy istotnie mniejszej ilości epitopów LM14 (AG). Ponadto, analizy molekularne wykazały zależność pomiędzy stadium procesu a składem łańcuchów cukrowych AGP. Na podkreślenie zasługuje znaczny spadek wartości mas molekularnych AGP, od 150-120 kDa w stadiach inicjacji procesu dojrzewania do 20-25 kDa w owocach w pełni dojrzałych. Stwierdzając wyraźnie przeważającą obecność AGP o niskiej masie molekularnej potwierdzono ich deprecjację w końcowych etapach procesu dojrzewania. Na podstawie uzyskanych wyników z zastosowaniem przeciwciał JIM13, JIM15, LM2 oraz LM14 niskocząsteczkowe pasma uznano za marker finalizacji procesu dojrzewania [6].

Wnioski: Techniki immunocytochemiczne dają możliwość precyzyjnej oceny zmian molekularnych i strukturalnych, zarówno w analizach *in situ*, jak i *ex situ*. Dokonane modyfikacje metodyczne pozwoliły na wykonanie kompleksowych, ukierunkowanych badań składników ściany komórkowej owoców podczas procesu dojrzewania. Uzyskane wyniki stanowią bezsprzecznie cenne informacje mogące stanowić uzupełnienie danych uzyskiwanych z użyciem standardowych metod biochemicznych.

Badania finansowane z projektu SONATA16 Narodowe Centrum Nauki (nr 2020/39/D/NZ9/00232).

Literatura:

1. N. Kutyrieva-Nowak, A. Leszczuk, A. Zdunek, *Plant Methods*, 19 (2023) 117.
2. L. Tan, S. Eberhard, S. Pattathil, et al., *Plant Cell*, 25 (2013) 270.
3. A. Leszczuk, M. Chylińska, E. Zięba, et al., *Plant Sci*, 275 (2018) 36.
4. I. Moller, S.E. Marcus, A. Haeger, et al., *Glycoconj. J*, 25 (2008) 37.
5. U.K. Laemmli, *Nature*, 227 (1970) 680.
6. N. Kutyrieva-Nowak, A. Leszczuk, A. Zając, et al., *Sci. Hort.*, 310 (2023) 111718.
7. A. Showalter, *Cell Mol Life Sci.*, 58 (2001) 1399.

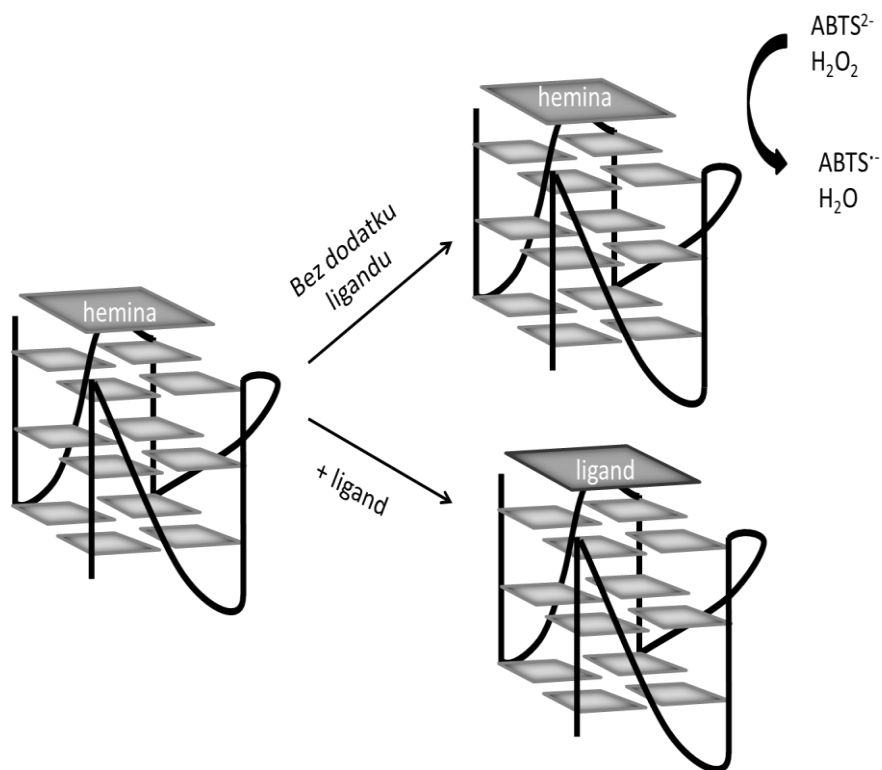
ZASTOSOWANIE DNAZYMÓW A AKTYWNOŚĆ PEROKSYDAZY W BADANIU ODDZIAŁYWAŃ G-KWADRUPLEKS/LIGAND

M. KASSEM, A. GŁUSZYŃSKA, J. KOSMAN, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Wydział Chemii, Zakład Chemii Bioanalitycznej, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań

Abstrakt: Obiektem przedstawionej pracy były kompleksy G-kwadrupleksów z heminą, tworzące DNAzym o aktywności peroksydazy chrzanowej. Wykorzystując zdolność DNAzymów do katalizowania reakcji pomiędzy chromogennym substratem a nadtleniem wodoru, zbadano zdolność innych ligandów do wiązania się z strukturą G-kwadrupleksu i wypierania heminy, co skutkowało obniżeniem aktywności DNAzymu. Metoda ta może zostać wykorzystana w badaniu oddziaływań ligandów z strukturami G-kwadrupleksów.

Wprowadzenie: Struktury zwane G-kwadrupleksami od wielu lat stanowią obiekt wielu badań. Powstają one na sekwencjach kwasów nukleinowych bogatych w reszty guanozyny. Cztery reszty guanozynowe tworzą między sobą wiązania wodorowe typu Hoogstena, tworząc G-tetradę. Co najmniej dwie, choć najczęściej trzy G-tetrazy w strukturze G-kwadrupleksu są dodatkowo stabilizowane oddziaływaniami warstwowymi. Struktura G-kwadrupleksu jest dodatkowo stabilizowana przez kation metalu (najczęściej potasu). Wolne odcinki nici tworząc pętle, oplatają stos tetrad, stanowiących rdzeń całej struktury.[1] W zależności od ilości cząsteczek DNA, rodzaju pętli, kierunku nici, możliwe jest tworzenie różnorodnych topologii, które podzielić można na równoległe, antyrównoległe i hybrydowe struktury G-kwadrupleksów. G-kwadrupleksy mogą wiązać się z różnymi cząsteczkami, które nazywamy ligandami. Ligandy składają się głównie z części aromatycznej oraz łańcuchów bocznych o ładunkach dodatnich. Część aromatyczna znacznie lepiej oddziałuje z powierzchnią G-4, natomiast dodatni łańcuch dobrze oddziałuje z ujemnie naładowanym szkieletem DNA. Ligandy mogą wiązać się z strukturą G-kwadrupleksy w różny sposób. Cząsteczka może wnikać do rowków G-4, nakładać się od góry G-tetrazy (oddziaływanie typu „end-stacking”) lub oddziaływać z nicią [2]. W badaniach oddziaływania ligandu z G-kwadrupleksem należy wyznaczyć stałą trwałości powstałego kompleksu. Można do tego zastosować metody bezpośrednie, jak miareczkowanie spektrofotometryczne czy miareczkowanie spektrofluorymetryczne. Jednak nie wszystkie związki wykazują fluorescencję lub mają intensywne pasmo absorpcji w zakresie widzialnym. Jeśli, więc mamy do czynienia z takim ligandem, konieczne jest użycie metod pośrednich. W przedstawionej pracy badam oddziaływania pomiędzy G-kwadrupleksem, a heminą, wykorzystując metodę pośrednią, bazującą na DNAzymach. Wykazano, że struktura G-kwadrupleksu, tworzy kompleks z cząsteczką heminy, za pomocą oddziaływania „end stacking”. Oznacza to, że atomy tlenu reszt guanozyn oddziałują z atomem żelaza, znajdującego się w cząsteczce heminy. Tym samym zwiększają jego aktywność enzymatyczną. Aktywność peroksydazowa całego układu, jest tym wyższa, im lepsze jest oddziaływanie pomiędzy G-4, a heminą. W cząsteczce heminy atom żelaza jest związany wiązaniem koordynacyjnym z atomem chloru, natomiast

drugie miejsce jest wolne. Przyłącza się do niego cząsteczka H_2O_2 . [3] Tak powstały kompleks może uczestniczyć w procesach utleniania i redukcji. Metoda opisana w tej pracy, polega na działaniu DNAzymem na substrat chromogenny, jakim jest kwas 2,2'-azyno-di-[3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy] (ABTS). W obecności H_2O_2 , dochodzi do utlenienia $ABTS^{2-}$, do anionu rodnikowego $ABTS^{\cdot-}$, który ma intensywne zabarwienie i maksimum absorpcji obserwowane przy 414 nm. Po dodaniu potencjalnego liganda, będzie on konkurował z heminą o miejsce wiązania z G-kwadrupleksem. Spowoduje to spadek intensywności zabarwienia, jako konsekwencja spadku intensywności utleniania ABTS. [4] Na rysunku 1 przedstawiono poglądowy schemat działania metody wykorzystanej w niniejszej pracy. W poniższej pracy przedstawię wstępne wyniki badań aktywności peroksydazowej DNAzymów w obecności różnych ligandów zdolnych do konkurowania z cząsteczką heminy.



Rys. 1. Schemat działania metody wypierania heminy przez ligand z kompleksu G-kwadrupleks/hemina. W nieobecności ligandu kompleks G-kwadrupleks/hemina katalizuje reakcję pomiędzy ABTS i nadtlenkiem wodoru. W obecności ligandu następuje wyparcie heminy przez ligand i powstały kompleks nie wykazuje aktywności katalitycznej i nie jest obserwowane utlenianie ABTS.

Część eksperymentalna: Badania przeprowadzono dla trzech sekwencji wymienionych w tabeli 1. Jako ligandów użyto heminy, zakupionej w Sigma Aldrich, oraz związków zsyntezowanych przez prof. UAM dr. hab. Agatę Głuszyńską określonych skrótami: AG oraz ER, opisanych w artykule opublikowanym przez A. Głuszyńską i współpracowników [5].

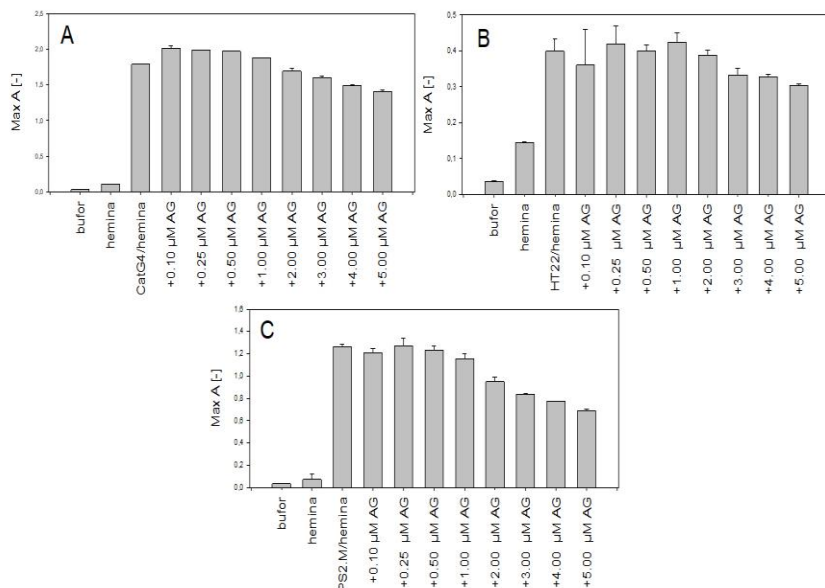
Tabela 1. Sekwencje wykorzystane w badaniach.

Nazwa sekwencji	Topologia sekwencji	Sekwencja
CatG4	równoległa	5'-TGGGTAGGGCGGGTTGGGAAA-3'
PS2.M	mieszanina topologii	5'-GTGGGTAGGGCGGGTTGG-3'
HT22	hybrydowa	5' AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG 3'

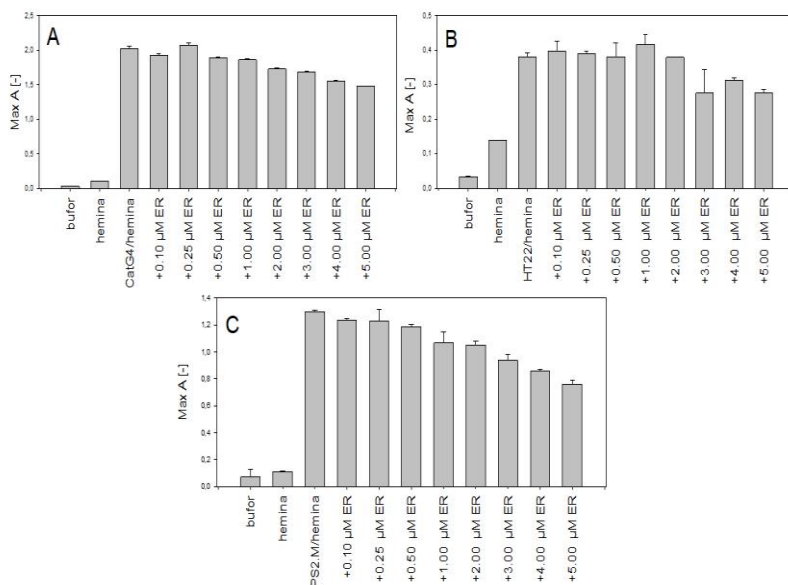
Mieszaniny buforu, chlorku potasu, heminy oraz odpowiedniej sekwencji, poddano podgrzewaniu przez 5 minut w temperaturze 95°C. Następnie roztwory chłodzono 15 minut w lodzie i 15 minut w temperaturze pokojowej. W kolejnych krokach dodano ligand AG lub ER i inkubowano 30 minut w temperaturze pokojowej. Po dodaniu substratu chromogenego, ABTS, przeniesiono roztwory na płytkę. Pomiar aktywności enzymatycznej badanych układów dokonano na czytniku mikroplatek (Tecan M200) w 96-dółkowych transparentnych mikroplatekach (Corning). Intensywność absorbancji rejestrowano w czasie 600s w odstępach co 10s przy długości fali 414 nm. Przed pomiarem do dołków został dodany H₂O₂ korzystając z dyspensora automatycznego.

Wyniki: Wykresy przedstawione na rysunkach 1 i 2 obrazują maksima absorpcji po upływie 15 minut reakcji utleniania ABTS katalizowanej przez DNAzym w obecności liganda AG lub ER. Do dołków aparat zaaplikował roztwór H₂O₂ i dokonywał pomiaru co 10 sekund. W przypadku roztworu samego buforu aktywność jest znikoma. Hemina sama w sobie wykazuje niewielką aktywność peroksydazową, dlatego jej sygnał jest trochę wyższy niż ten odpowiadający roztworowi buforu. W badaniu wykorzystano sekwencje, tworzące G-kwadrupleksy o topologii równoległej (CatG4), sekwencje o tworzącą mieszaninę topologii (PS2.M) oraz o topologii hybrydowej (HT22). Przeprowadzono próby z dodatkiem liganda AG oraz ER. Największą absorbancję zauważono w przypadku sekwencji CatG4. DNAzym, tworzony przez sekwencje HT22, wykazywał najniższy sygnał. W jego przypadku, sygnał był tak słaby, że konieczne było podwyższenie stężenia DNA oraz heminy z 1μM do 3μM. Jeśli chodzi o PS2.M, to absorbancja była niższa niż w przypadku CatG4, ale ponad trzykrotnie wyższa niż w przypadku HT22.

Ligand AG oraz ER mają zdolność do wypierania heminy z kompleksu G-kwadrupleks/hemina. Stężenie ligandu wynosiło kolejno 0,10 μM; 0,25 μM; 0,50 μM; 1,00 μM; 2,00 μM; 3,00 μM; 4,00 μM; 5,00 μM. Na Rysunku 2 i 3 przedstawiono porównanie wartości absorbancji maksymalnej rejestrowanej po 15 minutach od dodatku nadtlenu wodoru dla wszystkich trzech sekwencji i obu ligandów. W przypadku niższych stężeń liganda (0,10-0,50 μM) absorbancja nie ulegała znacznym zmianom. Efekt ten był obserwowany dla wszystkich badanych warunków. Wraz ze wzrostem stężenia AG lub ER obserwowany był spadek absorbancji. Jest to spowodowane wypieraniem heminy z kompleksu przez ligandy, a to skutkuje spadkiem aktywności peroksydazowej i zmniejszeniem intensywności utleniania ABTS. Widoczne jest, że nawet przy 5-krotnym nadmiarze liganda w stosunku do heminy spadek aktywności nie jest aż tak znaczny. To potwierdza, że hemina ma większe powinowactwo w stosunku do G4 niż AG i ER.



Rys. 2. Maksymalna absorbancja uzyskana po 15 min reakcji utleniania ABTS katalizowanej przez DNAzymu z dodatkiem ligandu AG w zakresie 0,1 – 5,0 μM. A- CatG4, B- HT22, C- PS2.M.



Rys. 3. Maksymalna absorbancja uzyskana po 15 min reakcji utleniania ABTS katalizowanej przez DNAzymu z dodatkiem ligandu ER w zakresie 0,1 – 5,0 μM.. A- CatG4, B- HT22, C- PS2.M.

Wnioski: W przedstawionych badaniach wykazano, że DNAzymy o aktywności peroksydazowej tworzone przez kompleks G-kwadrupleks/hemina mogą być stosowane

w badaniach oddziaływań z innymi ligandami dla G-kwadrupeksów. W badaniach wykorzystano dwa ligandy, o potwierdzonej zdolności do oddziaływania z strukturami G-kwadrupeksu. Oba ligandy zdolne były do wypierania heminy z kompleksu z G-kwadrupeksem, co przekładało się na zmniejszoną aktywność peroksydazową w reakcji z chromogenicznym substratem ABTS. Metoda ta w dalszych krokach zostanie przebadana na większej ilości ligandów. Opracowana metoda zwiększy repertuar metod pośrednich służących do badań oddziaływań G-kwadrupeks-ligand.

Literatura:

1. D. Yang, *Methods Mol Biol.*, 2035 (2019) 1.
2. V. Meier-Stephenson, *Biophys Rev.*, 14 (2022) 635.
3. J. Li, H. Wu, Y. Yan, T. Yuan, Y. Shu, X. Gao, L. Zhang, S. Li, S. Ding, W. Cheng, *Nucleic Acids Research*, 49 (2021) 13031.
4. X. Cheng, X. Liu, T. Bing, Z. Cao, D. Shangguan, *Biochemistry*, 48 (2009) 7817.
5. A. Głuszyńska, B. Juskowiak, M. Kuta-Siejkowska, M. Hoffmann, S. Haider, *Int. J. Biol. Macromolecules*, 114 (2018) 479.

METODY OZNACZANIA WRAŻLIWOŚCI NA ANTYBIOTYKI

D. JAGLENIEC, J. KUTKOWSKA, UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Abstrakt: Skuteczność terapii stosowanych w leczeniu pacjentów z infekcjami bakteryjnymi wymaga starannego doboru antybiotyków w oparciu o testy mikrobiologiczne oraz określenia *in vitro* poziomu wrażliwości lub oporności badanych izolatów na antybiotyki. Oznaczanie wrażliwości na antybiotyki pozwala na określenie zdolności środków przeciwdrobnoustrojowych do hamowania wzrostu mikroorganizmów. Jest ważnym etapem diagnostyki bakteriologicznej i ma kluczowe znaczenie w powodzeniu antybiotykoterapii.

Wprowadzenie: Poważnym zagrożeniem zdrowia publicznego na całym świecie jest wzrastająca oporność bakterii na środki przeciwdrobnoustrojowe. Szybkie i dokładne wykrycie szczepu lekoopornego i dobór odpowiednich leków we właściwym stężeniu jest istotne w zapobieganiu rozprzestrzenienia się tego niebezpiecznego zjawiska. Najczęściej stosowanymi metodami określania antybiotykowrażliwości są: metoda krążkowo-dyfuzyjna (metoda Kirby-Bauera), oznaczanie minimalnego stężenia hamującego wzrost (MIC) metodą mikrorozcieńczeń w bulionie oraz metody zautomatyzowane. Oporność mikroorganizmów jest jednym z poważniejszych problemów, z którymi się stykają służby zdrowia na świecie. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *The World Health Organization*) antybiotykkooporność prowadząca do wzrostu zachorowalności i śmiertelności jest problemem globalnym. Pandemia SARS-CoV-2 spowodowała pogłębienie się problemów związanych z opornością bakterii na środki przeciwdrobnoustrojowe. Mechanizmy antybiotykkooporności mogły się rozwinąć przez nadmierne i niewłaściwe stosowanie antybiotyków, nieodpowiedni czas ich podawania - zbyt długi lub za krótki, długie pobyty pacjentów w szpitalach oraz stosowaniem leków immunosupresyjnych. W celu wykrycia wrażliwości danego drobnoustroju na leki stosowane są różnorodne metody laboratoryjne. Metody te można podzielić na fenotypowe, molekularne oraz na spektrometrię mas. Metodami fenotypowymi są: metoda dyfuzyjno-krążkowa, metoda seryjnych rozcieńczeń, metoda dyfuzji gradientowej oraz coraz częściej metody zautomatyzowane [3, 4]. Metoda dyfuzyjno-krążkowa jest prostą, dokładną i powtarzalną techniką oznaczania lekowrażliwości. Płytki z agarom Mueller-Hintona są inkubowane zawieszoną badanego szczepu o zmętnieniu wynoszącym 0,5 w skali McFarlanda. Następnie na powierzchni agaru umieszcza się krążki bibuły nasączone środkami przeciwdrobnoustrojowymi w odpowiednich stężeniach. Płytki są inkubowane w optymalnej temperaturze dla wzrostu badanego drobnoustroju przez 16-24 h [1]. Podczas inkubacji badany związek dyfunduje z krążka do agaru. Zahamowanie wzrostu bakterii jest widoczne w postaci przejaśnień wokół krążka. W oparciu o porównanie średnicy strefy hamowania z referencyjnymi patogen można sklasyfikować jako wrażliwy, średnio wrażliwy lub oporny na antybiotyk. Metoda ta jest metodą jakościową, która określa fenotyp oporności badanego szczepu i pozwala na dobór antybiotyków oraz wdrożenie terapii celowanej. Zaletą tej techniki jest niski koszt oraz szybka możliwość testowania dużej liczby mikroorganizmów i środków przeciwdrobnoustrojowych oraz

łatwość interpretacji uzyskanych wyników [3]. Metody seryjnych rozcieńczeń (w podłożu agarowym lub płynnym) oraz metody gradientowe pozwalają na określenie minimalnego stężenia antybiotyku (MIC, ang. *minimum inhibitory concentration*) hamującego wzrost bakterii. W metodzie mikrorozcieńczeń seryjne rozcieńczenia antybiotyku przygotowuje się w podłożu płynnym na płytkach mikrotitracyjnych (96-dołkowych), a następnie dodaje się inoculum bakterii i inkubuje w temperaturze optymalnej dla badanego izolatu. Zahamowanie wzrostu drobnoustrojów jest odczytywane wizualnie (zmętnienie) lub automatycznie. Wartość MIC jest określana jako najniższe stężenie leku, które całkowicie hamuje wzrost bakterii [3]. Zaletą metody mikrorozcieńczeń jest wygenerowanie wyniku ilościowego, powtarzalność metody oraz oszczędność odczynników, które wynikają z miniaturyzacji testu, a możliwość stosowania automatycznych czynników płytek znacznie ułatwia odczytanie wyników. Główną wadą metody jest nieelastyczność w doborze leków [1]. Metoda dyfuzji gradientowej (E-testy) jest połączeniem metody rozcieńczeń z metodą dyfuzji, która pozwala w sposób szybki i prosty określić wartości MIC. Stosowane są w niej paski nasączone gradientem stężenia środka przeciwdrobnoustrojowego, na ich powierzchni znajduje się podziałka z kolejnymi stężeniami antybiotyku. Płytki agarowe są inokulowane badanym mikroorganizmem, a następnie na powierzchnię nakładany jest pasek gradientowy. Po inkubacji testy są odczytywane, na podstawie odczytu stężenia z podziałki wyznaczana jest wartość MIC na granicy przecięcia strefy zahamowania wzrostu (kształt elipsy) z paskiem testowym [1, 3]. Metody automatyczne wprowadzone w wielu laboratoriach klinicznych i mikrobiologicznych w dużym stopniu zwiększyły ich wydajność, skróciły czas analizy i zmniejszyły koszty. Stosowanymi systemami testowymi są VITEK 2, MicroScan WalkAway i Phoenix system. Urządzenia te wykorzystują systemy optyczne do pomiaru niewielkich zmian, określają wzrost bakterii i wrażliwość na środki przeciwdrobnoustrojowe [4]. Automatyczny system VITEK 2 (firmy Biomerieux) służy do identyfikacji (ID) i określania lekowrażliwości (AST) drobnoustrojów. Składa się z 64-dołkowych płytek plastikowych tzw. kart VITEK® 2 ID/AST o rozmiarze karty kredytowej, które zawierają od 17 do 20 środków przeciwdrobnoustrojowych i pożywkę testową. Po wstępnej izolacji badanego drobnoustroju przygotowywane inoculum jest wkładane do kasety VITEK®2, którą następnie umieszcza się w komorze napełniającej. Później kasetę przenoszona jest do modułu inkubacyjnego, inkubacja i odczyt odbywają się automatycznie. System umożliwia badanie szybko rosnących bakterii tlenowych Gram-dodatnich i Gram-ujemnych oraz *Streptococcus pneumoniae*. Wyniki zawierające MIC i kategorię wrażliwości uzyskiwane są w ciągu 4–18 godzin [1, 4, 6]. W systemie MicroScan WalkAway (firmy Beckman Coulter) stosowane są standardowe płytki do mikrorozcieńczeń, które są ręcznie nawadniane, inokulowane badanym mikroorganizmem, a następnie umieszczane w inkubatorze. Urządzenie inkubuje płytki przez określony okres i okresowo wykonuje pomiary za pomocą fotometru lub fluorometru. System ten umożliwia identyfikację bakterii i oznaczanie wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe (ID/AST) [1]. BD Phoenix system (firmy BD) jest przeznaczony do identyfikacji drobnoustrojów i oceny ich lekowrażliwości. Posiada on 99 paneli testowych, które mają 84-dołki przeznaczone do rozcieńczeń i inokulacji wykonywanych ręcznie. Zasada określania antybiotyko-wrażliwości opiera się na zastosowaniu wskaźnika utleniania i redukcji (barwnik resazurynowy lub błękit Alamar) i wykrywaniu wzrostu bakterii w obecności różnych stężeń środka przeciwdrobnoustrojowego. Urządzenie dokonuje automatycznego odczytu w odstępach 20-minutowych podczas inkubacji trwa-

jącej do 18 godzin. W 2014 roku wprowadzono nowy panel badania wrażliwości bakterii Gram-ujemnych system Phoenix do stosowania w połączeniu z BD Bruker MALDI-TOF [1, 4, 7]. Metody molekularne pozwalają bezpośrednio wykrywać geny oporności, mutacje tych genów oraz ich ekspresję. Są metodą alternatywą lub uzupełnieniem metod konwencjonalnych, są znacznie szybsze niż klasyczne testy, ponieważ wyniki mogą być już otrzymane po upływie godziny. Większość metod należy do jednej z trzech kategorii, które odpowiednio są oparte na: reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, ang. *Polymerase Chain Reaction*), hybrydyzacji lub na sekwencjonowaniu [4]. Technika PCR jest najczęściej wykorzystywaną metodą do wykrywania specyficznych genów oporności na antybiotyki, pozwala na wykazanie obecności danego genu lub jego braku. Opracowano testy multipleksowe do jednoczesnego badania wielu determinant genetycznych u różnych gatunków bakterii. Jedną z najbardziej rozpowszechnionych metod jest PCR w czasie rzeczywistym (qPCR, ang. *quantitative polymerase chain reaction*), która umożliwia dokładne określenie liczby kopii genu w analizowanej próbce. Metoda ta, mimo wyższych kosztów w porównaniu do klasycznego PCR, ma kilka zalet tj. pomiar danych w czasie rzeczywistym, większa czułość oraz mniejsze ryzyko przeniesienia zanieczyszczenia. Wadą natomiast jest to, że nie dostarcza informacji o mechanizmie oporności oraz wymaga wcześniejszej hodowli, czyli nie można użyć pierwotnych próbek klinicznych. Do identyfikacji obecności specyficznych kwasów nukleinowych są wykorzystywane mikromacierze DNA. Każde pole płytki zawiera znaną sekwencję DNA tzw. sondę, unieruchomioną na powierzchni. Dzięki hybrydyzacji sond z badanym materiałem genetycznym możliwe jest ilościowe wykrywanie danych sekwencji DNA. Technika ta wymaga wyznakowania (fluorescencyjne, chemiluminescencyjne) wyizolowanego z patogenu DNA, które następnie ulega hybrydyzacji z sondami DNA na macierzy. Metoda ta pozwala na jednoczesne wykrywanie różnych patogenów i różnych genów oporności, a także odrębnych mechanizmów oporności w przeciwieństwie do metod opartych na PCR.

Zalety obecnie dostępnych metod molekularnych to: bezpośredniość, szybkość, wysoka czułość i specyficzność. Ponadto do badań można użyć bezpośrednio próbki klinicznej, w przypadku niektórych metod. Jednak obecność markera oporności, nie zawsze występuje z opornością fenotypową. Kolejnym minusem tej metody jest wykrywanie tylko znanych genów oporności, pomijając pojawianie się nowych mechanizmów, co może prowadzić do fałszywie ujemnych wyników i niewłaściwej klasyfikacji izolatów jako wrażliwych. Ponadto metody genetyczne nie umożliwiają określenia wartości MIC [4]. Wykrycie wszystkich genów, biorących udział w mechanizmie oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, umożliwiłoby zastosowanie sekwencjonowania całego genomu (WGS, ang. *whole genome sequencing*). Pomogłoby to w stworzeniu baz danych z czynnikiem oporności dla danych gatunków oraz umożliwiłoby wykrywanie oporności *in silico*. W niektórych przypadkach dane uzyskane z metod stosujących sekwencjonowanie są skorelowane z danymi uzyskanymi za pomocą fenotypowych testów wrażliwości. Jednak WGS nie jest powszechnie wykonywany, z kilku względów, m.in. z powodu istnienia nieznanymi mechanizmów oporności oraz wyższego kosztu w porównaniu z tradycyjnymi technikami [4]. Metoda spektrometrii masowej MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) jest to spektrometria mas z laserową jonizacją próbki, mierzony jest w niej czas przelotu za pomocą detektora. Zaletą tej metody jest to, że jest szybsza niż konwencjonalne. Może być stosowana do wykrywania dowolnego mechanizmu oporności na antybiotyki, przez optymalizację

zaczę wzrostu drobnoustrojów w obecności antybiotyków. Gdy mikroorganizmy są inkubowane z antybiotykami, w pożywce są zawarte znakowane izotopowo aminokwasy. Szczepy odporne i rosnące są w stanie wykorzystać aminokwasy z podłoża. Dzięki temu, w czasie badania ujawniane są piki profilu białkowego dla wrażliwych i opornych mikroorganizmów [5].

Wnioski: Wdrożenie celowanej terapii przeciwdrobnoustrojowej w oparciu o dokładne testy oznaczania lekowrażliwości jest kluczowe w leczeniu chorób zakaźnych. Pomimo wielu niedoskonałości metod fenotypowych, takich jak metoda dyfuzyjno-krażkowa i rozcieńczeń w bulionie, ich zastosowanie jest wymagane w praktyce klinicznej w celu uzyskania prawidłowych wyników zgodnie ze standardami protokołów EUCAST i CLSI. Metody molekularne są szybkie, wydajne i niezawodne, a także charakteryzują się wysoką swoistością i czułością. Niemniej jednak nie są one powszechne w rutynowych analizach mikrobiologicznych. MALDI-TOF MS wydaje się być wysoce specyficznym systemem, który pozwoli skrócić czas analizy. Jednak metoda ta nie została jeszcze opracowana dla wszystkich gatunków patogenów i środków przeciwdrobnoustrojowych, a koszty zakupu systemu i jego utrzymania są wysokie. Dlatego dalsze udoskonalanie obecnie stosowanych i nowatorskich metod oznaczania wrażliwości na antybiotyki jest konieczne w celu przyspieszenia uzyskania i opracowania wyników w laboratoriach mikrobiologii klinicznej.

Literatura:

1. J. H. Jorgensen, M. J. Ferraro, Infectious Diseases Society of America (IDSA), 49 (2009) 1749.
2. L. LaPierre i in., Laboratory Guide: Methodologies for Antimicrobial Susceptibility Testing, APEC, Singapur 2020.
3. M. Balouiri i in., J. Pharm. Analysis (JPA), 6 (2016) 71.
4. I. Gajic i in., Antibiotics, 11 (2022) 427.
5. T-Y. Hou i in., J. Food. Drug. Analysis (JFDA), 27 (2019) 404.
6. <https://www.biomerieux.pl/mikrobiologia-0>
7. <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=29254>

SKRINING GRZYBÓW PSYCHROFILNYCH W REAKCJACH KATALIZOWANYCH PRZEZ LIPAZY

S. GRABA¹, N. JASZEK¹, A. BATYRA¹, M. KUTYŁA², M. TRYTEK², ¹UMCS, Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów „Bakcyl”, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej, Akademicka 19, 20-033 Lublin, ²UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej, Akademicka 19, 20-033 Lublin

Abstrakt: Grzyby psychrofilne to organizmy, które wykształciły zdolność do życia w niskich temperaturach. Organizmy te pełnią w ekosystemach szczególną rolę w obiegu składników odżywczych ze względu na wydzielanie termostabilnych enzymów. Enzymy pochodzące z grzybów psychrofilnych wykazują wysoką aktywność w obniżonych temperaturach, co jest wysoce korzystne z ekonomicznego punktu widzenia. Przeprowadzanie z ich udziałem różnych procesów prowadzi do zmniejszenia finansowych oraz energetycznych nakładów zwłaszcza w reakcjach przeprowadzanych na dużą skalę. Lipazy to enzymy hydrolityczne, istotne w wielu gałęziach przemysłu za sprawą katalizowanych przez nie reakcji. W środowisku bezwodnym lipazy odpowiadają za katalizę takich reakcji, jak aminoliza, epoksydacja czy estryfikacja. Celem przeprowadzonych badań była ocena aktywności biokatalitycznej wybranych szczepów grzybów psychrofilnych wyizolowanych z gleby pochodzącej z arktycznej tundry w reakcjach katalizowanych przez lipazy. Uzyskane wyniki wskazują, że szczepy 59, 36, 18, 96 oraz 85 mogą znaleźć zastosowanie w procesach na skalę przemysłową ze względu na wysoką aktywność katalityczną.

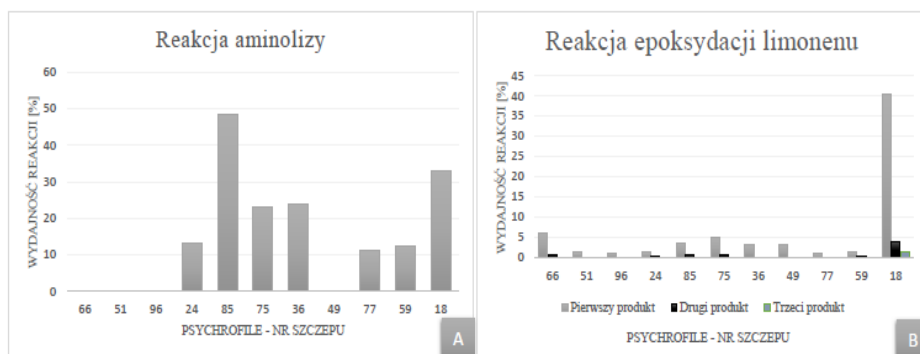
Wprowadzenie: Nasza planeta składa się blisko w 85% ze środowisk zimnych, których temperatura stale lub sezonowo oscyluje w wartościach poniżej 5°C [1]. W związku z tym, liczne organizmy zamieszkujące tego typu biosferę wykształciły unikalne cechy umożliwiające im przetrwanie w tak skrajnych warunkach. Organizmy żywe, które przystosowały się do życia w niskich temperaturach określane są jako organizmy psychrofilne [2]. Optymalna temperatura dla wzrostu tych organizmów to wartości niższe lub równe 15°C, zaś maksymalna to 20°C [3]. Wśród psychrofilii znajdziemy wiele gatunków grzybów, o cechach budzących ogromne zainteresowanie wśród naukowców z całego świata. Grzyby psychrofilne pełnią w ekosystemach szczególną rolę w obiegu składników odżywczych ze względu na wydzielanie enzymów, wśród których znajdują się między innymi lipazy [3]. Lipazy (EC 3.1.1.1) to enzymy hydrolityczne, należące do hydrolaz serynowych i szczególnie istotne w wielu gałęziach przemysłu. Reakcje katalizowane przez lipazy w środowisku wodnym prowadzą do hydrolizy wiązań estrowych natomiast w środowisku bezwodnym odpowiadają za katalizę takich reakcji jak: estryfikacja czy też aminoliza [6,7]. Aminoliza jest reakcją estrów lub kwasów karboksylowych z aminą; stanowi bezpośrednią metodę syntezy amidów. Amidy są z kolei częstym składnikiem licznych leków, w związku z czym poszukiwanie zrównoważonych metod ich pozyskiwania jest niezbędne dla rozwoju przemysłu farmaceutycznego [9]. Kolejną wartościową przemysłowo reakcją chemoenzymatyczną jest epoksydacja limonenu, monoterpenu o licznych zastosowaniach w przemyśle chemicznym i perfumeryjno-

kosmetycznym. Epoksyd limonenu jest związkiem wykorzystywanym do syntezy bardziej złożonych struktur leków czy też biodegradowalnych polimerów. Proces ten jest jednak skomplikowany i kosztowny, w związku z czym stale poszukuje się nowych metod przeprowadzania efektywnej epoksydacji [10,11]. Reakcję estryfikacji katalizowaną przez lipazy stosuje się w celu poprawy specyficznych właściwości substratów, jak emulgacja, dyspersja czy ich jakość użytkowa [14]. Innym cennym związkiem terpenowym jest alkohol perylowy, składnik olejków eterycznych o wysokiej aktywności biologicznej; znajduje zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej. Związek ten jest stosowany także jako substrat w reakcji estryfikacji katalizowanej przez grzybowe lipazy [15]. Enzymy pochodzące z grzybów psychrofilnych wykazują wysoką aktywność w obniżonych temperaturach co prowadzi do licznych korzyści ekonomicznych przeprowadzanych z ich udziałem procesów, takich jak obniżenie temperatury katalizowanych reakcji, co prowadzi do mniejszych nakładów energii oraz nakładów finansowych zwłaszcza przy reakcjach przeprowadzanych na dużą skalę [2]. Taki model biokatalizy wiąże się również ze znaczną redukcją procesu parowania substratów, co jest szczególnie istotne w reakcjach z udziałem substancji lotnych, takich jak terpeny, oraz skróceniem czasu reakcji i zmniejszeniem ryzyka występowania reakcji niepożądanych, których szansa na wystąpienie w wyższych temperaturach wzrasta [6]. Enzymy grzybowe mogą być wykorzystywane jako biokatalizatory wielu reakcji chemicznych interesujących z punktu widzenia przemysłowego. W poniższej pracy przedstawione zostały wyniki skринingu wybranych szczepów grzybów psychrofilnych w reakcjach katalizowanych przez lipazy.

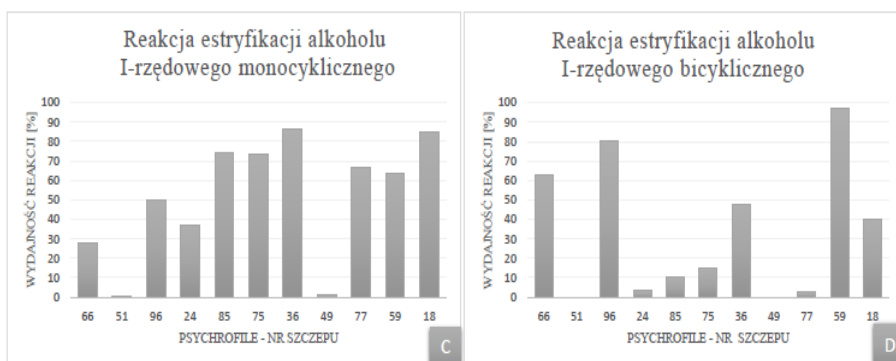
Część eksperymentalna: Doświadczenia przeprowadzono na grzybach psychrofilnych wyizolowanych z gleby pochodzących z arktycznej tundry, które oznaczono następującymi numerami: 66, 51, 96, 24, 85, 75, 36, 49, 77, 59, 18. Hodowle grzybowe prowadzono na podłożu podstawowym, o składzie: 0,7% Tween 85; 0,1% ekstrakt drożdżowy; 0,1% K_2HPO_4 ; 0,5% $(NH_4)_2SO_4$; 0,02% $MgSO_4 \times 7H_2O$; 1% oliwy z oliwek i 0,5% $CaCO_3$ (pH = 6). W pracy przeprowadzono cztery reakcje biokatalityczne: aminolizę, chemoenzymatyczną, epoksydację limonenu, estryfikację monocyklicznego alkoholu I-rzędowego (alkohol perylowy) i estryfikację bicyklicznego alkoholu I-rzędowego (myrtenol). Reakcję aminolizy przeprowadzono w następujący sposób: do fiołki dodano 50 mg grzybni, 2 ml heksanu; 2,9 μ l heksanianu metylu oraz 4,6 μ l amyloaminy. Po dokładnym wymieszaniu fiołki inkubowano przez 24 godz. w 40°C. W reakcji epoksydacji limonenu zmieszano 50 mg grzybni, 2 ml octanu etylu, 30 μ l limonenu, 100 μ l 30% H_2O_2 oraz 30 μ l kwasu octowego. Po dokładnym wymieszaniu fiołki odstawiono do inkubacji w temperaturze 55°C na 3 godz. W reakcji estryfikacji monocyklicznego i bicyklicznego alkoholu I-rzędowego dodano 50 mg grzybni, 2 ml heptanu; 9,2 μ l kwasu masłowego i 32 μ l alkoholu perylowego lub myrtenolu. Po wymieszaniu próbki poddano 24 godz. inkubacji w 40°C. Po inkubacji zebrano po 100 μ l mieszaniny reakcyjnej i dodano do 900 μ l heptanu. Tak przygotowane próbki analizowano za pomocą techniki chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-FID).

Wyniki: W przypadku reakcji aminolizy (Rys. 1A) najwyższą wydajność uzyskano dla szczepów 85 (49,5%), 18 (33%), 36 (24%) oraz 75 (23%). Dla szczepów 24 (13%), 59 (12,5%) oraz 77 (11%) osiągnięto nieco niższe wyniki. Szczepy 66, 51, 96, 49 nie wykazały aktywności w tym typie reakcji. W przypadku reakcji epoksydacji limonenu

(Rys. 1B) udało się zidentyfikować trzy produkty reakcji (1) 1,2-epoksyd limonenu, (2) 8,9-epoksyd limonenu i (3) diepoksyd limonenu. Najwyższą wydajność reakcji dla pierwszego produktu osiągnął szczep 18 (40%). Pozostałe szczepy wykazywały wydajność w granicach 1-6%. W przypadku drugiego produktu najwyższą wartość osiągnięto dla szczepu 18 (3,7%). Szczepy 66, 24, 85, 75 wykazały aktywność w przedziale 0,1-0,6%, natomiast w przypadku pozostałych szczepów nie odnotowano aktywności. Dla trzeciego produktu odnotowano aktywność jedynie w przypadku szczepu 18 (1,1%). W reakcji estryfikacji monocyklicznego alkoholu I-rzędowego (Rys. 2C) najwyższy wynik osiągnięto dla szczepów 36 (86,3%), 18 (85%), 85 (74%), 75 (73,5%), a nieco niższy wynik dla szczepów 77 (67%), 59 (64%) oraz 96 (50%). Najniższą wydajnością tej reakcji wykazały się szczepy 24 (37%), 66 (28%), 49 (1,3%), 51 (0,4%). W reakcji estryfikacji bicyklicznego alkoholu I-rzędowego (Ryc. 2D) najwyższą wydajność osiągnęły szczepy: 59 (97%) oraz 96 (80%). Niższe wartości zaobserwowano w przypadku szczepów 66 (63%), 36 (47,5%) oraz 18 (40%). Najniższą wydajnością reakcji wykazały szczepy 75 (15%), 85 (10%), 24 (3,5%) oraz 77 (2,8%). Szczep 51 nie wykazał żadnej aktywności. Na rysunku 1 oraz 2 zbiorczo przedstawiono wydajność kolejnych reakcji katalizowanych przy użyciu poszczególnych grzybów.



Rys. 1. Wydajność reakcji katalizowanych przez lipazy grzybów psychrofilnych: A - aminoliza, B - epoksydacja limonenu.



Rys. 2. Wydajność reakcji estryfikacji katalizowanych przez lipazy grzybów psychrofilnych C - estryfikacja alkoholu I-rzędowego monocyklicznego, D - estryfikacja alkoholu I-rzędowego bicyklicznego

Wnioski: Biokatalizatory w formie liofilizowanej grzybni wykazują wysoką aktywność w reakcjach katalitycznych przeprowadzanych w rozpuszczalnikach organicznych. Spośród wszystkich przeprowadzonych reakcji najwyższą wydajność wykazał grzyb 59 w reakcji estryfikacji bicyklicznego alkoholu I-rzędowego, która wyniosła 97%. Natomiast dla pozostałych typów reakcji wydajność dla tego szczepu nie była aż tak znacząca. Nieco niższe, lecz wciąż wysokie wartości uzyskano w reakcji estryfikacji monocyklicznego alkoholu I-rzędowego, gdzie wyróżniające wyniki zanotowano w przypadku dwóch szczepów 36 oraz 18, dla których wydajność wyniosła kolejno 86,3% oraz 85%. W reakcji aminolizy jedynie szczep 85 znacząco różnił się aktywnością od pozostałych grzybów, osiągając wydajność 49,5%. W końcu, w reakcji epoksydacji limonenu szczep 18 osiągnął wydajność 40% dla pierwszego produktu. W przypadku wszystkich reakcji otrzymano bardzo niskie lub zerowe wyniki dla szczepów 51, 49 oraz 24, co wskazuje na fakt, iż szczepy te nie są odpowiednie do przeprowadzania tego typu reakcji.

Literatura:

1. T. Hoshino, N. Matsumoto, *Fungal Biol Rev*, 26 (2012) 102.
2. R.Y. Morita, *Bacteriol Rev*, 39 (1975) 144.
3. N. Hassan, M. Rafiq, M. Hayat, A. Shah, F. Hasan, *Int J. of Enviro Sci & Tech*, 15 (2016).
4. L.Tosi, L. Carbognin, P. Teatini, R. Rosselli, *VI International Symposium on Land Subsidence*, (2000).
5. M. Tojo, K.K. Newsham, *Fungal Ecol*, 5 (2012) 379.
6. M. Kutyla, M. Trytek, K. Buczek, E. Tomaszewska, S. Muszyński, *BioEnergy Res.*, 15 (2022) 1.
7. M. Kutyla, N. Jaszek, W. Jędrys, S. Graba, E. Pluta, K. Gdula, A. Batyra, A. Szczepańska, A. Śliwa, L. Cieślak, A. Marzec-Grządziel, M. Trytek, *Biochem. Eng. J.*, 204 (2024).
8. E. M. Arnett, J. G. Miller, A. R. Day, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 5393.
9. S. Zeng, J. Liu, S. Anankanbil, M. Chen, Z. Guo, J.P. Adams, Z. Li, *ACS Catalysis*, 8 (2018) 8856.
10. A. Gawarecka, A. Wróblewska, R. Pelech, *Technical Issues*, 2 (2015) 9.
11. M. Uemura, G. Hata, T. Toda, F.S. Weine, *J. Endod.*, 23 (1997) 739.
12. R. Ciriminna, M. Lomeli-Rodríguez, P.D. Cara, A. Lopez-Sanchez, M. Pagliaro, *ChemComm*, 50 (2014) 15288.
13. S. Zeng, J. LIU, S. Anankanbil, M. Chen, J.P. Adams, R. Snajdrova, Z. Li, *ACS Catalysis*, 8 (2018) 8856.
14. H. K. Hall, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 5441.
15. M. Zanetti, T. K. Carniel, A. Valério, J. Vladimir de Oliveira, D. de Oliveira, P. H.H. de Araújo, H. Gracher Riella, M. A. Fiori, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 92 (2017) 115.

WYZWANIA ZWIĄZANE Z OPORNOŚCIĄ BAKTERII *ENTEROBACTERIACEAE* NA ANTYBIOTYKI B-LAKTAMOWE

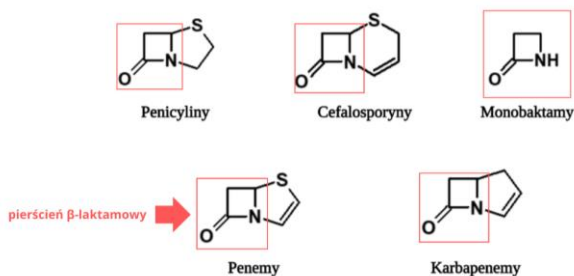
K. GORZKIEWICZ, J.KUTKOWSKA, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Abstrakt: Oporność bakterii na leki przeciwbakteryjne jest istotnym aspektem zdrowia publicznego, które wymaga ciągłego monitorowania na poziomie zarówno lokalnym, jak i globalnym. Obserwowana wzrastająca liczba bakterii opornych na antybiotyki może wynikać ze złego stosowania terapeutyków bądź niewłaściwego ich doboru. Antybiotyki β -laktamowe są grupą leków często stosowanym w leczeniu zakażeń bakteryjnych. W ich strukturze cząsteczkowej obecny jest pierścień β -laktamowy z wiązaniem amidowym (C-N). Do głównych mechanizmów odporności na antybiotyki β -laktamowe u bakterii Gram-ujemnych jest wytwarzanie: β -laktamaz, zmiany białek wiążących penicylinę (PBP) i przepuszczalności osłon komórkowych oraz usuwanie antybiotyków za pomocą systemów efflux. Szczególny problem lekooporności bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* stanowi produkcja β -laktamaz o poszerzonym spektrum działania (ESBL). Enzymy te nadają patogenom oporność na większość dostępnych antybiotyków β -laktamowych.

Wprowadzenie: Oporność bakterii na antybiotyki tematem o ogromnym znaczeniu dla zdrowia publicznego na całym świecie. Lekooporność utrudnia skuteczną terapię zakażeń, zwiększa ryzyko powikłań oraz prowadzi do wzrostu kosztów opieki zdrowotnej [2]. Można wyróżnić dwa typy lekooporności: naturalną, która jest swoista dla danego gatunku bakterii oraz nabytą charakterystyczną dla konkretnego szczepu. Oporność naturalna może być spowodowana brakiem miejsc docelowych dla leku, obecnością struktur ograniczających jego dostęp do komórki, funkcjonowaniem pomp efflux czy produkcją enzymów degradujących antybiotyków, które są kodowane najczęściej przez geny chromosomalne specyficzne dla gatunku. Ten typ antybiotykooporności chociaż nie stanowi znaczącego problemu klinicznego może się nasilać, gdy dochodzi do zwiększenia ekspresji naturalnych genów oporności, co w konsekwencji prowadzi do powstania szczepów opornych na lek. W takim przypadku mówimy o lekooporności nabytej. Zmiany w DNA komórek mogą prowadzić do zwiększenia ekspresji naturalnych genów oporności, modyfikacji miejsca docelowego antybiotyku lub blokowania jego penetracji. Ponadto horyzontalny transfer genów umożliwia wprowadzenie do komórek nowych genów oporności. Geny te mogą być przenoszone przez ruchome elementy genetyczne, takie jak elementy transpozycyjne, plazmidy bądź bakteriofagi. Warto zaznaczyć, że szczepy bakterii posiadające oporność nabytą mają przewagę w warunkach silnej presji antybiotykowej [1, 6]. Antybiotyki β -laktamowe stanowią najliczniejszą i najbardziej zróżnicowaną grupę leków przeciwbakteryjnych, które są stosowane w leczeniu niemalże wszystkich rodzajów zakażeń. Wyróżnia się pięć głównych typów β -laktamów: penicyliny, cefalosporyny, monobaktamy, karbapenemy oraz inhibitory β -laktamaz (Rys. 1).

W strukturze chemicznej antybiotyków β -laktamowych występuje charakterystyczne wiązanie β -laktamowe, które jest podatne na hydrolizę enzymatyczną. Antybiotyki tej grupy różnią się właściwościami farmakokinetycznymi w zależności od klasyfikacji [3].

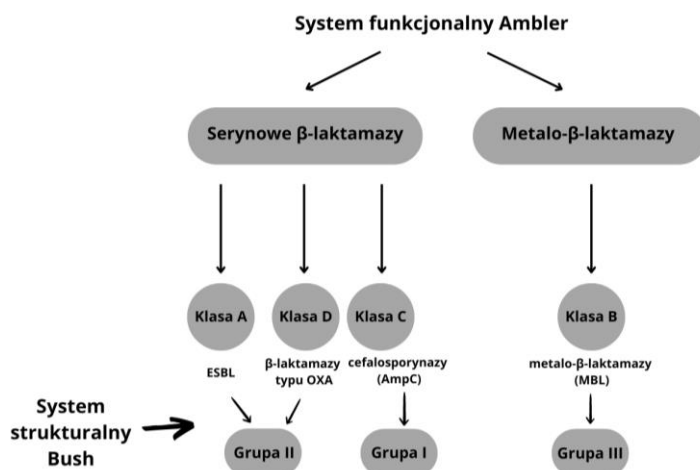
Główne typy β -laktamów:



Rys.1. Schemat struktury podstawowych grup antybiotyków β -laktamowych z zaznaczeniem pierścienia β -laktamowego (opracowanie własne, na podstawie [7]).

Penicyliny naturalne (np. penicylina benzylowa) mają wąski zakres działania, są aktywne głównie wobec bakterii Gram-dodatnich. Penicyliny półsyntetyczne obejmują penicyliny izoksazolidowe (np. oksacylina) o wąskim spektrum działania oraz o szerokim spektrum działania karboksypenicyliny, aminopenicyliny (np. amoksycylina, ampicylina), ureidopenicyliny, amidynopenicyliny [3]. Najszerszym zakresem działania spośród wszystkich antybiotyków β -laktamowych charakteryzują się karbapenemy (np. imipenem, meropenem), które są skuteczne wobec tlenowych i beztlenowych patogenów. Cefalosporyny są podzielone na cztery generacje: I generacja (np. cefaleksyna, cefradyna) działa głównie na bakterie Gram-dodatnie (z wyjątkiem *Staphylococcus aureus*) oraz Gram-ujemne niewytwarzające β -laktamaz. Antybiotyki z tej grupy nie wykazują aktywności przeciwko bakteriom Gram-ujemnym oraz beztlenowcom i słabo przenikają do płynu mózgowo-rdzeniowego. II generacja cefalosporyn (np. cefaclor, cefuroksym) posiadają szerszy zakres działania oraz zwiększoną oporność na β -laktamazy wytwarzane przez bakterie Gram-ujemne, ale są mniej skuteczne wobec bakterii Gram-dodatnich. Leki tej generacji są skuteczne w leczeniu większości zakażeń wywołanych przez pałeczki beztlenowe, bakterie Gram-ujemne, gronkowce, paciorkowce oraz w mniejszym stopniu przez *Bacteroides*. Generacja III cefalosporyn (np. cefotaksym, ceftriakson, ceftazydym) posiada szeroki zakres aktywności przeciwbakteryjnej oraz wysoką oporność na β -laktamazy. Ostatnia IV generacja (cefepim, cefiprom) charakteryzuje się ulepszonymi właściwościami farmakokinetycznymi oraz bardzo szerokim zakresem działania [1,4]. Mechanizm działania β -laktamów polega na blokowaniu kluczowych enzymów odpowiedzialnych za syntezę ściany komórkowej bakterii białek wiążących penicylinę (PBP ang. *Penicillin-Binding Proteins*). W wyniku czego dochodzi do zahamowania syntezy ściany komórkowej, osłabienia jej struktury i lizy bakterii [1,6]. Produkcja β -laktamaz, które dezaktywują antybiotyki β -laktamowe, w tym również te nowej generacji, jest obecnie jednym z najpoważniejszych mechanizmów oporności bakterii na leki. Stopień oporności bakterii na antybiotyki β -laktamowe, wywołane przez produkcję β -laktamaz, wynika zarówno z właściwości samego enzymu, jak i z poziomu jego ekspresji. Istotne jest również tło genetyczne, czyli obecność innych mechanizmów oporno-

ści w danym szczepie bakteryjnym. Proces wytwarzania β -laktamazy w komórce bakteryjnej może zachodzić na stałym poziomie (ekspresja konstytutywna) lub być regulowany (ekspresja indukowana), co zależy od obecności w środowisku bakterii odpowiednich dla danego gatunku i rodzaju induktorów β -laktamowych [1, 2]. Stosowane są dwa systemy klasyfikacji β -laktamaz: system funkcjonalny (klasyfikacja Bush) i system strukturalny (klasyfikacja Ambler) (Rys. 2). Pierwszy system klasyfikacji opiera się na analizie szybkości hydrolizy różnych β -laktamów, a także na podatności β -laktamaz na hamowanie przez niektóre inhibitory np. kwas klawulanowy [1]. System funkcjonalny składa się z wyodrębnionych czterech grup oznaczonych od I do IV. Grupa I (cefalosporynazy AmpC) to β -laktamazy, które są aktywne wobec cefalosporyn oraz penicylin i monobaktamów. Są słabo podatne na kwas klawulanowy, mogą być hamowane przez kloksacylinę. Grupa II stanowi najliczniejszą klasę, charakteryzującą się dużym zróżnicowaniem strukturalnym i funkcjonalnym, co prowadzi do jej podziału na 12 podgrup. Zawiera ona zarówno penicyliny, jak i cefalosporylasy, które wykazują różnorodne spektrum substratowe, ich aktywność jest hamowana przez kwas klawulanowy lub tazobaktam. Grupa III to metalo- β -laktamazy (MBL, ang. *Metallo- β -lactamases*), które są zdolne do hydrolizy penicylin, cefalosporyn oraz karbapenemów. Aktywność MBL nie jest hamowana przez typowe inhibitory β -laktamowe, jedynie przez kwas wersenowy (EDTA, ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*). Do grupy IV, zaliczono niewiele enzymów, które zostały zidentyfikowane stosunkowo dawno i są słabo zbadane, ale ta grupa została pominięta w najnowszej wersji systemu klasyfikacji funkcjonalnej [1].



Rys.2. Systemy klasyfikacji β -laktamaz: system funkcjonalny Ambler i system strukturalny Bush (opracowanie własne na podstawie; [8]).

Drugim systemem klasyfikacji β -laktamaz system strukturalny opiera się na analizie sekwencji aminokwasowych enzymów i grupuje β -laktamazy na podstawie ich pokrewieństwa ewolucyjnego. Przeprowadzona analiza porównawcza sekwencji aminokwasowych β -laktamaz doprowadziła do wyróżnienia czterech klas enzymów, oznaczonych

literami od A do D. W klasach A, C i D znajdują się β -laktamazy serynowe, podczas gdy w klasie B występują metalo- β -laktamazy [1]. Enzymy z klasy A i D wg. Ambler odpowiadają grupie II wg. klasyfikacji Bush, natomiast C i B odpowiednio grupie I i III.

Wnioski: Wzrost różnorodności i liczby lekoopornych drobnoustrojów chorobotwórczych, w tym szczepów wielolekoopornych (MDR, *multidrug-resistant*) stwarza wyzwania w diagnostyce klinicznej oraz leczeniu zakażeń. Niezbędna jest odpowiednia diagnostyka mikrobiologiczna, a wykrycie wielolekoopornych patogenów powinno skutkować wdrażaniem zastrzonych procedur kontroli zakażeń i działań zapobiegających ich rozprzestrzenianiu się. Jest to szczególnie istotne w przypadku wykrycia pałeczek *Enterobacteriaceae* (głównie *Klebsiella pneumoniae*) wytwarzających β -laktamazy typu KPC, szczepów wytwarzających β -laktamazy MBL oraz wytwarzających MBL-NDM-1 (ang. *New Delhi metallo- β -lactamase*) oraz β -laktamazy typu OXA-48 (*oxacillinase-48*). Szczepy te mają podwyższony potencjał epidemiczny, a fakt że geny kodujące ten typ β -laktamaz zlokalizowane są na ruchomych elementach genetycznych zagraża ich rozprzestrzenianiem się w środowisku nie tylko szpitalnym. Wytwarzane przez *E. coli* β -laktamazy typu ESBL i AmpC zostały zidentyfikowane w szczepach pochodzących od zwierząt domowych, hodowlanych oraz jako zanieczyszczenia w żywności. Częstość występowania oporności typu ESBL znacząco się różni między krajami, co może być związane z dostępnością antybiotyków, zarządzaniem odpadami i wodą, oraz ogólny poziomem życia i opieki zdrowotnej. W niektórych regionach świata, oporność na istotne antybiotyki stosowane w szpitalach, takie jak cefalosporyny III generacji występuje u ponad 60% bakterii *E. coli* i *K. pneumoniae*. Ponadto, podróżujący regularnie mogą przenosić bakterie odporne do krajów o niższej częstości występowania tego zjawiska. Należy podkreślić, że odchody ludzi i zwierząt zanieczyszczają środowisko, a źródła wody pitnej i środowiskowej mogą być siedliskiem wysoce opornych bakterii.

Literatura:

1. E. Nikonorow, A. Baraniak, M. Gniadkowski, Postępy Mikrobiologii, (2013) 261.
2. J. Iredell, J. Brown, K. Tagg, BMJ, (2016) 352.
3. K. Korzeniowska, A. Jabłecka, K. Simon, Nowiny Lekarskie, (2008) 134.
4. M. Rzewuska, Życie weterynaryjne, (2009).
5. M. Binek, M. Kizerwetter-Świda, M. Rzewuska, D. Chrobak-Chmiel, D. Sałamaszyńska-Guz, Postępy Mikrobiologii, (2019) 259.
6. A. Baraniak, Aktualności Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków, (2011) 1.
7. J. Prajsnar, Praca doktorska, (2023).
8. N. Rijal, Microbeonline, (2024).

RAMNOLIPIDY – WPLYW METOD PRODUKCJI NA ICH STRUKTURĘ I AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNĄ

B. FOKT, M.A. KARASZ, UMCS, Wydział Nauk Biologicznych, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Abstrakt: Ramnolipidy (RhaL) po raz pierwszy wyizolowane z podłoża wzrostowego *Pseudomonas aeruginosa* i opisane przez Jarvisa i Johnsona w 1949 r., jako czynniki wirulencji, obecnie identyfikowane są, jako metabolity wtórne znacznie większej ilości różnych bakterii. Dzięki nowoczesnym technikom analitycznym do tej pory zidentyfikowano około 60 ich kongenerów i homologów. Amfipatyczny charakter budowy RhaL-ów wpływa na ich właściwości fizyko-chemiczne, a także na aktywność biologiczną. RhaL-y dzięki działaniu przeciwdrobnoustrojowemu, czy desorpcji opornych związków organicznych z cząstek stałych, wykazują duży potencjał aplikacyjny w różnych gałęziach przemysłu m.in. farmaceutycznym, kosmetycznym, chemicznym czy ochronie środowiska, dlatego stale czynione są starania w kierunku zwiększenia wydajności ich produkcji z jednoczesnym obniżeniem jej kosztów.

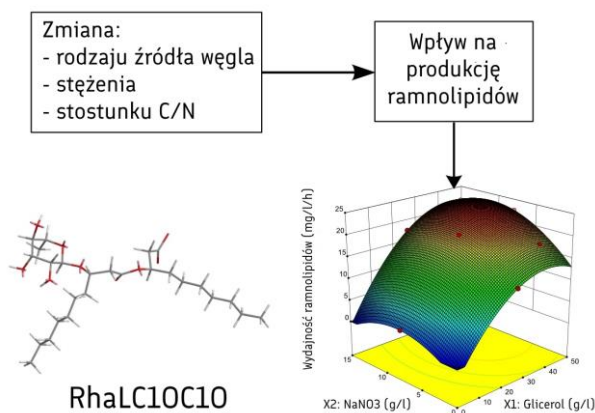
Wprowadzenie: Ramnolipidy to glikolipidowe biosurfaktanty o amfipatycznej strukturze, produkowane głównie przez bakterie i wykazujące aktywność powierzchniową oraz zdolność zwilżania. Molekuły te składają się z polarnego glikonu, który stanowi jedna lub dwie reszty L-ramnozy podstawionego hydrofobowym „ogonem”, w postaci jednej lub dwóch cząsteczek β -hydroksy kwasów tłuszczowych (FA) o zmiennej długości łańcucha alifatycznego ($C_8 - C_{22}$) i różnym stopniu nasylenia, które odpowiednio nazywane są mono-RhaL-mono-lipidami, mono-RhaL-dilipidami, di-RhaL-mono-lipidami i di-RhaL-di-lipidami. Wykazano również występowanie RhaL-ów podstawionych metylowanymi FA lub trzema cząsteczkami FA, oraz z alkiłowaną resztą cukrową [1]. RhaL-y produkowane są przez bakterie klasyfikowane do różnych rodzajów m.in. *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Bulkholderia* czy *Pseudomonas*. Wśród tej ostatniej grupy znajduje się najbardziej znany producent RhaL-ów, *Pseudomonas aeruginosa* będący oportunistycznym patogenem człowieka. Jednak, w obrębie gatunku poszczególne szczepy wykazują różną wydajność syntezy biosurfaktantów oraz zdolność tworzenia mieszaniny odmiennych homologów i kongenerów (Tabela 1). Ponieważ acylowane RhaL-y: decenoil-Rha- C_{10} - C_{10} oraz decenoil-Rha-Rha- C_{10} - C_{10} , uzyskano z hodowli tylko kilku przedstawicieli uważa się, że są one gatunkowo specyficzne. Równie unikatowe są jedyne znane niejonowe RhaL-y, podstawione FA w postaci estrów metylowych i identyfikowane m.in. wśród metabolitów wtórnych szczepu *P. aeruginosa* 158 [1]. Jednakże patogenny charakter szczepów *P. aeruginosa* jest główną przeszkodą w komercyjnej produkcji ramnolipidów, dlatego poszukuje się również wydajnych szczepów niepatogennych o potencjale biotechnologicznym do ich biosyntezy. Kilka wybranych przykładów podano w Tabeli 1 (Lp. 6 – 9).

Tabela 1. Przykładowe homologi i kongenery RhaL-ów identyfikowane w hodowlach *Pseudomonas* spp. [1, 2, 3, 4].

Lp.	Szczep	Podłoże/metoda pozyskiwania RhaL-ów	Typ ramnolipidu
1	<i>P. aeruginosa</i> KY 4025	MSM + 10% <i>n</i> -parafina + 0,2% syrop kukurydziany + 1% YE; ekstrakcja płynu pochodowlanego (pH 5,0) octanem etylu (1:5)	mono-RhaL z C ₁₀ -C ₁₀ di-RhaL z C ₁₀ -C ₁₀
2	<i>P. aeruginosa</i> 158	Podłoże TSB Precypitacja FeCl ₃ , wodny r-r pozostały po ekstrakcji CH ₃ Cl	mono-RhaL z C ₁₀ -C ₁₀ -CH ₃ , di-RhaL z C ₁₀ -C ₁₀ -CH ₃
3	<i>P. aeruginosa</i> od pacjenta z rozstrzeniemi oskrzeli	Podłoże Eagle'a Ekstrakcja CH ₃ Cl	di-RhaL (C ₈ -C ₁₀ /C ₁₀ -C ₈)
4	<i>P. aeruginosa</i> PBS	MSM + 2,17% cytrynian Na + 0,5% YE Ekstrakcja MeOH precypitatu z płynu pochodowlanego (o pH 2.0; 6M HCl)	mono-RhaL z C ₁₀ -C ₁₀ di-RhaL (C ₁₀ -C ₁₀ , C ₈ -C ₁₀ , C ₁₂ -C ₁₀ /C ₁₀ -C ₁₂)
5	<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 2874	MSM + <i>n</i> -alkany i glicerol Ekstrakcja płynu pochodowlanego (o pH 2.0; 10% H ₂ SO ₄) octanem etylu	mono-RhaL z C ₁₀ . di-RhaL z C ₁₀
6	<i>Pseudomonas</i> sp. degradujący węglowodory	<i>n</i> -parafiny	decenoil-Rha -C ₁₀ -C ₁₀ , decenoil-Rha-Rha -C ₁₀ -C ₁₀
7	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> NRRL B-30761	podłoże minimalne wg Kay'a, MSM + 2% Glc ekstrakcja precypitatu (CHCl ₃ :EtOH; 2:1) otrzymanego z płynu pochodowlanego (o pH 2.0; 12M HCl)	wyłącznie mono-RhaL (C ₁₀ -C ₈ , C ₁₀ -C ₁₀ , C ₁₂ -C ₁₀ , C _{12:1} -C ₁₀ , C ₁₂ -C ₁₂ , C _{12:1} -C ₁₀ , C ₁₄ -C ₁₀ , C _{14:1} -C ₁₀)
8	<i>P. chlororaphis</i> 23aP	MSM + 0.1% Glc + 0,1% trypton Ekstrakcja płynu pochodowlanego (o pH 2.0; 6M HCl): 1. Octanem etylu i 2. Wg metody Folch'a	1. mono-RhaL (C ₈ -C ₈ , C ₁₀ -C _{8:1}) 2. mono-RhaL (C _{12:2} -C ₁₀ , C _{12:1} -C _{12:1}), di-RhaL z C ₈ -C ₁₀
9	<i>Pseudomonas clemancea</i> <i>Pseudomonas collierea</i> <i>Pseudomonas teessidea</i>	MSM + 3% glicerol + wysoka zawartość fosforanów + brak pierwiastków śladowych	Mono- i di-RhaL z C ₁₀ -C ₁₀

Z uwagi na fakt, że dostępność RhaL-ów do szerszego zastosowania jest znacznie ograniczona kosztami ich produkcji, dlatego też optymalizacja efektywności ich otrzymywania nabiera znaczenia. Wśród rozpatrywanych pod tym kątem są różne parametry odżywcze i środowiskowe, w tym typ i stężenie źródeł C i N, pH pożywki, wielkość inokulum, czas inkubacji i temperatura. Czynniki te z jednej strony wpływają na wydajność produkcji RhaL-ów, ale także na skład otrzymywanej mieszaniny, a co za tym idzie na właściwości fizyko-chemiczne. Wśród wymienionych, jednym z ważniejszych czynników jest wielkość inokulum, gdyż geny zaangażowane w syntezę RhaL-ów, są zależne od zjawiska quorum-sensing [5]. Obecnie, kiedy więcej niż dwa czynniki wejściowe wpływają w sposób nieliniowy na wartość wyjściową, przed optymalizacją warunków hodowli generuje się frakcyjne plany doświadczeń, które pozwalają na zminimalizowanie ilości przeprowadzanych prób z jednoczesnym lepszym dopasowaniem warunków.

Na podstawie otrzymanych danych oblicza się efekty liniowe i kwadratowe oraz interakcje dla wielkości wejściowych [6] (Rys. 1).



Rys. 1. Przestrzenny wykres powierzchni odpowiedzi pokazujący wpływ: X1 - stężenia glicerolu i X2 - stężenia NaNO_3 na produkcję RhaL-ów przez hipotetyczny szczep bakterii [7].

Najczęściej stosowaną metodą pozyskiwania homologów RhaL-ów z podłoża pochodowlanego jest precypitacja ich w pH 2,0 a następnie ekstrakcja precypitatu różnymi solwentami organicznymi. Jednakże wg Firdose i wsp. [7] podejście takie, w porównaniu z ekstrakcją zakwaszonego płynu pochodowlanego wraz z precypitatem, skutkuje znacznie niższą wydajnością odzysku biosurfaktantów. Ponadto jak wykazano dla szczepu *P. chlororaphis* 23aP wybór metody ekstrakcji wpływa na typ pozyskiwanych homologów RhaL-ów (Tabela 1, Lp. 8). Wcześniejsze badania z innym szczepem tego gatunku NRRL B-30761 wskazywały, że jest on zdolny tylko do produkcji mono-RhaL-ów (Tabela 1, Lp. 7) i autorzy postawili hipotezę, że prawdopodobnie nie posiada on homologu genu *rhlC* obecnego w genomie *P. aeruginosa* i odpowiedzialnego za biosyntezę di-RhaL-ów. Jednakże, wnioski te oparto o wyniki analiz składu RhaL-ów pozyskanych wyłącznie z precypitatów płynów pochodowlanych. Badania Karaś i wsp. dowodzą, że gatunek ten może również produkować di-RhaL, które uzyskano stosując ekstrakcję Folch'a zakwaszonych płynów pochodowlanych [3].

RhaL-y wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowe poprzez działanie antyoksydacyjne [8], zapobieganie tworzenia jak i eradykacji dojrzałych bakteryjnych biofilmów [9], zwiększanie przepuszczalności błon komórkowych [10], czy podstawianiu cząsteczek LPS w błonie zewnętrznej Gram ujemnych bakterii [11]. Wykazano, że RhaL-y były skuteczne jako czynniki biokontrolne przeciwko fitopatogennym grzybom *Phytophthora* sp. czy *Phytophthora* sp. [9]. Z kolei biosurfaktant PS-17 (mieszanka di-RhaL-C₁₀ i di-RhaL-C₁₀-C₁₀) hamował proliferację wirusa opryszczki HSV-1 i HSV-2 w komórkach MDBK [12]. Natomiast handlowy preparat firmy AGAE Technologies (US) zawierający mieszaninę głównie di-RhaL, w sposób zależny od stężenia, hamował wzrost i zdolność tworzenia biofilmu na polistyrenie bakterii jamy ustnej zaangażowanych w tworzenie płytki nazębnej: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus mutans* i *Streptococcus sanguinis* [9]. Ponieważ biosurfaktanty *P. aeruginosa* pełnią funkcję egzotoksyn, to wnioskowano, że RhaL-y mogą mieć działanie immunomodulujące, co potwierdzono stymulując komórki jednojądrzaste z krwi obwodowej do produk-

cji cytokiny prozapalnej TNF α stosując di-RhaL-C₁₄-C₁₄. Jednocześnie surfaktant ten nie wykazywał działania hamującego wzrost *E. coli* i *S. aeruginosa* w badanym zakresie stężeń [13].

Wnioski: Umiejętność kontrolowania ilości i składu pozyskiwanych RhaL-ów jest ważnym aspektem, gdyż jak wykazano w niniejszej monografii ich struktura wpływa na właściwości biosurfaktantów. Przykładowo mono-RhaL-y wykazują lepsze właściwości emulsyfikacyjne [14], co może determinować ich zastosowanie w bioremediacji, zaś di-RhaL-y lepiej oddziałują z błonami biologicznymi [11], sugerując zastosowanie jako czynniki biokontrolne. Ponadto, umiejętność kontrolowania procesów technologicznych pozwoli na ulepszenie wydajności produkcji przez niepatogenne szczepy, co może znacznie uprościć rygorystyczne procesy separacji przy produkcji ramnolipidów z zastosowaniem potencjalnie patogennych szczepów *P. aeruginosa*.

Literatura:

1. AM. Abdel-Mawgoud, F. Lépine, E. Déziel, Appl Microbiol Biotechnol 86/5 (2010) 1323.
2. R. Sharma, J. Singh, N. Verma, 3 Biotech 8 (2018) 20.
3. MA. Karaś, S. Wdowiak-Wróbel, M. Marek-Kozaczuk, W. Sokółowski, K. Melianchuk, I. Komaniecka, Molecules 28/22 (2023) 7581.
4. NW. Gunther 4th, A. Nuñez, W. Fett, DK. Solaiman, Appl Environ Microbiol 71/5 (2005) 2288.
5. DH. Dusane, SS. Zinjarde, VP. Venugopalan, RJ. McLean, MM. Weber, PK. Rahman, Biotechnol Genet Eng Rev 27 (2010) 159.
6. https://www.statsoft.pl/textbook/stathome_stat.html?https%3A%2F%2Fwww.statsoft.pl%2Ftextbook%2Fstexdes.html
7. O. Mat'átková, J. Michailidu, R. Ježdík, I. Jarošová Kolouchová, T. Řezanka, V. Jirků, J. Masák, Microorganisms 10/7 (2022) 1272.
8. M. Msarah, NH. Harzin-Hong, WS. Aqma, A. Firdose, Malaysian J. Microbiol. 17/2 (2021) 103.
9. H. Sarma, M. N. V. Prasad, Biosurfactants for a sustainable future: production and applications in the environment and biomedicine. John Wiley & Sons, 2021.
10. R. Yamasaki, A. Kawano, Y. Yoshioka, BMC Microbiol, 20 (2022) 358.
11. M. Sánchez, F. J. Aranda, J. A. Teruel, M. J. Espuny, A. Marqués, Á. Manresa, A. Ortiz, J. Colloid. Interf. Sci., 341/2 (2010) 240.
12. Z. Ma, J. Liu, R. P. Dick, H. Li, D. Shen, Y. Gao, W. Ling, Environmental Pollution, 240 (2018) 359.
13. J. Andrä, J. Rademann, J. Howe, MH. Koch, H. Heine, U. Zähringer, Biol Chem. 387/3 (2006) 301.
14. F. Zhao, H. Jiang, H. Sun, C. Liu, S. Han, Y. Zhang, RSC Advances 9/6 (2019) 2885.

CHARAKTERYSTYKA BAKTERII Z RODZAJU *LEUCONOSTOC* I *GLUCONOBACTER* WYZIOLOWANYCH PRODUKTÓW SPOŻYWCZYCH

J. DZIEDZIC, K. TOKARSKA, M. MAREK-KOZACZUK, W. SOKOŁOWSKI, S. WDOWIAK-WROBEL, UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Abstrakt: Dzięki zdolności do przeprowadzania fermentacji mlekowej (w przypadku rodzaju *Leuconostoc*) i octowej (charakterystycznej dla rodzaju *Gluconobacter*) znalazły one szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym. Jednak niektóre szczepy rodzaju *Leuconostoc* i *Gluconobacter* mogą negatywnie wpływać na przebieg procesu produkcji, powodując obniżenie wartości odżywczych produktu i straty materialne w przemyśle. Celem pracy było ustalenie pozycji taksonomicznej i relacji filogenetycznych, trzech izolatów powodujących zanieczyszczenie produktów spożywczych, w oparciu o wielolokusową analizę sekwencji genów metabolizmu podstawowego – MLSA (*groEL*, *dnaK* i *recA*). Określono także wpływ wybranych środków dezynfekujących na przeżywalność szczepów bakteryjnych.

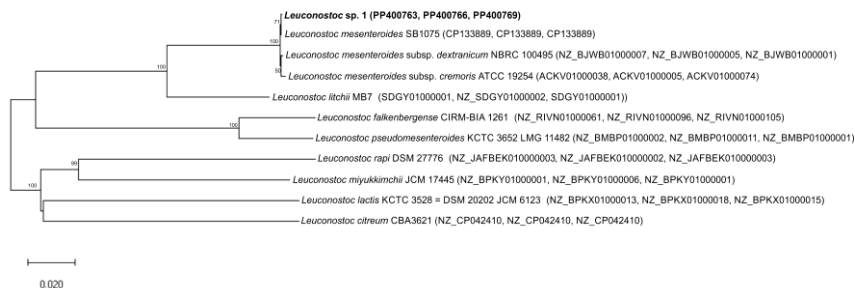
Wprowadzenie: Bakterie rodzaju *Gluconobacter* ze względu na zdolność utleniania różnych cukrów, polioli i alkoholi do kwasów, aldehydów i ketonów od dawna znajdują zastosowanie w przemyśle biotechnologicznym, np. w produkcji kwasu L-askorbinowego (witaminy C), czy kwasu glukonowego i jego pochodnych [1]. Ze względu na zdolność do wytwarzania związków aromatycznych i dwutlenku węgla w drodze heterofermentacji laktozy i wykorzystania cytrynianów, zastosowanie w przemyśle spożywczym, znalazły również bakterie fermentacji mlekowej, np. rodzaju *Leuconostoc* [2]. Należy jednak zauważyć, że część szczepów reprezentujących wyżej wymienione rodzaje może odpowiadać za psucie produktów żywnościowych. Szczepy *Leuconostoc* spp. ze względu na dużą ilość produkowanego EPSu i produkcję CO₂ mogą wpływać na pogorszenie zapachu i smaku produktów spożywczych, co prowadzi do strat ekonomicznych w przemyśle spożywczym [3]. Również szczepy rodzaju *Gluconobacter* odpowiadają za zanieczyszczenia produktów spożywczych, między innymi niegazowanych napojów owocowych, herbat i koncentratów smakowych, ze względu na ich zdolność wzrostu w niskim pH i przy dużym stężeniu polisacharydów w podłożu [4]. Najlepszym sposobem unikania zanieczyszczeń mikrobiologicznych jest higiena i konserwacja. Trzeba jednak pamiętać, że każda sytuacja związana z kontaminacją produktów spożywczych jest wyjątkowa i może wymagać specyficznych rozwiązań.

Część eksperymentalna: Do izolacji genomowego DNA izolatów wykorzystano metodę Pitchera i wsp. [5]. Stężenie i czystość uzyskanego DNA określano za pomocą spektrofotometru Thermo Scientific NANOD-ROP 2000 (Thermo Fisher Scientific). Amplifikację genu *groEL*, *dnaK* i *recA* przeprowadzono przy użyciu starterów i w warunkach opisanych w literaturze [6, 7]. Produkty amplifikacji oczyszczano przy użyciu zestawu Clean-up (A&A Biotechnology). Reakcję sekwencjonowania przeprowadzono zgodnie z protokołem załączonym przez producenta (Applied Biosystems™). Uzyskane produk-

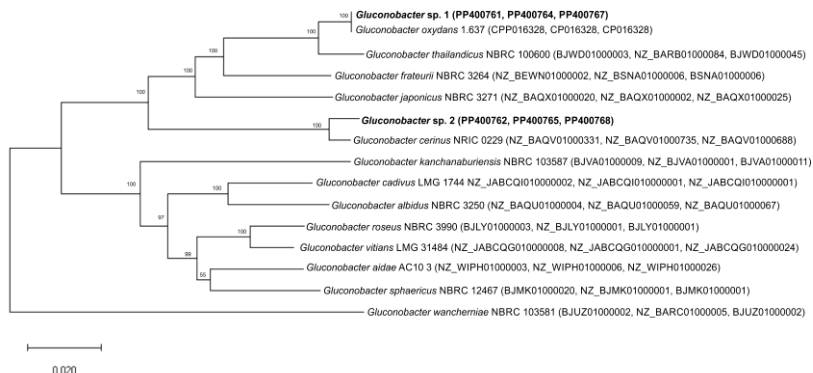
ty reakcji oczyszczono za pomocą zestawu ExTerminator (A&A Biotechnology) zgodnie z instrukcją producenta. Odczyt sekwencji wykonano w firmie zewnętrznej (Genomed S.A., Warszawa). Do dopasowania sekwencji analizowanych w programie GeneDoc zastosowano program ClustalX2 [8]. Filogram konstruowano metodą Neighbor-Joining (NJ) (program MEGA11) [9]. Istotność statystyczną drzew oceniano za pomocą testu bootstrap (1000 powtórzeń). Określono wrażliwości badanych izolatów bakteryjnych na 3 komercyjne środki dezynfekcyjne w dwóch temperaturach (50°C i 60°C). Do zawiesiny bakteryjnej (OD 0,1) dodawano badany środek bakteriobójczy o określonym stężeniu. Próbkę inkubowano w temp. 50°C lub 60°C przez 10 min. Po wirowaniu (12 000-14 000 rpm/min.) osad dwukrotnie przepłukiwano 0,85 % jałowym płynem fizjologicznym. Po ostatnim płukaniu osad zawieszono w 0,85 % jałowym płynie fizjologicznym. 100 µl zawiesiny наносono na szalki Petriego z podłożem stałym MRS [Oxoid] lub GYP [10] i rozprowadzano za pomocą głaszczki. Płytki inkubowano przez 3-4 dni w temperaturze 28°C. Próby wykonano w trzykrotnym powtórzeniu. Próbę kontrolną stanowiły szczepy niepoddane działaniu badanego czynnika bakteriobójczego i temperatur.

Wyniki: W celu określenia pokrewieństwa i relacji filogenetycznych izolatów przeprowadzono analizę porównawczą sekwencji trzech genów metabolizmu podstawowego (*dnaK*, *groEL*, *recA*) badanych szczepów do sekwencji genów szczepów referencyjnych dostępnych w bazie danych GenBank. Sekwencje tych genów połączono w kolejności: *dnaK+groEL+recA*, uzyskując konstrukt o długości 4200 pz dla szczepu rodzaju *Leuconostoc* oraz 2690 pz dla szczepów z rodzaju *Gluconobacter*. Analizy MLSA potwierdziła przynależność jednego z badanych szczepów do bakterii rodzaju *Leuconostoc*. Szczep *Leuconostoc* sp. 1 charakteryzował się największym podobieństwem połączonych sekwencji do szczepów reprezentujących gatunek *Leuconostoc mesenteroides* (99% podobieństwa sekwencji), tworząc z nimi na drzewie filogenetycznym wspólne grono przy współczynniku poparcia wynoszącym 100% (Rys. 1). Szczep *Gluconobacter* sp. 1 wykazał największy stopień podobieństwa sekwencji (100%) do sekwencji szczepu referencyjnego *Gluconobacter oxydans* tworząc z nim wspólną grupę przy współczynniku poparcia wynoszącym 100% (Rys. 2). Z kolei szczep *Gluconobacter* sp. 2 wykazujący podobieństwo sekwencji do sekwencji *Gluconobacter cerinus* na poziomie 98%, utworzył z tym szczepem wspólne grono (Rys. 2), przy współczynniku poparcia równym 100%. Sprawdzano wrażliwość trzech izolatów na różne stężenia środków dezynfekujących (DM Clean Super, DM CID, Eco Chlor) w temperaturze 50°C i 60°C (Tabela 1). Próbę kontrolną stanowiły bakterie poddane działaniu temperatury 50°C lub 60°C bez dodatku środka dezynfekującego przez okres 10 minut. Zastosowana temperatura nie wpływała na ograniczenie wzrostu wszystkich trzech badanych szczepów (dane nieprezentowane). Najefektywniejszy efekt bójczy, dla badanych preparatów dezynfekcyjnych, uzyskano w temperaturze 60°C. Jedynie *Gluconobacter* sp. 2 przy stężeniu 0.5% Eco Chlor wykazywał wzrost bakterii. W temperaturze 50°C szczep *Gluconobacter* sp. 1 był najbardziej wrażliwy na działanie DM SUPER CLEAN. Szczep ten nie wykazywał zdolności wzrostu już przy najniższym użytym stężeniu tego środka (0.5%) (Tabela 1). Szczep *Gluconobacter* sp. 2 charakteryzował się największą, spośród wszystkich przebadanych izolatów, opornością na wszystkie zastosowane środki dezynfekujące (temp. 50°C). Największą wrażliwość wykazał on na DM SUPER CLEAN (brak wzrostu przy stężeniu 1 %, temp. 50°C) (Tabela 1). Podobnie, jak to miało miejsce w przypadku

szczepów *Gluconobacter*, najbardziej skutecznym środkiem w stosunku do *Leuconostoc* sp. 1 okazał się DM SUPER CLEAN. Najskuteczniejsze działanie bakteriobójcze tego związku zaobserwowano w stężeniu 1 % w temperaturze 50°C. Szczep *Leuconostoc* sp. 1 był najmniej wrażliwy na działanie środka ECO CHLOR. Środek ten, w temperaturze 50°C, wykazał właściwości bakteriobójcze w stężeniu 2,5 % (Tabela 1).



Rys. 1. Drzewo filogenetyczne utworzone w oparciu o wyniki analizy genów metabolizmu podstawowego (*dnaK*, *groEL* i *recA*) rodzaju *Leuconostoc*. Skala w lewym dolnym rogu - długość gałęzi, która odpowiada 0,02 podstawienia nukleotydu na jeden nukleotyd sekwencji.



Rys. 2. Drzewo filogenetyczne utworzone w oparciu o wyniki analizy genów metabolizmu podstawowego (*dnaK*, *groEL* i *recA*) rodzaju *Gluconobacter*. Skala w lewym dolnym rogu - długość gałęzi, która odpowiada 0,02 podstawienia nukleotydu na jeden nukleotyd sekwencji.

Wnioski: Na podstawie analizy sekwencji określono przynależność izolatów do rodzaju *Gluconobacter* oraz *Leuconostoc*. Jeden ze szczepów wykazał największe podobieństwo do szczepów gatunku *Leuconostoc mesenteroides*. Pozostałe dwa szczepy, tj. *Gluconobacter* sp. 1 i 2 wykazały największe podobieństwo kolejno do gatunku *G. oxydans* oraz *G. cerinus*. Badania wykazały, że najsilniej działającym środkiem dezynfekującym (w obydwu badanych temperaturach), był DM CLEAN SUPER. Szczep *Gluconobacter* sp. 2 charakteryzował się największą opornością na wszystkie przebadane środki.

Tabela 1. Wrażliwość szczepów bakteryjnych na środki dezynfekcyjne.

	<i>Gluconobacter</i> sp. 1	<i>Leuconostoc</i> sp. 1	<i>Gluconobacter</i> sp. 2
DM CLEAN SUPER (50°C/60°C)			
0,5%	-/-	+/-	+/-
1%	-/-	-/-	-/-
1,5%	-/-	-/-	-/-
2%	-/-	-/-	-/-
2,5%	-/-	-/-	-/-
3%	-/-	-/-	-/-
3,5%	-/-	-/-	-/-
DM CID (50°C/60°C)			
0,5%	+/-	+/+	+/-
1%	+/-	+/-	+/-
1,5%	-/-	+/-	+/-
2%	-/-	-/-	+/-
2,5%	-/-	-/-	+/-
3%	-/-	-/-	+/-
3,5%	-/-	-/-	+/-
4%	-/-	-/-	-/-
ECO CHLOR (50°C/60°C)			
0,5%	+/-	+/-	+/+
1%	-/-	+/-	+/-
1,5%	-/-	+/-	+/-
2%	-/-	+/-	+/-
2,5%	-/-	-/-	+/-
3%	-/-	-/-	+/-
3,5%	-/-	-/-	-/-

Literatura:

1. G.A.R. da Silva, S.S.S. Oliveira, S.F. Lima, R.P. do Nascimento, A.R.S. Baptista, S.B. Fiaux, World J Microbiol Biotechnol., 11 (2022) 134.
2. M. Ziarno. Medycyna Weterynaryjna, 63 (2007) 403.
3. S. Chen, S. Liu, J. Ma, X. Xu, H. Wang, Food Res. Int., 156 (2022).
4. L. Stasiak, S. Błażej. Pol. J. Food Nutr. Sci., 59(1) (2009) 17.
5. D.G Pitcher, N.A. Saunders, R.J. Owen., Lett Appl Microbiol, 8 (1989) 151.
6. I. Cleenwerck, P. De Vos P, L. De Vuyst, Int J Syst Evol Microbiol., 60 (2010) 2277.
7. T. Dan, W. Liu, Y. Song, Y. et al., BMC Microbiol, 15 (2015) 107.
8. M.A. Larkin, G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace et al. Bioinformatics., 23 (2007) 2947.
9. K. Tamura, G. Stecher, S. Kumar, Mol Biol Evol., 38(7) (2021) 3022.
10. B. Mathew, S. Agrawal, N. Nashikkar, S. Bundale, A. Upadhyay, AiM, 9 (2019) 556.

WPLYW RODZAJU INDUKTORA NA AKTYWNOŚĆ KATALITYCZNĄ GRZYBNI NITKOWATEJ W REAKCJI ESTRYFIKACJI ALKOHOLI TERPENOWYCH

J. ZAWADA, I. KRUCZEK, D. STOŚ, M. KUTYŁA, M. TRYTEK, UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Abstrakt: Reakcje biokatalizy są stosowane jako opcjonalne alternatywy dla procesów chemicznych wykorzystywanych w produkcji przemysłowej. Wśród biokatalizatorów szczególne zastosowanie znajdują lipazy. W ramach badań określono wpływ różnych induktorów lipaz, tj. Span'ów i Tween'ów na właściwości biokatalityczne grzybni psychrotrofowego szczepu *Cladosporium cladosporioides* w reakcji estryfikacji dwóch alkoholi terpenowych: cytronelolu i karweolu. Na podstawie uzyskanych wyników pokazano jak bardzo ważne jest dobranie odpowiedniego induktora, który może różnorodnie wpływać na efektywność biokatalitycznej estryfikacji mającej przełożenie na optymalizację procesu biotechnologicznego.

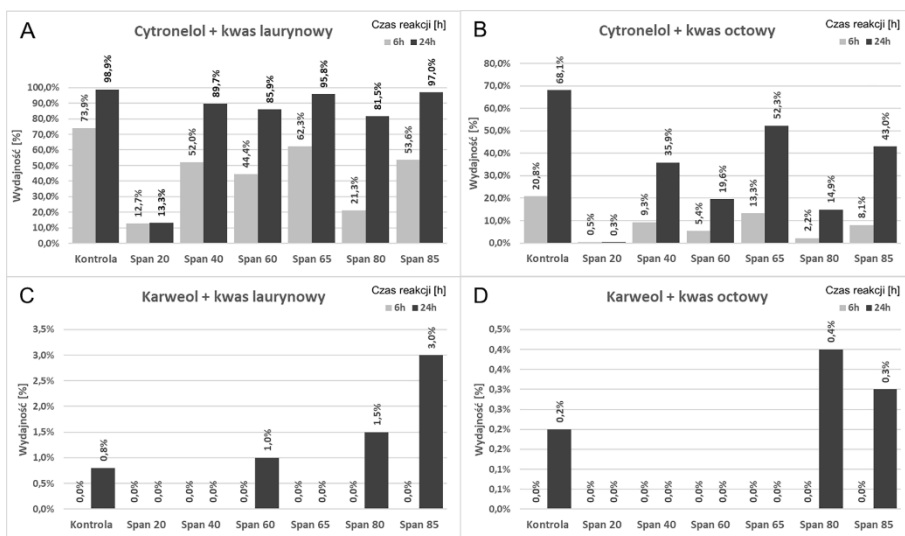
Wprowadzenie: Enzymy lipolityczne odgrywają kluczową rolę jako biokatalizatory różnych reakcji chemicznych, przez co stanowią obiekt zainteresowania biotechnologów i chemików ze względu na ich szerokie spektrum zastosowania w przemyśle oraz opłacalność i łatwość w użyciu. Można je pozyskać z różnych źródeł, jednak najbardziej pożądane i najczęściej stosowane są te produkowane przez mikroorganizmy [1]. Enzym zwiększa swoją aktywność poprzez działanie cząsteczki induktora lub substratu na ekspresję genów [2]. Lipazy należą do klasy hydrolaz, charakteryzują się wysoką selektywnością i specyficznością oraz posiadają zdolność do utrzymania wysokiej aktywności katalitycznej zarówno w środowiskach wodnych jak i niewodnych, co wskazuje na szerokie możliwości zastosowania tych enzymów [3]. Szczególne znaczenie przemysłowe biokatalizatory te odgrywają w reakcji estryfikacji alkoholi z kwasami tłuszczowymi oraz hydrolizy wiązań estrowych. Za ich pomocą można przeprowadzić syntezę estrów terpenowych wykorzystywanych w różnych gałęziach przemysłu, od spożywczego do farmaceutycznego [4]. Aktualnie nie przeprowadza się za wiele badań dotyczących biokatalizatorów reakcji alkoholi drugorzędowych. Celem niniejszej pracy było zbadanie różnego rodzaju induktorów lipaz (Span'ów i Tween'ów) na aktywność biokatalityczną liofilizowanej grzybni nitkowatej w reakcji estryfikacji alkoholi terpenowych.

Część eksperymentalna: Przeprowadzono badanie mające na celu określenie wpływu induktorów lipaz na zdolności katalityczne grzybni nitkowatej *Cladosporium cladosporioides*. Doświadczenie zostało rozpatrzone pod kątem aktywności biokatalitycznej w reakcji estryfikacji dwóch alkoholi terpenowych, I-rz- cytronelolu oraz II-rz. karweolu. Do badania wykorzystano psychrotrofowy szczep *C. cladosporioides* 01, który wyizolowany został z gleby zachodniego wybrzeża Norwegii – Spitzbergenu. W doświadczeniu wykorzystano podłoże A o składzie: ekstrakt drożdżowy (1 g/L); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5 g/L); K_2HPO_4 (1 g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/L); induktor (7 g/L). Badanymi induktorami były: Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 65, Tween 80, Tween 85, Span 20,

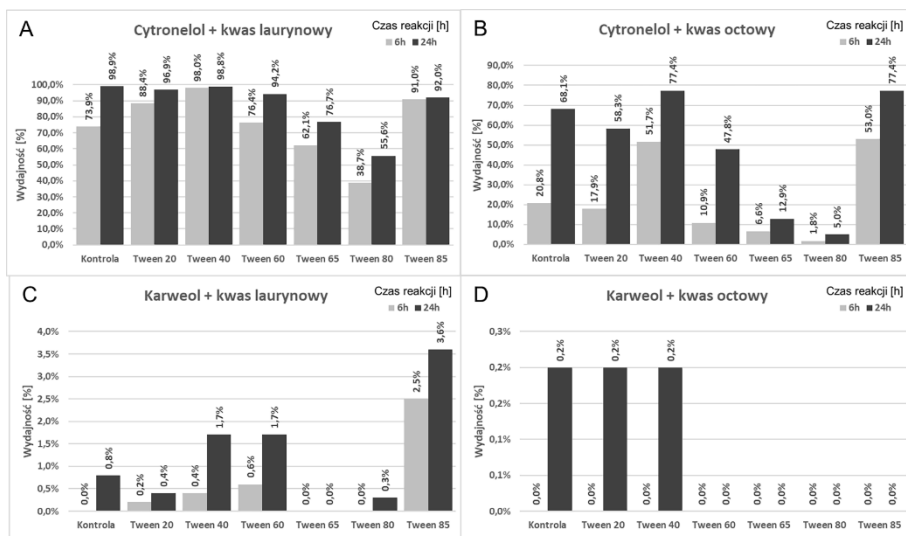
Span 40, Span 60, Span 65, Span 80 i Span 85. W próbie kontrolnej do podłoża w miejsce induktora dodano oliwę z oliwek (10 g/L); podłoża uzupełniano węglanem wapnia CaCO_3 (5 g/L). Wartość pH gotowego podłoża ustalono na 6,0. Każdy z induktorów dodawano do oddzielnej kolby Erlenmeyera o poj. 300 mL w ilości 0,7 g wraz ze 100 mL podłoża A. Rozpuszczenie induktorów przeprowadzono w ultradźwiękowej łaźni wodnej po czym kolby z podłożem wyjałowiono w autoklawie. Do każdej z kolb Erlenmeyera z podłożem A jałowo dodawano po 4 mL inokulum. Hodowlę prowadzono przez 5 dni na wytrząsarce przy obrotach 160 rpm i w temperaturze 20°C. Uzyskaną biomasę przesączono oddzielnie dla każdej próby na lejek z sączkiem materiałowym, zamrożono przez noc w temp. -20°C przez 24 h, po czym liofilizowano przez dobę. Po liofilizacji biomasę roz tarto na jednorodny proszek przy użyciu młynka. Następnie grzybnie wykorzystano jako biokatalizator w procesie estryfikacji alkoholi terpenowych. Do przeprowadzenia reakcji estryfikacji użyto kolb Erlenmeyera o objętości 25 mL. Do każdej próby dodano po 100 mg biokatalizatora, 5 mL heksanu, odpowiedniej ilości substratów reakcji (cytronelol lub karweol i kwas octowy lub laurynowy), tak aby ich stężenie wynosiło 50 mM. Estryfikację prowadzono w termostacie w temp. 40°C, bez wytrząsania. Po upływie 6 i 24 godzin pobrano próbki do określenia wydajności reakcji. Do analizy ilościowej wykorzystano metodę chromatografii gazowej przy użyciu aparatu Chromopack 3380 firmy Varian z detektorem płomieniowo-jonizującym (FID). Urządzenie wyposażone było w kolumnę o wymiarach: 30 m – długość; 0,25 mm – średnica, z fenylo-metylosilikonową fazą stacjonarną o grubości 0,25 μm . Gazem nośnym o szybkości przepływu 1 mL/min był hel. Próbki do analizy zawierały: 900 μL heksanu i 100 μL mieszaniny poreakcyjnej. Analizę prowadzono według następującego programu temperaturowego: dozownik 270°C, kolumna 100°C przez 1 min, następnie wzrost temperatury w tempie 4°C/min do 145°C (1 min). Następnie dalszy wzrost w tempie 20°C/min do 280°C (1 min). Temp. detektora 300°C. W celu obliczenia wydajności reakcji estryfikacji użyto wartości pól powierzchni pików substratu oraz produktu na otrzymanych chromatogramach. Wyniki przedstawiono jako procentową konwersję molową alkoholu terpenowego do odpowiedniego estru.

Wyniki: Zastosowanie Span'ów jako induktorów enzymatycznych miało zróżnicowany wpływ na wyniki estryfikacji. Estryfikacja karweolu przy użyciu grzybni hodowanej z dodatkiem Span 80 i Span 85 przebiegała z wyższą wydajnością niż estryfikacja katalizowana przez grzybnię z podłoża kontrolnego (Rys. 1C i 1D). Wykorzystanie tych związków zwiększyło zatem aktywność katalityczną grzybni wobec alkoholu drugorzędowego. Wydajność estryfikacji cytronelolu – alkoholu pierwszorzędowego z kwasem laurynowym była zbliżona do kontroli, jednak Span 20 znacząco obniżył wydajność reakcji (Rys. 1A i 1B). Układy estryfikacji z udziałem grzybni hodowanej z dodatkiem Span'ów wykazały niższą wydajność w porównaniu do kontroli, a niektóre Spany całkowicie zahamowały aktywność katalityczną grzybni wobec alkoholu drugorzędowego. Większość Tween'ów zwiększa wydajność estryfikacji (jest to szczególnie widoczne po 6 godzinach biokatalizy), w porównaniu z kontrolą (Rys 2.). Po 24 godzinach różnica ta maleje dla układów z alkoholem pierwszorzędowym, ale estryfikacja karweolu pozostaje wyższa niż w próbie kontrolnej. Nie wszystkie Tween'y skutkują wzrostem aktywności katalitycznej grzybni: na przykład Tween 65 i Tween 80 obniżają ją we wszystkich badanych układach. W układzie z cytronelolem i kwasem laurynowym Tween'y: 20, 40, 60 i 85 utrzymują podobną wydajność po 6 i 24 godzinach, jednak w przypadku kwasu

octowego występuje znaczne zróżnicowanie. Z kolei Tween 85 wykazuje działanie dwutorowe w indukcji estryfikacji alkoholu drugorzędowego. Z jednej strony zastosowanie go w hodowli powoduje zwiększenie aktywności grzybni w estryfikacji karweolu i kwasu laurynowego w porównaniu z próbą kontrolną, a z drugiej strony hamuje on aktywność grzybni w estryfikacji alkoholu z kwasem octowym (Rys. 2). Zastosowanie Tween'ów jako induktorów widocznie zwiększyło wydajność poszczególnych układów reakcji w porównaniu do Span'ów, zwłaszcza w przypadku reakcji cytronelolu z kwasem octowym. Wykorzystanie Tween'ów do indukcji aktywności estryfikacyjnej grzybni *C. cladosporioides* wyraźnie zwiększyło wydajność estryfikacji już po 6 godzinach reakcji, gdzie użycie Span'ów spowodowało jej zauważalne zmniejszenie. Wydajność estryfikacji z wykorzystaniem grzybni indukowanej Tween'ami była znacznie wyższa w przypadku alkoholu drugorzędowego, gdzie wydajność wzrosła czterokrotnie.



Rys. 1. Wydajność reakcji estryfikacji alkoholi terpenowych z użyciem grzybni *C. cladosporioides* hodowanej na podłożach z Span'ami jako induktorami aktywności lipolitycznej A) estryfikacja cytronelolu z kwasem laurynowym, B) cytronelolu z kwasem octowym, C) karweolu z kwasem laurynowym, D) karweolu z kwasem octowym.



Rys. 2. Wydajność reakcji estryfikacji alkoholi terpenowych z użyciem grzybni *C. cladosporioides* hodowanej na podłożach z dodatkiem Tween-ów jako biokatalizatora reakcji estryfikacji A) cytronelolu z kwasem laurynowym, B) cytronelolu z kwasem octowym, C) karweolu z kwasem laurynowym, D) karweolu z kwasem octowym.

Wnioski: Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że różnice w efektywności katalizacyjnej grzybni *C. cladosporioides* są bezpośrednio związane z wyborem induktora enzymów lipolitycznych w hodowli grzyba. Dodatek Spanu 80 oraz Spanu 85 w roli induktorów enzymatycznych ma pozytywny wpływ na cechy biokatalizacyjne grzybni *C. cladosporioides* dla zwiększenia wydajności reakcji estryfikacji alkoholu drugorzędowego. Wyniki badań wskazują na to, że Spany jako induktory syntezy enzymów lipolitycznych skutkują niską wydajnością reakcji estryfikacji alkoholu pierwszorzędowego katalizowanej przez grzybnię *C. cladosporioides*. Z kolei dodatek Tweenu 40 oraz Tweenu 85 jako induktorów enzymatycznych poprawiło właściwości biokatalizacyjne grzybni oraz wydajność estryfikacji zarówno alkoholu pierwszorzędowego jak i drugorzędowego już po upływie zaledwie 6 godzin reakcji. Przeprowadzone badania sugerują, że odpowiedni wybór induktora może istotnie wpływać na proces estryfikacji, co ma znaczenie w optymalizacji tych reakcji w przemyśle.

Literatura:

1. N. Aminudin, M. Ridzuan, D. Susanti, Z. Azira, Z. Abidin, J. Asian Natural Product. Res., 4 (2021).
2. C.A. Soares, R. Alnoch, G. Silva Dias, N. dos Santos Reis, J.R. de Oliveira, N. Krieger, M. Franco, Biotech. Appl. Biochem., 69 (2021) 679.
3. L. Brandão, M.S. Barbosa, R.L. Souza, M.M. Pereira, A.S. Lima, C.M. Soares, Biotechnol. Progress., (2020) 3064.
4. M. Pilarek, K. Szewczyk, K.W. Wrona, Biotechnologia, 2(57) (2002) 146.

KOMPLEKSY KOBALTU I NIKLU Z KWASEM FENOKSYOCTOWYM

G. TYNIECKA, Politechnika Białostocka, Wydział Budownictwa i Nauk o Środowisku, Instytut Inżynierii Środowiska i Energetyki, Katedra Chemii, Biologii i Biotechnologii; ul. Wiejska 45E, 15-351 Białystok

Abstrakt: W niniejszej pracy przedstawiono wyniki analizy FT-IR, ATR i UV-Vis kwasu fenoksyoctowego oraz jego kompleksów z kobaltem i niklem.

Wprowadzenie: W ostatnich latach konsumenci stali się niezwykle wymagający i oczekują od producentów, aby produkty przez nich wytwarzane były najwyższej jakości. Zdecydowanie chętniej sięgają po owoce i warzywa, które mają regularne kształty i piękne kolory oraz przede wszystkim nie są uszkodzone przez owady. Aby wyhodować tak idealne owoce i warzywa potrzeba zabezpieczyć rośliny przed negatywnym wpływem chwastów i szkodników. W tym celu stosowane są różne środki ochrony- m.in. herbicydy. Herbicydy są to środki chemiczne, które są stosowane w celu zatrzymania wzrostu i niszczenia niepożądanych roślin. Ich działanie polega na zaburzeniu prawidłowego funkcjonowania rośliny poprzez zakłócenie przebiegu podstawowych procesów fizjologicznych, takich jak oddychanie, fotosynteza, synteza białek, metabolizm kwasów nukleinowych itp. Herbicydy można sklasyfikować na wiele sposobów np. ze względu na budowę chemiczną substancji czynnej, mechanizm działania, sposób wnikania, selektywność, termin stosowania, a także ze względu na zwalczane chwasty czy na ich formę [1]. Bardzo ważne jest odpowiednie stosowanie herbicydów, zgodnie z zaleceniami producenta. Niestosowanie się do tych wytycznych może mieć bardzo poważne konsekwencje. Niewłaściwe stosowanie może opóźnić wzrost roślin, powodować ubytki w obsadzie plantacji lub nawet całkowicie zniszczyć uprawy i zanieczyścić środowisko. Do najczęściej popełnianych błędów użytkownika środków ochrony roślin można zaliczyć kontakt rośliny z herbicydem z plantacji sąsiedniej, nie zachowanie odpowiedniej przerwy między nowym zasianiem a wcześniejszym zastosowaniem środka chwastobójczego, użycie herbicydów bez zważania na warunki atmosferyczne (np. przed ulewami czy w trakcie silnego wiatru) [2]. Oprócz wyżej wymienionych błędów również często dochodzi do niewłaściwego dawkowania, złego terminu aplikacji oraz złego rozpoznania chwastów i w konsekwencji zastosowania nieodpowiedniego środka. Jednymi z chętniej wykorzystywanych substancji czynnych pestycydów są kwas fenoksyoctowy oraz jego chloropochodne takie jak kwas 4-chlorofenoksyoctowy (4-CPA), kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D) oraz kwas 2,4,5-trichlorofenoksyoctowy (2,4,5-T) [3]. Są one wykorzystywane do ochrony zbóż, kukurydzy, trawników i sadów. Niestety nadmierne stosowanie kwasu 2,4-dichloroocowego spowodowało zwiększenie poziomu jego pozostałości w glebach i wodach. 2,4-D może być absorbowany przez składniki gleby i osadów, a także tworzyć kompleksy z metalami, powodując zmiany w ich biodostępności[4]. Wg badań działanie fitotoksyczne 2,4-D jest widoczne już po 4h od zastosowania. Uszkodzona zostaje wewnętrzna struktura chloroplastów- dochodzi do rozpadu zniekształcenia struktur systemów błonowych komórek epidermy, palisady i mezofilu [5]. Oprócz działania toksycz-

nego na komórki roślinne zaobserwowano również wpływ na komórki zwierzęce. W literaturze zagranicznej pojawiają się doniesienia, że kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy może mieć powiązanie z chorobą Hodgkina (nowotworem węzłów chłonnych), chłoniakiem nieziarnicznym (NHL) i mięsakiem tkanek miękkich [6]. Natomiast wg D.H. Garabranta i M.A. Philberta nie ma wiarygodnych wyników badań, które jednoznacznie udowadniają zależność między tymi kwasami a chorobami nowotworowymi [7].

Część eksperymentalna: Kompleksy kwasu fenoksyoctowego z metalami- kobaltem i niklem, zostały zsyntetyzowane poprzez odważenie ok 0,1g krystalicznego kwasu fenoksyoctowego i rozpuszczenie naważki w roztworze wodorotlenku sodu o stężeniu $0,1 \text{ mol/dm}^3$ w ilości stechiometrycznej 1:1. Następnie do roztworu dodano stechiometryczną objętość wodnego roztworu chlorku metalu. Mieszaninę umieszczono w inkubatorze z wytrząsaniem na godzinę, a następnie odstawiono na kilka dni, w celu strącenia osadów. Następnie powstałe osady przesączono, przemywając wodą destylowaną i wysuszono w temperaturze pokojowej. Widma UV rejestrowano na spektrofotometrze UV/Vis DR 5000 dla metanolowych roztworów kwasu fenoksyoctowego i kompleksów z kobaltem i niklem o stężeniu $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$. Analizę struktury badanego kwasu i jego kompleksów wykonano przy użyciu metod FT IR i ATR. Widma w podczerwieni rejestrowano metodą transmisyjną z zastosowaniem matrycy KBr w zakresie liczb falowych $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ oraz metodą ATR w zakresie liczb falowych $2000-400 \text{ cm}^{-1}$ za pomocą spektrofotometru podczerwieni Alfa firmy Bruker.

Wyniki: Zarejestrowano widma UV-Vis metanolowych roztworów kwasu fenoksyoctowego, fenoksyoctanu kobaltu i fenoksyoctanu niklu (Rys.1). Maksima absorpcji obecne na widmach UV-Vis przedstawiono w Tabeli 1.

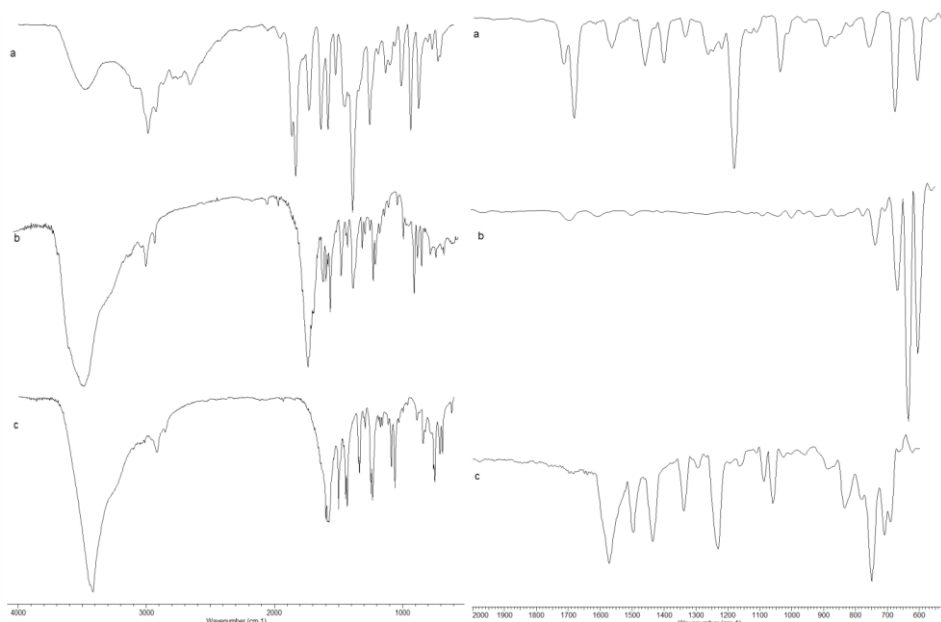


Rys. 1. Widma UV Vis kwasu fenoksyoctowego i jego kompleksu z kobaltem i niklem.

Tabela 1. Maksima absorpcji obecne na widmach UV-VIS kwasu fenoksyoctowego i jego kompleksów z kobaltem i niklem.

[nm]	Kwas fenoksyoctowy	Kompleks z kobaltem	Kompleks z niklem
λ_{max1}	218	223	222
λ_{max2}	269	270	270
λ_{max3}	276	277	277

Na widmie elektronowym kwasu fenoksyoctowego w zakresie światła UV (Rys.1) zaobserwowano trzy pasma, których maksima położone są przy długości fali 218 nm, 269 nm i 276 nm (Tabela 1). Pasma te związane są z przejściem elektronowym $\pi \rightarrow \pi^*$ w pierścieniu aromatycznym ligandu. W kompleksach z kobaltem i niklem zaobserwowano nieznaczne przesunięcia batochromowe (w kierunku fal dłuższych) wszystkich trzech pasm. Może to świadczyć o stabilizującym efekcie jonów metali na układ aromatyczny kwasu fenoksyoctowego. Zarejestrowane zostały również widma FTIR oraz ATR kwasu fenoksyoctowego, fenoksyoctanu kobaltu i fenoksyoctanu niklu (Rys.2). Wartości liczb falowych i intensywności wybranych pasm obecnych na widmach FTIR i ATR przedstawiono w Tabeli 2.



Rys. 2. Widma FTIR (po lewej) i ATR (po prawej) kwasu fenoksyoctowego (a) i jego kompleksu z kobaltem (b) i niklem (c).

Tabela 2. Wartości liczb falowych oraz intensywności wybranych pasm w widmach kwasu fenoksyoctowego, fenoksyoctanu kobaltu i fenoksyoctanu niklu.

Kwas fenoksyoctowy		Kompleks kobaltu		Kompleks niklu		Przypisanie
IR _{KBr}	IR _{ATR}	IR _{KBr}	IR _{ATR}	IR _{KBr}	IR _{ATR}	
2923 M		2923 M		2915 W		νCH_2
1737 M	1731 M					$\nu\text{C=O}$
1595 M	1597 W	1586 S	1598 W	1598 S	1572 S	$\nu\text{C=C}$
		1452 M		1443 M		$\nu\text{C-C}$
1436 M	1439 M	1433 S	1432 W	1431 M	1435 S	$\delta\text{C-H}$
		1346 M	1344 W	1334 M	1338 M	$\nu\text{C-O}$
1300 M						βOH

Widma FTIR i ATR dla kwasu fenoksyoctowego i jego kompleksów z kobaltem i niklem przedstawiono na Rys.2. Porównując wyniki uzyskane dla fenoksyoctanu kobaltu i fenoksyoctanu niklu z wartościami odpowiednimi dla czystego kwasu fenoksyoctowego, można zauważyć zmiany intensywności i długości fal pasm układu aromatycznego i grupy karboksylowej (Tabela 2). Wyraźnie widać pasma charakterystyczne dla kwasu, które nie pojawiają się na widmach kompleksów (drgania $\nu_{C=O}$ 1731-1737 oraz β_{OH} 1300). Natomiast na widmach kompleksów z kobaltem i niklem pojawiają się nowe pasma 1443-1455 ν_{C-C} oraz 1334-1344 ν_{C-O} , które są obecne tylko w widmach kompleksów.

Wnioski: Zastąpienie wodoru metalami- kobaltem i niklem w cząsteczkach kwasu fenoksyoctowego powoduje istotne zmiany w strukturze badanych cząsteczek. Zaobserwowano pojawianie się dodatkowych pasm na widmach FTIR oraz ATR oraz zanik niektórych pasm charakterystycznych dla cząsteczki czystego kwasu. Zaobserwowano również że, pasma na widmach elektronowych fenoksyoctanu kobaltu i fenoksyoctanu niklu przesuwają się w kierunku wartości wyższych, w porównaniu z widmem elektronowym czystego kwasu fenoksyoctowego.

Literatura:

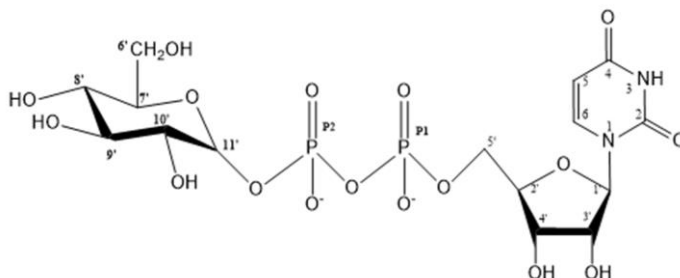
1. O. Bemowska-Kalabun, Fenotypowe i genetyczne badania zmian mikroewolucyjnych w populacjach *Geranium robertianum* (Geraniaceae); Rozprawa doktorska w zakresie nauk biologicznych dyscyplinie: biologii; Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, 2018.
2. J. Osowski, Główne przyczyny braku wschodów i ubytków roślin w obszarze plantacji ziemniaka, Agrotechnika i mechanizacja, *Ziemniak Polski*, 1 (2020).
3. F. Jiang, W. Tan, H. Chen, L. Tan, J. Liu, 2015, *RSC Advances*, 64 (2015).
4. A. Drzewiecka – Antonik, W. Ferenc, A. Wolska, M.T. Klepka, B. Cristóvão, J. Sarzyński, P. Rejmak, D. Osypiuk, *Chem. Phys. Lett.* (2016).
5. N.D. Hallam, *J. Experiment. Botan.*, 21 (1970) 1031.
6. L. Hardell, *Scand J Work Environ Health.*, 7 (1981) 119.
7. D. H. Garabrant, M. A. Philbert, *Epidemiol. Toxicol. Critical Rev. Toxicol.*, 32(4) (2002) 233.

BADANIE REAKCJI KOMPLEKSOWANIA W UKŁADZIE URYDINO-5'-DIFOSFOGLUKOZA, JONY MIEDZI(II)

K. STACHOWIAK, M. ZABISZAK, R. JASTRZĄB, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii, Zakład Chemii Koordynacyjnej, ul. Uniwersyte-
tu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań

Abstrakt: W pracy badano reakcje kompleksowania w układzie podwójnym: jony miedzi(II), urydino-5'-difosfoglukoza w stosunku molowym metalu do liganda 1:1 oraz 1:2. Przeprowadzone badania potencjometryczne umożliwiły pełną charakterystykę tworzących się w badanym układzie form kompleksowych. Wyznaczono ogólne stałe trwałości ($\log\beta$), stałe równowag reakcji tworzenia ($\log K_e$) oraz pH dominacji kompleksów. Badania spektroskopowe pozwoliły na określenie składu wewnętrznej sfery koordynacyjnej badanych związków kompleksowych oraz na wyznaczenie typów chromoforów w badanym układzie.

Wprowadzenie: Jony miedzi(II) występują w organizmie człowieka w śladowych ilościach, jednak są one niezbędne do jego prawidłowego funkcjonowania. Głównym źródłem jonów miedzi(II) w codziennej diecie są np. skorupiaki, podroby, orzechy suszone owoce, a także awokado i czekolada [1-3]. Jony miedzi(II) pełnią rolę kolatorów wielu białek, odgrywających kluczową rolę w procesie wytwarzania energii, obrony antyoksydacyjnej oraz metabolizmie oksydacyjnym. Ponadto jony miedzi(II) biorą udział w metabolizmie lipoprotein oraz stanowią centra aktywne wielu enzymów takich jak: oksydaza cytochromowa c, tyrozylnaza czy oksydaza lizylowa [4-6]. Zarówno niedobór, jaki i nadmiar jonów miedzi(II) może przyczynić się do wystąpienia różnych schorzeń i chorób, m.in.: choroba Hodgkina, choroba Menkesa, anemia, osteoporoza czy białaczkę szpikową oraz nadczynność tarczycy [4,7]. Cukrowe pochodne nukleozydów można podzielić na cukrowe pochodne monofosforanów nukleozydu oraz cukrowe pochodne difosforanów nukleozydu [8]. Urydino-5'-difosfoglukoza (UDP-Glc, Rys. 1) jest niezbędna do przeprowadzenia niektórych procesów w organizmie, m., in.: syntezy glikogenu, sacharozy i glikoprotein, produkcji kolagenu, a także syntezy kwasu urydino-5'-difosfoglukuronowego. Dodatkowo stwierdzono, że urydino-5'-difosfoglukoza jest donorem glikozyli w syntezie glikanów [9-10].



Rys. 1. Wzór strukturalny urydino-5'-difosfoglukozy (UDP-Glc).

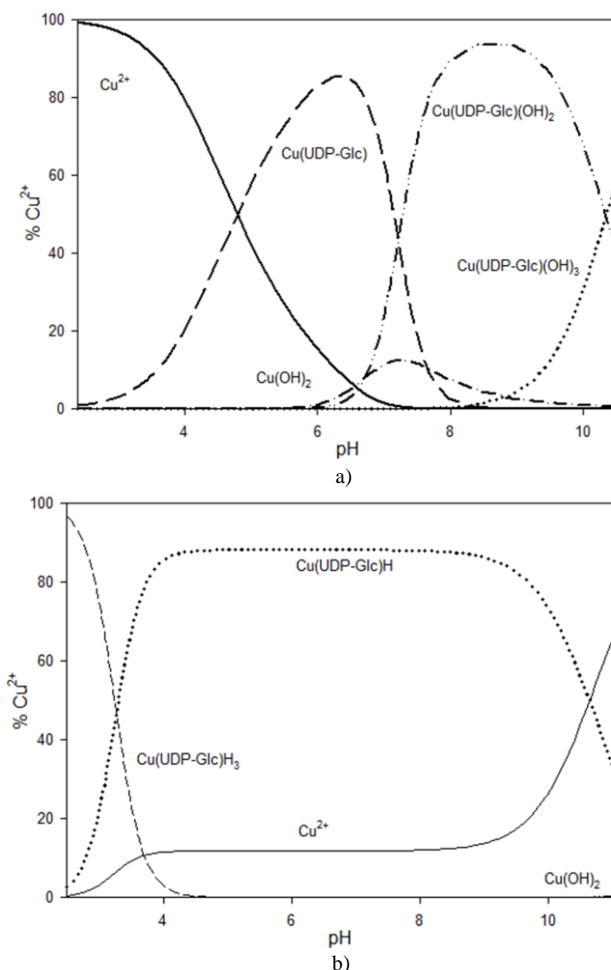
Część eksperymentalna: Badania potencjometryczne w układzie Cu(II)/UDP-Glc prowadzono w ściśle określonych warunkach temperatury, przy stałej sile jonowej oraz w obecności gazu obojętnego. Każdą serię miareczkowań poprzedzono kalibracją pH-metru wykorzystując dwa roztwory buforowe: wodorofalanu potasu (pH=4,002) oraz boraksu (pH=9,225). Pierwszy etap badań obejmował wyznaczenie stałych protonacji liganda. W tym celu przygotowano serię próbek, w których stężenie liganda wynosiło 0,0005 mol/dm³. W kolejnym etapie przygotowano serię próbek dla badanego układu, gdzie stężenie metalu i liganda w przygotowanych próbkach wynosiło 0,0005 mol/dm³, a stosunek molowy metalu do liganda wynosił 1:1 i 1:2. Próbkę miareczkowano za pomocą roztworu NaOH o stężeniu 0,1984 mol/dm³, w zakresie pH od 2,5 do 11,0. Otrzymane wyniki poddano analizie komputerowej z wykorzystaniem programu Hyperquad2008. Dla badanego układu przeprowadzono serię badań spektroskopowych UV-Vis oraz EPR, na podstawie których określono typy chromoforów oraz skład wewnętrznej sfery koordynacyjnej.

Wyniki: Analiza danych uzyskanych z badań potencjometrycznych potwierdziła występowanie w układach form: ML, MLH_x oraz ML(OH)_x. Dla tworzących się w układach form kompleksowych wyznaczono ogólne stałe trwałości (logβ) oraz stałe równowag reakcji tworzenia (logK_e), a także zaproponowano ich reakcje tworzenia (Tabela 1).

Tabela 1. Ogólne stałe trwałości (logβ), stałe równowag reakcji tworzenia (logK_e) oraz reakcje tworzenia kompleksów w badanych układach.

Kompleks	logβ	Reakcja	LogK _e
Cu(UDP-Glc)	8,50(5)	$\text{Cu}^{2+} + \text{UDP-Glc} \rightleftharpoons \text{Cu(UDP-Glc)}$	8,50
Cu(UDP-Glc)H	13,81(4)	$\text{Cu}^{2+} + (\text{UDP-Glc})\text{H} \rightleftharpoons \text{Cu(UDP-Glc)H}$	4,13
Cu(UDP-Glc)H ₃	20,35(5)	$\text{Cu(UDP-Glc)H} + 2 \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Cu(UDP-Glc)H}_3$	6,54
Cu(UDP-Glc)(OH) ₂	-5,93(7)	$\text{Cu(OH)}_2 + \text{UDP-Glc} \rightleftharpoons \text{Cu(UDP-Glc)(OH)}_2$	7,20
Cu(UDP-Glc)(OH) ₃	-16,27(9)	$\text{Cu(UDP-Glc)(OH)}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cu(UDP-Glc)(OH)}_3 + \text{H}^+$	3,43

Na podstawie otrzymanych wyników sporządzono krzywe dystrybucji form powstających w badanych układach (Rys. 1a i 1b). W układzie równomolowym pierwszy kompleks Cu(UDP-Glc) zaczyna tworzyć się od pH ok. 2,5, osiągając swoje maksimum przy pH ok. 6,5 i wiążąc ok. 85% jonów miedzi(II). Drugim związkiem powstającym w tym układzie jest Cu(UDP-Glc)(OH)₂. Kompleks ten łączy ok. 90% jonów Cu(II), a swoje maksimum osiąga przy pH ok. 8,5. Ostatni kompleks tworzący się w układzie równomolowym Cu(UDP-Glc)(OH)₃ osiąga swoje maksimum poza badanym zakresem pH, wiążąc ok. 60% jonów miedzi(II) przy pH=11,0. Proces kompleksowania w układzie z nadmiarową ilością liganda rozpoczyna się już przy pH poniżej 2,5. Kompleks Cu(UDP-Glc)H₃ obserwowany jest już w układzie przy poniżej pH=2,5 wiążąc ok. 95% jonów Cu(II). Drugi kompleks Cu(UDP-Glc)H dominuje w układzie w przedziale pH ok. 4,5-8,5 i łączy ok. 85% jonów miedzi(II).



Rys. 1. Krzywe dystrybucji form w układach: a) Cu(II)/UDP-Glc 1:1, b) Cu(II)/UDP-Glc 1:2.

Wnioski: Na podstawie przeprowadzonych badań potencjometrycznych i analiz otrzymanych wyników określono formy kompleksowe występujące w badanych układach. Wykazano istnienie form kompleksowych typu MLH_x , ML oraz $\text{ML}(\text{OH})_x$. Przeprowadzono charakterystykę otrzymanych związków kompleksowych: wyznaczono ogólne stałe trwałości ($\log\beta$) oraz stałe równowag reakcji tworzenia ($\log K_e$). Dla badanych układów wykreślono krzywe dystrybucji form, na podstawie których określono procentową zawartość jonów miedzi(II) dla każdej z tworzących się form kompleksowych oraz pH ich dominacji. Na podstawie wyników otrzymanych z badań spektroskopowych wyznaczono typy chromoforów, a także określono skład wewnętrznej sfery koordynacyjnej w badanych związkach kompleksowych.

Literatura:

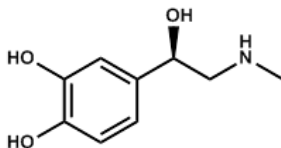
1. D.G. Barceloux, *Clinical Toxicology*, 37 (1999) 217.
2. V. Ochoa-Herrera, G. León, Q. Banihani, J.A. Field, R. Sierra-Alvarez, *Sci. Total Environment*, (2011) 380.
3. T. Wang, Z. Guo, *Current Medical Chemistry*, 13 (2006) 525.
4. M. Angelova, S. Asenova, V. Nedkova, R. Koleva-Kolarova, *Tarika J. Sci.*, 9 (2011) 88.
5. R. Jastrząb, *New J. Chem.*, 34 (2010) 2864.
6. T. Kirsipuu, A. Zadoroznaja, J. Smirova, M. Friedemann, T. Plitz, V. Tõugu, P. Palumaa, *Sci. Report.*, 10 (2010) 5686.
7. J. Osredkar, N. Sustar, *J. Clinical Toxicol.*, (2011) 1.
8. M. Qiao, B. Li, Y. Ji, L. Lin, R. Linhardt, X. Zhang, *Critical Rev. Biotech.*, (2020) 1.
9. M. Flores-Diaz, A. Alapne-Giron, B. Persson, P., Pollesello, M., Moos, Ch., von Eichel-Streiber, M., Thelestam, I., Florin, J. *Biological Chemistry*, 272 (1997) 23784.
10. S., Mikkola, *Molecules*, 25 (2020) 5755, 1.

WPLYW pH NA TWORZENIE ZWIĄZKÓW KOMPLEKSOWYCH W UKŁADZIE BINARNYM JONÓW MIEDZI(II) Z ADRENALINĄ W ROZTWORZE WODNYM

P. SADOWSKA, R. BREGIER-JARZĘBOWSKA, R. JASTRZĄB, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii, Zakład Chemii Koordynacyjnej, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań

Abstrakt: Badano reakcje kompleksowania w roztworze wodnym w układzie binarnym jonów miedzi(II) z adrenaliną w stosunkach molowych metalu do liganda 1:1, 1:2 i 1:4. Na podstawie komputerowej analizy danych potencjometrycznych, z wykorzystaniem programu komputerowego HYPERQUAD, wyznaczono skład i wartości ogólnych stałych trwałości ($\log\beta$) oraz wartości stałych równowagi reakcji tworzenia ($\log K_e$) kompleksów powstających w układzie Cu(II)/Adr. Analiza parametrów spektroskopowych Vis pozwoliła określić, które atomy donorowe liganda biorą udział w oddziaływaniach.

Wprowadzenie: Adrenalina (*Adr*) (Rys.1.) znana także jako epinefryna, należy do katecholamin, które stanowią grupę związków organicznych o kluczowym znaczeniu dla organizmów żywych [1,2]. Adrenalina to hormon produkowany w rdzeniu nadnerczy, pełniący istotną rolę jako neuroprzekaźnik w ośrodkowym układzie nerwowym [3]. Epinefryna ma wpływ na prawie wszystkie tkanki ciała. Jest odpowiedzialna za zwiększanie częstości akcji serca, ułatwia przepływ krwi do mięśni i mózgu, rozluźnia mięśnie gładkie oraz zwiększa poziom cukru we krwi powodując przyspieszenie oddechu [3,4]. Stwierdzono także, że zmniejszenie stężenia adrenaliny w organizmie przyczynia się do występowania chorób Alzheimera i Parkinsona [3].



Rys. 1. Wzór strukturalny adrenaliny.

Na działanie bioligandów znaczny wpływ mają ich interakcje z obecnymi w organizmach żywych jonami metali, stąd duże znaczenie przypisuje się badaniom, na poziomie komórkowym, tego typu oddziaływań [5,6]. Istotną rolę z biologicznego punktu widzenia przypisuje się jonom miedzi(II) stanowiącym centra aktywne szeregu enzymów uczestniczących na przykład w biosyntezie neuroprzekaźników czy oddychaniu komórkowym [7]. Co więcej, jony miedzi(II) uważane za kwasy Lewisa, chętnie tworzą kompleksy z ligandami posiadającymi donorowe atomy azotu i tlenu, takimi jak np. katecholaminy [8,9]. Związki kompleksowe adrenaliny z jonami Cu(II), mogą być użytecznymi układami modelowymi pozwalającymi na uzupełnienie informacji dotyczących reakcji kompleksowania jonów metali przez katecholaminy, co z kolei może przyczynić się do lepszego zrozumienia procesów zachodzących w organizmach żywych [10].

Część eksperymentalna: Do przeprowadzenia badań potencjometrycznych wykorzystano zestaw Metrohm 702SM Titrino z autobiuwetą oraz elektrodą szklaną kombinowaną. Przed każdą serią pomiarów wykonywano kalibrację pH-metru stosując bufor ftalanowy (pH=4,01) i boraksowy (pH=9,22). Pomiary przeprowadzono w zakresie pH od 2,5 do 11,0 przy stałej sile jonowej $\mu=0,1$ M (KNO_3), w temperaturze 20°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) oraz w atmosferze gazu obojętnego (Argon). Stężenie titranta (NaOH) wynosiło $0,19565$ mol/dm³, a jonów miedzi(II) w próbkach $0,001$ mol/dm³. Stosunek stężeń jonów miedzi(II) i adrenaliny wynosił 1:1, 1:2 oraz 1:4. Skład i wartości ogólnych stałych trwałości ($\log\beta$) form tworzących się w badanym układzie wyznaczono na podstawie komputerowej analizy danych potencjometrycznych (program HYPERQUAD). Próbki do badań spektroskopowych Vis przygotowano w analogicznych stężeniach, jak w badaniach potencjometrycznych i wykonano je przy użyciu spektrofotometru Thermo Fisher Scientific Evolution 300 w zakresie 400-900 nm, przy pH dominacji poszczególnych kompleksów.

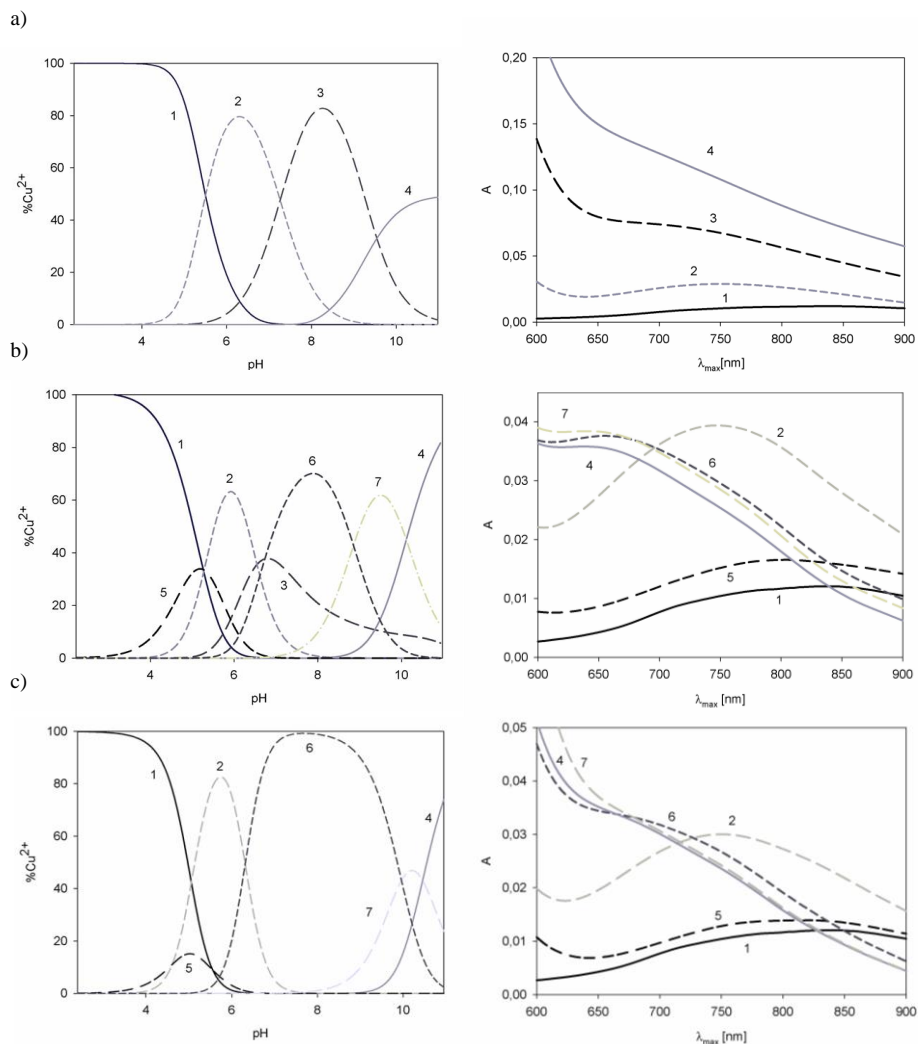
Wyniki: W układzie Cu(II)/Adr w stosunkach molowych metal : ligand = 1:1, 1:2 oraz 1:4 ustalono tworzenie się zarówno kompleksów protonowanych, jak i prostych. W stosunku molowym 1:1 w układzie obecne są formy CuH(Adr), Cu(Adr) i Cu(Adr)₂, a w 1:2 również CuH₂(Adr), CuH₂(Adr)₂ i CuH(Adr)₂. Natomiast w stosunku M:L = 1:4 nie stwierdzono tworzenia się kompleksu Cu(Adr). Wartości ogólnych stałych trwałości ($\log\beta$) oraz stałych równowagi reakcji tworzenia ($\log K_e$) powyższych kompleksów przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Wartości ogólnych stałych trwałości ($\log\beta$) oraz stałych równowagi reakcji tworzenia ($\log K_e$) w układzie Cu(II)/Adr.

Kompleks	Stosunek molowy 1:1		Stosunek molowy 1:2		Stosunek molowy 1:4	
	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$
CuH ₂ (Adr)	-	-	27,53(2)	6,00	26,92(7)	5,39
CuH(Adr)	22,26(1)	10,54	22,30(2)	10,58	22,31(1)	10,59
Cu(Adr)	15,00(2)	15,00	15,76(8)	15,76	-	-
CuH ₂ (Adr) ₂	-	-	42,24(2)	19,94	42,26(2)	19,95
CuH(Adr) ₂	-	-	33,38(3)	5,90	32,30(3)	-
Cu(Adr) ₂	24,05(5)	9,05	23,27(2)	7,51	21,84(2)	-

$\log\beta_{\text{H3(Adr)}}=29,95$; $\log\beta_{\text{H2(Adr)}}=21,53$, $\log\beta_{\text{H(Adr)}}=11,72$

Na podstawie krzywych dystrybucji (Rys. 2) wyznaczono wartość pH dominacji kompleksów w układzie. Pozwoliło to na wykonanie badań spektralnych Vis (Tabela 2) dla poszczególnych form i ustalenie dla nich typu chromoforu. W adrenalinie centrami donorowymi są, zgodnie z kolejnością deprotonacji, atom tlenu z jednej z grup hydroksylowych przyłączonych do pierścienia benzenowego, atom azotu z łańcucha bocznego oraz atom tlenu z drugiej grupy hydroksylowej przy pierścieniu [1].



Rys. 2. Rysunek przedstawiający krzywe dystrybucji oraz widma absorpcji form powstałych w układzie Cu(II)/Adr w stosunku M:L a) 1:1, b) 1:2, c) 1:4, gdzie: 1 – Cu^{2+} , 2 - $CuH(Adr)$, 3 - $Cu(Adr)$, 4 – $Cu(Adr)_2$, 5 – $CuH_2(Adr)$, 6 – $CuH_2(Adr)_2$, 7 – $CuH(Adr)_2$.

Tabela 2. Wartości parametrów spektroskopowych dla form tworzących się w układzie Cu(II)/Adr.

Kompleks	Stosunek molowy	pH	λ_{max} [nm]	chromofor
$CuH_2(Adr)$	1:2	4,2	800	{O}
	1:4	4,0	800	
$CuH(Adr)$	1:1	6,3	750	{N, O}
	1:2	5,9	745	
	1:4	5,7	750	
$Cu(Adr)$	1:1	8,4	695	{N, O _x }

CuH ₂ (Adr) ₂	1:2	8,0	660	{2N, O _x }
	1:4	7,6	655	
CuH(Adr) ₂	1:2	9,5	657	{2N, O _x }
	1:4	10,2	-	
Cu(Adr) ₂	1:1	10,5	-	{2N, O _x }
	1:2	10,5	655	
	1:4	10,8	-	

Wnioski: Stwierdzono, że przy stosunku M:L = 1:2 tworzy się najwięcej form kompleksów i może to być najbardziej optymalny stosunek molowy do badania reakcji kompleksowania między jonami miedzi(II) i adrenaliną. Wraz z deprotonacją adrenaliny obserwuje się włączanie w koordynację z Cu²⁺ kolejnych centrów aktywnych tego liganda. Dla kompleksu protonowanego CuH₂(Adr), logK_e=6,00, analiza wyników Vis wskazuje na obecność chromoforu {O}, podczas gdy dla CuH(Adr), logK_e=10,58, chromoforu {N,O}. Wzrost wartości stałej równowagi reakcji tworzenia dla formy Cu(Adr) logK_e=15,76 w stosunku do CuH₂(Adr) i CuH(Adr) dowodzi, że w oddziaływaniach z jonami metalu uczestniczy kolejne centrum aktywne z cząsteczki adrenaliny, chromofor {N,O_x}. Natomiast porównanie wartości stałych równowagi kompleksów Cu(Adr) logK_e=15,76 i Cu(Adr)₂ logK_e=7,51 sugeruje, że druga cząsteczka liganda koordynuje do kotwiczącego Cu(Adr) w odmienny sposób tj. tylko przez atomy tlenu z grupy hydroksylowej (podobnie jak w CuH₂(Adr) logK_e=6,00).

Literatura:

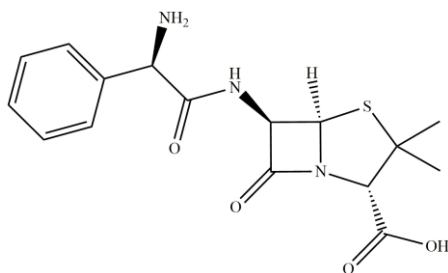
1. F. Crea, C. De Stefano, A. Irto, G. Lando, S. Materazzi, D. Milea, A. Pettignano, S. Sammartano, *Molecules*, 25 (2020) 511.
2. A. Mirzahosseini, T. Pálta, G. Orgován, G. Tóth, B. Noszál, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 170 (2019) 215.
3. I. Cs. Szigyártó, L. Szabó, L.I. Simándi, *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 372 (2013), 66.
4. C. Bretti, R. M. Cigala, F. Crea, C. De Stefano, G. Vianelli, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 12 (2015) 37.
5. L. Łomozik, A. Gąsowska, R. Bregier-Jarzębowska, R. Jastrząb, *Coord. Chem. Rev.*, 249 (2005) 2335.
6. L. Łomozik, R. Jastrząb, R. Bregier-Jarzębowska, A. Gąsowska, *Na pograniczu chemii i biologii*, XV (2006) 76.
7. I. Belfilali, S. Louhibi, R. Mahboub, R. Touzani, S. El Kadiri, T. Roisnel, *Res. Chem. Intermed.*, 41 (2015) 1819.
8. B. Modéc, N. Podjed, N. Lah, *Molecules*, 25 (2020) 1573.
9. E. Biondi, R. R. Poudyal, J. C. Forgy, A. W. Sawyer, A. W. R. Maxwell, D. H. Burke, *Nucleic Acids Res.*, 41 (2013) 3327.
10. S. Materazzi, C. Nugnes, A. Gentili, R. Curini, *Thermochim. Acta*, 369 (2001) 167.

POTENCJOMETRYCZNE ORAZ SPEKTROSKOPOWE BADANIA ZWIĄZKÓW KOMPLEKSOWYCH AMPICYLINY

J. FRYMARK, M. ZABISZAK, R. JASTRZĄB, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii, Zakład Chemii Koordynacyjnej, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań

Abstrakt: Przeprowadzono badania reakcji kompleksowania w układach równomolowych zawierających wybrane jony metali oraz ampicylinę, reprezentującą antybiotyk β -laktamowy z grupy penicyliny. Poprzez komputerową analizę danych z miareczkowania potencjometrycznego potwierdzono tworzenie się związków kompleksowych oraz wyznaczono ich ogólne stałe trwałości. Wykorzystując metody spektroskopowe określono wewnętrzną sferę koordynacyjną jonów metali w ich związkach z badanym antybiotykiem.

Wprowadzenie: Współcześnie, antybiotyki β -laktamowe pełnią kluczową rolę w zwalczaniu infekcji bakteryjnych poprzez hamowanie biosyntezy ściany komórkowej bakterii. Ampicylina jest powszechnie stosowanym antybiotykiem β -laktamowym z grupy penicylin charakteryzująca się szerokim spektrum działania, jednakże jest podatna na działanie β -laktamazy [1-5]. W związku ze swoją skutecznością w leczeniu różnorodnych infekcji, w tym zakażeń dróg moczowych, zapalenia płuc czy zatrucia pokarmowego, ampicylina pozostaje jednym z kluczowych leków w terapii antybiotykowej [3-5]. Problem rosnącej oporności bakterii na powszechnie stosowane antybiotyki staje się coraz bardziej zauważalny na całym świecie, zagrażając skuteczności stosowanych terapii. Oporność ta może powodować poważne komplikacje kliniczne i ograniczać skuteczność stosowanych antybiotyków [6-8]. W tym kontekście, istnieje pilna potrzeba opracowania nowych strategii terapeutycznych, które mogą pomóc w przezwycięzeniu tego problemu. Jedną z potencjalnych strategii jest wykorzystanie jonów metali o znaczeniu biologicznym i diagnostycznym do modyfikacji antybiotyków, tworząc z nimi związki kompleksowe. Kompleksy te mogą stanowić innowacyjną barierę ochronną, która chroni antybiotyk przed działaniem enzymów, takich jak β -laktamazy, odpowiedzialnych za rozwój oporności [9,10]. Badania potencjometryczne oraz spektroskopowe związków kompleksowych ampicyliny mogą dostarczyć istotnych informacji dotyczących ich struktury oraz stabilności powstających kompleksów.



Rys. 1. Wzór strukturalny ampicyliny.

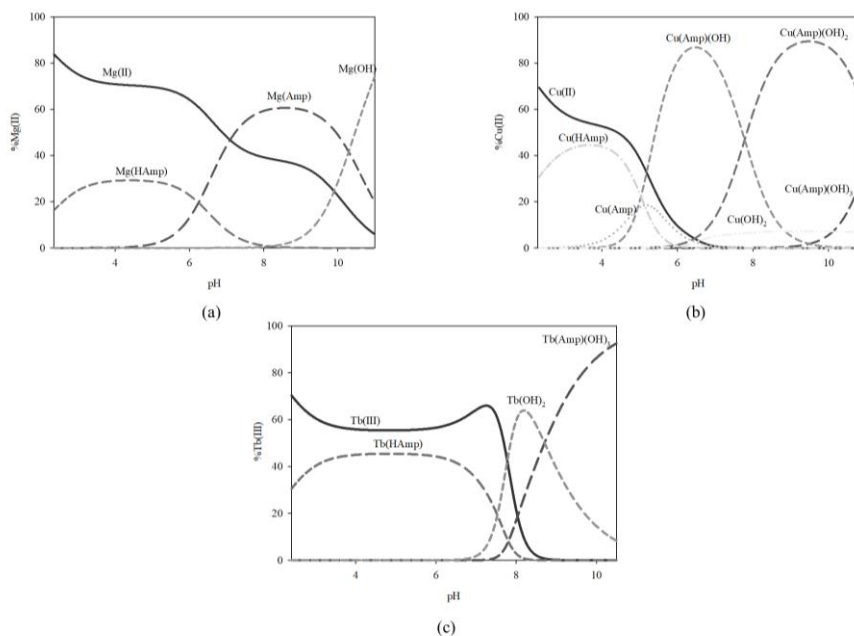
Część eksperymentalna: Badania potencjometryczne przeprowadzono za pomocą zestawu Titrando 905 Metrohm wyposażonego w autobiuiretę Dosino 800 z kombinowaną elektrodą szklaną. Pomiary potencjometryczne wykonano w ściśle kontrolowanych warunkach temperatury ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) oraz w atmosferze gazu obojętnego (hel 5.0), przy stałej sile jonowej $\mu = 0,1 \text{ mol/dm}^3$ (KNO_3). Stężenie jonów metalu wynosiło $0,001 \text{ mol/dm}^3$, a stosunek molowy jonów metalu do ligandów w układach podwójnych był 1:1. Skład oraz ogólne stałe trwałości tworzenia się poszczególnych form kompleksowych obliczono przy użyciu komputerowej analizy danych otrzymanych w wyniku przeprowadzenia serii miareczkowań potencjometrycznych w zakresie pH 2,5-11,0, wykorzystując program HYPERQUAD2008. Pomiary spektroskopowe przeprowadzono przy wartościach pH, w których dominowała dana forma kompleksowa. Badania UV-Vis wykonano w zakresie 200-1000 nm na spektrofotometrze ThermoFisher Scientific Evolution 300, stężenie jonów metalu wynosiło $0,001 \text{ mol/dm}^3$. Badania IR wykonano na spektrofotometrze FT-IR INVENIO R Bruker w próbkach stężenie antybiotyku wynosiło $0,05 \text{ mol/dm}^3$. Badania CD zostały przeprowadzone na spektrofotometrze J810 JASCO, a stężenie liganda w próbkach wynosiło $0,0001 \text{ mol/dm}^3$. Natomiast badania luminescencyjne zostały wykonane na spektrofluorymetrze RF-6000 Shimadzu, a stężenie jonów metalu wynosiło $0,001 \text{ mol/dm}^3$.

Wyniki: Na podstawie danych uzyskanych z serii miareczkowań potencjometrycznych ampicyliny z jonami metali bloków s (Mg, Ca, Sr), d (Cu, Ni, Co) i f (Nd, Eu, Tb) określono ogólne stałe trwałości ($\log\beta$) oraz stałe równowagi reakcji chemicznych ($\log K_e$) (Tab. 1).

Tabela 1. Ogólne wartości stałych trwałości ($\log\beta$) oraz stałe równowagi reakcji chemicznych ($\log K_e$) dla kompleksów.

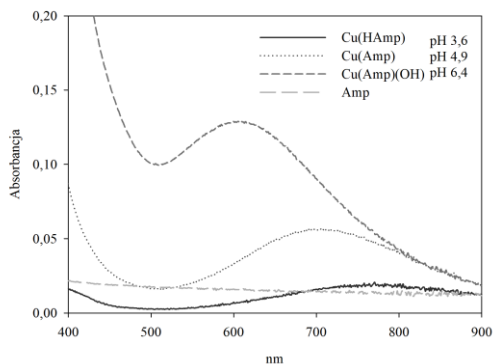
Forma kompleksowa	Mg(II)		Ca(II)		Sr(II)	
	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$
MHAmp	9,85(5)	2,75	9,68(3)	2,58	9,75(1)	2,57
MAmp	3,60(2)	3,60	-	-	2,60(7)	2,60
M(Amp)(OH)	-	-	-	-	-8,56(5)	2,60
	Cu(II)		Ni(II)		Co(II)	
	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$
MHAmp	10,35(4)	3,26	10,91(2)	3,82	9,99(6)	2,90
MAmp	5,23(5)	5,23	3,86(1)	3,86	3,12(6)	3,12
M(Amp)(OH)	0,29(2)	8,83	-6,21(1)	3,70	-	-
M(Amp)(OH) ₂	-7,48(3)	5,99	-	-	-14,88(8)	12,66
M(Amp)(OH) ₃	-18,67(4)	2,58	-	-	-25,33(4)	3,32
	Nd(III)		Eu(III)		Tb(III)	
	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$
MHAmp	10,30(3)	3,21	11,22(2)	4,12	10,28(2)	3,18
MAmp	3,28(2)	3,28	-	-	-	-
M(Amp)(OH) ₃	-	-	-21,11(4)	20,20	-20,95(1)	20,36
M ₂ (Amp)	-	-	7,47(3)	7,47	-	-

Ponadto dla badanych układów wykreślono krzywe dystrybucji poszczególnych form kompleksowych (Rys. 2.), a następnie na ich podstawie ustalono wartości pH dominacji dla poszczególnych form, co stanowiło punkt wyjścia do badań spektroskopowych.

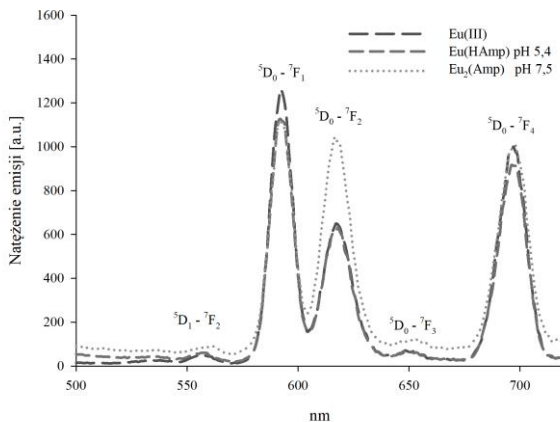


Rys. 2. Krzywa dystrybucji form kompleksowych układzie: a) Mg(II)/Ampicylina; b) Cu(II)/Ampicylina; c) Tb(III)/Ampicylina.

Zastosowano kilka niezależnych metod spektroskopowych (UV-Vis, IR, CD, EPR, luminescencja) (Rys. 3-4) w celu potwierdzenia procesu kompleksowania i zidentyfikowania wewnętrznej sfery koordynacyjnej wybranych form kompleksowych.



Rys. 3. Widma UV-Vis badanych form kompleksowych w układzie jony miedzi(II)/ampicylina.



Rys. 4. Widma emisji badanych form kompleksowych w układzie jony europu(III)/ampicylina.

Wnioski: W układach podwójnych ampicyliny z wybranymi jonami metali zaobserwowano tworzenie się kompleksów o odmiennej sferze koordynacyjnej jonów metali. Przy zastosowaniu technik spektroskopowych zidentyfikowano skład oraz wewnętrzną sferę koordynacyjną dla poszczególnych jonów metali.

Literatura:

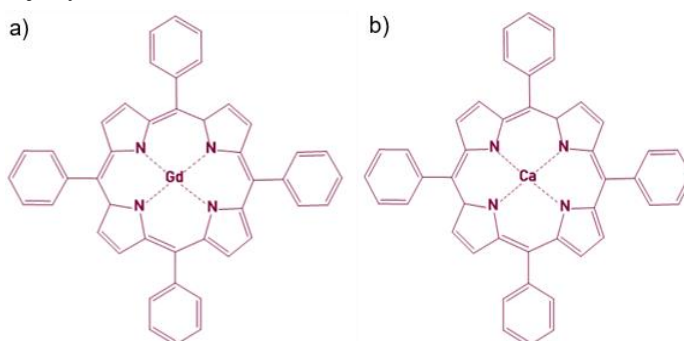
1. M. Gawrońska, M. Kowalik, M. Makowski, TrAC Trend. Anal. Chem., 155 (2022) 116691.
2. Bush, K. β -Lactam Antibiotics. Antibiotic and Chemotherapy; Elsevier, (2010) 200.
3. K. Wolff, M. Sherman, L. Nguyen, Drug Development – A Case Study Based Insight into Modern Strategies., InTech, NY, USA, 2011 183.
4. L.M. Lima, B.N.M. da Silva, G. Barbosa, E.J. Barreiro, Eur. J. Med. Chem., 208 (2020) 112829.
5. World Health Organization, Critically Important Antimicrobials for Human Medicine, 6th rev.; World Health Organization: Geneva, 2019.
6. C.-A. D. Burnham, J. Leeds, P. Nordmann, J. O'Grady, J. Patel, Nat Rev Microbiol, 15 (2017) 697.
7. C. J. Murray, et al., The Lancet, 399 (2022) 629.
8. C. A. Nadgir, D. A. Biswas, Cureus 15 (2023) e38251.
9. M. Mora-Ochomogo, C.T. Lohans, RSC Med. Chem., 12 (2021) 1623.
10. M. Zabiszak, J. Frymark, K. Ogawa, M. Skrobańska, M. Nowak, R. Jastrząb, M.T. Kaczmarek, Coord. Chem. Rev., 493 (2023) 215326.

SYNTEZA I WŁAŚCIWOŚCI KOMPLEKSUJĄCE POCHODNYCH PORFIRYNY

J. BARAŃSKA, K. KORONIAK-SZEJN, M. ZABISZAK, R. JASTRZĄB, UAM,
Wydział Chemii, Zakład Chemii Koordynacyjnej, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8,
61-614 Poznań

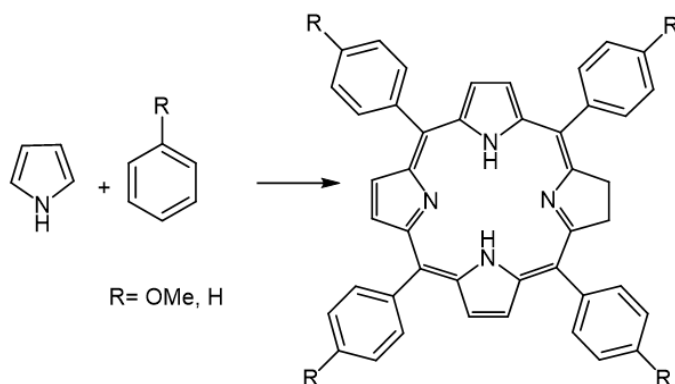
Abstrakt: W badaniach nad systemami opartymi na kompleksowaniu porfiryn w ostatnich latach doszło do znacznego rozwoju w syntezie i zastosowaniu tych związków. Porfiryny znalazły praktyczne zastosowanie w dziedzinach takich jak medycyna, przemysł, botanika i kataliza. W kontekście rozwoju medycyny stały się obiecującymi narzędziami do obrazowania w celach monitorowania diagnostycznego i terapeutycznego [1]. Ze względu na ich niską toksyczność w warunkach pozbawionych światła oraz kontrolowalne właściwości fotofizyczne, takie jak długość fali absorpcji i emisji, powierzchniowa derywatyzacja i doskonała detekcja komórek nowotworowych, zostały one wykorzystane w technikach obrazowania, takich jak obrazowanie fotoakustyczne (PAI), rezonans magnetyczny (MRI), radiografia rentgenowska i obrazowanie fluorescencyjne.

Wprowadzenie: Porfiryny odgrywają bardzo ważną rolę w procesach życiowych, ponieważ występują w hemoglobinie u zwierząt i w chlorofilu u roślin. Porfiryny znalazły swoje zastosowanie w różnych dziedzinach: medycyna, kataliza, przemysł, botanika. Wraz z rozwojem medycyny związki te stały się obiecującymi narzędziami obrazowania do celów monitorowania diagnostycznego i terapeutycznego. Obecność atomów azotu w strukturze rdzenia porfiryny umożliwia selektywne chelatowanie jonów metali oraz sprzęganie polimerów i liposomów. Najczęściej stosowanymi środkami kontrastowymi są kompleksy z jonami metali, które mają duży moment magnetyczny tj. gadolin. Środki kontrastujące z paramagnetykami, używane w diagnostyce MIR, służą do badań naczyń krwionośnych, rdzenia kręgosłupa, jak i do wykrywania nieprawidłowości struktury mózgu. Natomiast jony wapnia pełnią rolę budulcową i motoryczną organizmu, jak również biorą udział w regulowaniu gospodarki hormonalnej i nerwowej, Rys. 1 [1].



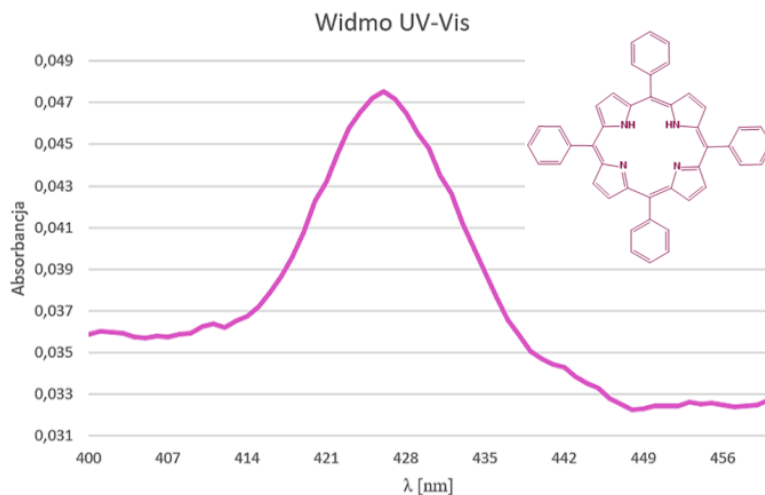
Rys. 1. Struktura związków kompleksowych z jonami: a) gadolinu(III) b) wapnia.

Część eksperymentalna: Celem pracy była synteza pochodnej porfiryny, 5,10,15,20-tetrafenylo porfiryny, w której pierścienie fenolowe zostały podstawione w 4 pozycje mezo pierścienia porfiryнового. Cząsteczka ta została otrzymana metodą „zielonej chemii”. Mieszanina reakcyjna zawierała: 500 ml metanolu, 250 ml wody destylowanej, 20 ml stężonego kwasu chlorowodorowego, 1,02 ml benzaldehydu i 694 µl pirolu, a reakcja prowadzona była przez 2 h. Początkowo barwa roztworu jest celista i obserwowane jest strącenie osadu w tym samym kolorze. Stopniowo roztwór i osad stają się coraz ciemniejsze, przyjmując intensywny pomarańczowy kolor. Powstały osad został oddzielony od roztworu poprzez sączenie pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie osad jest umieszczony w kolbie i rozpuszczany w 100 ml DMF, dodaje się do niego szczyptę krzemionki i odparowuje do całkowitego wyschnięcia na wolnoobrotowej wyparce. Tak odparowany związek umieszczono na kolumnie chromatograficznej i oczyszczano z użyciem eluentu chlorek metylenu : heksan 12:1. Pożądana frakcja ma fioletowo-różowy kolor. Wszystkie frakcje o tym kolorze połączono, a następnie odparowano na wyparce wolnoobrotowej. Masa otrzymanego związku (kolor fioletowy) wyniosła 100 mg, co odpowiada wydajności 3,7 %.



Rys. 2. Schemat reakcji otrzymania 5,10,15,20-tetrafenyloporfiryny metodą „zielonej chemii” [2]

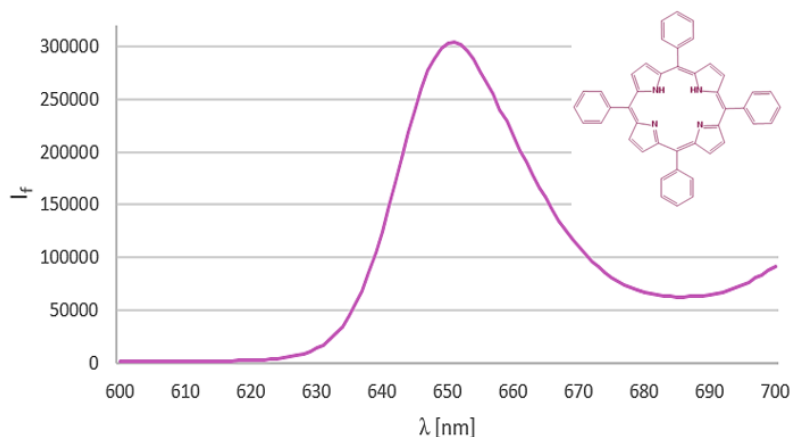
Wyniki: Otrzymany związek 5,10,15,20-tetrafenyloporfiryna poddany został badaniom spektroskopowym czego efektem są widma absorpcji oraz emisji.



Rys. 3. Widmo absorpcji dla 5,10,15,20-tetrafenyloporfiryny.

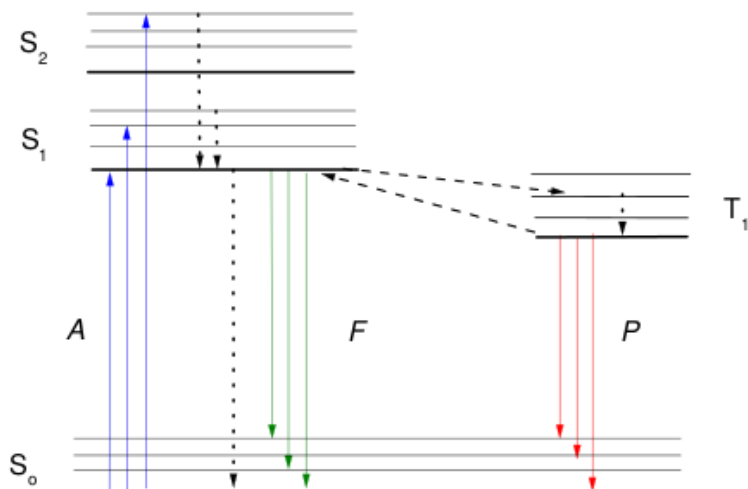
Pasma absorpcji w układach porfiryńowych wynikają z przejść pomiędzy poziomami HOMO i LUMO, gdzie centrum metalu i podstawniki w pierścieniu wpływają na energię tych przejść. Przejścia te prowadzą do powstania stanów wzbudzonych, z wyższym stanem energii i większą siłą oscylatora, powodując powstanie pasma Soreta, czyli przejście ze stanu podstawowego do drugiego stanu wzbudzonego ($S_0 \rightarrow S_2$) w zakresie absorpcji od 380 do 500 nm, zależnie od podstawników porfiryny. Otrzymane widmo przedstawia formę „meso” z czterema pierścieniami fenolowymi, które korzystnie wpływają na jej właściwości spektroskopowe i wynikają z koniugacji 18 π -elektronów oraz zapewniają zaletę łatwego i precyzyjnego monitorowania procesów wiązania gości za pomocą metod spektroskopii UV-Vis [3].

Zależność intensywności fluorescencji od długości fali



Rys. 4. Widmo emisji dla 5,10,15,20-tetrafenyloporfiryny.

Pasmo przy długości fali 650 nm wykazuje na konwersję wewnętrzną ze stanu $S_2 \rightarrow S_1$. Konwersja wewnętrzna (IC) jest przejściem bezpromieniowym o jednakowej krotności [4].



Rys. 5. Diagram Jabłońskiego przedstawiający uproszczony układ poziomów elektronowo-oscylacyjnych singletowych (S) i tripletowych (T) cząsteczki. Strzałki ciągłe ilustrują przejścia promieniste związane z absorpcją (A) oraz emisją fluorescencji (F) i fosforescencji (P); strzałki przerywane odzwierciedlają procesy bezpromieniste: konwersję wewnętrzną (IC) (.....) i przejścia międzysystemowe (ISC) (- - -).[5]

Wnioski: Zaprezentowane widma absorpcji i emisji potwierdzają otrzymanie zamierzonej cząsteczki 5,10,15,20-tetrafenyloporfiryny.

Literatura:

1. N. Tsolekile, S. Nelana, O.S. Oluwafemi, Porphyrin as Diagnostic and Therapeutic Agent. *Molecules*, 24/14 (2019).
2. S. Mondal, T. Pain, K. Sahu, S. Kar, *ACS Omega*, 6/35 (2021) 22922.
3. R. Giovannetti, *The Use of Spectrophotometry UV-Vis for the Study of Porphyrins. Macro To Nano Spectroscopy*, 2012.
4. J. M. Dawlaty, S. Shivaraman, M. Chandrashekar, F. Rana, M.G. Spencer, *Appl. Phys. Lett.* 92, (2008).
5. J. Sadlej, *Spektroskopia molekularna*, WNT 2002.

WPLYW MODYFIKACJI MECHANOCHEMICZNEJ NA STRUKTURĘ I WŁAŚCIWOŚCI BIEWĘGLI Z ODPADÓW ORGANICZNYCH

B. WAWRZASZEK¹, B. CHARMAS¹, K. JEDYNAK², ¹UMCS, Wydział Chemii, Katedra Chromatografii, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin, ²Uniwersytet Jana Kochanowskiego, Instytut Chemii, Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, Ul. Uniwersytecka 7, 25-406 Kielce

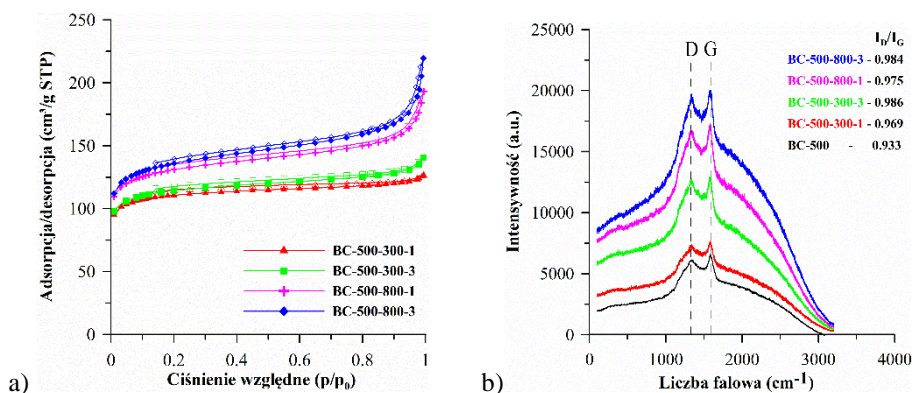
Abstrakt: Mechanochemia umożliwia rozwijanie parametrów strukturalnych biowęgli, będąc przy tym metodą prostą i niewymagającą dodatkowych odczynników chemicznych. Zmniejszenie rozmiaru cząstek, zwiększanie porowatości i wprowadzanie na powierzchnie tlenowych grup funkcyjnych poprawiają właściwości adsorpcyjne materiałów pod kątem usuwania różnego rodzaju zanieczyszczeń. W prezentowanych badaniach scharakteryzowano biowęgle z trocin drzew mieszanych poddane modyfikacji mechanochemicznej. Najwyższą powierzchnię właściwą (508,3 m²/g) charakteryzował się materiał mielony przy najwyższych parametrach procesu, co skutkowało kilkunastokrotnym wzrostem powierzchni w porównaniu do próbki wyjściowej. Wyznaczone pojemności sorpcyjne wyniosły 151,84 mg/g względem MB i 181,28 mg/g względem MO, a wartości te są porównywalne z pojemnością sorpcyjną komercyjnego węgla aktywnego A2PS.

Wprowadzenie: Działalność gospodarcza prowadzona przez człowieka ma bezpośredni wpływ stopień zanieczyszczenia środowiska, w tym również wodnego. Wykorzystywane w różnych gałęziach przemysłu chemikalia nie są obojętne dla środowiska naturalnego i mogą powodować poważne zagrożenie ze względu na swój toksyczny i mutageny charakter, a ich obecność wpływa na obniżenie jakości ekosystemów. Woda jako kluczowy składnik potrzebny do życia i funkcjonowania wszystkich organizmów żywych powinna być szczególnie chroniona, ze względu na jej ograniczone i wyczerpywalne zasoby [1]. By przeciwdziałać negatywnym skutkom działalności człowieka poszukuje się wydajnych i ekologicznych sposobów usuwania różnego rodzaju zanieczyszczeń zawartych w wodzie. Wśród wielu obecnie stosowanych metod uzdatniania wody największą popularnością cieszą się procesy adsorpcyjne, charakteryzujące się prostotą, niskim kosztem i skutecznością. Kluczowe znaczenie ma wybór odpowiedniego adsorbentu, od którego zależeć będzie efektywność adsorpcji [2]. Biowęgiel jest materiałem charakteryzującym się słabo rozwiniętą powierzchnią właściwą i strukturą porowatą, obecnością powierzchniowych tlenowych grup funkcyjnych oraz zdolnością wymiany jonów, co przekłada się na jego potencjalne zastosowanie w procesach adsorpcyjnych. Dodatkowo materiał ten jest nietoksyczny, tani w wytwarzaniu i przyjazny dla środowiska, a do jego produkcji wykorzystać można różnego rodzaju odpady organiczne [3]. By poprawić jego zdolności adsorpcyjne stosowanych jest wiele metod modyfikacji i aktywacji. Coraz powszechniej praktykowaną techniką rozwijania powierzchni właściwej i porowatości biowęgli jest modyfikacja mechanochemiczna, która nie wymaga stosowania dodatkowych odczynników chemicznych, będąc przy tym metodą tanią i powtarzalną. Pozwala na modyfikację wła-

ściwości biowęgla poprzez zwiększenie pola powierzchni, zmniejszenie rozmiaru cząstek, wprowadzenie dodatkowych powierzchniowych grup funkcyjnych oraz poprawę właściwości adsorpcyjnych i katalitycznych [4].

Część eksperymentalna: Węgłe aktywne przygotowano z mieszanych trocin drzewnych. Materiał umyto i suszono w temperaturze pokojowej przez 24h, a następnie przez 12h w suszarce w temperaturze 100°C, zmielono przy użyciu młynka i przesiano, uzyskując frakcję w zakresie 1-2 mm, którą poddano procesowi pirolizy. Pirolizę prowadzono w atmosferze gazu obojętnego (N₂, przepływ 100 ml/min) do temperatury 500°C (nagrzewanie z prędkością 10°C/min), w której nastąpił etap izotermiczny trwający 1 godz. Materiały poddano następnie modyfikacji mechanochemicznej na sucho. Proces prowadzono w planetarnym młynie kulowym (Fritsch, Pulverisette 7) przez 1 i 3 godziny, przy prędkościach 300 i 800 obr./min. W celu wyznaczenia parametrów struktury porowatej wykorzystano dane niskotemperaturowych izoterm adsorpcji/desorpcji azotu (Micromeritics ASAP 2405, USA). Strukturę krystaliczną określono na podstawie widm Ramana (mikroskop DMLM Leica Research Grade, Reflex, Renishaw, UK). Do badań składu chemicznego biowęgla wykorzystano skaningowy mikroskop elektronowy FEI Quanta 3D FEG. Chemiczny charakter powierzchni zbadano za pomocą miareczkowania potencjometrycznego metodą Boehma (716DMS Titrino, Metrohm, Szwajcaria). Zbadano również całkowite pojemności sorpcyjne względem wybranych barwników: błękitu metylenowego (MB) i oranżu metylenowego (MO).

Wyniki: Rys. 1 przedstawia izotermy adsorpcji/desorpcji N₂ dla badanych materiałów. Widoczny jest wyraźny wzrost położenia izoterm biowęgla mielonych w porównaniu z wyjściowym biowęgłem. Wszystkie izotermy należą do typu I według klasyfikacji IUPAC. Wysokie wartości adsorpcji przy niskim ciśnieniu względnym ($p/p_0 \sim 0 - 0,02$) wskazują na znaczny udział mikroporów w mielonych materiałach. Niemal równoległy przebieg izoterm względem osi ciśnień względnych w zakresie średnich i wysokich ciśnień ($p/p_0 \sim 0,2 - 0,9$) świadczy o niewielkim udziale mezoporów. Kształt izoterm dla wyjściowego biowęgla BC-500 świadczy o słabym uporządkowaniu struktury i rozwinięciu powierzchni. Dla próbek poddanych obróbce mechanochemicznej widać wyraźnie wpływ zastosowanej modyfikacji na rozwinięcie powierzchni i porowatości. Świadczy o tym wyższe położenie izoterm oraz zarejestrowane zamknięte pętle histerezy. Materiały mielone przy 800 obr./min charakteryzują się wyższymi wartościami parametrów strukturalnych niż materiały mielone przy niższych obrotach. Podobną zależność obserwuje się w przypadku wydłużenia czasu mielenia. Strukturę krystaliczną scharakteryzowano za pomocą spektroskopii Ramana. Badane biowęgłe są amorficzne a wyznaczone stosunki intensywności pasm I_D/I_G w zakresie 0,933-0,986 wskazują na występowanie defektów w strukturze materiałów. Wzrost stosunku I_D/I_G po mieleniu względem próbki wyjściowej sugeruje wzrost liczby defektów powstałych na skutek mielenia.



Rys. 1. Niskotemperaturowe izotermi adsorpcji/desorpcji azotu (a) oraz widma Ramana (b) biowęgla.

W tabeli 1 przedstawiono dane dotyczące charakterystyki strukturalnej i chemicznej otrzymanych materiałów węglowych. Powierzchnia właściwa wynosi od 29,5 do 508,3 m²/g, przy czym mikropory stanowią ponad 72% powierzchni (S_{mikro} od 345,1 do 370,7 m²/g). Największą powierzchnię właściwą otrzymano dla materiału mielonego przy wyższych obrotach i dłuższym czasie (508,3 m²/g). Wraz ze zwiększeniem parametrów procesu mielenia zauważalny jest kilkunastokrotny wzrost powierzchni właściwej materiałów względem próbki wyjściowej oraz rozwinięta mikroporowość.

Tabela 1. Charakterystyka otrzymanych biowęgla.

Nazwa próbki	S_{BET} [m ² /g]	S_{mikro} [m ² /g]	V_p [cm ³ /g]	V_{mikro} [cm ³ /g]	R_{sr} [nm]	pH	Gr. kwasowe [mgR/g]	Gr. zasadowe [mgR/g]
BC-500	29,5	-	0,023	0,016	1,56	7,23	0,10	0,31
BC-500-300-1	419,0	345,1	0,196	0,139	0,93	8,80	0,17	0,42
BC-500-300-3	430,9	343,8	0,217	0,139	1,01	8,50	0,32	0,43
BC-500-800-1	491,7	370,7	0,299	0,150	1,22	8,04	0,51	0,38
BC-500-800-3	508,3	368,9	0,340	0,149	1,34	7,47	0,85	0,46

gdzie: S_{BET} – powierzchnia właściwa, S_{mikro} – powierzchnia mikroporów, V_p – całkowita objętość porów sorpcyjnych, V_{mikro} – objętość mikroporów, R_{sr} – średni promień porów.

Wartości pH biowęgla wyznaczono na podstawie pomiarów pH ich wodnych roztworów (tabela 1). Wyniki wskazują, że materiały mają charakter lekko zasadowy. Mielenie mechanochemiczne spowodowało wzrost wartości pH do 8,8 a zwiększanie obrotów lub wydłużenie czasu mielenia wywołało zmniejszanie tych wartości. Zawartość powierzchniowych grup funkcyjnych określono za pomocą miareczkowania potencjometrycznego metodą Boehma. Biowęgla zawierają na swojej powierzchni zarówno grupy kwasowe, jak i zasadowe (tabela 1). Obserwuje się widoczny wzrost ilości grup powierzchniowych zarówno o charakterze kwasowym jak i zasadowym wywołany modyfikacją mechanochemiczną a zwiększenie intensywności mielenia (wzrost szybkości obrotów oraz wydłużenie czasu mielenia) jest proporcjonalne do wzrostu ilości grup funkcyjnych.

Analiza składu powierzchniowego EDS biowęgla (tabela 2) pokazuje, że zawartość węgla zmniejsza się po zastosowaniu modyfikacji mechanochemicznej oraz przy wydłużeniu parametrów procesu, przy jednoczesnym wzroście zawartości tlenu. Materiały zawierają w swoim składzie domieszki innych pierwiastków, których obecność spowodowana jest ich występowaniem w materiale wyjściowym.

Tabela 2. Skład pierwiastkowy (%w/w) wybranych biowęgla.

Biowęgiel	C	O	Na	Mg	Al	Si	P	S	K	Ca
BC-500	95,62	6,22	0,03	0,08	0,05	0,19	0,04	0,02	0,20	0,56
BC-500-300-1	90,48	8,67	0,03	0,06	0,06	0,18	0,03	0,02	0,11	0,37
BC-500-800-1	88,14	10,80	0,05	0,08	0,08	0,35	0,01	0,01	0,11	0,37

Testy adsorpcyjne przeprowadzono w celu wyznaczenia całkowitych pojemności sorpcyjnych. Do badań wybrano materiał o najlepiej rozwiniętej powierzchni właściwej – BC-500-800-1 oraz komercyjny węgiel aktywny A2PS. Jako zanieczyszczenie wybrano błękit metylenowy (MB) oraz oranż metylowy (MO). Wyniki wskazują, że otrzymany biowęgiel w większym stopniu adsorbował anionowy oranż metylowy, co może wynikać z pH powierzchni materiału oraz przewagi kwasowych powierzchniowych grup funkcyjnych.

Tabela 3. Całkowite pojemności sorpcyjne badanych materiałów względem błękitu metylenowego (MB) i oranżu metylowego (MO).

	q_m MB [mg/g]	q_m MO [mg/g]
BC-500-800-1	151,84	181,28
A2PS	337,73	223,59

Wnioski: Otrzymano biowęgle na bazie mieszanych trocin drzewnych i w celu rozwinięcia ich powierzchni i porowatości poddano je modyfikacji mechanochemicznej w różnych warunkach (czas i szybkość obrotów mielenia). Uzyskane wyniki wskazują, że materiały modyfikowane mechanochemicznie mają dobrze rozwiniętą powierzchnię i mikroporowaty charakter. Analiza metodą Boehma wykazała zwiększenie zawartości tlenowych powierzchniowych grup funkcyjnych pod wpływem mielenia. Wraz z zastosowaniem modyfikacji zmniejszeniu uległa zawartość węgla w materiałach, przy jednoczesnym wzroście zawartości tlenu. Osiągnięte pojemności sorpcyjne dla wybranego materiału i komercyjnego węgla aktywnego pozwalają stwierdzić, że biowęgiel poddany modyfikacji mechanochemicznej z powodzeniem może być wykorzystywany jako adsorbent barwników organicznych.

Literatura:

1. S. O. Amusat, T. G. Kebede, S. Dube, M. M. Nindi, J. Water Process Eng., 41(2021)101993.
2. S. Praveen, J. Jegan, T. Bhagavathi Pushpa, R. Gokulan, L. Bulgariu, Biochar, 4(2022)10.
3. D. Kim, G. Jung, Appl. Sci. 13(2023)4288.
4. S. C. Peterson, M. A. Jackson, S. Kim, D. E. Palmquist, Powder Technol., 228(2012)115.

SUBSTANCJE POLIMEROWE JAKO MODYFIKATORY ZDOLNOŚCI SORPCYJNYCH WĘGLA AKTYWNEGO OTRZYMANEGO ZE SKÓREK POMARAŃCZY WOBEC JONÓW METALI

S. KUKOWSKA¹, P. NOWICKI², I. KOMANIECKA³, K. SZEWCZUK-KARPISZ¹, ¹Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, ²Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań, ³UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Abstrakt: W niniejszej pracy zbadano pojemność sorpcyjną węgla aktywnego otrzymanego na drodze bezpośredniej aktywacji skórek pomarańczy (ACFM) wobec jonów miedzi(II), bez i w obecności egzopolisacharydu (EPS) oraz anionowego poliakrylamidu (AnPAM). ACFM został wytworzony w temperaturze 800°C, w muflowym piecu mikrofalowym z wykorzystaniem dwutlenku węgla jako czynnika aktywującego. Adsorbent został scharakteryzowany m. in. za pomocą niskotemperaturowej adsorpcji/desorpcji azotu, miareczkowania Boehma, miareczkowania potencjometrycznego oraz analizy elementarnej CHNS. Przeprowadzone badania wykazały, że AnPAM przyczynił się do wzrostu wielkości adsorpcji jonów miedzi(II) na powierzchni ACFM.

Wprowadzenie: Miedź (Cu) jest metalem stanowiącym mikroskładnik niezbędny do syntezy hemoglobiny i przyswajania żelaza, biorącym udział w utwardzaniu kolagenu, formowaniu kości czy metabolizmie tłuszczów. Duże stężenia miedzi stanowią jednak zagrożenie dla roślin, zwierząt i ludzi. Negatywny wpływ Cu w organizmie może przejawiać się anemią czy też zaburzeniami funkcjonowania wątroby i nerek [1, 2]. Miedź jest uwalniana do środowiska w wyniku działalności przemysłu metalurgicznego, galvanizerskiego, tekstylnego, farmaceutycznego, a także wraz z środkami ochrony roślin i nawozami [3]. W przyrodzie Cu występuje najczęściej w postaci rud i minerałów [4]. Najważniejszym czynnikiem wpływającym na dostępność fitochemiczną metali w glebach są cechy fizykochemiczne i biologiczne gleby. Należą do nich skład granulometryczny, pH, potencjał redoks, zawartość związków próchnicznych, a także obecność nawozów (zarówno naturalnych, jak i syntetycznych) [5]. W celu unieruchomienia jonów metali ciężkich i toksycznych cząsteczek, do gleb wprowadza się substancje różnego pochodzenia (nieorganiczne lub organiczne). Imobilizacja zanieczyszczeń na powierzchni tych materiałów redukuje ich biodostępność oraz zapobiega ich wymywaniu do wód powierzchniowych i gruntowych [5]. Przykładem tak wykorzystywanych materiałów nieorganicznych są: zeolity, skały osadowe [6, 7], natomiast spośród dodatków organicznych można wymienić osady ściekowe, kompost [5, 7], biowęgle i węgle aktywne [6]. Ostatnie z wymienionych można wytworzyć praktycznie z każdego materiału bogatego w węgiel organiczny, co czyni je bardzo atrakcyjnymi materiałami wykorzystywanymi w wielu dziedzinach nauki i przemysłu [8]. Prekursorami biowęgla i węgla aktywnych mogą być np. skorupy orzechów, obornik, osady ściekowe, wytloki, łuski nasion, skórki owoców i warzyw [9]. Mobilność jonów metali ciężkich w środowisku

glebowym można również ograniczyć poprzez dodatek związków polimerowych. Mogą one zmniejszać biodostępność szkodliwych pierwiastków [10], a dodatkowo stabilizować strukturę gleby, zwiększać jej odporność na erozję, a także ograniczać transport zanieczyszczeń do głębszych warstw [11]. W niniejszej pracy sprawdzono, w jaki sposób egzopolisacharyd pochodzenia bakteryjnego oraz anionowy poliakryloamid wpływają na zdolność sorpcyjną węgla aktywnego otrzymanego ze skórek pomarańczy wobec jonów miedzi(II).

Część eksperymentalna: Wysuszone skórki pomarańczy o wymiarach 3-5 mm zostały poddane bezpośredniej aktywacji w temp. 800 °C przez okres 45 minut w atmosferze dwutlenku węgla (CO₂ techniczny, Linde Gaz Polska, przepływ 250 cm³/min). Po zakończeniu próbki ACFM chłodzono w przepływie gazu obojętnego (azot techniczny, Linde Gaz Polska, przepływ 200 cm³/min). Parametry teksturalne ACFM wyznaczono metodą niskotemperaturowej adsorpcji/desorpcji azotu (sorptomat Quadrasorb SI, Quantachrome). Ładunek powierzchniowy wyznaczono za pomocą miareczkowania potencjometrycznego (Titrimo 702 SM, Metrohm), a zawartość kwasowych oraz zasadowych grup funkcyjnych określono za pomocą miareczkowania Boehma. Przeprowadzono również analizę elementarną ciała stałego (analizator CHNS, Perkin Elmer). Zdolności sorpcyjne zbadano wobec jonów miedzi(II) (analizator AAS, Analytik Jena ContrAA 800). Badania adsorpcyjne zostały przeprowadzone w temperaturze pokojowej, w pH 6, przy zastosowaniu roztworu 0,001 mol/dm³ CaCl₂ jako elektrolitu podstawowego. W celu wyznaczenia izoterm adsorpcji jonów miedzi(II) na powierzchni badanego adsorbentu do próbek Falcona dodawano 10 cm³ roztworu zawierającego odpowiednie objętości CaCl₂, jonów Cu²⁺ (zakres stężeń: 10 - 250 ppm) oraz 0,02 g adsorbentu. Źródłem jonów miedzi był CuCl₂. Po ustaleniu pH próbki wytrząsano przez 24 h. Podczas badań kinetycznych stężenie początkowe jonów Cu²⁺ wynosiło 100 ppm, a wielkości adsorpcji były mierzone po upływie od 5 do 480 minut. Substancjami polimerowymi wybranymi do badań były: egzopolisacharyd (syntezowany przez bakterie glebowe *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*) oraz anionowy poliakryloamid (syntetyczny polimer). Wpływ polimerów na wielkość adsorpcji Cu²⁺ był mierzony w układach zawierających 10 i 100 ppm substancji polimerowej oraz 50, 100 lub 250 ppm jonów miedzi(II) w pH 6.

Wyniki: W tabeli 1 przedstawiono parametry teksturalne węgla aktywnego i biomasy, z której został otrzymany. Aktywacja przyczyniła się do znacznej zmiany struktury powierzchni ciała stałego. Powierzchnia właściwa biomasy wynosiła zaledwie 8 m²/g, z kolei węgla aktywnego – 266 m²/g. Mikropory w ACFM stanowiły aż 64% objętości wszystkich porów, podczas gdy biomasa ich nie posiadała.

Tabela 1. Charakterystyka teksturalna biomasy i ACFM, gdzie: S_{BET} – powierzchnia właściwa [m²/g], D_{average} – średnia średnica porów [nm], V_{micro} – objętość mikroporów [cm³/g], V_{total} – całkowita objętość porów [cm³/g], V_{micro}/V_{total} – udział mikroporów.

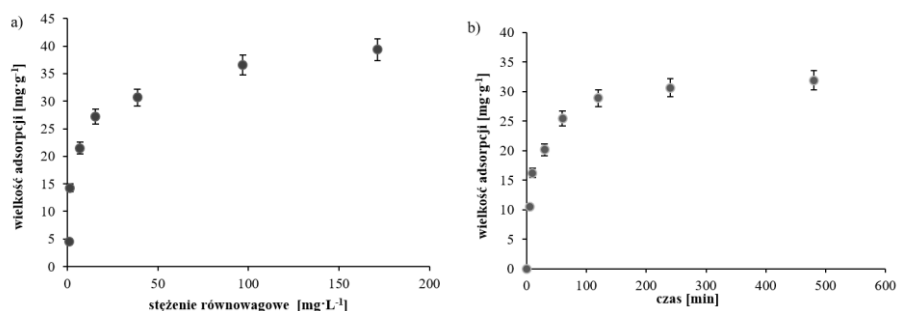
Parametr	S _{BET} [m ² /g]	D _{average} [nm]	V _{micro} [cm ³ /g]	V _{total} [cm ³ /g]	V _{micro} /V _{total}
biomasa	8	4,72	-	0,0092	-
ACFM	266	2,33	0,1	0,1552	0,64

Miareczkowanie potencjometryczne wykazało, że punkt zerowego ładunku powierzchniowego ACFM wynosi ok. 10. Parametr ten w przypadku biomasy wynosił ok 4,5. Oznacza to, że w pH 6, w którym prowadzone były badania adsorpcyjne, powierzchnia ACFM ma ładunek dodatni (+26,24 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$), natomiast w przypadku biomasy ujemny. Piroliza połączona z aktywacją skórek pomarańczy przyczyniła się również do całkowitej zmiany charakteru chemicznego materiału. Na powierzchni biomasy przeważały grupy kwasowe, natomiast na powierzchni ACFM wszystkie grupy funkcyjne miały charakter zasadowy (Tabela 2). Aktywacja biomasy spowodowała również obniżenie zawartości polarnych grup funkcyjnych (o czym świadczą niższe wartości parametru O:C) oraz wzrost aromatyczności i hydrofobowości (na co wskazują niższe wartości parametrów H:C i (O+N):C) (Tabela 2).

Tabela 2. Chemiczny charakter skórek pomarańczy i węgla aktywnego z niej otrzymanych.

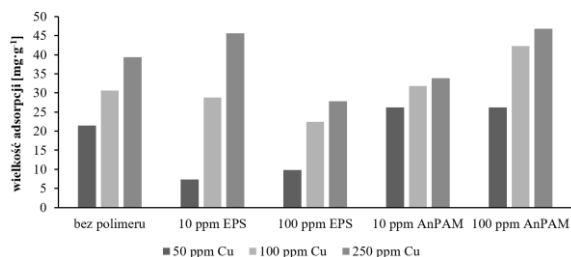
Adsorbent	Grupy funkcyjne [mmol/g]			pH wyciągu wodnego	pH _{pzc}	H:C	O:C	(O+N):C
	kwasowe	zasadowe	suma					
biomasa	1,904	0,299	2,203	4,5	4,5	0,14	1,14	1,16
ACFM	0,000	2,243	2,243	10,3	10,1	0,01	0,25	0,29

Rysunek 1 przedstawia uzyskaną izotermę i kinetykę adsorpcji jonów miedzi(II) na powierzchni ACFM. Pomimo dodatniego ładunku powierzchniowego badanego materiału zaobserwowano adsorpcję kationów miedzi na jego powierzchni. Ważną rolę w procesie adsorpcji mogły pełnić mechanizmy, takie jak wymiana jonowa i kompleksowanie powierzchniowe. Wielkość adsorpcji jonów Cu(II) wynosiła 30,66 mg/g przy ich stężeniu początkowym równym 100 ppm. Równowaga w układzie została osiągnięta po około 240 min.



Rys. 1. Izoterma (a) oraz kinetyka (b) adsorpcji jonów miedzi(II) na cząstkach ACFM w pH 6.

Przeprowadzone pomiary wykazały również, że AnPAM zaaplikowany zarówno w stężeniu 10 ppm, jak i 100 ppm, przyczynił się do adsorpcji większej ilości jonów Cu(II) na powierzchni ACFM (Rys. 2). Największy wzrost wielkości adsorpcji jonów miedzi(II) zaobserwowano dla układu z 100 ppm AnPAM (wzrost z 30,66 do 46,79 mg/g). W przypadku EPS nie odnotowano wzrostu adsorpcji miedzi w większości układów, co mogło być spowodowane tym, że EPS zajął miejsca aktywne na powierzchni węgla aktywnego, utrudniając w ten sposób adsorpcję jonów metalu.



Rys. 2. Wpływ egzopolisacharydu i anionowego poliakryloamidu na adsorcję jonów miedzi(II) na węglu aktywnym w pH 6.

Przeprowadzone badania nad kompleksowaniem jonów Cu(II) przez makrocząsteczki EPS i AnPAM potwierdziły, że łańcuchy polimerowe wiążą jony tego metalu ciężkiego (Tabela 3).

Tabela 3. Kompleksowanie jonów miedzi(II) przez EPS oraz AnPAM.

stężenie początkowe Cu(II) [ppm]	ilość Cu(II) skompleksowanych przez polimer [ppm]			
	EPS 10 ppm	EPS 100 ppm	AnPAM 10 ppm	AnPAM 100 ppm
50	2,86	1,14	6,00	16,14
100	8,29	0,29	12,57	15,57
250	32,86	23,43	30,57	35,57

Powstałe kompleksy były adsorbowane na powierzchni ACFM wraz z nieskompleksowanymi jonami Cu(II).

Wnioski: Przeprowadzane prace doświadczalne wykazały, że dodatek anionowego poliakryloamidu zwiększa wielkość adsorpcji jonów miedzi(II) na powierzchni węgla aktywnego ze skórek pomarańczy. Makrocząsteczki polimeru wiążą miedź tworząc z nim kompleksy Cu(II)-AnPAM, co wzmacnia immobilizację metalu ciężkiego. W rezultacie biodostępność miedzi(II) zmniejsza się. Tak silny efekt nie został zaobserwowany dla egzopolisacharydu. Wzrost adsorpcji jonów metalu w obecności EPS był widoczny tylko w jednym z badanych układów.

Badania zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki (2021/41/B/NZ9/03059).

Literatura:

1. D. Kondej, Bezpieczeństwo Pracy: nauka i praktyka, 2 (2007) 25.
2. M. Jagodzińska i in. Autobusy–Technika, Eksploatacja, Systemy Transportowe, 231(6) (2019) 68.
3. Q. Feng, W. Yang, S. Wen i in., Int. J. Min. Sci. Technol., 32 (2022) 1351.
4. A. Jancewicz, U. Dmitruk, B. Taboryska, Antropogeniczne oddziaływania i ich wpływ na środowisko wodne, Instytut Meteorologii i Gospodarki Wodnej, Warszawa 2009.
5. E. Ociepa, A. Ociepa-Kubicka i in. Rocznik Ochrona Środowiska, 15 (2013) 1772.
6. S. M. Shaheen, C. D. Tsadilas, J. Rinklebe, J Plant Nutr Soil Sc, 178(1) (2015) 112.
7. M. Jamal Khan, D. L. Jones, J Plant Nutr Soil Sc, 171(6) (2013) 908.
8. P. Paraskeva, D. Kalderis, E. Diamadopoulos, J Chem Technol Biotechnol, 83 (2008) 581.
9. A. Tomczyk, Z. Sokołowska, P. Boguta, Rev Environ Sci Biotechnol, 19 (2020) 191.
10. K. Szewczuk-Karpisz, A. Tomczyk, I. Komaniecka i in., Materials, 14(8) (2021) 1950.
11. A. R. Sepaskhah, V. Shahabizad, Biosyst eng, 106(4) (2010) 513.

WPLYW PROCESU SIECIOWANIA NA WŁAŚCIWOŚCI SORPCYJNE HYDROŻELI ALGINIANOWYCH

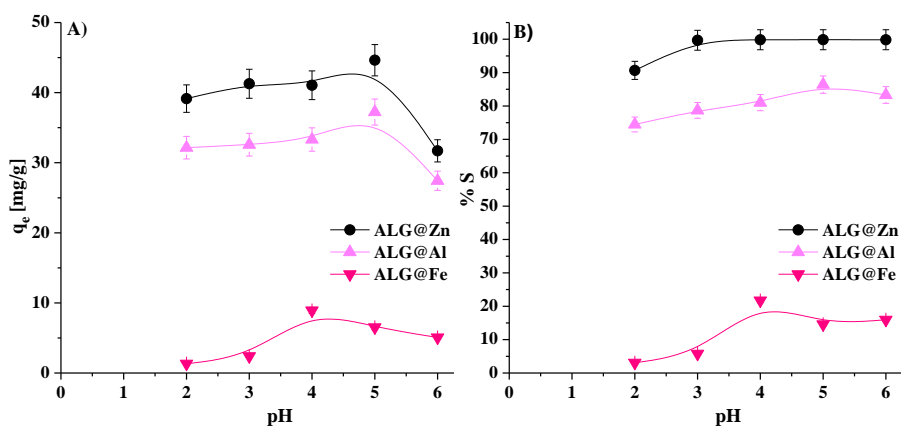
P. KRZEWSKI, D. FILA, Z. HUBICKI, UMCS, Katedra Chemii Nieorganicznej, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 2, 20-031 Lublin

Abstrakt: Zbadano zastosowanie nowo zsyntezowanych hydrożeli alginianowych ALG@Zn, ALG@Al i ALG@Fe w procesie sorpcji pierwiastków ziem rzadkich, tj. jonów Ce(III). Badania przeprowadzono metodą statyczną z modelowych roztworów wodnych. Proces sorpcji jonów Ce(III) na hydrożelach alginianowych zoptymalizowano określając wpływ parametrów takich jak wpływ pH i czasu kontaktu.

Wprowadzenie: Pierwiastki strategiczne, takie jak pierwiastki ziem rzadkich (REE), odgrywają kluczową rolę w przemyśle, zwłaszcza w produkcji zaawansowanych technologicznie materiałów. To grupa składająca się z 15 lantanowców o liczbie atomowej od 57 do 71 oraz dwóch skandowców o liczbie atomowej 21 i 39. Metale te mają bardzo podobne właściwości chemiczne i fizyczne, a ich duże pokrewieństwo geochemiczne powoduje, że tworzą one plejady z przewagą jednego z pierwiastków. Lantanowce występują w skorupie ziemskiej w znacznej ilości, jednakże ich skoncentrowanie w rudzie jest niewielkie, co wiąże się z ogromnymi kosztami wzbogacania [1]. Główne światowe gałęzie przemysłu rozwinęły silną zależność od metali ziem rzadkich. Co roku pojawiają się innowacje w sektorach, zwłaszcza z zakresu zielonej energii czy technologii komunikacyjnych, [2-3]. Bardzo często REE stosowane są w nowoczesnych technologiach, takich jak produkcja filtrów optycznych, silników elektrycznych do samochodów, barwników, luminoforów, a nawet w metalurgii jako dodatki do stopów. Ciekawostką jest to, że jeden z nowoczesnych samochodów posiada w swojej masie nawet kilkanaście kilogramów różnych metali REE [1]. Przez tak duże możliwości wykorzystania REE zwiększa się ich zapotrzebowanie, co niestety nie jest równoznaczne z dostępnością ich zasobów. Jedną z perspektyw pozyskiwania pierwiastków ziem rzadkich z roztworów wodnych jest proces sorpcji. Proces sorpcji coraz częściej jest prowadzony z wykorzystaniem adsorbentów pochodzenia naturalnego, tzw. adsorbentów typu low-cost. Jednym z nich jest alginian – surowiec pozyskiwany najczęściej z brunatnych alg. Alginian sodu jest nietoksycznym i niedrogim naturalnym polisacharydem posiadającym grupy hydroksylowe i karboksylowe, które mogą być skutecznie usieciowane jonami Ca(II), Fe(III) i Y(III) [4]. Alginian jest zwykle modyfikowany przy użyciu różnych metod w celu zwiększenia jego właściwości mechanicznych i wydajności adsorpcji. W literaturze hydrożelowe adsorbenty alginianowe zyskały znaczącą uwagę ze względu na ich wysoką zdolność adsorpcji. W niniejszej pracy określono efektywność procesu sorpcji jonów Ce(III) na hydrożelach alginianowych sieciowanych jonami Zn(II), Al(III) i Fe(III) przy różnych parametrach procesu, m.in. zbadano wpływ pH i czas kontaktu roztwór metalu-sorbent.

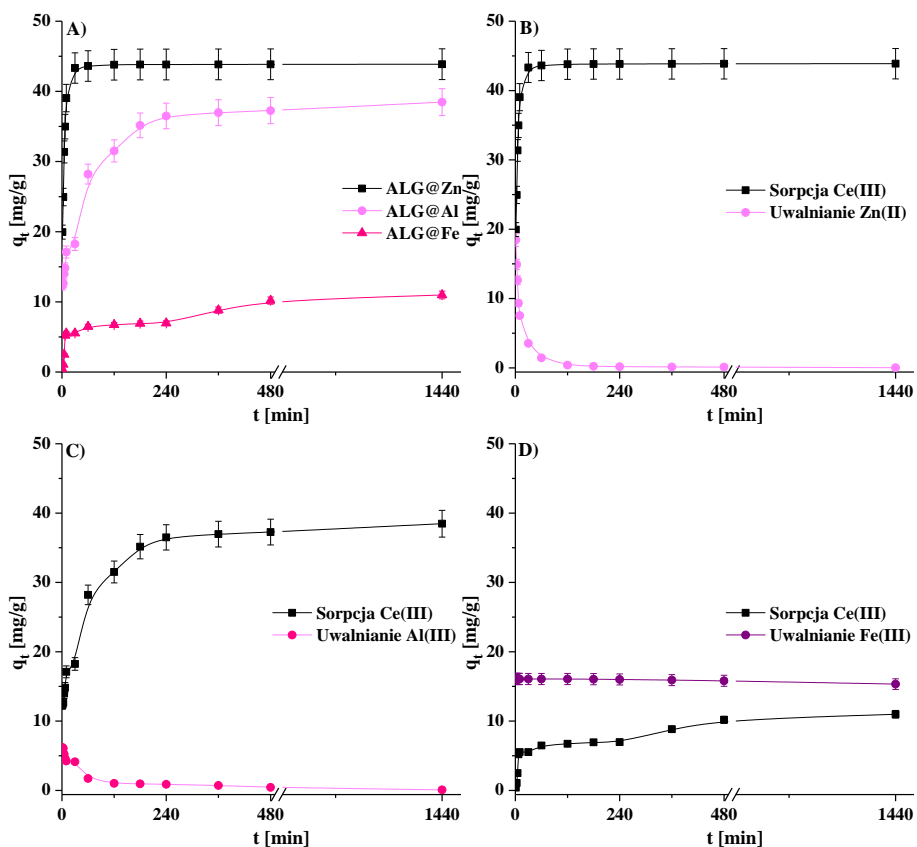
Część eksperymentalna: Przygotowane hydrożele alginianowe ALG@Zn, ALG@Al i ALG@Fe poddano wstępnym badaniom sorpcji jonów Ce(III) metodą statyczną stosując następujące parametry procesu: $C_0 = 100 \text{ mg/dm}^3$, $T = 293 \text{ K}$, $m = 0,05 \text{ g}$, $V = 20 \text{ cm}^3$ i $t = 480 \text{ minut}$. Badania wpływu pH roztworu przeprowadzono w zakresie $\text{pH} = 2\text{--}6$, zaś wpływ czasu oddziaływania jon metalu-sorbent w $t = 1\text{--}1440 \text{ minut}$. Stężenie jonów Ce(III) po procesie sorpcji określono stosując spektrometr ICP-OES, tj. optyczny spektrometr emisyjny z plazmą wzbudzoną indukcyjnie.

Wyniki: Rysunek 1 przedstawia wstępne wyniki badań sorpcji jonów Ce(III) na hydrożelach alginianowych dotyczące wpływu pH na pojemność sorpcyjną (q_e) oraz na procent sorpcji %S.



Rys.1. Wyniki sorpcji jonów Ce(III) na hydrożelach alginianowych. Wpływ pH roztworu na: A) pojemność sorpcyjną, B) procent sorpcji.

Wstępne badania miały na celu sprawdzenie jak pH roztworu ma wpływ na pojemność sorpcyjną (q_e) i procent sorpcji (%S). Stosując roztwór jonów Ce(III) o stężeniu początkowym 100 mg/dm^3 maksymalna pojemność sorpcyjna dla ALG@Zn wyniosła $45,05 \text{ mg/g}$ przy pH równym 5, dla ALG@Al $37,23 \text{ mg/g}$ przy pH równym 5 oraz dla ALG@Fe $8,92 \text{ mg/g}$ przy pH równym 4 (rys.1A). Wartości %S na hydrożelach alginianowych w zakresie pH 2-6 zmieniały się następująco: 90,67-99,85% dla ALG@Zn, 74,47-83,30% dla ALG@Al oraz 3,07-15,95% dla ALG@Fe (rys.1B). Zmiana pH miała istotny wpływ na pojemność sorpcyjną oraz procent sorpcji. Wykazano, że sorbenty ALG@Zn i ALG@Al są efektywne w szerokim zakresie pH , podczas gdy sorbent ALG@Fe charakteryzował się najniższą zdolnością sorpcyjną a maksymalne właściwości sorpcyjne wykazał przy pH równym 4. Rodzaj środka sieciującego miał istotny wpływ na strukturę żelu alginianowego a w konsekwencji na jego właściwości sorpcyjne. W dalszym etapie badań zbadano wpływ czasu oddziaływania roztwór metalu-sorbent na wydajność adsorpcji (rys.2A) oraz możliwość uwalniania jonów sieciujących ze struktury hydrożeli alginianowych (rys.2B-D).



Rys.2. Wyniki sorpcji jonów Ce(III) na hydrożelach alginianowych. A) wpływ czasu oddziaływania metal-sorbent. B-D) wpływ czasu oddziaływania na uwalnianie jonów Zn(II), Al(III) i Fe(III).

Czas kontaktu roztwór metalu-sorbent miał istotny wpływ na efektywność adsorpcji jonów Ce(III). Wartości q_t rosły wraz ze wzrostem czasu kontaktu faz roztwór metalu-sorbent aż do ustalenia się stanu równowagi. Czas ten znacząco się różnił, gdy zastosowano różne czynniki sieciujące alginian, tj. Zn(II), Al(III) i Fe(III). W przypadku Alg@Zn równowagę procesu sorpcji osiągnięto po 30 minutach, dla ALG@Al po 240 minutach, zaś dla ALG@Fe po 360 minutach. Wydłużanie czasu kontaktu faz od 480 minut nie prowadziło do znaczącego wzrostu efektywności adsorpcji. Największe wartości pojemności sorpcyjnej odnotowano dla ALG@Zn i ALG@Al, a najniższe dla ALG@Fe, które wynosiły odpowiednio: 43,87 mg/g, 38,47 mg/g i 10,98 mg/g. Zaobserwowano również, że podczas sorpcji jonów Ce(III) wraz ze wzrostem czasu kontaktu faz miało miejsce równoczesne uwalnianie jonów Zn(II) oraz Al(III) ze struktury hydrożelu alginianowego. Dla ALG@Fe zaobserwowano nieznaczące uwalnianie jonów Fe(III) w trakcie sorpcji jonów Ce(III), co było spowodowane niskimi wartościami sorpcji. Z powyższych zależności wynika, że głównym mechanizmem procesu sorpcji jest wymiana jonowa. W celu zbadania kinetyki procesu sorpcji jonów Ce(III) zastosowano dwa podstawowe równania modeli kinetycznych: model pseudo I rzędu (PFO) oraz model pseudo II rzędu (PSO). Wyniki przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Parametry kinetyczne dla sorpcji jonów Ce(III) przez hydrożele alginianowe sieciowane jonami Zn^{2+} , Al^{3+} i Fe^{3+} ($C_0=100\text{ mg/dm}^3$).

Model	Parametr	Jednostka	ALG@Zn	ALG@Al	ALG@Fe
	q_{exp}	[mg/g]	43,87	38,47	10,98
PFO	q_1	[mg/g]	3,80	20,94	7,60
	$k_1 \times 10^{-2}$	[1/min]	0,015	0,007	0,004
	R^2	-	0,712	0,913	0,864
PSO	q_2	[mg/g]	43,92	38,81	11,11
	$k_2 \times 10^{-2}$	[g/mg·min]	0,0223	0,0016	0,0011
	h	[mg/g·min]	43,05	2,40	0,22
	R^2	-	1,000	1,000	0,989

Przyjmując za podstawowe kryterium wartości współczynnika korelacji uzyskane w przypadku zlinearyzowanych form równań pseudo I i II rzędu można stwierdzić, że adsorpcja jonów Ce(III) na hydrożelach alginianowych sieciowanych jonami Zn(II), Al(III) i Fe(III) zachodziła zgodnie z modelem pseudo II rzędu, co obrazują większe wartości współczynnika $R^2 > 0,989$.

Wnioski: W ramach badań opracowano metodę otrzymywania hydrożeli alginianowych do usuwania jonów Ce(III) z fazy wodnej. Stosując roztwór jonów Ce(III) o stężeniu początkowym 100 mg/dm^3 najwyższą pojemność sorpcyjną otrzymano dla ALG-Zn przy pH równym 5 wynoszącą $45,05\text{ mg/g}$. Proces sorpcji jonów Ce(III) przebiegał najefektywniej na hydrożelach alginianowych sieciowanych jonami cynku(II) (ALG@Zn) w zakresie pH 2-6 i wynosił 90,67-99,85%. Najbardziej obiecującym hydrożelem alginianowym do sorpcji jonów Ce(III) z roztworów wodnych okazał się ALG@Zn, na co wskazują uzyskane wysokie wartości pojemności sorpcyjnych oraz korzystna kinetyka sorpcji.

Badania zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki zgodnie z decyzją nr 2019/35/N/ST8/01390.

Literatura:

1. K. Podbiera-Matysiak, K. Gorazda, Z. Wzorek, Czasopismo techniczne, Chemia, Wydawnictwo Politechniki Krakowskiej im. Tadeusza Kościuszki, 109 (2012) 147.
2. L. M. Wang, Q. Lin, L. J. Yue, L. Liu, F. Guo, F. M. Wang, J. Alloys Compound., 451 (2008) 534.
3. S. Zhang, S. E. Saji, Z. Yin, H. Zhang, Y. Du, C. H. Yan, Adv. Mater., 33 (2021) 2005988.
4. S. Suresh, S. Ravichandran, I. Pandya, S.S.S. Mole, S.R.B. Prabhu, G.K. Prashanth, Asian J. Chem., 34 (2022) 1625.

WYKORZYSTANIE SYNCHROTRONU W BADANIACH KOMPLEKSÓW URANU I TORU Z LIGANDAMI ZAWIERAJĄCYMI FOSFOR NA RÓŻNYCH STOPNIACH UTLENIEŃ

M. GRZELKA¹, E. GRABIAS-BLICHAZ², B. PŁASKA³, M. MAJDAN¹,
A. MAXIMENKO⁴, A. GŁADYSZ-PŁASKA¹, ¹UMCS, Wydział Chemii, Katedra
Chemii Nieorganicznej, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 2, 20-031 Lublin, ²Uniwersytet
Medyczny w Lublinie, Wydział Farmaceutyczny ul. Chodźki 1 (Collegium Universum)
Lublin 20-093, ³Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Wydział Lekarsko-Dentystyczny
al. Raławickie 1 Lublin 20-059, ⁴Narodowe Centrum Promieniowania Synchrotrono-
wego Solaris ul. Czerwone Maki 98 30-392 Kraków

Abstrakt: Uran, a w przyszłości tor są i będą jednymi z ważniejszych źródeł energii na świecie, dlatego też prowadzone są badania nad zastosowaniem różnych metod wydobywania uranu i toru z rud oraz neutralizacji ścieków z elektrowni jądrowych i kopalni uranu. Związki pierwiastków takich jak uran czy tor powinny być usuwane, ze względu na ich toksyczność dla organizmów żywych. W tym celu można stosować różne metody, takie jak: ekstrakcja ciecz-ciecz [1], ekstrakcja ciecz-ciało stałe [2-3], adsorpcja. Przedstawione wyniki dotyczą analizy widm XANES U(VI) i Th(IV) w krzemionce i zeolicie NaX, które zmodyfikowano ekstrahentami: kwasem fosfonowym (H_3PO_3) oraz kwasem di(2-ethylhexyl) fosforowym. Adsorbenty te, można potencjalnie wykorzystać do oczyszczania ścieków uranowych i torowych oraz ekstrakcji uranu z wody morskiej.

Wprowadzenie: W przedstawionych badaniach zastosowano synchrotron SOLARIS znajdujący się w Krakowie. Synchrotronem nazywamy urządzenie, w którym przyśpieszane elektrony poruszają się w okręgu. Osiągają one w przybliżeniu prędkość światła w próżni. Elektrony naturalnie przemieszczają się w linii prostej, dlatego aby poruszały się po okręgu o średnicy 30m wykorzystano elektromagnesy. Elektromagnesy generują olbrzymie pole elektromagnetyczne, które zakrzywia tor ruchu elektronów; w tym momencie powstaje promieniowanie zwane światłem synchrotronowym. Ma ono szczególne właściwości; jego intensywność jest milion razy większa od światła na powierzchni Ziemi. Składa się z fal elektromagnetycznych od podczerwieni aż do promieniowania rentgenowskiego. Największą zaletą synchrotronu jest możliwość jednoczesnego wykonywania badań, na odrębnych liniach badawczych w różnych dziedzinach nauki. W Solarisie w skład pierścienia wchodzi 12 elektromagnesów, co daje taką samą ilość źródeł promieniowania i jednocześnie umożliwia powstanie 12 osobnych linii badawczych; na dzień dzisiejszy w użytku znajduje się siedem linii a trzy kolejne są w budowie [4-6]. Linię badawczą ASTRA – Absorption Spectroscopy beamline for Tender Energy Range and Above – dedykuje się absorpcyjnej spektroskopii rentgenowskiej oraz pokrewnym technikom. W tej metodzie dostępny zakres energii fotonów mieści się w przedziale od 1 do 15 keV, znanym jako „tender energy range”. Tak zaprojektowane urządzenie umożliwia pomiary:

- na krawędzi absorpcji K pierwiastków takich jak magnez, glin, krzem, siarka czy fosfor,

- krawędzi K cięższych pierwiastków od sodu aż do selenu,
- krawędzi L pierwiastków od kryptonu do bizmutu,
- krawędzi M niektórych pierwiastków w tym uranu i toru.

XAS jest stosowana dla różnych materiałów: krystalicznych jak i amorficznych w fazie gazowej, ciekłej czy stałej. Znalazła zastosowanie w dziedzinach takich jak materiałoznawstwo, chemia, biomedycyna, ochrona środowiska [5,7].



Rys. 1. Schemat synchrotronu SOLARIS z zaznaczonymi liniami badawczymi.

Część eksperymentalna: Wykorzystano podstawowe sorbenty jakimi są krzemionka SiO_2 oraz glinokrzemian NaX . W celu modyfikacji powierzchni adsorbentów użyto dwóch ligandów, zawierających jony fosforu na różnych stopniach utlenienia: P(III) i P(V). Jako ligand pierwszy L1 wykorzystano kwas fosforowy(III) H_3PO_3 , natomiast ligand drugi L2 to kwas di(2-ethylhexyl) fosforowy HDEHP. Występowanie jonów fosforu w strukturze adsorbentu umożliwiło wykonywanie selektywnych i skutecznych sorpcji uranu oraz toru. Ze względu na różny stan skupienia ligandów jak i sorbentów, modyfikacje wykonano różnymi metodami.

1. W metodzie zol-żel użyto tetraetoksyilanu (TEOSu) i wody w odpowiednich proporcjach. Zawartość zlewki zakwaszono kwasem chlorowodorowym, następnie dodano odpowiedni ligand i umieszczono na mieszadło magnetycznym na okres 1h. Po zakończeniu reakcji klarowną ciecz przelano do szalek i pozostawiono do krystalizacji. Otrzymane kryształy zhomogenizowano w moździerzu. Tą metodą otrzymano sorbenty: $\text{SiO}_2 + \text{L1}$; $\text{SiO}_2 + \text{L2}$.

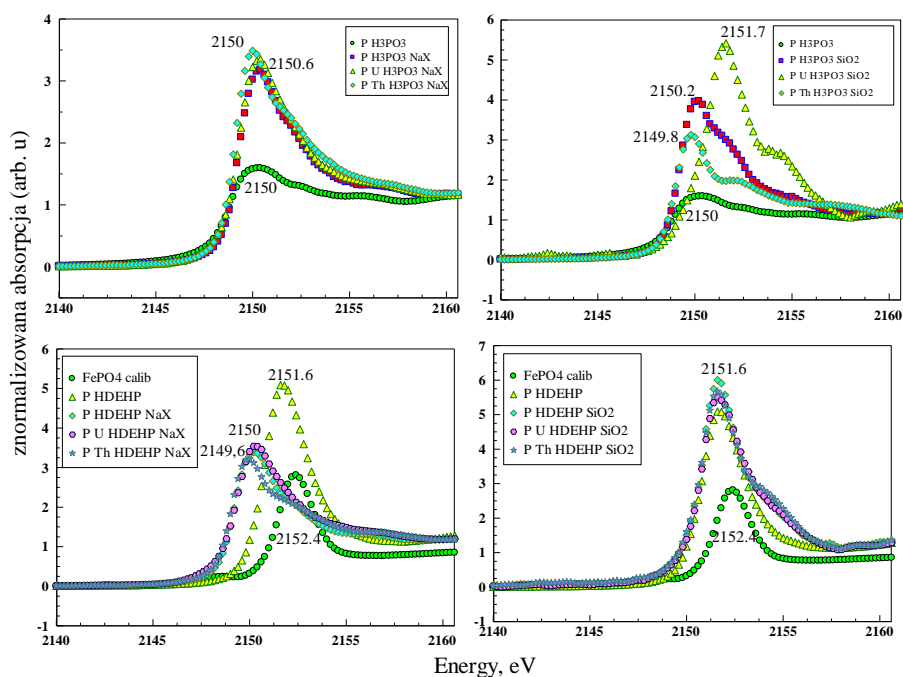
2. Metoda mechaniczna polega na umieszczeniu sorbentu wraz z ligandem w moździerzu. Zawartość należy powtarzalnie ucierać przez 30 minut. Sorbenty otrzymane tą metodą to: $\text{NaX} + \text{L1}$; $\text{NaX} + \text{L2}$.

Gotowe sorbenty wysycono związkami uranu lub toru. W tym celu przygotowano po 20 ml roztworów azotan(V) toru oraz octanu uranylu o stężeniach $0,02\text{mol}/\text{dm}^3$. Próbkę kontaktowano na wytrząsarce przez okres 1h. Sorbenty przesączono i wysuszono w temperaturze pokojowej. Odpowiednio zabezpieczone próbki przetransportowano do Centrum Promieniowania Synchrotronowego „Solaris” w Krakowie. W laboratorium „Solaris” materiał pomiarowy został umieszczony na specjalnych płytkach (Rys. 2) i tak otrzymano próbki do pomiarów synchrotronowych.



Rys. 2. Próbką umieszczona na płytce pomiarowej.

Wyniki: Zarejestrowano widma XAS fosforu w próbkach krzemionki i zeolitu NaX modyfikowanych ligandami: H_3PO_3 oraz HDEHP z zaadsorbowanymi jonami uranu bądź toru. Porównano je z widmami otrzymanymi dla próbek bez toru i uranu oraz samych ligandów. Jako materiał referencyjny zastosowano $FePO_4$. Otrzymane widma przedstawione zostały na rysunku 3.



Rys. 3. Widma XAS dla fosforu w próbkach ligandów i sorbentów: SiO_2 i NaX.

Wnioski: Analiza widm XAS fosforu (Rys. 3) pozwala na stwierdzenie, że fosfor występuje na +III stopniu utlenienia zarówno w ligandzie H_3PO_3 , w kompleksie sorpcyjnym H_3PO_3 (NaX), jak i w kompleksach sorpcyjnych U(VI) i Th(IV) na powierzchni NaX (maksima absorpcji 2150, 2150,6 eV). W przypadku SiO_2 maksimum przy 2151,7 eV odpowiada prawdopodobnie utworzeniu wiązania donorowego $-P=O \rightarrow UO_2^{2+}$ w kompleksie sorpcyjnym U(VI) z H_3PO_3 . Zastanawiające jest to, że maksimum absorp-

cji wynoszące 2149,8, odpowiadające kompleksowi sorpcyjnemu Th(IV) z H_3PO_3 , tak bardzo różni się od maksimum sorpcji kompleksu U(VI) (maksimum 2151,7 eV). Może to być spowodowane zupełnie innym mechanizmem kompleksowania, z większym udziałem wymiany protonów w H_3PO_3 na jony Th^{4+} i mniejszym udziałem tlenu fosforowego P=O w kompleksowaniu jonów Th^{4+} w porównaniu do jonów UO_2^{2+} . Z kolei maksimum przy 2150,2 eV odpowiadające P w kompleksie sorpcyjnym H_3PO_3 na SiO_2 jest bliskie maksimum dla wolnego liganda H_3PO_3 . Pasma 2152,6 w próbkach referencyjnych: FePO_4 odpowiadają P(V). Przesunięcie tego pasma do 2151,8 eV w ligandzie HDEHP (kwas di(2-ethylhexyl) fosforowy) wynika z faktu, że grupy 2-etyloheksylowe są typowymi grupami alkilowymi, które „odpychają elektrony” (grupy dostarczające elektrony) do grup fosforanowych HDEHP. Gęstość elektronów na atomach P wzrasta, w efekcie czego obserwujemy przesunięcie pasm absorpcji w stronę niższych energii. Pasma 2150 eV odpowiada P w kompleksie sorpcyjnym U(VI) i Th(IV) z ligandem HDEHP, a także P w ligandzie HDEHP zaadsorbowanym na NaX. Prawdopodobnie tworzy się wiązanie -P-O-Al-, czyli wiązanie atomów P liganda z grupami aluminolowymi zeolitu NaX [8, 9]. Wzrasta gęstość elektronów na atomach P i stąd obserwowany jest efekt przesunięcia pasma w kierunku niskich energii, niezauważalny w przypadku sorpcji na SiO_2 (pasmo 2151,6 eV), gdzie nie ma grup aluminolowych HO-Al≡. Porównanie widm próbek U i Th z widmami referencyjnymi pokazuje, że U(VI) i Th(IV) są obecne we wszystkich próbkach.

Literatura:

1. A.M. Wilson, P.J. Bailey, P.A. Tasker, J.R. Turkington, R.A. Grant, J.B. Love, Chem. Soc. Rev., 43 (2014) 123.
2. D. Zhang, L. Fang, L. Liu, B. Zhao, B. Hu, S. Yu, X. Wang, Sep. Purif. Technol., 320 (2023) 124204.
3. Y. Peled, D. Shamir, V. Marks, H. Kornweitz, Y. Albo, E. Yakhin, D. Meyerstein, A. Burg, J. Environ. Chem. Eng., 10 (2022) 108142.
4. <https://synchrotron.uj.edu.pl/dla-gosci-i-mediow/solaris-w-pigulce> [dostęp 25-02-2024].
5. <https://synchrotron.uj.edu.pl/faq> [dostęp 25-02-2024].
6. S. Calvin „XAFS for Everyone” CRC Press, Boca Raton 2013.
7. <https://synchrotron.uj.edu.pl/linie-badawcze/astra> [dostęp 25-02-2024].
8. I. Persson, W. Klysubun, D. Lundberg, J. Molec. Struct., 1179 (2019) 608.
9. Y. Huang, X. Dong, M. Li, M. Zhang, Y. Yu, RSC Adv., 4 (2014) 14573.

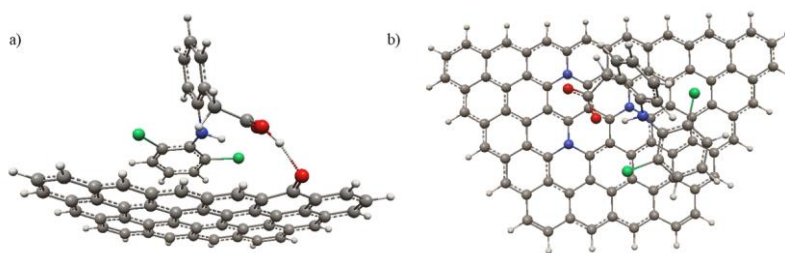
ADSORPCJA WYBRANYCH FARMACEUTYKÓW NA FUNKCJONALIZOWANYCH POWIERZCHNIACH GRAFENOWYCH

K. KOWALSKA¹, M. BARCZAK¹, T.J. BANDOSZ², P. BOROWSKI¹, ¹UMCS, Wydział Chemii, Katedra Chemii Teoretycznej, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin, ²Department of Chemistry and Biochemistry, The City College of New York, 160 Convent Avenue, New York, NY, 10031, USA

Abstrakt: Zanieczyszczenia wody są istotnym problemem współczesnego świata. W ostatnich latach badania skupiają się wokół zanieczyszczeń wód spowodowanych obecnością farmaceutyków, np. niesteroidowych leków przeciwzapalnych, antybiotyków. Jest to istotny problem, ponieważ konsumpcja tego rodzaju produktów ciągle rośnie, a to stanowi zagrożenie nie tylko dla środowiska. W ramach przeprowadzonych badań podjęto próbę analizy oddziaływań wybranych farmaceutyków (diklofenaku, karbamazepiny oraz sulfametoksazolu) na funkcjonalizowanych powierzchniach grafenowych w oparciu o eksperyment *in silico* z wykorzystaniem metody obliczeniowej DFT.

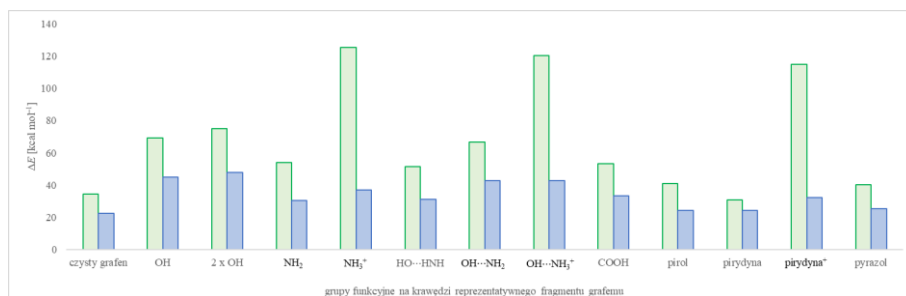
Wprowadzenie: Nieustanny rozwój farmaceutyki związany jest z coraz większym zapotrzebowaniem na produkty lecznicze nie tylko w odniesieniu do chorób somatycznych, ale również tych związanych z zaburzeniami psychicznymi. Regularny w ostatnich latach wzrost popytu na różnego rodzaju farmaceutyki odzwierciedla się w ogromnych przychodach firm farmaceutycznych [1]. Ciągła potrzeba poprawy jakości i komfortu życia wywiera również widoczny wpływ na środowisko. W ostatnich latach uwaga naukowców skupia się wokół wpływu farmaceutyków na środowisko naturalne – prowadzone badania pokazują, że są one obecne nie tylko w ściekach, ale także wykrywane w wodach gruntowych i powierzchniowych w różnych formach [2]. Należy podkreślić, że część substancji nie jest całkowicie wchłaniane przez organizm, co więcej niska świadomość społeczna związana z utylizacją tego rodzaju produktów również przyczynia do wzrostu ich zawartości w wodach [2]. Oczywiście nie są to jedyne źródła wprowadzające wspomniane substancje do środowiska. Jednakże konsekwencje wynikające z obecności farmaceutyków są realne, m.in. lekooporność, czy też zaburzenia rozwoju flory i fauny [3]. Za zanieczyszczenia wód odpowiedzialne są m.in. niesteroidowe leki przeciwzapalne, antybiotyki, leki psychotropowe, czy też hormony. Analizując dostępną literaturę widać wyraźnie, że opis tego zagadnienia skupia się wokół badań eksperymentalnych (np. [4,5]); dostępnych jest natomiast niewiele prac teoretycznych z tego zakresu (np. [6]). W ramach tej tematyki przeprowadzono badania teoretyczne nad adsorpcją diklofenaku na funkcjonalizowanych powierzchniach grafenowych, co stanowi istotne uzupełnienie dotychczasowej wiedzy z tego zakresu. Diklofenak należy do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Występuje najczęściej w formie soli sodowej, która charakteryzuje się dobrą rozpuszczalnością i łatwością przyswajania przez organizm [6]. Obecnie trwają również badania teoretyczne nad oddziaływaniami innych farmaceutyków z powierzchniami grafenowymi, m.in. karbamazepiny i sulfametoksazolu [4], co pozwoli na bardziej dokładny opis mechanizmów ich adsorpcji z zanieczyszczonych wód.

Część obliczeniowa: Wszystkie obliczenia przeprowadzono na poziomie teorii DFT/B3LYP [7] z bazą funkcyjną 6-311++G** [8] stosując metodę reprezentatywnego fragmentu (Rys.1a) [9]. Ze względu na strukturę analizowanego farmaceutyku w obliczeniach uwzględniono występowanie oddziaływań natury dyspersyjnej poprzez wprowadzenie tzw. poprawki Grimma [10]. Oczywiście kwestią pozostaje uwzględnienie efektu rozpuszczalnika (wody) poprzez zastosowaniem tzw. ciągłego polaryzowalnego modelu rozpuszczalnika (PCM, ang. *Polarizable Continuum Model* [11]). W trakcie badań teoretycznych uwzględniono szereg grup funkcyjnych przyłączonych do krawędzi powierzchni grafenowej [9] zawierających w swojej strukturze atomy tlenu i azotu np. grupę hydroksylovą, aminową, czy też karboksylovą. Również rozważono układy, w których grupy funkcyjne znajdują się w bezpośrednim sąsiedztwie grupy hydroksyloviej w celu zbadania kooperatywnego charakteru wiązań wodorowych [12]. Modyfikacja krawędzi grafenu także obejmowała wprowadzenie protonowanych grup funkcyjnych (aminowej oraz pirydynowej) ze względu na pH prowadzonych badań eksperymentalnych. Przeprowadzone badania teoretyczne również uwzględniają obecność defektów w strukturze grafenu w postaci czwartorzędowych atomów azotu (Rys. 1b).



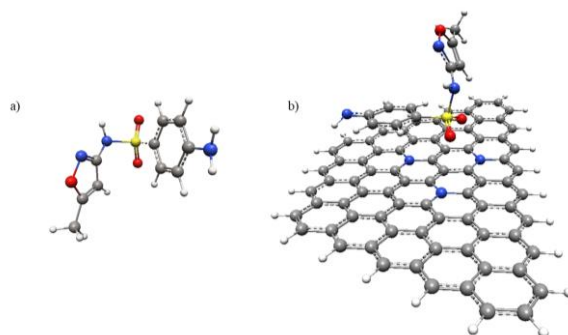
Rys. 1. Kompleks anionu diklofenaku z reprezentatywnym fragmentem powierzchni grafenowej a) funkcjonalizowanej grupą hydroksylovą, b) zawierającej defekty w postaci trzech czwartorzędowych atomów azotu.

Wyniki: Wyniki przeprowadzonych badań teoretycznych przedstawiono na Rys. 2. Na podstawie uzyskanych danych można zauważyć, że wyższe wartości energii stabilizacji uzyskano dla układów nieuwzględniających obecności rozpuszczalnika (oznaczonych na Rys. 2 kolorem zielonym). Włączenie do obliczeń rozpuszczalnika (dane oznaczone kolorem niebieskim na Rys. 2) dla większości układów powoduje spadek energii stabilizacji o ponad 35%. Największy efekt związany z obecnością rozpuszczalnika odnotowano dla układów z protonowanymi grupami funkcyjnymi w strukturze grafenu, dla których energie stabilizacji uległy obniżeniu nawet o ponad 65%.



Rys. 2. Energie stabilizacji ΔE (w kcal mol⁻¹) uzyskane w wyniku adsorpcji anionu diklofenaku na reprezentatywnych fragmentach powierzchni grafenowej, czystych i funkcjonalizowanych przykładowymi grupami funkcyjnymi przyłączonymi do jego krawędzi.

W dotychczasowo prowadzonych badaniach teoretycznych [9] pokazano, że energie stabilizacji związane z adsorpcją cząsteczek wody (z fazy gazowej) na reprezentatywnym fragmencie powierzchni grafenowej są na ogół mniejsze niż 10 kcal mol⁻¹. Patrząc na uzyskane wartości energii stabilizacji związane z adsorpcją anionu diklofenaku (Rys. 2) widać, że cząsteczki wody nie będą konkurować o miejsca aktywne na powierzchni adsorbentu – w fazie gazowej uzyskane ΔE są zdecydowanie powyżej 30 kcal mol⁻¹. Uzyskane wyniki badań teoretycznych potwierdzają również kooperatywny charakter wiązań wodorowych – zaobserwowano wzrost energii stabilizacji uzyskanych kompleksów, np. wprowadzenie kolejnej grupy hydroksylowej do układu (2xOH) powoduje wzrost energii o ponad 5 kcal mol⁻¹, a tym samym uzyskanie bardziej stabilnych kompleksów. Patrząc na przykładowe struktury uzyskanych kompleksów (Rys. 1) należy pokreślić, że kluczową rolę w procesie adsorpcji mają oddziaływania dyspersyjne (duża powierzchnia kontaktu powoduje, że istotną rolę odgrywają oddziaływania typu π - π *stacking*), a grupy funkcyjne w strukturze grafenu powodują, że anion diklofenaku zbliża się właśnie w kierunku krawędzi dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym. Warto dodać, że w przypadku niektórych grup funkcyjnych zaobserwowano migrację protonu z grupy funkcyjnej do jednego z atomów tlenu grupy COO⁻ anionu diklofenaku (por. Rys. 1a), czy też migrację protonu między grupami tak jak w przypadku grupy aminowej będącej w sąsiedztwie grupy hydroksylowej. Wyniki uzyskane dla układów zawierających defekty w strukturze grafenu także potwierdzają dominującą rolę oddziaływań natury dyspersyjnej. Dodatkowo liczba atomów azotu w strukturze adsorbentu ma wpływ na stabilność uzyskanych kompleksów z anionem diklofenaku. Zwiększenie liczby czwartorzędowych atomów azotu powoduje wzrost energii stabilizacji (oddziaływania typu ładunek-dipol) – wprowadzenie do struktury grafenu kolejnych dwóch atomów azotu powoduje wzrost energii stabilizacji o ponad 5 kcal mol⁻¹. Wspomniany wzrost energii stabilizacji uzyskano również dla układów z karbamazepiną oraz sulfame-toksazolem (Rys. 3).



Rys. 3. a) Struktura cząsteczki sulfametoksazolu, b) kompleks utworzony w wyniku adsorpcji cząsteczki sulfametoksazolu na reprezentatywnym fragmencie powierzchni grafenowej zawierającej defekty w postaci trzech czwartorzędowych atomów azotu.

Wnioski: Przeprowadzone badania teoretyczne umożliwiły uzyskanie energii stabilizacji związanych z adsorpcją wybranych farmaceutyków (diklofenaku, karbamazepiny oraz sulfametoksazolu) na funkcjonalizowanych powierzchniach grafenowych. Wyniki obliczeń kwantowochemicznych pokazują, że wspomniany adsorbent może być efektywnie wykorzystywany do usuwania tego rodzaju substancji z zanieczyszczonych wód w oparciu o adsorpcję fizyczną. Dodatkowo badania teoretyczne potwierdzają kooperatywny charakter wiązań wodorowych.

Literatura:

1. O.I. González Peña, M.Á. López Zavala, H. Cabral Ruelas, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 18 (2021) 2532.
2. A. Szymonik, J. Lach, *Proceedings of ECOpole*, 7 (2013) 735.
3. T. Baus, A. Michalska, *Inżynieria i Ochrona Środowiska*, 22 (2019) 89.
4. C.B. Vidal, M. Seredych, E. Rodríguez-Castellón, R.F. Nascimento, T.J. Bandosz, *J. Colloid Interface Sci.*, 449 (2015) 180.
5. L.A. Al-Khateeb, W.Hakami, M.A. Salam, *J. Mol. Liq.*, 241 (2017) 733.
6. I.M. Jauris, C.F. Matos, C. Saucier, E.C. Lima, A.J.G. Zarbin, S.B. Fagan, F.M. Machado, I. Zanella, *Phys. Chem.*, 18 (2016) 1526.
7. A.D. Becke, *J. Chem. Phys.*, 98 (1993) 5648.
8. R. Krishnan, J.S. Binkley, R. Seeger, J.A. Pople, *J. Chem. Phys.*, 72 (1980) 650.
9. K. Kowalska, M. Barczak, D.A. Giannakoudakis, T.J. Bandosz, P. Borowski, *Carbon* 215 (2023) 118443.
10. S. Grimme, S. Ehrlich, L. Goerigk, *J. Comput. Chem.*, 32 (2011) 1456.
11. J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, *Chem. Rev.*, 105 (2005) 2999.
12. A.D. Buckingham, *Theoretical Treatments of Hydrogen Bonding*, D. Hadži, Ed., Wiley, New York 1997.

ZASTOSOWANIE WĘGLI AKTYWNYCH UZYSKANYCH Z PREKURSORÓW ROŚLINNYCH DO ADSORPCJI OLI(KWASU AKRYLOWEGO) ORAZ POLIETYLENOIMINY

M. GEĆA¹, M. WIŚNIEWSKA¹, P. NOWICKI², ¹UMCS, Wydział Chemii, Katedra Radiochemii i Chemii Środowiskowej, Pl. Marii Curie-Skłodowskiej 3, 20-031 Lublin, ²UAM, Wydział Chemii, Zakład Chemii Stosowanej, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań

Abstrakt: Łodygi pokrzywy, szalwii, melisy oraz mięty zostały zastosowane w roli prekursorów do otrzymania węgla aktywnych. Materiały te uzyskano na drodze aktywacji fizycznej z wykorzystaniem CO₂ i poddano je charakterystyce pod kątem parametrów struktury porowatej oraz właściwości powierzchniowych. Wytworzone adsorbenty wykazują dobrze rozwiniętą powierzchnię właściwą oraz odznaczają się wysoką zawartością powierzchniowych grup funkcyjnych. Węgla aktywne zostały wykorzystane do adsorpcji polimerów jonowych z układów pojedynczych i podwójnych adsorbatów. Otrzymane wyniki pozwoliły stwierdzić, że adsorbenty uzyskane z biomasy roślinnej mogą być z powodzeniem zastosowane do równoczesnego usuwania polietylenoiminy oraz poli(kwasu akrylowego) z roztworów wodnych.

Wprowadzenie: Węgla aktywne, dzięki swojej dobrze rozwiniętej powierzchni właściwej i polidispersyjnej strukturze porowatej, są często używane jako materiały adsorpcyjne. Dzięki wielu zróżnicowanym technikom ich aktywacji oraz modyfikacji mogą one być stosowane do pochłaniania różnorodnych związków chemicznych. Produkowane są głównie z drewna, węgla kamiennego i brunatnego oraz torfu [1]. Jednak ze względu na wyczerpywanie się tych prekursorów i wzrastające zanieczyszczenie środowiska, poszukiwane są alternatywne, odnawialne źródła surowców, które mogą zostać wykorzystane do produkcji węgla aktywnych. Jednym z takich źródeł są pędy roślin, które po zbiorze mogą ponownie odrosnąć, co minimalizuje negatywny wpływ na ekosystem oraz czyni je zasobem niemal niewyczerpalnym. Zróżnicowane metody aktywacji materiałów węglowych pozwalają otrzymać adsorbenty zdolne do zatrzymywania na swojej powierzchni substancji o różnym charakterze chemicznym. Jednakże w dobie ciągle rosnącego zanieczyszczenia środowiska istotne jest wdrażanie zasad zielonej chemii i ograniczanie zużycia odczynników chemicznych. Aktywacja fizyczna wykorzystująca gazy (para wodna, dwutlenek węgla) pozwala na otrzymanie węgla aktywnych o bardzo dobrze rozwiniętej powierzchni, nie powodując równocześnie produkcji ścieków chemicznych. Z tego względu można ją określić jako najbardziej przyjazną środowisku metodą otrzymywania węgla aktywnych [2]. Węglowe materiały adsorpcyjne znajdują szerokie zastosowanie jako adsorbenty jonów metali ciężkich i barwników organicznych, jednak ich potencjał w usuwaniu polimerów z roztworów wodnych jest jeszcze niedostatecznie poznany [3]. Z tego powodu prezentowane badania skupiają się na możliwości wykorzystania węgla aktywnych do redukcji zanieczyszczenia środowiska spowodowanego przez polimery rozpuszczalne w wodzie. W eksperymentach zastosowano dwa polielektrolyty - anionowy poli(kwas akrylowy) (PAA)

i kationową polietylenoiminę (PEI), które są powszechnie używane w przemyśle. W związku z tym, że oba te polimery obecne są w ściekach, dlatego istnieje konieczność ich skutecznego usuwania z fazy wodnej.

Część eksperymentalna: W celu otrzymania węgla aktywnych łądygi pokrzywy (PO), szaławii (SZ), melisy (ML) oraz mięty (MT) zostały rozdrobnione na kawałki o długości 1,5 - 2,0 cm i wysuszone w temperaturze 110 °C. Następnie prekursorzy zostały poddane równoczesnej pirolizie i aktywacji fizycznej (AF) z użyciem CO₂ (Linde Gaz Polska) (przepływ 250 ml/min) w temperaturze 800 °C, przez okres 30 min. Po tym czasie produkty aktywacji ostudzono do temperatury pokojowej za pomocą zewnętrznego wentylatora. Charakterystykę struktury porowatej otrzymanych węgla aktywnych przeprowadzono metodą adsorpcji/desorpcji azotu w temperaturze -196 °C, wykorzystując aparat ASAP 2420 (Micromeritics). Zawartość tlenowych grup funkcyjnych występujących na powierzchni badanych materiałów węglowych wyznaczono metodą alkacymetryczną, zaproponowaną przez Boehma [4]. Badania adsorpcyjne z wykorzystaniem anionowego poli(kwasu akrylowego) - PAA (Fluka) oraz kationowej polietylenoiminy - PEI (Sigma-Aldrich) prowadzono przez 24 h, w temperaturze 25 °C, w pH 3. W tym celu naważki węgla o masie 0,02 g dodano do roztworów o objętości 10 cm³, zawierających polimer o stężeniu początkowym 200 ppm. Jako elektrolit podstawowy zastosowano roztwór chlorku sodu (Sigma-Aldrich) o stężeniu 0,001 mol/dm³. Badania prowadzono w roztworach pojedynczych i podwójnych adsorbatów w celu określenia wzajemnego wpływu polimerów na ich adsorpcję. Wielkość adsorpcji określono metodą statyczną, opierającą się na różnicy stężeń substancji w roztworach przed i po procesie adsorpcji. Stężenie obu polimerów w roztworach wyznaczono przy użyciu spektrofotometru UV-VIS Carry 1000 (Varian). Z uwagi na fakt, że żaden z polimerów nie absorbuje światła w zakresie widzialnym i ultrafioletu, do oznaczeń konieczne było zastosowanie reakcji kompleksowania. W przypadku poli(kwasu akrylowego) wykorzystano reakcję z hyaminą 1662, która skutkuje otrzymaniem białego zabarwionego kompleksu. Absorbancję roztworów mierzono po upływie 15 minut od momentu dodania odczynnika kompleksotwórczego, przy długości fali 500 nm [5]. Z kolei stężenie polietylenoiminy określono z zastosowaniem reakcji z chlorkiem miedzi(II), prowadzącej do wytworzenia niebiesko zabarwionego kompleksu. Próbkę pozostawiono na 10 minut, a następnie mierzono ich absorbancję przy fali długości 286 nm [6].

Wyniki: Właściwości powierzchniowe otrzymanych materiałów węglowych zestawiono w tabeli 1. Węgla aktywne charakteryzują się dobrze rozwiniętą powierzchnią właściwą z dużym udziałem mikroporów w strukturze. Największą powierzchnię wykazuje materiał otrzymany z łądygi mięty (666 m²/g), odznaczający się również największym udziałem mikroporów, z kolei analogiczny węgiel aktywny otrzymany z pokrzywy posiada najmniej korzystne właściwości teksturalne.

Tabela 1. Właściwości teksturalne otrzymanych węgla aktywnych.

Węgiel aktywny	Powierzchnia [m ² /g]		Objętość porów [cm ³ /g]		Średnia wielkość porów [nm]	Udział mikro-porów
	całkowita	mikropory	całkowita	mikropory		
PO_AF	368	248	0,21	0,10	2,26	0,47
SZ_AF	399	327	0,20	0,13	1,96	0,65
ML_AF	547	430	0,26	0,17	1,92	0,65
MT_AF	666	535	0,32	0,21	1,91	0,66

W tabeli 2 przedstawiono zawartość powierzchniowych grup funkcyjnych dla badanych adsorbentów. Z uzyskanych danych wynika, że na powierzchni każdego z produktów aktywacji bezpośredniej (zwłaszcza próbki PO_AF) dominują grupy o charakterze zasadowym. Materiał otrzymany z łądyg pokrzywy wykazuje ponadto najwyższą całkowitą zawartość grup funkcyjnych (4,89 mmol/g), natomiast materiał otrzymany z mięty najniższą (2,19 mmol/g).

Tabela 2. Zawartość kwasowo-zasadowych grup powierzchniowych otrzymanych węgla aktywnych.

Węgiel aktywny	Grupy kwasowe [mmol/g]	Grupy zasadowe [mmol/g]	Całkowita zawartość [mmol/g]
PO_AF	0,32	4,57	4,89
SZ_AF	0,48	1,96	2,44
ML_AF	0,29	2,03	2,32
MT_AF	0,63	1,56	2,19

W tabeli 3 zamieszczono informacje dotyczące wielkości adsorpcji obydwu polimerów na powierzchni węgla aktywnych z układów pojedynczych i podwójnych adsorbatów. Poli(kwas akrylowy) jest adsorbowany w większych ilościach na powierzchni wszystkich materiałów węglowych niż polietylenoimina. Ma to związek z odmienną konformacją łańcuchów polimerowych w pH 3. W tych warunkach PAA na skutek minimalnej dysocjacji grup karboksylowych występuje w postaci skłębionej, z kolei w przypadku PEI dysocjacja grup aminowych jest niemal całkowita, co prowadzi do rozwiniętej konformacji łańcucha polimerowego. Skłębione łańcuchy PAA mogą bardziej swobodnie adsorbować się w porach materiałów węglowych, natomiast adsorpcja rozwiniętych makrocząsteczek PEI- jest ograniczona tylko do zewnętrznej powierzchni adsorbentów. Najlepszymi właściwościami adsorpcyjnymi w odniesieniu do poli(kwasu akrylowego) charakteryzuje się węgiel aktywny otrzymany z łądyg pokrzywy. Materiał ten wykazuje największy średni rozmiar porów, co skutkuje największą ich dostępnością dla makrocząsteczek PAA. Ponadto zawartość kwasowo-zasadowych grup powierzchniowych w przypadku próbki PO_AF jest ponad dwukrotnie większa niż w dla pozostałych adsorbentów, co także może zwiększać jego zdolność sorpcyjną. Wielkość adsorpcji polietylenoimini jest porównywalna na powierzchni wszystkich badanych węgla aktywnych. W przypadku adsorpcji z roztworów podwójnych, powinowactwo PAA do powierzchni materiałów węglowych zwiększa się w porównaniu do układów pojedynczych. Ma to

związek z adsorpcją dodatnio naładowanych cząsteczek polietylenoiminy, które w pH 3 lokują się bardziej prostopadle do dodatnio naładowanej powierzchni węgla aktywnych, co zwiększa elektrostatyczne przyciąganie łańcuchów PAA. W przypadku polietylenoiminy różnice w wielkości adsorpcji z roztworów podwójnych nie różnią się znacząco od tych uzyskanych z roztworów pojedynczych.

Tabela 3. Wielkość adsorpcji polietylenoiminy oraz poli(kwasu akrylowego) na powierzchni otrzymanych węgla aktywnych.

Węgiel aktywny	Wielkość adsorpcji [mg/g]			
	PEI		PAA	
	PEI	PEI+PAA	PAA	PAA+PEI
PO_AF	21,88	50,39	47,49	94,32
SZ_AF	29,83	21,45	18,79	42,26
ML_AF	30,54	25,31	28,69	44,16
MT_AF	27,84	27,64	23,16	42,58

Wnioski: Otrzymane węgle aktywne charakteryzują się dobrze rozwiniętą powierzchnią właściwą (~370-670 m²/g) oraz znacznym udziałem mikroporów w strukturze (47-66%). Ponadto odznaczają się one znaczną zawartością powierzchniowych grup funkcyjnych (od 2,2 do 4,9 mmol/g), wśród których dominują te o charakterze zasadowym. Poli(kwas akrylowy) najlepiej adsorbuje się na powierzchni węgla aktywnego uzyskanego z łądy pokrzywy, który charakteryzuje się największym średnim rozmiarem porów oraz najwyższą zawartością powierzchniowych grup funkcyjnych. Z kolei polietylenoimina jest adsorbowana w podobnych ilościach na powierzchni wszystkich materiałów węglowych. Polimer o charakterze anionowym wykazuje zatem wyższe powinowactwo do powierzchni węgla aktywnych o dominującym udziale grup zasadowych w porównaniu do związku wielkocząsteczkowego o charakterze kationowym, zarówno w układach pojedynczych, jak i podwójnych adsorbatów.

Literatura:

1. A. Kobyłka, Technical Issues, 4 (2016) 27.
2. Y. Ding, J. Qi, R. Hou, B. Liu, S. Yao, J. Lang, J. Chen, B. Yang, Energy & Fuels, 36(10) (2022) 5456.
3. M. Gęca, M. Wiśniewska, P. Nowicki, Advances in Colloid and Interface Science, 305 (2022) 102687.
4. H.P. Boehm, E. Dielh, W. Heck, R. Sappok, Angewandte Chemie, 3 (1964) 669.
5. W.B. Crummett, R.A. Hummel, Journal of American Water Works Association, 68 (1994) 1871.
6. J. Patkowski, D. Myśliwiec, S. Chibowski, International Journal of Polymer Analysis and Characterization, 21, 6 (2016) 486.

WPLYW DODATKU BIOWĘGLA DO GLEBY NA ILOŚĆ FTALANÓW POBIERANYCH PRZEZ ROŚLINY

A. SOKOŁOWSKI, B. CZECH, UMCS, Wydział Chemii, Katedra Radiochemii i Chemii Środowiskowej, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin

Abstrakt: W badaniach skupiono się na określeniu wpływu dodatku biowęglu do gleby na losy estrów kwasu ftalowego w systemie gleba-warzywo. Określono ilość ftalanów pobieraną przez sałatę i ich dystrybucję w różnych częściach rośliny. Zastosowano 1% dodatek różnych typów biowęgli przygotowanych z 4 typów surowców a pirolizowanych w jednakowej temperaturze 600 °C. Otrzymane wyniki pokazują, że rodzaj materiału użytego do produkcji biowęglu ma wpływ na właściwości otrzymywanego finalnie produktu, które z kolei decydują o wydajności zatrzymywania ftalanów w glebie.

Wprowadzenie: Estry kwasu ftalowego (PAEs – phthalic acid esters) inaczej nazywane ftalanami, są bardzo popularnymi plastyfikatorami stosowanymi w wielu produktach [1]. Wyróżnia się dwie grupy estrów ftalanów: małowcząsteczkowe (LMW – low molecular weight) do których zaliczają się: ftalan dimetylu (DMP), ftalan dietylu (DEP), ftalan dibutyli (DBP) i ftalan benzylu butylu (BBP) oraz wielkowcząsteczkowe (HMW – high molecular weight) takie jak: ftalan di-(2-etylheksylu) (DEHP) i ftalan di-n-oktylu (DNOP) [2]. Produkty wykonane z tworzyw sztucznych są głównym źródłem ftalanów we wszystkich elementach środowiska takich jak: woda, gleba i powietrze [3]. Z uwagi na fakt, że ftalany są związane z matrycą polimerową jedynie słabymi wiązaniami, takimi jak wiązania wodorowe lub oddziaływania van der Waalsa, to mogą zostać łatwo wypłukane i trafić do środowiska [4]. Zanieczyszczenie gleby rolnej estrami kwasu ftalowego niesie za sobą duże niebezpieczeństwo dla ludzi. Obecne w glebie ftalany mogą zostać pobrane przez rośliny i wprowadzone do łańcucha pokarmowego. Spożywanie zanieczyszczonej ftalanami żywności takiej jak: warzywa i owoce jest głównym źródłem narażenia ludzi na negatywne działanie tych związków [5]. Do schorzeń wywoływanych przez ftalany można zaliczyć: alergie i astmę oraz poważniejsze efekty takie jak: nowotwory, zaburzenia działania układów nerwowego i hormonalnego oraz zaburzenie rozwoju dzieci i niemowląt [3]. Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (USEPA) określiła: DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP i DNOP jako związki wymagające szczególnej kontroli, a DEHP dodatkowo znajduje się na liście związków będących potencjalnymi czynnikami rakotwórczymi [6]. Z tego względu konieczne jest prowadzenie badań mających na celu oznaczanie zawartości estrów ftalanów w produktach spożywczych i opracowywanie metod i skutecznego usuwania ze środowiska lub immobilizacji. Ostatnio dużą uwagę zwraca się na zastosowanie naturalnych dodatków do gleb. Takim dodatkiem może być biowęgiel (BC), czyli materiał stały otrzymany w wyniku konwersji termochemicznej biomasy w atmosferze o ograniczonej zawartości tlenu [7]. Jako surowiec można wykorzystać różnego typu materiały odpadowe z produkcji rolnej np.: słomę, łupiny orzechów, ale także osad ściekowy [8]. Zaletą zastosowania biowęglu w celu immobilizacji estrów ftalanów w glebie i ograniczenia ich biodostępności jest fakt, że biowęgiel jest używany jako dodatek do gleb zwiększający ich żyzność.

Do pozytywnych efektów stosowania biowęgla w glebie, potwierdzonych licznymi badaniami można zaliczyć: zwiększenie pH gleb kwaśnych, zwiększenie biodostępności wielu mikroelementów np.: K, Mg, Ca, P, Cu, Mn, Fe i N, zwiększenie wilgotności gleby przez ograniczenie procesu parowania wody, zwiększenie pojemności jonowymiennej gleby i stymulację rozwoju mikroorganizmów glebowych [9, 10]. Oznacza to, że zastosowanie biowęgla jako sorbentu mającego zmniejszyć biodostępność ftalanów dla roślin jednocześnie może zwiększyć uzyskiwane plony i zmniejszyć ryzyko jakie stwarza dla ludzi spożywanie roślin zanieczyszczonych estrami kwasu ftalowego.

W celu określenia wpływu dodatku różnych typów biowęgla przygotowanych z różnych surowców na ilość ftalanów pobieranych przez rośliny wykorzystana została sałata (*Lactuca sativa* L.). Jest to popularne warzywo, spożywane na surowo w wielu krajach. Stanowi źródło wielu mikroelementów i witamin np.: A, C, E.

Część eksperymentalna: Prowadzone doświadczenia składało się z kilku etapów:

- produkcja biowęgla: w badaniach wykorzystane zostały biowęgle przygotowane z dwóch różnych surowców, z dwóch różnych grup materiałów odpadowych: słomy ze słonecznika (BC-Sf) – jako materiału odpadowego z produkcji rolnej i osadu ściekowego (BC-Ss). Piroliza prowadzona była w temperaturze 600 °C w czasie 3 h, w atmosferze azotu. Jednakowe parametry syntezy miały na celu zapewnienie, że różnice we właściwościach biowęgla mogą wynikać jedynie z użycia różnych surowców.

- badania właściwości fizykochemicznych otrzymanych biowęgla: przeprowadzone zostały badania podstawowych właściwości fizykochemicznych otrzymanych materiałów, takie jak: pH, zawartość pierwiastków C, H, N i O, zawartość całkowitego węgla organicznego (TOC), określenie zawartości popiołów, określenie powierzchni właściwej i pojemności porów, oraz przy pomocy spektroskopii FT-IR i rentgenowskiej spektrometrii fotoelektronów (XPS) zbadano grupy funkcyjne obecne na powierzchni biowęgla.

- hodowla roślin: przygotowane biowęgle były dodawane w ilości 1% do 340 g gleby w szklanych naczyniach, glebę nastrzykiwano 1 mL roztworu ftalanów zawierającego 1 µg/mL każdego z testowanych związków: DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DNOP, do całości dodawana była woda w celu osiągnięcia 65 % pojemności wodnej. Na tak przygotowanej glebie siano po 10 nasion sałaty. Uprawa roślin prowadzona była przez 6 tygodniu w Conviron GEN100 w stałej wilgotności 65 %, w 12 godzinnych cyklach dzień/noc, w temperaturze 22 °C/ 18 °C dzień/ noc. Rośliny były podlewane 2 razy w tygodniu w celu utrzymania stałej wilgotności gleby na poziomie 65 %.

- analiza zawartości estrów ftalanów w poszczególnych częściach rośliny: po 6 tygodniach uprawy, rośliny zostały usunięte z gleby i umyte wodą destylowaną. Liście zostały oddzielone od korzeni, poszczególne części rośliny zostały zamrożone w temperaturze -20 °C i zliofilizowane przed dalszą analizą GC-MS/MS według procedury [11].

Wyniki: Otrzymane biowęgle miały charakter zasadowy, a różniły się zasadniczo zarówno zawartością węgla (23% BC-Ss do nawet 86,7% BC-Sf), w tym węgla organicznego (ponad dwukrotnie więcej w BC-Sf) oraz ilością popiołu (7% w BC-Sf i aż 63% w BC-Ss) i wielkością dostępnej powierzchni (Tabela 1). Obecność węgla czy też frakcji nieorganicznej w popiele może być źródłem substancji odżywczych, gdy biowęgiel dodawany jest do gleby a dobrze rozwinięta powierzchnia może zwiększać immobilizację zanieczyszczeń, ale też i substancji odżywczych.

Tabela 1. Właściwości fizykochemiczne biowęgla użytych w doświadczeniu.

Materiał	Surowiec	pH	Popiół (%)	C (%)	H (%)	N (%)	O (%)	TOC (mg/g)	S _{BET} (m ² /g)
BC-Ss	Osad ściekowy	8,06	62,78	23,49	0,57	3,66	9,5	328,05	26,25
BC-Sf	Słonecznik	9,26	6,7	86,71	1,67	0,96	3,96	878,52	0,102

Dodatek biowęgla do gleby spowodował zmiany stężenia estrów kwasu ftalowego w różnych częściach sałaty. Poszczególne związki reagowały na dodatek biowęgla w różny sposób. Stężenia części z badanych ftalanów w próbkach z dodanym biowęgłem uległy zmniejszeniu w porównaniu z próbą kontrolną. Taki efekt miało dodanie do gleby biowęgla otrzymanego ze słonecznika na stężenie DMP, DEP, DBP i BBP w korzeniach sałaty (Tabela 2). Wzbogacenie gleby 1% dodatkiem BC-Sf nie spowodowało natomiast znaczącej zmiany stężenia DNOP ale zwiększyło ilość DEHP w korzeniach sałaty. Oznacza to, że BC przygotowany ze słonecznika przyczynił się do zmniejszenia biodostępności estrów kwasu ftalowego z grupy związków małowcząsteczkowych. Biowęgiel z osadu ściekowego przyczynił się jedynie do zmniejszenia stężenia DEP w korzeniach sałaty. W przypadku pozostałych analizowanych związków powodował wzrost ich stężenia w tej części rośliny.

Tabela 2. Zawartość ftalanów w korzeniach sałaty.

Próbka	DMP (ng/L)	DEP (ng/L)	DBP (ng/L)	BBP (ng/L)	DEHP (ng/L)	DNOP (ng/L)
Kontrola	1,0784	3,3677	0,6079	1,0137	0,7384	1,6295
BC-Ss	1,1129	3,1747	0,8	1,3135	0,9148	2,5595
BC-Sf	0,787	2,1716	0,5861	0,8081	1,5582	1,6195

W przypadku liści sałaty (Tabela 3) znaczne zmniejszenie zawartość dwóch ftalanów: DMP i DEHP zaobserwowano w wyniku dodatku BC-Sf. Niestety dodatek BC-Sf spowodował jednocześnie znaczny wzrost stężeń w liściach sałaty takich związków jak: DBP, BBP i DNOP, nie mając wpływu na stężenie DEP. Dodatek BC-Ss spowodował natomiast zmniejszenie stężenia DNOP w liściach sałaty. Stężenia pozostałych estrów kwasu ftalowego w liściach sałaty wzrastały w wyniku dodatku biowęgla otrzymanego z osadu ściekowego. W przypadku DMP, DEP, DBP i DEHP wzrost ten wynosił od 0,310 ng/L do 0,375 ng/L. Jednak w przypadku BBP wzrost ten był większy i wynosił 0,936 ng/L. Dodatkowo można zauważyć, że wszystkie badane związki osiągały większe stężenie w liściach sałaty niż w jej korzeniach.

Wnioski: Ftalany podobnie jak inne związki organiczne mogą być pobierane z gleby przez korzenie roślin. Są one następnie transportowane do innych części roślin, gdzie ulegają akumulacji. Analizując wyniki przeprowadzonych badań można zauważyć, że w przypadku estrów kwasu ftalowego transport w sałacie nie jest zaburzony, a organami, w których są one akumulowane są jadalne liście, co powoduje wzrost zagrożenia dla zdrowia ludzi. Dodatek biowęgla do gleby zanieczyszczonej ftalanami ma wpływ na ilość tych związków pobieraną przez rośliny i ich akumulację w poszczególnych częściach roślin. Różne typy biowęgla mogą zmniejszać stężenie tych niebezpiecznych związków w korzeniach sałaty, ale powodować zwiększenie ich zawartości w liściach. Różne związki reagują w różny sposób na obecność biowęgla, co wynika z właściwości zarówno danego ftalanu, jak i biowęgla. Działanie poszczególnych

materiałów zależy w największym stopniu od takich właściwości jak: wielkość powierzchni właściwej oraz ilość i typ grup funkcyjnych obecnych na powierzchni biowęglu. Na zdolność do immobilizacji ftalanów na powierzchni biowęglu wpływ ma również jego pH, aromatyczność i skład pierwiastkowy. Głównymi oddziaływaniami odpowiedzialnymi za wiązanie ftalanów z powierzchnią biowęglu są: π - π donor-akceptor oraz oddziaływania hydrofobowe. Właściwości dodawanego biowęglu mają również wpływ na wzrost i rozwój roślin. Pewne materiały dzięki dużej zawartości substancji mineralnych mogą stymulować wzrost roślin, dodatkowo zwiększając w nich zawartość takich związków jak: cukry i witaminy. Inne biowęgle mogą mieć natomiast całkiem przeciwnie działanie, będąc toksycznymi dla roślin i hamując ich wzrost. Konieczne jest zatem odpowiednie dobranie stosowanego biowęglu do rodzaju zanieczyszczeń i typu uprawianej rośliny. W niektórych przypadkach konieczne może być użycie kilku różnych biowęgli, których działanie względem poszczególnych ftalanów będzie się uzupełniało.

Tabela 3. Zawartość ftalanów w liściach sałaty.

Próbka	DMP (ng/L)	DEP (ng/L)	DBP (ng/L)	BBP (ng/L)	DEHP (ng/L)	DNOP (ng/L)
Kontrola	5,5059	3,207	7,5961	5,0847	7,1701	2,941
BC-Ss	5,8162	3,5736	7,9711	6,0203	7,5257	2,5599
BC-Sf	3,9406	3,2078	8,1354	6,4099	5,3311	4,857

Literatura:

1. K. M. Gani, V. K. Tyagi, A. A. Kazmi, Environ Sci Pollut Res 24 (2017) 17267.
2. L. Edwards, N. L. McCray, B. N. VanNoy, A. Yau, R. J. Geller, G. Adamkiewicz, A. R. Zota, JESEE 32 (2022) 366.
3. A. Giuliani, M. Zuccarini, A. Cichelli, H. Khan, M. Reale, Int. J. Environ. Res. Public Health 17 (2020) 5655.
4. H. Hou, Y. Min, X. Liu, P. Wang, Z. Zhou, D. Liu, J. Hazard. Mater. 418 (2021) 126277
5. L. Coltro, E. S. Saron, I. A. G. Ferreira, B. B. Santos, L. Marangoni J., J. Consum. Prot. Food S. 18 (2023) 27.
6. B. Zhou, L. Zhao, Y. Sun, X. Li, L. Weng, Y. Li, Sci. Tota. Environ. 778 (2021) 146281.
7. Standardized Product Definition and Product Testing Guidelines for Biochar That Is Used in Soil, IBI-STD-2.1 (2015)
8. M. I. Inyang, B. Gao, Y. Yao, Y. Xue, A. Zimmerman, A. Mosa, Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 46 (2016) 406.
9. D. Wang, P. Jiang, H. Zhang, W. Yuan, Sci. Tota. Environ. 723 (2020) 137775.
10. S. Dangi, S. Gao, Y. Duan, D. Wang, App. S. Eco. 150 (2020) 103452.
11. A. Sokółowski, M. P. Dybowski, Y. Gao, P. Oleszczuk, B. Czech, Food Chem. 440 (2024) 138222.

WŁAŚCIWOŚCI TERMICZNE KOPOLIMERÓW DIWINYLOBENZENU I METAKRYLANU GLICYDYLU PRZED I PO SORPCJI BŁĘKITU METYLENOWEGO

M. PARCHETA, UMCS, Wydział Chemii, Katedra Chemii Polimerów, ul. Gliniana 33, 20-614 Lublin

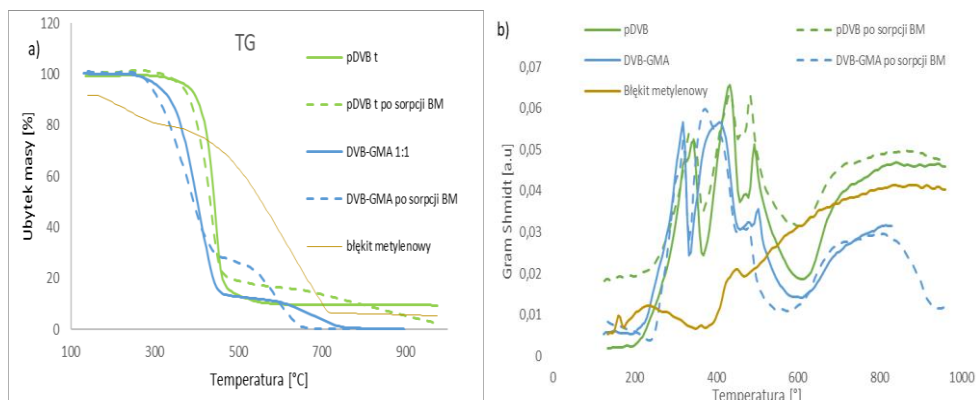
Abstrakt: W publikacji porównane zostały właściwości termiczne polimerów na bazie diwinylobenzenu (DVB) i metakrylanu glicydyłu (GMA) przed i po sorpcji błękitu metylenowego. Analiza termiczna wykazała iż zarówno polimery wyjściowe, jak i po sorpcji są stabilne do 200°C. Na podstawie analizy gazów, wydzielających się w czasie analizy termicznej, zaproponowano schematy rozkładu otrzymanych polimerów oraz barwnika oraz produktów ich rozpadu.

Wprowadzenie: Polimery porowate, to trójwymiarowe, usieciowane struktury, otrzymywane na drodze polimeryzacji spęczniania, suspensyjnej lub emulsyjnej. W zależności od rozkładu objętości porów względem rozmiaru ich średnic, wielkości powierzchni właściwej, właściwości termicznych i wytrzymałości mechanicznej polimery znajdują liczne zastosowania w różnych gałęziach przemysłu [1,2]. Mikrosfery polimerowe stosowane są w przemyśle farmaceutycznym jako nośniki do kontrolowanego uwalniania leków, porowate podłoża do syntezy białek, a także jako nośniki do immobilizacji enzymów [3]. W niektórych przypadkach kluczowe znaczenie dla zastosowań polimerów mają ich właściwości termiczne. Duża odporność na działanie wysokiej temperatury jest warunkiem koniecznym w przypadku zastosowań mikrosfer polimerowych jako wypełnień kolumny w chromatografii gazowej. Polimery mogą też uczestniczyć w procesach katalitycznych, które również wymagają wysokiej odporności termicznej, gdyż zachodzą one w temperaturze przekraczającej 200 °C. Odporność termiczna polimerów wzrasta wraz ze wzrostem stopnia usieciowania. Monomerami sieciującymi mogą być zarówno wielofunkcyjne związki aromatyczne jak również alifatyczne [4]. W tej publikacji, jako monomer sieciujący zastosowany został diwinylobenzen (DVB), posiadający dwie aktywne, wiszące grupy etylenowe, które łatwo wchodzi w reakcję polimeryzacji, tworząc termoutwardzalne materiały o sferycznej morfologii. Mikrosfery polimerowe stosowane są również w technice SPE jako sorbenty do wstępnego zatężania i usuwania zanieczyszczeń środowiskowych tj. leki czy barwniki sztuczne z wody [5], co ma szczególne znaczenie zważywszy na fakt, iż tylko 0,02 % ziemskich zasobów wody jest przydatna do spożycia [6]. Sorbenty polimerowe, w przeciwieństwie do krzemionkowych mogą być stosowane w szerokim zakresie pH, ponadto wykazują odporność na działanie rozpuszczalników organicznych, kwasów i zasad, a także wysoką selektywność względem sorbowanych substancji. Zaletą sorbentów polimerowych jest również możliwość ich regeneracji i ponownego zastosowania [7].

Część eksperymentalna: Homopolimer pDVB oraz kopolimery diwinylobenzenu oraz metakrylanu glicydyłu zostały otrzymane w reakcji polimeryzacji suspensyjnej, prowadzonej przez 20 godzin w temperaturze 70°C przy jednoczesnym mieszaniu o intensywności 300 rpm. Stosunek objętościowy monomerów w kopolimerze wynosił

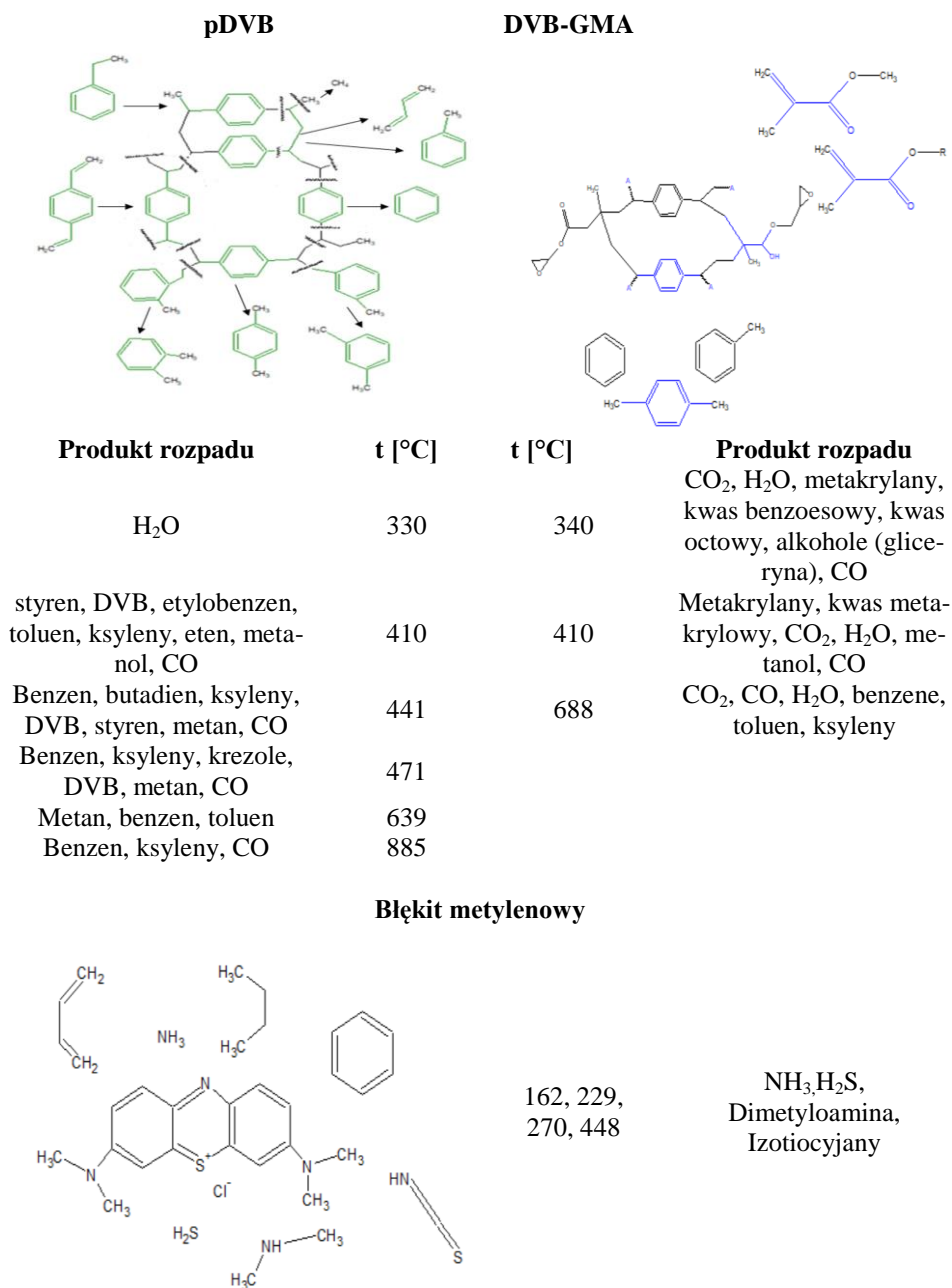
1:1. Jako rozpuszczalnik porotwórczy zastosowano toluen, zaś katalizatorem polimeryzacji był AIBN. Sorpcję błękitu metylenowego na pDVB prowadzono metodą statyczną, w łaźni wodnej z mieszaniem o intensywności 100 rpm, w temperaturze 25°C. Naważka polimeru była równa 0,1 g. Sorpcję błękitu metylenowego prowadzono z 10 ml roztworu wodnego barwnika o stężeniu 10 mg/L. Analizę TG wykonano za pomocą aparatu Netzsch STA 449 F1 Jupiter w helu. Szybkość ogrzewania próbki wynosiła 10°C/min. Naważka próbek umieszczanych w tyglu wynosiła ok. 7 mg.

Wyniki: W celu określenia wpływu sorpcji błękitu metylenowego na stabilność termiczną mikrosfer polimerowych wykonano analizę rozkładu badanych materiałów w zakresie temperaturowym od 35 do 1000°C. Na Rys.1 porównano krzywe TG oraz wykres Gram Shmidta polimerów pDVB oraz DVB-GMA przed i po sorpcji błękitu metylenowego.



Rys. 1. Krzywe rozkładu termicznego (a) oraz wykresy Gram Shmidta (b) badanych polimerów przed i po sorpcji błękitu metylenowego.

W zakresie 35-200°C nie zaobserwowano wpływu zaadsorbowanego błękitu metylenowego na stabilność termiczną badanych polimerów. Powyżej 300 °C polimery, na powierzchni których zaadsorbowano barwnik ulegają wcześniejszemu rozkładowi w porównaniu z polimerami niemodyfikowanymi. Polimery wyjściowe rozkładają się jednoetapowo, natomiast w przypadku polimerów zawierających zaadsorbowany barwnik, pojawia się drugi etap, związany z dekompozycją błękitu metylenowego. Barwnik ten jest mocniej związany z pDVB niż z kopolimerem DVB-GMA, gdyż w przypadku homopolimeru rozkład zaadsorbowanego barwnika zaczyna się w temperaturze 468°C, zaś dla kopolimeru rozkład ten ma początek w temperaturze 428°C. Opis produktów rozkładu badanych materiałów wykonano w oparciu analizę gazów uwalnianych w czasie ich ogrzewania na podstawie widm FTIR. Rozpad badanych polimerów oraz barwnika przedstawiono na Rys.2.



Rys. 2. Produkty rozkładu badanych polimerów i błękitu metylenowego.

Wnioski: W pracy porównano termiczny rozkład polimerów na bazie diwinylobenzenu i metakrylanu glicydylu przed i po sorpcji barwnika metylenowego. Badane polimery wykazują stabilność termiczną do 200 °C. Powyżej 300 °C, polimery z zaadsorbowanym

barwnikiem ulegają wcześniejszej dekompozycji niż polimery wyjściowe. W przeciwieństwie do polimerów wyjściowych polimery poddane sorpcji rozkładają się dwuetapowo. Barwnik nie rozkłada się całkowicie – po analizie pozostało 10,74 % jego wyjściowej masy. Na podstawie wyników analizy EGA, zaproponowano schematy rozkładu termicznego otrzymanych polimerów i błękitu metylenowego.

Praca została zrealizowana w ramach projektu 101131382 – Cleanwater, Horizon MSCA -2022-SE-01

Literatura:

1. M. Talha Gokmen, Filip E. du Prez, *J. Polym. Sci.*, 37 (2012) 365.
2. N.K. Varde, D.W. Pack, *Expert Opin Biol Ther*, 4 (2004) 35.
3. A.H. Ali, *Ann. Adv. Chem.*, 6 (2022) 10.
4. M. Maciejewska, B. Gawdzik, M. Rogulska, *Mater.*, 14 (2021) 2040.
5. L. Li, H. Song, X. Chen, *Mater. Lett.*, 62 (2008) 179.
6. M. Wang, B. L. Bodirsky, B. Rijnveld, F. Beier, M. P. Bąk, M. Batool, B. Droppers, A. Popp, M. T. H van Villet, M. Stokal, *Nat. Commun.*, 880 (2024) 1.
7. M. Grochowicz, Ł. Szajnecki, M. Rogulska, *Polym.*, 14 (2022) 2080.

BADANIE PRZYDATNOŚCI SORBENTU IMPREGNOWANEGO DO USUWANIA JONÓW METALI SZLACHETNYCH

K. ZINKOWSKA, Z. HUBICKI, G. WÓJCIK, UMCS, Wydział Chemii, Katedra Chemii Nieorganicznej, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 2, 20-031 Lublin

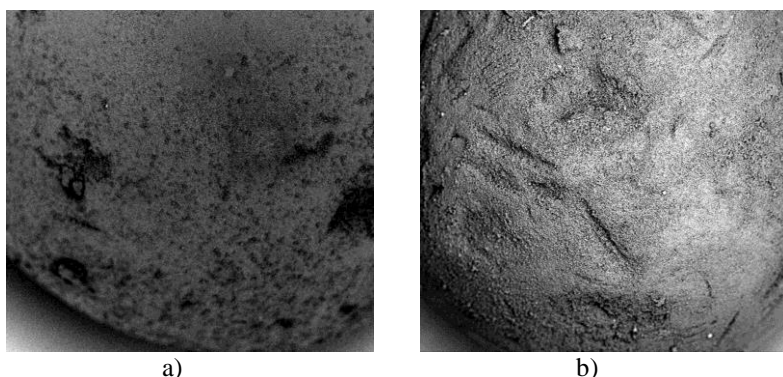
Abstrakt: Metale szlachetne są wyjątkową grupą pierwiastków, których ceny ze względu na zmniejszające się zasoby naturalne wzrastają z każdym rokiem. Z tego powodu istnieje konieczność pozyskiwania tych metali ze źródeł wtórnych i poszukiwania efektywnych metod ich odzysku. Celem niniejszej pracy było zbadanie przydatności sorbentu Lewatit VP OC 1026 impregnowanego czwartorzędową solą amoniową Aliquat 336 do usuwania jonów metali Au(III), Pd(II), Pt(IV) i Rh(III) z chlorkowych roztworów wodnych zawierających makroskładnik. Scharakteryzowano powierzchnię sorbentu przed i po impregnacji ekstrahentem za pomocą elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM). Zbadano wpływ czasu kontaktu faz w obecności makroskładnika w postaci jonów cynku(II). Zawartość pierwiastków w roztworach modelowych po sorpcji oznaczono techniką optycznej spektrometrii emisyjnej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP-OES). Najwyższą pojemność sorpcyjną oraz najwyższy współczynnik wydzielania jonów otrzymano dla jonów platyny(IV).

Wprowadzenie: Metale szlachetne są cenione przede wszystkim za swoją doskonałą przewodność elektryczną i wyjątkową odporność na korozję. Z tego powodu są używane w zastosowaniach, w których istotne są specjalne właściwości powierzchni, dobre właściwości mechaniczne czy też estetyczny wygląd. Metale szlachetne od wieków są używane jako materiały, z których wytwarzana jest biżuteria. Powłoki ze złota, palladu czy platyny szeroko stosowane są w m.in. elektronice. Ze względu na właściwości katalityczne platyny, palladu i rodu, są one używane do produkcji konwerterów spalin samochodowych [1]. W ostatnich kilkadziesiąt latach zainteresowanie metalami szlachetnymi znacząco wzrosło ze względu na szybki rozwój technologiczny, stąd też zwiększona produkcja tych metali. Jednak, są to surowce wyczerpywalne, więc z roku na rok ich zasoby maleją i coraz ważniejszą rolę odgrywa recykling tych metali [2]. Odzysk metali szlachetnych może być przeprowadzany metodami hydrometalurgicznymi lub pirometalurgicznymi. Metody hydrometalurgiczne mają tę przewagę nad pirometalurgicznymi, że pozwalają na większą kontrolę nad procesem oraz nie potrzebują tak drogiego i skomplikowanego sprzętu. Wadą stosowania metod mokrych jest generowanie szkodliwych odpadów powstających przez stosowanie dużych ilości agresywnych odczynników [3]. Do separacji metali szlachetnych wykorzystuje się szereg różnych technik m.in. ekstrakcję rozpuszczalnikową, procesy elektrochemiczne, procesy membranowe czy wymianę jonową. Dobrą alternatywą dla technik separacyjnych zużywających duże ilości toksycznych rozpuszczalników są impregnowane żywice polimerowe (Solvent-Impregnated-Resins – SIRs). Są to sorbenty powstałe w wyniku zaadsorbowania na makroporowatej matrycy polimerowej określonego, selektywnego wobec konkretnych jonów ekstrahenta. Dotąd, do impregnacji sorbentów stosowano toksyczne organiczne odczynniki np. chloroform, w którym rozpuszczany był ekstrahent [4]. Badany

w niniejszej pracy sorbent Lewatit VP OC 1026 został przygotowany za pomocą nowej metody, bez użycia rozpuszczalnika, która jest bardziej przyjazna środowisku.

Część eksperymentalna: Lewatit VP OC 1026 jest komercyjnie dostępną, makroporową żywicą impregnowaną kwasem di(2-etyloheksylo)fosforowym (D2EHPA), która nie ma zdolności do sorpcji jonów metali szlachetnych. Aby sorbent mógł być przydatny do usuwania jonów Au(III), Pd(II), Pt(IV) i Rh(III) został ponownie zaimpregnowany czwartorzędową solą amoniową (chlorkiem metylotrioktyloamoniowym) o nazwie handlowej Aliquat 336. Impregnację przeprowadzono nową metodą, bez użycia toksycznych rozpuszczalników organicznych. 1 g ekstrahenta został podgrzany do temperatury ok. 60°C, a następnie bezpośrednio i dokładnie wymieszany z 2 g sorbentu Lewatit VP OC 1026. Tak zaimpregnowany sorbent użyto do badań sorpcji jonów metali szlachetnych. Zbadano wpływ czasu kontaktu faz na sorpcję jonów Au(III), Pd(II), Pt(IV) i Rh(III) w obecności makroskładnika – jonów Zn^{2+} . W tym celu, do kolb stożkowych odważono na wadze analitycznej po 0.2 g sorbentu i kontaktowano z 50 cm³ roztworu ZnCl₂ o stężeniu jonów cynku 0.1 M, stężeniu kwasu chlorowodorowego 0.1 M i zawartości jonów metali szlachetnych 10 ppm. Próbkę pobierano po czasie: 1, 5, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 1440 minut do kolb o pojemności 10 cm³ i rozcieńczano wodą do kreski. Zawartości badanych metali zmierzono przy użyciu optycznej spektrometrii emisyjnej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP-OES).

Wyniki: Na rysunku 1 przedstawiono zdjęcia powierzchni sorbentu Lewatit VP OC 1026, które otrzymano za pomocą elektronowego mikroskopu skaningowego Phenom World (powiększenie x 460). Na zdjęciu 1a widoczny jest sorbent przed impregnacją, którego powierzchnia wydaje się dosyć szorstka. Na zdjęciu 1b, po impregnacji Aliquatem 336, powierzchnia przedstawionego sorbentu stała się znacznie mniej chropowata i bardziej jednorodna. Potwierdza to, że ekstrahent znajduje się na powierzchni sorbentu Lewatit VP OC 1026.



Rys. 1. Zdjęcia SEM powierzchni sorbentu Lewatit VP OC 1026: a) przed impregnacją; b) po impregnacji.

Na rysunku 2. zaprezentowano wykres zależności współczynnika wydzielania jonów (%R) od czasu kontaktu faz (t). Współczynnik wydzielania jonów metali szlachetnych został obliczony przy użyciu wzoru:

$$\%R = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \cdot 100\%$$

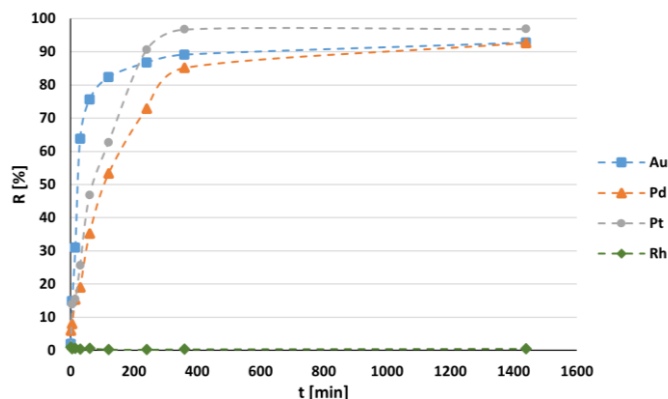
gdzie: %R – współczynnik wydzielania jonów metali szlachetnych; C_0 – stężenie początkowe metali szlachetnych (ppm); C_t – stężenie jonów metali szlachetnych po czasie t (ppm).

Na rysunku 3 przedstawiona została zależność pojemności sorpcyjnej (q) sorbentu Lewatit VP OC 1026 impregnowanego Aliquatem 336 od czasu kontaktu faz (t). Pojemność sorpcyjną wyliczono na podstawie równania:

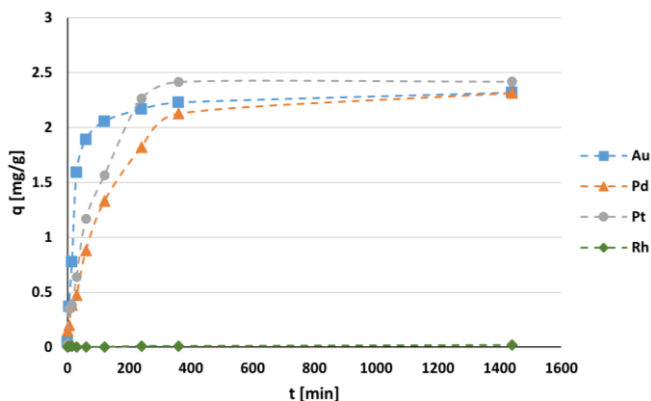
$$q = \frac{C_0 - C_t}{m} \cdot V$$

gdzie: q – pojemność sorpcyjna sorbentu (mg/g); C_0 – początkowe stężenie jonów metali szlachetnych (ppm); C_t – stężenie jonów metali szlachetnych po czasie t (ppm); V – objętość użytego roztworu (dm^3); m – masa użytego sorbentu (g).

Analizując wykres na rysunku 2 można zauważyć, że im dłuższy był czas, w którym fazy pozostawały w kontakcie, tym większy był współczynnik wydzielania jonów metali szlachetnych. Jedynie jony Rh(III) nie były usuwane z roztworu przez sorbent Lewatit VP OC 1026+Aliquat 336. Najlepiej sorbowanymi jonami w tym układzie były jony platyny(IV). Niemalże wszystkie jony Pt(IV) zostały zasorbowane po 24 godzinach, a współczynnik wydzielania jonów wynosił 96,82%. Największą pojemność sorpcyjną uzyskano również dla tego pierwiastka – 2,42 mg/g. Współczynniki wydzielania jonów po 24 godzinach dla złota(III) i palladu(II) były do siebie zbliżone i wynosiły odpowiednio: 92,7% oraz 92,6%. Pojemności sorpcyjne wynosiły: 2,32 mg/g dla Au(III) oraz 2,31 mg/g dla Pd(II). Sorpcja jonów złota(III) spośród wszystkich badanych metali następowała najszybciej: po 30 minutach zasorbowane zostało aż 63,7% wszystkich jonów. Dla porównania współczynniki wydzielania jonów po 30 minutach dla jonów palladu(II) i platyny(IV) wynosiły kolejno: 19% i 25,6%. Wyraźnie widać, że mimo obecności dużego stężenia jonów cynku(II), jony metali szlachetnych nadal były efektywnie usuwane z roztworu. Potwierdza to selektywność sorbentu względem jonów Pt(IV), Pd(II) oraz Au(III).



Rys. 2. Zależność współczynnika wydzielania jonów metali szlachetnych (10 ppm Au(III), Pd(II), Pt(IV), Rh(III)) z roztworu 0.1 M HCl, 0.1 M Zn(II) od czasu kontaktu faz.



Rys. 3. Zależność pojemności sorpcyjnej sorbentu z roztworu (0.1 M HCl, 0.1 M Zn(II), 10 ppm Au(III), Pd(II), Pt(IV), Rh(III)) od czasu kontaktu faz.

Wnioski: Po przeprowadzeniu odpowiednich badań, można stwierdzić, że otrzymany sorbent impregnowany Lewatit VP OC 1026+Aliquat 336 można wykorzystać do sorpcji jonów metali szlachetnych: Au(III), Pd(II), a w szczególności jonów Pt(IV), dla których współczynnik wydzielania jonów po 24 godzinach był największy i wynosił 96,82%. Obecność makroskładnika (jony cynku(II)) nie wpływała na osiągnięcie wysokich wartości współczynników wydzielania i pojemności sorpcyjnych dla jonów Au(III), Pd(II) i Pt(IV). W badanym układzie jony rodu(III) nie ulegały sorpcji.

Literatura:

1. H. Schmidbaur, J. L. Cihonski, Encyclopedia of Physical Science and Technology 3rd ed., Academic Press, 2003.
2. T. E. Graedel, G. Gunn, L. Tercero Espinoza, L., Critical Metals Handbook, John Wiley & Sons, 2013.
3. J. Willner, A. Fornalczyk, Przemysł Chemiczny, 91/4 (2012) 517.
4. A. Warshawsky, J.L. Cortina, Ion Exchange and Solvent Extraction, CRC Press, Boca Raton 1997.

POSZUKIWANIA SKUTECZNYCH METOD USUWANIA POZOSTAŁOŚCI LEKÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH NA BAZIE PLATYNY ZE ŚCIEKÓW SZPITALNYCH

K. MORLO, J. DOBRZYŃSKA, R. DOBROWOLSKI, UMCS, Wydział Chemii, Instytut Nauk Chemicznych, Katedra Chemii Analitycznej, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin

Abstrakt: W pracy przedstawiono procedurę otrzymywania biosorbentu i biowęgla ze zboin pszczelich oraz ich charakterystykę fizykochemiczną. Omówiono optymalizację procesu adsorpcji cisplatyny z modelowych roztworów wodnych na otrzymanych materiałach. W tym celu zbadano wpływ pH oraz czasu kontaktu faz na adsorpcję cisplatyny. Ponadto wyznaczono maksymalne pojemności adsorpcyjne cisplatyny na uzyskanych adsorbentach.

Wprowadzenie: Nowotwory są uważane za drugą najczęstszą przyczynę zgonów na świecie. Według Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (IARC) do 2040r. na całym świecie zostanie zdiagnozowanych 30,2 mln nowych przypadków nowotworów, a liczba zgonów przekroczy 16 mln. Konsekwencją zwiększenia liczby zdiagnozowanych nowotworów będzie wzrost stosowania leków cytostatycznych. Terapeutyki te są projektowane i stosowane w celu wywołania dysfunkcji komórek. Ich działanie polega na hamowaniu wzrostu komórek nowotworowych w skutek zmian ich metabolizmu oraz blokady procesu podziału i reprodukcji komórek. Do najczęściej stosowanych chemioterapeutyków (~70%) należą związki syntezowane na bazie platyny. Na przestrzeni ostatnich 50 lat zaprojektowano wiele cytostatyków zawierających w swoim składzie jony platyny, ale tylko kilka z nich uzyskało międzynarodową zgodę na dopuszczenie do obrotu, tj. cisplatyna, karboplatyna, oksaliplatyna, nedaplatyna, heptaplatyna i laboplatyna. Wśród nich najistotniejszym cytostatykiem jest cisplatyna, która wykorzystywana jest w leczeniu aż około 50% pacjentów z różnym typem nowotworów, w tym jąder, pęcherza moczowego, jajników, piersi, głowy, płuc, a także nowotworu krwi [1,2]. Ponieważ cisplatyna nie jest biodostępna po podaniu doustnym musi być podawana we wlewie dożylnym o dużej objętości, zalecana dawka to 100 mg m^{-2} powierzchni ciała. W strumieniu krwi, gdzie stężenie chlorków jest stosunkowo wysokie cisplatyna nie wykazuje aktywności terapeutycznej. Działanie cytotoksyczne jest związane z szybką hydroлизą cisplatyny, po jej wprowadzaniu do komórki, gdzie ligandy chlorkowe są zastępowane kolejno przez cząsteczki wody, tworząc dodatnio naładowane molekuly. Te aqua-kompleksy (a w szczególności monoaquacisplatyna, $(\text{NH}_3)_2\text{PtCl}(\text{OH}_2)^+$) są bardzo reaktywne i mogą tworzyć wiązania kowalencyjne z zasadami w DNA. Końcowe addukty cisplatyna-DNA zawierają skoordynowane wiązania krzyżowe, które aktywują szereg procesów ostatecznie prowadzących do śmierci komórki. Niestety efekt terapeutyczny cisplatyny nie jest specyficzny wyłącznie dla komórek nowotworowych, ale ma wpływ na wszystkie komórki organizmu, powodując niekorzystne skutki uboczne, takie jak uszkodzenie nerek, wątroby, układu pokarmowego, nerwowego, krwiotwórczego i skóry. Dodatkowo liczne badania farmakokinetyczne wykazały, że w ciągu 24 godz. od infuzji dożylnej pacjenci wydalają 10-40% całkowitej podanej dawki cisplatyny wraz

z moczem w postaci niezmienionej lub w formie metabolitów (głównie monoaquacisplatyny). Według ostatnich doniesień związki te są tylko częściowo (51-64%) usuwane ze ścieków szpitalnych w wyniku adsorpcji na osadzie czynnym, pozostałość (27-34%) jest odprowadzana do ścieków komunalnych. Ogólnoeuropejskie badania wykazały obecność cytostatyków syntezowanych na bazie platyny i ich metabolitów w stężeniach od kilkudziesięciu ng L^{-1} do kilkuset $\mu\text{g L}^{-1}$ w ściekach szpitalnych. Oprócz tego, w wyniku częstych zabiegów wykonywanych w warunkach pozaszpitalnych ścieki domowe stały się kolejnym źródłem zanieczyszczenia kompleksami platyny. Konwencjonalne podejścia polegające na wspólnym oczyszczaniu ścieków szpitalnych ze ściekami miejskimi w oczyszczalniach komunalnych nie obejmują monitorowania ani specjalnego oczyszczania wód z cytostatyków i produktów ich rozkładu. Istniejące procesy oczyszczania wstępnego (np. flotacja, koagulacja-flokulacja) okazały się niewystarczające do skutecznego usunięcia związków platyny ze względu na ich specyficzny charakter i niskie stężenie [1-3]. Cytostatyki na bazie platyny i ich metabolity są słabo biodegradowalne i zostają uwolnione do systemów lądowych oraz wodnych, powodując zanieczyszczenia na poziomie śladowym. Zarówno cytostatyki jak i ich metabolity charakteryzują się fetotoksycznością, genotoksycznością i teratogennością wobec komórek organizmów żywych chronicznie narażonych na ich długotrwałe działanie, dlatego niezbędne jest usuwanie tych związków bezpośrednio u źródła ich emisji. Co więcej, oczyszczanie ścieków ze związków zawierających platynę pozwala na jej odzyskiwanie. Ma to istotne znaczenie ze względu na jej wysoką wartość ekonomiczną i ograniczone zasoby naturalne. W literaturze opisano różne rodzaje metod uzdatniania wód i odzyskiwania metali szlachetnych. Jednak adsorpcja na biomateriałach wykazuje wiele korzyści w porównaniu z innymi metodami. Przede wszystkim zapewnia skuteczną ekstrakcję substancji toksycznych z roztworów zawierających ich niskie stężenia. W ostatnim czasie popularność zyskały materiały biogeniczne, takie jak trociny, kawa, algi i biowęgiel, jako potencjalne adsorbenty służące do usuwania zanieczyszczeń i związków toksycznych, w tym kompleksów platyny, ze środowiska. Nowymi i bardzo obiecującymi biosorbentami są biomasa ze zboin pszczelich, a także zsyntezowany z niej biowęgiel. Zboiny pszczele to naturalny odpad organiczny, który pochodzi z gospodarstw pszczelarских, obejmujący zużyte ramki pszczele. Szacuje się, że światowa roczna produkcja tego typu odpadów przekracza 55,5 tys. ton. Aktualnie zboiny pszczele nie są poddawane recyklingowi, a niewłaściwe zarządzanie tą biomasa może prowadzić do skażenia gleby i wód gruntowych substancjami toksycznymi (np. pestycydami), pozostałościami biologicznymi (grzybami, bakteriami). Dlatego produkcja biowęgla ze zboin pszczelich pozwoli częściowo rozwiązać ten problem. Warto dodać, że związki organiczne obecne w biomasie mogą być źródłem heteroatomów (O, N, S, P) stanowiących potencjalne centra adsorpcyjne wykazujące powinowactwo wobec kompleksów platyny [1,2,4,5].

Część eksperymentalna: W celu przygotowania biosorbentu zboiny pszczele w pierwszej kolejności poddano suszeniu w temperaturze 120°C przez dobę. Następnie surowiec zhomogenizowano i usunięto pozostałości metalowych drutów z ramek pszczelich. Tak przygotowany materiał przeniesiono do aparatu Soxhleta, gdzie w celu usunięcia pozostałości wosku przeprowadzono ekstrakcję heksanem. Otrzymany biosorbent oznaczono symbolem ZPH. Następnie z powstałego materiału zsyntezowano 2 biowęgla. Pierwszą część zboin impregnowano w 60% kwasie fosforowym(V) w temperaturze 200°C przez dobę. Otrzymany układ przeniesiono do pieca rurowego,

a następnie poddano procesowi pirolizy w obecności gazu obojętnego (N₂) w temperaturze 700°C. W dalszej kolejności z materiału węglowego odmywano wodą nadmiar kwasu fosforowego(V). Otrzymany biowęgiel wysuszono i oznaczono symbolem ZPH_H₃PO₄. Natomiast drugą część materiału ZPH przeniesiono bezpośrednio do kwarcowego pieca rurowego i poddano aktywacji fizycznej w temperaturze 820°C w atmosferze CO₂. Drugi biowęgiel oznaczono symbolem ZPH_CO₂ i wraz z biowęglem ZPH_H₃PO₄ oraz materiałem ZPH posłużyły jako adsorbenty w dalszej części eksperymentalnej. W celu optymalizowania warunków procesu adsorpcji cislplatyny na uzyskanych sorbentach zbadano wpływ pH początkowego na wielkość adsorpcji, a także określono czas ustalania się równowagi w układzie adsorbent-roztwór cislplatyny. Ponadto wyznaczono izotermy adsorpcji cislplatyny na trzech badanych materiałach. Proces adsorpcji cislplatyny prowadzono w układzie statycznym, przy dawce adsorbentu 0,5 g L⁻¹ o określonym pH i stężeniu początkowym adsorbentu. Wielkość adsorpcji określono z różnicy stężeń cislplatyny w roztworze wyjściowym i w stanie równowagi adsorpcyjnej. Oznaczenia platyny prowadzono techniką absorpcyjnej spektrometrii atomowej z atomizacją w piecu grafitowym (GF AAS).

Wyniki: W Tabeli 1 przedstawiono charakterystykę fizykochemiczną uzyskanych adsorbentów. Na podstawie otrzymanych danych można stwierdzić, że aktywacja chemiczna i fizyczna materiału ZPH pozwala znacznie rozwinąć powierzchnię właściwą, jest to szczególnie widoczne dla biowęgla ZPH_H₃PO₄. Dodatkowo modyfikacja kwasem fosforowym(V) pozwala na ponad czterokrotne zwiększenie ilości fosforu w stosunku do materiałów ZPH i ZPH_CO₂, nadając mu charakter kwasowy potwierdzony wartością pH_{sf}. Natomiast na powierzchni biowęgla aktywowanego CO₂ znajduje się potas, który jest wynikiem kondensacji związków nieorganicznych podczas syntezy materiału wyjściowego i nadaje temu adsorbentowi charakter zasadowy.

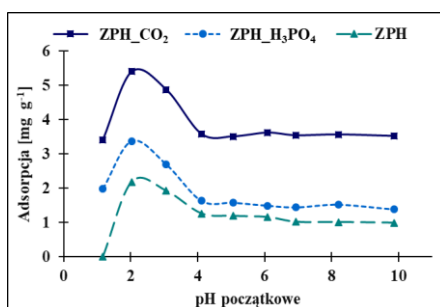
Tabela 1. Charakterystyka fizykochemiczna uzyskanych biomateriałów.

Materiał	Parametry porowatości			pH _{KCl}	Skład pierwiastkowy (XPS)				
	S _{BET} [m ² g ⁻¹]	V _T [cm ³ g ⁻¹]	d _{BH} [nm]		C [wt. %]	N [wt. %]	O [wt. %]	P [wt. %]	K [wt. %]
ZPH	3,7±0,9	0,02±0,01	18,3±0,9	5,1±0,1	71,9±2,7	5,3±0,13	21,4±0,85	1,4±0,1	<LOD
ZPH_H ₃ PO ₄	612±17	0,41±0,08	3,9±0,3	3,4±0,2	67,8±2,7	3,6±0,3	19,8±1,1	8,8±0,4	<LOD
ZPH_CO ₂	248±10	0,24±0,01	4,3±0,2	9,6±0,1	70,7±1,6	4,4±0,2	18,4±0,6	1,6±0,3	4,9±0,5

S_{BET} – powierzchnia właściwa, V_T – całkowita objętość porów, d_{BH} – średnica porów, pH_{sf} – pH 5 mL 0,001 mol L⁻¹ KCl będącego w stanie równowagi z 20 mg badanego biomateriału, LOD – granica wykrywalności.

Wielkości adsorpcji cislplatyny na uzyskanych materiałach ZPH, ZPH_H₃PO₄ i ZPH_CO₂ badano w zakresie pH początkowego 1-10. Dla trzech badanych układów adsorpcyjnych ww. adsorbentów zaobserwowano podobny przebieg zależności wpływu pH na wielkość adsorpcji cislplatyny (Rys. 1). Największą wielkość adsorpcji można zauważyć przy wartości pH początkowego równej 2. Natomiast po osiągnięciu maksimum obserwuje się spadek adsorpcji aż do wartości pH≈4, po której wielkość adsorpcji pozostaje na stałym poziomie w szerokim zakresie pH. Biorąc pod uwagę adsorbenty ZPH i ZPH_H₃PO₄ większą zdolnością adsorpcji wykazuje się biowęgiel ZPH_H₃PO₄ ze względu na znacznie większą powierzchnię właściwą i specyficzne centra aktywne,

w których skład może wchodzić fosfor. Dla obu tych adsorbentów pH równowagowe jest bliskie pH początkowemu, w odróżnieniu do biowęgla ZPH_CO₂, który przy pH początkowym równym 2, po kontakcie z roztworem adsorbentu osiąga pH równowagowe 4,6. Przy tej wartości pH cisplatyna występuje w postaci zhydrolizowanej, tj. monoaquacisplatyny, która jest bardziej reaktywna niż cisplatyna, co może wyjaśniać większą wielkość adsorpcji dla materiału ZPH_CO₂.



Rys. 1. Wpływ pH początkowego na wielkość adsorpcji cisplatyny na biomateriałach ZPH, ZPH_H₃PO₄ i ZPH_CO₂, m = 20 mg, V = 5 mL, C_{cisplatyny} = 12 mg L⁻¹.

Badania kinetyki adsorpcji cisplatyny na uzyskanych materiałach prowadzono przy pH≈2, przy stężeniu początkowym adsorbentu 25 mg L⁻¹. Adsorpcja cisplatyny dla wszystkich adsorbentów zachodziła w dwóch etapach, pierwszy szybki przebiegający w pierwszych 15 min. po kontakcie z roztworem adsorbentu, a drugi znacznie wolniejszy związany prawdopodobnie z powolną wymianą ligandów w kompleksie platyny, a także zaburzeniami sterycznymi i utlenieniem Pt(II) do Pt(IV). Maksymalna pojemność adsorpcyjna cisplatyny na badanych materiałach wynosi 15 mg g⁻¹, 21 mg g⁻¹, 45 mg g⁻¹ odpowiednio dla ZPH, ZPH_H₃PO₄ i ZPH_CO₂.

Wnioski: Podsumowując, w wyniku aktywacji CO₂ i H₃PO₄ uzyskuje się biowęgłe o zróżnicowanej strukturze porowatej, chemii powierzchni, które charakteryzują się dobrymi właściwościami adsorpcyjnymi w stosunku do cisplatyny. Badane sorbenty mogą być potencjalnie wykorzystane do usuwania pozostałości i metabolitów leków przeciwnowotworowych syntezowanych na bazie platyny ze ścieków szpitalnych.

Literatura:

1. Y. Roque-Diaz, M. Sanadar, D. Han, et al. Processes, 9, (2021), 1873.
2. K. Folems., A. Abebe, J. Tang, Environmental Chemistry, 15, (2018), 506.
3. M.R. Khaksar, Y. Ghafari, A.R. Yari, Health Scope, 12, (2023).
4. R.M. Corts, M. A. Gómez-Sánchez, R. P. Sánchez, SJAR, 2, (2010), 493.
5. P. Calatayud-Vernich, F. Calatayud, E. Simó, Environmental Pollution, 241, (2018) 106.

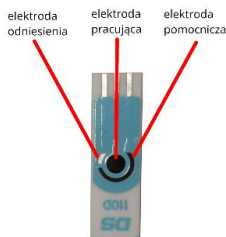
WOLTAMPEROMETRYCZNA METODA OZNACZANIA Pb(II) PRZY UŻYCIU ELEKTRODY SITODRUKOWANEJ MODYFIKOWANEJ NANORURKAMI I BŁONKĄ MIEDZI

A. WAWRUCH, M. GRABARCZYK, UMCS, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Katedra Chemii Analitycznej, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 2, 20-031 Lublin

Abstrakt: W niniejszej pracy zaproponowano wykorzystanie anodowej woltamperometrii strippingowej (ASV) z zastosowaniem elektrody sitodrukowanej modyfikowanej nanorurkami i błonką miedzi (CuF/MWCNTs/SPCE) w procedurze oznaczania śladowych ilości Pb(II). Parametry wpływające na wyniki pomiarów takie jak stężenie elektrolitu podstawowego, stężenie metalu tworzącego błonkę, potencjał i czas nagromadzenia, czas i amplituda impulsu, czy wpływ surfaktantów zostały zbadane i zoptymalizowane.

Wprowadzenie: Ołów to metal należący to 14. grupy układu okresowego, stanowiący 0,0014% skorupy ziemskiej, występujący naturalnie głównie w formie galeny PbS. Znalazł zastosowanie w różnych procesach przemysłowych np. galwanizacji czy w przemyśle papierniczym. Może się akumulować w wodzie i glebie co stanowi zagrożenie dla naszego zdrowia, ponieważ wszystkie jego związki są toksyczne [1]. Nagromadzenie ołowiu w ludzkim organizmie może prowadzić do wystąpienia nowotworów, zaburzenia pracy wątroby czy problemów z układem krążenia, dlatego tak istotne są metody analityczne pozwalające na określenie ilości ołowiu w środowisku [2]. Na dokonanie tego w łatwy sposób pozwalają nam metody wykorzystujące sprzęt niedużych rozmiarów, głównie metody elektrochemiczne. Zaproponowana procedura opiera się na metodzie anodowej woltamperometrii strippingowej i wykorzystuje ona elektrodę sitodrukowaną, która mimo swoich niewielkich rozmiarów zawiera trzy elektrody niezbędne w pomiarach woltamperometrycznych. Uzyskiwane wyniki są zależne od wielu parametrów, najważniejsze z nich zostały zoptymalizowane.

Część eksperymentalna: Do przeprowadzenia badań wykorzystano analizator elektrochemiczny Autolab PGSTAT 10 oraz elektrodę sitodrukowaną DropSens DRP-110CNT. Rysunek 1 przedstawia zastosowaną elektrodę.



Rys. 1. Elektroda sitodrukowana wykorzystana w zaproponowanej metodzie.

Elektrodą pracującą jest elektroda węglowa zmodyfikowana przez producenta nanorurkami węglowymi z grupami karboksylowymi. Każdorazowo przed pomiarem jej powierzchnia była dodatkowo modyfikowana poprzez nałożenie *in situ* filmu miedzi. Elektroda pomocnicza to elektroda węglowa, elektrodą referencyjną jest elektroda srebrowa. Zastosowane naczynko voltamperometryczne miało objętość 10 mL. Badany roztwór nie był odtleniany. Przed każdym pomiarem elektrodę czyszczono elektrochemicznie poprzez przyłożenie potencjału +0,4 V na 10 s. Początkowo przyjęto następujące parametry: potencjał nagromadzenia -0,8 V, czas nagromadzenia 60 s, czas impulsu 2 ms, amplituda impulsu 120 mV. Sygnał rejestrowano zmieniając potencjał elektrody pracującej od -0,7 V do -0,35 V. Wysokość pików na uzyskanym w ten sposób voltamperogramie była wprost proporcjonalna do stężenia jonów Pb(II) w roztworze. Przygotowywano roztwór badany zawierający znane stężenie Pb(II), Cu(II) oraz HCl i przeprowadzano serie pomiarów za każdym razem modyfikując inny parametr i badając jego wpływ na sygnał uzyskiwany od ołowiu. Dokonano optymalizacji stężenia elektrolitu podstawowego, stężenia Cu(II), potencjału i czasu nagromadzenia oraz czasu i amplitudy impulsu. Sprawdzone także wpływ substancji interferujących takich jak surfaktant niejonowy Triton X-100, surfaktant anionowy SDS, surfaktant kationowy CTAB, kwasy humusowe HA, kwasy fulwowe FA oraz naturalna materia organiczna NOM.

Wyniki: Wykazano eksperymentalnie, że w przypadku roztworu badanego niezawierającego Cu(II) nie otrzymujemy sygnału ołowiu, ponieważ ołów nie nagromadza się bezpośrednio na powierzchni elektrody MWCNTs/SPCE. Piki od jonów ołowiu pojawiają się tylko wtedy, gdy jony Cu(II) są obecne w roztworze. Dzięki utworzeniu warstwy miedzi na powierzchni elektrody możliwa była akumulacja ołowiu. Bazując na wcześniejszych pracach na elektrolit podstawowy wybrano kwas solny [3]. Zoptymalizowane zostało jego stężenie, testowano stężenia w zakresie 0,05 – 0,4 M. Badania przeprowadzono na roztworze zawierającym $1,2 \times 10^{-5}$ M Cu(II), 5×10^{-8} M Pb(II) i odpowiednie ilości HCl. Piki ołowiu otrzymywane w całym badanym zakresie były podobnej wielkości i kształtu, ze względu na zapewnianie najbardziej stabilnego pH dalsze badania prowadzono przy stężeniu HCl wynoszącym 0,4 M. Kolejnym badanym parametrem było stężenie Cu(II). Przygotowano roztwór zawierający 0,4 M HCl i 1×10^{-8} M Pb(II), a następnie dodawano kolejne porcje Cu(II), sprawdzając zakres jego stężeń od 1×10^{-5} M do 1×10^{-4} M. Po każdym dodatku Cu(II) rejestrowano voltamperogram i mierzono prąd pikowy ołowiu. Zaobserwowano początkowy wzrost sygnału od ołowiu przy wzroście stężenia miedzi do poziomu 6×10^{-5} M, następnie między 6×10^{-5} M a 8×10^{-5} M sygnał jest praktycznie stały, przy wyższych stężeniach zaczyna powoli maleć. Do dalszych badań stosowano dodatek 40 μ l roztworu wzorcowego 1 g/L Cu(II), dzięki czemu w roztworze badanym uzyskiwano stężenie $6,3 \times 10^{-5}$ M. Potencjał nagromadzenia przetestowano w zakresie od -1,1 V do -0,5 V. Na podstawie uzyskanych wyników, jako optymalny uznano potencjał -0,7 V, ponieważ zapewniał otrzymanie najwyższych i najbardziej symetrycznych pików. Równie ważnym parametrem etapu nagromadzenia jest czas jego trwania. Dokonano pomiarów dla czasów z zakresu 0 – 1020 s. Zaobserwowano, że im dłuższy czas tym większa wartość sygnału, ale nachylenie uzyskanej krzywej maleje dla czasów powyżej 600 s. Optymalizację przeprowadzono także dla parametrów techniki rejestracji sygnału takich jak czas i amplituda impulsu. Czas sprawdzono w zakresie 2-20 ms i stwierdzono zmniejszenie wartości uzyskiwanego

sygnału wraz z rosnącym czasem trwania impulsu. W przypadku badania amplitudy zmieniano jej wartość w zakresie 20-200 mV. Zaobserwowano początkowo wzrost sygnału uzyskiwanego od ołowiu, następnie przy amplitudach od 120 do 160 mV sygnały były porównywalne, powyżej 160 mV ich wartość zaczęła się zmniejszać. Używając zoptymalizowanych wcześniej parametrów przeprowadzono pomiary w celu wyznaczenia krzywej kalibracyjnej. Przygotowano roztwór zawierający $6,3 \times 10^{-5}$ M Cu(II) i 0,4 M HCl. Przy zastosowaniu czasu nagromadzenia 120 s zależność liniową uzyskano dla stężeń ołowiu od 5×10^{-10} M do 5×10^{-7} M. Równanie krzywej kalibracyjnej ma postać $y = 5 \times 10^8 x + 13,02$, gdzie y to natężenie prądu pikowego (μ A), a x to stężenie Pb(II) (M). Wyznaczono wartości LOD i LOQ, wynoszą odpowiednio $1,2 \times 10^{-10}$ M oraz $3,6 \times 10^{-10}$ M. Sprawdzone także podatność metody na wpływ substancji interferujących: SDS, Tritonu X-100, CTAB, HA, FA oraz NOM. Mierzono wielkość natężenia prądu pikowego ołowiu, obecnego w roztworze w stężeniu 3×10^{-8} M, po kolejnych dodatkach substancji powierzchniowo czynnej. Sprawdzone zakres stężeń substancji interferujących od 0,1 do 5 mg/L dla każdej z nich. Otrzymane wyniki względnej wielkości sygnału ołowiu w obecności różnych stężeń substancji interferujących przedstawia Tabela 1. Jak można zauważyć największy wpływ na sygnał ołowiu miało CTAB, powodując praktycznie jego zanik przy stężeniu 5 mg/L.

Tabela 1. Względna wielkość sygnału ołowiu w zależności od stężenia substancji powierzchniowo czynnej.

Stężenie interferenta [ppm]	Względna wielkość sygnału ołowiu [%]					
	SDS	Triton X-100	CTAB	HA	FA	NOM
0	100%	100%	100%	100%	100%	100%
0,1	101%	105%	100%	112%	88%	97%
0,2	95%	109%	86%	118%	87%	95%
0,5	108%	106%	63%	113%	90%	92%
1	72%	104%	42%	99%	91%	90%
1,5	72%	103%	30%	86%	90%	87%
2	69%	95%	21%	74%	91%	84%
3	77%	80%	12%	66%	92%	79%
5	59%	71%	5%	52%	91%	70%

Wnioski: Opracowano i zoptymalizowano procedurę oznaczania śladowych ilości Pb(II) za pomocą anodowej woltamperometrii strippingowej (ASV) z zastosowaniem elektrody sitodrukowanej modyfikowanej nanorurkami i błonką miedzi. Wyznaczone optymalne parametry to stężenie miedzi $6,3 \times 10^{-5}$ M Cu(II), stężenie będącego elektrolitem podstawowym HCL 0,4 M, potencjał nagromadzenia -0,7 V, amplituda impulsu 120 mV, czas impulsu 2 ms. Uzyskano niską granicę wykrywalności wynoszącą $1,2 \times 10^{-10}$ M. Zaletą zaproponowanej metody jest także jej prostota i niskie koszty analizy. Nie wymaga skomplikowanej aparatury, dlatego wydaje się umożliwiać przeprowadzenie analizy w warunkach terenowych.

Literatura:

1. A. Bielański „Podstawy chemii nieorganicznej. Tom 2” PWN, Warszawa (2013).
2. N.H. Pratiwi, M.Y. Azis, D.A. Setyorini, R.S. Rahayu, Anal. Bioanal. Electrochem., 14 (2022) 331.
3. J. Wasąg, M. Grabarczyk, Materials, 14 (2021) 5148.

OCZYSZCZANIE OKSYDAZY ALKOHOŁOWEJ Z WYKORZYSTANIEM METOD CHROMATOGRAFICZNYCH

S. STEFANEK, G. JANUSZ, UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademicka 19, 20-400 Lublin

Abstrakt: Metody chromatograficzne pozwalają na oczyszczenie białek z wysoką rozdzielczością. Najczęściej stosowanymi technikami prowadzącymi do oczyszczenia cząsteczek biologicznych to chromatografia jonowymienna (IEC), chromatografia oddziaływań hydrofobowych (HIC), chromatografia powinowactwa (AC), czy chromatografia sączenia molekularnego (SEC). Dobór odpowiedniej metody oczyszczania zależy od wielu czynników, głównie od właściwości fizykochemicznych i biologicznych. Oksydaza alkoholowa (AOX) otrzymywana w szczególności z grzybów podstawkowych jest niestabilnym enzymem i szybko ulega degradacji, tracąc aktywność enzymatyczną. Dlatego tak ważną kwestią podczas przeprowadzenia procesu oczyszczania AOX jest dobór odpowiedniej chromatografii przy zachowaniu jej aktywności enzymatycznej.

Wprowadzenie: Oksydaza alkoholowa [E.C. 1.1.3.13] (AOX) należy do rodziny oksydaz glukozowo-metanolowo-cholinowych (GMC) [1,2]. Enzym ten jest oktamerem, gdzie każdy z pojedynczych monomerów ma masę cząsteczkową od 72,4 do 79 kDa [2]. Produkowana jest głównie przez grzyby podstawkowe oraz drożdże metylotroficzne. Charakterystyczną reakcją, którą przeprowadza AOX jest utlenianie alkoholi pierwszorzędowych do odpowiednich aldehydów. Typowym substratem w jej reakcji jest metanol, który utlenia do aldehydu mrówkowego. Reakcje prowadzące do otrzymywania różnorodnych aldehydów poprzez utlenianie odpowiednich alkoholi mogą być z powodzeniem wykorzystywane do celów przemysłowych [1]. Niestety głównym problemem w pracy z większością enzymów jest ich niska stabilność. Podczas długotrwałego przechowywania mogą tracić one swoje zdolności katalityczne. Dlatego tak ważnym aspektem w pracy nad nimi jest dobór odpowiedniej metody oczyszczania, tak by straty aktywności były jak najmniejsze [3]. Jak donoszą dane literaturowe, najczęstszymi metodami oczyszczania omawianej w tym rozdziale oksydazy alkoholowej są metody precipitacji z użyciem wysokich stężeń siarczanu amonu $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ lub glikolu polietylenowego (PEG). Jako drugi etap oczyszczania AOX wykorzystywane są techniki chromatograficzne, takie jak chromatografia oddziaływań hydrofobowych (HIC), jonowymienna (IEC) oraz sączenia molekularnego (SEC) [4]. Chromatografia oddziaływań hydrofobowych (HIC) jest często wykorzystywana jako pierwszy etap oczyszczania, w większości poprzedzona dodatkową precipitacją z wykorzystaniem siarczanu amonu. HIC stosuje się do oczyszczania białek na podstawie różnic w sile oddziaływań obszarów hydrofobowych białek z bardziej hydrofobowymi grupami ligandów. Zwykle w takich metodach używane są bufony o wysokiej sile jonowej (ok. 1.5 M siarczanu amonu), wówczas uwalnianie białek zachodzi poprzez ich wymywanie buforem o zmniejszającej się zawartości soli [3,5]. Metoda chromatografii HIC jest korzystnym wyborem jako pierwszy etap oczyszczania oksydazy alkoholowej, przede wszystkim ze względu na duże zawartości soli siarczanu amonu w próbce po wytrącaniu tą solą białek, które dodatkowo mogą podnosić stabilność enzymatyczną AOX. W literaturze jednak

najczęściej używaną metodą do oczyszczania oksydazy alkoholowej jest sączenie molekularne (SEC), nazywane czasem filtracją żelową. Tej typ chromatografii wykorzystuje różnice w masach cząsteczkowych związków do ich rozdziału. Niepodważalną zaletą tej metody jest fakt, iż warunki rozdziału są dobierane typowo pod próbkę, z tego względu, że skład buforu nie wpływa na rozdział, a cząsteczki nie wiążą się z nośnikiem chromatograficznym. Ta metoda jest niezwykle korzystna przy oczyszczaniu białek, które są wrażliwe na zmiany pH lub występowanie jonów [3]. Daniel i wsp. oraz inni badacze często w procesie oczyszczania oksydazy alkoholowej używali chromatografii jonowymiennej [6]. W tej metodzie wykorzystuje się różnice w wartości ładunku powierzchniowego białek polegającej na odwracalnej wymianie jonowej z wymienniczem jonowym o przeciwnym ładunku [3]. Ze względu na to, iż AOX jest białkiem z przeważającymi ładunkami ujemnymi stosuje się do tego typu rozdziału chromatografię anionowymienną z wykorzystaniem takich ziół jak DEAE-Sephadex lub DEAE-celuloza. Kolumny te zawierają dodatkowo naładowane grupy dietyloaminoetylowe (DEAE), co usprawnia rozdzielanie oksydazy alkoholowej od innych związków występujących w próbce [3,7].

Literatura

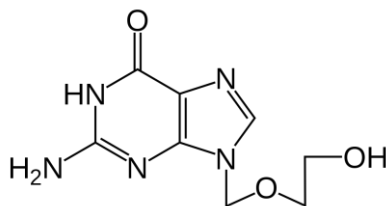
1. H.J. Danneel, J. Biotechnol., 33 (1994) 33.
2. A. Pawlik, S. Stefanek, G. Janusz, Int. J. Molec. Sci., 23 (2022).
3. M. Rosiński, D. Piasecka-Kwiatkowska, J.R. Warchalewski, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 3(44) (2005) 5.
4. N. Mangkorn, P. Kanokratana, N. Roongsawang, N. Laosiripojana, V. Champreda, Protein Expression Purif., 150 (2018) 26.
5. J.C. McCue, Methods Enzymology, (2009) 405.
6. G. Daniel, J. Volc, L. Filonova, O. Plihal, E. Kubátová, P. Halada, Appl. Environ. Microbiol., 73(19) (2007) 6241.
7. P. Ozimek, M. Veenhuis, I.J. Klei, FEMS Yeast Research, 5 (2005) 975.
8. P. Goswami, S.S.R. Chinnadayala, M. Chakraborty, A.K. Kumar, A. Kakoti, Appl. Microbiol. Biotech., 97 (2013) 4259.

WYKORZYSTANIE CZUJNIKÓW SITODRUKOWANYCH W WOLTAMPEROMETRYCZNEJ PROCEDURZE OZNACZANIA ZWIĄZKU PRZECIWWIRUSOWEGO – ACYKLOWIRU

K. STANIEC, K. TYSZCZUK-ROTKO, A. KELLER, D. GORYLEWSKI, UMCS, Wydział Chemii, Instytut Nauk Chemicznych, Katedra Chemii Analitycznej, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin

Abstrakt: W poniższej pracy scharakteryzowano acyklowir, który jest jednym z najpopularniejszych leków stosowanych wobec wirusów *Herpes simplex* (wirus opryszczki pospolitej) typu 1 i 2 (HSV-1, HSV-2) oraz *Varicella-zoster* (VZV, wirus ospy wietrznej i półpaśca). Przedstawiono również informacje na temat czujników sitodrukowanych, które ze względu na swoje zalety – przede wszystkim miniaturyzacja układu, mogą być stosowane w analizie terenowej. Porównano także woltamperometryczne procedury oznaczania acyklowiru z wykorzystaniem klasycznych układów trój-elektrodowych jak i czujników sitodrukowanych.

Wprowadzenie: Wirus opryszczki pospolitej typu 1 (HSV-1) oraz typu 2 (HSV-2) z rodziny *Herpesviridae* to jedne z najpowszechniejszych patogenów na świecie. Zakażenie objawia się bolesnymi pęcherzami na różnych obszarach ciała, zwykle w okolicy ust. Wirusy z tej rodziny mają zdolność do wywoływania infekcji utajonych – po wnikięciu do ciała HSV pod wpływem odpowiednich bodźców może się aktywować a po zakażeniu przejść w stan hibernacji. Przebieg zakażenia wirusami HSV-1 lub HSV-2 często jest łagodny, jednak w celu skrócenia czasu infekcji, zmniejszenia jej objawów oraz minimalizacji ryzyka zakażenia innych osób stosuje się terapię wykorzystującą związki biologicznie czynne o działaniu przeciwwirusowym. Jednym z najpopularniejszych leków stosowanych w leczeniu opryszczki pospolitej jest acyklowir [1,2]. Acyklowir (ACV, 2-amino-9-[(2-hydroksyetoksy)metylo]-3,9-dihydro-6H-puryn-6-on) to acykliczny analog guanozyny o wzorze ogólnym $C_8H_{11}N_5O_3$ i masie molowej 225,20 g/mol (Rys. 1). Jest to lek z grupy inhibitorów polimerazy DNA. Pierwszy lek zawierający acyklowir został zarejestrowany przez FDA (Agencja Żywności i Leków, USA) w 1982 rok pod handlową nazwą Zovirax®. W temperaturze pokojowej występuje on w formie białego, krystalicznego proszku [3].



Rys 1. Wzór strukturalny acyklowiru.

Przeciwwirusowe działanie ACV wynika z hamowania replikacji wirusa. Mechanizm działania ACV oparty jest na podobieństwie tego leku do jednego nukleozydów (deok-

syguanozyna). Acyklowir działa jako termiantor łańcucha, tzw. „falszywy substrat” [4]. Dzięki działaniu enzymu wirusowej polimerazy, lek w postaci trifosforanu zostaje przyłączony do nowopowstającej nici DNA. Wbudowanie aktywnej formy ACV do łańcucha DNA wirusa zamiast deoksyguanozyny blokuje dalsze wydłużanie łańcucha i w wyniku tego namnażanie wirusa w organizmie zostaje zahamowane. Acyklowir ceniony jest za wysoką selektywność i niską toksyczność, co oznacza, że należy do leków wywołujących najmniej szkodliwe skutki uboczne [5]. Jedną z metod stosowanych do oznaczania zawartości ACV w m.in. próbkach biologicznych i wyrobach farmaceutycznych może być woltamperometria. W procedurach woltamperometrycznych do pomiarów można wykorzystywać klasyczne układy trójelektrodowe (składające się z elektrody pracującej, odniesienia i porównawczej) jak i zespolone czujniki sitodrukowane (SPEs), które w ostatnich latach cieszą się dużą popularnością. Technika sitodruku polega na zaprojektowaniu składu tuszu, a następnie naniesieniu go przez odpowiedni szablon na powierzchnię obojętnego podłoża [6]. Zastosowanie tej techniki pozwala na produkowanie elektrod w powtarzalnym, tanim i jednorazowym formacie, a dodatkowo miniaturyzacja układu pomiarowego pozwala na zastosowanie SPEs w analizatorach przenośnych. Czujniki sitodrukowane można poddawać modyfikacji poprzez zmianę składu tuszu, np. SPEs modyfikowane nanorurkami węglowymi, grafenem. Powierzchnię elektrody można również modyfikować nanosząc na jej powierzchnię błonkę metalu czy polimeru [7].

Część eksperymentalna: Podczas badań wykorzystywano statyw elektrodowy firmy MTM Anko (Polska) oraz analizator elektrochemiczny μ Autolab firmy Eco Chemie (Holandia) wraz z oprogramowaniem GPES 4.9. pomiary prowadzono w klasycznym naczynku elektrochemicznym o pojemności 10 mL. Jako układ pomiarowy wykorzystano dostępne w handlu sitodrukowane elektrody węglowe (Metrohm DropSens, Hiszpania) aktywowane w $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ roztworze NaOH.

Wyniki: Opracowano wiele procedur analizy ACV w próbkach o różnej matrycy pomocą technik woltamperometrycznych [2,8-13]. Porównanie wyników oznaczeń ACV z wykorzystaniem różnych procedur zestawiono w tabeli 1. Jako elektrolity podstawowe stosowano różne roztwory: bufor octanowy [2], bufor PBS [8,10,11], bufor fosforanowy [9] oraz dobrze przewodzący roztwór buforowy ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$, CH_3COOH oraz NH_4Cl) [13]. W procedurze opisanej w publikacji [12] jako elektrolit podstawowy zastosowano roztwór zasady sodowej. Podczas procedur prowadzonych w klasycznych zespołach trójelektrodowych jako elektrodę pracującą wykorzystywano modyfikowaną elektrodę z węgla szklistego [2,9,10,12] i pastową elektrodę węglową [8,11].

Tabela 1. Zestawienie woltamperometrycznych procedur oznaczania ACV.

Elektroda (Technika)	LOD [nmol L^{-1}]	Analizowane próbki	Literatura
PEBT/GCE (DPV)	12,0	Surowica krwi ludzkiej, wyroby farmaceutyczne	[2]
β -CD/TiO ₂ NPs–CPE (DPV)	21,0	Surowica krwi ludzkiej	[8]
rGO–TiO ₂ –Au/GCE (LSV)	300,0	Wyroby farmaceutyczne	[9]
SWNT/Naf/GCE (LSV)	1,0	Mocz ludzki	[10]
NC/GPE (SWAdSV)	0,2	Mocz ludzki, wyroby farmaceutyczne	[11]

GCE/TFM (LCAdSV)	1,0	Syntetyczne próbki zawierające ATP oraz DNA	[12]
aSPCE (DPAAdSV)	0,12	Wyroby farmaceutyczne	[13]

Techniki: DPV – woltamperometria impulsowo różnicowa, LSV – woltamperometria z liniową zmianą potencjału, SWAdSV – adsorpcyjna strippingowa woltamperometria fali prodtokątnej, LCAdSV – liniowa cykliczna adsorpcyjna woltamperometria strippingowa, DPAAdSV – impulsowo różnicowa adsorpcyjna woltamperometria strippingowa. Elektrody: PEBT/GCE – elektroda z węgla szklanego modyfikowana filmem polimerowym czerni eriochromowej T, β -CD/TiO₂ NPs-CPE – pastowa elektroda węgla modyfikowana nanocząsteczkami ditlenku tytanu i β -cyklodekstryną, rGO-TiO₂-Au/GCE – elektroda z węgla szklanego modyfikowana nanokompozytem składającym się z zredukowanego tlenku grafenu, nanocząsteczek ditlenku tytanu i nanocząsteczek srebra, SWNT/Naf/GCE – elektroda z węgla szklanego modyfikowana jednościnnymi nanorurkami węglowymi i błonką nafionu, NC/GPE – pastowa elektroda węgla modyfikowana nanogliną, GCE/TFM – elektroda z węgla szklanego modyfikowana cienkim filmem rtęci, aSPCE – aktywowana elektrochemicznie sitodrukowana elektroda węgla

Opracowana procedura wykorzystująca zespolony czujnik sitodrukowany jest jedyną znaną nam procedurą oznaczania ACV z wykorzystaniem niemodyfikowanej SPCE. Podczas badań optymalizowano parametry takie jak: rodzaj elektrolitu podstawowego, jego pH oraz stężenie. Charakterystyka procesu elektrodowego wykazała, że jest on kontrolowany zarówno przez dyfuzję jak i adsorpcję. Następnie zoptymalizowano parametry techniki takie jak szybkość skanowania, amplituda i czas modulacji. Zoptymalizowane warunki pomiaru przedstawiono w tabeli 2 [13].

Tabela 2. Zoptymalizowane warunki pomiaru ACV z wykorzystaniem aSPCE [13].

Elektrolit podstawowy	0,075 mol L ⁻¹ bufor (CH ₃ COONH ₄ , CH ₃ COOH oraz NH ₄ Cl) o pH= 4,2
Technika rejestracji sygnału	DPAAdSV (impulsowo różnicowa adsorpcyjna woltamperometria strippingowa)
Potencjał i czas nagromadzenia ACV	-0,1 V przez 60 s
Szybkość skanowania	250 mV s ⁻¹
Amplituda	150 mV
Czas modulacji	6 ms

Wnioski: W literaturze można znaleźć wiele procedur woltamperometrycznych wykorzystywanych do oznaczania ACV w wyrobach farmaceutycznych [2,9,11,13] oraz próbkach biologicznych takich jak surowica krwi [2,8] oraz mocz [10,11]. Najniższą granicę wykrywalności uzyskano przy zastosowaniu aktywowanej elektrochemicznie sitodrukowanej elektrody węglowej aSPCE [13]. Przeprowadzone badania wykazały, że woltamperometria strippingowa jest czułą metodą analizy ilościowej, a wykorzystanie czujników sitodrukowanych daje potencjalną możliwość zastosowania jej w analizatorach przenośnych.

Literatura:

1. A. Majewska, B. Młynarczyk-Bonikowska, *Int. J. Mol. Sci.*, 23 (2022) 3431.
2. P. S. Dorraji, F. Jalali, *Mater. Sci. Eng.: C.*, 61 (2016) 858.
3. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acyclovir>.
4. P. Graham, tłum. M.Zajac, *Chemia medyczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.
5. Y.P. Wei, L.Y. Yao, Y.Y. Wu, *Molecules*, 26 (2021) 6566.

6. W. Wahyuni, B. Putra, A. Fauzi, D. Ramadhanti, E. Rohaeti, R. Heryanto, Indo. J. Chem. Res., 8 (2021) 210.
7. K. Tyszczyk-Rotko, J. Kozak, B. Czech, Sensors, 22 (2022) 243.
8. G. Karim-Nezhad, Z. Khorablou, S. Mehdikhani, Electroanalysis, 30 (2018) 2908.
9. X.-Y. Lu, J. Li, F.-Y. Kong, M.-J. Wei, P. Zhang, Y. Li, H.-L. Fang, W. Wang, Frontiers in Chemistry 10 (2022) 892919.
10. P. Tarlekar, A. Khan, A. Chatterjee, J. Pharm. Biomed. Anal., 151 (2018) 1.
11. N.P. Shetti, D.S. Nayak, S.J. Malode, R.M. Kulkarni, Sens. Bio-Sens. Res., 14 (2017) 39.
12. A.A. Castro, A.I.P. Cordoves, P.A.M. Farias, Anal. Chem. Insights, 8 (2013) ACI.S11608.
13. K. Tyszczyk-Rotko, K. Staniec, D. Gorylewski, A. Keller, Sensors 24 (2024) 1125.

ZASTOSOWANIE METODY NANOCZĄSTECZKOWEJ SNAPC (SILVER NANOPARTICLE ANTIOXIDANT CAPACITY) W OCENIE AKTYWNOŚCI ANTYOKSYDACYJNEJ EKSTRAKTÓW ROŚLINNYCH

N. ŻUK, E. GRABIAS-BLICHAZ, M. PIZOŃ, J. FLIEGER, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Wydział Farmacji, Zakład Chemii Analitycznej, ul. Chodźki 4a, 20-093 Lublin

Abstrakt: W pracy przedstawiono wyniki badań dotyczących zastosowania metody nanocząsteczkowej do oceny właściwości antyoksydacyjnych ekstraktów z szyszek chmielu (*Humulus lupulus* L.) przygotowanych przy użyciu różnych rozpuszczalników. Wykonano krzywą kalibracyjną dla standardowego antyoksydantu tj. witaminy C i wyznaczono całkowitą pojemność antyoksydacyjną (The total antioxidant capacity-TAC) wyrażoną w μM standardowego przeciwutleniacza.

Wprowadzenie: Nanocząstki (NP) cieszą się dużym zainteresowaniem w dziedzinach takich jak mechanika, elektronika, optyka, chemia, elektrochemia, nauki biomedyczne. Cząstki te ze względu na mały rozmiar (1-100 nm) i duży stosunek powierzchni do objętości posiadają ciekawe właściwości chemiczne, fizyczne i biologiczne w porównaniu do indywidualów chemicznych o tym samym składzie. Różnice dotyczą m.in. zmian przewodności cieplnej i elektrycznej, aktywności katalitycznej, absorpcji optycznej i temperatury topnienia. Unikalne właściwości fizykochemiczne nanocząstek sprawiają, że są one zaawansowanymi materiałami do zastosowań biomedycznych [1]. Istnieje kilka interesujących zastosowań nanocząstek w medycynie i farmacji, na przykład w obrazowaniu medycznym, jako nanokompozyty, filtry, składniki systemów dostarczania leków i preparaty do leczenia nowotworów metodą hipertermii [2-5]. Nanocząstki srebra (AgNPs) są znane jako środki przeciwdrobnoustrojowe nawet przeciwko organizmowi zakaźnym, takim jak *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Vibria cholera*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Syphilis typhus* i *Staphylococcus aureus*. Nanocząstki srebra wykorzystuje się także do pomiaru całkowitego potencjału antyoksydacyjnego. Metoda wykorzystuje właściwości optyczne nanomateriałów a szczególnie obecność powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR, ang. surface plasmon resonance). Plazmony wzbudzone przez światło absorbują promieniowanie elektromagnetyczne o określonej długości fali. W przypadku AgNPs jest to 423-425 nm. Mustafa Ozyürek i współpracownicy w 2012 opracowali metodę syntezy oraz użycia AgNPs do badań aktywności antyoksydacyjnej złożonych mieszanin [6]. Niewiele jest raportów, które opisują wykorzystanie tej metody w praktyce, dlatego wciąż wymaga dopracowania [7,8]. Metoda jest skuteczna dla przeciwutleniaczy o potencjale standardowym mniejszym niż 0,8 V ze względu na $E_{\text{Ag(I)}}$, $\text{Ag}^{\circ} = 0,8 \text{ V}$. Projekt badań zakłada optymalizację oznaczeń aktywności ekstraktów roślinnych z szyszek chmielu zwyczajnego (*Humulus lupulus* L.) (Rys.1) przygotowanych przy użyciu wybranych rozpuszczalników.



Rys. 1. Szyszki chmielu *Humulus lupulus L.*

Część eksperymentalna: Pomiary SNPAC przeprowadzono według Özyürek i in. z własnymi modyfikacjami [6]. Procedura została szczegółowo opisana wcześniej [9]. Początkowy roztwór nanocząstek srebra (AgNPs) tzw. roztwór zarodkowy przygotowano przez dodawanie po kropli przy ciągłym mieszaniu 1% wodnego roztworu cytrynianu trisodu do 150 ml 1 mM AgNO_3 w podwyższonej temperaturze (około 90°C) aż do uzyskania jasno-żółtego zabarwienia. Z kolei próbki do badań przygotowano przez zmieszanie 2 ml roztworu zarodkowego AgNPs i roztworu standardowego antyoksydantu (lub badanego ekstraktu). Po 30 minutach przechowywania mieszaniny w ciemności mierzono absorbancję spektrofotometrycznie przy 423 nm. Ekstrakcja szyszek chmielowych (*Humulus lupulus L.*) uprawianych na Lubelszczyźnie (Chmielnik k. Lublina) została wykonana różnymi rozpuszczalnikami, tj. 80% etanolem, 80% metanolem, dichlorometanem, propanolem, acetonem i DMSO. W celu ekstrakcji 2 g (wysuszonego i rozdrobnionego w mrożdzierzu) materiału roślinnego zawieszono w 50 ml rozpuszczalnika i poddano sonikacji przez 60 minut w łaźni ultradźwiękowej (moc ultradźwiękowa 1200 W, częstotliwość 35 kHz), Bandelin Sonorex RK 103 H (Bandelin Electronics, Berlin, Niemcy), w temperaturze 50°C . Po ochłodzeniu ekstrakt odwirowano przy 11 000 obr./min przez 15 minut w celu wytrącenia śladów substancji stałych z ekstraktu. Zebrano supernatanty, a następnie przesączono przez bibułę filtracyjną Whatman nr 1.

Wyniki: Monodispersję zarodkowego roztworu AgNPs stabilizowaną cytrynianem trisodu, zmieszano z roztworem witaminy C jako standardowego przeciwutleniacza. W wyniku reakcji dochodzi do redukcji jonów Ag^+ , które dyfundują na powierzchnię nanocząstek. Wraz ze wzrostem nanocząstek obserwujemy zmianę barwy roztworu (Rys.2) i wzrost absorbancji, który koreluje ze zdolnością redukującą. Krzywa kalibracyjna (Rys 3.) pokazała zależność pomiędzy absorbancją (A) a stężeniem standardowego przeciwutleniacza. Dla witaminy C krzywa kalibracji była liniowa od 13,6498 do 218,3968 μM . Równanie krzywej kalibracyjnej było następujące: $y = 0,0116x + 0,1154$, $R^2 = 0,9934$. W przypadku badania zdolności antyoksydacyjnej ekstraktów chmielowych kluczowe jest sprawdzenie liniowości odpowiedzi w szerokim zakresie dodawanej objętości od 5 do 100 μL . Dla poszczególnych ekstraktów uzyskano

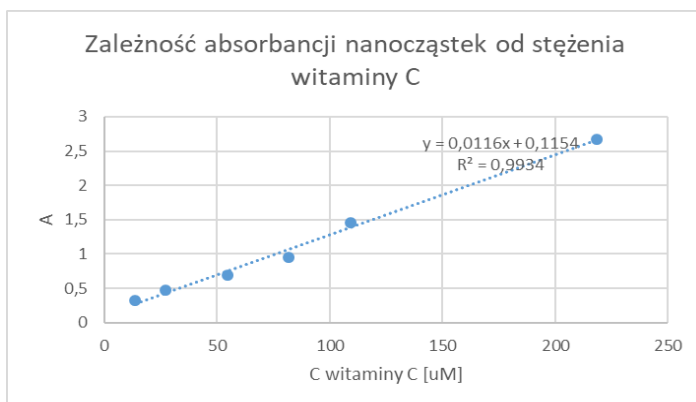
różne zakresy liniowe zależności A vs μL dodanego ekstraktu (Rys.4). Zgodnie z dotychczasowymi badaniami efekt ten odzwierciedla wpływ różnych czynników na absorpcję, takich jak stechiometria reakcji, wielkość i kształt cząstek oraz stałe dielektryczne ośrodka [10]. Określenie wspólnej objętości dla wszystkich ekstraktów, które mieszczą się w tym zakresie jest warunkiem miarodajnego porównania wartości TAC badanych ekstraktów. Całkowitą zdolność przeciwutleniającą ekstraktów w μM (TAC- total antioxidant capacity) obliczono dzieląc zaobserwowaną absorbcję przy $\lambda = 423 \text{ nm}$ dla $20 \mu\text{l}$ dodanej próbki przez molową absorpcję (ϵ) witaminy C, którą można otrzymać z nachylenia krzywej kalibracji w testach TAC opartych na nanocząsteczkach (Tabela 1).

Tabela 1. Całkowita zdolność przeciwutleniająca ekstraktów w μM (TAC- total antioxidant capacity).

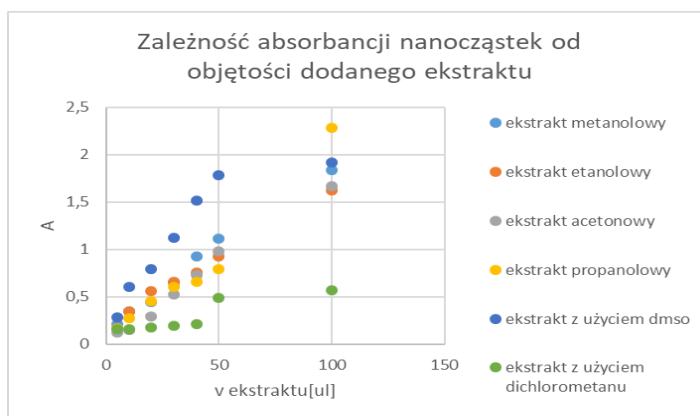
ekstrakt	zakres liniowości	współczynnik korelacji	równanie krzywej	TAC
80% metanol	od 5 do 100	0,9889	$y = 0,0173x + 0,1596$	38,79
80% etanol	od 5 do 100	0,9874	$y = 0,0145x + 0,1915$	48,28
aceton	od 5 do 100	0,988	$y = 0,017x + 0,0233$	25,69
propanol	od 5 do 50	0,9719	$y = 0,0135x + 0,1416$	38,97
DMSO	od 5 do 50	0,989	$y = 0,0322x + 0,1861$	68,19
dichlorometan	od 5 do 40	0,9813	$y = 0,0017x + 0,1442$	15,34



Rys. 2. Zmiana barwy roztworu nanocząstek w zależności od stężenia witaminy C.



Rys. 3. Krzywa kalibracyjna dla witaminy C.



Rys. 4. Zależność absorbancji nanocząstek od objętości ekstraktów.

Wnioski: Zastosowana metoda SNAPC jest czułą powtarzalną, tanią i łatwą w przygotowaniu procedurą ewaluacji całkowitej aktywności antyoksydacyjnej złożonych mieszanin, co wykazano na przykładzie ekstraktu chmielowego. Zauważono, że rozpuszczalniki stosowane do ekstrakcji (metanol, etanol, aceton, DMSO, propanol, dichlorometan) wpływają na zakres liniowości. Jest to zrozumiałe z uwagi na różne składy ekstraktów, ale także wielkość tworzonych nanocząstek, która decyduje o wielkości adsorpcji. Biorąc pod uwagę aktywność antyoksydacyjną badanych ekstraktów (na podstawie TAC) można je uporządkować wraz ze wzrastającą aktywnością antyoksydacyjną: ekstrakt dichlorometanowy < ekstrakt acetonowy < ekstrakt metanolowy < ekstrakt propanolowy < ekstrakt etanolowy < ekstrakt z DMSO.

Literatura:

1. E. Boisselier, D. Astruc, Chem. Soc. Rev., 38 (2009) 1759.
2. G.C. Brown, V. Borutaite, IUBMB Life., 52(3-5) (2001) 189.
3. O.I. Aruoma, Food Chem. Toxicol., 32(7) (1994) 671.
4. J.M. McCord, Am. J. Med., 108(8) (2000) 652.

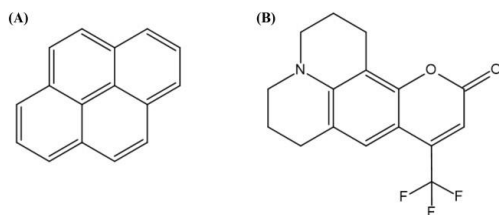
5. Y. Fang, S. Yang, G. Wu, *Nutrition*, 18(10) (2002) 872.
6. M. Ozyürek, N. Güngör, S. Baki, K. Güçlü, R. Apak, *Anal Chem.* 84(18) (2012) 8052.
7. J. Flieger, W. Franus, R. Panek, M. Szymańska-Chargot, W. Flieger, M. Flieger, P. Kołodziej, *Molecules*, 26(16) (2021) 4986.
8. J. Flieger, W. Flieger, J. Baj, R. Maciejewski, *Materials*, 14 (2021) 4135.
9. J. Flieger, S. Pasieczna-Patkowska, N. Żuk, R. Panek, I. Korona-Główniak, K. Suśniak, M. Pizoń, W. Franus, *Antibiotics*, 13 (2024) 111.
10. S. Eustis, M.A. El-Sayed, *Chem. Soc. Rev.*, 35 (2006) 209.

BADANIE WŁAŚCIWOŚCI OBJĘTOŚCIOWYCH WYBRANYCH FUNKCJONALIZOWANYCH SILOKSANÓW

K. WOJDAT¹, J. KARASIEWICZ², J. KRAWCZYK¹, ¹UMCS, Wydział Chemii, Instytut Nauk Chemicznych, Katedra Zjawisk Międzyfazowych, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin, ²UAM, Wydział Chemii, Zakład Chemii i Technologii Związków Krzemu, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań

Abstrakt: Związki powierzchniowo czynne, powszechnie nazywane surfaktantami, stanowią różnorodną grupę związków chemicznych o szerokim zastosowaniu. Zastosowanie surfaktantów wynika z ich specyficznych właściwości, będących następstwem budowy amfifilowej tych związków. Odpowiednia modyfikacja tej budowy surfaktantu zapewnia zmianę zarówno jego właściwości powierzchniowych, jak i objętościowych.

Wprowadzenie: Cząsteczki surfaktantów zbudowane są z części hydrofilowej, nazywanej „głową”, oraz części hydrofobowej, określanej mianem „ogona”. Część polarna, dzięki powinowactwu do wody i innych cieczy polarnych, zapewnia rozpuszczalność surfaktantu w środowisku polarnym. W zależności od budowy części hydrofobowej surfaktanty mogą się znacząco różnić od siebie właściwościami. Związki powierzchniowo czynne, w których ogon stanowi łańcuch alkilowy, nazywane są surfaktantami syntetycznymi (klasycznymi). Inną grupę z kolei stanowią surfaktanty specjalne – np. fluorowe, w których część hydrofobową stanowi łańcuch fluorowęglowodorowy, oraz surfaktanty silikonowe, w których zastosowano grupy, zawierające atomy krzemu [1]. Ważnym parametrem, charakteryzującym surfaktanty, jest ich krytyczne stężenie micelizacji (CMC). CMC jest to stężenie, przy którym cząsteczki surfaktantu zaczynają tworzyć zorganizowane struktury (micelle), a w roztworze ustala się dynamiczna równowaga między monomerami a micelami surfaktantu [2]. Wyróżnia się następujące formy asocjacji: micelle kuliste, micelle niesferyczne oraz micelle usieciowane [1]. W celu określenia wartości CMC danego surfaktantu w danym układzie można wykorzystać badanie następujących właściwości fizykochemicznych: napięcie powierzchniowe, lepkość, gęstość, przewodnictwo, współczynnik załamania światła i rozproszenie światła. Wśród technik instrumentalnych stosowanych do wyznaczenia wartości CMC wyróżnia się: spektroskopię elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR), spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), spektroskopię absorpcyjną UV-VIS, kalorymetrię, a także techniki chromatograficzne, potencjometryczne oraz spektrofluorymetryczne [3]. W technikach spektrofluorymetrycznych badane są zmiany widma emisji i wzbudzenia sond fluorescencyjnych. W tym celu stosuje się związki luminescencyjne, które wykazują podwyższoną lub odmienną charakterystykę emisji w roztworach micelarnych i monomerycznych surfaktantów, co umożliwia analizę procesu ich micelizacji. Jedną z częściej stosowanych metod wyznaczenia wartości CMC jest spektroskopia fluorescencyjna, której niewątpliwą zaletą jest wysoka wrażliwość na dynamikę i strukturę miceli. Istotną kwestią, wpływającą na wiarygodność wyników otrzymanych przy zastosowaniu tej metody, jest dobór odpowiedniej sondy fluorescencyjnej. Przykładowymi sondami fluorescencyjnymi są piren i kumaryna 153 (Rys 1.), które mają zastosowanie w różnych roztworach surfaktantów [2].

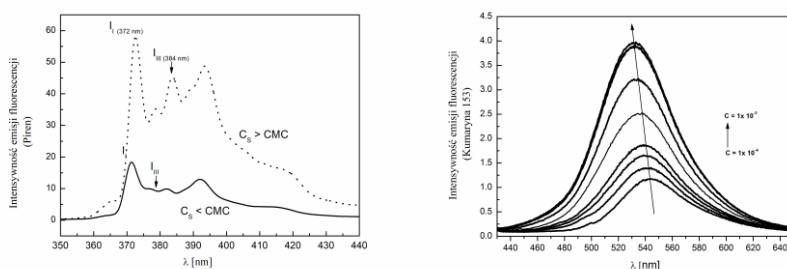


Rys. 1. Wzór strukturalny: (A) pirenu, (B) kumaryny 153.

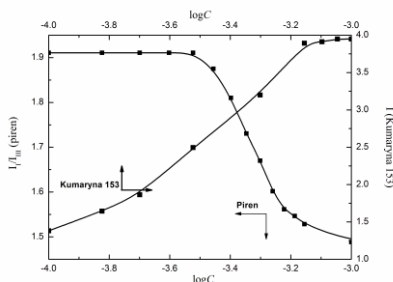
Piren jest stosowany do wyznaczenia wartości CMC zarówno surfaktantów o niskiej masie cząsteczkowej jak i polimerowych, a kumaryna 153 jest wykorzystywana częściej w badaniach związków powierzchniowo czynnych o stosunkowo niskiej masie cząsteczkowej [2]. Piren jest sondą fluorescencyjną, która wykorzystuje proces tworzenia ekscymerów [4]. Związek ten wykazuje dużą czułość na lokalne zmiany środowiska, dzięki czemu każda zmiana polarności w otoczeniu cząsteczki pirenu może powodować znaczące zmiany intensywności fluorescencji. Niezaprzeczalną zaletą spektrometrii fluorescencyjnej z użyciem pirenu jest łatwość wyznaczenia CMC. Jednakże jest to związek o słabej rozpuszczalności w wodzie, oraz wykazuje tendencję do tworzenia fluorescencyjnych i niefluorescencyjnych agregatów w roztworze, co nie zawsze jest korzystne [2]. Kumaryna 153 jest sondą, która wykazuje niewielką intensywność fluorescencji w roztworach wodnych i lepiej rozpuszcza się w wodzie w porównaniu do pirenu. Stosowana przy wyższych stężeniach surfaktantów, kiedy zostaje przekroczone CMC i powstają micelle, kumaryna wnika do ich hydrofobowego wnętrza. Kumaryna 153 jako sonda fluorescencyjna wykazuje przewagę nad pirenem w aspekcie łatwości przeprowadzenia eksperymentu, jego czasochłonności oraz dokładności pomiaru [2]. Celem przedstawionych badań było określenie wpływu rodzaju sondy fluorescencyjnej na wartości CMC wybranego surfaktantu z grupy surfaktantów siloksanowych w temperaturze 293 K.

Część eksperymentalna: W ramach przeprowadzonych badań dokonano pomiaru emisji fluorescencji dwóch wybranych sond fluorescencyjnych: pirenu ($M=202.25$ g/mol) i kumaryny 153 ($M=146$ g/mol) w roztworze wybranego surfaktantu siloksanowego. Na początek przygotowano roztwór wyjściowy pirenu i kumaryny 153 w etanolu o stężeniu 1×10^{-2} M. Następnie sporządzono wodny roztwór wyjściowy wybranego surfaktantu silikonowego (3-[3-(hydroksy)(polyetoxy)propyl]-1,1,1,3,5,5,5-heptametylotrisiloksan (P20), $M = 808.5$ g/mol) o stężeniu 1×10^{-3} M. Wykorzystując przygotowane roztwory wyjściowe surfaktantu i prób fluorescencyjnych sporządzono dwie serie roztworów roboczych surfaktantu i próby – jedną z wykorzystaniem pirenu, a drugą z wykorzystaniem kumaryny 153. Stężenie surfaktantu w roztworach roboczych mieściło się w zakresie od 1×10^{-5} M do 1×10^{-3} M. Natomiast stężenie próby (zarówno piranu jak i kumaryny 153) w tych roztworach było stałe i wynosiło 1×10^{-6} M. Długość fali wzbudzenia wynosiła 335 nm dla pirenu i 440 nm dla kumaryny 153. Pomiary przeprowadzono w zakresie $\lambda=430-650$ nm z wykorzystaniem spektrofluorymetru Hitachi F-2700. Pomiary przeprowadzono w temperaturze 293 K.

Wyniki: Na podstawie otrzymanych widm emisyjnych pirenu i kumaryny 153 w wodnych roztworach badanego surfaktantu (Rys. 2 i 3) stwierdzono, że stężenie surfaktantu w znaczny sposób wpływa na kształt widma (w przypadku pirenu) oraz wartość intensywności emisji fluorescencji (w przypadku kumaryny 153). Wzrost stężenia pirenu w roztworze P20 powoduje przede wszystkim zmiany wartości intensywności pierwszego (I_I) i trzeciego (I_{III}) pików na widmie emisyjnym pirenu. Pierwszy pik na tym widmie odpowiada długości fali 372 nm, a trzeci 384 nm. Do wyznaczenia CMC surfaktantu wykorzystujemy stosunek I_I/I_{III} . Z kolei w przypadku kumaryny 153 wzrost stężenia badanego surfaktantu powodował wzrost intensywności emisji fluorescencji oraz przesunięcie maksimum (540 nm) w kierunku fal krótszych (Rys. 2).



Rys. 2 Wpływ stężenia badanego surfaktantu (P20) na intensywność i kształt widma emisji fluorescencji pirenu (po lewej) oraz kumaryny 153 (po prawej).



Rys. 3 Zależność stosunku intensywności I_I/I_{III} emisji fluorescencji pirenu i intensywności emisji fluorescencji kumaryny 153 od stężenia P20 w roztworze ($\log C$).

Wnioski: Stwierdzono, że po przekroczeniu CMC badanego surfaktantu silikonowego intensywność emisji fluorescencji badanych sond fluorescencyjnych wyraźnie wzrasta, zmienia się również kształt widma. Zaobserwowano także, że wzrost stężenia surfaktantu wpływa nieznacznie na przesunięcie maksimum pików na widmie pirenu. Wszystkie obserwowane zmiany świadczą o zmianie charakteru hydrofobowo-hydrofilowego otoczenia pirenu w badanym roztworze. Na podstawie tych zmian można stwierdzić, że badany surfaktant tworzy micelle w roztworze wodnym, oraz że pirenu ulega solubilizacji w ich wnętrzu. Pirenu jest więc sondą fluorescencyjną, która może być z powodzeniem stosowana do wyznaczania CMC trisiloksanów. Kolejną zastosowaną sondą była kumaryna 153. Według danych literaturowych [2-3] charakteryzuje się ona lepszą rozpuszczalnością w wodzie w porównaniu do pirenu, a wartości CMC surfaktantów otrzymywane przy jej wykorzystaniu są bardziej powtarzalne i wiarygodne. Stąd w ramach prze-

prowadzonych badań, otrzymanych wyników i ich analizy porównano otrzymane wartości CMC badanego surfaktantu silikonowego (P20) wyznaczone przy użyciu pirenu z tymi otrzymanymi przy wykorzystaniu kumaryny 153. Okazało się, że CMC P20 otrzymane przy wykorzystaniu pirenu i kumaryny 153 są bardzo zbliżone (odpowiednio: 4.9×10^{-4} M i 4×10^{-4} M). W przypadku pirenu punkt CMC związany jest ze spadkiem wartości I_I/I_{III} . Natomiast dla kumaryny 153 w badanym układzie punkt ten odpowiada początkowi plateau na wykresie. Otrzymane przy użyciu sond fluorescencyjnych wartości CMC dla P20 są bliskie tym wyznaczonym na podstawie pomiarów napięcia powierzchniowego (3.12×10^{-4}) [5]. Otrzymane wartości CMC dodatkowo potwierdzają, że w przypadku pirenu, właściwe jest wyznaczanie CMC na podstawie pierwszych zmian intensywności emisji fluorescencji a nie zatrzymania się tych zmian. W literaturze pojawiają się różne podejścia co do sposobu wyznaczania CMC na podstawie pomiarów emisji fluorescencji pirenu [5]. Niektórzy autorzy za punkt CMC obierają właśnie pierwsze zmiany stosunku intensywności pierwszego I_I (372 nm) i trzeciego I_{III} (384 nm) pików, natomiast inni jeden z parametrów funkcji opisującej te zmiany [5]. Nasze badania potwierdziły, że przyjęta metoda wyznaczania tego parametru jest poprawna, a kumaryna podobnie jak piren może być stosowana do wyznaczania CMC surfaktantów siloksanowych.

Badania finansowane przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu LIDER XI, nr umowy LIDER/ 5 0011 /L 11 19 / 2020.

Literatura:

1. R. Zieliński, *Surfaktanty budowa właściwości zastosowania*, Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu, 2013.
2. O. Grabowska, P. Dywicki, L. Chmurzyński, *Wiadomości Chemiczne*, 74 (2020) 375.
3. K.G. Furman, A. Norelus, T.C. Vaimakis, *J. Chem. Educ.*, 70 (1993) 254.
4. J. Pączkowski, *Polimery*, 50 (2000) 520.
5. J. Karasiewicz, J. Krawczyk, *Molecules*, 25 (2020) 5669.

OZNACZENIE CYTOSTATYKÓW METALOORGANICZNYCH W ŚCIEKACH SZPITALNYCH Z WYKORZYSTANIEM HPLC-ICP-MS

K. WRZESIŃSKA, J. CZERWIŃSKI, Politechnika Lubelska, Wydział Inżynierii Środowiska, Katedra Inżynierii Ochrony Środowiska, ul. Nadbystrzycka 40B, 20-618 Lublin

Abstrakt: Leki chemioterapeutyczne na bazie platyny, takie jak cisplatyna, karboplatyna i oksaliplatyna, są szeroko stosowane w leczeniu różnych rodzajów nowotworów. W ciągu ostatnich kilku dekad stwierdzono ich obecność w próbkach środowiskowych, zarówno w przypadku ścieków szpitalnych, komunalnych jak i wód powierzchniowych. Z uwagi na ich toksyczność opracowuje się ciągle nowe techniki ich oznaczania i jedną z nich opartą na analizie HPLC-ICP-MS przedstawiamy w niniejszej pracy.

Wprowadzenie: Rosnące wykorzystanie cytostatyków, które są stosowane w terapii nowotworów, stało się nowym problemem środowiskowym. Substancje te działają poprzez hamowanie wzrostu komórek lub ich bezpośrednie zabijanie, kilka cytostatyków zostało sklasyfikowanych jako leki RMR (rakotwórcze, mutagenne i reprotoksyczne). Różne źródła, takie jak emisje z zakładów produkcyjnych lub bezpośrednia utylizacja farmaceutyków w gospodarstwach domowych, przyczyniają się do potencjalnego zanieczyszczenia środowiska, ale głównym źródłem związków cytostatycznych w ściekach lub w środowisku są wydaliny (mocz i kał) pacjentów leczonych medycznie. Cytostatyki i ich metabolity są stale usuwane do ścieków szpitalnych lub komunalnych. Rozcieńczenie wydalanych stężeń cytostatyków powoduje rozproszenie substancji w systemie ściekowym i utrudnia ich usuwanie w oczyszczalniach ścieków [1–2]. Pochodne platyny są stosowane od dziesięcioleci w terapii nowotworów złośliwych, głównie guzów litycznych. Pierwszy opisany związek, cisplatyna, jest bardzo skutecznym związkiem i został pierwotnie odkryty poprzez obserwację jego działania bakteriostatycznego. Aktywność przeciwnowotworowa cisplatyny wiąże się jednak z szeregiem skutków ubocznych, w tym wymiotami czy nefrotoksycznością. Związek ten zyskał szeroką dystrybucję w terapii guzów litycznych, w tym np. raka płuc, jajnika, głowy i szyi oraz jąder. W związku z tym podjęto kilka prób dalszego rozwoju klasy związków platyny w celu zachowania wysokiej aktywności terapeutycznej poprzez zmniejszenie niepożądanych skutków ubocznych. Jednym z tych związków jest karboplatyna, która jest stosowana głównie w leczeniu raka jajnika, wykazując mniejsze spektrum terapeutyczne niż cisplatyna [3]. W ostatnim czasie przeprowadzono kilka badań dotyczących rosnącego stężenia platyny w różnych częściach ekosystemu wodnego, tj. w wodach pitnych, gruntowych i powierzchniowych, a także w ściekach. Poziomy występowania cytostatyków opartych na platynie wahają się w granicach od pojedynczych ng/dm^3 do $250\,000\ \text{ng/dm}^3$ w ściekach szpitalnych, od poziomu niewykrywalnego do $35\,000\ \text{ng/dm}^3$ w ściekach komunalnych i również od poziomu niewykrywalnego do $150\ \text{ng/dm}^3$ w wodach powierzchniowych [4-5]. Chociaż cytostatyczne związki platyny są uważane za trwale zanieczyszczenie toksyczne, wiedza na temat ich występowania i dystrybucji w środowisku jest nadal dość fragmentaryczna. Analiza oznaczeń tych związków

w środowisku jest trudna ze względu na niskie poziomy stężen i na raportowanie w większości publikacji sprzecznych informacji dotyczących ich stabilności. Dlatego też większość prac przedstawia oznaczanie platyny całkowitej z wykorzystaniem ICP-MS. Znacznie rzadziej HPLC-ICP-MS lub inne techniki komplementarne. Najwyraźniej głównymi zaletami ICP-MS w zakresie analizy ultraśladowej są doskonała czułość i granica wykrywalności metody [5–6].

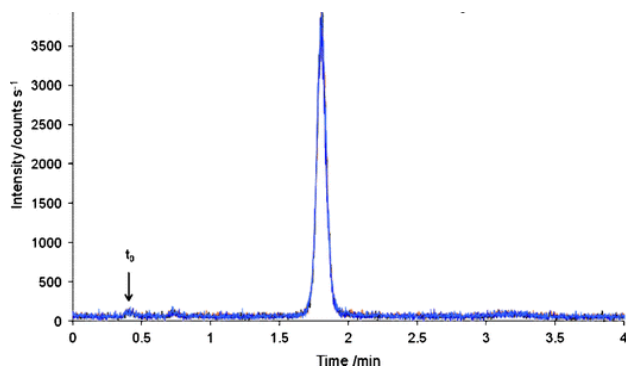
Część eksperymentalna: W badaniach wykorzystano próbki ścieków pobranych z 4 lubelskich szpitali posiadających oddziały onkologiczne, COZL, PSK – 1 i PSK – 4 (druga próbka z pulmonologii) oraz szpitala „kolejowego”. Objętość pobranych ścieków wynosiła nie mniej niż 1 dm³. Próbki ścieków odwirowywano przy 4500 rpm i sączono przez filtry strzykawkowe 0,45µm. Próbek dostarczanych do laboratorium nie utrwalano i analizę wykonywano nie później niż 2 godziny po dostarczeniu próbki do laboratorium. Tak przygotowane próbki analizowano z wykorzystaniem chromatografu cieczowego Agilent Infinity II sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas z plazmą wzbudzaną indukcyjnie Agilent 8900. Parametry pracy chromatografu oraz spektrometru przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Parametry pracy systemu HPLC-ICP-MS.

Kolumna chromatograficzna	Zorbax Stable Bond C18, 2.1×50 mm, 1.8µm, 80 Å
Eluent	A = H ₂ O, 1% MeOH, 0.1% HCOOH B = MeOH, 0.1% HCOOH
Przepływ	0,9 ml/min
Objętość dozowana	5µl
Temperatura termostatu	30°C
Gradient	0 - 2 min A 100% 10 min B90%
Komora mgielelna	„cyclonic”
Gaz do nebulizatora	0,9 l/min
Gaz dodatkowy	1,2 l/min
Gaz do plazmy	15 l/min
Stożki	„Platinum”

W badaniach wykorzystano wzorce cis-platyny, karboplatyny i oxaliplatyny produkcji Supelco (secondary standards) zakupione w Sigma Aldrich (Polska). Roztwory wzorców sporządzano bezpośrednio przed użyciem w celu zapobiegnięcia degradacji, która najszybciej zachodziła dla cis-platyny (wymiana Cl na grupę OH).

Granice oznaczalności (BEC) jakie uzyskano dla cis-platyny, karboplatyny i oksaliplatyny kształtowały się odpowiednio 0,02, 0,04 i 0,07 µg/dm³.



Rys. 1. Chromatogram próbki ścieków z oddziału pumunologicznego PSK 4 w Lublinie.

Na rysunku 1 przedstawiono chromatogram próbki ścieków z oddziału pumunologicznego PSK-4 w Lublinie gdzie obserwujemy jedynie obecność karbolplatyny, a cis-platyna (Rt 0,72 min) i oxaliplatyna (Rt 3,22 min) występują jedynie na granicy oznaczalności. W pozostałych przypadkach cis-platyna jest dominująca. Tabela 2 przedstawia wyniki oznaczeń cytostatyków platynooorganicznych.

Tabela 2. Wyniki oznaczeń w ściekach cytostatyków platynooorganicznych.

Miejsce pobrania próbki	Cis-platyna [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$]	Karbolatyna [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$]	Oksaliplatyna [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$]
PSK-1	27,3	3,2	2,1
PSK-4 ogólny	39,1	0,71	ND
PSK-4 pulmunologia	0,09	32,1	0,17
COZL	71,2	1,2	0,42

W przedstawionych badaniach nie analizowaliśmy obecności jonu platyny Pt^{2+} , który ujawnia swoją obecność w „czasie martwym” kolumny i jest ona tym istotniejsza im dłużej przechowywana jest próbka. Obecność Pt^{2+} w badanych próbkach może wskazywać, że ścieki pochodzą ze zbiornika wyrównawczego lub też próbki były zbyt długo przechowywane.

Wnioski: Przedstawione wyniki wskazują, że połączenie HPLC-ICP-MS jest techniką odpowiednią do oznaczania kompleksów platyny (czy też związków platynooorganicznych) wykorzystywanych jako leki cytostatyczne w ściekach szpitalnych. Jest to istotne z tego powodu, że kompleksy platyny i związki platynooorganiczne posiadają wyższy potencjał kancerogenny niż jony platyny. Uzyskane granice oznaczalności są wyższe niż te, kiedy oznaczamy sumaryczną zawartość platyny, która w warunkach LAŚ wynosi ok (BEC) $0,2 \text{ ngPt}/\text{dm}^3$. Zaletą jest jednak możliwość pokazania rodzaju związków zawierających platynę, które występują w ściekach. Literatura wskazuje, że cytostatyki platynooorganiczne słabo usuwane są w klasycznych oczyszczalniach ścieków, dlatego też nawet niewielkie ilości tych związków trafiające do ścieków komunalnych i wód są znaczące dla organizmów zamieszkujących odbiorniki oczyszczonych ścieków. Dane te pokazują również, że celowe byłoby budowanie niewielkich (np. kontenerowych)

oczyszczalni ścieków szpitalnych po to, by pozostałości leków (antybiotyków, cytostatyków, pozostałości środków kontrastujących i innych) były degradowane i nie trafiały bezpośrednio do oczyszczalni ścieków komunalnych.

Literatura:

1. L. Kelland, *Nat Rev Cancer*, 7 (2007) 573.
2. T. Andre, C. Boni, L. Mounedji-Boudiaf, M. Navarro, J. Tabernero, T. Hickish, C. Topham, M. Zaninelli, P. Clingan, J. Bridgewater, I. Tabah-Fisch, A. de Gramont, *N. Engl. J. Med.*, 350 (2004) 2343.
3. K. Ravindra, L. Bencs, R. Van Grieken, *Sci. Total Environ.*, 318 (2004) 1.
4. K. Lenz, S. Hann, G. Koellensperger, Z. Stefanka, G. Stingerer, N. Weissenbacher, S.N. Mahnik, M. Fuerhacker, *Sci. Total Environ.*, 345 (2005).
5. J.P. Besse, J.F. Latour, J. Garric, *Environment. Int.*, 39(1) (2012) 73.
6. B. Michalke, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 24 (2010) 69.

RODZAJ SURFAKTANTÓW A KINETYKA ELEKTROREDUKCJI JONÓW BIZMUTU W ROZTWORACH ELEKTROLITÓW WODNO - ORGANICZNYCH: NOWE SPOJRZENIE NA ZASTOSOWANIE REGUŁY „CAP-PAIR” W OBLICZU WYZWAŃ WSPÓŁCZESNEGO ŚWIATA

A. N. PAWLAK, A. NOSAL-WIERCIŃSKA, UMCS, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Katedra Chemii Analitycznej, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 2, 20-031 Lublin

Abstrakt: Badania eksperymentalne skoncentrowały się na wpływie surfaktantów jonowych oraz metanolu na elektroredukcję jonów Bi(III). Wykazano, że CTAB przyspiesza ten proces, podczas gdy IOSASS go inhibituje. Dodatek metanolu zmienia dynamikę wpływu surfaktantów na proces elektrodowy.

Wprowadzenie: Surfaktanty są związkami chemicznymi, odgrywającymi kluczową rolę zarówno w przemyśle, medycynie, jak i w procesach biologicznych. Ich zdolność do tworzenia układów micelarnych wynika z charakterystycznej budowy, która obejmuje fragmenty o różnej polarności [1]. Surfaktanty posiadają właściwości amfifilowe: z jednej strony zawierają w swojej strukturze fragmenty hydrofobowe, co sprawia, że wykazują duże powinowactwo do cieczy niepolarnych (np. alkoholi), natomiast z drugiej strony, posiadają części hydrofilowe, które oddziałują z cząsteczkami polarnymi (np. wodą). Zwykle ich części hydrofobowe składają się z alifatycznego łańcucha węglowodorowego. Może być on rozgałęziony, nierozgałęziony, jak również posiadać w swojej strukturze pierścień aromatyczny [2]. W przypadku surfaktantów jonowych, ich część hydrofilowa zawiera najczęściej grupę stanowiącą resztę kwasową lub zasadową. W środowisku wodnym surfaktanty jonowe ulegają dysocjacji, tworząc jony dodatnie (kationy) lub ujemne (aniony). Przykładami jonowych środków powierzchniowo czynnych są sól sodowa kwasu sulfonowego (IOSASS; surfaktant anionowy) oraz bromek heksadecylotrimetyloamoniowy (CTAB; surfaktant kationowy). IOSASS znajduje zastosowanie w leczeniu objawów chorobowych wywołanych przez pikornawirusy (Picornaviridae), takich jak zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, mięśni, wątroby czy spojówek. Poza zastosowaniami medycznymi, może być używany w wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) do detekcji związków organicznych, zwłaszcza peptydów oraz białek [3]. Z kolei CTAB, wykorzystywany jest m.in. jako solubilizator leków oraz środek w produkcji szczepionek czy farmaceutyków przeznaczonych do terapii genowych [4]. Zrozumienie właściwości elektrochemicznych leków jest kluczowe dla pełniejszej analizy ich szlaku metabolicznego związanego z procesami redox zachodzącymi w organizmach. Natomiast w kontekście optymalizacji procesów produkcji leków jest to istotne w związku z rodzajem środowiska reakcji. Surfaktanty zastosowane do badań wykazują zdolność do modyfikacji struktury obszaru międzyfazowego (elektroda-roztwór), poprzez utworzenie mieszanej warstwy adsorpcyjnej, wpływającej na zmiany w kinetyce i mechanizmie procesu elektroredukcji jonów Bi(III) [5]. Badano wpływ surfaktantów jonowych na mechanizm i kinetykę elektroredukcji jonów Bi(III) w roztworach elektrolitów wodno – organicznych, wykorzystując następujące metody

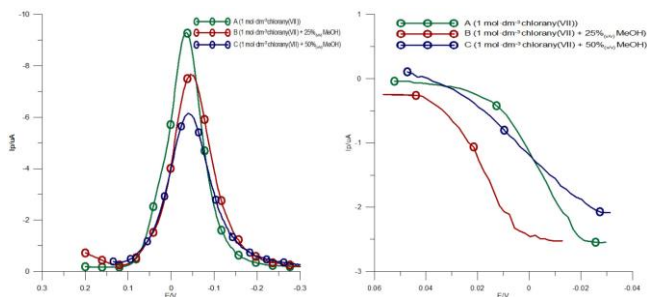
elektrochemiczne: polarografia stałoprądowa (DC), woltamperometria cykliczna (CV) i fali prostokątnej (SWV).

Część eksperymentalna: Do przygotowania roztworów użyto następujących odczynników: NaClO_4 (Fluka), HClO_4 (Sigma), metanol cz.d.a, $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NaO}_3\text{S}$ - sól sodową kwasu sulfonowego (IOSASS) (Fisher Chemical), $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$ - bromek heksadecylotrimetyloamoniowy (CTAB) oraz wodę redestylowaną. Sporządzono mieszane roztwory wodno-organiczne elektrolitów podstawowych (EP), zawierające $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NaClO}_4$ i $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ HClO}_4$ oraz wodę i metanol w różnych stosunkach objętościowych. Roztwory oznaczono według schematu: A oznacza $1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ chlorany(VII)_(aq) gdzie, stosunek chlorany(VII):metanol = 4:0 (A - 0 % MeOH); B oznacza $1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ chlorany(VII)_(aq) gdzie, stosunek chlorany(VII):metanol = 3:1 (B - 25%_(v/v) MeOH); C oznacza $1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ chlorany(VII)_(aq) gdzie, stosunek chlorany(VII):metanol = 2:2 (C - 50%_(v/v) MeOH).

Każdy z roztworów EP zawierał jony depolaryzatora Bi(III) o stałym stężeniu $1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Próbkę zawierającą surfaktanty przygotowywane były zawsze tuż przed pomiarami. W badaniach wykorzystano potencjostat Autolab FRA 2/ GPES 4.9 firmy Eco Chemie (Utrecht, Holandia) wraz z programowalnym statywem elektrodowym M165D (mtm-anko, Kraków, Polska), zawierającym układ trzech elektrod. Elektroda $\text{Ag}/\text{AgCl}/3\text{M KCl}$ stanowiła elektrodę odniesienia, drut platynowy pełnił rolę elektrody pomocniczej, a elektrodą roboczą była innowacyjna elektroda z cyklicznie odnawialnym filmem ciekłego amalgamatu srebra (R-AgLAFE), która stanowi doskonałą alternatywę dla tradycyjnej elektrody rtęciowej. Konstrukcja zastosowana w elektrodzie R-AgLAFE gwarantuje porównywalne parametry użytkowe i jakościowe jak elektroda HMDE, przy znacznym ograniczeniu zużycia szkodliwej rtęci.

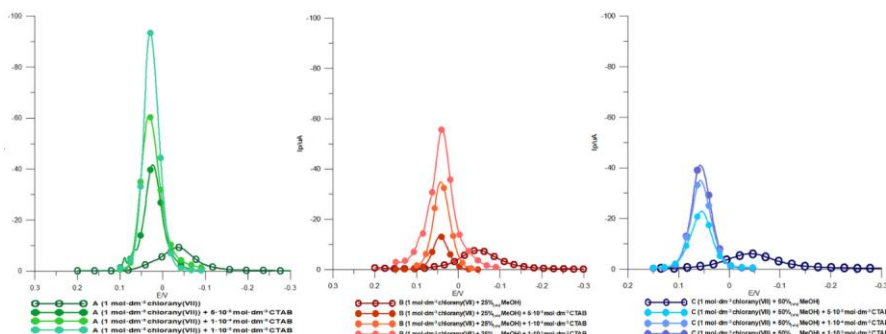
Wyniki: Wzrost ilości metanolu w roztworze elektrolitu podstawowego powoduje spadek odwracalności procesu elektrodredukcji jonów Bi(III). Świadczą o tym: obniżenie wartości prądów pików SWV (Rys. 1) oraz spadek nachylenia fali polarograficznej DC (Rys. 2). Obecność CTAB w roztworach zmienia kinetykę procesu elektrodredukcji jonów Bi(III) w kierunku przyspieszania, co potwierdzają wzrosty prądów pików SWV oraz zmniejszająca się szerokość pików w połowie ich wysokości (Rys. 3-5). Dodatek IOSASS powoduje zmniejszenie wysokości prądu pików SWV (Rys. 6-8) we wszystkich badanych roztworach EP. Dynamika elektrodredukcji Bi(III) w roztworach elektrolitów mieszanych (chlorany(VII) - metanol), w związku z obecnością CTAB i IOSASS wyraźnie ulega zmianie. Wraz ze zwiększeniem zawartości alkoholu w roztworach EP, prądy pików maleją i stają się gorzej zdefiniowane (Rys. 3-8). Wpływ CTAB i IOSASS oraz zmian stosunku stężeń $\text{MeOH}-\text{ClO}_4^-$ na odwracalność procesu elektrodredukcji jonów Bi(III) wynika także z danych uzyskanych z pomiarów woltamperometrii cyklicznej. Wraz ze wzrostem ilości metanolu w roztworze EP obserwuje się zwiększenie odległości między pikiem anodowym a katodowym ($\Delta E_A = 0.103$; $\Delta E_B = 0.132$; $\Delta E_C = 0.151$), co przekłada się na spadek szybkości procesu. W przypadku obecności CTAB, wartości ΔE zmniejszają się ($\Delta E_B = 0.132$; $\Delta E_{B1} = 0.088$; $\Delta E_{B2} = 0.039$; $\Delta E_{B3} = 0.029$), natomiast w obecności IOSASS obserwujemy ich wzrost ($\Delta E_B = 0.132$; $\Delta E_{B1} = 0.151$; $\Delta E_{B2} = 0.196$; $\Delta E_{B3} = 0.207$). Wcześniejsze badania wykazały złożony mechanizm procesu elektrodredukcji jonów Bi(III) na elektrodzie [6] i wskazują na reakcję chemiczną

tworzenia się kompleksów aktywnych biorących udział w przejściu elektronów. Sugerują one podobny wieloetapowy mechanizm elektrodowy również w badanych układach.

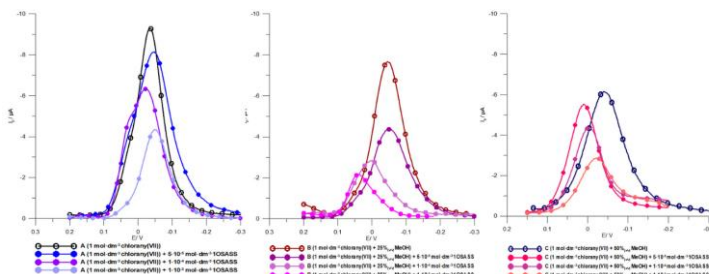


Rys.1. Piki SWV elektroredukcji $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ jonów Bi(III) w wodno-organicznych roztworach elektrolitów podstawowych.

Rys.2. Fale polarograficzne DC elektroredukcji $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ jonów Bi(III) w wodno-organicznych roztworach elektrolitu podstawowego.



Rys.3-5. Piki SWV elektroredukcji $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ jonów Bi(III) w roztworach A-C elektrolitów podstawowych w obecności różnych stężeń CTAB.



Rys.6-8. Piki SWV elektroredukcji $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ jonów Bi(III) w roztworach A-C elektrolitów podstawowych w obecności różnych stężeń IOSASS.

Wzrost ilości metanolu w roztworze EP nie powoduje znacznych zmian w wartościach współczynników przejścia katodowego α ($\alpha_A = 0.36$; $\alpha_B = 0.35$; $\alpha_C = 0.34$), co wskazuje na taki sam mechanizm procesu elektrodowego w roztworach wodno – organicznych i wodnych [7]. Obecność surfaktantów powoduje znaczące różnice w wartościach α , potwierdzając wcześniej wspomniane zmiany w wieloetapowym mechanizmie elektro-

dowym. Różnice w kinetyce procesu elektroredukcji jonów Bi(III) związane z obecnością CTAB i IOSASS wynikają zapewne z ich struktury i ułożenia na elektrodzie. Literatura potwierdza adsorpcję alkoholu na elektrodzie [7], co skutkuje jej blokadą i ewentualnym zmniejszeniem ilości kompleksów aktywnych Bi – CTAB w warstwie adsorpcyjnej. Z kolei IOSASS, adsorbując się silnie na elektrodzie, sam blokuje do niej dojście, co skutkuje inhibitowaniem procesu. Utworzone kompleksy aktywne Bi – IOSASS nie mają szans dotrzeć do powierzchni elektrody, a dodatkowa obecność metanolu w roztworze EP, umacnia tę blokadę. Zaproponowany w literaturze [8] mechanizm działania substancji organicznych na elektroredukcję jonów Bi(III) w roztworach chloranów(VII), w pełni współgrający z założeniami reguły „*cap – pair*”, można również odnieść do prezentowanego układu Bi(III) – CTAB, Bi(III) – IOSASS. Natomiast zmiana mechanizmu, a w konsekwencji spadek dynamiki kinetyki procesu elektroredukcji jonów Bi(III) w obecności mieszanych roztworów wodno – organicznych, rozszerza interpretację mechanizmu efektu „*cap – pair*”.

Wnioski: Wykazano, że na szybkość procesu elektroredukcji jonów Bi(III) wpływają: obecność surfaktantu oraz rodzaj elektrolitu podstawowego. CTAB przyspiesza wieloetapowy proces elektroredukcji jonów Bi(III) we wszystkich badanych roztworach elektrolitów podstawowych, natomiast IOSASS inhibituje ten proces. Obecność metanolu zmienia dynamikę katalitycznego działania CTAB oraz inhibicji IOSASS na proces elektrodowy. Zmiana dynamiki procesu elektroredukcji jonów Bi(III) w kierunku inhibicji może być spowodowana ograniczeniem dostępu do elektrody przez zaadsorbowane cząsteczki metanolu, co skutkuje blokadą elektrody bądź/ i wypychaniem tworzących się cząsteczek kompleksów aktywnych Bi-CTAB i Bi-IOSASS, ułatwiających przejście elektronów w procesie elektrodowym.

Literatura:

1. H. Sonntag, Koloidy, PWN, Warszawa 1982.
2. S. Anastasiu, E. Jelescu, Środki powierzchniowo czynne, WNT, Warszawa, 1973.
3. P. Sangeetha, S. Mullainathan, L. Rajasekaran, S. Muthu, Ahmad Irfan, A. Saral, J. Mol. Liquid., 344 (2021).
4. N. Nordisc, Pharm. Technol., 2 (2021).
5. A. Nosal-Wiercińska, M. Martyna, M. Wiśniewska, Appl. Nanosci., 13 (2023) 4737.
6. A. Nosal-Wiercińska, Electroanalysis, 26 (2014) 1013.
7. B. Marczevska, Przyspieszanie procesu elektroredukcji jonów Zn(II) na elektrodzie rtęciowej przez niektóre związki organiczne, w wybranych mieszanych rozpuszczalnikach wodno-organicznym, 1998.
8. A. Nosal-Wiercińska, M. Martyna, A. Pawlak, Appl. Nanosci. 13 (2023) 6811.

ANALITYCZNE WYKORZYSTANIE REAKCJI ESTRYFIKACJI NA PRZYKŁADZIE OZNACZANIA WYBRANYCH METABOLITÓW SZLAKU KINURENINOWEGO METODĄ LC-MS

K. OŹGA¹, I. SADOK², ¹KUL, Wydział Medyczny, Instytut Nauk Biologicznych, Katedra Biomedycyny i Badań Środowiskowych, ul. Konstantynów 1J, 20-708 Lublin, ²KUL, Wydział Medyczny, Instytut Nauk Biologicznych, Katedra Chemii, ul. Konstantynów 1J, 20-708 Lublin

Abstrakt: Metabolizm tryptofanu szlakiem kinureninowym związany jest z regulacją odpowiedzi immunologicznej podczas wielu schorzeń m.in. chorób nowotworowych, kardiologiczno-naczyniowych oraz neurodegeneracyjnych. W niniejszym komunikacie zaprezentowano wyniki badań wstępnych ukierunkowanych na sprawdzenie możliwości zastosowania reakcji estryfikacji do przekształcenia endogennych metabolitów szlaku kinureninowego w pochodne estrowe o zmniejszonej polarności i bardziej pożądanym właściwościach chromatograficznych. Reakcję estryfikacji przeprowadzono z wykorzystaniem *n*-butanolu i chlorku acetylu jako katalizatora. Hipotezę badawczą sprawdzono z wykorzystaniem modelowych roztworów metabolitów szlaku kinureninowego - kinureniny (KYN), kwasu nikotynowego (NA) i kwasu pikolinowego (PA). Detekcję pochodnych estrowych metabolitów tryptofanu prowadzono z wykorzystaniem spektrometru mas z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie po rozdziale chromatograficznym w odwróconym układzie faz na kolumnie ze złożem C18.

Wprowadzenie: Tryptofan to dostarczany wraz z pożywieniem aminokwas, który jest wykorzystywany do syntezy białek w ludzkim organizmie. To również prekursor ważnych pod względem fizjologicznym metabolitów, które powstają w trakcie jego rozkładu na drodze czterech szlaków: hydroksylacji, dekarboksylacji, transaminacji oraz szlaku kinureninowego (z ang. kinurenine pathway). Z puli niezwiązanego tryptofanu, aż do 95% jest metabolizowane na drodze szlaku kinureninowego [1] prowadząc do wytworzenia szeregu metabolitów zaangażowanych w regulację odpowiedzi immunologicznej. W wyniku enzymatycznego metabolizmu tryptofanu szlakiem kinureninowym powstają następujące metabolity: kinurenina (KYN), kwas kinureninowy (KYNA), 3-hydroksykinurenina (3HKYN), kwas 3-hydroksyantranilowy (3-HAA), kwas chinolinowy (QA), kwas antranilowy (AA), kwas ksanturenowy (XA) i kwas pikolinowy (PA) [2]. Rozregulowanie szlaku kinureninowego, prowadzące do nadprodukcji takich metabolitów jak: KYN, 3HKYN, KYNA i QA, opisano w przypadku HIV, choroby Alzheimera, depresji, schizofrenii i różnych nowotworów [3-4]. Aby zrozumieć patofizjologię szlaku kinureninowego w szerokim zakresie chorób i zidentyfikować nowe biomarkery diagnostyczne, ważne jest posiadanie wysoce czułej, dokładnej i szybkiej metody analitycznej służącej do oznaczania poziomów stężeń tryptofanu i jego metabolitów, w różnych matrycach biologicznych. Monitorowanie aktywności szlaku kinureninowego w dużej serii próbek z wysoką dokładnością i niezawodnością w ramach jednego protokołu eksperymentalnego może przynieść wiele korzyści w badaniach farmakologicznych i diagnostycznych związanych z lepszym poznaniem patogenezы różnych chorób lub

odkryciem nowych biomarkerów. Mimo, że opracowano wiele metod z wykorzystaniem detektorów UV i fluorescencyjnych [5], podejścia te wykazują pewne wady w postaci słabej czułości, selektywności i swoistości. W przypadku analizy próbek o złożonym składzie matrycy, metody wykorzystujące rozdział chromatograficzny i detekcję z użyciem analizatorów mas (w szczególności tandemowych spektrometrów mas) gwarantują czułą i selektywną analizę materiału biologicznego różnego pochodzenia [6-7]. Jednakże jednoczesne oznaczenie panelu metabolitów szlaku kinureninowego w trakcie pojedynczej analizy nadal stanowi wyzwanie. Wynika to z różnic w ich endogennych poziomach stężeń, polarności i rodzaju grup funkcyjnych, a także z efektu matrycowego często obserwowanego podczas analizy próbek pochodzenia biologicznego z wykorzystaniem metod LC-MS. Cztery z tych metabolitów są bardzo polarne (np. QA, PA, 3HKYN i KYN), podczas gdy inne są mniej polarne (np. 3HAA, TRP, XA, KA i AA). Różnice widoczne są również w liczbie grup kwasowych i zasadowych, co skutkuje różną wydajnością jonizacji w źródle mas i zachowaniem chromatograficznym, co istotnie utrudnia wybranie uniwersalnych warunków ekstrakcji i jednoczesnej detekcji metabolitów tryptofanu w próbkach biologicznych [6].

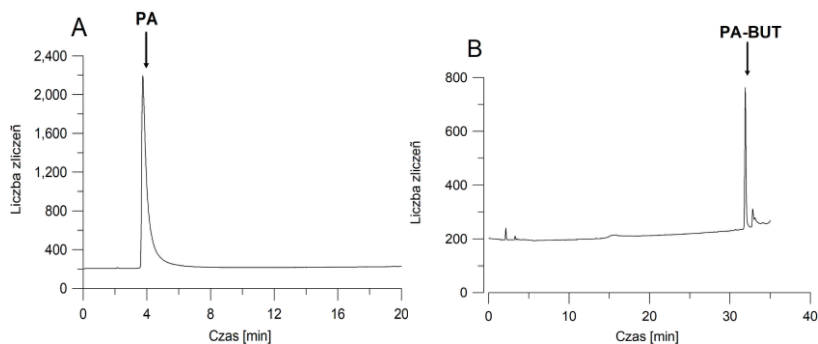
Część eksperymentalna: Wszystkie odczynniki i substancje chemiczne były wysokiej klasy czystości z przeznaczeniem do analiz LC-MS. Roztwory wyjściowe o stężeniu 1000 ppm uzyskano poprzez rozpuszczenie naważek PA i NA w wodzie, natomiast KYN w DMSO. W celu uzyskania końcowego stężenia 1 ppm, próbki rozcieńczono *n*-butanolem. Do 500 μ L tak przygotowanych roztworów wzorcowych metabolitów (PA, KYN, NA) dodano po 70 μ L mieszaniny *n*-butanolu z chlorkiem acetylu (9:1, *v/v*). Następnie próbki inkubowano w 57°C przez 1h. W kolejnym kroku próbki odparowano z wykorzystaniem Genevac EZ-2 Series, a następnie rozpuszczono w 100 μ L ultraczystej wody. Analizy przeprowadzono z wykorzystaniem wysokosprawnego chromatografu cieczowego serii 1200 sprzężonego ze spektrometrem mas (model 6120) firmy Agilent Technologies. Widma zbierano dla wyjściowych roztworów wzorcowych metabolitów tryptofanu (przed derywatyzacją) oraz metabolitów po reakcji estryfikacji. Faza ruchoma składała się ze składnika A (0,1 % kwasu mrówkowego w wodzie) oraz składnika B (metanolu). Rozdział chromatograficzny uzyskano na kolumnie Luna 3u C18(2) 100Å, 150 \times 4,60 mm (Phenomenex) pracując w gradiencie (20% B: 0-5 min; 20-80% B: 5-35 min; 80% B: 5-75 min). Jonizację próbek uzyskano poprzez elektrorozpraszanie w polaryzacji dodatniej. Jony pseudomolekularne ($[M+H]^+$) monitorowano w trybie SIM (z ang. Single Ion Monitoring).

Wyniki: Głównym problemem analitycznym w przypadku opracowania metod LC-MS w odwróconym układzie faz jest krótki czas retencji kwasu piko linowego (PA), kwasu nikotynowego (NA) oraz kinureniny (KYN). Kwas pikolinowy ze względu na swoją polarność jest szczególnie trudnym celem analitycznym i jest często pomijany w metodach jednoczesnego oznaczania wielu metabolitów tryptofanu. Wszystkie badane związki zawierają grupę karboksylową zdolną do uczestniczenia w reakcji estryfikacji z *n*-butanolem (Tabela 1).

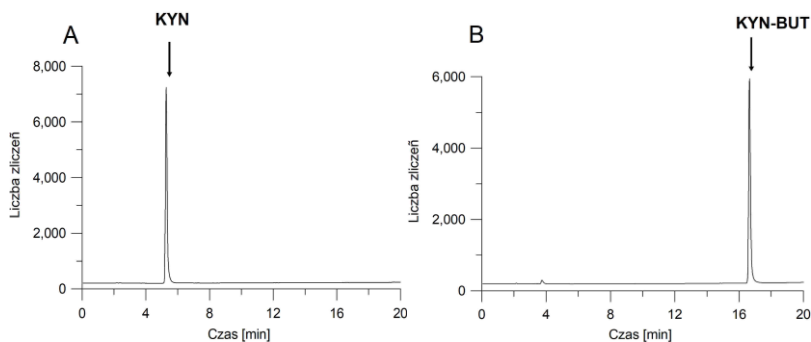
Tabela 1. Porównanie wzorów strukturalnych metabolitów tryptofanu przed i po reakcji estryfikacji.

Metabolit	Wzór strukturalny przed derywatyzacją	Wzór po derywatywacji
Kwas nikotynowy		
	MW = 123,11 u	MW = 180,11 u
Kwas pikolinowy		
	MW = 123,11 u	MW = 180,11 u
Kinurenina		
	MW = 208,21 u	MW = 264,21 u

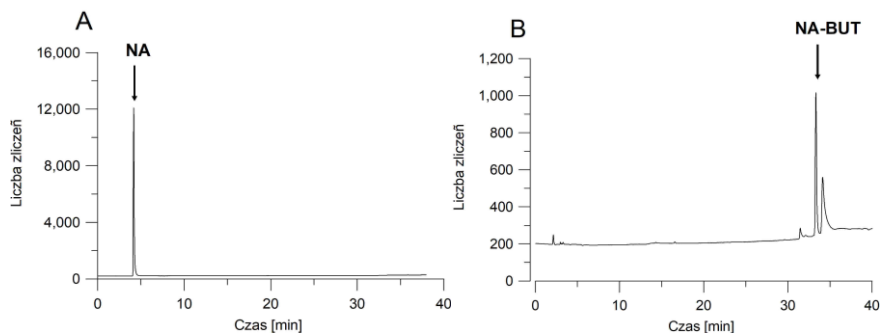
Redukcję polarności grupy hydroksylowej uzyskano poprzez substytucję łańcucha alkiłowego. Przełożyło się to na znaczne wydłużenie czasu retencji estrów w porównaniu z wyjściowymi metabolitami, co przedstawiono na Rys. 1-3.



Rys. 1. Chromatogram zarejestrowany dla kwasu pikolinowego (A) przed i (B) po reakcji estryfikacji. W przypadku kwasu pikolinowego (PA) monitorowano jon $m/z = 124$, a dla jego pochodnej estrowej (PA-BUT) – jon $m/z = 181$.



Rys. 2. Porównanie położenia sygnałów kinureniny (A) przed (KYN, $m/z = 209$) i (B) po reakcji estryfikacji (KYN-BUT, $m/z = 265$).



Rys. 3. Porównanie położenia sygnałów kwasu nikotynowego (A) przed (NA, $m/z = 124$) i (B) po reakcji estryfikacji (NA-BUT, $m/z = 181$).

Wnioski: Derywatywacja metabolitów szlaku kinureninowego poprzez przyłączenie reszty alkilowej pozwala na wydłużenie czasu retencji (poprzez obniżenie polarności) i daje szansę na poprawę parametrów analitycznych metod LC-MS (poprawę odzysków na etapie oczyszczania próbek biologicznych techniką SPE, obniżenie efektu matrycowego, poprawę selektywności oznaczenia).

Badania zostały finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu Preludium-21 (nr 2022/45/N/NZ5/01753)

Literatura:

1. A. A.B. Badawy, *Int. J. Tryptophan Res*, 10 (2017) 1.
2. A. A.B. Badawy, *Exp. Gerontol*, 129 (2020) 1.
3. H. Zuo, M. Ueland, A. Ulvik, S.J.P.M. Eussen, S.E. Vollset, O. Nygård, Ø. Midttun, D. Theofylaktopoulou, K. Meyer, G.S. Tell, *Am. J. Epidemiol*, 183 (2016) 249.
4. Y. Chen and G. J. Guillemin, *Int. J. Tryptophan Res*, 2 (2009) 2.
5. A. Sousa, C. Ribeiro, V.M.F. Gonc, J. Barbosa, B.A. Andrade, P. Silva, J.P. Andrade, S. Lea, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 198 (2021) 2.
6. F. Tömösi, G. Kecskeméti, E.K. Cseh, E. Szabó, C.Rajda, R. Kormány, Z. Szabó, L. Vécsei, T. Janáky, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 185 (2020) 2.
7. S. Bourcier, J.-F. Benoist, F. Clerc, O. Rigal, M. Taghi, and Y. Hoppilliard, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20 (2006) 1405.

ELEKTRODY BIZMUTOWE JAK CZUJNIKI ELEKTROCHEMICZNE DO OZNACZANIA CYNY W PRÓBKACH RZECZYWISTYCH

E. WLAZŁOWSKA, M. GRABARCZYK, M. FIALEK, UMCS, Wydział Chemii, Instytut Nauk Chemicznych, Katedra Chemii Analitycznej, pl. Marii Curie-Skłodowskiej 3, 20-031 Lublin

Abstrakt: Oznaczanie cyny pozwala na monitorowanie zanieczyszczeń i ocenę wpływu działalności człowieka na środowisko. Ma to kluczowe znaczenie dla ochrony zdrowia ludzkiego i ekosystemów oraz dla utrzymania zrównoważonego rozwoju. Cyna może być uwalniana do środowiska z różnych źródeł, takich jak przemysł, transport i odpady elektroniczne. Zawartość cyny w środowisku można oznaczyć różnymi metodami, w tym metodami woltamperometrii strippingowej z wykorzystaniem różnych elektrod pracujących. Na podstawie przeglądu literaturowego w niniejszej pracy zostały przedstawione granice wykrywalności i zakresy liniowości uzyskane dla oznaczania cyny metodami woltamperometrycznymi z wykorzystaniem elektrod bizmutowych jako elektrod pracujących. Podsumowano także praktyczne zastosowania opracowanych metod oznaczania cyny w analizie próbek rzeczywistych.

Wprowadzenie: Cyna jest niezbędnym pierwiastkiem śladowym występującym w roślinach i zwierzętach, szeroko stosowanym przez człowieka od początków epoki brązu. Jest jednak metalem ciężkim, który może kumulować się w organizmie i mieć szkodliwy wpływ na zdrowie człowieka, m.in.: obniżenie poziomu bilirubiny we krwi, anoreksję, obrzęki ośrodkowego układu nerwowego. Jest szeroko stosowana w przemyśle spożywczym jako składnik opakowania konserw i napojów [1,2]. Narażenie ogółu populacji na cynę może mieć podłoże dietetyczne, zwłaszcza poprzez spożycie żywności przechowywanej w puszkach pokrytych cyną. Szybkość rozpuszczania cyny w puszkach zależy od wielu czynników, z których prawdopodobnie najważniejszą rolę odgrywa obecność środków utleniających, które powodują korozję cyny. Azotany, najczęściej pochodzące z nawozów znajdujących się w składnikach żywności, są najczęściej spotykanymi środkami utleniającymi. Ważnym aspektem są również warunki przechowywania, zwłaszcza temperatura. Poddano badaniu pięć różnych puszek z żywnością owocową, które były przechowywane w temperaturze 37°C i 1°C. Po 20 miesiącach przeprowadzonych badań stwierdzono, że zawartość cyny była 12-krotnie wyższa w temperaturze 37°C niż w 1°C. Badania mające na celu określenie zawartości cyny w puszkach zawierających sok grejpfrutowy, sok pomarańczowy, sos pomidorowy i ananas wykazały, że przy pierwszym otwarciu puszek zawierały od 51 do 150 mg cyny na kg żywności [3]. Związki cynoorganiczne stosowane są jako składniki katalizatorów, stabilizatory tworzyw sztucznych, w produkcji środków ochrony roślin oraz jako środki pomocnicze w przemyśle papierniczym i tekstylnym. Głównym źródłem pobrania cyny przez człowieka jest żywność, szczególnie ta uprawiana na zanieczyszczonych terenach przemysłowych, gdzie stężenie tego pierwiastka w wodzie i powietrzu jest wysokie. WHO określiła maksymalny poziom tolerancji cyny w żywności na poziomie 250 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Znaczące ilości cyny nieorganicznej w wodzie pochodzą z odpadów przemysłowych oraz z metabolizmu związków cynoorganicznych przez mikroorganizmy [1,2]. Zainteresowanie oznaczaniem cyny związane jest z jej szerokim zastosowaniem w różnych dziedzinach. W literaturze opisano wiele metod oznaczania cyny. Do często stosowanych metod oznaczania cyny zalicza się atomową spektroskopię absorpcyjną, spektrofotometrię, atomową spektroskopię emisyjną, spektrometrię mas sprzężoną z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP–MS), spektrometrię emisyjną ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP–OES), spektrometrię fluorescencji rentgenowskiej, chromatografię i chemiluminescencję. Na wyróżnienie zasługują techniki ICP–MS i ICP–OES, które pozwalają na oznaczenie stężeń cyny całkowitej jak i w analizie specyficzynej cyny organicznej. Metody te są drogie i nie pozwalają jednak na selektywne oznaczanie jonów Sn(II) i Sn(IV) [2]. Metody elektrochemiczne mogą stanowić interesującą alternatywę dla innych metod oznaczania śladów cyny. W metodach tych pomiar polega na kontrolowaniu wielkości elektrycznych, takich jak potencjał, prąd lub ładunek. Główną zaletą metod elektrochemicznych w porównaniu z innymi systemami detekcji jest to, że osiąga się wysoką czułość, szeroki zakres liniowości przy niskich kosztach aparaturowych. Wśród metod elektrochemicznych możemy wyróżnić metody woltamperometrii stripingowej, w których zwiększoną czułość przypisuje się etapowi wstępnego załączenia, podczas którego oznaczony metal gromadzi się na powierzchni elektrody pracującej przed etapem strippingu, w którym dochodzi do rejestracji sygnału. Jako elektrody pracujące w metodach elektrochemicznych często były stosowane elektrody rtęciowe, takie jak wisząca kroplowa elektroda rtęciowa (HMDE) i filmowa elektroda rtęciowa (MFE). Jednakże toksyczność rtęci zmniejsza atrakcyjność stosowania tych elektrod i zainicjowała do skonstruowania elektrod na bazie materiałów nietoksycznych. Aby wyeliminować elektrody rtęciowe wprowadzono między innymi elektrody bizmutowe. Analizując dane literaturowe można stwierdzić, że do oznaczania cyny zostały wykorzystane filmowe elektrody bizmutowe (BiFE) oraz stała mikroelektroda bizmutowa (BiF μ E). Zaletami elektrod bizmutowych jest ich wydajność, która jest porównywalna z elektrodami rtęciowymi, ale także przy wykorzystaniu tych elektrod pomiar może być prowadzony z roztworów nieodtlenionych, co powoduje skrócenie czasu analizy [2–8]. W przypadku oznaczania cyny filmowe elektrody bizmutowe zostały wykorzystane jako elektrody pracującej w metodzie anodowej woltamperometrii stripingowej (ASV). W metodzie tej proces nagromadzania cyny na powierzchni elektrody pracującej dochodzi, gdy cyna zostaje zredukowana do postaci metalicznej, a następnie elektroda jest polaryzowana w kierunku anodowym, dzięki czemu oznaczana cyna zostaje utleniona i jest rejestrowany sygnał [4–8]. Gdy jako elektrodę pracującą wykorzystano stałą mikroelektrodę bizmutową stosowaną metodą była adsorpcyjna woltamperometria stripingowa (AdSV). W procesie załączenia dochodziło do adsorpcyjnego nagromadzania na powierzchni elektrody pracującej utworzonego kompleksu cyny z czynnikiem kompleksującym [9].

Część eksperymentalna: Podłożem do uzyskanie filmowej elektrody bizmutowej (BiFE) stosowana była elektroda z węgla szklatego. Powierzchnia elektrody pracującej przed rozpoczęciem wykonywania pomiarów była odpowiednio przygotowywana poprzez wypolerowanie jej z użyciem pasty z tlenku glinu, przepłukanie wodą destylowaną i umieszczenie w łaźni ultradźwiękowej. Tak wypolerowana elektroda była gotowa do nałożenia na nią filmu bizmutu in situ, czyli z roztworu, z którego były prowadzone

pomiary. Pomiary prowadzono w elektrolicie podstawowym, zawierającym odpowiednie stężenie Bi(III), dzięki któremu był utworzony film bizmutu na powierzchni elektrody. Elektroda bizmutową, która została wykorzystana do oznaczania cyny była również stałą mikroelektroda bizmutowa (BiF μ E). Aby zwiększyć czułość oznaczania cyny używając tę elektrodę tworzą na jej powierzchni film bizmutu. Był on tworzony w ten sam sposób jak na elektrodzie z węgla szklanego. Procedury oznaczania cyny za pomocą elektrod bizmutowych były optymalizowane pod kątem doboru elektrolitu podstawowego i jego stężenia, potencjału i czasu nagromadzenia, doboru czynnika kompleksującego jeżeli był stosowany. Ważnym elementem było zbadanie wpływu obecności jonów obcych oraz substancji organicznych, takich jak związki powierzchniowo czynne i związki humusowe, na sygnał cyny. Występowanie tych substancji w próbkach rzeczywistych jest bardzo prawdopodobne.

Wyniki: Na podstawie danych literaturowych porównano uzyskane granice wykrywalności i zakresy liniowości oznaczania cyny metodami woltamperometrii strippingowej z wykorzystaniem jako elektrod pracujących elektrody bizmutowe. Szczególną uwagę zwrócono na zastosowanie opracowanych metod do oznaczania cyny w próbkach rzeczywistych. Dane te przedstawia Tabela 1.

Tabela 1. Porównanie woltamperometrycznych procedur oznaczania cyny przy użyciu elektrod bizmutowych. Procedury uszeregowano według rosnącej granicy wykrywalności.

Metoda	Elektroda pracująca	Elektrolit podstawowy	Zakres liniowości [mol L ⁻¹]	Granica wykrywalności [mol L ⁻¹]	Czas nag. [s]	Zastosowanie	Lit.
AdSV	BiF μ E	0,1 mol L ⁻¹ bufor octanowy (pH 4,6)	8,0 × 10 ⁻⁹ – 8,0 × 10 ⁻⁷	2,1 × 10 ⁻⁹	40	CRM (SPS –WW1 woda odpadowa, SPS –SW1 woda powierzchniowa), woda rzeczna, woda deszczowa	9
ASV	BiFE	0,1 mol L ⁻¹ bufor octanowy (pH 4,5)	8,4 × 10 ⁻⁹ – 8,4 × 10 ⁻⁷	2,2 × 10 ⁻⁹	60	woda morska	4
ASV	BiFE	75 mmol L ⁻¹ kwas szczawio-owy, 75 μ mol L ⁻¹ CTAB	4,2 × 10 ⁻⁸ – 2,1 × 10 ⁻⁶	1,6 × 10 ⁻⁸	120	sok owocowy z puszki (ananas)	6
ASV	BiFE	0,1 mol L ⁻¹ bufor octanowy (pH 4,5)	5,0 × 10 ⁻⁸ – 5,0 × 10 ⁻⁶	1,8 × 10 ⁻⁸	90	–	5
ASV	BiFE	0,1 mol L ⁻¹ bufor octanowy (pH 4,5)	1,7 × 10 ⁻⁷ – 7,83 × 10 ⁻⁶	1,4 × 10 ⁻⁷	90	biodiesel	7
ASV	BiFE	2,5 mol L ⁻¹ bromek sodu	2,0 × 10 ⁻⁵ – 2,0 × 10 ⁻⁴	–	120	sok owocowy z puszki	8

Wnioski: W tabeli 1 zostały przedstawione metody woltamperometrii strippingowej do oznaczania cyny, w których wykorzystanymi elektrodami pracującymi były filmowe elektrody bizmutowe oraz stała mikroelektroda bizmutowa. Wykazano, że zastosowanie

BiFE i BiF μ E są odpowiednimi elektrodami do analizy śladowych stężeń cyny. Procedury te zostały zoptymalizowane tak, aby były co najmniej porównywalne, jeśli nie lepsze, w porównaniu z procedurami oznaczania cyny wykorzystującymi elektrody rtęciowe. Najczęściej stosowanym elektrolitem podstawowym był bufor octanowy o pH=4.6. Uzyskane granice wykrywalności do opracowanych procedur oznaczania cyny przy wykorzystaniu elektrod bizmutowych są zadawalające. Różnice w wartościach granic wykrywalności mogą wynikać ze sposobu przygotowania elektrody pracującej, wyboru elektrolitu podstawowego oraz zastosowaniu czynnika kompleksującego. W przypadku zastosowania metod ASV czas nagromadzenia był w zakresie od 60 do 120 s, natomiast w metodzie AdSV wynosił on zaledwie 40 s, co świadczy iż procedury te charakteryzowały się krótkim czasem analizy. Przedstawione procedury w pracach [6,9] wykazały, że opracowane metody wykazują bardzo dobrą selektywność cyny w stosunku do innych jonów oraz substancji organicznych, bez większych zakłóceń sygnału. Praktyczne zastosowanie opracowanych metod oznaczania cyny wykazano w badaniach przeprowadzonych na próbkach żywności, próbkach środowiskowych i certyfikowanych materiałach odniesienia. Wcześniejsze przygotowanie próbki było konieczne w przypadku oznaczania cyny w próbce biodeselu, która została poddana procesowi mineralizacji. Pozostałe metody nie wymagały wstępnego przygotowania próbek rzeczywistych przed pomiarem, dzięki czemu nie wydłużał się czas trwania analizy próbek. Uzyskane wyniki oznaczania cyny potwierdzają możliwość wykorzystania tych metod do analizy próbek rzeczywistych. W przypadku wykonywania analiz środowiskowych lepszym wyborem byłaby stała mikroelektroda bizmutowa niż filmowa elektroda bizmutowa. BiF μ E jest czujnikiem bardziej przyjaznym dla środowiska w porównaniu z BiFE, ponieważ do elektrolitu pomocniczego nie dodaje się jonów bizmutu w celu utworzenia filmu bizmutu. Użycie tej elektrody jest zgodne z założeniami zielonej chemii, gdyż pozwala na redukcję odpadów, unikanie toksycznych substancji oraz zachowanie naturalnych warunków pomiaru.

Literatura:

1. M.N. Gitlitz, M.K. Moran, Kirk–Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 5th edition, John Wiley & Sons, New York 2006.
2. M. Grabarczyk, E. Wlazłowska, M. Fiałek, *Materials*, 16 (2023) 7545.
3. S. Blunden, T. Wallace, *Food Chem. Toxicol.* 41 (2003) 1651.
4. E.A Hutton, S.B. Hočevár, L. Mauko, B. Ogorevc, *Anal. Chim. Acta*, 580 (2006) 244.
5. K. Tyszczyk–Rotko, R. Metelka, K. Vytřas, M. Barczak, I. Sadok, B. Mirosław, *Monatsh. Für Chem. Chem. Mon.*, 147 (2016) 61.
6. C. Prior, *Electroanalysis*, 22 (2010) 1446.
7. M. Frena, I. Campestrini, O.C. de Braga, A. Spinelli, *Electrochim. Acta*, 56 (2011) 4678.
8. C. Prior, G.S. Walker, *Electroanalysis*, 18 (2006) 823.
9. M. Adamczyk, M. Grabarczyk, *J. Electrochem. Soc.* 169 (2022) 016515.

IDENTYFIKACJA METABOLITÓW PRZY UŻYCIU CHROMATOGRAFII GAZOWEJ SPRĘŻONEJ ZE SPEKTROMETRIĄ MAS

M. NESTERAK, A. SWATEK, I. KOMANIECKA, UMCS, Instytut Nauk Biologicznych, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

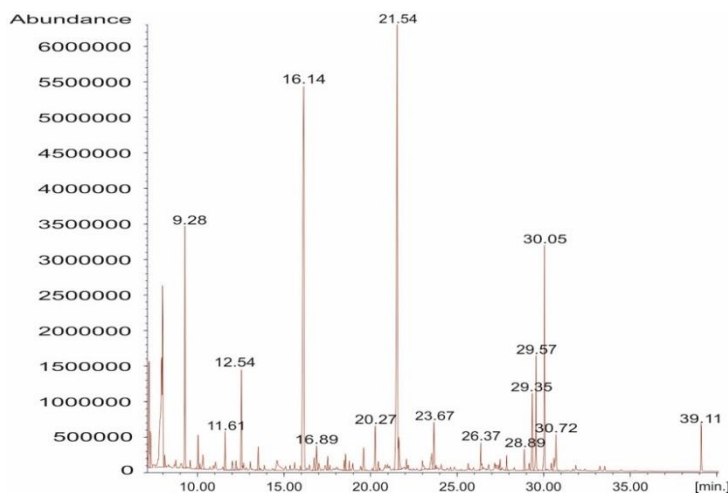
Abstrakt: Analizy metabolomiczne oparte na spektrometrii mas mają ogromny potencjał analityczny. Pozwalają na jednoczesne wykrywanie i oznaczanie ilościowe wielu tysięcy metabolitów. Jednak identyfikacja związków i precyzyjne oznaczanie ilościowe stanowią spore wyzwanie, ze względu na złożoność chemiczną i dynamiczny zakres metabolomu. Analiza ilościowa wielu metabolitów w mieszaninach jest dodatkowo utrudniona przez czynniki takie jak supresja jonów, fragmentacja i obecność izomerów. Metabolomika oparta na chromatografii gazowej sprężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) jest doskonałym narzędziem do identyfikacji i ilościowego oznaczania metabolitów drobnocząsteczkowych, o masie nie przekraczającej 650 Da. Jest skuteczna w identyfikacji związków, takich jak: cukry, aminokwasy, kwasy tłuszczowe, sterole, kwasy organiczne, alkohole, hormony, katecholaminy, związki aromatyczne, leki i toksyny. Aby zwiększyć lotność tych związków i ułatwić analizę chromatograficzną, często stosuje się ich chemiczną derywatyzację. Identyfikacja otrzymanych związków przebiega najczęściej w oparciu o zgromadzone biblioteki danych, które pozwalają na określenie prawdopodobieństwa prawidłowej identyfikacji danej pochodnej metabolitu.

Wprowadzenie: Metabolomika, jako dziedzina badawcza, jest nauką liczącą ponad 20 lat. Stanowi ona istotne narzędzie biologii systemowej, które znalazło zastosowanie w badaniach nad roślinami, drobnoustrojami i ssakami, zarówno w aspektach podstawowych, jak i stosowanych. Charakter metabolitów, ich różnorodność pod względem struktury chemicznej i dynamicznego zakresu liczebności, nadal stanowi główne wyzwanie w pełnym zrozumieniu metabolomu. Pomimo tych wyzwań, dokonano znaczących postępów w zakresie ilościowych analiz metabolitów, co dostarczyło istotnych informacji na temat różnorodnych metabolitów obecnych we wszystkich domenach drzewa życia [1]. Szacuje się, że w całym drzewie życia może występować ponad milion różnych metabolitów, z których u jednego gatunku może być obecnych nawet od 1 000 do 40 000 różnych związków [2]. To potwierdza ogromną złożoność metabolomu oraz potrzebę dalszych badań w tej dziedzinie. Dotychczas nawet najbardziej zaawansowane metody nie są w stanie precyzyjnie określić górnych limitów liczby metabolitów. Aktualne możliwości wykrywania i oznaczania ilościowego metabolitów są dość ograniczone. Obecnie, kombinacje różnych metod umożliwiają ilościowe oznaczenie jedynie części metabolitów, obecnych w komórkach bakterii (u *E. coli* oznaczono ilościowo 700 z 3 700 zidentyfikowanych metabolitów), drożdży (oznaczono 500 z 2 680 metabolitów), człowieka (oznaczono ilościowo 8 000 z 114 100 metabolitów) czy też roślin (oznaczono 14 000 z 400 000 przewidywanych metabolitów) [3-6]. Różnorodność chemiczna, szybkie zmiany w stężeniach metabolitów i szeroki zakres ich występowania, sprawiają, że niemożliwe jest zastosowanie pojedynczej procedury analitycznej do po-

miaru wszystkich metabolitów [7]. Dlatego konieczne jest stosowanie różnorodnych technik ekstrakcji i metod analitycznych w celu uzyskania jak najbardziej kompletnego obrazu metabolomu [8-13, 15]. Ustalenie skutecznych praktyk laboratoryjnych w tej dziedzinie jest trudniejsze niż np. w przypadku techniki sekwencjonowania RNA [14-16]. Konieczne jest wprowadzenie rygorystycznych standardów normalizacji danych metabolomicznych. Dodatkowe trudności w analizie i interpretacji otrzymanych wyników związane są z szerokim zakresem celów związanych z pomiarem metabolitów, który obejmuje ukierunkowaną analizę metabolitów, ich profilowanie, analizę w skali metabolomicznej oraz techniki pobierania odcisków palców metabolitów [17,18]. Technika GC-MS posiada specyficzne zalety, które sprawiły, że została określona jako "złoty standard" w metabolomice [19]. Jonizacja elektronowa w GC-MS prowadzi do uzyskania złożonych i bogatych wzorów fragmentacji poszczególnych związków, co zwiększa specyficzność dopasowania widm masowych [20]. Dotychczas zarejestrowane widma masowe związków i chromatograficzne parametry retencji gromadzone w publicznie dostępnych bibliotekach widm masowych, np. NIST (Mass Spectral Library collection, U.S. National Institute of Standards and Technology) [21]. Obecnie dostępna wersja tej biblioteki (NIST14) zawiera widma GC-MS dla 242 477 unikalnych związków, z których około 30% posiada standaryzowane dane retencji, pozwalające na zastosowanie dwóch ortogonalnych parametrów (widmo masowe i wyznaczony indeks retencji) podczas identyfikacji związku [21]. Celem pracy było wykorzystanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) do identyfikacji metabolitów polarnych pochodzących z komórek bakterii (*Pseudomonas* sp.)

Część eksperymentalna: Przeprowadzono analizy metabolitów polarnych obecnych w komórkach bakterii (*Pseudomonas* sp.) techniką GC-MS, wg procedury zaproponowanej przez Strelkova i wsp. [22]. W tym celu 18 h hodowlę, na standardowym podłożu, odwirowano (10000 obr/min, 20°C, 30 min), a komórki przemyto 0,85% roztworem NaCl. Masę bakteryjną poddano procedurze ekstrakcji metabolitów przy użyciu 2,5 ml gorącego metanolu, podgrzanego do 65°C. Po dodaniu do próbki wzorca wewnętrznego (mannitol) prowadzono ekstrakcję w łaźni wodnej o temperaturze 65°C przez 15 min. Następnie ekstrakt schłodzono do 25°C i odwirowano resztki komórek (5 tys. x g, 5 min). Zebrano supernatant i dodano do niego równą objętość wody i 1 ml chloroformu, następnie wytrząsano energicznie i odwirowano w celu odmycia związków lipofilnych. Fazę górną, zawierającą wyekstrahowane związki polarne, wysuszono nad P₂O₅ i KOCH. Do suchej próbki dodano 100 µl roztworu hydrochlorku metoksyaminy w pirydynie (20 mg/ml) i inkubowano w 30°C przez 90 min. Następnie próbkę poddano silylacji przy użyciu 150 µl MSTFA (N-metylo-N-trimetylosililo-trifluoroacetamid) i inkubację z odczynnikami w 37°C przez 30 min [22]. Analizę GC-MS wykonano przy użyciu chromatografu gazowego 5890A sprzężonego ze spektrometrem mas MSD 5975C (inert XL EI/CI, Agilent Technologies). Chromatograf wyposażony był w kolumnę kapilarną HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Gazem nośnym był hel (przepływ 1 ml/min), iniekcja w trybie *splitless* (1 min/100 ml). Program temperaturowy: 70°C przez 1 min, narost 1°C/min do 76°C, następnie 6°C/min do 325°C, utrzymywanej przez 10 min [22]. Otrzymane dane analizowano w oparciu o bibliotekę widm NIST08.

Wyniki: Analizując próbkę polarnych metabolitów otrzymanych z komórek bakterii *Pseudomonas sp.* stwierdzono obecność szeregu intensywnych sygnałów oraz dużej liczby pików chromatograficznych o niewielkiej intensywności (Rys. 1). Analiza widm masowych poszczególnych związków pozwoliła na identyfikację metabolitów polarnych pochodzących z komórek bakterii (Tabela 1). Piki chromatograficzne o niskich czasach retencji pochodziły od zastosowanych odczynników (pirydyna $T_R=9.27$ min, metoksyamina $T_R=11.61$ min). Zanotowano m.in. obecność TMS-pochodnej kwasu bursztynowego, aminokwasów (5-okso-L-proliny i lizyny), kwasu fosforowego oraz sacharozy. Powyższe metabolity bakteryjne zidentyfikowano przy zastosowaniu bazy NIST08 z prawdopodobieństwem na poziomie 38 – 98%.



Rys. 1. Chromatogram (GC) metabolitów wyizolowanych z komórek bakterii (frakcja polarna), po derywatywacji metoksyaminą i MSTFA.

Tabela. 1. Metabolity niskocząsteczkowe obecne w ekstrakcie z komórek bakterii (Rys. 1), zidentyfikowane na podstawie ich widm masowych przy zastosowaniu biblioteki NIST.08, z określonym prawdopodobieństwem poprawnej identyfikacji [%].

T_R [min.]	Metabolit i prawdopodobieństwo jego identyfikacji	[%]
12,54	3,4-dimetylo-1-pentametylodisililoksycykloheksan	47
16,14	silanol, trimetylofosforan	98
16,89	kwas bursztynowy, di-TMS ester	98
21,54	5-okso-L-prolina, TMS ester	98
23,67	amina, <i>N,N,N</i> -tri-TMS ester	64
26,36	kwas fosforowy, 2,3-di-TMS ester	94
28,89	L-lizyna, <i>N2,N6,N6'</i> -tri-TMS ester	90
29,34	D-mannitol (wzorec wewn.), heksakis- <i>O</i> -TMS ester	93
29,56	kwas 1-propeno-1,2,3-trikarboksylowy, tri-TMS ester	38
30,05	1- <i>O</i> -heksadecylo glicerol, di-TMS eter	42
38,10	α -D-glukopyranozylo- β -fruktofuranozyl, tetrakis- <i>O</i> -TMS ester (TMS-pochodna sacharozy)	91

Wnioski: Technika chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) jest narzędziem bardzo użytecznym, służącym do identyfikacji związków będących

metabolitami komórkowymi, które uprzednio zostały wyekstrahowane z komórek bakterii i poddane chemicznej derywatywacji. Porównanie parametrów retencji poszczególnych związków i ich widm masowych pozwala na wysoce prawdopodobną ich identyfikację przy zastosowaniu dostępnej biblioteki widm masowych NIST.

Praca powstała w ramach realizacji projektu OPUS finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (nr projektu: 2020/37/B/NZ8/00855).

Literatura:

1. M.M. Rinschen, J. Ivanisevic, M. Giera, G. Siuzdak, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20 (2019) 353.
2. S. Alseekh, A.R. Fernie, *Plant J.*, 94 (2018) 933.
3. A.C. Guo, *Nucleic Acids Res.*, 41 (2013) D625.
4. T. Sajed, *Nucleic Acids Res.*, 44 (2016) D495.
5. T. Hautbergue, E.L. Jamin, L. Debrauwer, O. Puel, IP. Oswald., *Nat. Prod. Rep.*, 35 (2018) 147.
6. M. Ramirez-Gaona, *Nucleic Acids Res.*, 45 (2017) D440.
7. K. Saito, F. Matsuda, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 61 (2010) 463.
8. MR. Mashego, *Biotechnol. Lett.* 29 (2007) 1.
9. WM. Van Gulik, *Methods Mol. Biol.*, 881 (2012) 279.
10. J. Lisek, N. Schauer, J. Kopka, L. Willmitzer, *Fernie. Nat. Protoc.*, 1 (2006) 387.
11. T. Tohge, AR. Fernie, *Nat. Protoc.*, 5 (2010) 1210.
12. W. van Gulik, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 21 (2010) 27.
13. D. Vuckovic, *Anal. Bioanal. Chem.*, 403 (2012) 1523.
14. Z. Wang, M. Gerstein, M. Snyder, *Nat. Rev. Genet.*, 10 (2009) 57.
15. BD. Bennett, J. Yuan, EH. Kimball, JD. Rabinowitz, *Nat. Protoc.*, 3 (2008) 1299.
16. B. Li, *Nucleic Acids Res.*, 45 (2017) W162.
17. O. Fiehn, *Plant Mol. Biol.*, 48 (2002) 155.
18. MP. Papadimitropoulos, CG. Vasilopoulou, C. Maga-Nteve, MI. Klapa, *Methods Mol. Biol.*, 1738 (2018) 133.
19. E. Gelpi, WA. Koenig, J. Gibert, J. Oro, *J. Chromatogr. Sci.*, 7 (1969) 604.
20. CJW. Brooks, EC. Horning, JS. Young, *Lipids*, 3 (1968) 391.
21. O. Fiehn, *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 114 (2017) 30.4.1.
22. S. Strelkov, M. von Eistermann, D. Schomburg, *Biol. Chem.*, 385 (2004) 853.

NOWE ROZWIĄZANIA W ELEKTRODACH JONOSELEKTYWNYCH ZE STAŁYM KONTAKTEM – POLIMERY PERINONOWE JAKO WARSTWA MEDIACYJNA

K. MORAWSKA¹, C. WARDAK¹, M. WARDAK², M. CZICHY³, P. JANASIK³,

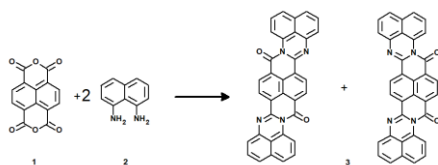
¹Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Chemii, Katedra Chemii Analitycznej, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin, ² Samodzielny Publiczny Zakład Opieki Zdrowotnej Ministerstwa Spraw Wewnętrznych i Administracji w Lublinie, ul. Grenadierów 3, 20-331 Lublin, ³Politechnika Śląska, Wydział Chemiczny, Katedra Fizykochemii i Technologii Polimerów, ul. ks. Marcina Strzody 9, 44-100 Gliwice

Abstrakt: Elektrody jonoselektywne ze stałym kontaktem (SCISEs, ang. *solid contact ion-selective electrodes*) to jedne z częściej wykorzystywanych czujników potencjometrycznych. Od ponad 50 lat ich budowa jest udoskonalana w celu uzyskania coraz lepiej działających sensorów. Wykorzystując nowy polimer perinonowy w roli warstwy mediacyjnej opracowano nowy rodzaj potasowych elektrod jonoselektywnych ze stałym kontaktem. Warstwa pośrednia polimeru perinonowego naniesiona została na powierzchnię elektrody z węgla szklatego (GCE, ang. *glassy carbon electrode*) na drodze polimeryzacji potencjodynamicznej z roztworu elektrolitu zawierającego monomery polimeru B4. Następnie na odpowiednio przygotowane podłoże nanoszono jonoczułą membranę, która zapewniała SCISE selektywność na jony potasu. W celu sprawdzenia jakości przygotowanej elektrody przeprowadzono szereg badań i wyznaczono parametry takie jak nachylenie charakterystyki, zakres liniowości, granica wykrywalności, selektywność, odwracalność i stabilność potencjału, a także zbadano wpływ środowiska próbki i warunków pomiaru na potencjał elektrod.

Wprowadzenie: Prace nad rozwojem elektrod jonoselektywnych ze stałym kontaktem trwają już nieprzerwanie od lat 70. XX wieku – to właśnie wtedy powstała pierwsza SCISEs, która była elektrodą typu drutu powlekanego (CWE, ang. *coated wire electrode*). Mimo uproszczonej budowy i eliminacji mankamentów związanych z obecnością roztworu wewnętrznego (obecny w klasycznych elektrodach jonoselektywnych (ISEs, ang. *ion-selective electrodes*)) wciąż borykano się z problemami takimi jak niestabilność i słaba odwracalność potencjału, które były następstwem niezbyt efektywnego przewodnictwa jonowo-elektronowego wynikającego z braku elektrolitu wewnętrznego. Rozwiązaniem okazało się wprowadzenie odpowiedniej warstwy mediacyjnej, zwanej również warstwą pośrednią lub stałym kontaktem. Materiał pełniący tę funkcję musi charakteryzować się hydrofobowością, obojętnością oraz stabilnością chemiczną, ale przede wszystkim powinien on wykazywać bardzo dobre przewodnictwo jonowo-elektronowe. Do dzisiaj opracowano bardzo liczne grupy materiałów stałego kontaktu: nanomateriały węglowe, polimery przewodzące, nanocząstki metali oraz tlenków metali, ciecze jonowe oraz materiały kompozytowe. Dość liczną grupą są polimery przewodzące. Spełniają one wszystkie wymagania, jakie powinien posiadać materiał warstwy mediacyjnej. Do tej pory jako stały kontakt z sukcesem wykorzystano między innymi polianilinę (PANI), poli-3-oktylotiofen (POT), poli(3,4-etylenodioksytiofen) (PEDOT), a także polipirol (PPy) [1,2]. Nasz zespół badawczy po raz pierwszy zastosował w tej roli polimer perinonowy. Polimery te ze względu na ich właściwości zaliczane są do półprzewodników

organicznych i składają się z monomerów będących pochodnymi naftalenu i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Polimery perinonowe charakteryzują się niską przerwą energetyczną, stabilnością zarówno termiczną, jak i elektryczną, wysoką absorpcją światła, bardzo dobrym przewodnictwem, a także zaskakującą elektroaktywnością. W skład tych polimerów wchodzi imidazole oraz grupy imidowe, dzięki czemu zyskują one jeszcze lepszą odporność na wysokie temperatury [3]. Polimer perinonowy B4 również posiada wyżej wspomniane cechy, a ponadto wykazuje bardzo dobrą hydrofobowość, co jest szczególnie ważne w przypadku zastosowania go jako warstwy medycyjnej w SCISEs. Dzięki temu zminimalizowane jest prawdopodobieństwo utworzenia się warstwy wodnej między warstwą medycyjną, a podłożem lub membraną, co z kolei przekłada się na bardziej dokładne i wiarygodne wskazania elektrody.

Część eksperymentalna: W celu przygotowania elektrod z węgla szklatego przed naniesieniem warstwy polimeru przewodzącego, powierzchnia wszystkich elektrod została oczyszczona poprzez mechaniczne wypolerowanie na papierze ściernym, a następnie na filcu pokrytym zwilżonym tlenkiem glinu (Al_2O_3). Tak przygotowane elektrody przepłukano wodą destylowaną, a następnie na kilka minut umieszczono w łaźni ultradźwiękowej w celu usunięcia pozostałości Al_2O_3 . Kolejnym krokiem było naniesienie na podłoże elektrod warstwy pośredniej polimeru B4. W tym celu sporządzono 0,1 M roztwór heksafluorofosfanu tetrabutylamoniowego w dichlorometanie, w którym następnie rozpuszczono monomery polimeru B4 (schemat reakcji syntezy monomerów przedstawiono na rysunku 1).

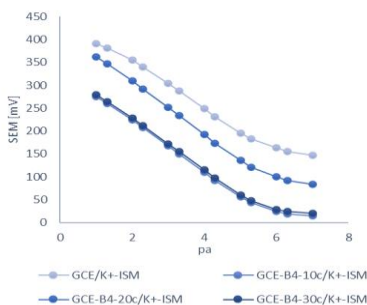


Rys. 1. Schemat syntezy monomerów będących prekursorami polimeru B4, gdzie 1 – dibenzodion-1,4,5,8-naftaleno-1,8-tetrakarboksylowy; 2 – naftaleno-1,8-diamina; 3 – mieszanina monomerów B4.

Roztwór poddano homogenizacji w łaźni ultradźwiękowej, a następnie umieszczono go w naczynku elektrochemicznym i wprowadzono wcześniej oczyszczoną elektrodę z węgla szklatego, drucik srebrny (elektroda odniesienia) oraz drucik platynowy (elektroda pomocnicza). Wszystkie elektrody zostały uprzednio przemyte roztworem dichlorometanu. W tym układzie przeprowadzono proces polimeryzacji potencjodynamiczną metodą woltamperometrii cyklicznej w zakresie potencjałów dodatnich od 0 do +1,45 V, który przebiegał dla 1 pary elektrod w 10 cyklach, dla 2 pary w 20 cyklach i dla 3 pary w 30 cyklach. Drugim etapem generowania warstwy pośredniej był proces stabilizacji, który zachodził w roztworze elektrolitu i przebiegał w takich samych warunkach, i przy takich samych parametrach jak proces polimeryzacji. Jediną różnicą było to, że dla każdej elektrody stabilizacja przebiegała w 5 cyklach, a roztwór nie zawierał monomeru B4. Na tak przygotowane elektrody nakropiono następnie odpowiednią objętość koktajlu membranowego (skład w procentach wagowych: 64% z DOS, 32% PCV, 3% walinomycyny oraz 1% KpTPBCl – odważkę 0,3g rozpuszczono w 3 ml tetrahydrofuranu). Czynność tą powtórzono jeszcze dwukrotnie, a elektrody pozostawiono do odparowania rozpuszczalnika na 24 godziny. W rezultacie otrzymano cztery pary elektrod – GCE/ K^+

ISM (elektroda niemodyfikowana - kontrolna), GCE-B4-10c/K⁺-ISM (elektroda z warstwą polimeru B4 naniesionego w 10 cyklach), GCE-B4-20c/K⁺-ISM (elektroda z warstwą polimeru B4 naniesionego w 20 cyklach), GCE-B4-30c/K⁺-ISM (elektroda z warstwą polimeru B4 naniesionego w 30 cyklach). Wszystkie SCISEs kondycjonowano przez kilka dni w 1x10⁻³ M roztworze KNO₃.

Wyniki: W celu wyznaczenia charakterystyki elektrod wykonano krzywe kalibracyjne w zakresie stężeń 1x10⁻¹-1x10⁻⁷ M (zestawienie krzywych kalibracyjnych przedstawiono na rysunku 2). Na podstawie odpowiedzi elektrod wyznaczono nachylenie charakterystyki (S), zakres liniowości oraz granicę wykrywalności (LOD). Dane zebrano w tabeli 1.



Rys. 2. Zestawienie krzywych kalibracyjnych poszczególnych potasowych elektrod jonoselektywnych ze stałym kontaktem.

Tabela 1. Wybrane parametry SCISEs wyznaczone na podstawie odpowiedzi elektrod.

Wybrane parametry	GCE/K ⁺ -ISM	GCE-10c-B4/K ⁺ -ISM	GCE-20c-B4/K ⁺ -ISM	GCE-30c-B4/K ⁺ -ISM
Nachylenie [mV/dekadę]	51,55	55,23	54,92	54,89
Zakres liniowości [M]	1x10 ⁻² -5x10 ⁻⁶	1x10 ⁻¹ -5x10 ⁻⁶	1x10 ⁻¹ -5x10 ⁻⁶	1x10 ⁻¹ -5x10 ⁻⁶
Granica wykrywalności [μM]	2,03	2,74	2,87	2,80

Bardzo ważnym parametrem dla elektrod jonoselektywnych jest stabilność i odwracalność potencjału. Stabilność definiowana jest przez dryft potencjału, który wyznacza się jako iloraz różnicy potencjału i różnicy czasu. Pomiar stabilności prowadzono przez 3 godziny w roztworze jonu głównego (KNO₃) o stężeniu 1x10⁻³ M. Dryft potencjału dla elektrod GCE/K⁺-ISM, GCE-10c-B4/K⁺-ISM, GCE-20c-B4/K⁺-ISM, GCE-30c-B4/K⁺-ISM wynosił odpowiednio 27x10⁻⁴, 5,4x10⁻⁴, 6,7x10⁻⁴, 2,0x10⁻⁴ mV/s. Z kolei odwracalność potencjału wyznaczono poprzez naprzemienny pomiar potencjału w roztworach KNO₃ o stężeniu 1x10⁻³ M oraz 1x10⁻⁴ M. Na podstawie otrzymanych wyników obliczono średnią wartość potencjału w danym stężeniu i odchylenie standardowe, których wartości umieszczono w tabeli 2.

Tabela 2. Średnie wartości potencjału oraz odchylenia standardowe dla wybranych stężeń KNO₃.

Stężenie roztworu badanego	GCE/K ⁺ -ISM	GCE-10c-B4/K ⁺ -ISM	GCE-20c-B4/K ⁺ -ISM	GCE-30c-B4/K ⁺ -ISM
1x10 ⁻³ M [mV]	436,01±4,35	284,96±0,31	302,17±1,31	280,00±1,31
1x10 ⁻⁴ M [mV]	386,24±4,97	233,95±1,04	251,50±2,80	229,95±2,72

W celu wyznaczenia K_{ij} , czyli potencjometrycznego współczynnika selektywności najpierw przeprowadzono pomiary w roztworze zawierającym wyłącznie jon główny, aby uzyskać krzywą kalibracyjną dla jonów potasu (K^+). Następnie wykonano kalibrację w roztworach jonów interferujących takich jak jony magnezu (Mg^{2+}), jony wapnia (Ca^{2+}), jony sodu (Na^+), jony litu (Li^+). Uzyskane wartości logarytmicznego współczynnika selektywności umieszczono w tabeli 3.

Tabela 3. Wartości potencjometrycznego współczynnika selektywności w postaci logarytmicznej wybranych SCISEs.

Jony	$(\log K_{K/M})$			
	GCE/ K^+ -ISM	GCE-10c-B4/ K^+ -ISM	GCE-20c-B4/ K^+ -ISM	GCE-30c-B4/ K^+ -ISM
Mg^{2+}	-3,54	-3,91	-3,90	-3,99
Ca^{2+}	-3,59	-4,60	-4,59	-4,32
Na^+	-3,66	-4,69	-4,71	-4,01
Li^+	-3,70	-5,15	-5,15	-4,29

Na drodze badań dowiedziono również, że światło oraz obecność gazów w próbce (tlen i dwutlenku węgla) nie miała wpływu na potencjał elektrod. Ponadto SCISEs modyfikowane perinonem nie wykazywały wrażliwości na zmiany potencjału redox.

Wnioski: Obecność polimeru perinonowego B4 między membraną, a podłożem elektrody wpłynęła korzystnie na parametry potasowych elektrod jonoselektywnych ze stałym kontaktem. Najlepsze parametry posiadała GCE-10c-B4/ K^+ -ISM, w której polimer perinonowy naniesiono w 10 cyklach. Polimer ten sprawdził się bardzo dobrze w roli warstwy mediacyjnej o czym świadczy między innymi bardzo niski dryft potencjału (około 5-krotnie mniejszy niż dla elektrody niemodyfikowanej), a także poprawiona odwracalność potencjału (odchylenie standardowe elektrody najlepiej działającej było 15-krotnie mniejsze w stosunku do odchylenia dla elektrody kontrolnej). Wszystkie elektrody modyfikowane miały szerszy zakres liniowości, wyższe nachylenie oraz niższą granicę wykrywalności, co świadczy o tym, że polimer B4 jest świetnym materiałem mediacyjnym. Dzięki warstwie pośredniej SCISEs wykazywały również lepszą selektywność w stosunku do wybranych jonów interferujących.

Literatura:

1. C. Wardak, K. Morawska, K. Pietrzak, *Materials*, 16 (2023) 5779.
2. E. Zdrachek, E. Bakker, *Anal. Chem.*, 91 (2019) 2.
3. M. Łapkowski, *Materials*, 14 (2021) 6880.

ANALIZA TERMOGRAWIMETRYCZNA MODYFIKOWANYCH WYTŁOKÓW Z JABŁEK

K. KORONKIEWICZ¹, M. JOKA-YILDIZ², M. KALINOWSKA¹,
G. ŚWIDERSKI¹, ¹Politechnika Białostocka, Wydział Budownictwa i Nauk
o Środowisku, Katedra Chemii, Biologii i Biotechnologii, ul. Wiejska 45E, 15-351 Bia-
łystok; ²Politechnika Białostocka, Wydział Budownictwa i Nauk o Środowisku, Katedra
Inżynierii Rolno-Spożywczej i Kształtowania Środowiska, ul. Wiejska 45E, 15-351
Białystok

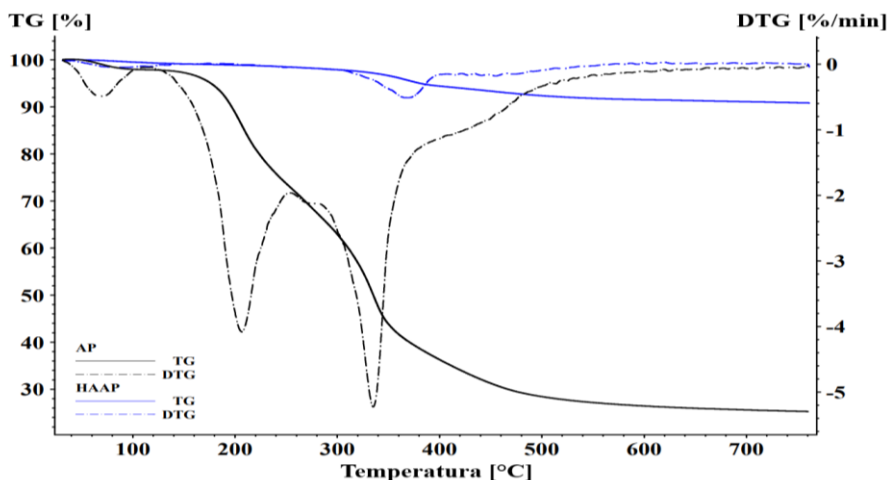
Abstrakt: Celem pracy było zbadanie i analiza właściwości termicznych zaproponowa-
nego adsorbentu, jakimi były wytłoki z jabłek przed i po chemicznej modyfikacji na
drodze syntezy hydrotermalnej hydroksyapatytu. Skuteczność przeprowadzonej syntezy
potwierdzono techniką FT-IR, a właściwości termiczne scharakteryzowano za pomocą
termograwimetru (TG) z wyznaczeniem pochodnej (DTG). Zsyntezowany hydroksyapa-
tyt (HAAP) charakteryzował się znacznie większą stabilnością termiczną w porównaniu
do wytłoków z jabłek (AP) w badanym zakresie temperatur.

Wprowadzenie: Zanieczyszczenie jonami metali ciężkich jest istotnym zagrożeniem
środków wodnych. Synteza hybrydowych adsorbentów kompozytowych z minerałów
nieorganicznych i odpadów rolniczych jest aktualnie popularna ze względu na ich niższy
koszt w porównaniu do konwencjonalnych adsorbentów. Poza tym, wytwarzanie tego
typu materiałów gwarantuje maksymalne wykorzystanie zasobów, przyczyniając się do
ochrony środowiska. Należy jednak wziąć pod uwagę m.in. koszty eksploatacji, trans-
portu i mielenia. Ogólnie, odpady rolnicze mają niską gęstość objętościową, co znacznie
podnosi koszty ich transportu.

Dlatego pożądane jest wykorzystanie odpadów wytworzonych w otoczeniu obszarów
problemowych. W różnych pracach zaprezentowano skuteczność stosowania biomasy
modyfikowanej chemicznie do oczyszczania wód i ścieków [2, 3]. Jeden z obiecujących
przykładów to hydroksyapatyt zsyntezowany z wykorzystaniem biomasy. Włączenie
biomasy do procesu syntezy zapobiega łączeniu się nano/mikrocząstek hydroksyapatytu
w większe aglomeraty, które powodują zmniejszanie efektywności adsorpcji zanieczysz-
czeń. W celu uzyskania takiego kompozytu stosowano wiele metod, w tym syntezę sol-
gel, wytrącanie chemiczne i proces hydrotermalny [4]. Wśród nich procesy hydrotermal-
ne okazały się najskuteczniejsze do syntezy produktu o wysokiej wydajności
i powtarzalności. Analiza termiczna może dostarczyć przydatnych informacji związa-
nych z jakością wytłoków jabłkowych i produktów ich modyfikacji, ich stabilnością
w temperaturach przechowywania, zmianach zachodzących podczas dalszego przetwa-
rzania w podwyższonych temperaturach itp. Analiza termograwimetryczna (TGA) jest
użytecznym narzędziem i jest szeroko stosowana do charakteryzowania rozkładu ter-
micznego (ilość i szybkość utraty masy), stabilności termicznej i zmian właściwości
materiałów w czasie [5]. Celem niniejszej pracy była analiza stabilności termicznej wy-
tłoków z jabłek oraz hydroksyapatytu zsyntezowanego na ich powierzchni.

Część eksperymentalna: Surowcem wykorzystanym do analizy termogravimetrycznej były mikronizowane wytloki z jabłek odmiany Gold Milenium, pozyskane z gospodarstwa sadowniczo-szkółkarskiego Sajsad (Kuriany). Synteza hydroksyapatytu ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) na ich powierzchni została wykonana techniką hydrotermalną, na podstawie pracy Scheverin i innych [4]. W pierwszym etapie, w celu potwierdzenia jej skuteczności wykonano widma FT-IR za pomocą spektrofotometru Cary 630 firmy Agilent, w zakresie długości fali $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$. Widmo zmodyfikowanych wytlóków z jabłek porównano z widmem handlowego hydroksyapatytu (Sigma-Aldrich). W celu uzyskania krzywych termogravimetrycznych (TG i DTG), wykorzystano termowagę TG 209 F1 Libra firmy Netzsch. W ceramicznych tyglach odważano $10 \pm 0,1\text{g}$ próbek, następnie były one ogrzewane do temperatury 800°C z szybkością $10^\circ\text{C}/\text{min}$, w atmosferze azotu ($15\text{ mL}/\text{min}$).

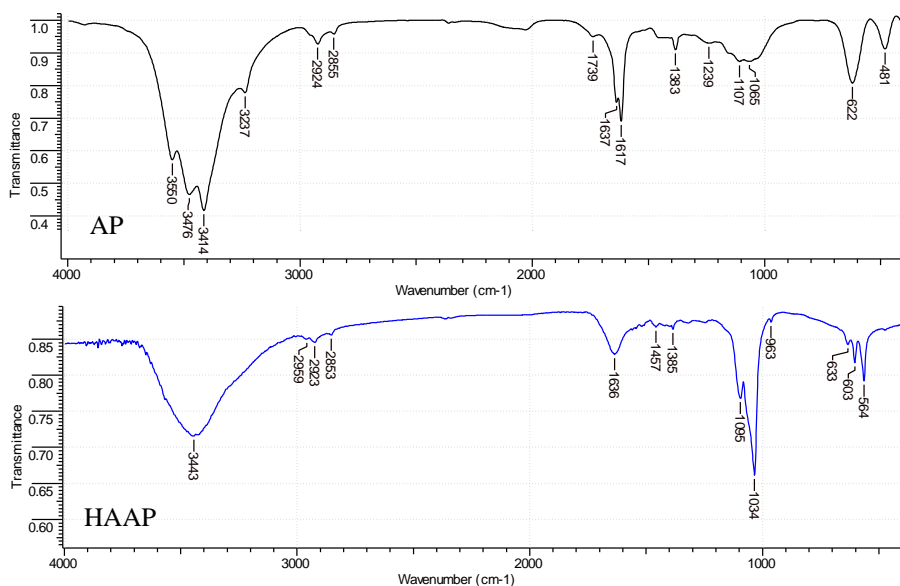
Wyniki: Na rysunku 1. przedstawiono krzywe TG i DTG badanych materiałów (AP – wytloki z jabłek, HAAP – hydroksyapatyt zsyntezowany na powierzchni wytlóków).



Rys. 1. Krzywe TG i DTG wytlóków z jabłek (AP) oraz hydroksyapatytu zsyntezowanego na ich powierzchni (HAAP).

Zaobserwowano istotne różnice między zarejestrowanymi krzywymi. Rozkład AP może być podzielony na 4 etapy. W pierwszym etapie (utrata masy 2%) od temperatury 30°C do 110°C zaszło odparowanie zaadsorbowanej wody i lekkich substancji lotnych. Drugi i trzeci etap (utrata masy odpowiednio 25 i 46,5%), w zakresie temperatur od 105 do około 500°C (główny obszar degradacji AP), są spowodowane rozkładem związków organicznych. Czwarty etap (utrata masy ok. 3%), od ok. 500 do 800°C , odpowiada najprawdopodobniej rozkładowi substancji powstałych przez polimeryzację produktów degradacji wytworzonych we wcześniejszych etapach. Pozostałość AP w temperaturze około 800°C w atmosferze azotu wynosiła zatem 25,28% masy początkowej [5]. Piki na krzywej DTG odpowiadały głównym obszarom degradacji AP. Pierwszy, szeroki pikin o małej intensywności przy 70°C był spowodowany dehydratacją biomasy. Kolejny, intensywny i dość szeroki pikin, o maksymalnej wartości po osiągnięciu temperatury

207°C, był konsekwencją degradacji głównie prostych węglowodanów (prawdopodobnie w kolejności: fruktozy, glukozy i sacharozy) [5]. Trzeci, ostry i wąski pik o maksimum w temperaturze 335°C jest charakterystyczny dla rozkładu substancji lignocelulozowych (hemicelulozy, celulozy i ligniny). Z danych literaturowych wynika, że lignina ulega ciągłemu rozkładowi w zakresie temperatur 160-900°C [6]. W strefie nakładania się dwóch opisanych pików, w zakresie temperatur około 260-280°C zaobserwowano dodatkowy sygnał o mniejszej intensywności, który odpowiadał prawdopodobnie degradacji makrocząstek takich jak pektyny i białka. Ponieważ te składniki są obecne w znacznie mniejszych ilościach w wytlókach jabłkowych, szczyty ich degradacji mogą nie być dobrze oddzielone i mogą pokrywać się z pikami pochodzącymi od prostych węglowodanów i składników lignocelulozowych, będących głównymi składnikami wykorzystanej biomasy [5]. Po modyfikacji AP, na widmie HAAP zauważono zanik niektórych pasm (3414, 3237, 1739, 1617, 1239, 622, 481 cm^{-1}), zmniejszenie intensywności pasm (29274, 1383 cm^{-1}), a także pojawienie się pików w regionie charakterystycznym dla fosforanów (PO_4^{3-}), przy liczbach falowych 1095, 1034, 663, 603 i 564 cm^{-1} , będących skutkiem drgań rozciągających i zginających od grup PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} .



Rys. 2. Widma FTIR wytlóków z jabłek (AP) oraz hydroksyapatytu zsyntezowanego na ich powierzchni (HAAP).

Scharakteryzowane intensywne piki przy 1034, 603 i 564 cm^{-1} potwierdziły udaną impregnację hydroksyapatytu na powierzchni AP [2], najprawdopodobniej na drodze utworzenia wiązań koordynacyjnych między biomasą a cząsteczkami hydroksyapatytu. W przypadku próbki HAAP, stopień utraty masy w stosunku do masy początkowej w badanym zakresie temperatur był zdecydowanie mniejszy, niż w przypadku AP i wynosił ok. 9%. Prawdopodobnie było to spowodowane obróbką wytlóków jabłkowych na potrzeby syntezy hydroksyapatytu – obróbka obejmowała w pierwszym etapie działanie ultradźwięków, a następnie ogrzewanie w 160°C w reaktorze hydrotermalnym,

w układzie zamkniętym zapewniającym ciśnienie wyższe od atmosferycznego. Po tych procesach składniki wytlóków uległy degradacji, zatem końcowy produkt, którego skuteczność syntezy potwierdziła analiza FT-IR, (rys. 2) stanowiły substancje nieorganiczne. Na krzywej DTG produktu syntezy zaobserwowano niewielki sygnał przy temperaturze ok. 87°C, po którym nastąpiła utrata ok. 1% masy, na skutek desorpcji cząsteczek wody. Drugi pik o większej intensywności wystąpił przy 369°C, poprzedzając ubytek masy ok. 7% i był spowodowany procesami odgazowania pozostałości lotnych substancji organicznych, pochodzących od biomasy [7].

Wnioski: Kompozyt HAAP został w powodzeniu zsyntezowany za pomocą techniki hydrotermalnej, wspomaganej obróbką ultradźwiękową. Przygotowany adsorbent wykazuje szereg zalet, takich jak prosta i wydajna droga syntezy, a także fakt wykorzystania taniego i szeroko dostępnego materiału. Zgodnie z analizą TG/DTG, analizowane próbki wytlóków z jabłek i modyfikowanych na drodze syntezy hydroksyapatytu wytlóków z jabłek wykazały odmienne zachowania termiczne. Podczas gdy biomasa (AP) uległa degradacji w większości swojej masy (ok. 75%), próbka HAAP, składająca się w zdecydowanej większości z substancji nieorganicznych, uległa rozpadowi jedynie w 9%. Na tej podstawie stwierdzono, że warunki hydrotermalnej syntezy HAAP znacząco wpłynęły na zmniejszenie utraty masy i przemiany fazowe produktu podczas obróbki cieplnej. Warto dodać, że wytloki z jabłek są odpadem rolno-spożywczym o zerowym lub bardzo niskim koszcie, stąd wytwarzanie i stosowanie jego kompozytów jako adsorbentów może znacznie obniżyć koszty usuwania zanieczyszczeń wody i ścieków.

Badania zostały zrealizowane w ramach projektu nr 2023/49/N/NZ9/02845, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w Katedrze Chemii, Biologii i Biotechnologii Politechniki Białostockiej.

Literatura:

1. K. Koronkiewicz, M. Kalinowska, G. Świdorski, *Innovations – Sustainability – Modernity – Openness Modern Solutions In Engineering*, Oficyna Wyd. Politechniki Białostockiej, 2022.
2. P. Chand, Y. Pakade, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 22 (2015) 1.
3. T. Yuxing i in., *Environ. Technol.*, 1 (2021) 1.
4. V.N. Scheverin, M.F. Horst, V. L. Lassalle, *Results Eng.*, 16 (2022) 100648.
5. S. Zlatanović i in., *Thermochim. Acta*, 673 (2019) 17.
6. H. Yang i in., *Fuel*, 86 (2007) 1781.
7. M.S. Djošić i in., *Mater. Chem. Phys.*, 111 (2008) 137.

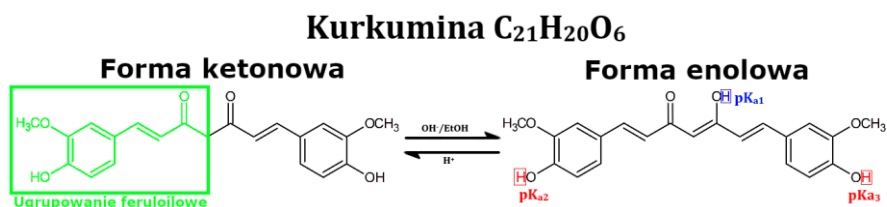
WOLTAMPEROMETRYCZNE PROCEDURY OZNACZANIA KURKUMINY

A. KELLER, K. TYSZCZUK-ROTKO, D. GORYLEWSKI, K. STANIEC, UMCS, Wydział Chemii, Katedra Chemii Analitycznej, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 2, 20-031 Lublin

Abstrakt: Niniejsza praca przedstawia zbiór informacji na temat popularnego związku używanego w żywności jako antyoksydant – kurkuminy, oraz jej zachowanie z chemicznego punktu widzenia. Zostały również zebrane i porównane woltamperometryczne procedury oznaczania kurkuminy w próbkach różnego typu. Dzięki użyciu woltamperometrii strippingowej oraz różnego rodzaju elektrod opracowano wysoce selektywne oraz czułe metody ilościowego oznaczania tej substancji.

Wprowadzenie: Kurkumina, czyli ((E,E)-1,7-bis(4-Hydroksy-3-metoksyfenilo)-1,6-heptadien-3,5-dion, CCM) to jeden z przedstawicieli polifenoli naturalnie występujących w przyrodzie (Rys. 1). Znana jest ze swoich właściwości przeciwutleniających (hamuje tworzenie się wolnych rodników we krwi oraz tkankach), przeciwnowotworowych oraz zwalczających drobnoustroje. Otrzymywana jest z korzeni rośliny *Curcuma Longa* [1-3]. Jej zawartość w roślinach, w dużej mierze zależy od warunków uprawy oraz rodzaju gleby (w korzeniu ok. 3-5%) [5]. Znalazła swoje zastosowanie m. in. w medycynie w leczeniu schorzeń takich jak Alzheimer, stwardnienie rozsiane czy demencji [2]. Ze względu na swoje pomarańczowo-żółte zabarwienie w roztworach używana jest jako barwnik [5]. Ponadto uważana jest za substancję bezpieczną, nietoksyczną, nie wykazującą działania mutagennego. Używanie jej w dawkach powyżej 12g dziennie (51,2ng/ml w ludzkiej surowicy [5]), może powodować biegunki, nudności oraz bóle brzucha [1,4]. Pod względem chemicznym CCM jest symetryczną cząsteczką zbudowaną z dwóch ugrupowań feruloilowych połączonych grupą metylenową. W skład cząsteczki wchodzi także dwie grupy karbonylowe (α,β -nienasycony keton), które odpowiedzialne są za występowanie form tautomerycznych w roztworze CCM, w zależności od pH. W środowisku kwaśnym i obojętnym kurkumina znajduje się w formie ketonowej. W środowisku zasadowym oraz innych rozpuszczalnikach takich jak etanol czy inne niepolarne rozpuszczalniki organiczne, znajduje się w formie enolowej. Forma ta przeważa również w fazie stałej CCM, ze względu na obecność wiązań wodorowych. W wodzie kurkumina ulega trójstopniowej dysocjacji kwasowej ($pK_{a1}= 7,43-8,55$ – dysocjacja grupy enolowej; $pK_{a2}= 8,55-10,45$; $pK_{a3}= 9,05-10,95$ – druga i trzecia stała związana z dysocjacją grup fenolowych). W związku z aktywnością biologiczną tej substancji, tak ważnym jest aby została opracowana szybka, selektywna oraz czuła metoda oznaczania ilościowego kurkuminy. W metodach woltamperometrycznych wykorzystuje się różne elektrody, np. z węgla szklanego (GCE), złote, sitodrukowane, mikroelektrody, rtęciowe zarówno błonkowe jak i w trybie wiszącej kropli (HMDE). Szczególnym zainteresowaniem cieszą się elektrody sitodrukowane (SPEs). Otrzymuje się je poprzez naniesienie na nośnik (np. płytkę ceramiczną) techniką sitodruku, trzech elektrod – pracującej, pseudo-odniesienia i pomocniczej. SPEs cechują się niskim kosztem produkcji, miniaturyzacją, co pozwala na użycie ich w warunkach polowych. Ponadto można je łatwo modyfiko-

wać, np. za pomocą elektrochemicznej aktywacji czy osadzania różnego rodzaju substancjami. W ten sposób na powierzchni elektrody można osadzić metale, np. ołów, bizmut, ale można użyć także związki powierzchniowo czynne (surfaktanty) takie jak dodecylosiarczan sodu (SDS), Triton X-100 czy bromek heksadecylotrimetyloamoniowy. Tusz stosowany przy produkcji SPEs zawiera organiczne spoiwo, które nie przewodzi prądu elektrycznego przez co spowalnia reakcje redoks zachodzące na powierzchni elektrody. Dzięki elektrochemicznej aktywacji zwiększa się powierzchnia aktywna elektrody poprzez usunięcie z jej powierzchni spoiwa i funkcjonalizację, co skutkuje zwiększeniem sygnału analitycznego (zwiększenie czułości metody) [6].



Rys. 1. Wzór strukturalny kurkuminy.

Część eksperymentalna: Pomiary elektrochemiczne prowadzono z wykorzystaniem analizatora elektrochemicznego μ Autolab pod kontrolą oprogramowania GPES 4.9 (pomiarzy voltamperometryczne) i FRA (pomiarzy impedancyjne) w klasycznym naczynku elektrochemicznym o pojemności 10 mL. W pomiarach wykorzystano dostępne w handlu sitodrukowane czujniki węglowe (Metrohm DropSens), których powierzchnię elektrody pracującej aktywowano elektrochemicznie z wykorzystaniem voltamperometrii cyklicznej 0,1 mol/L roztworze zasady sodowej [3].

Wyniki: W literaturze można odnaleźć przykłady voltamperometrycznych oznaczeń kurkuminy w próbkach o różnej matrycy [3,7-12]. Wszystkie z nich cechowały się niskim pH roztworu badanego, ze względu na czułość pomiarów, która jest związana ze stabilnością CCM (w niskim pH cząsteczki CCM są stabilne, zaś w wysokim ulegają hydrolizie) [5]. Wśród zastosowanych elektrod pracujących możemy wyróżnić niemodyfikowaną i modyfikowaną elektrodę z węgla szklanego [8, 12], modyfikowane elektrody grafitowe [10, 11], modyfikowane pastowe elektrody węglowe [7] i aktywowaną elektrochemicznie sitodrukowaną elektrodę diamentową domieszkowaną borem [3]. Porównanie wyników oznaczeń na przedstawionych powyżej elektrodach pokazano w tabeli 1. Jak można zauważyć, najniższą granicę wykrywalności uzyskano przy użyciu aSPBDDE [3]. Badania na aSPBDDE pozwoliły na opracowanie wysoce selektywnej i czulej procedury ilościowego oznaczania CCM w próbkach żywności. Ponadto, dzięki pomiarom z wykorzystaniem elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS) i mikroskopowemu obrazowaniu powierzchni dowiedziono zmiany w morfologii oraz oporze właściwym elektrody po elektrochemicznej aktywacji.

Tabela 1. Zestawienie woltamperometrycznych procedur oznaczania kurkuminy.

Elektroda [przypis]	Technika	LOD [nmol/l]	Analizowane próbki
GCE [8]	CV	41,0	Ludzki mocz
GE/PdNps/Poly(Pr) [9]	SWV	22,0	Ekstrakt z przyprawy
MWCNT-BPPG [10]	AdSV	450,0	Ekstrakt z przyprawy
CPE/RGO [11]	DPV	3183,0	Surowica z ludzkiej krwi
GCE/Az-rGO@CNTs [12]	SWV	3,0	Płyny ustrojowe i farmaceutyki
CPE/DyNW [7]	SWV	0,5	Ludzkie osocze
CPE/MWCNT [7]	SWV	5,0	Ludzkie osocze
aSPBDDE [3]	DPAdSV	0,0005	Wyciąg z herbaty, ekstrakt z przyprawy, szot odpornościowy

GCE – elektroda z węgla szklatego; GE/PdNps/Poly(Pr) – elektroda grafitowa pokryta folią polipirrolinową oraz nanocząstkami palladu; MWCNT-BPPG - Elektroda z grafitu pirolitycznego o płaszczyźnie podstawowej modyfikowana kwasem 4-[10,15,20-tris(4-sulfofenylo)-21,22-dihydroporfirylo-5-ylo]benzenosulfonowym zaadsorbowanym na wielościennych nanorurkach węglowych; CPE/RGO - Elektroda z pastą węglową modyfikowaną zredukowanym tlenkiem grafenu; GCE/Az-rGO@CNTs – elektroda z węgla szklatego modyfikowana azobenzenem zredukowanym tlenkiem grafenu w wielościennych nanorurkach węglowych; CPE/DyNW – Pastowa elektroda węglowa modyfikowana nanocząstkami dysprozu; CPE/MWCNT – Pastowa elektroda węglowa modyfikowana wielościennymi nanorurkami węglowymi; aSPBDDE – aktywowana sitodrukowana elektroda diamentowa domieszkowana borem; CV – woltamperometria cykliczna; SWV – woltamperometria fali prostokątnej; DPV – impulsowo-różnicowa woltamperometria; DPAdSV – impulsowo-różnicowa adsorpcyjna woltamperometria stripingowa.

Wnioski: Opisane w literaturze [3,7-12] procedury woltamperometryczne znalazły zastosowanie do oznaczania kurkuminy w preparatach farmaceutycznych, płynach ustrojowych i próbkach żywności. Najniższą granicę wykrywalności uzyskano przy użyciu aktywowanej elektrochemicznie sitodrukowanej elektrody diamentowej domieszkowanej borem (aSPBDDE) [3]. Podsumowując można stwierdzić, że woltamperometria stripingowa (DPAdSV, impulsowo-różnicowa adsorpcyjna woltamperometria stripingowa) pozwala na szybką oraz wysoce czułą analizę ilościową związków elektroaktywnych (takich jak kurkumina) nie wymagającej skomplikowanej aparatury oraz odczynników chemicznych.

Literatura:

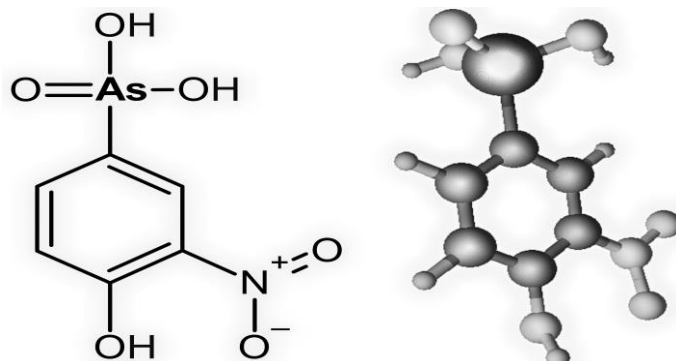
1. A.H. Ahmed, H. Naskar, S. Banerjee, B. Ghatak, N. Das, B. Tudu, R. Bandyopadhyay, *Sens. Actuators A Phys.*, 344 (2022) 113748.
2. A. Masek, E. Chrzeszcjanska, M. Zaborski, *Electrochimica Acta*, 107 (2013) 441,
3. J. Kozak, K. Tyszczyk-Rotko, A. Keller, M. Wójciak, I. Sowa, *Materials*, 16 (2023) 6826.
4. C. Raril, J.G. Manjunatha, G. Tigari, *Instrum. Sci. Technol.*, 48 (2020) 561.
5. I.G. David, E.E. Iorgulescu, D.E. Popa, M. Buleandra, M.C. Cheregi, *Antioxidants*, 12 (2023) 1908.
6. K. Tyszczyk-Rotko, K. Staniec, D. Gorylewski, A. Keller, *Sensors*, 24 (2024) 1125.
7. P. Daneshgar, P. Norouzi, A.A. Moosavi-Movahedi, M.R. Ganjali, E. Haghshenas, F. Dousty, M. Farhadi, *J. Appl. Electrochem.*, 39 (2009) 1983.
8. J. Peng, K. Nong, L. Cen, *J. Chin. Chem. Soc.*, 59 (2012) 1415.
9. S. Çakır, E. Biçer, E.Y. Arslanc, *Croat. Chem. Acta*, 88 (2015) 105.
10. K. Chaisiwamongkhon, K. Ngamchuea, Ch. Batchelor-McAuley, R.G. Compton, *Electroanalysis*, 29 (2017) 1049.
11. M. Rahimnejad, R. Zokhtareh, A. Moghadamnia, M. Asghary, *Port. Electrochim. Acta*, 38 (2020) 29.
12. K.Z. Mousaabadi, A.A. Ensafi, H. Hadadzadeh, B. Rezaei, *J. Electroanal. Chem.*, 873 (2020) 114418.

WYKORZYSTANIE CZUJNIKA NA BAZIE MEZOPOROWATYCH WĘGLI AKTYWNYCH IMPREGNOWANYCH DIKLOFENAKIEM W WOLTAMPEROMETRYCZNEJ ANALIZIE ZWIĄZKU ARSENOORGANICZNEGO ROKSARSONU

D. GORYLEWSKI, K. TYSZCZUK-ROTKO, K. STANIEC, A. KELLER, UMCS,
Wydział Chemii, Instytut Nauk Chemicznych, Katedra Chemii Analitycznej, Pl. Marii
Sklodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin

Abstrakt: Od wielu lat widocznym trendem w szeroko pojętej analityce chemicznej jest pobijanie kolejnych rekordów w opracowywaniu procedur, pozwalających osiągać najlepsze parametry analityczne. Jednym z przyjętych kryteriów, zwłaszcza w analizie związków wysokotoksycznych takich jak roksarson jest najczęściej granica wykrywalności (ang. *limit of detection*; LOD). Możliwość wykrycia bardzo niskich stężeń szkodliwych substancji jest kluczowa zwłaszcza w kontroli żywności trafiającej do sprzedaży, a także wody pitnej. W literaturze opisano szereg elektrochemicznych procedur oznaczania roksarsonu w próbkach o różnej matrycy. Niemniej jednak procedura wykorzystująca czujnik na bazie elektrody z węgla szklanego modyfikowanej mezoporowatym węglem aktywnym impregnowanym diklofenakiem oraz bromkiem cetylotrimetyloamoniowym charakteryzuje się najniższym LOD rzędu 10^{-11} mol L⁻¹ i z powodzeniem została zastosowana do oznaczania roksarsonu we wzbogaconych próbkach oczyszczonych ścieków i wody rzecznej.

Wprowadzenie: Kwas 3-nitro-4-hydroksyfenyloarsenowy, znany jako roksarson (ang. *roxarson*; ROX) (Rys. 1), od wielu lat był stosowany w weterynarii jako lek przeciwko kokcydiozie – chorobie pasożytniczej drobiu oraz czerwonce. Stosowano go również jako dodatek paszowy wspomagający wzrost drobiu i trzody chlewnej. Wykazano, że większa część roksarsonu spożywana przez drób jest wydalana w postaci niezmienionej, jednak niewielkie ilości tego leku gromadzą się w ich organizmach. W odchodach zwierzęcych arsen zawarty w roksarsonie przekształca się w toksyczne związki nieorganiczne As(III) i As(V), tym samym przyczyniając się do skażenia środowiska naturalnego, co może stanowić bezpośrednie zagrożenie dla człowieka. Z tego powodu stosowanie tego związku do produkcji pasz dla drobiu i trzody chlewnej zostało zakazane w UE (1999) i Chinach (2019), jak również zaprzestano jego stosowania w USA (2011) [1,2]. Niestety, w wielu częściach świata, m.in. w niektórych częściach Azji i Ameryce Południowej, a także w Kanadzie nie zrezygnowano ze stosowania dodatków ROX w produkcji pasz dla zwierząt. Warty wspomnienia jest fakt, że wiele artykułów spożywczych sprowadzanych jest z zagranicy. Z tego powodu potencjalne ryzyko kontaktu z roksarsonem jest realne również w przypadku osób, które nie mieszkają w regionach, w których nadal stosuje się ROX. Z tego powodu koniecznością staje się opracowanie czułych metod wykrywania oraz oznaczania śladowych ilości tego związku [1,2].



Rys. 1. Wzór strukturalny roksarsonu [1].

Na przestrzeni wielu lat zostało opracowane wiele procedur oznaczania roksarsonu przy pomocy metod chromatograficznych [3,4], które charakteryzują się zwykle długim czasem trwania analizy oraz czasochłonnym i kosztownym etapem przygotowania próbek przed pomiarem. Voltamperometria należąca do grupy metod elektrochemicznych jest techniką analityczną, która cechuje się znacznie wyższą czułością względem metod chromatograficznych, umożliwiając uzyskanie bardzo niskich granic wykrywalności (ang. *limit of detection*; LOD) oraz oznaczalności (ang. *limit of quantification*; LOQ) w analizie bezpośredniej. Oznacza to, że zwykle nie jest wymagany skomplikowany etap przygotowania próbki, który ewentualnie ogranicza się do przefiltrowania próbki przez filtr strzykawkowy o odpowiedniej średnicy porów. Dodatkowo czas trwania jednego pomiaru jest bardzo krótki. Dzięki temu w tym samym czasie możliwe jest uzyskanie większej liczby wyników względem pomiarów wykonanych na chromatografie. Dzięki większej puli uzyskanych danych poprawieniu ulega stosunek sygnału do szumu oraz precyzja w określaniu zawartości analitu w badanej próbce [1]. Podstawowym sposobem umożliwiającym poprawienie parametrów analitycznych opisanych w literaturze, voltamperometrycznych procedur oznaczania różnych depolaryzatorów jest modyfikacja elektrod stałych przy pomocy materiałów węglowych. Tego typu modyfikatory jak np. uporządkowane mezoporowate węgle aktywne, cechują się wieloma zaletami. Posiadają dużą powierzchnię aktywną, są stabilne mechanicznie, termicznie oraz chemicznie jak również wykazują bardzo dobre przewodnictwo elektryczne. Dodatkowo materiały węglowe w dość prosty sposób można dodatkowo zmodyfikować poprzez wprowadzenie atomów azotu, fosforu, siarki, tlenu czy boru do ich struktury. Cechy te sprawiają, że po naniesieniu takiego modyfikatora na powierzchnię elektrody stałej zwiększeniu ulega ilość miejsc aktywnych elektrochemicznie na powierzchni elektrody jak również przyspieszeniu ulega transfer elektronów w zachodzącej reakcji elektrodowej, co bezpośrednio przekłada się na spadek oporu elektrody pozwalając uzyskać wyższą czułość oznaczeń [1].

Część eksperymentalna: Pomiary elektrochemiczne prowadzono z wykorzystaniem analizatora elektrochemicznego μ Autolab pod kontrolą oprogramowania GPES 4.9 (pomiary voltamperometryczne) w klasycznym naczynku elektrochemicznym o pojemności 10 mL. Poszczególne etapy optymalizacji opracowanej procedury oznaczania ROX na elektrodzie z węgla szklanego modyfikowanej mezoporowatym węglem aktywnym

impregnowanym diklofenakiem oraz bromkiem cetylotrimetyloamoniowym (GCE/DF-CMK/CTAB) zostały dokładnie opisane w publikacji [1].

Wyniki: W tabeli 1 zestawiono wyniki uzyskane na podstawie opublikowanych badań własnych [1] z innymi wynikami badań cytowanymi w literaturze [2, 6-8]. Większość przedstawionych tam voltamperometrycznych procedur oznaczania ROX jest czasochłonna i wymaga skomplikowanego procesu przygotowania czujnika przed analizą [6-8]. Jak można zauważyć, zaproponowana w artykule procedura oznaczania roksarsonu na elektrodzie z węgla szklanego modyfikowanej mezoporowatym węglem aktywnym impregnowanym diklofenakiem oraz bromkiem cetylotrimetyloamoniowym umożliwiła uzyskanie bardzo dobrych parametrów analitycznych, osiągając jedną z najniższych granic wykrywalności (rzędu 10^{-11} mol L⁻¹) [1]. Dodatkowo, proces przygotowania czujników do pracy jest bardzo krótki, a zawieszina materiału węglowego może być wykorzystywana wielokrotnie i przechowywana przez kilka tygodni. Opracowana procedura z powodzeniem została zastosowana do oznaczania roksarsonu we wzbogaconych próbkach oczyszczonych ścieków jak również wody rzecznej [1].

Tabela 1. Voltamperometryczne procedury oznaczania roksarsonu.

Elektroda	Technika	Zakres liniowy [μmol L ⁻¹]	LOD [μmol L ⁻¹]	Zastosowanie	Lit.
GCE/DF-CMK/CTAB	SWAdSV	0,0005–0,02 0,02–0,5 0,5–100,0	0,000096	woda z rzeki, oczyszczone ścieki	[1]
GCE/CTAB	SWAdSV	0,001–0,02 0,02–20,0	0.00013	woda z rzeki	[2]
Tm-BTC MOF/GCE	DPV	0,00015–770,0	0,0001	żywność	[6]
2D-AC/GCE	DPV	0,76–474,0	0,0015	surowica krwi	[7]
CoMn ₂ O ₄ -500	DPV	0,01–0,84 0,84–1130,0	0,002	woda z rzeki	[8]
<p>Objaśnienie użytych akronimów: <i>SWAdSV - adsorpcyjna voltamperometria stripingowa fali prostokątnej; DPV – voltamperometria impulsowo-różnicowa; GCE/DF-CMK/CTAB - elektroda z węgla szklanego modyfikowana mezoporowatym węglem aktywnym impregnowanym diklofenakiem oraz bromkiem cetylotrimetyloamoniowym; GCE/CTAB – elektroda z węgla szklanego modyfikowana bromkiem cetylotrimetyloamoniowym; Tm-BTC MOF/GCE – elektroda z węgla szklanego modyfikowana organicznym szkieletem na bazie kwasu Tm(III)-1,3,5-benzenotrikarboksylowego; 2D-AC/GCE – elektroda z węgla szklanego modyfikowana dwuwymiarowym węglem aktywnym; CoMn₂O₄-500 – sitodrukowana elektroda węglowa modyfikowana trójwymiarowym manganianem kobaltu o strukturze przypominającej kwiat.</i></p>					

Wnioski: Opisane w literaturze [1, 2, 6-8] voltamperometryczne procedury znalazły zastosowanie do oznaczania roksarsonu w próbkach środowiskowych, żywności i płynach ustrojowych. Najniższą granicę wykrywalności uzyskano na elektrodzie z węgla szklanego modyfikowanej mezoporowatym węglem aktywnym impregnowanym diklofenakiem oraz bromkiem cetylotrimetyloamoniowym [1]. Procedurę z powodzeniem zastosowano w analizie roksarsonu we wzbogaconych próbkach oczyszczonych ścieków i wody rzecznej.

Literatura:

1. K. Tyszczyk-Rotko, D. Gorylewski, R. Olchowski, R. Dobrowolski, *Materials*, 16 (2023) 5420.
2. K. Tyszczyk-Rotko, D. Gorylewski, *Materials*, 16 (2022) 345.

3. A.R. Roerdink, J.H. Aldstadt, *J. Chromatogr. A*, 1057 (2004) 177.
4. J. Cui, Y. Xiao, L. Dai, X. Zhao, Y. Wang, *Food Anal. Methods*, 6 (2013) 370–379.
5. R. Olchowski, E. Zięba, D.A. Giannakoudakis, I. Anastopoulos, R. Dobrowolski, M. Barczak, *Materials* 13 (2020) 1625.
6. S. Chinnapaiyan, U. Rajaji, S.-M. Chen, T.-Y. Liu, J.I. De Oliveira Filho, Y.-S. Chang, *Electrochimica Acta*, 401 (2022) 139487.
7. S.K. Nikhil, A. Srivastava, M. Srivastava, R. Srivastava, *Material. ACS Omega*, 7 (2022) 2908.
8. T. Kokulnathan, V. Rajagopal, T.-J. Wang, S.-J. Huang, F. Ahmed, *Inorg. Chem.*, 60 (2021) 17986.

WPŁYW METODY OTRZYMYWANIA SUBSTANCJI BIOLOGICZNIE AKTYWNYCH Z LIŚCI *JACARANDA MIMOSAEFOLIA* NA ZAWARTOŚĆ WYBRANYCH ZWIĄZKÓW

K. SIECZKOWSKA, M.A. KARAŚ, UMCS, Wydział Nauk Biologicznych, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

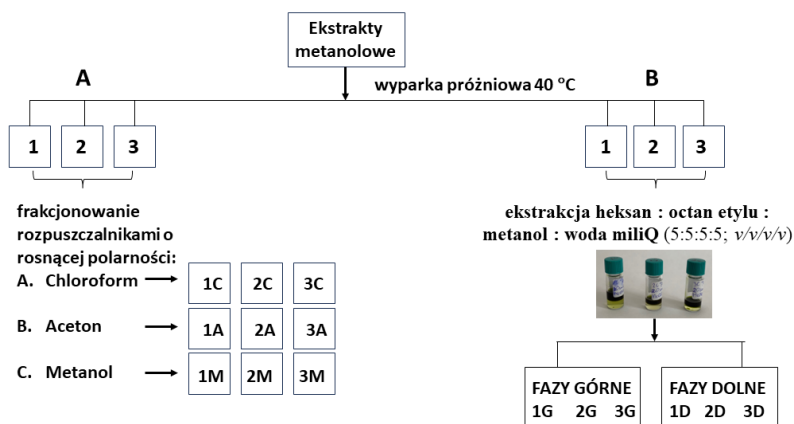
Abstrakt: *Jacaranda mimosifolia* jest rośliną powszechnie wykorzystywaną w praktykach medycyny tradycyjnej na terenach endemicznego występowania. Bioaktywny potencjał ekstraktów pozyskiwanych z różnych fragmentów tej rośliny, m.in. działanie przeciwbakteryjne czy przeciwgrzybicze, również został potwierdzony. Jednakże zastosowane w tych badaniach procedury wskazują, że ekstrakty te mogą być wzbogacone w chlorofile czy karotenoidy [1], co może istotnie wpływać na wyniki badań. W niniejszej pracy, porównano dwie techniki otrzymywania ekstraktów roślinnych: (A) frakcjonowania z zastosowaniem solwentów o rosnącej polarności oraz (B) jednoetapowej metody mieszanią heksan : octan etylu : metanol : woda oraz wpływ sposobu obróbki liści *J. mimosifolia*: (i) zamrażanie w temperaturze -20°C, (ii) suszenie oraz (iii) wymrażanie ciekłym azotem, na zawartość barwników roślinnych oraz substancji bioaktywnych. Efektywność „oczyszczania”, sprawdzono stosując technikę chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC).

Wprowadzenie: *Jacaranda mimosifolia* to drzewo ozdobne z rodziny *Bignoniaceae*, szeroko rozpowszechnione w tropikalnych i subtropikalnych obszarach świata. Ekstrakty pozyskiwane z różnych jego części (liści, kwiatów, łodyg, korzeni i kory) stosowane są w medycynie tradycyjnej w leczeniu nadciśnienia, wrzodów, ran, biegunki czy wymiotów [1]. Ekstrakty roślinne, zawierające substancje biologicznie aktywne, najczęściej pozyskuje się na drodze maceracji w obecności metanolu lub rzadziej innych organicznych solwentów. Ponieważ chlorofile i ich pochodne łatwo rozpuszczają się w lipofilnych solwentach (eterze naftowym, chloroformie, alkanach i w mniejszym stopniu octanie etylu), ale też MeOH i EtOH [1], to często ulegają ko-ekstrakcji z substancjami biologicznie aktywnymi w preparatach pochodzących z naziemnych części roślin. Również karotenoidy łatwo przechodzą do takich solwentów. Chlorofile i produkty ich autodegradacji mogą powodować problemy w testach biologicznych *in vitro* ze względu na ich absorbancję UV-VIS, właściwości fluorescencyjne i tendencję do wytrącania się w środowisku wodnym [2]. Ponadto, wykazują działanie przeciwbakteryjne [3], co utrudnia interpretację wyników. Z kolei karotenoidy z powodu reaktywności chemicznej i właściwości pochłaniania światła wykazują aktywność przeciwutleniającą i antibakteryjną, dlatego także mogą interferować z pomiarami biologicznymi. W związku z tym opracowano wiele metod usuwania barwników roślinnych z ekstraktów, które jednak albo nie wykazują wystarczającej skuteczności, albo skutkują usuwaniem znacznej części substancji bioaktywnych.

Przegląd literatury dotyczący działania preparatów pozyskanych z *J. mimosifolia* zawierających substancje aktywne wykazał ich aktywność w testach *in vitro* w kierunku wybranych Gram dodatnich i Gram ujemnych bakterii, pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba*, drożdżaków *Candida albicans*, a także działanie przeciwnowotworowe

[1,4,5,6]. Jednakże dogłębna analiza stosowanej metodyki wskazała, że badania prowadzono głównie z użyciem tzw. „surowych metanolowych ekstraktów” lub preparatów uzyskanych w drodze frakcjonowania z użyciem solwentów o różnej polarności. Dlatego wyniki tych badań, mogą nie być miarodajne i mogą wymagać weryfikacji z powodu zawartości mieszaniny związków takich jak: chlorofile, karotenoidy i ich pochodne.

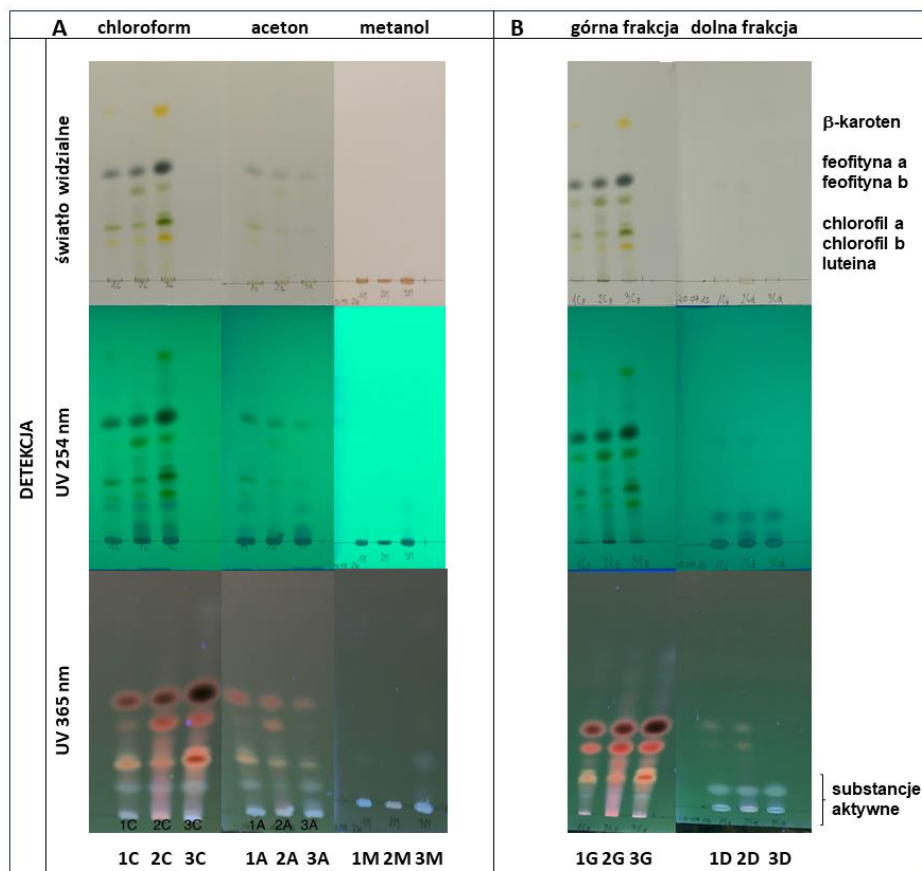
Część eksperymentalna: Sterylizacja materiału roślinnego: pędy z liśćmi *J. mimosaeifolia* poddano działaniu 70% etanolu 1 min, 3,5% podchlorynu 2 min i czterokrotnemu płukaniu w jałowej wodzie destylowanej [7]. Uzyskiwanie substancji biologicznie aktywnych: aseptycznie pozyskane liście podzielono na trzy porcje. Poszczególne partie: umieszczono w -20°C (1), suszono na powietrzu w ciemności (2), poddano działaniu ciekłego azotu (3), a następnie każdą trawiono 99,8% metanolem w 70°C przez 2 godz., po czym poddano maceracji przez kolejne 18 godz. Po tym czasie materiały przesączono przez bibułę Whatman no. 1. i dalej postępowano zgodnie z procedurami zaprezentowanymi na schemacie (Rys.1). Materiały 1-3 M dodatkowo odsalano poprzez ekstrakcję $\text{CHCl}_3:\text{H}_2\text{O}$ (1:1; v/v), dwukrotne płukanie fazy organicznej wodą i na koniec odwadnianie fazy organicznej przepuszczając ją przez kolumnkę wypełnioną bezwodnym Na_2SO_4 . Analizy chromatograficzne HPTLC uzyskanych próbek, zawieszonych w mieszaninie $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (2:1; v/v), tak aby uzyskać stężenie 20 mg/mL, prowadzono w mieszaninie rozwijającej: heksan: octan etylu : aceton : metanol (6:1:1:0,4; v/v/v/v) na płytkach Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck).



Rys. 1. Schemat otrzymywania preparatów (1 – 3 C, 1 – 3 A, 1 – 3 M, 1 – 3 G, 1 – 3 D) do analiz HPTLC [metodyka B. w oparciu o źródło 2].

Wyniki: W niniejszej pracy porównano dwie metody pozyskiwania substancji bioaktywnych z metanolowych ekstraktów otrzymanych z liści *J. mimosaeifolia*: (A) frakcjonowanych przy zastosowaniu solwentów o rosnącej polarności – chloroformu, acetonu, metanolu oraz (B) jednoetapowej ekstrakcji (Rys. 1). Ponadto, oceniano wpływ sposobu przygotowania roślinnego materiału przed ekstrakcją na zawartość substancji aktywnych i skuteczność „oczyszczania”. Uzyskane wyniki wskazują, że wydajność metanolowej ekstrakcji roślinnego materiału wynosiła odpowiednio: 10,17%, 4,84% i 6,23% dla świeżych liści uprzednio wymrożonych (-20 °C), suszonych liści i wymrażanych cie-

kłym azotem. Spośród testowanych metod usuwania barwników roślinnych jednoetapowa ekstrakcja mieszaniną heksan : octan etylu : metanol : woda miliQ (5:5:5:5; v/v/v/v) okazała się bardziej skuteczną i pozwoliła na usunięcie chlorofilu a i b i ich nieskompleksowanych form feofityny a i b oraz karotenoidów (luteiny i β -karotenu) z ekstraktu *J. mimosaeifolia*, z jednoczesnym zachowaniem większości substancji bioaktywnych. Zastosowanie tej metody pozwoliło na uzyskanie 101,71 mg/g, 258 mg/g i 7,81 mg/g substancji aktywnych odpowiednio dla 1-3 D (Rys. 2), w stosunku do masy wyjściowego materiału roślinnego.



Rys. 2. Analiza chromatograficzna HPTLC (heksan:octan etylu:aceton:metanol; 6:1:1:0,4; v/v/v/v) ekstraktów *J. mimosaeifolia* (1-3C, 1-3A, 1-3M, 1-3G, 1-3D) zgodnych ze schematem na Rys. 1. Oznaczenia prób: 1 – materiały z roślin zamrożonych -20°C , 2 – materiały z roślin suszonych, 3 – materiały z roślin poddanych działaniu ciepłego azotu; C- frakcje chloroformowe, A- frakcje acetonowe, M – frakcje metanolowe, G- frakcje górne i D – frakcje dolne jednoetapowej ekstrakcji.

W metodzie A, frakcje metanolowe uzyskane z materiałów roślinnych z jednej strony pozbawione były całkowicie barwników chlorofilowych i karotenoidów, ale jednocześnie część substancji aktywnych uległa ekstrakcji chloroformem (1-3C) czy acetonem (1-3A) (Rys. 2).

Wnioski: Przeprowadzone badania wykazały jednoznacznie, że jednoetapowa metoda ekstrakcji, w porównaniu z frakcjonowaniem, pozwala na skuteczne usunięcie barwników roślinnych z ekstraktów z jednoczesnym zachowaniem większości substancji aktywnych. Natomiast największą wydajność odzysku substancji aktywnych uzyskuje się z materiału suszonego na powietrzu. Jednakże badania aktywności przeciwbakteryjnej (dane nie prezentowane) wskazują, że to materiał pozyskany ze świeżych liści uprzednio tylko zamrożonych ma potencjał bioaktywny.

Literatura:

1. R. Naz , T. H. Roberts, A. Bano, A. Nosheen, H. Yasmin, M. Nadeem Hassan, R. Keyani, S. Ullah, W. Khan, Z. Anwar, PLoS ONE, 15(7) (2020) 18.
2. S. B. Kim, J. Bisson, J. Brent Friesen, G. F. Pauli, Ch. Simmler, J. Natural Prod., 83 (2020) 1846.
3. R. Indrawati, E. Zubaidah, A. Sutrisno, L. Limantara, M. M. Yusuf, T. H. Panintingjati Brotosudarmo, Scientifica, 2021 (2021) 1.
4. M. B. Serra, W. A. Barroso, F. F. Filho, S. Silva, A. C. R. Borges, M. B. Campos, R. S. Gondim, R. G. Souza, A. C. Alves, I. C. Abreu, M. O. Borges, Biomed. J. Sci. Technical Res., 28 (2020) 21731.
5. L. S. Sidjui, R. Toghueo, E. Z. Menkem, O. Noté, Record. Natural Product., 8:3 (2014) 307.
6. A. Rana, S. Bhangalia, H. P. Singh, Natural Product Res., 27 (2012) 1167.
7. P. Benito, L. Carro, R. Bacigalupe, M. Ortúzar, M. E. Trujillo, Phytobiomes. J., 6 (2022) 36.

PORÓWNANIE FLUORODEOKSYGLUKOZY FLUORU-18 ORAZ GALU 68-DOTATATE NA PRZYKŁADZIE PACJENTA Z GUZEM NEUROENDOKRYNNYM

B. PŁASKA, I. ŁUCZKOWSKA, A. DANILCZUK, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Wydział Lekarsko-Dentystyczny, al. Raclawickie 1, Lublin 20-059

Abstrakt: Porównano możliwości zastosowania metody obrazowania pozytonowej tomografii emisyjnej (PET/CT) z użyciem dwóch radiofarmaceutyków: ^{18}F FDG (fluorodeoksyglukozy fluoru-18) wykorzystujący promieniotwórczy analog glukozy oraz ^{68}Ga -DOTATATE oparty na izotopie galu-68. Zależnie od stopnia guza wybór radiofarmaceutyku pozostaje kluczowy do prawidłowej diagnostyki. W praktyce klinicznej większość nowotworów o agresywnym przebiegu wykazuje wysoki metabolizm glukozy, ^{18}F FDG umożliwia obrazowanie stanu zaawansowania choroby, pozwalając na szeroki zakres wykrywania kosztem niskiej specyficzności. Obrazowanie za pomocą ^{68}Ga -DOTATATE wykorzystuje receptory somatostatynowe, które wykazują nadekspresję w guzach neuroendokrynnych, czyniąc tę metodę bardziej specyficzną. Praca opiera się na przykładzie pacjenta z guzem NET diagnozowanym przy użyciu obu metod. Pacjent zgłosił się na badanie ^{18}F FDG z powodu podejrzenia nawrotu guza zastawki Bauchina, który został 5 lat wcześniej usunięty. U pacjenta początkowo zastosowano znacznik ^{18}F FDG, który nie wykazał istotnych zmian. W wyniku dalszej diagnostyki pierwsze badanie okazało się niewystarczające i musiało zostać rozszerzone o zastosowanie znacznika ^{68}Ga -DOTATATE. Zastosowanie ^{68}Ga -DOTATATE wykazało liczne ogniska podwyższonego gromadzenia między innymi w wątrobie i zastawce Bauhina. Zbadanie wycinka wskazało na guz NET G1. Wcześniejsze wykonane ^{18}F FDG pozwoliło na wykluczenie guza o niskim zróżnicowaniu G2 i G3, które byłyby gorzej widoczne w badaniu ^{68}Ga -DOTATATE. Dzięki wykorzystaniu obu metod, możliwe było postawienie lepszej diagnozy, a co za tym idzie leczenie pacjenta w odpowiednim kierunku.

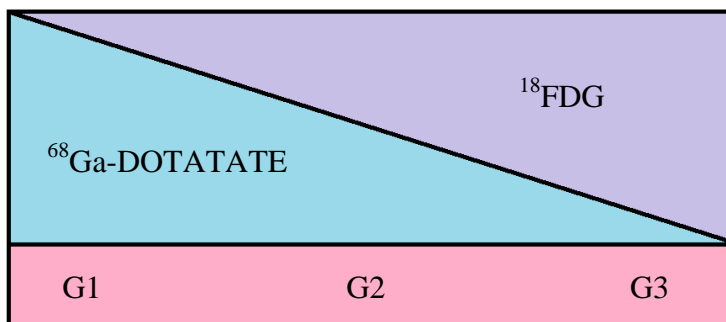
Wprowadzenie: Pozytonowa tomografia emisyjna (PET) jest jednym z największych osiągnięć w diagnostyce nowotworów. Ta nowoczesna metoda diagnostyczna polega na zastosowaniu radioaktywnego związku, który emituje pozytony, są one następnie odczytywane przez gamma kamerę. Pozytonowa tomografia emisyjna wykorzystuje radioizotopy krótko żyjące, o okresie półrozpadu od kilku minut do kilku godzin. Powszechnie stosowanym parametrem do pomiarów ilościowych, który stanowi swojego rodzaju jednostkę jest maksymalna standaryzowana wartość absorpcji (SUV max). Jednym z najczęściej używanych radioznaczników jest fluorodeoksyglukoza fluoru-18 (^{18}F FDG). ^{18}F FDG jest analogiem glukozy i dlatego w żywych tkankach ulega podobnym procesom jak glukoza. Glukoza dostaje się do komórki poprzez transportery glukozy, gdzie ulega fosforylacji. Diagnostyka opiera się na zwiększonym wychwycie glukozy, który ma miejsce między innymi w komórkach nowotworowych, z uwagi na ich duże zapotrzebowanie energetyczne z powodu częstych podziałów komórkowych [1]. Jest to spowodowane zmianami fenotypowymi, które charakteryzują komórkę nowotworową, określane jako zjawisko Warburga. Proces chemiczny polegający na tym, że w komórkach nowotworowych następuje programowanie procesów metabolicznych, w wyniku czego

obserwuje się wzrost glikolizy beztlenowej i zahamowanie fosforylacji oksydacyjnej. Niski zysk energetyczny glikolizy beztlenowej (dwie cząsteczki ATP) i znaczące zapotrzebowanie energetyczne proliferujących komórek nowotworowych prowadzi do znacznego nasilenia tempa glikolizy. ^{18}F FDG to badanie wykazujące szeroki zakres wykrywania zmian, ale cechujące się niską specyficznością. ^{68}Ga -DOTATATE jest radiozincznikiem PET służącym do obrazowania funkcjonalnego receptora somatostatyny (SSTR). Scyntygrafia receptorów (SRS) pozwala na ocenę stopnia zaawansowania guzów NET, rozpoznanie ewentualnych zmian przerzutowych i wczesne wykrycie wznowy nowotworu, jednak ze względu na wysokie koszty tych znaczników badanie z ich zastosowaniem jest rzadziej wykonywane. W przeciwieństwie do ^{18}F FDG PET, w mózgu występuje niewielka aktywność znacznika [2, 3]. Znacznik jest wykorzystywany ze względu na właściwości fizyczne emitowanego promieniowania i czasu półrozpadu Galu-68. Najczęściej jest wykorzystywany do oceny pierwotnych i przerzutowych, dobrze zróżnicowanych guzów neuroendokrynnych (NET), gdzie pojawiają się receptory somatostatyny. [4]. Guzy neuroendokrynnne, stanowią zróżnicowaną grupę nowotworów a ich rozpoznanie jest często zbyt późne ze względu na brak swoistych metod obrazowania. Charakteryzują się występowaniem odległych przerzutów, utrudniających ich usunięcie operacyjnie [5]. Obecnie najlepszą metodą do diagnostyki i różnicowania jest PET-CT. Podstawowymi radiozincznikami stosowanymi do diagnostyki tych zmian jest ^{68}Ga -DOTATATE oraz ^{18}F FDG, które pozwalają ocenić stopień złośliwości, proliferacji i odpowiedzi na leczenie NET [6]. Połączenie badań wykorzystujących radiozinczniki ^{68}Ga -DOTATATE oraz ^{18}F FDG jest często stosowane, w szczególności, gdy diagnostyka tańszą metodą jaką jest ^{18}F FDG okaże się niewystarczająca [6]. Jeżeli guz pacjenta nie posiada receptorów somatostatyny typu 2 lub jest ich za mało, wówczas zalecane jest wykonanie badania FDG-PET. W guzach pierwotnych wychwytywanie ^{68}Ga -DOTATATE jest znacząco wyższe niż w przypadku radiozincznika ^{18}F FDG [5, 6]. Różnice w zastosowaniu obu preparatów przedstawia rysunek 1. Celem pracy było porównanie wyników otrzymanych po zastosowaniu metody obrazowania pozytonowej tomografii emisyjnej (PET/CT) z użyciem dwóch radiofarmaceutyków: ^{18}F FDG i ^{68}Ga -DOTATATE.

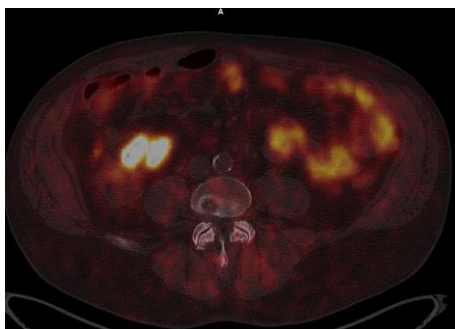
Wyniki: Przykładem zastosowania i połączenia w stosunku do stopnia zróżnicowania zmiany przy użyciu radiozinczników ^{68}Ga -DOTATATE oraz ^{18}F FDG jest diagnostyka pacjenta, który zgłosił się na badanie do Zakładu Medycyny Nuklearnej w Lublinie. U tego pacjenta w obu badaniach akwizycję obrazu przeprowadzono przy użyciu dedykowanego systemu PET/CT Biograph mCT S(64)-4R (Siemens, Erlangen, Niemcy). Badanie wykonane zostały według przyjętych procedur. Do badania z wykorzystaniem ^{18}F FDG (Synektik Pharma, Polska): pacjentom zaleca się, aby przed badaniem nie spożywali posiłków przez co najmniej 6 godzin. Godzinę przed obrazowaniem pacjentom wstrzykiwane jest ok. 3,5 MBq ^{18}F FDG/kg masy ciała. Na etapie wchłaniania umieszczano pacjentów w cichym, słabo oświetlonym pomieszczeniu. U pacjentów badanych ^{68}Ga -DOTADATE (NetSpot, Advanced Accelerator Applications, USA) zalecana dawka wynosi 2 MBq/kg masy ciała, podawana w postaci bolusa dożylnego. Pacjent powinien być dobrze nawodniony. Dane PET zebrano w trybie trójwymiarowym, w kierunku ogonowo-czaszkowym, w pozycji 2,5 min/łóżko i zrekonstruowano z zastosowaniem korekcji absorpcji i rozproszenia. Metoda rekonstrukcji była następująca: TrueX + czas przelotu (PET o ultra wysokiej rozdzielczości) dwie iteracje, 21 podzbiorów, filtr Gaussa o pełnej szerokości przy połowie maksimum 2,0 mm, rozmiar obrazu 200×200 (matry-

ca), powiększenie 1,0 i warstwa 3 mm. CT wykonywano przed PET, bez wzmocnienia kontrastowego i przy następujących parametrach: napięcie 120 kV, natężenie wynosiło 50, 150 lub 200 mAs, pich 0,8 i grubość warstwy 3 mm. Mężczyzna w wieku 66 lat, u którego został zdiagnozowany guz zastawki Bauhina a następnie został usunięty. Po 5 latach podczas kontrolnego badania USG zaobserwowano zmianę, która w dalszej diagnostyce okazała się nawrotem guza. Rozpoznano zapalenie błony śluzowej, pseudopolipa oraz zmianę ogniskową o wielkości 15 mm w lewym płacie wątroby oraz 16 mm w prawym. W celu odnalezienia ogniska pierwotnego zostało wykonane badanie rezonansu magnetycznego (MRI), w wyniku którego stwierdzono zmiany metastatyczne w wątrobie. Wykonano kolonoskopię, podczas której usunięto grudkę z zastawki Bauhina. Pacjent otrzymał wyniki z wycinków z okolicy zastawki oraz okolicy krzywizny mniejszej żołądka, w których stwierdzono ognisko neuroendokryne H-P NET G1. Wykonano badanie rezonansu magnetycznego, w którym zdiagnozowano zmiany przerzutowe w wątrobie o nieznanym punkcie wyjścia. W celu zlokalizowania i oceny ogniska pierwotnego, pacjent został skierowany na badania PET/CT z wykorzystaniem ^{18}F FDG oraz ^{68}Ga -DOTATATE, których wyniki przedstawia rysunek 2. W wyniku badania z radioznacznikiem ^{18}F FDG stwierdzono, że wątroba wykazuje nieco niejednorodne gromadzenie znacznika, w lewym płacie widoczna hypodensyjna zmiana, poza tym bez wydzielających się aktywnych metabolicznie zmian ogniskowych. W CT widoczne cechy stłuszczenia. We wstępniczy podwyższona ^{18}F FDG o prawdopodobnie charakterze zapalnym. Widoczny niewielki obszar na dnie żołądka o podwyższonym gromadzeniu ^{18}F FDG SUV MAX 4,8. Poza tym fizjologiczne gromadzenie znacznika. Natomiast po podaniu ^{68}Ga -DOTATATE badanie wskazało na brak aktywnych zmian w ogniskowych, w seg. lewym guzek 6 mm, węzły chłonne o zwiększonym gromadzeniu znacznika. Fizjologiczne gromadzenie ^{68}Ga -DOTATATE w strukturach klatki piersiowej. Jama brzuszna i miednica oraz wątroba o niejednorodnym rozmieszczeniu znacznika z wydzielającymi się aktywnymi obszarami w seg. 5 24,1 SUV MAX i seg. 8 15,4 SUV MAX prawdopodobnie torbiel. Aktywne ogniska stwierdza się też w układzie kostno-szkieletowym w końcu mostkowym obojczyka lewego. Zwiększony wychwyty stwierdza się w okolicy zastawki Bauhina SUV MAX do 42 (rys. 2a), widoczny obszar z komponentą tłuszczową i zwapnieniami. Ponadto w CT w obrębie jelita stwierdza się zmiany zapalne. Gromadzenie znacznika z przewagą po stronie lewej niż prawej nerek.

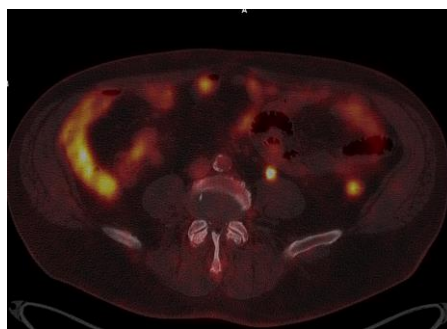
Wnioski: Dane, które można pozyskać poprzez zastosowanie badań z radioznacznikami ^{68}Ga -DOTATATE oraz ^{18}F FDG dają możliwość lepszej interpretacji obrazów i pozyskanie informacji, które mogą stanowić wzajemne uzupełnienie diagnostyczne. Dzięki różnym mechanizmom wychwytywania znacznika, obie metody się wzajemnie uzupełniają poprzez wykluczanie informacji, które przy zastosowaniu tylko jednej pozostałyby niejednoznaczne. W szczególności wpływa to na poprawę oraz przyspieszenie czasu diagnostyki pacjentów ułatwiając klasyfikacje ewentualnych guzów odpowiedniemu stopniowi złośliwości i zastosowanie odpowiedniego leczenia.



Rys. 1. Różnice zastosowania $^{68}\text{Ga-DOTATATE}$ oraz $^{18}\text{F-FDG}$ w stosunku do rodzaju zmian.



Rys. 2a



Rys. 2b

Rys. 2. Guz zastawki Bauhina (2a) widoczny po podaniu $^{68}\text{Ga-DOTATATE}$, (2b) niewidoczny po podaniu fluorodeoksyglukozy fluoru-18.

Literatura:

1. O. Mbakaza, M.-D.-T. W. Vangu, *Front. Nucl. Med.*, 2 (2022) 847810.
2. M. Morgan, M. Elfeky, Y. Yu, Al Et, *Radiopaedia.Org.*, (2024).
3. L. Bednarek-Papierska, K. Nowak, *Chirurgia po Dyplomie. Diagnostyka Obrazowa Guzów Nadnerczy*, 03 (2020).
4. M. Jagodziński, J. Boratyński, *Swiat Chemii*, 22.09 (2020)
5. E. Panagiotidis, *J. Nucl. Med.*, 58/1 (2017) 91.
6. X. Hu, D. Li, R. Wang, P. Wang, J. Cai, *Medicine (Baltimore)*, 102/19 (2023) E33726.

MODYFIKACJA I BADANIA FIZYKOCHEMICZNE KOMPOZYTÓW NA BAZIE AKRYLANÓW DO ZASTOSOWAŃ W PROTETYCE

W. PAKASZEWSKI¹, A. SZABELSKA¹, A. WÓJCIK¹, B. PODKOŚCIELNA²,
¹Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Zakład Technik Dentystycznych z Laboratorium Nowoczesnych Technologii, ul. Chodźki 6, 20-093 Lublin; ²UMCS, Wydział Chemii, Instytut Nauk Chemicznych, Katedra Chemii Polimerów, Ul. Gliniana 33, 20-614 Lublin

Abstrakt: Głównym celem prezentowanych badań była modyfikacja handlowego materiału polimerowego opartego na akrylanach (Vertex) stosowanego powszechnie w wykonawstwie ruchomych i stałych uzupełnień protetycznych. W celu poprawy właściwości przeciwdrobnoustrojowych do mieszanki handlowo dostępnego akrylu dodano metakrylan cynku (MZn). W celu potwierdzenia budowy chemicznej wyjściowego układu oraz modyfikowanego MZn wykonano analizę ATR-FT/IR. Przeprowadzono także badania DSC w celu oceny wpływu dodatku oraz przebiegu procesu polimeryzacji badanego materiału.

Wprowadzenie: Materiały na bazie akrylanów są szeroko stosowane w protetyce stomatologicznej. Charakteryzują się szerokim wachlarzem właściwości. Mogą być zarówno miękkie i elastyczne, jak i twarde i sztywne, dzięki czemu są używane w różnych sytuacjach klinicznych. Dokładne statystyki dotyczące udziału protez zębowych wykonanych z akrylu w ogólnej liczbie protez mogą się różnić w zależności od regionu, trendów w dziedzinie stomatologii oraz zmieniających się preferencji pacjentów. Niemniej jednak, protezy zębowe wykonane z polimerów akrylowych nadal pozostają popularnym wyborem, szczególnie ze względu na ich stosunkowo niski koszt i dostępność dla szerokiego spektrum pacjentów. W Polsce jest to jedyny materiał w wykonawstwie protez refundowany przez Narodowy Fundusz Zdrowia. Do ich zalet należy także fakt iż, protezy akrylowe są stosunkowo trwałe i odporne na uszkodzenia. Mogą wytrzymać codzienne żucie i użytkowanie przez długi czas, są stosunkowo lekkie w porównaniu do niektórych innych materiałów, co może być korzystne dla komfortu noszenia. Akrylowe protezy są także stosunkowo łatwe w dostosowaniu do kształtu i wielkości jamy ustnej pacjenta. Protetyk może wykonać dokładne odlewy i dostosować protezę do unikalnych potrzeb każdej osoby. Warto zwrócić uwagę także na szybkość wykonania. Proces wytwarzania protez akrylowych jest zazwyczaj mniej skomplikowany niż w przypadku niektórych innych materiałów, może to przyspieszyć cały proces od pomiarów do gotowej pracy. W przypadku uszkodzenia protezy akrylowej, można ją stosunkowo łatwo naprawić, co może przyczynić się do wydłużenia jej trwałości. Tworzywo akrylowe z którego są wykonane jest nietoksyczne, niedrażniące, nierozpuszczalne i bierne w środowisku jamy ustnej (choć wykazuje niewielką absorpcję wody). Masy akrylowe są proste w użyciu, nie wymagają skomplikowanej i drogiej aparatury. Warto jednak zaznaczyć, że protezy akrylowe mają też pewne ograniczenia. Mogą być mniej estetyczne niż protezy wykonane z bardziej zaawansowanych materiałów, takich jak porcelana czy ceramika. Ponadto, niektóre osoby mogą odczuwać dyskomfort w związku z materiałem akrylowym lub mogą mieć alergie na niektóre składniki akrylu. Metakrylan

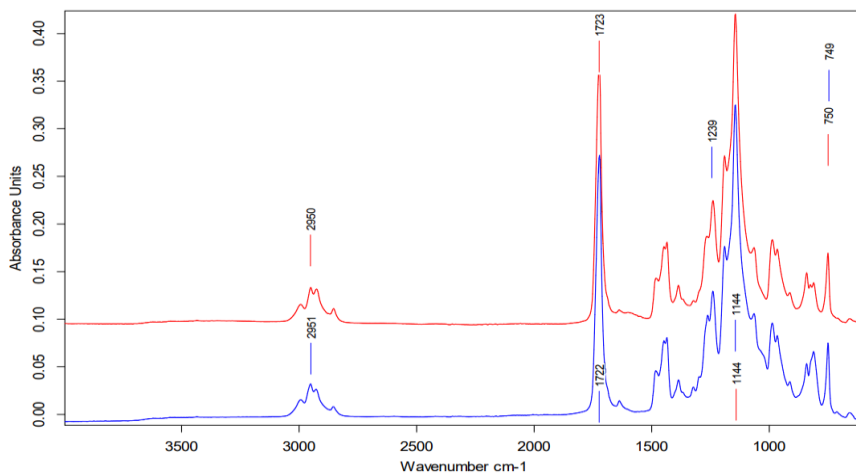
metylu (MMA) jest substancją toksyczną i drażniącą, zwłaszcza w swojej nieutwardzonej postaci. Przy kontaktach skórnych lub inhalacji oparów MMA mogą wystąpić reakcje alergiczne, podrażnienia skóry, oczu i dróg oddechowych. W trakcie procesu produkcji protez akrylowych MMA jest używany do tworzenia monomeru akrylowego, który następnie jest utwardzany, tworząc trwały polimer. Jednak nieutwardzony MMA może pozostać w protezie w niewielkich ilościach. W przypadku kontaktu jamy ustnej z nieutwardzonym MMA może wystąpić podrażnienie błon śluzowych, zapalenie dziąseł i inne problemy zdrowotne. Dodatkowo tworzywo akrylowe nie jest odporne na działanie drobnoustrojów które mogą namnażać się na powierzchni protez i prowadzić do stanów zapalnych jamy ustnej. Dlatego też tak duża popularność tych materiałów skłania do rozpoczęcia badań, które mogą pozwolić udoskonaleń oraz eliminację wspomnianych negatywnych cech materiałów na bazie metakrylanu metylu [1,2,3].

Część eksperymentalna: Syntezę kompozytów na bazie mieszanki Vertex wykonano w szklanych formach o wymiarach 8x10 cm. Do zlewki o poj. 50 ml dodano stałą mieszankę a następnie uzupełniono płynem w proporcji 1,5:1. Całość dokładnie wymieszano i niezwłocznie umieszczono w szklanej formie. Kompozyty z dodatkiem metakrylanu cynku otrzymano tą samą metodą dodając modyfikator do stałej mieszanki. Użyto 0,5, 1 i 2 % wg. MZn w stosunku do obu składników (stałego i ciekłego). Ilości użytych składników przedstawiono w tabeli 1.

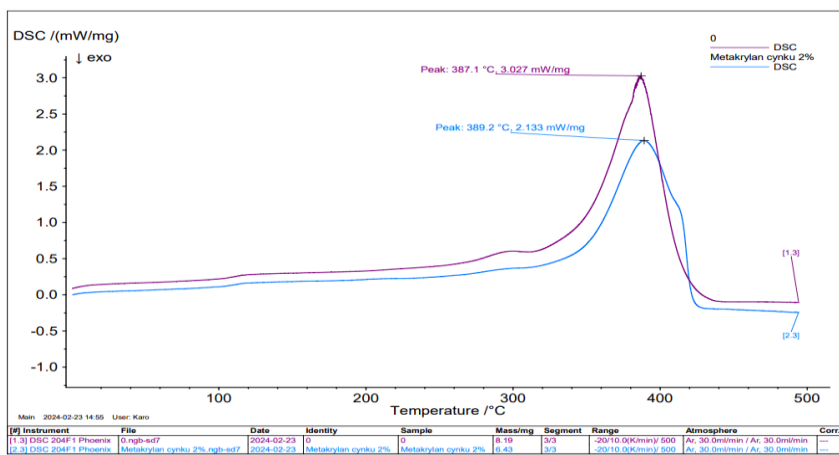
Tabela 1. Skład ilościowy kompozycji.

Kompozyt	Proszek [g]	Płyn [g]	Metakrylan cynku [g]
Vertex	12	8	-
Vertex + 0,5% MZn	12	8	0,1
Vertex + 1% MZn	12	8	0,2
Vertex + 2% MZn	12	8	0,4

Wyniki: Do badań wybrano próbki zawierające 0 i 2% wt. dodatku w postaci metakrylanu cynku. Z wykorzystaniem techniki osłabionego odbicia (ATR) zarejestrowano widma FT/IR kompozytów (Bruker Tensor 27 FTIR – Niemcy). Widma uzyskiwano w zakresie 500-4000 cm^{-1} . Na każdym z przedstawionych na rysunku 1 widm, można zaobserwować sygnał przy długości fali 2951 cm^{-1} , pochodzący od drgań rozciągających grupy -CH. Pasma przy długości fali 1722 cm^{-1} jest sygnałem pochodzącym od drgań grupy karbonylowej C=O. Drgania zginające grupy -CH zaobserwowano przy 1329 cm^{-1} . Zauważono, że wraz ze zwiększającą się ilością metakrylanu cynku w kompozycie nieznacznie obniża się intensywność poszczególnych pasm na widmach. Z wykorzystaniem techniki różnicowej kalorymetrii skaningowej dokonano pomiarów kalorymetrycznych (Netzch DSC 204 – Selb, Niemcy). Przed analizą próbki (w postaci sproszkowanej) ogrzewano przez dwie godziny w suszarce w temp. 70 °C w celu usunięcia z nich wilgoci. Skany wykonywano w zakresie temperatur 0-500 °C z przyrostem temperatury 10 °C/min w atmosferze argonu (ze stałym przepływem gazu 30 mL/min). Masa próbki wynosiła ~5-10 mg a jako odniesienie zastosowano pusty tygiel aluminiowy. Badania potwierdziły, że oba materiały (bez dodatku modyfikatora oraz z dodatkiem 2% metakrylanu cynku) są stabilne termicznie do temperatury ok. 320 °C (Rys. 2). Materiały rozkładają się w temperaturze 387-389 °C o czym świadczy wyraźny endotermiczny sygnał na krzywych DSC.



Rys.1. Widma ATR/FT-IR dla wyjściowego (linia górna) i modyfikowanego 2% dodatkiem MZn materiału polimerowego.



Rys.2. Krzywe DSC badanych materiałów, rejestrowane przy szybkości ogrzewania 10°C/min, przedstawione w funkcji temperatury.

Tabela 2. Badania twardości w skali D.

Kompozyt	1	2	3	4	5	6	7	8	Średnia
Vertex	81	81	80,5	81	81,5	80	82	81	81
Vertex + 2% MZn	82	81,5	81	80,5	82	82,5	81,5	82	81,6

W celu oceny wpływu dodatku na właściwości mechaniczne kompozytów wykonane zostały badania twardości na aparacie Shore'a. Badane kompozyty zaliczają się do grupy materiałów twardych, parametr twardości mieści się w zakresie 80-82 °D. Dodatek metakrylanu metylu nie pogarsza twardości kompozytów.

Wnioski: W wyniku przeprowadzonych modyfikacji uzyskano materiał polimerowy na bazie akrylanów zawierający metakrylan cynku w roli wypełniacza, posiadającego potencjalne właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Z wykorzystaniem techniki ATR-FT/IR potwierdzono strukturę uzyskanych związków których głównym składnikiem jest poli-metakrylan metylu. Analiza DSC potwierdziła dobrą stabilność materiałów do 320 °C oraz dobry stopień spolimeryzowania mieszanki.

W kolejnym etapie prac przeprowadzone zostaną m.in. badania cytotoksyczności otrzymanych materiałów.

Literatura:

1. A. M. Varghese, V. Mittal, Biodegr. Biocomp. Polymer Compos., 6 (2018) 157.
2. A. S. Khindaria, S.K. Garg, S. Mittal, Contemp Clin Dent., 2 (2011) 182.
3. E. Moslehifard, T. Ghaffari, H. Abolghasemi, S. Maleki Dizaj, Surface Roughness, and Water Sorption 17 (2022) 7069507.

IDENTYFIKACJA CHEMICZNA KAMIENI NERKOWYCH

W. JÓZWICKA¹, G. ŚWIETLICKA², M. JÓZWICKI¹, P. Malinowska³, M. GOLISZEK³, W. SOFIŃSKA-CHMIEL³, ¹Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Chemii, Instytut Nauk Chemicznych, Pracownia Technologii Światłowodów, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin, ² Studenckie Koło Naukowe ISOMERS przy Katedrze i Zakładzie Chemii Medycznej Wydział Lekarski, ul. Chodźki 19, 20-400 Lublin, ³Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Chemii, Instytut Nauk Chemicznych, Laboratorium Analityczne, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin

Abstrakt: Celem badań była identyfikacja chemiczna oraz analiza substancji współstrącających się ze szczawianami w próbkach kamieni nerkowych. Badania wykonano dla 20 próbek kamieni nerkowych wydalonych samoistnie przez pacjentów lub usuniętych chirurgicznie na oddziale szpitalnym. Badania wykonano z wykorzystaniem spektroskopii FTIR z zastosowaniem techniki ATR. Identyfikacji dokonano z wykorzystaniem bazy danych spektralnych NICODOM Kidney Stone. Przeprowadzone badania pozwoliły na określenie składu chemicznego badanych kamieni nerkowych.

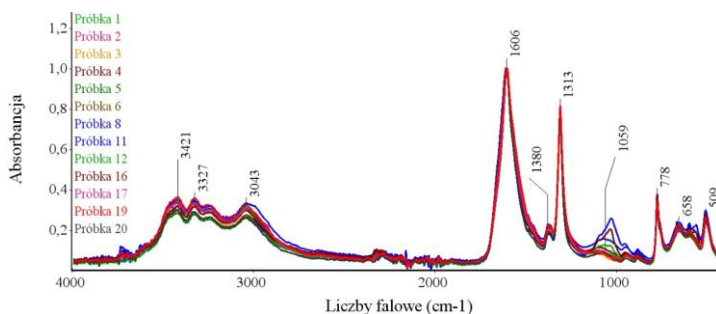
Wprowadzenie: Kamica nerkowa jest chorobą związaną z powstawaniem nierozpuszczalnych złogów, zwanych kamieniami, w obrębie dróg moczowych. Powstają one w wyniku wytrącania się substancji chemicznych obecnych w moczu, gdy ich stężenie przekroczy próg rozpuszczalności. Najczęściej dotyczy ona górnych dróg moczowych, czyli nerek i moczowodów, jednakże kamica pęcherza moczowego nie należy do rzadkości. Złogi niewielkich rozmiarów najczęściej zostają wydalone samoistnie wraz z moczem i nie powodują widocznych objawów. Większe złogi, mogą blokować odpływ moczu z układu kielichowo-miedniczkowego nerki lub moczowodu, powodując zespół objawów bólowych nazywany kolką nerkową [1]. Kamica jest jedną z najczęstszych chorób układu moczowego. Występuje u około 7-9% populacji. Szczyt zachorowalności przypada u kobiet i mężczyzn między 30 a 40 rokiem życia. Obecność złogów stwierdza się u 7-8% pacjentów bez objawów kamicy, u których z innego wskazania wykonano badania obrazowe. Charakterystyczny dla kamicy nerkowej jest nawrotowy charakter choroby. W ciągu 15 lat od pierwszej manifestacji choroby, jej nawrót występuje u ~40% chorych. Przyczyna tworzenia kamieni nerkowych nie jest do końca poznana. Do czynników sprzyjających rozwojowi kamicy zaliczamy: duże stężenie w moczu substancji litogennych, zastój moczu, zakażenie układu moczowego, obecność organicznych jąder krystalizacji oraz niewłaściwa dieta.

Ze względu na skład chemiczny wyróżnić można następujące rodzajów kamieni nerkowych: szczawianowo-wapniowe, fosforanowo-wapniowe, struwitowe, moczanowe oraz cystynowe [2]. W zależności od dominującej substancji składowej w leczeniu stosowana jest różnego rodzaju dieta wykluczająca. W przypadku wystąpienia u pacjenta kamieni szczawianowo-wapniowych, z diety należy wyeliminować: szpinak, szczaw, rabarbar, botwinę, cytryny, czekoladę, kakao, groch, fasolę oraz soczewicę [3]. W przypadku kamicy moczanowej, niewskazane są następujące produkty: wątróbka, kaszanka, mięso wołowe, mięso baranie, wieprzowina, śledzie, czekolada, kakao, orzechy oraz grzyby [4]. Pacjenci ze stwierdzoną kamicią fosforanową, w celu uniknięcia nawrotów choroby, powinni z diety wykluczyć: nasiona roślin strączkowych, ser żółty, ser topiony, konser-

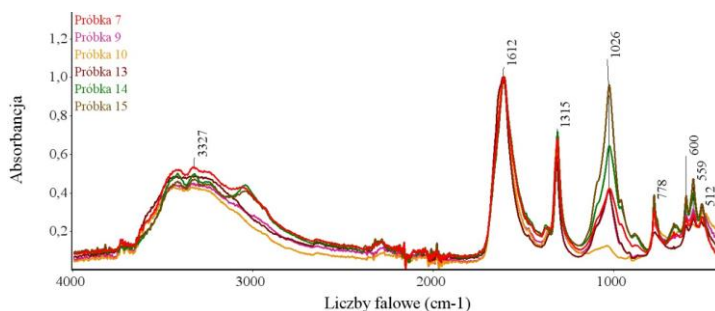
wy rybne oraz w znacznym stopniu ograniczyć produkty mleczne oraz jaja [5]. Identyfikacja chemiczna złogów pełni istotną rolę w doborze odpowiedniej diety, która stanowi podstawę profilaktyki nawrotów kamicy nerkowej.

Część eksperymentalna: Celem badań była analiza składu chemicznego i identyfikacja substancji, które współstrącają się ze szczawianami w kamieniach nerkowych. Materiałem badawczym było 20 próbek kamieni nerkowych pozyskanych we współpracy z laboratorium szpitalnym oraz za zgodą Komisji Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Lublinie (nr zgody KE-0254/140/2020). Badane kamienie nerkowe były wydalane samoistnie przez pacjentów lub usuwane chirurgicznie na oddziale szpitalnym. Badania wykonano z wykorzystaniem spektroskopii FTIR. Widma FTIR badanych kamieni nerkowych wykonano z wykorzystaniem spektrometru FTIR Nicolet 8700A firmy Thermo Scientific. Przed wykonaniem pomiaru, próbki kamieni nerkowych utarto w moździerzu agatowym. Do badań zastosowano przystawkę Smart Orbit ATR z kryształem diamentowym. Pomiarzy wykonano w zakresie liczb falowych $4000-400\text{ cm}^{-1}$ z rozdzielczością spektralną 4 cm^{-1} . Do badań wykorzystano detektor DTGS. Otrzymane widma poddano korekcji ATR, korekcji linii bazowej oraz normalizacji za pomocą oprogramowania Omnic SpectraTM. Uzyskane widma porównano z bazą danych spektralnych NICODEM Kidney Stone. Dla wszystkich badanych próbek wyznaczony został współczynnik korelacji HQI (Hit Quality Index), który jest ilościową miarą jakości dopasowania widma badanego do wzorcowego. $\text{HQI}=100$ oznacza perfekcyjne dopasowanie widm. Wartość współczynnika $\text{HQI} >90$ oznacza bardzo wysoki stopień podobieństwa widm. Na tej podstawie dokonano identyfikacji składników chemicznych obecnych w badanych próbkach.

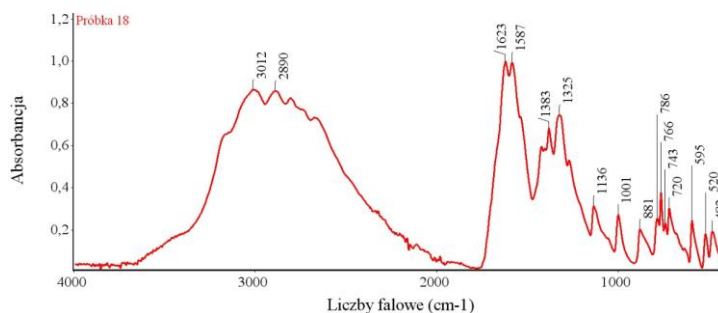
Wyniki: Identyfikację chemiczną badanych 20 próbek kamieni nerkowych wykonano metodą spektroskopii FTIR z wykorzystaniem techniki ATR. Widma badanych kamieni przedstawiono na rysunkach 1-3.



Rys.1. Zestawienie widm FTIR-ATR próbek kamieni nerkowych, których głównymi składnikami są: jedno- oraz dwuwodny szczawian wapnia.



Rys.2. Zestawienie widm FTIR-ATR próbek kamieni nerkowych których głównymi składnikami są: jedno- oraz dwuwodny szczawian wapnia oraz węglano-apatyt.























Rys. 3. Zestawienie widm FTIR-ATR próbek kamieni nerkowych których głównymi składnikami są: jedno- wodny szczawian wapnia oraz kwas moczowy.

Na widmach FTIR-ATR wszystkich badanych próbek zaobserwowano pasma w zakresie $3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ odpowiadające drganiom rozciągającym grup O-H oraz pasma w zakresie $1870\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ charakterystyczne dla grup C=O. W zakresie $1430\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$ stwierdzono obecność drgań rozciągających grup C-O. Pasma te są charakterystyczne dla szczawianów. Ponadto w próbkach 7, 9, 10, 13, 14, 15 badania FTIR wykazały znacznie większą intensywność pików w położeniu 1026 cm^{-1} , który odpowiada drganiom rozciągającym grup P=O, co potwierdza obecność fosforanów w badanych próbkach. Widmo FTIR próbki 18 wykazało również sygnały charakterystyczne dla kwasu moczowego. Stwierdzono obecność pasm charakterystycznych dla grup -NH w zakresie $3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ oraz obecność pasm odpowiadających drganiom rozciągającym pochodzącym od grup C-H w zakresie $3000\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$. Widma FTIR próbki 18 wykazały także obecność drgań pochodzących od wiązań C=C w obrębie pierścienia aromatycznego w zakresie $1610\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ [6]. Wyniki badań identyfikacji składu chemicznego metodą FTIR-ATR przedstawiono w tabeli 1. W tabeli 1 zaprezentowano również zdjęcia badanych kamieni nerkowych.

Wnioski: Celem przeprowadzonych badań było potwierdzenie obecności głównego składnika (jedno- oraz dwuwodnego szczawianu wapnia) w 20 próbkach kamieni nerkowych oraz identyfikacja substancji współstrzęających się ze szczawianami.

Tabela 1. Zestawienie składu chemicznego badanych próbek szczawianowych kamieni nerkowych.

Lp.	Nazwa próbki	Zdjęcie próbki	Skład chemiczny	Współczynnik dopasowania HQI
1	Próbka 1		CaC ₂ O ₄ ·H ₂ O – jednowodny szczawian wapnia CaC ₂ O ₄ ·2H ₂ O - dwuwodny szczawian wapnia	80,48 %
2	Próbka 2		CaC ₂ O ₄ ·H ₂ O – jednowodny szczawian wapnia CaC ₂ O ₄ ·2H ₂ O - dwuwodny szczawian wapnia	76,21 %
3	Próbka 3		CaC ₂ O ₄ ·H ₂ O – jednowodny szczawian wapnia CaC ₂ O ₄ ·2H ₂ O - dwuwodny szczawian wapnia	76,70 %
4	Próbka 4		CaC ₂ O ₄ ·H ₂ O – jednowodny szczawian wapnia CaC ₂ O ₄ ·2H ₂ O - dwuwodny szczawian wapnia	79,20 %
5	Próbka 5		CaC ₂ O ₄ ·H ₂ O – jednowodny szczawian wapnia CaC ₂ O ₄ ·2H ₂ O - dwuwodny szczawian wapnia	77,54 %
6	Próbka 6		CaC ₂ O ₄ ·H ₂ O – jednowodny szczawian wapnia CaC ₂ O ₄ ·2H ₂ O - dwuwodny szczawian wapnia	75,37 %
7	Próbka 7		CaC ₂ O ₄ ·H ₂ O – jednowodny szczawian wapnia CaC ₂ O ₄ ·2H ₂ O - dwuwodny szczawian wapnia Ca ₅ (PO ₄ ,CO ₃) ₃ (OH,F) – węglano-apatyt	73,38 %
8	Próbka 8		CaC ₂ O ₄ ·H ₂ O – jednowodny szczawian wapnia CaC ₂ O ₄ ·2H ₂ O - dwuwodny szczawian wapnia	77,61 %
9	Próbka 9		CaC ₂ O ₄ ·H ₂ O – jednowodny szczawian wapnia CaC ₂ O ₄ ·2H ₂ O - dwuwodny szczawian wapnia Ca ₅ (PO ₄ ,CO ₃) ₃ (OH,F) – węglano-apatyt	73,90 %
10	Próbka 10		85 % CaC ₂ O ₄ ·H ₂ O – jednowodny szczawian wapnia 5 % CaC ₂ O ₄ ·2H ₂ O - dwuwodny szczawian wapnia 5 % Ca ₅ (PO ₄ ,CO ₃) ₃ (OH,F) – węglano-apatyt	75,60 %
11	Próbka 11		CaC ₂ O ₄ ·H ₂ O – jednowodny szczawian wapnia CaC ₂ O ₄ ·2H ₂ O - dwuwodny szczawian wapnia	91,26 %
12	Próbka 12		CaC ₂ O ₄ ·H ₂ O – jednowodny szczawian wapnia CaC ₂ O ₄ ·2H ₂ O - dwuwodny szczawian wapnia	80,63 %
13	Próbka 13		CaC ₂ O ₄ ·H ₂ O – jednowodny szczawian wapnia CaC ₂ O ₄ ·2H ₂ O - dwuwodny szczawian wapnia Ca ₅ (PO ₄ ,CO ₃) ₃ (OH,F) – węglano-apatyt	82,76 %
14	Próbka 14		90 % CaC ₂ O ₄ ·H ₂ O – jednowodny szczawian wapnia 10 % Ca ₅ (PO ₄ ,CO ₃) ₃ (OH,F) – węglano-apatyt	70,58
15	Próbka 15		65 % CaC ₂ O ₄ ·H ₂ O – jednowodny szczawian wapnia 35 % Ca ₅ (PO ₄ ,CO ₃) ₃ (OH,F) – węglano-apatyt	74,98 %
16	Próbka 16		CaC ₂ O ₄ ·H ₂ O – jednowodny szczawian wapnia CaC ₂ O ₄ ·2H ₂ O - dwuwodny szczawian wapnia	90,64 %
17	Próbka 17		CaC ₂ O ₄ ·H ₂ O – jednowodny szczawian wapnia CaC ₂ O ₄ ·2H ₂ O - dwuwodny szczawian wapnia	75,45 %
18	Próbka 18		90 % C ₃ H ₄ N ₄ O ₃ – kwas moczowy 10 % CaC ₂ O ₄ ·H ₂ O – jednowodny szczawian wapnia	81,07 %
19	Próbka 19		CaC ₂ O ₄ ·H ₂ O – jednowodny szczawian wapnia CaC ₂ O ₄ ·2H ₂ O - dwuwodny szczawian wapnia	78,97 %
20	Próbka 20		CaC ₂ O ₄ ·H ₂ O – jednowodny szczawian wapnia CaC ₂ O ₄ ·2H ₂ O - dwuwodny szczawian wapnia	83,24 %

Wykonane badania wykazały, że w 13 z 20 badanych próbek głównym, a zarazem jedynym składnikiem jest jedno- oraz dwuwodny szczawian wapnia. W 6 próbkach

stwierdzono również obecność $\text{Ca}_5(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_3(\text{OH}, \text{F})$ węglano-apatytu. W próbce 18 stwierdzono dodatkowo obecność kwasu moczowego, który jest składnikiem dominującym. Przeprowadzone badania wykazały, iż spektroskopia w podczerwieni z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych baz danych jest skuteczną metodą identyfikacji składu chemicznego kamieni nerkowych. Celowość badań podkreśla fakt, iż znajomość składu chemicznego kamieni nerkowych jest niezwykle istotna dla pacjentów dotkniętych kamicą nerkową w celu zastosowania odpowiedniej diety i zapobiegania nawrotom choroby.

Literatura:

1. J. Duława, Forum Nefrologiczne, 2 (2009) 184.
2. W. Combest, M. Newton, A. Combest, J.H. Kosier, Urologic Nursing, 25 (2005) 381.
3. P.M. Ferraro, M. Bargagli, A. Trinchieri, G. Gambaro, Nutrients, 12(3) (2020) 779.
4. B.B. Lin, M.E. Lin, R.H. Huang, Y.K. Hong, B.L. Lin, X.J. He, BMC Nephrology, 21 (2020) 267.
5. Y. Wang, S. Liu, Q. Zhao, N. Wang, X. Liu, T. Zhang, G. He, G. Zhao, Y. Jiang, B. Chen, Nutrients, 16 (2024) 214.
6. M. Silverstein, F.X. Webster, D. J. Kiemle, Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych, PWN, Warszawa 2007.

BADANIA PRZESIEWOWE A ŚREDNIA DŁUGOŚĆ ŻYCIA LUDZI

N. GRUSZKIEWICZ¹, B. PŁASKA¹, K. SZWED², J. MANDZIUK-NIZIŃSKA¹,

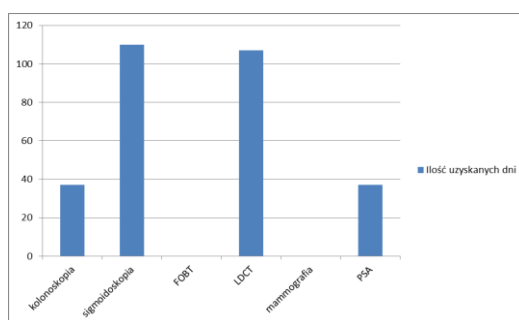
¹Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Wydział Lekarsko- Dentystyczny al. Raclawickie 1, Lublin 20-059, ²Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Wydział Farmaceutyczny ul. Chodźki 1 (Collegium Universum) Lublin 20-059

Abstrakt: Przedstawiono zagadnienie badań przesiewowych i ich wpływ na możliwość zwiększenia średniej długości życia populacji ludzkiej. Dokonano przeglądu danych dotyczących analizy wpływu minimalnej granicy wiekowej dla wykonywanych tego rodzaju badań i zestawiono to ze średnią długością życia w wybranych krajach. Podano propozycje działań w celu poprawy wydajności programu badań przesiewowych.

Wprowadzenie: Badania przesiewowe, zwane również skriningiem (ang. screening), mają na celu wykrycie choroby bądź stwierdzenie podatności na nią u osób bez żadnych objawów chorobowych. Tego typu badania są istotnym elementem w profilaktyce zdrowotnej. Umożliwiają przebadanie dużych grup osób, a następnie zdiagnozowanie schorzeń na wczesnym etapie ich rozwoju, co daje większe szanse na skuteczne leczenie. Obecnie badania przesiewowe wykonywane są najczęściej u pacjentów w kierunku możliwości wystąpienia nowotworów tj. rak piersi, rak szyjki macicy czy rak jelita grubego, a także w przypadku podejrzeń wykrycia cukrzycy, gruźlicy, raka prostaty oraz nowotworów płuc. Nowotwory stały się główną przyczyną zgonów wśród populacji ludzkiej. W celu zmniejszenia śmiertelności zalecane i prowadzone są badania przesiewowe mające na celu wczesne wykrywanie nowotworów [1]. Prawdopodobnie wiele powszechnych badań screeningowych w kierunku raka nie zwiększa średniej długości życia pacjentów.

Wyniki: Po analizie baz bibliotek MEDLINE oraz Cochrane dokonano oceny czasu życia uzyskanych dla kilku powszechnych badań przesiewowych w kierunku raka: kolonoskopii, sigmoidoskopii lub badania krwi utajonej w kale (FOBT) w kierunku raka jelita grubego; badania przesiewowe w kierunku raka płuc u palaczy i byłych palaczy; badanie antygenu swoistego dla prostaty w kierunku raka prostaty i przesiewowe badania mammograficzne w kierunku raka piersi, pod kierownictwem dr Michaela Bretthauera oraz jego współpracowników. Ostatecznie w poddanych analizie badaniach wzięło udział 2 111 958 uczestników. Dzięki uzyskanym wynikom, opublikowanym w JAMA Internal Medicine, odkryto że, sigmoidoskopia była jedynym testem przesiewowym, który przyniósł znaczący przyrost w ciągu całego życia: 110 dni. W pozostałych badaniach nie stwierdzono istotnych różnic, a rezultaty były następujące: 0 dni w przypadku mammografii oraz w przypadku badania przesiewowego FOBT, 37 dni w przypadku kolonoskopii i skriningu w diagnostyce zmian w gruczole krokowym, 107 dni w przypadku badań przesiewowych w kierunku raka płuc [2]. Powyższe wyniki zostały przedstawione na rysunku 1. Rak płuc uznawany jest za główną przyczynę zgonów związanych z nowotworami na całym świecie, a wskaźniki przeżycia są niskie, głównie ze względu na późne stadium diagnozy. Wczesne wykrywanie może znacząco poprawić

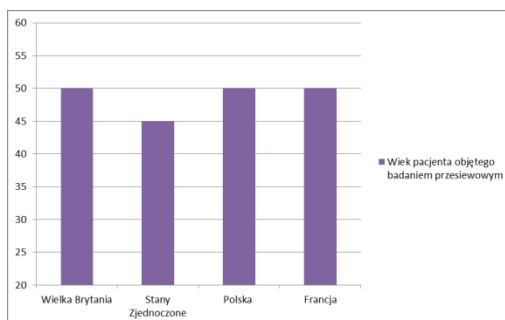
wskaźniki przeżywalności, jednakże badania screeningowe w kierunku raka płuc nie są obecnie aż tak rozpowszechnione jak między innymi przesiewowe badania mammograficzne. Z tego powodu coraz więcej państw wdraża przeprowadzanie niskodawkowej tomografii komputerowej (LDCT) w ramach programu badań przesiewowych w kierunku raka płuc. Jednym z tych krajów jest mianowicie Polska, która wniosła istotny wkład w ten program. Do tej pory w ramach pilotażu w Szczecinie, Gdańsku, Poznaniu i Warszawie przebadano łącznie prawie 50 000 osób: u około 1% potwierdzono raka płuc, a od 64% do 70% zdiagnozowano go w stadium I. Jest to szczególnie ważne, gdyż istnieje więcej możliwości leczenia raka płuc w jego wczesnym stadium, co poprawia przeżywalność pacjentów. Badania przesiewowe raka płuc mogą być także wykonane przy użyciu RTG a dokładniej CXR (ang. chest X-ray).



Rys. 1. Długość życia uzyskana dzięki powszechnie stosowanym badaniom przesiewowym w kierunku raka.

W Stanach Zjednoczonych oraz we Francji zostały przeprowadzone obie te formy badań (LDCT oraz CXR) w celu sprawdzenia, która jest bardziej skuteczna we wczesnym wykrywaniu raka płuc. W USA zaobserwowano 20% zmniejszenie śmiertelności z powodu raka płuc wśród osób z grupy wysokiego ryzyka, natomiast badania we Francji wykazały znaczącą przewagę LDCT jako metody służącej do diagnostyki drobnych zmian [3, 4]. Na świecie jest różne podejście do skriningu, przekłada się to na inne przedziały wiekowe osób objętych takimi programami. W Wielkiej Brytanii program przesiewowych badań zarówno w kierunku raka jelita grubego jak i raka piersi są przewidziane dla grupy wiekowej od 50 roku życia (Rys. 2). W przypadku diagnostyki zmian w obrębie szyjki macicy pacjentki od 25 roku życia są objęte programem profilaktycznym [5]. Tomografia niskodawkowa jako skrining w celu wykrycia guzków płuc jest przeznaczony dla pacjentów w wieku 55 - 74 lat z zastrzeżeniem jedynie dla grupy wysokiego ryzyka [6]. W Polsce, zgodnie z rozporządzeniem ministra zdrowia, program screeningowy w kierunku diagnostyki raka jelita grubego jest wykonywany u osób, które mają od 50 do 65 lat, chyba że u ich najbliższych rozpoznano taką chorobę - wtedy skrining jest przeprowadzany u osób objętych ryzykiem pomiędzy 40 a 49 rokiem życia. W Polsce duże znaczenie ma program profilaktyki raka piersi (mammografia). Na takie badanie mogą zgłaszać się pacjentki w wieku 45 - 74 lat. Natomiast cytologię mogą wykonywać kobiety w wieku od 25 do 59 roku życia w ramach badań przesiewowych [7]. Nową pozycją wśród badań przesiewowych w Polsce jest LDCT w kierunku wczesnego wykrycia raka płuc. Przedział wiekowy wyznaczony do tego programu wynosi od 50 do 74 roku życia [8]. W innym kraju europejskim, jakim jest Francja, diagnostyka zmian jelita grubego oraz piersi odbywa się w wieku

50 - 74 lata. W przypadku cytologii jest ona wykonywana już od 25 do 65 roku życia. Ten kraj nie honoruje programu badań profilaktycznych w kierunku raka płuca. Najniższy wiek badań jelita grubego spośród opisywanych krajów jest w USA, który wynosi już od 45 do 75 roku życia, natomiast jeśli lekarz zaleci może zostać przedłużony aż do ukończenia 85 lat. Profilaktyczna mammografia jest wykonywana u kobiet w wieku 45 - 54 lat, ale może dalej być kontynuowana, gdy stan zdrowia pacjentki na to pozwala. W przypadku diagnostyki zmian szyjki macicy program taki jest już przeprowadzany od 25 roku życia. Kontrolna tomografia jest przewidziana dla osób od 50 do 80 lat, którzy znajdują się w grupie ryzyka [9, 10].



Rys. 2. Dolna granica wieku w przypadku kolonoskopii w poszczególnych krajach.

Wnioski: Wczesna diagnostyka w postaci badań screeningowych, w niektórych chorobach wpływa w sposób znaczący na poprawę średniej długości życia. Nowością w Polsce są badania przesiewowe w kierunku raka płuca, którego wczesne rozpoznanie znacząco poprawia rokowania. Odpowiednie dofinansowanie, więcej przeprowadzanych szkoleń personelu medycznego w celu poprawy jego zdolności i umiejętności w zakresie badań screeningowych oraz podnoszenie świadomości społeczeństwa na temat badań przesiewowych mogłoby zwiększyć skuteczność, jak i również wydajność tych badań. Każde państwo ma inne podejście odnośnie badań przesiewowych. Przykładem skrajnej polityki skringowej są Chiny, które nie honorują takich programów, poza profilaktyką w kierunku raka płuca. Jakość badań przesiewowych w celu diagnostyki raka nadal nie jest na pożądanym poziomie w tym kraju. Powyższy przegląd literatury nasuwa potrzebę opracowania silnego i dobrze zorganizowanego programu badań przesiewowych w kierunku raka z między innymi wymaganą liczbą przeszkolonej siły roboczej [11].

Literatura:

1. Z. Yang, J. Liu, Q. Wang, PLoS One, 17/7 (2022) e0270347.
2. M. Bretthauer, P. Wieszczy, M. Løberg, M.F. Kaminski, T.F. Werner, L.M. Helsingen, Y. Mori, Ø. Holme, H.-O. Adami, M. Kalager, JAMA Intern Med., 183/11 (2023) 1196.
3. D. Amicizia, M.F. Piazza, F. Marchini, M. Astengo, F. Grammatico, A. Battaglini, I. Schenone, C. Sticchi, R. Lavieri, B. Di Silverio, G.B. Andreoli, F. Ansaldi, Healthcare (Basel), 11/14 (2023) 2085.
4. <https://www.lungcancerpolicynetwork.com/lung-cancer-screening-in-poland/>
5. <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/screening>
6. <https://view-health-screening-recommendations.service.gov.uk/lung-cancer/>
7. Bezpłatne programy profilaktyczne - Ministerstwo Zdrowia - Portal Gov.pl (www.gov.pl)
8. Polska wniosła istotny wkład w program badań przesiewowych w kierunku raka płuca w Europie (medical-press.pl).

9. <https://drees.solidarites-sante.gouv.fr/publications/etudes-et-resultats/les-francais-vivent-plus-longtemps-mais-leur-esperance-de-vie-en>
10. Cancer Screening Guidelines | Detecting Cancer Early | American Cancer Society
11. M. Cao, H. Li, D. Sun, S. He, Y. Yu, J. Li, H. Chen, J. Shi, J. Ren, N. Li, W. Chen, *Can. Let.*, 506 (2021) 120.

POTENCJAŁ ZASTOSOWANIA NANOCZĄSTECZEK ZŁOTA W CELU POPRAWY SKUTECZNOŚCI TERAPII FOTODYNAMICZNEJ W LECZENIU NOWOTWORÓW

W. GAWRYŚ, A. ZAJĄC, UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Anatomii Funkcjonalnej i Cytobiologii, Instytut Nauk Biologicznych ul. Akademicka 19, 20-031 Lublin

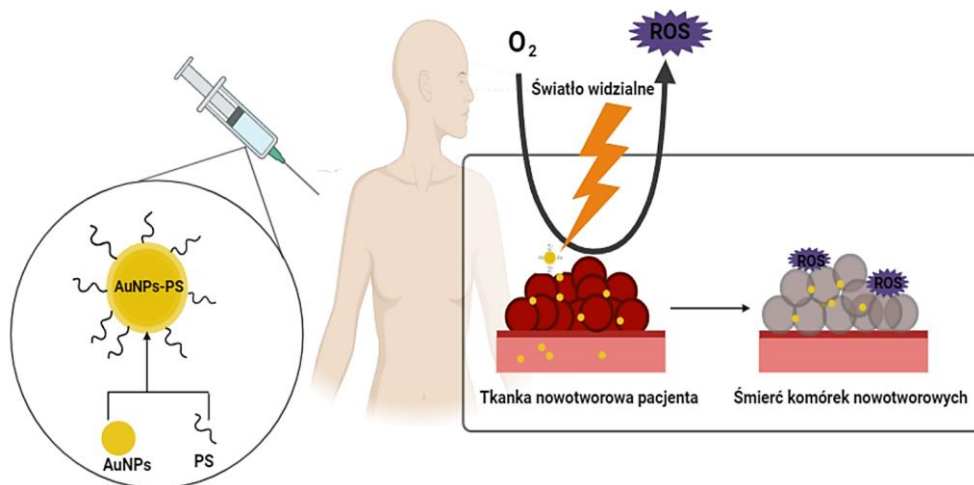
Abstrakt: Powszechność występowania oraz wysoka śmiertelność chorób nowotworowych wymaga ciągłego poszukiwania skutecznych i innowacyjnych metod terapeutycznych. Jedną ze strategii o obiecującym potencjale w walce z tymi chorobami jest terapia fotodynamiczna (PDT), której mechanizm opiera się na bezpośrednim niszczeniu komórek nowotworowych przy udziale reaktywnych form tlenu (ROS), generowanych dzięki fotouczulaczom (PS) oraz energii świetlnej. Choć obecnie metoda znajduje zastosowanie głównie w leczeniu miejscowych zmian nowotworowych skóry, intensywnie badany jest jej potencjał w nowotworach piersi, prostaty, bądź płuc. Wiele dostępnych źródeł literaturowych wskazuje, iż kluczowe znaczenie w zakresie rozwoju terapii PDT ma funkcjonalizacja wykorzystywanych fotouczulaczy, szczególnie przy użyciu narzędzi nanotechnologicznych. W przypadku PDT, istotnym znaczeniem wykazują się nanocząsteczki złota. Według obecnie prowadzonych badań, sprzężenie PS z cząsteczkami złota (AuNPs) pozwoli przezwyciężyć wiele problemów, z jakimi powiązana jest terapia PDT, które skutecznie zmniejszają jej skuteczność oraz blokują powiększenie obszaru jej wykorzystania w leczeniu różnych typów nowotworów.

Wprowadzenie: Choroby nowotworowe, są obecnie jednym z najpowszechniejszych zagrożeń zdrowia społeczeństwa i stanowią ogromne wyzwanie dla współczesnej medycyny. Złożoność onkogenezy oraz progresji tych chorób skutkuje wciąż niedostateczną efektywnością leczenia pacjentów, pomimo niezwykle dynamicznego rozwoju różnorodnych metod terapeutycznych. Wiele dostępnych źródeł literaturowych wskazuje terapię fotodynamiczną (PDT ang. *Photodynamic Therapy*), jako metodę o znaczącym potencjale w zwalczaniu nowotworów [1]. Mechanizm PDT polega na generowaniu toksycznych, reaktywnych form tlenu przy udziale specyficznego fotouczulacza (PS ang. *Photosensitizer*) oraz światła widzialnego do bezpośredniego niszczenia komórek nowotworowych [2,3]. Obecnie PDT jest klinicznie zatwierdzoną terapią stosowaną głównie w leczeniu miejscowych zmian nowotworowych skóry[4]. Jednakże, jej skuteczność w tym zakresie przyczyniła się do rozwoju badań nad potencjalnym wykorzystaniem tej terapii także w innych typach nowotworów takich jak np. rak piersi, prostaty czy płuca [5, 6]. Leczenie pacjentów za pomocą terapii PDT wymaga dożylniej, bądź miejscowej iniekcji w obrębie guza, specyficznego dla danego typu nowotworu PS. Wykorzystywane obecnie w tym celu związki, do których zaliczamy np. porfiryny, chloryny oraz róż bengalski, należą do grupy nietoksycznych barwników o pochodzeniu zarówno naturalnym, jak i syntetycznym.

Po zlokalizowaniu PS w obrębie guza, na obszar dotknięty nowotworem zostaje skierowane światło widzialne o odpowiedniej długości fali. PS absorbuje światło przechodząc do stanu wzbudzonego, a następnie przekazuje energię na zlokalizowany w otaczającej

tkance tlen cząsteczkowy. W rezultacie dochodzi do wytworzenia reaktywnych form tlenu (ROS ang. *Reactive Oxygen Species*), które dzięki wysokiej reaktywności chemicznej skutecznie uszkadzają elementy wewnątrzkomórkowe guza, a docelowo powodują śmierć komórek nowotworowych [7]. Akumulacji PS w obrębie guza oraz produkcji ROS znacznie sprzyja fakt, iż komórki nowotworowe wykazują większą podatność na stres oksydacyjny niż zdrowe komórki. Ma to znaczący wpływ na wydajność aktywacji reakcji immunologicznych, procesów prowadzących do hemostazy naczyniowej oraz szlaków apoptotycznych, umożliwiających selektywne niszczenie komórek guza przy minimalnym uszkodzeniu zdrowych tkanek [2]. Selektywność ROS wobec komórek nowotworowych wyróżnia terapię PDT spośród innych konwencjonalnych metod terapeutycznych oraz nadaje jej znaczącą wartość jako potencjalnie skutecznej metody leczenia wielu typów nowotworów w przyszłości [6]. Jednakże, obecnie ta obiecująca perspektywa jest znacznie ograniczona, głównie z powodu stosowanych w terapii PDT fotouczulaczy. Większość z aktualnie wykorzystywanych w terapii fotodynamicznej PS jest hydrofobowa, a tym samym nierozpuszczalna w warunkach fizjologicznych, co znacznie utrudnia ich do ustrojową infekcję. Ponadto, często dochodzi do niespecyficznego lokalizowania się PS w organizmie, co naraża pacjenta na wystąpienie działań niepożądanych takich jak uszkodzanie tkanek prawidłowych w przypadku ekspozycji na światło widzialne [3]. Z tego powodu, głównym celem w kontekście rozwoju terapii PDT jako skutecznej terapii przeciwnowotworowej, stało się odnalezienie rozwiązania eliminującego niekorzystny wpływ oraz poprawienie skuteczności fotouczulaczy. Wiele dostępnych źródeł literaturowych podkreśla, że stanie się to możliwe dzięki zastosowaniu innowacyjnych narzędzi nanotechnologii. Dziedzina nanotechnologii w ciągu ostatnich lat cieszy się ogromnym zainteresowaniem w biomedycynie. Technologia ta obejmuje tworzenie materiałów w nanometrowej skali, co nadaje im unikalne właściwości. Dzięki temu, są one wykorzystywane jako niezwykle funkcjonalne platformy, zwane również nanonośnikami, umożliwiające efektywne dostarczanie terapeutyków do miejsc docelowych organizmu oraz zwiększanie ich pożądanego efektu [7,8]. Spośród różnorodnych nanocząsteczek badanych w kontekście poprawy PDT, wyjątkowym potencjałem wyróżniają się nanocząsteczki złota (AuNPs ang. *Gold nanoparticles*). AuNPs są syntetyzowane poprzez metody chemiczne, takie jak redukcja chlorku złota za pomocą stabilizatora powierzchniowego, który zapobiega ich agregacji lub przeniesieniu roztworu jonów złota do fazy organicznej i redukcji. Obecnie coraz częściej do redukcji oraz stabilizacji AuNPs wykorzystywane są biopolimery, które cechują się znacznie większym bezpieczeństwem stosowania [7]. Niezwykle korzystnym okazało się sprzężenie cząsteczek AuNPs z PS wykorzystywanymi w terapii PDT. Według badań, dostarczenie kompleksów AuNPs-PS w terapii PDT prowadzi do znacznej poprawy rozpuszczalności PS w wodzie, a także szybszą oraz zwiększoną akumulację w docelowym miejscu, czyli w obrębie tkanki guza. Działanie to można dodatkowo zintensyfikować dzięki odpowiedniej funkcjonalizacji powierzchniowej nośnika PS, czyli AuNPs, np. poprzez zastosowanie przeciwciał specyficznych dla komórek nowotworowych. AuNPs wyróżniają się spośród różnorodnych nanocząsteczek wydajną penetracją błon komórek nowotworowych, co zapewnia ulokowanie PS w docelowym miejscu i minimalizuje pojawienie się niepożądanych skutków ubocznych u pacjenta. Wykazano, że zastosowanie AuNPs jako nośników dla PS, znacznie zwiększa absorpcję światła widzialnego, co prowadzi do wzrostu ich aktywności [9]. Dzięki temu zwiększa się również wydajność ROS produ-

kowanych w obrębie tkanki nowotworowej, a tym samym efektywność efektu przeciwnowotworowego zastosowanej terapii PDT [10] (Rys. 1).



Rys. 1 Mechanizm przedstawiający potencjał wykorzystania AuNPs w terapii PDT [opracowanie własne].

Wnioski: Wysoka skuteczność terapii PDT w bezpośredniej aktywacji mechanizmów śmierci komórek nowotworowych spowodowała w ostatnich latach znaczące powiększenie obszaru jej potencjalnego wykorzystania klinicznego poza standardowym leczeniem miejscowych nowotworów skóry. Jest to spowodowane dostępem do coraz większej ilości rzetelnych badań oraz źródeł naukowych potwierdzających jej potencjał w leczeniu różnych typów nowotworów, do których zaliczyć można np. guzy piersi, prostaty czy płuc. Jednakże, w tym celu terapia PDT wymaga przede wszystkim uprzedniego zoptymalizowania skuteczności, przy równoczesnym ograniczeniu jej skutków ubocznych u pacjentów. Przedstawiona w pracy technologia sprzężenia fotouczulaczy z nanocząsteczkami złota stanowi bardzo obiecujące narzędzie w ukierunkowaniu rozwoju PDT. AuNPs prezentują szereg unikalnych właściwości, które są czynią je doskonałymi kandydatami w zwalczaniu niekorzystnych cech PS oraz ograniczeń terapii PDT. Nanonośniki złota zwiększają skuteczność dostarczenia PS do tkanki nowotworowej, podtrzymując równocześnie ich stabilność oraz minimalizując wystąpienie skutków ubocznych. Odpowiednie ułożenie PS przyczynia się do zwiększonej syntezy toksycznych, reaktywnych form tlenu w obrębie tkanki złośliwej, a tym samym zwiększeniu efektu przeciwnowotworowego, czyli śmierci komórek nowotworowych. W świetle tych znaczących implikacji, wiele dostępnych źródeł literatury sugeruje, że postęp w technologii nanocząsteczek złota może odegrać kluczową rolę w rozwoju terapii PDT. W efekcie bezpośredniego oraz niezwykle skutecznego działania przeciwnowotworowego, terapia ta może w przyszłości stanowić istotne narzędzie w leczeniu różnych rodzajów nowotworów.

Literatura:

1. N. Singh, R.S. Gupta, S. Bose, Nanoscale, (2024).
2. R. Mokoena, P. George, B.H. Abrahamse, Int. J. Mol. Sci, 20(19) (2019) 4771.

3. M. Fan, Y. Han, S. Gao, H. Yan, L. Cao, Z. Li, X. Liang, J. Zhang, *Theranostics*, 10(11) (2020) 4944.
4. N. Dragicevic, J. Predic-Atkinson, B. Nikolic, S.B. Pajovic, S. Ivkovic, M. Adzic, *Expert Opin. Drug Deliv.*, (2024).
5. M.M.N. Uddin, A. Bekmukhametova, A. Antony, S.K. Barman, J. Houang, M.J. Wu, A. Lauto, *Molecules*, 29(2) (2024) 546.
6. O.C. Omiyale, M. Musa, A.I. Otuyalo, T.J. Gbayisomore, D.Z. Onikeku, S.D. George, T.T. Ogunjobi, *Discover Nano*, 18(1) (2023) 150.
7. H.S. Ali, B.M. El-Haj, S. Saifullah, M. Kawish, *Elsevier*, (2020) 43.
8. I. Sasaki, F. Brégier, G. Chemin, J. Daniel, J. Couvez, R. Chkair, M. Blanchard-Desce, *Nanomaterials*, 14(2) (2024) 216.
9. P. García Calavia, M.J. Marín, I. Chambrier, M.J. Cook, D.A. Russell, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 17 (2018) 281.
10. P. Shi, X. Sun, H. Yuan, K. Chen, S. Bi, S. Zhang, *ACS Biomater. Sci.Eng.*, 9(10) (2023) 5441.

OTRZYMYWANIE EKSTRAKTÓW Z WYTŁOKÓW WINOGRON DO ZASTOSOWANIA W PROFILAKTYCE PRÓCHNICY ZĘBÓW

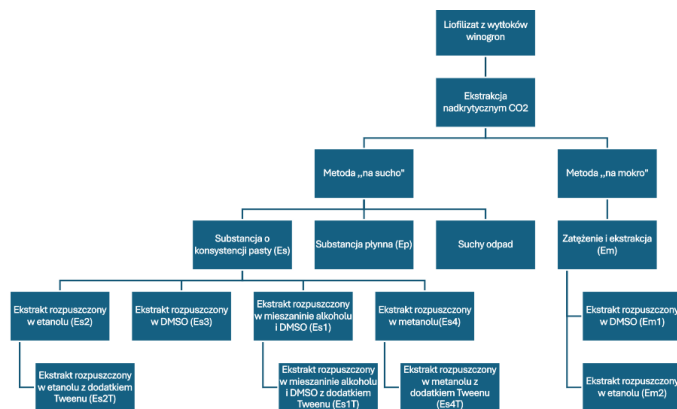
J. CZERWONKA¹, A. WIATER¹, M. KUTYŁA¹, K. TYŚKIEWICZ²,
G. FLORKOWKI², M. TRYTEK¹, ¹UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej, Akademicka 19, 20-031 Lublin.
²Grupa Badawcza Ekstrakcja Nadkrytyczna, Sieć Badawcza Łukasiewicz - Instytut Nowych Syntez Chemicznych, al. Tysiąclecia Powstania Polskiego 13A, 24-110 Puławy

Abstrakt: Winogrona zawierają szereg cennych substancji, które podczas produkcji win nie są całkowicie wykorzystywane i często są wyrzucane w postaci odpadów. Takimi odpadami są np. wytloki po maceracji winogron, które stanowią rezerwuar substancji aktywnych. Jedną z metod pozyskiwania takich substancji z odpadów spożywczych jest ekstrakcja z użyciem rozpuszczalników organicznych i płynów nadkrytycznych. Celem badań było otrzymanie biologicznie aktywnych preparatów, które działają hamująco i/lub bakterioobójczo na bakterie powodujące próchnicę zębów. W ramach doświadczeń przeprowadzono ekstrakcję wytlóków winogron z użyciem nadkrytycznego CO₂, wykorzystując dwa sposoby, „metodę suchą” oraz „metodę mokrą”. W wyniku tych działań otrzymano dwa rodzaje ekstraktów, z których następnie przygotowano osiem preparatów. W celach porównawczych, poza wspomnianymi preparatami, przebadano również ekstrakty otrzymane metodą ekstrakcji 70% (v/v) alkoholem etylowym. W badaniach przedstawiono zastosowanie wybranych preparatów, które wykazywały największy wpływ na bakterie próchnicotwórcze. Określono minimalne stężenia hamujące (MIC) i minimalne stężenia biobójcze (MBC) wobec czterech szczepów bakterii z rodzaju *Streptococcus*.

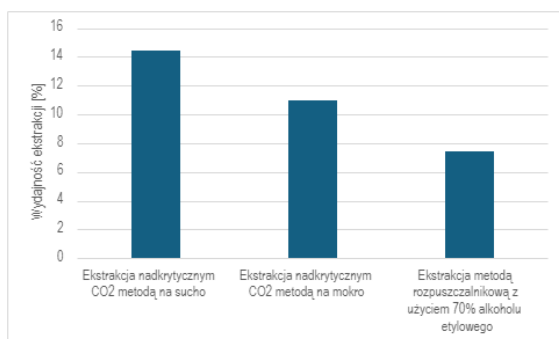
Wprowadzenie: W winogronach zawarte są liczne substancje, które bardzo często są atrakcyjne dla ludzi. Same owoce znajdują zastosowanie w różnych dziedzinach, zarówno jako produkt konsumpcyjny, jak i surowiec do produkcji różnorodnych artykułów spożywczych. Jednakże, w procesie produkcji napojów, takich jak wino, generowane są znaczne ilości odpadów biodegradowalnych, jak np. wytloki pozostające po maceracji winogron. Te odpady zawierają wiele wartościowych składników, dlatego wykorzystuje się je do różnych celów, np. jako dodatek do pasz dla zwierząt czy źródło biofarmaceutyków. Bogactwo związków chemicznych zawartych w wytlókach skłania do poszukiwania ich alternatywnych zastosowań. Cenne substancje zawarte w takim materiale odpadowym to między innymi: sacharydy, białka, pektyny, błonnik, lipidy, kwasy organiczne, witaminy, aldehydy, polifenole i wiele innych [1]. Istnieje kilka metod, które można zastosować do wyodrębniania/izolacji cennych substancji z odpadów winogronowych. Jedną z nich jest ekstrakcja nadkrytycznym CO₂, pozwalająca na uzyskanie aktywnych substancji z owoców, bez utraty czy zmiany ich właściwości biologicznych [2,3,4]. Próchnica zębów to problem dotyczący znaczną część ludzkości. Ta choroba jest szczególnie niebezpieczna, gdyż w przypadku braku leczenia może prowadzić do poważnych schorzeń, takich jak miażdżycza naczyń krwionośnych, choroby serca (np. zapalenie wsierdza, niedomykalność zastawek), choroby nerek, problemy okulistyczne

czy choroby stawów. W związku z tym, nadal poszukiwane są nowe, alternatywne rozwiązania w zwalczaniu próchnicy. Jednym z takich rozwiązań jest stosowanie ekstraktów lub czystych substancji pochodzących z materiału roślinnego [5]. To podejście jest szczególnie atrakcyjne dla osób unikających środków higieny jamy ustnej zawierających chemiczne substancje przeciwdrobnoustrojowe, takie jak fluor czy chlorheksydyna [6,7].

Część eksperymentalna: Wytłoki po maceracji winogron (*Vitis vinifera*), szczep seyal blanc, pochodziły z winnicy „Dwa wzgórze” zlokalizowanej w miejscowości Modliborzycze (powiat janowski, woj. lubelskie). Wytłoki winogron przed procesem ekstrakcji zliofilizowano. Ekstrakcję wytłoków winogronowych prowadzono w Łukasiewicz – INS na instalacji do ekstrakcji nadkrytycznym dwutlenkiem węgla o pojemności ekstraktora 1L. Część preparatów otrzymano z ekstraktu otrzymanego za pomocą tzw. „metody suchej”, a drugą część z substancji płynnej otrzymanej metodą „ekstrakcji mokrej” nadkrytycznym CO² (Rys.1). Zastosowano temperaturę ekstrakcji wynoszącą 50°C i ciśnienie 300 bar. Ekstrakcję prowadzono przez 58 min. Rezultatem procesu było uzyskanie wydajności ekstrakcji na poziomie 14,46% (liczona jako masa ekstraktu do masy wsadu do ekstrakcji) (Rys.2). Wytłoki winogronowe poddano również ekstrakcji z dwutlenkiem węgla modyfikowanym przez dodatek wody (ok. 1%) do strumienia CO₂ w celu uzyskania frakcji polifenolowej. Po ekstrakcji dwutlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym uzyskano dwie substancje, z których następnie przygotowano 8 różnych próbek do dalszych badań. W celach porównawczych przeprowadzono także ekstrakcję rozpuszczalnikową przy użyciu 70% roztworu alkoholu etylowego. Do dwóch kolb Erlenmayera odważono po 24 g liofilizatu wytłoków winogronowych. Dodano 70% roztwór alkoholu etylowego w ilości po 216 ml i poddano maceracji na wstrząsarce (170 RPM) w 30°C przez 2 dni. Następnie roztwór przesączono, filtrat odwirowano otrzymując produkt płynny EA1 z wydajnością ekstrakcji 7,42% (masa suchego ekstraktu do masy wsadu do ekstrakcji). Następnie połowę płynu zatężono na wyparce próżniowej, w warunkach 50 mbarów, 40°C i 110 obrotów/min. Po odparowaniu etanolu i wody otrzymano oleisty osad, który rozpuszczono w 38 ml 70% alkoholu etylowego otrzymując w ten sposób kolejny preparat EA2. W następnym etapie badań przeprowadzono skrining otrzymanych preparatów (Es, Es1, Es2, Es3, Em, Em1, Em2 oraz z dodatkiem Tweenu 80: Es1T, Es3T, Es4T) w celu wybrania najbardziej aktywnych substancji, o największym hamującym wpływie na wzrost danego szczepu bakterii próchnicotwórczych. W przeprowadzonych badaniach użyto cztery referencyjne szczepy bakterii próchnicotwórczych: *Streptococcus mutans* CAPM 6067 i *S. sobrinus* CAPM 6070 (CAPM, Czeska Kolekcja Mikroorganizmów Zoopatogennych, Brno, Czechy), *S. sobrinus* DSMZ 20381 (DSMZ, Niemiecka Kolekcja Mikroorganizmów i Kultur Komórkowych, Braunschweig, Niemcy) oraz *S. sanguis* ATCC 10556 (ATCC, Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych, Manassas, VA, USA). Na początku zastosowano dwie metody skriningowe: metodę krążkową i metodę dołkową. Zaobserwowano, iż metoda dołkowa daje znacznie gorsze efekty, w związku z czym dalszą ocenę aktywności preparatów przeciwko bakteriom *Streptococcus* wykonywano przy użyciu metody krążkowej. W końcowym etapie określono minimalne stężenie hamujące (MIC) oraz minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) dla najlepiej działających substancji, z użyciem płytek 96-dołkowych (Tab.2).

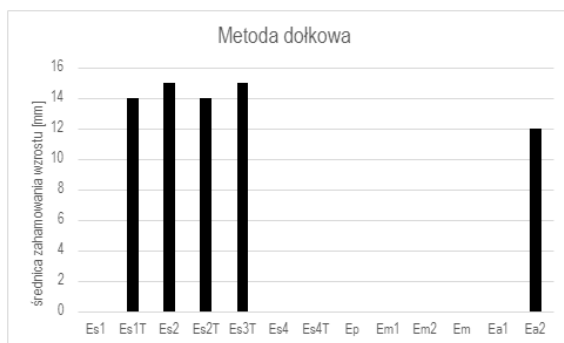


Rys. 1. Schemat otrzymywania badanych substancji pozyskanych w wyniku ekstrakcji wyłoków z winogron nadkrytycznym dwutlenkiem węgla, w tak zwanej „suchej ekstrakcji” i w metodzie „na mokro”.

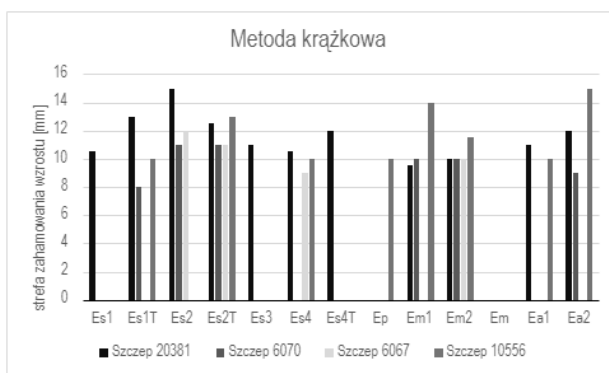


Rys. 2. Porównanie wydajności ekstrakcji wyłoków winogronowych z użyciem nadkrytycznego CO₂ i alkoholu etylowego [% w/w].

Wyniki: Na rysunku 3, przedstawiono wyniki badania skringowego metodą dołkową, która okazała się metodą mniej efektywną w porównaniu do metody krążkowej. Na rysunku 4 przedstawiono wyniki metody krążkowej dla poszczególnych szczepów bakterii *Streptococcus sobrinus* 6070, *S. sobrinus* 20381 *S. sangius* 10556 i *S. mutans* 6067. Najbardziej aktywną substancją dla szczepów 20381, 6070 i 6067 było Es2, zaś dla 10556 Ea2. Dzięki zebranych informacjom z badania skringowego wyselekcjonowano odpowiednie preparaty wykazujące najwyższą aktywność antybakteryjną w stosunku do poszczególnych szczepów bakterii (Tab.1). Dla szczepu *S. sobrinus* 20381 są to preparaty: Es2, Es2T, Em2, EA1; dla szczepu *S. sobrinus* 6070 są to preparaty: Es2, EA2; dla szczepu *S. mutans* 6067 preparaty: Es2, Es2T, Es4; zaś dla szczepu *S. sangius* 10556 preparaty: Em1, EA2. Wyniki dotyczące MBC oraz MIC przedstawiono w tabeli 2.



Rys. 3. Ocena aktywności biologicznej preparatów otrzymywanych z wycieków winogron wobec bakterii *S. sobrinus* 20381 z zastosowaniem metody dołkowej.



Rys. 4. Skryning aktywności biologicznej preparatów otrzymanych z wycieków winogron wobec bakterii *Streptococcus sobrinus* (20381; 6070), *Streptococcus mutans* (6067) i *Streptococcus sangius* (10556). Strefa zahamowania wzrostu [mm].

Tabela 1. Zestawienie wybranych preparatów wykazujących najwyższą aktywność wobec konkretnego szczepu bakterii *Streptococcus*.

Szczep	<i>S. sobrinus</i> 20381	<i>S. sobrinus</i> 6070	<i>S. mutans</i> 6067	<i>S. sangius</i> 10556
Wyselekcjonowane preparaty	Es2; Es2T; Em2; EA1.	Es2; EA2	Es2; Es2T; Es4	Em1; EA2

Tabela 2. Zestawienie minimalnych stężeń hamujących (MIC) oraz minimalnych stężeń bakteriobójczych (MBC) preparatów wobec bakterii z rodzaju *Streptococcus*.

Szczep	Rodzaj preparatu	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)
<i>S. sobrinus</i> 20381	Es2- substancja o konsystencji pasty rozpuszczona w etanolu	0,85	0,85
	Es2T- substancja o konsystencji pasty rozpuszczona w etanolu z dodatkiem Tweenu 80	0,85	0,85
	Em2- ekstrakt z metody „na mokro” rozpuszczony w etanolu	0,5	0,25
	EA1- preparat niezatężony, otrzymany po ekstrakcji 70% etanolem	0,85	0,425
<i>S. sobrinus</i> 6070	Es2- substancja o konsystencji pasty rozpuszczona w etanolu	0,45	0,45

	EA2 - preparat zatężony, otrzymany po ekstrakcji 70% etanolem	4,5	2,25
<i>S. mutans</i> 6067	Es2- substancja o konsystencji pasty rozpuszczona w etanolu	0,9	0,45
	Es2T- substancja o konsystencji pasty rozpuszczona w etanolu z dodatkiem Tweenu 80	0,9	0,45
	Es4- substancja o konsystencji pasty rozpuszczona w metanolu	0,2	0,1
<i>S. sanguis</i> 10556	Em1- ekstrakt z metody „na mokro” rozpuszczony w DMSO	0,5	0,5
	EA2- preparat zatężony, otrzymany po ekstrakcji 70% etanolem	9	9

Wnioski: Na podstawie uzyskanych wyników stwierdza się, że otrzymane z wytlóków winogron preparaty mają hamujący wpływ i bakteriobójczą aktywność w stosunku do bakterii powodujących próchnicę zębów. Wyselekcjonowane preparaty w największym stopniu ograniczały wzrost szczepów bakterii *S. sobrinus* oraz *S. mutans*, które wykazują zwiększoną wrażliwość na badane substancje. Na szczególną uwagę zasługują preparaty otrzymane z ekstrakcji nadkrytycznym dwutlenkiem węgla „metodą na sucho” rozpuszczone w metanolu lub etanolu, które wykazują wyższą aktywność niż preparaty uzyskane przy użyciu 70% (v/v) etanolu. Wytloki po maceracji winogron posiadają substancje czynne, które wykazują właściwości hamujące oraz biobójcze wobec bakterii próchnicotwórczych. Jednak efektywność działania płynów na bazie takich substancji w profilaktyce próchnicy zębów, w dużym stopniu uzależniona jest od sposobu ich otrzymywania.

Literatura:

1. T. Tarko, A. Suda-Chodak, A. Bebak, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 4(83) (2012) 55.
2. P. Nadobna, Ekstrakcja nadkrytycznym CO₂. Poznański Park Naukowo- Technologiczny PPNT, 2018. 3.
3. E. Rój, Ekstrakcja surowców roślinnych w warunkach nadkrytycznych z użyciem CO₂ INS Puławy 2012.
4. E. Janiszewska, D. Witrowa-Rajchert, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 4(45) (2005) 5.
5. H. Poureslami, The effects of plant extracts on dental plaque and caries. Contemporary approach to dental cariers, 20 (2012) 395.
6. B.R.C. Shekar, R. Nagarajappa, S. Suma, R. Thakur, Pharmacognosy reviews, 9(18) (2015) 87.
7. K.N. Kontogiannopoulos, A. Kapourani, I. Gkougkourelas, M.E. Anagnostaki, L. Tsalikis, A.N. Assimopolou, P. Barmपालexis, Pharmaceuticals, 16 (2023) 1136.

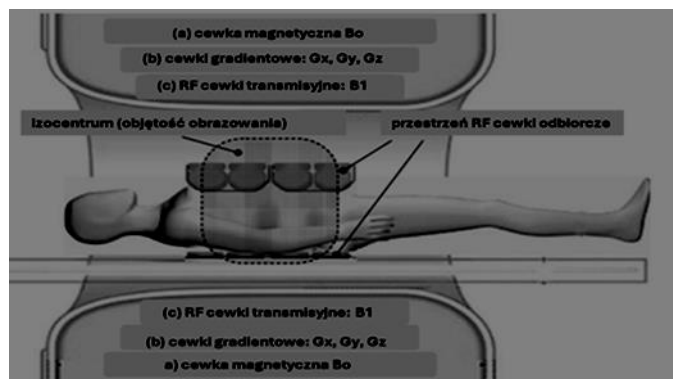
ZNACZENIE OBRAZOWANIA TECHNIKĄ REZONANSU MAGNETYCZNEGO (MRI, MR) W DIAGNOSTYCE NOWOTWORÓW

W. JAROSZ, K. ZAMLYŃSKA, UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin, UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Abstrakt: Obrazowanie magnetycznym rezonansem jądrowym (MRI, ang. magnetic resonance imaging) jest nieinwazyjną metodą odzwierciedlenia wnętrza ciała, która wykorzystuje pole magnetyczne i fale radiowe. Obrazy uzyskane tą techniką dostarczają szczegółowych informacji dotyczących anatomii i funkcji tkanek. MRI jest często porównywane z tomografią komputerową (metoda obrazowania warstwowego - TK, CT). Obydwie techniki pozwalają „zajrzeć” w głąb ludzkiego ciała, aczkolwiek wykorzystują różne rodzaje promieniowania. W TK nośnikiem energii jest promieniowanie rentgenowskie (fale X), które stosowane zbyt często lub w wysokich dawkach może prowadzić do uszkodzeń DNA. Z tego powodu TK nie może być wykonywane w małych odstępach czasu oraz u kobiet w ciąży. MRI umożliwia uzyskanie obrazów bez udziału promieniowania jonizującego, dlatego posiada opinię techniki bezpiecznej i obojętnej dla organizmu [1]. Badanie można wykonywać wielokrotnie. Jedynym przeciwwskazaniem jest wszczepiony rozrusznik serca, neurostymulator, aparat słuchowy, pompa insulinowa itp. Zarówno MRI i TK dają bardzo dokładny, trójwymiarowy obraz. Aczkolwiek MRI często umożliwia identyfikację zmian (np. guzów) niewidocznych w TK. MRI jest jedynym badaniem, dzięki któremu można dokładnie zbadać mięśnie, stawy, więzadła i ścięgna, jak również dostrzec ich uszkodzenia. W onkologii uchodzi za technikę uniwersalną, która obejmuje niemalże wszystkie narządy m.in. jelito (cienkie i grube), trzustkę, wątrobę, nadnercza, ośrodkowy układ nerwowy. Umożliwia także obrazowanie w obrębie całego ciała, co ma istotne znaczenie w lokalizacji przerzutów.

Wprowadzenie: Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, ang. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) jest jedną z metod spektroskopii absorpcyjnej. Oparta jest na zjawisku rezonansu magnetycznego, który wykazują jądra posiadające niezerowy moment magnetyczny, umieszczone w silnym stałym polu magnetycznym [2]. W medycynie zjawisko rezonansu magnetycznego wykorzystywane jest m.in. w technice obrazowania MRI. Podwaliny tej metody opracowali Paul Lauterbur USA oraz Peter Mansfield z Wielkiej Brytanii, którzy w 2003 roku za swoje odkrycia zostali uhonorowani Nagrodą Nobla. Wynalezienie tej nowoczesnej metody obrazowania spowodowało znaczący przełom zarówno w diagnostyce jak i badaniach medycznych [3]. W MRI najpowszechniej wykorzystywane są właściwości magnetyczne atomów wodoru, który znajduje się w każdej żywej komórce. Badanie wykonuje się za pomocą aparatu MRI, który porównywany jest do wielkiego elektromagnesu (Rys. 1). Po uruchomieniu generuje on pole magnetyczne o odpowiedniej częstotliwości, dzięki czemu protony znajdujące się wewnątrz tkanek poruszają się w określony sposób. Gdy wracają do pozycji wyjściowej, generowane są

fale radiowe odbierane przez detektor. Zarejestrowane sygnały są następnie przekształcane w obrazy przestrzenne za pomocą odpowiedniego oprogramowania. Podstawą do otrzymywania różnych obrazów jest odmienna struktura chemiczna materii (np. części ciała), w której znajdują się analizowane protony. Dobór odpowiednich parametrów pomiarowych tzw. sekwencji (modulowanie pól magnetycznych, czasów, cewek nadawczo-odbiorczych) umożliwia uzyskanie niezbędnych danych potrzebnych do otrzymania bardzo dokładnych obrazów konkretnych narządów, ich fragmentów, a nawet warstw np. warstw mózgu.



Rys. 1. Schemat systemu MRI [1].

Biorąc pod uwagę podstawowe parametry obrazowania, których dobór zależy od obrazowanej części ciała, wyróżnia się m.in.:

- obrazy T1-zależne, otrzymywane głównie w celu wizualizacji anatomii mózgu, istota biała widoczna jest w jasnych kolorach, istota szara w ciemnych, płyn mózgowo-rdzeniowy wyraźnie ciemny. Obrazy te pozwalają na rozpoznanie obrzęku mózgu, ropienia czy guza;

- obrazy T2-zależne, na których istota biała jest widoczna jako ciemna, zaś istota szara i płyn mózgowo-rdzeniowy są wyraźnie jasne. Za pomocą obrazowania T2 rezonansem magnetycznym można zobaczyć np. fazy powstawania krwiaka bądź odróżnić torbiel od guza;

- FLAIR (ang. *fluid-attenuated inversion recovery*), w tym typie MRI obszary charakteryzujące się małą zawartością wody widoczne są jako ciemniejsze, natomiast obszary z jej dużą ilością jako jaśniejsze. Obrazowanie w tej sekwencji jest często wykorzystywane w diagnostyce chorób demielinizacyjnych [4].

Liczne udoskonalenia techniki MRI pozwoliły na rozpowszechnienie nowoczesnych technik obrazowania MRI, takich jak: sekwencje 3D echa gradientowego (3D T1 GRE, ang. gradient recalled echo); sekwencje stanu zrównoważonego (ang. true-FISP, true fast imaging with steady state free precession, balanced FFE, FIESTA); obrazowanie dyfuzyjne (DWI, ang. diffusion weighted imaging); obrazowanie za pomocą sekwencji echa planarnego (EPI, ang. echo planar imaging), wykorzystywane głównie w diagnostyce schorzeń jamy brzusznej [5]. Obecnie MRI jest jedną z najważniejszych metod diagnostyki obrazowej, pozwalającej na bardzo szczegółową wizualizację tkanek miękkich opartą na wielu parametrach kontrastu, możliwością wizualizacji w różnych orientacjach przestrzennych oraz dostarczającej danych 2- i 3- wymiarowych. Znaczenie

MRI w imponujący sposób odzwierciedla stale rosnącą liczbę instalacji aparatów MRI. W Polsce przed rokiem 2013 przypadało 3,7 aparatów MRI na milion mieszkańców, w roku 2013 współczynnik ten wynosił 7 [6] i stale rośnie. MRI jest metodą kompleksową, dzięki której możliwa jest ocena wielu różnorodnych parametrów. Technika ta pozwala na ocenę strukturalną, jak i czynnościową. Ocena strukturalna opiera się na ocenie wzmocnienia kontrastowego (nie tylko po podaniu tradycyjnych związków kontrastowych) oraz na wykrywaniu obecności tkanki tłuszczowej lub żelaza. Diagnostyka czynnościowa umożliwia analizę parametrów, których często nie da się ocenić za pomocą innych metod. Przykładem tego typu diagnostyki jest technika DWI (ang. diffusion weighted imaging), która odgrywa istotną rolę w wykrywaniu nowotworów. Pozwala na ocenę dyfuzji cząsteczek wody w przestrzeni pozanaczyniowej (zewnątrzkomórkowej). Jednym z czynników wpływających na ograniczenie dyfuzji w przestrzeni zewnątrzkomórkowej jest m.in. zwiększona liczba komórek, co może wskazywać na obecność nowotworu. DWI jest stosowane w onkologii, w celu wykrycia nieprawidłowych ognisk w różnych narządach oraz do odróżnienia zmian łagodnych od złośliwych [7]. Jelito cienkie obrazuje się dzięki zastosowaniu dwóch technik: enteroklizy i enterografii, które różnią się sposobem podania kontrastu. W przypadku enteroklizy środek kontrastowy podaje się przez sondę założoną do pętli jelita cienkiego, podczas gdy w enterografii podaje się go doustnie [8]. W technikach tych wykorzystuje się różne środki kontrastowe, tj. płyny wieloelektrolitowe, roztwory metylocelulozy, sole baru czy cząsteczki tlenku żelaza. Podanie środka kontrastowego przez cewnik umożliwia bardzo dobry kontrast jelita cienkiego poprzez jego rozdęcie, aczkolwiek powoduje dyskomfort pacjenta. Z tego powodu częściej stosuje się enterografię. Najczęściej stosowanymi sekwencjami pozwalającymi na uzyskanie najlepszych obrazów jelita są: true-FISP, sekwencja HASTE oraz trójwymiarowa T1-zależna sekwencja echa gradientowego (3D T1 GRE). Zarówno enterokliza, jak i enterografia cechują się wysoką czułością w wykrywaniu nowotworów i polipów jelita cienkiego. Do obrazowania jelita grubego stosowana jest kolonografia MRI. Wykorzystuje ona te same sekwencje co w badaniach jelita cienkiego. Badanie wykonuje się dwoma technikami: jasnego światła (bright-lumen) i ciemnego światła (dark-lumen). Technika jasnego światła wymaga doodbytniczego podania pozytywnego środka kontrastowego (np. chelatu gadolinu). Tego typu obrazowanie wykonuje się przy użyciu sekwencji 3D T1 GRE. Nieprawidłowości ściany jelit są widoczne jako ciemne na tle jasnego światła jelit. W technice ciemnego światła jelito grube wypełnione jest wodą, powietrzem bądź dwutlenkiem węgla, a następnie dożylnie podawany jest środek kontrastowy, który poprawia wizualizację zmian występujących w ścianie jelita. Technika ta umożliwia określenie stopnia zaawansowania nowotworu i obecność ewentualnych przerzutów odległych. Rak jelita grubego często daje przerzuty do wątroby. Wątrobę obrazuje się często techniką DWI ze wzmocnieniem kontrastowym – związkami hepatotropowymi, bądź związkami o powinowactwie do układu siateczkowo-śródbłonkowego. DWI jest uznawane za najskuteczniejszą metodę wykrywania zmian nowotworowych wątroby, jest także przydatne w ocenie charakteru uwidocznionych już zmian [9]. MRI jest nieodzownym narzędziem stosowanym do wykrywania, różnicowania i przedoperacyjnej oceny guzów mózgu. Pozwala na określenie ich zaawansowania miejscowego, stosunku do szlaków istoty białej (traktografia MR) czy też ważnych ośrodków korowych, odpowiedzialnych za ruch, mowę, słuch i wzrok. Umożliwia także charakterystykę struktury guza.

W diagnostyce tego typu nowotworów zazwyczaj wykorzystuje się technikę DWI oraz metodą tensora dyfuzji (DTI, ang. tractography, diffusion tensor tractography). DTI polega na mapowaniu przebiegu włókien istoty białej, co umożliwia lekarzowi zaplanowanie zabiegu chirurgicznego (np. usunięcia guza). Kolejną techniką jest protonowa spektroskopia rezonansu magnetycznego (MRS) pozwalająca na nieinwazyjne badanie składu chemicznego mózgu. Umożliwia ocenę stężenia niektórych metabolitów np. N-acetyloasparaginiany (NAA), choliny, kreatyny, alaniny. W zmianach nowotworowych w mózgu dochodzi do znaczącego zwiększenia stosunku choliny do kreatyny oraz obniżenia stężenia NAA. MRS najczęściej wykorzystuje się w różnicowaniu między odrostem guza (najczęściej pooperacyjnym) a nienowotworowymi zmianami. Badanie to umożliwia także odróżnienie guzów mózgu od innych zmian (np. udaru, ropienia lub nietypowych ognisk demielinizacyjnych) oraz ocenę ich stopnia złośliwości [1; 9; 7]. Nowotwory złośliwe najczęściej identyfikuje się wykorzystując akwizycję obrazu za pomocą sekwencji odwróconej inwersji typu STIR, oraz sekwencji DWI w płaszczyznach czołowych. Przykładem innej techniki mającej znaczenie przy tego typu nowotworach jest WB MRI (ang. whole-body magnetic resonance imaging) z pozytonową tomografią emisyjną, która umożliwia także wykrycie przerzutów do innych narządów [2, 10].

Wnioski: MRI to bezbolesna, nieinwazyjna i bezpieczna dla organizmu metoda obrazowania, która znajduje bardzo wiele zastosowań. Mimo wysokich kosztów w porównaniu z innymi formami obrazowania stanowi nieodzowny warsztat dla lekarzy. Umożliwia wykrycie wielu zmian, w tym nowotworowych i schorzeń, co pozwala na dobór właściwej strategii leczenia oraz zwiększa szanse pacjenta na powrót do zdrowia.

Literatura:

1. E. Moser, A. Stadlbauer, C. Windischberger, H.H. Quick, M.E. Ladd, Eur. J. Nucl. Med. Imaging., 36: (2009) 30.
2. R.L. Kleinberg, Magn. Reson., 35 (1999) 337.
3. W. Froncisz, Kosmos, 53 (2004) 251.
4. <https://portal.abczdrowie.pl/czym-sa-sekwencje-w-badaniu-rezonansu-magnetycznego>
5. R.N. Low, J.J. Gurney, Magn. Reson. Imaging, 25 (2007) 848.
6. R. Szybiński, CX News, 4(46) (2013) 17.
7. K.R.T. Fink, Principles of Neurological Surgery, (2018) 62.
8. T. Lebda-Wyborny, A. Barczyk, J. Pilch-Kowalczyk, M. Korzekwa, D. Sojka, D. Knap, L. Baron, A. Pałasz, Chirurgia Polska, 14(1-2) (2012) 69.
9. A. Cieszanowski, Onkol. Prak. Klin., 9(2) (2013) 60.
10. G. Petralia, F. Zugni, P.E. Summers, A. Colombo, P. Pricolo, L. Grazioli, S. Colagrande, A. Giovagnoni, A. Padhani, Radiol Med., 126(11) (2021) 1434.

RÓŻNOKIERUNKOWE ZASTOSOWANIE KOMPOZYTÓW NA BAZIE HYDROKSYAPATYTU

A. BIEDRZYCKA, E. SKWAREK, UMCS, Wydział Chemii, Katedra Radiochemii i Chemii Środowiskowej, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie, 20-031 Lublin

Abstrakt: Artykuł przedstawia możliwości aplikacyjne kompozytów na bazie hydroksyapatytu, którego głównym składnikiem jest fosforan wapnia. Związek ten wyróżnia się wysoką stabilnością, reaktywnością, doskonałą zdolnością do adsorpcji, dużą powierzchnią, przystępną ceną, biodegradowalnością oraz posiada przyjazne dla środowiska metody syntezy. Kluczowym czynnikiem, który sprawia, że jest on niezwykle popularny w medycynie to biokompatybilność. Dlatego też, istnieją liczne doniesienia o jego możliwości wykorzystania jako nośnik leków, materiał na implanty kostne oraz pokrycia. Znajduje też zastosowanie w bioobrazowaniu, inżynierii tkankowej oraz w metodach separacji. W szczególności jego zdolności adsorpcyjne pozwalają na skuteczne usuwanie jonów metali, radionuklidów, związków organicznych, jak i nieorganicznych. Mimo licznych zalet, hydroksyapatyt odznacza się jednakże słabą twardością, małą wytrzymałością na rozciąganie, a także trudnością w jego odzyskaniu z roztworów wodnych. Z uwagi na powyższe cechy opracowuje się liczne modyfikacje celem poprawy jego właściwości oraz poszerzenia horyzontu zastosowań. Praca ta podkreśla wszechstronność hydroksyapatytu w połączeniu z różnymi materiałami oraz wskazuje na jego mocne i słabe strony, a także na potencjał do dalszego rozwoju.

Wprowadzenie: Hydroksyapatyt (Hap) jest powszechnie znanym minerałem fosforanu wapnia. Należy do grupy apatytów i odznacza się wzorem $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Hap jest częścią ludzkich kości, w tym zębów i nadaje im wytrzymałość mechaniczną oraz trwałość. Ogółem, istnieje kilka dominujących związków wśród fosforanów wapnia, tj. fosforany trójwapniowe, dwufazowe fosforany wapnia lub fosforany czterowapniowe. Jednakże, każdy z tych materiałów wykazuje inne właściwości. Ponadto, istnieją pewne różnice w ich działaniu. Badania wykazały, że hydroksyapatyt jest bardziej popularny ze względu na swoje właściwości, tj. stabilność, reaktywność, dużą zdolność adsorpcji, dużą powierzchnię oraz niski koszt wytwarzania. Ponadto, jest biodegradowalny, przyjazny dla środowiska i może być syntetyzowany różnymi metodami, które nie wymagają agresywnych substancji. Co więcej, jego biokompatybilność ma ogromne znaczenie. Ze względu na swoje właściwości hydroksyapatyt jest wykorzystywany w wielu gałęziach przemysłu i życia człowieka. W medycynie znajduje zastosowanie jako system dostarczania leków i genów, materiał powłokowy i implant kostny. Co więcej, Hap może być wykorzystywany w bioobrazowaniu, rezonansie magnetycznym, inżynierii tkankowej, separacji komórek czy metodzie hipertermii. Ze względu na swoje zdolności sorpcyjne Hap może być wykorzystywany jako adsorbent. W literaturze opisano adsorpcję jonów metali, m.in. chromu, ołowiu, kadmu, niklu, cynku, aluminium, miedzi, kobaltu, żelaza, manganu czy baru. Dodatkowo, hydroksyapatyt okazał się skutecznym adsorbentem w procesach usuwania radionuklidów, np. uranu, cezu, strontu, jodu. Co więcej, zdolność sorpcyjna związków organicznych była również badana przez różnych naukowców, a także substancji nieorganicznych, tj. fluorków, selenu. Hydroksyapatyt wydaje się być

idealnym materiałem. Ma on jednak również pewne wady. Najważniejsze z nich to słaba wytrzymałość i odporność na rozciąganie. Ponadto występują pewne trudności podczas oddzielania go od roztworu. Dlatego też opracowano liczne modyfikacje hydroksyapatytu w celu poprawy jego właściwości i poszerzenia horyzontu jego zastosowań [1,2].

Wprowadzenie: Adsorpcja jest uważana za jedną z najbardziej skutecznych metod usuwania zanieczyszczeń w środowisku. Spośród innych metod wyróżnia się łatwością przeprowadzenia, niskim kosztem, wydajnością i uniwersalnością. W dzisiejszych czasach jest to istotna kwestia ze względu na rosnącą ilość zanieczyszczeń w środowisku. Wiele substancji lub jonów metali przedostaje się do ekosystemu z przemysłu, medycyny lub w wyniku wypadku. Niektóre z nich mogą być trujące i powodować choroby. W związku z tym istotne jest opracowanie procesów skutecznego oczyszczania z wykorzystaniem odpowiednich adsorbentów [3]. Połączenie hydroksyapatytu i tlenku żelaza (Fe_2O_3 lub Fe_3O_4) pozwala uzyskać wielofunkcyjny materiał typu rdzeń-powłoka, w którym tlenek żelaza stanowi rdzeń, a hydroksyapatyt warstwę zewnętrzną. Co więcej, dodatek Fe_2O_3 lub Fe_3O_4 nadaje materiałowi właściwości magnetyczne, co jest ważne w procesach separacji ze względu na możliwość zastosowania zewnętrznego magnesu do usunięcia adsorbentu z roztworu. Badania donoszą o zastosowaniu wspomnianego materiału jako adsorbentu jonów Cd, Pb, Cu, Ni, Mn, ale także radionuklidów, np. U. Ponadto, istnieją prace poruszające problematykę adsorpcji jonów azotanowych, kwasu humusowego, barwników oraz związku biologicznego takiego jak katechina [4].

Został zaproponowany również inny rodzaj kompozytu na bazie hydroksyapatytu, a mianowicie $\text{Zn}/\text{Fe}_2\text{O}_4/\text{Hap}$. Ten materiał przebadano pod kątem adsorpcji oleju i kadmu. Wyniki były obiecujące [5]. Z kolei, Foroughi i inni zaprezentowali kompozyt $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{Hap}$. Wyniki dotyczyły adsorpcji cynku [6]. Podobny kompozyt został także wykorzystany w badaniach nad sorpcją niklu [7]. Ciekawe podejście zostało również zaprezentowane przez Akartasse i innych. Badania te przedstawiają materiał $\text{Hap}/\text{chitosan}/\text{glicerol}$, który posłużył do zbadania adsorpcji jonów Cd i Zn [8]. Z kolei, kompozyt składający się z hydroksyapatytu oraz biowęgla został otrzymany przez Liao i innych. Badania poruszyły możliwość zastosowania materiału jako adsorbentu jonów uranu [9]. Interesującym rozwiązaniem okazał się być kompozyt $\text{Hap}/\text{alginian sodu}$, który został wykorzystany w procesach usuwania jonów Cd [10]. Istnieją również rozwiązania modyfikacyjne, gdzie umieszcza się poszczególne jony metali na powierzchni hydroksyapatytu. Taki kompozyt został zaprezentowany przez Zhu i innych. Ich materiał zawierał dodatkowo jony strontu i został wykorzystany w procesie adsorpcji ołowiu [11]. Zastosowania zmodyfikowanych kompozytów hydroksyapatytu nie można ograniczyć jedynie do procesów adsorpcyjnych. Ogromne znaczenie mają one także w medycynie. Biokompatybilne materiały odgrywają kluczową rolę w rozwoju innowacyjnych terapii i technologii. Jednym z najbardziej obiecujących materiałów stosowanych w tym obszarze jest hydroksyapatyt. Charakteryzuje się on jednak niezadowalającymi właściwościami mechanicznymi. Dlatego naukowcy szukają pewnych ulepszeń i modyfikacji w celu opracowania bardziej wydajnych materiałów. Niektóre z nich zostały przedstawione poniżej. W literaturze opisano szereg kompozytów na bazie hydroksyapatytu, które zostały przetestowane pod kątem transportu leków w organizmie człowieka. Jednym z nich jest kompozyt $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{Hap}$. Eksperyment dotyczył wiązania i uwalniania leku przeciwwzapalnego - sulfazaliny. Wyniki wykazały, że substancja wiązała się na powierzchni kompozytu z wydajnością 59,1% [12]. Z kolei, w innym badaniu

zaprezentowano materiał Hap/MgFe₂O₄. Został przetestowany pod kątem procesów ładowania i uwalniania ibuprofenu z jego powierzchni. Interakcje między lekiem a adsorbentem opierały się głównie na oddziaływaniach wodorowych. Głównym wnioskiem był fakt, że proces uwalniania leku jest silnie uzależniony od wielkości porów i rozwinięcia powierzchni materiału nośnego [13]. Inne kompozyty pojawiające się w badaniach nad dostarczaniem leków to, m.in. ferryt kobaltu/magnetyt/Hap, Hap/Si/nanorurki węglowe, chitosan-alginian/Hap. Co więcej, istnieje wiele artykułów na temat różnych kompozytów hydroksyapatytowych, które potencjalnie mogą znaleźć zastosowanie w ortopedii. Większość z tych prac ma charakter wstępny. Poniżej przedstawione zostaną najpopularniejsze kompozyty hydroksyapatytowe o potencjalnym zastosowaniu w procesach regeneracji kości i implantach. Dobrymi właściwościami bioaktywnymi wykazał się kompozyt Hap/Fe₃O₄. Wykazano, że materiał ten nadaje się do zastosowania w procesie regeneracji kości [14]. Inne rozwiązanie zostało zaproponowane przez Sadeghi i innych, którzy otrzymali kompozyt polikaprolakton/żelatyna/Hap. Stabilność termiczna i właściwości mechaniczne były znacznie lepsze po połączeniu trzech substancji. Testowane rusztowanie wykazywało doskonałą biokompatybilność z komórkami i wspierało ich proliferację. Co więcej, hodowane komórki bezproblemowo przylegały do rusztowania i infiltrowały jego porowatą strukturę. Uzyskane wyniki badań sprawiają, że materiał ten jest obiecującym rozwiązaniem w ortopedii [15]. Ciekawy, skomplikowany materiał został otrzymany w metodzie elektrospinningu, a mianowicie był to kompozyt Ce/Ag/Hap/alkohol poliwinylowy/ karboksymetyloceluloza. Materiał charakteryzował się najwyższą wytrzymałością na rozciąganie, wyjątkową aktywnością przeciwdrobnoustrojową i ułatwionym tworzeniem apatytu [16]. Inne kompozyty proponowane w tej tematyce to: polietylen/Hap, glikol etylenowy/di akrylan/Hap, czy też polilaktyd/Hap. Zastosowań medycznych jest wiele. Są to nie tylko implanty kostne i ortopedia, ale także różne procesy gojenia. Jednym z przykładów zastosowania kompozytów na bazie hydroksyapatytu jest immobilizacja enzymów. Co więcej, ochrona ran i przyspieszenie ich gojenia ma również ogromne znaczenie. Do takich celów mógłby posłużyć kompozyt alginian/Hap [17]. Jednym z najważniejszych zagadnień w obecnych trendach medycznych jest wykrywanie i leczenie nowotworów. W tym celu badano również zastosowanie kompozytów na bazie hydroksyapatytu.

Kataliza jest istotną częścią zielonej chemii. Jej celem jest rozwój zrównoważonych i przyjaznych dla środowiska reakcji chemicznych. Odpowiedni katalizator może ułatwić procesy chemiczne, pozostając niezmiennym. Dlatego też ta dziedzina wiedzy staje się coraz bardziej widoczna. Dbałość o środowisko i otoczenie, w którym żyjemy jest niezwykle ważnym czynnikiem. W literaturze można znaleźć wiele rozwiązań dla katalizatorów opartych na hydroksyapatytach. Niezwykle popularny w badaniach jest magnetyczny kompozyt hydroksyapatytowy.

Wnioski: Podsumowując, modyfikacja hydroksyapatytu jest kluczowym obszarem badań, który przyczynił się do rozszerzenia jego potencjału aplikacyjnego. Poprzez ciągły rozwój i optymalizację procesów modyfikacji, naukowcy dążą do wyeliminowania ograniczeń, takich jak słaba wytrzymałość mechaniczna i trudności w oddzielaniu od roztworów. W rezultacie nowe formy modyfikowanego hydroksyapatytu znajdują zastosowanie w wielu dziedzinach. W medycynie, jako skuteczny system dostarczania leków i regeneracji tkanki kostnej, a także jako materiał pokrywający implanty. Ponadto ich

unikalne właściwości adsorpcyjne czynią je cennymi narzędziami w usuwaniu zanieczyszczeń z roztworów i wykrywaniu substancji rakotwórczych. W dziedzinie katalizy, modyfikacje hydroksyapatytu otwierają drzwi do wydajnych reakcji chemicznych, przyczyniając się do zrównoważonego rozwoju procesów przemysłowych. Wraz z rozwojem badań nad modyfikacjami hydroksyapatytu, możemy spodziewać się nowych innowacyjnych podejść, które jeszcze bardziej poszerzą spektrum jego zastosowań. W połączeniu z dynamicznym postępem naukowym i technologicznym, modyfikacje hydroksyapatytu mogą potencjalnie przyczynić się do poprawy ludzkiego życia i zdrowia, a także do rozwoju nowych technologii o globalnym znaczeniu.

Literatura:

1. A. Biedrzycka, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 291 (2021) 102401.
2. Y. Hartati, *Sens. Bio-Sens. Res.*, 38(2) (2022) 100542.
3. F. Lu, *Coord. Chem. Rev.*, 356 (2018) 147.
4. X. Shen, *J. Dispers. Sci. Technol.*, 42(5) (2019) 1.
5. H. El-Maghrabi, *Egypt. J. Pet.*, 28(2) (2019) 137.
6. F. Foroughi, *Ceram. Int.*, 41 (2015) 6844.
7. K. Das, *Water Air Soil Pollut.*, 231 (2020) 43.
8. N. Akartasse, *Polymers*, 14(20) (2022) 4265.
9. J. Liao, *Biochar.*, 4(29) (2022).
10. Z. Song, *Materials Science Forum*, 743 (2013) 578.
11. Z. Zhu, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 29 (2022) 1.
12. Y. Orooji, *J. Hazard. Mater.*, 400 (2020) 123140.
13. F. Foroughi, *Mater. Sci. Eng.*, 68 (2016) 774.
14. P. Agalya, *Ceram. Int.*, 48 (2022) 28299.
15. E. Sadeghi, *Polym. Compos.*, 43(10) (2022) 7379.
16. K. Sabareeswari, *Polym. Bull.*, 79(12) (2022) 11523.
17. M. El Hawalany, *Pharm.*, 14(10) (2022) 2255.

KOMPOZYTY BAZUJĄCE NA GLINCIE ZIELONEJ, HYDROKSYAPATYCIE, KRZEMIONCE, TiO₂, ZnO ORAZ PYŁKU PSZCZELIM JAKO NOWE NOŚNIKI WITAMINOWE

K. KOWALSKA¹, V. PAIENTKO^{1,2}, E. SKWAREK¹, ¹UMCS, Wydział Chemii, Katedra Radiochemii i Chemii Środowiskowej, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin, ²Chuiko Institute of Surface Chemistry, 17 General Naumov Street, 03164 Kyiv, Ukraine

Abstrakt: Rozwój medycyny i starzenie się społeczeństwa mobilizują badaczy do wzmoczonych badań nad nowymi sposobami dostarczania substancji organicznych. Jednym z obiecujących sposobów aplikacji np. witamin są kompozyty. Zsyntezowano kompozyty na bazie glinki zielonej, hydroksyapatytu, krzemionki, TiO₂, ZnO i pyłku pszczelego. Wybrane próbki zbadano pod względem stężenia karotenoidów, antocyjanów, witaminy C przy pomocy UV-VIS. Zmierzono potencjał dzeta ζ oraz wielkość cząstek.

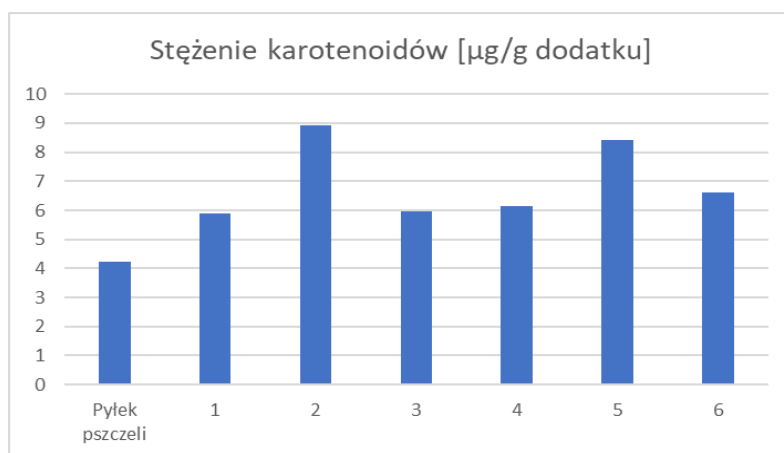
Wprowadzenie: Ziarna pyłku są niezbędnym źródłem białka dla pszczół potrzebnym do ich przeżycia. Ze względu na swój bogaty skład wysuszony pyłek pszczeli stanowi wartościowy dodatek do diety człowieka zapewniając harmonijną równowagę organizmu. Możemy zauważyć szeroką gamę kolorów zmieniających się z białego i kremowego na ciemnobrązowy, żółty, pomarańczowy, czerwony, czy zielonkawy w zależności od składu chemicznego. Swoje właściwości zawdzięcza składowi bogatemu m.in. w witaminy i przeciwutleniacze [1]. Glinki są szeroko stosowane w różnych dziedzinach przemysłu, medycynie, kosmetyce, rolnictwie itp. ze względu na ich naturalność, biokompatybilność i skład. Mogą być łatwo modyfikowane i mieszane z innymi nanocząsteczkami, dzięki czemu możemy korzystać z ich bogatych właściwości [2].

Część eksperymentalna: Próbki przygotowano mechanochemicznie mieląc składniki przez 3 minuty w młynku nożowym. Do określenia stężenia karotenoidów i antocyjanów odważono 1 g próbki do elenmajerki o objętości 250 mL. Dodano 10 mL acetonu dla karotenoidów oraz 100 mL 1% roztworu HCl dla antocyjanów. Stężenie określono przy pomocy UV-VIS przy długości fali 449 oraz 510 nm [3-4]. Stężenie witaminy C określono przy pomocy metody 2,4-DNPH [5]. Sprawdzono wielkość cząstek przy użyciu aparatu Mastersizer 2000 firmy Malvern metodą statycznego rozproszenia światła. Zbadano również potencjał dzeta ζ przy pomocy aparatu Zetasizer Nano series (Nano-ZS90). Mierzono wartości w NaCl w zakresie pH od 2 do 11.

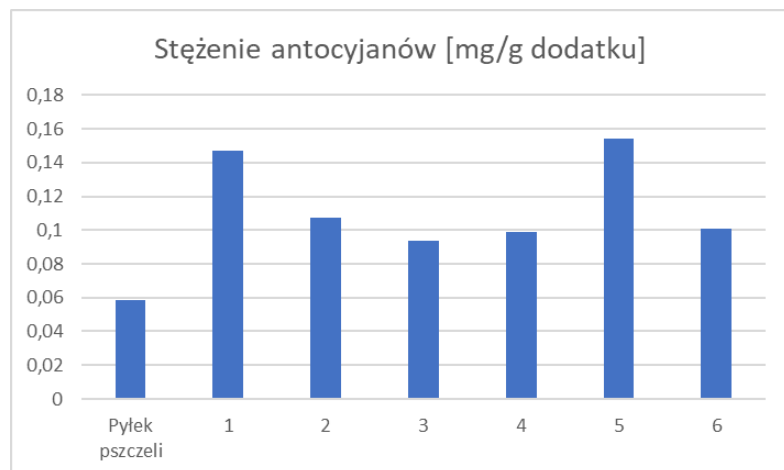
Wyniki: Badania zarówno stężenia karotenoidów, antocyjanów jak i witaminy C dostarczają nam satysfakcjonujących wyników. Dla niektórych próbek możemy zauważyć nawet 2 razy większe uwalnianie związków organicznych w porównaniu z wyjściowym pyłkiem pszczelim. Składy wybranych próbek przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Skład procentowy próbek.

Nr próbki	Glinka zielona, %	Glinka zielona wypalona w 200°C, %	Hydroksyapatyt, %	Krzemionka, %	TiO ₂ , %	ZnO, %	Pyłek pszczeleli, %
1	67	-	-	3	-	-	30
2	-	70	-	-	-	-	30
3	-	65	5	-	-	-	30
4	-	67	-	3	-	-	30
5	-	62	5	3	-	-	30
6	-	67	-	-	-	3	30



Rys. 1. Stężenie karotenoidów w próbkach.



Rys. 2. Stężenie antocyjanów w próbkach.

Po przeanalizowaniu wielkości cząstek i rozkładu potencjału dzeta ζ możemy upewnić się o strukturze nanokompozytów oraz ich stabilności w zależności od pH.

Wnioski: Mając ogłęd na wyniki analiz zsyntezowanych kompozytów możemy jednoznacznie zauważyć, że wydzielanie się dobroczynnych związków z dodatków organicznych ulega znacznemu polepszeniu. Dalsze prace nad poprawą stabilności i wielkością cząstek mogą zapewnić jeszcze lepsze wyniki, co pozwoli na zastosowanie w wielu dziedzinach życia tj. medycyna, farmacja czy branża kosmetyczna.

Literatura:

1. L.B. Almeida-Muradian, L.C. Pamplona, S. Coimbra, O.M. Barth, J. Food Compos. Anal., 18 (2005).
2. I. Protsak, V.V. Paientko, O.I. Oranska, Yu. I. Gornikov, P.A. Prokhnenko, S.A. Alekseev, L.M. Babenko, N.A. Liedienov, A.V. Pashchenko, G.G. Levchenko, V.M. Gun'ko, Colloid. Surf. A, 586 (2020).
3. A.K. Biswas, J. Sahoo, M.K. Chatli, LWT - Food Sci. Technol., 44 (2011).
4. A. Bosacka, V.V. Paientko, R.B. Kozakevich R.B., A.K. Matkovsky, V.M. Gun'ko, A. Derylo-Marczewska, «PLANTA+. НАУКА, ПРАКТИКА ТА ОСВІТА», 1 (2022).
5. M.M. Rahman Khan, M.M. Rahman, M.S. Islam, S.A. Begum, J. Biol. Sci., 6 (2006).

FILMY ALGINIANOWE DO ZASTOSOWAŃ ŚRODOWISKOWYCH

A. WAWSZCZAK¹, J. BĄK¹, R. PANEK², D. KOŁODYŃSKA¹, ¹UMCS, Instytut Nauk chemicznych, Wydział Chemii, Katedra Chemii Nieorganicznej, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 2, 20-031 Lublin, ²Politechnika Lubelska, Wydział Budownictwa i Architektury Katedra Inżynierii Materiałów Budowlanych i Geoinżynierii, Nadbystrzycka 40, 20-618, Lublin

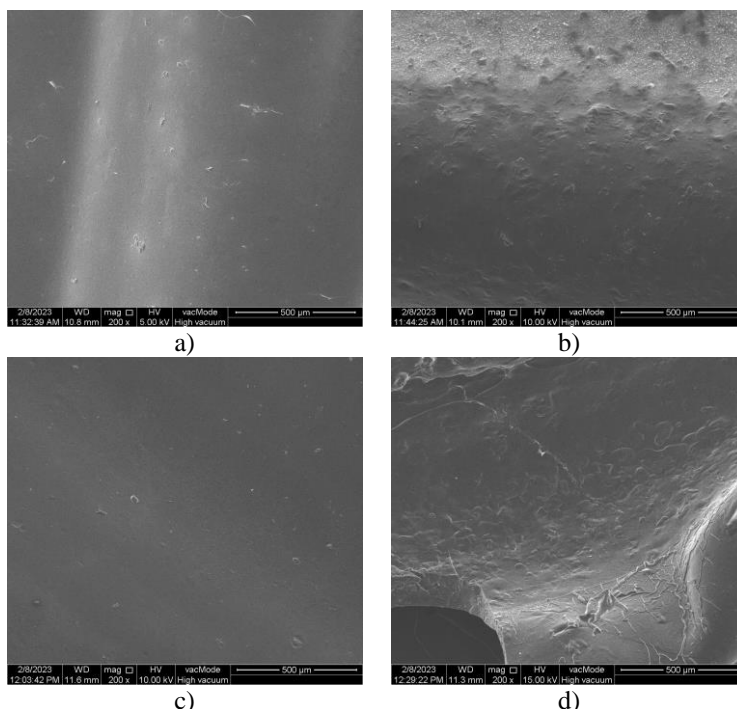
Abstrakt: Alginianowe filmy hydrożelowe to materiały o wszechstronnym zastosowaniu w szczególności w rolnictwie. Mają doskonałe właściwości, jako powłoka i polepszacz gleby, ponieważ mogą tworzyć barierę ochronną chroniącą uprawy i zapobiegającą degradacji gleby. Można je również wykorzystać do wzbogacenia gleby poprzez dostarczenie jej niezbędnych składników odżywczych, a także dzięki wyjątkowym właściwościom sorpcyjnym, do pochłaniania metali ciężkich. Opracowane hydrożelowe filmy alginianowe poddano modyfikacji celulozą i glikolem etylowym, a także przeprowadzono badania sorpcji kadmu(II). Otrzymane wyniki wskazują na fizyczną naturę sorpcji jonów Cd(II) oraz duży udział dyfuzji tych jonów do wnętrza porów, z kolei wyniki uzyskane z badań równowagowych na heterogeniczną powierzchnię filmów.

Wprowadzenie: Wkłady glebowe to skuteczny sposób na kontrolę i poprawę właściwości fizycznych i chemicznych gleby. Składają się z kilku warstw, z których każda pełni określoną funkcję. Jedną z nich jest warstwa hydrożelowa, która pełni rolę w zatrzymywaniu wody, ale także dostarczaniu składników poprawiających, jakości gleby i zatrzymywaniu jonów metali. Takie wkłady pomagają poprawić strukturę i drenaż gleby, a także chronią rośliny przed suszą i ekstremalnymi temperaturami. Do otrzymania warstwy hydrożelowej można z powodzeniem zastosować alginiany. Alginiany to grupa naturalnych polisacharydów, które są pozyskiwane z wodorostów. Żel, który tworzy się po rozpuszczeniu alginianów w wodzie jest biokompatybilny, biodegradowalny i ma wysokie właściwości zatrzymywania wilgoci [1]. Dobór odpowiednich parametrów syntezy pozwala na uzyskanie wielofunkcyjnych warstw alginianowych przypominających filmy, których właściwości można zmieniać w zależności od wybranego modyfikatora [2]. Tak otrzymane filmy stanowią potencjalne rozwiązanie problemu, dotyczącego stabilności gleby poprzez zapobieganie jej erozji. Dodatkowo stanowią osłonę, która z jednej strony zapobiega utracie składników odżywczych a z drugiej zbyt szybkiemu zagęszczaniu i wysychaniu gleby [3]. Co więcej, hydrożel alginianowy może adsorbować jony metali ciężkich i zapobiegać ich wymywaniu do gleby. Wobec powyższego, podjęto próbę zsyntezowania hydrożelowych filmów na bazie alginianu wapnia oraz ich modyfikacji celem poprawienia zdolności sorpcyjnych. W trakcie eksperymentu zbadano wpływ dodatków do alginianu wapnia takich jak: glikol etylenowy (EG), celuloza (CE) oraz ich mieszaniny (EG+CE) na wydajność sorpcji jonów Cd(II). Otrzymane filmy oznaczono: ALG (film z alginianu wapnia), ALG+CE (film z alginianu wapnia modyfikowany celulozą), ALG+EG (film z alginianu wapnia

modyfikowany glikolem etylenowym), ALG+CE+EG (film z alginianu wapnia modyfikowany celulozą i glikolem etylenowym).

Część eksperymentalna: Opracowano syntezę okrągłych filmów alginianowych, oraz proces ich modyfikacji. Przygotowano roztwory alginianu sodu o stężeniu 5%, które przeniesiono do okrągłych form. Roztwory poddano sieciowaniu jonami wapnia. Modyfikacje wykonano wykorzystując takie dodatki jak glikol etylenowego (EG), celulozę (CE) oraz mieszaninę EG+CE. Otrzymane materiały zostały scharakteryzowane i porównane pod kątem właściwości powierzchniowych oraz zdolności sorpcyjnych w kierunku usuwania jonów kadmu z roztworów modelowych, w zakresie stężeń 10 - 100 mg/L.

Wyniki: Wszystkie otrzymane filmy charakteryzowały się względnie gładką powierzchnią w centrum filmu oraz wyraźnymi zgrubieniami na granicach filmu. Efekt ten jest związany z występującymi silnymi siłami kapilarnymi roztworu alginianu sodu w skutek, czego roztwór wykazuje wysoką lepkość. Podczas sieciowania alginianu dochodzi do kumulacji jonów wapnia(II) na granicy filmów i krystalizacji powstających soli. Zjawisko to zostało zobrazowane na zdjęciach mikroskopowych SEM. Jako, że obecność grubszych obszarów mogłaby spowodować zafałszowanie wyników sorpcji jonów kadmu(II), badanie te przeprowadzono na filmach bez zgrubień.



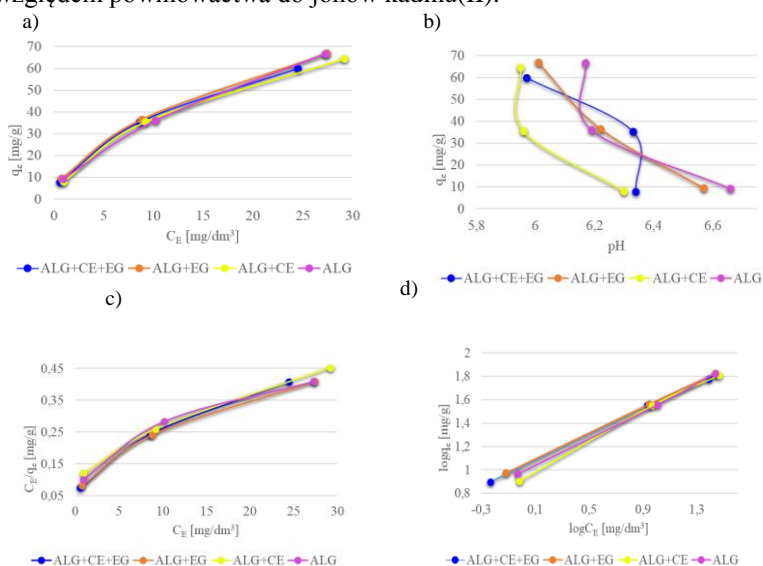
Rys. 1. Zdjęcia mikroskopowe SEM o powiększeniu x200 wykonane na granicy filmu: a) ALG, b) ALG+CE, c) ALG+EG, d) ALG+CE+EG.

Pojemności sorpcyjne, stałe poszczególnych modeli izoterm oraz współczynniki determinacji (korelacji liniowej) dla wszystkich prób zestawiono w tabeli 1. Współczynnik R^2 dla korelacji liniowej dla modelu Freundlicha mieściły się w zakresie 0,997-1,000 z kolei dla modelu Langmuira były one równe 0,926-0,980.

Tabela 1. Parametry równowagowe procesu sorpcji jonów Cd(II) na filmach alginianowych.

pH 5,85	Model Langmuira			Model Freundlicha		
	Q_0	K_L	R^2	n	K_F	R^2
ALG	89,62	0,09	0,926	1,72	9,56	0,997
ALG+CE	87,83	0,09	0,980	1,62	8,38	0,997
ALG+EG	84,99	0,12	0,957	1,83	10,98	1,000
ALG+CE+EG	74,23	0,15	0,963	1,83	10,62	0,999

Porównanie tych wartości wskazuje, że model Freundlicha najlepiej dopasowuje wyniki eksperymentalne w procesie sorpcji jonów kadmu(II) na wszystkich czterech filmach. Ponadto stwierdzono również, że wartości K_F dla tych filmów mieszczą się w zakresie od 8,38 do 10,62 L/g. Wynik ten wskazuje, że wszystkie filmy mają podobne właściwości pod względem powinowactwa do jonów kadmu(II).



Rys.2. Zestawienie wyników badań sorpcji jonów Cd(II) na filmach alginianowych a) zależności pojemności sorpcyjnej filmów alginianowych od stężenia równowagowego C_E , b) wpływ pH roztworów Cd(II) na pojemności sorpcyjne, c) izoterma Langmuira, d) izoterma Freundlicha adsorpcji jonów Cd(II).

Analiza otrzymanych wartości parametrów kinetycznych badanych modeli dla sorpcji jonów Cd(II) wykazała, że dla wszystkich typów filmów najlepsze dopasowanie wykazuje model kinetyczny pseudo-pierwszego rzędu, co świadczy o dominującej fizycznej naturze sorpcji. Jednakże należy zwrócić uwagę na wartości współczynników korelacji R^2 dla modelu dyfuzji wewnątrzcząstkowej. Na ich podstawie stwierdzono, że etapy pierwszy i drugi dyfuzji jonów Cd(II) na filmach ALG, ALG+CE, ALG+EG

i ALG+CE+EG mają znaczący wpływ na szybkość tego procesu. Pierwszy etap dyfuzji wewnątrzcząstkowej obejmuje dyfuzję jonów kadmu(II) na granicy faz roztwór – film. Kolejny etap odpowiada za procesy związane z dyfuzją jonów do wnętrza porów obecnych w filmach. Po około 300 min zaobserwowano, że układ osiąga stan równowagi, w związku z powyższym wykluczono możliwość występowania trzeciego etapu dyfuzji wewnątrzcząstkowej.

Tabela 2. Parametry kinetyczne modeli pseudo-pierwszego rzędu (PFO), pseudo-drugiego rzędu (PSO) i dyfuzji wewnątrzcząstkowej (IPD) dla procesu sorpcji jonów kadmu(II) na filmach alginianowych.

Model kinetyczny	Parametry kinetyczne	ALG	ALG+CE	ALG+EG	ALG+CE+EG
PFO	q_1	87,60	81,36	84,06	78,73
	$k_1 \times 10^{-2}$	1,059	1,865	2,050	1,110
	R^2	0,962	0,993	0,909	0,938
PSO	q_2	87,60	81,36	84,06	78,73
	$k_2 \times 10^{-2}$	0,033	0,001	3,715	0,018
	R^2	0,777	0,885	0,768	0,899
IPD	q_2	87,60	81,36	84,06	78,73
	ki_1	9,003	8,573	9,287	7,329
	ki_2	2,109	2,661	3,370	2,209
	R^2	0,983	0,975	0,998	0,984
	R^2	0,966	0,997	0,987	0,981

Wnioski: Wszystkie otrzymane filmy wykazywały wzrost pojemności sorpcyjnych jonów kadmu(II) ze wzrostem jego stężenia. Izoterma, która najlepiej opisuje sorpcję jonów Cd(II) na wszystkich otrzymanych filmach to izoterma Freundlicha. Szybkość procesu sorpcji ma naturę fizyczną, a etapy, które ją limitują to etap dyfuzji jonów Cd(II) na granicy faz roztwór – film a także etap dyfuzji jonów Cd(II) do wnętrza porów. Przeprowadzone badania równowagowe oraz kinetyczne potwierdziły wysoką skuteczność usuwania jonów kadmu(II) na otrzymanych filmach, co stanowi obiecującą podstawę do kontynuacji tych badań w przyszłości.

Literatura:

1. D. Kothale, U.Verma, N. Dewangan, P. Jana, A. Jain, D. Jain, Curr. Drug Deliv., 17 (2020) 755.
2. I. Liakos, L. Rizzello, I.S. Bayer, P.P. Pompa, R. Cingolani, A. Athanassiou, Carbohydr. Polym., 92 (2013) 176.
3. S. Ahn, J. E. Ryou, K. Ahn, C. Lee, J. D. Lee, J. Jung, Materials, 14 (2021) 2743.

SKŁAD POKARMU WYDRY W OTULINIE POLESKIEGO PARKU NARODOWEGO

J. GÓRSKA, J. SITARSKI, J. NOWOSAD, J. TOMASIK, A. GRYBOŚ,
A. BARTKOWSKA, W. PŁASKA, UP, Wydział Biologii Środowiskowej, Katedra
Hydrobiologii i Ochrony Ekosystemów, ul. Dobrzańskiego 37, 20-262 Lublin

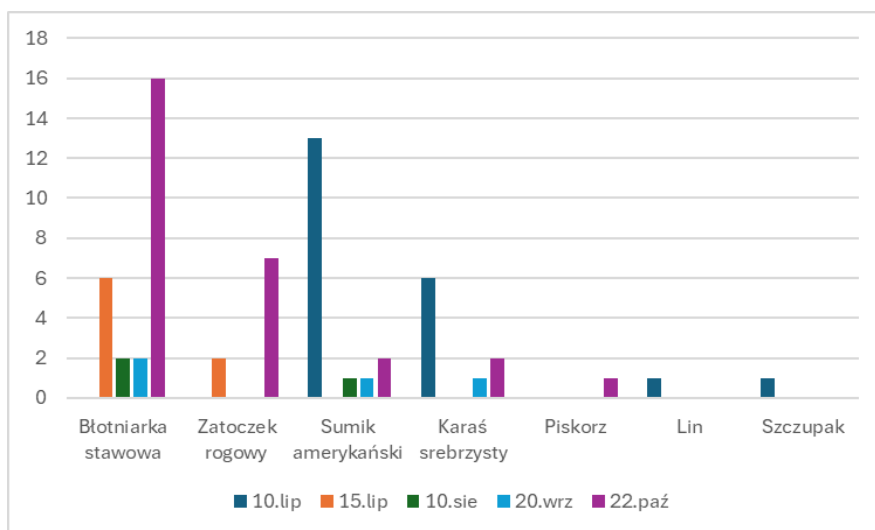
Abstrakt: Celem pracy była próba określenia roli wydry w ograniczeniu występowania gatunków inwazyjnych ryb. Poznanie roli wydry w ograniczaniu populacji sumika w otulinie PPN gdzie gatunek ten bardzo się rozprzestrzenił, pozwoli na poznanie interakcji jakie zachodzą pomiędzy rodzimymi drapieżnikami, a gatunkami inwazyjnymi. Wiedza ta ma istotne znaczenie dla ograniczenia ekspansji obcych gatunków ryb na obszarze Polski. Badania prowadzono w otulinie Poleskiego Parku Narodowego w okresie od dnia 10.07.2023 roku do dnia 22.10.2023 roku, kiedy wykonywano obserwacje terenowe polegające na odnajdywaniu pozostałości pokarmu (znakowań) wydry na wyznaczonym terenie badań. Analiza szczątków i pozostałości po pokarmie wydry w próbach odchodów wykazał obecność kilku kategorii (grup) pokarmów należących do organizmów z różnych gromad tj.: skorupiaków, mięczaków oraz ryb. Obserwacje wykazały, że podstawowym składnikiem diety wydry na badanym terenie są ryby, których udział był nieco wyższy niż pozostałe grupy pokarmów. Znaczący udział miały także mięczaki. Na podstawie analizy prób można stwierdzić, że wydry na obszarze Poleskiego Parku Narodowego mogą w pewnym stopniu kontrolować liczebność gatunków inwazyjnych i obcych ryb, w tym sumika karłowatego.

Wprowadzenie: Niekorzystne przemiany klimatyczne powodują zmniejszenie dostępności pokarmu dla wydr, ponieważ obniżenie się poziomu wody w rzekach powoduje zmiany w populacji ryb. Spadek poziomu wody w potencjalnych miejscach żerowania wydr skutkuje przewagą małych gatunków ryb oraz znacznym zmniejszeniem ich ilości. W rezultacie rzeki te nie dostarczają wydr wystarczającej ilości pożywienia, gdyż dorosła wydra codziennie potrzebuje od 1200 do 1800 gramów jedzenia. Zmniejszenie się dostępu do pożywienia może prowadzić do zwiększenia konkurencji wśród populacji wydr, ponieważ zmusza je do koncentracji na obszarach, gdzie jest więcej jedzenia. To z kolei prowadzi do zmniejszenia powierzchni obszarów terytorialnych dla każdej wydry, co z kolei rodzi konflikty między nimi. Konieczność migracji zwiększa także ryzyko kolizji wydr z pojazdami. Dlatego istotne jest zbadanie, jakie mogą być alternatywne źródła pożywienia dla wydr, co pozwoliłoby im przetrwać trudny okres w swoich dotychczasowych miejscach życia bez konieczności migrowania.

Część eksperymentalna: Odchody i pozostałości pokarmu zbierano wzdłuż biegu cieków oraz brzegów jezior i pakowano osobno do woreczków strunowych, po czym zamrażano. Następnie były one rozmrażane i rozmaczane, a następnie płukane wodą oraz suszone celem wybrania pozostałości pokarmu. Przed wysuszeniem usuwano nadmiar pozostałości roślinnych i innych zanieczyszczeń pobranych przypadkowo wraz z odchodami wydry. Następnie określana była przynależność taksonomiczna. Otrzymany materiał segregowano na frakcje, a następnie oznaczano przy pomocy odpowiednich

kluczy lub korzystano z gotowych preparatów i dostępnych zbiorów kości. Oznaczeń dokonywano poprzez analizę poszczególnych szczątków i resztek pokarmu przy użyciu lupy binokularowej.

Wyniki: Podstawą pokarmu wydry, jako gatunku prowadzącego ziemno-wodny tryb życia, są organizmy wodne i niektóre lądowe, występujące w bezpośrednim sąsiedztwie cieków, zbiorników wodnych bądź w innych podmokłych ekosystemach. Liczne opracowania dotyczące diety tego drapieżnika wyraźnie podkreślają, że ryby stanowią podstawowe źródło jego pożywienia. Badania przeprowadzone na obszarze Poleskiego Parku Narodowego potwierdzają tę prawidłowość. W badaniach bazy pokarmowej wydr na podstawie analizy odchodów na obszarze Poleskiego Parku Narodowego w badanym okresie zaobserwowano mniej liczny udział mięczaków oraz skorupiaków. Zaobserwowano szczątki błotniarek stawowych oraz sporadycznie spotykane zatoczki rogowe. Prawdopodobnie wynika to z faktu obecności bardzo dobrej bazy pokarmowej w postaci ryb, w tym między innymi licznej obecności w pokarmie gatunków inwazyjnych tzn. sumika amerykańskiego oraz karasia srebrzystego.



Rys. 1. Liczebność poszczególnych gatunków stanowiących bazę pokarmową wydry.

Wnioski: Na podstawie analizy odchodów można stwierdzić, że wydry na obszarze otuliny Poleskiego Parku Narodowego mogą w pewnym stopniu kontrolować liczebność gatunków inwazyjnych i obcych ryb, w tym sumika karłowatego. W badanym okresie inne grupy nie stanowiły alternatywnej bazy pokarmowej dla wydry, co prawdopodobnie związane jest z dużą dostępnością ryb. Analiza wpływu nasilających się zmian klimatycznych na ekosystemy hydrogeniczne, a pośrednio na bazę pokarmową wydry oraz jej siedlisko wymaga długoterminowych badań monitoringowych i pomocna może być w zarządzaniu ochroną tego gatunku.

Literatura:

1. J.M. Weber. Seasonal exploitation of amphibians by otters (*Lutra lutra*) in north-east Scotland., J. Zool., London, 1990.
2. W. Czarniawski, R.Gosik, D. Sałapa, A.Różycki, Plazy Poleskiego Parku Narodowego. Siedliska - rozmieszczenie - ochrona. Amphibians of Poleski National Park. Habitats - distribution - conservation. Wyd. Mantis, Olsztyn, 2014.
3. T. Chmielewski, J. Szymański, J. Weigle, A. Curie-Skłodowskiej, U.M. (Eds.). Poleski Park Narodowy: dziedzictwo i przyszłość. Wydawnictwo Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin, 2020.
4. M. Clavero, J. Prenda i M.Delibes, J. Biogeogr. Huelva, 2003.
5. J.M.Webb, Otter spraint analysis. An Occasional Publication, London, 1976.
6. W. Engelmann, J. Fritzsche, R. Unther, F. Obst. Lurche und Kriechtiere Europas [Amphibians and reptiles of Europe]. Neumann Verlag, Leipzig, 1985.
7. Z. Głowaciński, P.Sura. Atlas płazów i gadów Polski: status-Rozmieszczenie-Ochrona, z kluczami do oznaczania, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa, 2018.
8. L. Horoszewicz, Wartość kości gardłowych dolnych (ossa pharyngea inferiora) jako kryteriów gatunkowego oznaczania ryb karpiowatych (Cyprinidae), Roczniki Nauk Rolniczych, 1960.
9. B.Jędrzejewska, V. Sidorovich, M. Pikulik, W.Jędrzejewski, Ecography, 24 (2001) 165.
10. W. Janec-Susłowska, Osteologia szczupaka, PWN, Warszawa, 1957.
11. P. Jurajda, V. Prásek, K.Roche, Folia Zoologica, The autumnal diet of otter (*Lutra lutra*) inhabiting four streams in the Czech Republic, 1996.
12. J. Kłoskowski, International Journal of Mammalian Biology, 2 (1999) 201.
13. J. Kłoskowski, Otter *Lutra lutra* damage at farmed fisheries in southeastern Poland. I: an interview survey. Wildlife Biology, 2005.
14. J. Kłoskowski, Human –wildlife conflicts at pond fisheries in eastern Poland: perceptions and management of wildlife damage, 2005.
15. A. Krawczyk, M. Skierczyński, P. Tryjanowski, Diet of the Eurasian otter *Lutra lutra* on small watercourses in Western Poland. Mammalia, 2011.
16. J. Lanszki, S. Körmendi, C.Hancz. Effects of Habitat Changes on the otters' Habitat using Trophic Niche Breadth and Relative Abundance at an Eutrophic Fish Pond. IUCN/SSC Otter Specialist Group Bulletin 19(A)-Proc. VIIIth International Otter Colloquium, 1998.
17. R.Libois, C.Hallet-Libois, L. Lafontaine, Le regime de la loutre *Lutra lutra* en Bretagne interieure. Revue d Ecologie, Paris, 1987.
18. Z. Pucek, Keys to vertebrates of Poland: Mammals. Mammal Research Institute Polish Academy of Sciences, Warsaw, 1981.
19. J.Romanowski Monitoring of the Otter recolonisation of Poland – *Hystrix* It. J. Mamm (n.s.), 2006.

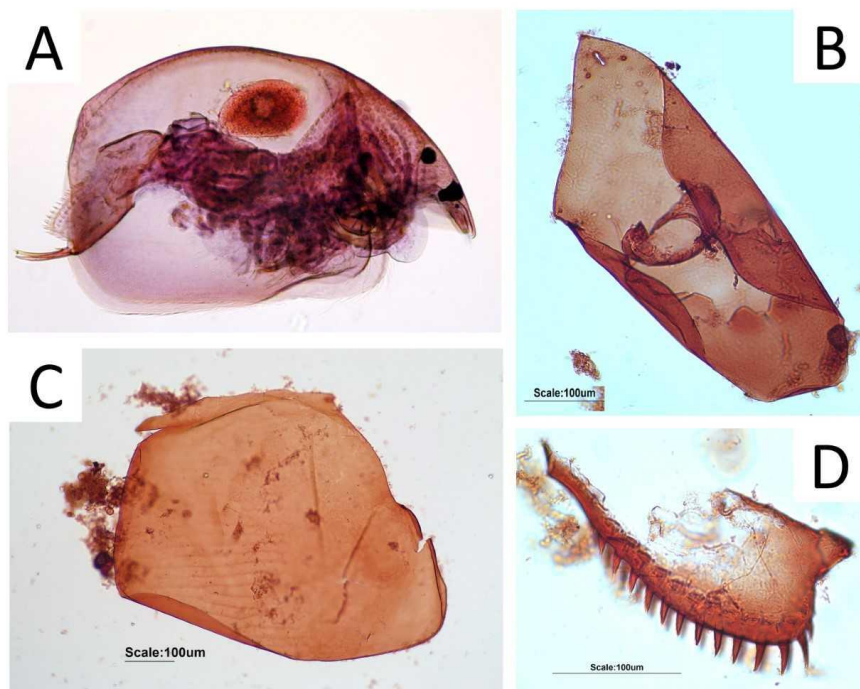
ANALIZA WIOŚLARKOWA (CLADOCERA) OSADÓW JEZIORNICH - CHITYNOWY WEHIKUŁ CZASU PALEOLIMNOLOGA

K. BURDZY^{1,2}, **M. SUCHORA**¹, ¹UMCS, Katedra Geomorfologii i Paleogeografii, Instytut Nauk o Ziemi i Środowisku, Wydział Nauk o Ziemi i Gospodarki Przestrzennej, al. Kraśnicka 2d, 20-718 Lublin, ²UMCS, Katedra Chemii Nieorganicznej, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 2, 20-031 Lublin

Abstrakt: Osady jeziorne stanowią cenne archiwum wiedzy na temat zmian środowiska przyrodniczego. Analiza ich składu, układu warstw, a także zachowanych w nich szczątków organizmów dostarcza wielu informacji o przemianach tych ekosystemów pod wpływem czynników zarówno naturalnych jak i antropogenicznych. Często pozwala także zidentyfikować moment pojawienia się człowieka na danym terenie oraz sposób i intensywność gospodarowania. Organizmy takie jak bezkręgowce są coraz częściej postrzegane jako istotne elementy biologiczne znajdujące zastosowanie w ocenie stanu ekologicznego jezior. Wśród nich duże znaczenie posiadają wioślarki (Cladocera), będące głównie słodkowodnymi skorupiakami planktonowymi. Ich twarde chitynowe pancerzyki, zachowujące się w dobrym stanie w osadach jeziornych przez tysiące lat, pozwalają na zastosowanie analizy wioślarkowej do śledzenia zmian środowiska przyrodniczego w przeszłości, w tym eutrofizacji wód, zakwaszenia, zmian poziomu wody czy temperatury.

Wprowadzenie: Wioślarki (Cladocera), należące do skorupiaków (Crustacea) z gromady skrzelonogów (Branchiopoda), to żyjące niemal na wszystkich kontynentach organizmy liczące około 600 gatunków (w Polsce sklasyfikowanych jest około 100). Do najbardziej znanych przedstawicieli Cladocera należą gatunki z rodziny rozwielitek (Daphniidae). Wioślarki charakteryzują się małymi rozmiarami ciała, w większości do 1 mm. Pokryte są dwuklapowym chitynowym pancerzykiem, który może przetrwać w osadach wiele tysięcy lat nie tracąc cech umożliwiających identyfikację gatunkową (rys. 1). Występują w wodach słodkich, zarówno w strefie przybrzeżnej, jak i w strefie wody otwartej, jednak rozpoznanych zostało także kilka gatunków mogących żyć w wodach słonych [1]. Ze względu na sposób odżywiania większość gatunków to filtratory, a ich głównym pożywieniem są glony, bakterie i drobna zawiesina organiczna. Znane są także nieliczne gatunki drapieżne, których przykładem może być *Leptodora kindtii*, będący jednocześnie jednym z największych gatunków Cladocera, osiągającym długość 18 mm. Wioślarki mogą rozmnażać się partenogenetycznie, gdy warunki środowiskowe są sprzyjające lub płciowo, gdy następuje ich pogorszenie, wytwarzając jaja przetrwalnikowe – efpia, zdolne do przetrwania dziesiątki czy setki lat nawet bez obecności wody. Ze względu na swoje cechy charakterystyczne szczątki wioślarek, zachowane w osadach jeziornych, mogą być dokładnie oznaczane do poziomu rodzaju lub gatunku. Z kolei zróżnicowane preferencje siedliskowe i wrażliwość poszczególnych gatunków na zmiany parametrów środowiska, czynią je swoistymi indykatorami. W ten sposób możliwe jest wyciągnięcie wniosków na temat zmian temperatury (klimatu), żyżno-

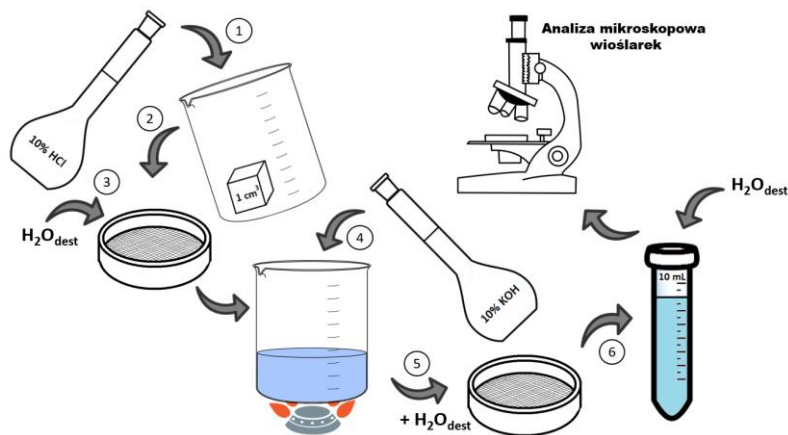
ści wód (trofii), ich poziomu, zakwaszenia (pH) czy obecności roślinności wodnej lub dominacji organicznego czy piaszczystego podłoża [2].



Rys. 1. A – wioślarka z rodzaju *Alona* sp. (cały osobnik); B-D subfosylne szczątki (B – tarczka głowowa *Alona affinis*; C – połowa skorupki tułowiowej *Alona quadrangularis*; D – postabdomen *Alona affinis*) [1].

Opracowane zostały modele (ang. transfer functions) określające zależność pomiędzy średnią temperaturą powietrza a zespołami Cladocera w osadach, co pozwoliło m.in. na rekonstrukcję temperatur panujących w późnym glacie na terenie Szwajcarii (badania jeziora Gerzensee), Finlandii czy terenach wschodniej Polski [3, 4]. Wskaźnikiem powszechnie stosowanym do oceny poziomu wód na podstawie analizy wioślarkowej jest stosunek form planktonowych do litoralnych (P/L) [5]. Wykazywano, że wskaźnik ten może ulegać zmianom, które nie są powodowane przez zmiany poziomu wody, ale przez wzrost trofii jeziora lub zmiany w łańcuchu pokarmowym. Jest on również zależny od wielkości strefy litoralnej. Cladocera wykazują wysoką wrażliwość na zmiany parametrów środowiska. Warunki tlenowe i obecność roślinności wodnej, będące następstwem wysokiej żyzności wód, wpływają na populację wioślarek. Na podstawie analizy zachowanych w osadach szczątków możliwe jest odtworzenie zmian żyzności jezior [6]. Znanne są bowiem gatunki niemal niewystępujące w wodach eutroficznych oraz takie, które dobrze przystosowały się do życia w nich. Opracowane zostały także zależności pomiędzy zawartością fosforu całkowitego (TP) a różnorodnością tych organizmów [7]. Wśród Cladocera można wyróżnić gatunki wrażliwe na zmiany pH zbiornika. *Daphnia longispina* oraz *Bosmina longirostris* to przykładowe gatunki, których zanik przy jednoczesnym wzroście *Alona guttata*, *Alonella exigua*, *Alonella excisa*, *Alonella nana* oraz *Bos-*

mina (E.) longispina może wskazywać na zakwaszenie środowiska [2]. Na podkreślenie zasługuje jednak fakt, iż jako że wioślarki są organizmami wrażliwymi na wiele czynników, trudno jest określić ten jeden właściwy, mający wpływ na liczebność ich populacji. Dlatego istotne jest równoległe zastosowanie także innych wskaźników (proxy) i metod do rekonstrukcji środowiska (podejście multi-proxy). Do analizy wioślarkowej niezbędne jest pobranie 1-2 cm³ osadu, który następnie poddawany jest procedurze chemicznego oczyszczania (rys. 2). Metoda ta pozwala na uzyskanie zawiesiny, w której obecne są głównie szczątki wioślarek. Próbkę osadu przemywana jest w pierwszej kolejności 10% roztworem kwasu chlorowodorowego, a następnie wodą destylowaną. W kolejnym etapie zalewana jest 10% roztworem wodorotlenku potasu i powoli doprowadzana do wrzenia. Po wystudzeniu tak przygotowana próbka przemywana jest na sicie wodą destylowaną w celu pozbycia się pozostałości zasady oraz jak największej ilości zanieczyszczeń. Osad pozostający na sicie jest przenoszony ilościowo do skalowanych próbek typu Falcon i uzupełniany do objętości 10 mL wodą destylowaną. Otrzymana opisaną metodą oczyszczona próbka może być poddana mikroskopowej analizie składu gatunkowego Cladocera. W celu poprawy widoczności elementów budowy organizmów do próbek przed obserwacją mikroskopową dodawana jest niewielka ilość safraniny zmieszanej z gliceryną. Mieszanina ta nadaje analizowanym szczątkom różową barwę. 0,1 mL zawiesiny nanoszone jest na szkiełko podstawowe i przykrywane szkiełkiem nakrywkowym. Tak przygotowany preparat analizowany jest pod mikroskopem z zastosowaniem powiększenia od 100 do 400x. Liczbę wszystkich szczątków wioślarek obecnych w całym preparacie zlicza się z podziałem na gatunki. Aby analiza była uznana za miarodajną wymagane jest zliczenie minimum 70-100 szczątków, co odpowiada od 1 do 4 preparatów [8]. Posiadając te dane można w prosty sposób przeliczyć ilość osobników obecnych w próbce.



Rys. 2. Schemat procedury oczyszczania zawiesiny do analizy wioślarkowej.

Chitynowe pancerzyki Cladocera stanowią materiał do analizy izotopów stabilnych węgla i azotu. Wyniki tych analiz wykorzystywane są do wnioskowania o przeszłych zmianach w łańcuchach pokarmowych jezior. Problematicznym zagadnieniem mogłaby wydawać się kwestia masy próbki do analizy, bowiem organizmy te posiadają niewielkie rozmiary, a w osadach ich populacja może być nieliczna. Innym aspektem jak również

fakt, że jedyną pozostałością po Cladocera są chitynowe fragmenty egzoszkieletu, nie zaś całe ciała. Badania wykazały jednak, że wymagania dotyczące masy zwykle mogą zostać spełnione, a skład izotopów C i N w okrywach wioślarek jest powiązany ze składem całego ich ciała [9, 10].

Wnioski: Wioślarki, niepozorne skorupiaki o niewielkich rozmiarach jako swoiste bio-indykatory pozwalają na analizę zmian wielu parametrów środowiskowych, takich jak temperatura, żyzność wód, ich poziom, zakwaszenie (pH), obecność roślinności wodnej czy dominacja organicznego lub piaszczystego podłoża. Ponadto chitynowe pancerzyki Cladocera umożliwiają ich analizę nawet po wielu tysiącach lat. Prosta metoda przygotowania próbek, brak konieczność zastosowania skomplikowanej i drogiej aparatury czyni analizę wioślarkową nieocenionym narzędziem w badaniach zmian środowiska, następujących zarówno naturalnie, jak i za sprawą oddziaływań człowieka.

Literatura:

1. J.I. Rybak, L.A. Błędzki, Słodkowodne skorupiaki planktonowe, Wydawnictwa Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa, 2010.
2. A. Korhola, M. Rautio, Cladocera and other branchiopod crustaceans, (w:) J.P. Smol, H.J.B. Birks, W.M. Last (red.) Tracking Environmental Change Using Lake Sediments, Zoological Indicators, Dordrecht, 4 (2001).
3. A.F. Lotter, H.J.B. Birks, W. Hofmann, A. Marchetto, J. Paleolimnol., 18 (1997) 395.
4. I. Zawiska, M. Słowiński, A. Correa-Metrio, M. Obremska, T. Luoto, L. Nevalainen, M. Woszczyk, K. Milecka, Catena, 126 (2015) 1.
5. W.P. Mueller, Invest. Indiana Lake. Stream., 1 (1964) 1.
6. I. Zawiska, I. Dimante-Deimantovica, T.P. Luoto, M. Rzedkiewicz, S. Saarni, N. Stivins, W. Tylmann, A. Lanka, M. Robeznieks, T. Jilbert, Water, 12 (2020) 1459.
7. K.P. Brodersen, M.C. Whiteside, C. Lindegaard, Can. J. Fish. Aquat., 55 (2011) 1093.
8. J. Kurek, J.B. Korosi, A. Jeziorski, J.P. Smol, J. Paleolimnol., 44 (2010) 603.
9. M. Van Hardenbroek, O. Heiri, A.F. Lotter, J. Paleolimnol., 44 (2010) 721.
10. M.-E. Perga, J. Paleolimnol., 44 (2010) 387.

MAPA WYSTĘPOWANIA ANTYBIOTYKOOPORNYCH SZCZEPÓW BAKTERII NA PLACACH ZABAW W LUBLINIE

A. BIŁOKINNA¹, R. ŁOPUCKI², K. ZIELIŃSKI³, M. SKOWRONEK², I. SADOK⁴, ¹KUL, Wydział Medyczny, ul. Konstantynów 1H, 20-708 Lublin, ²KUL, Wydział Medyczny, Instytut Nauk Biologicznych, Katedra Biomedycyny i Badań Środowiskowych, ul. Konstantynów 1J, 20-708 Lublin, ³KUL, Wydział Nauk Przyrodniczych i Technicznych, Instytut Matematyki, Informatyki i Architektury Krajobrazu, Katedra Informatyki Stosowanej, ul. Konstantynów 1J, 20-708 Lublin ⁴KUL, Wydział Medyczny, Instytut Nauk Biologicznych, Katedra Chemii, ul. Konstantynów 1J, 20-708 Lublin

Abstrakt: Celem pracy było opracowanie innowacyjnego narzędzia integrującego środowisko naukowe i społeczeństwo w wymianie informacji na temat lekoopornych patogenów na placach zabaw. Stworzono aplikację webową umożliwiającą monitorowanie bezpieczeństwa mikrobiologicznego w oparciu o interaktywną mapę Google. Aplikacja pozwala na zarządzanie danymi słownikowymi, informacjami o placach oraz szczegółami dotyczącymi próbek środowiskowych. Dzięki łatwemu dostępowi do informacji, rodzice i opiekunowie mogą świadomie wybierać miejsca zabaw dla dzieci, zwiększając zaangażowanie społeczeństwa w kwestie ochrony zdrowia publicznego.

Wprowadzenie: Place zabaw to miejsca tworzone w celu zapewniania dzieciom właściwego rozwoju psychoruchowego. Niestety, miejsca te, pomimo właściwego planowania, mogą czasami generować różnorodny ryzyko dla bezpieczeństwa użytkowników. Jednym z takich zagrożeń są antybiotykooporne bakterie, które stają się coraz większym problemem w otaczającym nas środowisku. Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe jest powszechnym problemem zdrowia publicznego, który dotyka ludzi na całym świecie. Niektóre patogenne bakterie, które kiedyś mogły być skutecznie leczone, obecnie coraz częściej uzyskują oporność na tradycyjnie stosowane terapie. Co więcej, pojawiają się bakterie niewrażliwe na prawie wszystkie obecnie dostępne antybiotyki, tzw. superbakterie [1]. Badania wykazują, że każdy element wyposażenia placu zabaw, z którym dzieci mogą mieć kontakt zarówno bezpośredni, jak i pośredni, może stanowić potencjalne źródło infekcji bakteryjnej [2]. Dodatkowo, gleba lub piasek – podłoża, z którymi dzieci często mają kontakt w trakcie zabawy - mogą także być rezerwuarem różnorodnych patogenów. Co ważne, dzieci są uważane za główną grupę ryzyka narażenia środowiskowego na patogeny, nie tylko dlatego, że są częstymi użytkownikami placów zabaw, ale także ze względu na wysoką częstość występowania geofagii (tj. spożycia piasku) oraz niedojrzałość ich układów immunologicznych, neurologicznych i trawiennych [3]. Wstępne badanie ankietowe wykonane w ramach niniejszego projektu. Celem pracy było stworzenie przyjaznego narzędzia do wymiany informacji między środowiskiem naukowym a społeczeństwem dotyczącym problemu narażenia na lekooporne patogeny.

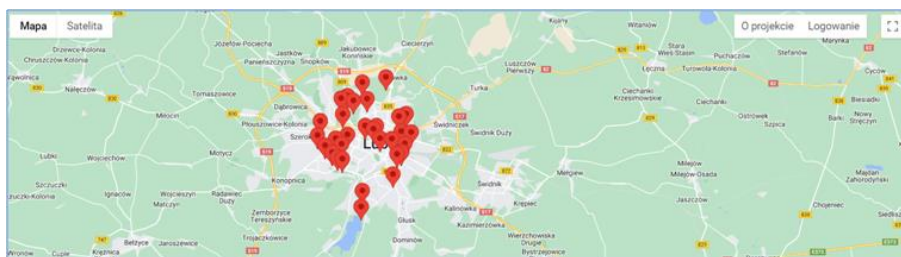
Część eksperymentalna: Próbkę mikrobiologiczną pozyskiwano z placów zabaw znajdujących się na terenie Lublina z użyciem sterylnych wymazówek z podłożem transpor-

towym. Próbkę zbierano z różnych elementów wyposażenia placów oraz z gleby i piasku. Zebrane bakterie namnażano i wysiewano na podłoża selekcyjne dedykowane dla następujących grup bakterii: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Pseudomonas* i *Staphylococcus*. Uzyskane izolaty identyfikowano z użyciem spektrometru MALDI-TOF/TOF ultraflex firmy Bruker Daltonik GmbH sterowanym z użyciem oprogramowania flexControl (wersja 3.4). Prawdopodobieństwo poprawności identyfikacji mikroorganizmu w oparciu o uzyskane widma mas oszacowano z wykorzystaniem oprogramowania MALDI BioTyper Compass (wersja 4.1). Zebrane w trakcie realizacji projektu dane zostały zwizualizowane przy pomocy aplikacji, która powstała jako oprogramowanie dedykowane. Specyfika danych sprawiła, iż nie istniała możliwość wykorzystania żadnego z ogólnodostępnych na rynku rozwiązań. Ze względu na wygodę użytkownika zdecydowano, iż oprogramowanie zostanie zrealizowane jako aplikacja webowa. Pierwszy etap wytwarzania dedykowanego oprogramowania polegał na zdefiniowaniu wymagań funkcjonalnych oraz нефункциональных systemu. W ramach projektu zdefiniowano wymagania funkcjonalne takie jak:

- możliwość wprowadzania, przechowywania i edycji danych słownikowych („antybiotyki”, „bakterie”, „dostępne atrakcje”, „materiały”);
- możliwość wprowadzania, przechowywania i edycji informacji o placach zabaw (nazwa, opis, współrzędne GPS);
- możliwość wprowadzania, przechowywania i edycji danych dotyczących zebranych próbek;
- wizualizacja lokalizacji placów zabaw z wykorzystaniem interaktywnej mapy;
- panel administratora – możliwość wprowadzania oraz edycji danych powinna być dostępna jedynie dla zalogowanego użytkownika.

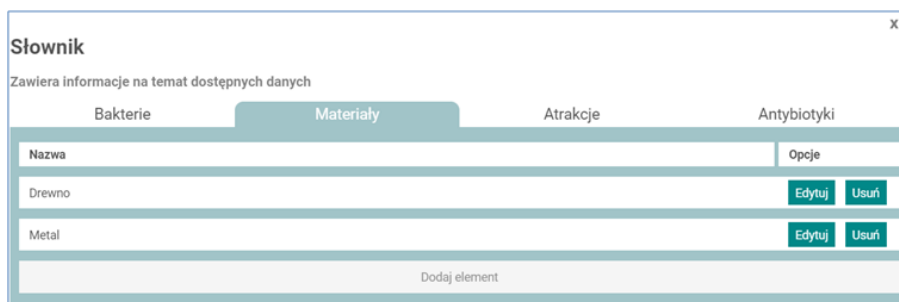
Zdefiniowano również wymagania нефункциональные: (1) intuicyjny interfejs, (2) działanie aplikacji na popularnych przeglądarkach. Po zdefiniowaniu wymagań funkcjonalnych i нефункциональных przystąpiono do implementacji aplikacji. Prace rozpoczęto od określenia stosu technologicznego zastosowanego w rozwiązaniu. Aplikację podzielono na dwie główne części. Pierwsza z nich – *frontend*, odpowiada za prezentację danych oraz umożliwia interakcję z użytkownikiem. Druga część – *backend*, ma za zadanie przetwarzanie danych oraz wykonywanie operacji na bazie danych. *Frontend* został zrealizowany przy użyciu frameworka Angular oraz z wykorzystaniem Google Maps API. Warstwa *backend* została opracowana z wykorzystaniem języka Java, frameworka Spring oraz relacyjnej bazy danych PostgreSQL. W ramach aplikacji backendowej przygotowano endpointy, które pozwalają na pobieranie danych (metoda get), aktualizację (metoda put) lub dodawanie (metoda post). Aplikacja frontendowa odwołuje się do udostępnionych endpointów, a następnie realizuje wizualizacje otrzymanych danych.

Wyniki: Ekran startowy aplikacji stanowi mapa Google, prezentująca lokalizacje placów zabaw (Rys. 1).



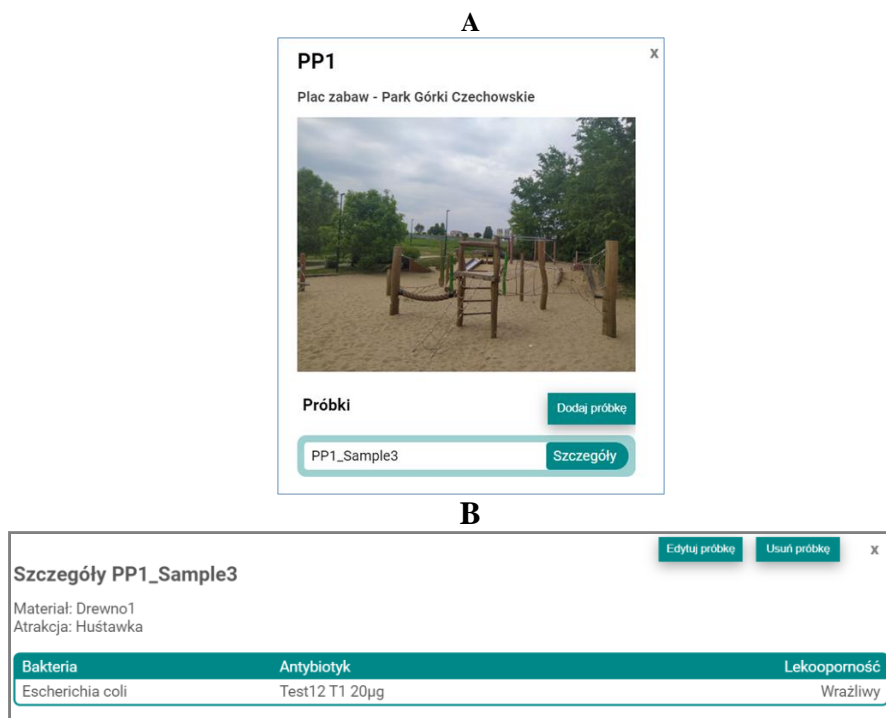
Rys. 1. Główny ekran aplikacji (mapa).

Dodatkowo w górnej części ekranu znajduje się przycisk, pozwalający na zalogowanie. Użytkownik posiadający odpowiednie uprawnienia posiada możliwość zarządzania danymi słownikowymi oraz danymi próbek (Rys. 2).



Rys. 2. Ekran zarządzania danymi słownikowymi.

Zastosowanie słowników („bakterie”, „materiały”, „atrakcje”, „antybiotyki”) wpływa na uproszczenie pracy operatora systemu. Dane do słowników wprowadzane są tylko raz. W późniejszych etapach pracy z systemem operator ma możliwość wybrania odpowiednich danych słownikowych z list. Dzięki wykorzystaniu słowników, w przypadku konieczności edycji jednego z elementów, wystarczy wykonać modyfikację na poziomie słownika. Dane zostaną automatycznie zaktualizowane w próbkach, w których został wykorzystany dany element. Kliknięcie na punkt na mapie sprawi, iż wyświetlone zostaną szczegóły dotyczące placu zabaw oraz powiązane z nim próbki (Rys. 3A). Przycisk „DODAJ PRÓBKĘ” jest widoczny tylko dla zalogowanego użytkownika. Po wybraniu próbki oraz kliknięciu na przycisk „SZCZEGÓŁY”, wyświetlone zostaną informacje o elementach placu zabaw z którego pobrano próbkę (typ oraz materiał, z którego zostały wykonane np. drewniana ławka), zidentyfikowanych gatunkach bakterii oraz ich wrażliwości na wybrane antybiotyki (Rys. 3B). Do bazy danych utworzonej aplikacji zostaną wprowadzone dane uzyskane w toku badań mikrobiologicznych i analizy MALDI-TOF MS. W szczególności mapa będzie informować o występowaniu bakterii t.j. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella* spp. Dla wyizolowanych szczepów tych gatunków bakterii poprowadzono również badania w kierunku wrażliwości na antybiotyki.



Rys. 3. (A) Ekran podglądu danych placu zabaw. (B) Ekran podglądu danych próbki.

Wnioski: Opracowana mapa dzięki dostępności w Internecie i przyjaznemu interfejsowi pozwoli na szybkie uzyskiwanie informacji o bezpieczeństwie mikrobiologicznym na miejskich placach zabaw. Zainteresowani rodzice i opiekunowie dzieci będą mogli sprawdzać, czy wykorzystywane przez nich place zabaw były poddawane badaniu oraz jakie bakterie zostały tam stwierdzone. Pozwoli to na szerszy udział społeczeństwa w inicjowaniu badań monitoringowych lub innych działań prewencyjnych odnośnie zdrowia publicznego.

Praca została przygotowana w ramach projektu Ministra Edukacji i Nauki w ramach Programu „Studenckie koła naukowe tworzą innowacje” (nr SKN/SP/570395/2023).

Literatura:

1. D. Caliskan, Z. Bakkaloğlu, Y. Numanoglu Cevik, S. Suzuk Yildiz, B. Kaskatepe, Microb Pathog., 159 (2021) 105155.
2. S. Ayan, Life Sci. J., 10 (2013) 2884.
3. C. Orden, C. Neila, J.L. Blanco, S. Álvarez-Pérez, C. Harmanus, E.J. Kuijper, M.E García, Zoonoses Public Health, 65 (2018) 88.

MIKRO- I NANOPLASTIKI W ŚRODOWISKU – ZAGROŻENIA, ANALIZA I SPOSOBY USUWANIA

K. GOŁĘBIEWSKA¹, E. GRZĄDKA², ¹UMCS, Wydział Chemii, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin, ²UMCS, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Katedra Chemii Fizycznej, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin

Abstrakt: Rosnącym problemem nowoczesnego świata jest obecność odpadów pochodzących z materiałów plastikowych. Wyroby te znalazły szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach życia i gospodarki człowieka ze względu na swoje unikalne właściwości. Jednakże, skutkiem ubocznym produkcji materiałów plastikowych jest uwalnianie się mikro- i nanocząstek do otoczenia. Kluczowe jest więc opracowywanie nowych metod usuwania tego rodzaju zanieczyszczeń. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie podstawowych informacji na temat mikro i nanoplastików, sposobów ich klasyfikacji i zagrożeń z nimi związanych. W prezentacji omówione będą również sposoby oddziaływania nanomateriałów z innymi substancjami, wszelkie źródła ich powstawania i drogi ich rozprzestrzeniania. Scharakteryzowane również zostaną sposoby analizy, separacji mikro i nanoplastików ze środowiska oparte na metodach spektroskopowych (FTIR, XPS, spektroskopia Ramana) i procesach filtracyjnych.

Wprowadzenie: Materiały zbudowane z polimerów syntetycznych wraz z dodatkiem innych substancji mających na celu nadanie im pożądanej cechy, takiej jak kolor, odporność na promieniowanie słoneczne, czy też odporność mechaniczną noszą nazwę plastików [1]. W sytuacji gdy odpady wykonane z plastiku dostają się do środowiska, mogą one stać się źródłem cząstek o drastycznie mniejszych rozmiarach, które obecnie klasyfikuje się w cztery kategorie: nanoplastiki, mezoplastiki, makroplastiki i mikroplastiki [2]. Mikroplastiki definiowane są jako cząstki plastiku mniejsze niż 5 mm o różnych kształtach, takie jak mikrosfery i włókna [3]. Rozmiar, kształt, ładunek powierzchni i hydrofobowość mikroplastików mają wpływ na sposób oddziaływania, a także biodostępność względem organizmów wodnych, co zaobserwowano w przypadku cząstek o kształtach kulistych i płytkowych. Cząstki o tak diametralnie odmiennych formach różnią się powierzchnią, na której mogą osadzać się zanieczyszczenia wodne w postaci depozytów, co w konsekwencji może zwiększyć ich biologiczne wchłanianie [4]. Mikroplastiki można podzielić na dwa rodzaje biorąc pod uwagę sposoby ich powstawania. Są to mikroplastiki pierwotne (ang. Primary Microplastics, PMPs), które są specjalnie syntezowane w wymiarach mikroskopowych od 2 do 5 mm, a także mikroplastiki wtórne (ang. Secondary Microplastics, SMPs), które pochodzą z odpadów plastikowych poddanych wcześniej zmianom fizycznym, chemicznym i biologicznym. Czynniki takie jak na przykład promieniowanie UV powoduje fotodegradację plastiku, a następnie oksydację jego powierzchni, co skutkować może kolejnymi procesami termooksydacyjnymi. Obok zmiany koloru zewnętrznej powierzchni zauważalne są również mikropęknięcia – materiał staje się kruchy, a w wyniku tego uwalnianie kolejnych cząstek zachodzi stanowczo łatwiej, nawet pod wpływem nieznacznych uszkodzeń mechanicznych [5][6]. Nanoplastiki określić można jako grupę odpadów, posiadających charakterystyczne właściwości, ze względu na które możliwe jest ich wyodrębnienie na tle

innych zanieczyszczeń. Pojęcie nanoplastiku stosuje się gdy obiektem badań są cząstki o wymiarach od 100 nm do 1000 nm powstałe jako produkt uboczny, np. na skutek degradacji materiałów wykonanych z plastiku, które równocześnie wykazują właściwości koloidalne [1]. Warto zaznaczyć, że termin ten nie obejmuje nanomateriałów obecnych w powszechnie stosowanych produktach takich jak kosmetyki, aczkolwiek mogą one się stać kolejnym źródłem uwalnianych nanoplastików [7]. Nanoplastiki powstają w wyniku procesów rozkładu większych, bardziej rozbudowanych materiałów. Konsekwencją tego jest niejednorodny skład i wysoka poldispersyjność wykazywana przez nanocząstki plastików jak i tendencja do tworzenia heteroagregatów razem z innymi materiałami naturalnymi lub antropogenicznymi [1]. Polimery takie jak polietylen, polipropylen, chlorek winylu, polistyren, politereftalan etylenu i poliuretan stanowią główny skład odpadów plastikowych [8]. Wymienione związki są aktualnie znajduwane w zbiornikach wodnych (rzekach, oceanach, lodzie morskim, arktycznych osadach głębinowych), glebie, powietrzu a także w organizmach żywych [2]. Głównym zagrożeniem ze strony nanoplastików jest ich zdolność do oddziaływania z innymi substancjami znajdującymi się w środowisku. Charakteryzuje je także duży stosunek powierzchni do objętości, przez co stają się one matrycami transportującymi zanieczyszczenia [9]. Zauważono również obniżenie produkcji chlorofilu α u cyjanobakterii na skutek ich oddziaływań z nanoplastikami, a proponowanym mechanizmem oddziaływania jest w tym przypadku absorpcja plastiku przez algi. Obecność cząstek polimerycznych powoduje obniżenie stężenie dwutlenku węgla, a tym samym utrudnia przeprowadzenie procesu fotosyntezy [2]. Innym przykładem bezpośredniego wpływu nanoplastików na środowisko naturalne jest np. utrudniony wzrost skąposzczetów, odpowiedzialnych za podtrzymywanie obiegu azotu w przyrodzie i za rozkład materii organicznej [10]. Co ciekawe, kiedy cząstki nanoplastików ulegają agregacji, rozmiar aglomeratów zwiększa się podczas gdy ich liczba proporcjonalnie maleje. Charakterystyczną cechą nanoplastików jest również wysoka reaktywność powierzchniowa, dzięki której oddziałują one z koloidami antropogenicznymi takimi jak suspensje tlenków metali, związków organicznych i nieorganicznych takich jak glina czy krzemionka. Oddziaływanie z innymi substancjami indukują heteroagregację zależną od warunków otoczenia tj. pH, poziomu zasolenia, czy ekspozycji na promieniowanie UV. W przypadku homoagregacji badania wykazały, że wzrost liczby przyłączonych cząsteczek jest proporcjonalny do siły jonowej, co jest efektem ściśnięcia podwójnej warstwy elektrycznej zgodnie z teorią DLVO. Wartościowość również ma w tym kontekście znaczenie. Dwuwartościowe kationy wapnia destabilizują nanoplastiki w stężeniach niższych niż kationy jednowartościowe, co jest zgodne z regułą Schulza-Hardy'ego [5]. Należy wspomnieć, że cząstki polistyrenu wykazują niską toksyczność wobec komórek, ale mają zauważalny efekt na potencjał błony mitochondrialnej. Rozmiar nanoplastików stanowczo utrudnia opracowanie dokładnych metod ich wykrywania w zbiornikach wodnych. Dodatkowym zagrożeniem jest możliwość przedostawania się nanoplastików do tkanek organizmów żywych [11]. Najczęściej wykorzystywane polimery do produkcji tworzyw sztucznych są wyjątkowo odporne na biodegradację (np. polietylen i polistyren) z uwagi na cechy takie jak duża masa cząsteczkowa, hydrofobowość oraz usieciowana struktura chemiczna. Niemniej jednak istnieją dowody na istnienie organizmów – bakterii i grzybów – które w pewnym stopniu są zdolne do biodegradacji polimerów. Należy zaznaczyć, że proces ten jest silnie zależny od warunków [12]. Większość mikro- i nanoplastików ze źródeł lądowych może bezpośrednio przedostawać się do rzek i jezior razem ze ściekami odprowadzanymi

z oczyszczalni [13]. Nanomateriały wytwarzane jako dodatki do różnych produktów, a szczególnie tych przeznaczonych higieny osobistej, często stają się ich dodatkowym źródłem. Towarzyszące procesowi transportu siły ścinające odpowiedzialne są za ich fragmentację, tym samym przyczyniając się do uwalniania nanoplastików do obiegu wodnego, gdzie cząstki te mogą podlegać dalszym reakcjom, np. degradacji na skutek hydrolizy. Mechanizmy odpowiadające za fragmentację łańcuchów polimerowych budujących nanoplastiki mogą działać niezależnie bądź wspólnie [14]. Dodatkowo, odpady pochodzące z portów wodnych, rybołówstwa i turystyki są bezpośrednio wyrzucane do wód przybrzeżnych [13]. Zastosowanie polimerów w biomedycynie jako nanokapsułki również może przyczyniać się do rozprzestrzeniania cząstek tworzywo sztucznych w środowisku. Ciekawym przypadkiem są zyskujące na popularności drukarki 3D, które obecnie sprzedawane są bez żadnych akcesoriów filtrujących, mimo faktu, że podczas swojej pracy uwalniają cząstki o rozmiarach 11,5 do 116 nm [15]. Analizowanie próbek pod kątem obecności mikro- i nanoplastików składa się przede wszystkim z identyfikacji ich rozmiaru, stężenia i składu chemicznego. Najczęściej aplikowane metody analizy mikro- i nanoplastików podczas oczyszczania wody obejmują stereo mikroskopię, mikroskopię elektronowo-skaningową i dynamiczne rozpraszanie światła [16]. Dzięki połączeniu spektroskopii XPS z mikroskopią elektronowo-skaningową możliwe jest np. wykrycie nanomateriałów obecnych w peelingach do twarzy i nanoplastików uwalnianych z torebek herbacianych. W celu usunięcia mikroplastików ze ścieków opracowano złożone procesy technologiczne, takie jak rozdzielanie na membranach, filtracja piaskowa, flotacja rozpuszczonym powietrzem oraz filtracja dyskowa [11]. Innymi metodami są koagulacja i flokulacja. Odnotowano zauważalny wpływ koagulacji na usuwanie mikroplastików, jednakże rodzaje tych cząstek w zbiornikach wodnych są bardzo zróżnicowane i nie każdy koagulant reaguje z nimi w ten sam sposób - efektywność usuwania mikroplastików jest różna zależnie od ich rozmiarów. Koagulacja polistyrenu i polietylenu, przeprowadzona z użyciem poliakrylamidu i chlorku żelaza(III), wskazała na bardzo niski poziom wolnego koagulantu po zakończeniu procesu. Jednym z zaproponowanych wyjaśnień mechanizmu koagulacji jest neutralizacja ładunku i połączenie się zanieczyszczeń w osadach amorficznych. Proces neutralizacji odnosi się głównie do różnoimiennie naładowanych cząstek, które są zobojętniane przez produkty hydrolizy koagulantów [17]. W przypadku flokulacji przeprowadzono badania z wykorzystaniem poliakrylamidu oraz alunu glinowo-potasowego. Różnoimiennie naładowane cząstki alunu silnie przyciągają duże ilości poliakrylamidu, tym samym tworząc duże skupiska cząstek przypominające „kłaczkę” [18].

Wnioski: Mikro- i nanoplastiki stanowią bardzo poważny problem środowiskowy, który może negatywnie wpływać na nie tylko na faunę i florę, ale także na zdrowie człowieka. Wymienione wyżej metody oczyszczania wody i ścieków z tego typu zanieczyszczeń są w stanie dość efektywnie usunąć mikroplastiki, natomiast kwestia usunięcia nanoplastików jest bardziej problematyczna [15]. Dlatego też istnieje pilna potrzeba opracowania nowych, skutecznych metod usuwania nanoplastików ze środowiska.

Literatura:

1. J. Gigault, A. ter Halle, M. Baurdimont, P. Y. Pascal, F. Gauffre, T. L. Phi, H. El Hadri, B. Grassl, S. Reynaud, *Environmental Pollution*. Elsevier Ltd, 1 (2018) 1030.
2. T. A. Lastovina, A. P. Budnyk, *J. Water Process Eng.* Elsevier Ltd, 1 (2021).
3. Y. Zhang, A. Diehl, A. Lewandowski, K. Gopalakrishnan., T. Baker, *Sci. Total Environ.*, (2020) 720.

4. W. Fu, J. Min, W. Jiang, Y. Li, W. Zhang, *Sci. Total Environ.*, (2020) 721.
5. S. Reynaud, A. Aynard, B. Grassl, J. Gigault, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. Elsevier Ltd, 1 (2022).
6. K. Rajala, O. Grönfors, M. Hesampour, A. Mikola, *Water Res.*, (2020) 183.
7. Y. Xiong, J. Zhao, L. Li, Y. Wang, X. Dai, F. Yu, J. Ma, *Water Res.*, (2020) 184.
8. J. Xue, S. Peldszus, M. I. Van Dyke, P. M. Huck, *Chem. Eng. J.*, (2021) 422.
9. Y. Zhang, Y. Luo, X. Guo, T. Xia, T. Wang, H. Jia, L. Zhu, *Water Res.*, (2020) 178.
10. S. Gangadoo, S. Owen, P. Rajapaksha, K. Plaisted, S. Cheeseman, H. Haddara, V. K. Truong, S. T. Ngo, V. V. Vu, D. Cozzolino, et al. , *Sci. Total. Environ. Elsevier B.V.*, 2020.
11. Z. Chen, Z. Huang, J. Liu, E. Wu, Q. Zheng, L. Cui, *J. Hazard. Mater.*, (2021) 406.
12. A. A Horton, A. Walton, D. J. Spurgeon, E. Lahive, C. Svendsen, *Sci. Total Environ*, 15 (2017) 127.
13. D. Huang, J. Tao, M. Cheng, R. Deng, S. Chen, L. Yin, R. Li, *J. Hazard. Mater.*, 5 (2021).
14. A. A. Mohana, S. M. Farhad, N. Haque, B. K. Pramanik, *Chemosphere*, (2021) 284.
15. J. P. da Costa, P. S. M. Santos, A. C. Duarte, T. Rocha-Santos, *Sci. Total Environ*, 1 (2016) 15.
16. M. R. Karimi Estahbanati, M. Kiendrebeogo, A. Khosravanipour Mostafazadeh, P. Drogui, R. D. Tyagi, *Marine Pollution Bulletin*. Elsevier Ltd, 1 (2021).
17. G. Zhou, Q. Wang, J. Li, Q. Li, H. Xu, Q. Ye, Y. Wang, S. Shu, J. Zhang, *Sci. Total Environ.*, (2021) 752.
18. S. Monira, M. A. Bhuiyan, N. Haque, B. K. Pramanik, *Process. Safe. Environ. Protect.*, 155 (2021) 11.

WPLYW MATRYCY NA USUWANIE ZWIĄZKÓW PERFLUOROWANYCH Z PRÓBEK ŚRODOWISKOWYCH

A. KRZYSZCZAK-TURCZYN^{1,2}, B. CZECH¹, I. SADOK², ¹UMCS, Wydział Chemii, Instytut Nauk Chemicznych, Katedra Radiochemii i Chemii Środowiskowej, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin, ²KUL, Wydział Medyczny, Instytut Nauk Biologicznych, Katedra Chemii, ul. Konstantynów 1J, 20-708 Lublin

Abstrakt: Związki per- i polifluoroalkilowe (PFAS) mają bardzo szerokie zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu, a jednocześnie są toksyczne dla organizmów żywych. Mnogość ich aplikacji świadczy jednocześnie o ogromnej liczbie źródeł, z których PFAS (jak również produkty ich degradacji) mogą być uwalniane do środowiska. Zawartości przedstawicieli tej grupy związków w próbkach środowiskowych, szczególnie w próbkach wodnych, są alarmujące. Dlatego też aktualne trendy badań dotyczących PFAS ukierunkowane są m.in. na poszukiwaniu nowych metod usuwania związków per- i polifluoroalkilowych z matryc wodnych, badaniu mechanizmu tego procesu, ocenie wpływu czynników organicznych i nieorganicznych na efektywność oczyszczania próbek wodnych. Celem badań była ocena wpływu jonów nieorganicznych i różnych matryc wodnych na wydajność procesu fotokatalitycznego usuwania związku z grupy PFAS.

Wprowadzenie: Związki perfluorowane i polifluorowane stanowią ogromną grupę (ponad 3000 związków) rozpuszczalnych w wodzie, syntetycznych organicznych surfaktantów [1,2]. Zakres ich wykorzystania w różnych gałęziach przemysłu jest bardzo szeroki. Pomimo wielu zalet dotyczących konkretnych zastosowań, związki perfluorowane są toksyczne dla organizmów żywych [3]. Stanowią również poważne zanieczyszczenie środowiskowe w związku z ich wysoką stabilnością i trwałością w warunkach naturalnych [2], które wynikają głównie z obecności licznych wiązań C-F. Szerokie spektrum zastosowania związków z grupy PFAS jest równoznaczne z istnieniem równie dużej ilości potencjalnych źródeł zanieczyszczenia środowiska badanymi substancjami oraz produktami ich degradacji. Obecność PFAS potwierdzono w różnych próbkach środowiskowych, żywności, wodzie, ściekach, jak również próbkach ludzkiej krwi [2]. Związki z grupy PFAS zostały zakwalifikowane do grupy trwałych zanieczyszczeń organicznych przez Konwencję Sztokholmską oraz Komisję Europejską. Ich zawartości w wodzie pitnej podlegają kontroli i nie powinny przekraczać dopuszczalnych poziomów ustalonych przez różne instytucje, np. 70 ppt dla PFAS – ograniczenie nałożone przez Komisję Europejską i Amerykańską Agencję Ochrony Środowiska (US-EPA) [2]. Ograniczenia zawartości badanych związków w wodzie pitnej, a także alarmujące zawartości PFAS w różnych próbkach środowiskowych (Tabela 1) zmuszają naukowców do poszukiwania nowych metod umożliwiających oznaczanie niskich stężeń związków per- i polifluoroalkilowych w zróżnicowanych matrycach. Aktualne sposoby ich oznaczania obejmują głównie chromatografię ciecząową oraz gazową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas [2,4-6]. Z metod bezpośredniego oznaczania związków per- i polifluoroalkilowych należy wykluczyć spektroskopię UV-Vis oraz metody elektrochemiczne [2]. Wynika to przede wszystkim z tego, iż nie są one optycznie lub elektro-

chemicznie czynne, jak również z braku chromoforów lub elektroaktywnych grup funkcyjnych [2]. Równocześnie intensywnie poszukiwane są nowe materiały zdolne do usuwania PFAS z wodnych próbek środowiskowych.

Tabela 1. Przykładowe zawartości perfluoroalkilowych kwasów karboksylowych (PFCA) i perfluoroalkilowych kwasów sulfonowych (PFSA) w wodnych próbkach środowiskowych.

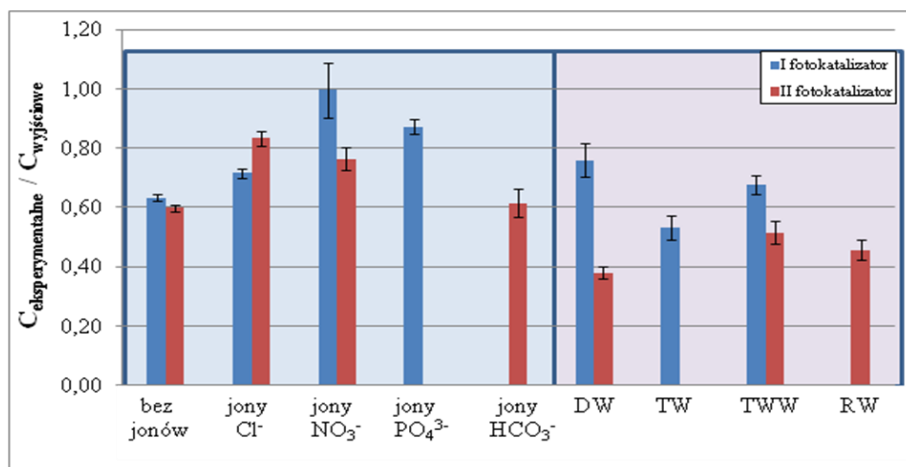
Matryca	PFCA/PFSA	Zakres stężeń (liczba próbek)	Pozycja literaturowa
woda pitna	PFCA	<LOD* – 4,2 ng/L (16)	[7]
	PFSA	<LOD* – 9,8 ng/L (16)	
ścieki	PFCA	0,2 – 60,0 ng/L (14)	[8]
	PFSA	0,6 – 240,0 ng/L (14)	
woda gruntowa	PFCA	<LOD* – 290,0 ng/L (102)	[9]
	PFSA	<LOD* – 143,0 ng/L (102)	
woda rzeczna	PFCA	<LOD* – 38,0 ng/L (2)	[10]

* LOD – granica wykrywalności metody analitycznej wykorzystanej w danej pozycji literaturowej.

Część eksperymentalna: Celem badań była ocena wpływu konkurencyjnych jonów nieorganicznych (chlorkowych, azotanowych(V), fosforanowych(V), wodorowęglanowych w stężeniu 5 mmol/L) i różnych matryc wodnych (woda destylowana, woda wodociągowa, oczyszczone ścieki, woda z rzeki „Bystrzyca”) na aktywność fotokatalityczną dwóch materiałów podczas usuwania kwasu perfluoroheksanowego (PFHxA, C₅F₁₁COOH, CAS: 307244, masa cząsteczkowa: 314,054 g/mol) z matrycy wodnej. Pierwszy fotokatalizator (I fotokatalizator) został uzyskany w wyniku modyfikacji wolframianu bizmutu jonami cynku [5], natomiast drugi materiał (II fotokatalizator) to modyfikowany żelazem katalizator cynkowy otrzymany metodą hydrotermalną. Eksperyment polegał na oznaczaniu zmian stężenia PFHxA podczas naświetlania światłem widzialnym w obecności wybranego fotokatalizatora. Do układu wprowadzano czynnik (wybrany jon nieorganiczny) lub eksperyment przeprowadzano w wybranej matrycy wodnej. Po ustaleniu stanu równowagi adsorpcyjno-desorpcyjnej w ciemności (30 min), włączono lampę i po odpowiednim czasie pobierano próbki. Po przefiltrowaniu przez filtr strzykawkowy (0,2 μm, wykonany z polipropylenu), próbki analizowano ilościowo metodą chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrem mas typu kwadrupol sprzężony z analizatorem czasu przelotu model 6538 (LC-ESI-QTOF/MS, z ang. liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry with the electrospray ionization source) [5] lub metodą chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrem mas typu pojedynczy kwadrupol model 6120 (HPLC-ESI-SQ, z ang. high performance liquid chromatography single quadrupole mass spectrometer with the electrospray ionization source) firmy Agilent Technologies. Jonizację próbki uzyskano poprzez elektrorozpraszanie, a jony charakterystyczne dla analitu śledzono w trybie jonów ujemnych.

Wyniki: Naturalne składniki matrycy wodnej (np. nieorganiczne jony, związki organiczne) mogą konkurować o miejsce aktywne na powierzchni fotokatalizatora. W przeprowadzonym eksperymencie, efektywność fotokatalitycznego usuwania PFHxA uległa spadkowi w obecności matrycy wodnej wzbogaconej wybranymi jonami nieorganicznymi (chlorkowymi, azotanowymi(V), fosforanowymi(V)). W przypadku jonów wodorowęglanowych, znaczących zmian nie zanotowano. Największy spadek zaobser-

wowano dla próbek z dodatkiem jonów azotanowych(V) w przypadku I fotokatalizatora oraz dla jonów chlorkowych w odniesieniu do II katalizatora (Rys. 1). Mniejsza skuteczność usuwania badanego związku wynikała z konkurencyjnego tworzenia rodników azotanowych o mniejszej sile utleniającej niż rodniki hydroksylowe, a tym samym mniej wydajnymi w rozkładzie PFHxA. Najlepsze wyniki (tzn. najlepszą efektywność) dotyczące wpływu matrycy wodnej na efektywność fotokatalitycznego usuwania kwasu perfluoroheksanowego na zmodyfikowanym wolframianie bizmutu, otrzymano dla wody wodociągowej, przy czym dane dotyczące fotokatalizy przeprowadzonej w wodzie destylowanej i oczyszczonych ściekach są zbliżone (najmniejszą efektywność usuwania analitu otrzymano dla PFHxA rozpuszczonego w wodzie destylowanej) (Rys. 1). Przyczyną spadku wydajności procesu usuwania kwasu perfluoroheksanowego jest m.in. obecność jonów interferujących (chlorkowych, azotanowych(V), fosforanowych(V), jak również jonów żelaza, czy magnezu) oraz rozpuszczonej materii organicznej. W przypadku drugiego katalizatora, najlepszą efektywność fotokatalitycznego utleniania PFHxA otrzymano w wodzie destylowanej. Mniejszą efektywność procesu uzyskano w wodzie z rzeki „Bystrzyca” i najmniejszą w oczyszczonych ściekach, co potwierdza, że obecność rozpuszczonej materii organicznej hamuje wydajność fotokatalitycznego utleniania PFHxA na badanym układzie.



Rys. 1. Efektywność fotokatalitycznego usuwania PFHxA (jako stosunek stężenia PFHxA po procesie fotokatalizy do stężenia wyjściowego) w roztworach zawierających różne jony nieorganiczne, jak również w wybranych matrycach wodnych (DW – woda destylowana, TW – woda wodociągowa, TWW – oczyszczone ścieki, RW – woda z rzeki „Bystrzyca”).

Wnioski: Niemal wszystkie zbadane jony interferujące spowodowały spadek efektywności usuwania analitu. W przypadku wpływu rodzaju matrycy wodnej, najlepszą wydajność procesu usuwania PFHxA otrzymano dla wody wodociągowej (I fotokatalizator) i wody destylowanej (II fotokatalizator), a najmniejszą dla wody destylowanej (I fotokatalizator) i oczyszczonych ścieków (II fotokatalizator). Wyniki potwierdzają, że zarówno wpływ jonów interferujących, jak również składu matrycy zależy od rodzaju zastosowanego fotokatalizatora (składu chemicznego, budowy strukturalnej, sposobu otrzymywania, ilości i jakości grup funkcyjnych obecnych na powierzchni materiału). Dane otrzy-

mane dla I fotokatalizatora ukazują, że pomimo spadku efektywności procesu fotokatalitycznego usuwania analitu w roztworze zawierającym wybrane jony konkurencyjne, efekt ich obecności znosi się z efektem innych substancji obecnych w wodzie wodociągowej (wyniki dotyczące wpływu matrycy). Co więcej, w matrycy wody wodociągowej znajdują się związki zwiększające wydajność usuwania PFHxA. Dlatego też kolejnym etapem badań będzie identyfikacja tych substancji i ilościowe określenie ich wpływu na fotokatalityczne usuwanie kwasu perfluoroheksanowego. W przypadku fotokatalizatora II, najlepszą fotokatalityczną aktywność otrzymano w wodzie destylowanej. Oznacza to znaczący wpływ jonów nieorganicznych (m.in. jonów chlorkowych, azotanowych(V) – Rys. 1) i związków organicznych na obniżenie fotokatalitycznych zdolności utleniania zmodyfikowanego żelazem katalizatora cynkowego.

Literatura:

1. Y. Qi, H. Cao, W. Pan, C. Wang, Y. Liang, J. Hazard. Mater., 436 (2022) 129139.
2. A. Ur Rehman, M. Crimi, S. Andreescu, Trends Environ. Anal. Chem., 37 (2023) e00198.
3. F. Xiao, Water Res., 124 (2017) 482.
4. S. F. Nakayama, M. Yoshikane, Y. Onoda, Y. Nishihama, M. Iwai-Shimada, M. Takagi, Y. Kobayashi, T. Isobe, Trends Analyt. Chem., 121 (2019) 115410.
5. M. Hojamberdiev, A. L. Larralde, R. Vargas, L. Madriz, K. Yubuta, L. K. Sannegowda, I. Sadok, A. Krzyszcak-Turczyn, P. Oleszczuk, B. Czech, Environ. Sci. Water Res. Technol., 9 (2023) 2866.
6. B. Czech, B. Nasri-Nasrabadi, A. Krzyszcak, I. Sadok, M. Hojamberdiev, R. Yadav, K. Shirvanimoghaddam, M. Naebe, J. Water Proc. Engineering, 54 (2023) 104058.
7. R. Tröger, P. Klöckner, L. Ahrens, K. Wiberg, Sci. Total Environ., 627 (2018) 1404.
8. C. Gallen, G. Eaglesham, D. Drage, T.H. Nguyen, J.F. Mueller, Chemosphere, 208 (2018) 975.
9. C. Wei, Q. Wang, X. Song, X. Chen, R. Fan, D. Ding, Y. Liu, Ecotoxicol. Environ. Saf., 152 (2018) 141.
10. X. Yao, Z. Zhou, M. He, B. Chen, Y. Liang, B. Hu, J. Chromatogr. A, 1553 (2018) 7.

OCENA WPLYWU ZANIECZYSZCZEŃ DROGOWYCH NA JAKOŚĆ WODY W ZBIORNIKACH ODWADNIAJĄCYCH DROGĘ EKSPRESOWĄ S 17

J. NOWOSAD¹, J. TOMASIK¹, A. GRYBOŚ¹, J. GÓRSKA¹, J. SITARSKI¹,
A. BARTKOWSKA², W. PŁASKA², ¹SKN Hydrobiologii i Ochrony Środowiska,
²Katedra Hydrobiologii i Ochrony Ekosystemów, Wydział Biologii Środowiskowej, UP
Lublin ul. Dobrzańskiego 37, 20-262 Lublin

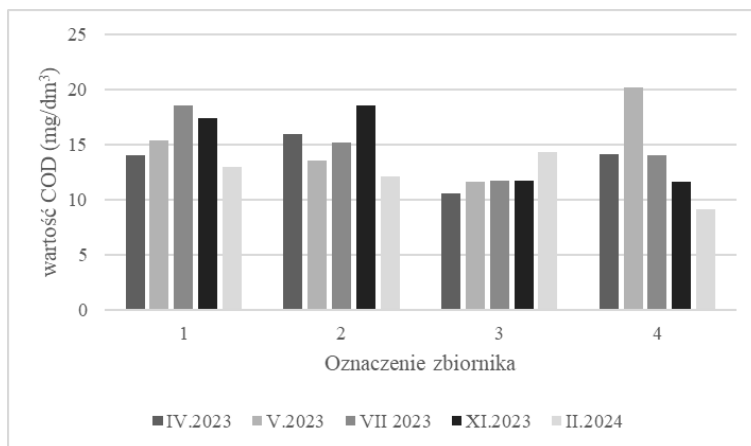
Abstrakt: W oparciu o wyniki badań laboratoryjnych próbek wody, dokonano oceny wpływu transportu drogowego na jakość wody w zbiornikach odwadniających obwodnicę Lublina. Próbkę zostały pobrane z czterech różnych zbiorników retencyjnych umiejscowionych między węzłami Sławinek i Elizówka. Pierwszy oraz drugi są stałe oraz charakteryzują się występowaniem w nich roślinności i wielu przedstawicieli fauny, również ryb. Trzeci wysycha, gdy temperatura powietrza sięga 30 stopni Celsjusza, czwarty wysycha często nawet poniżej tej temperatury. Próby pobrano pięciokrotnie w okresie od kwietnia 2023 roku do lutego 2024 roku. Po odpowiednim zabezpieczeniu przetransportowano je i poddano analizom fizyko-chemicznym w Katedrze Hydrobiologii i Ochrony Ekosystemów Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Otrzymane wyniki badań właściwości fizyko-chemicznych pobranych prób wykazały wpływ działań człowieka na stan wody tychże zbiorników retencyjnych, jednakże większość zanieczyszczeń (w szczególnym stopniu zasolenie) okazała się neutralizowana w czasie okresu wegetacyjnego przez rośliny wodne, dzięki czemu zbiorniki te mogą funkcjonować jako siedliska zastępcze dla hydrobiontów.

Wprowadzenie: Pod pojęciem retencji kryje się możliwość magazynowania oraz gromadzenia wody w określonym czasie i miejscu. W przypadku zbiorników przy obwodnicy Lublina obserwujemy retencję powierzchniową. Zbiorniki wspierają gospodarowanie wodą spływającą po powierzchniach asfaltowych i betonowych tworzących szlaki obwodnicy [1]. Pierwszorzędną funkcją tychże struktur jest przechwytywanie wody opadowej z dróg oraz jej długotrwałe magazynowanie, gdyż ze względu na swoją budowę (betonową) nie spływa z nich w inne miejsca. Spełniając to zadanie zapobiegają nadmiernemu przedostawaniu się wody opadowej do kanalizacji, tym samym odciążają sieć i umożliwiają pominięcie spływu jej nadmiaru do rzek [2]. Są one stosunkowo niewielkie, co wiąże się z dużą podatnością na wpływy zewnętrzne, chociażby temperatury. Dwa z badanych zbiorników na terenie obwodnicy Lublina narażone są na czasowe wysychanie. Dwa pozostałe są stałe, wzbogacone w roślinność oraz są miejscem życia dla wielu organizmów - począwszy od bezkręgowców, kończąc na organizmach wyższych, takich jak ryby. Ich powierzchnia sięga do 2 tysięcy m², głębokość do 1,4 m, z kolei w zbiorniku czwartym tylko do 0,3 m. Roślinność odgrywa kluczową rolę przy walce ze skutkami oddziaływań zanieczyszczeń drogowych na tamtejsze zbiorniki. Niestety, wraz z coraz to większą ingerencją człowieka w środowisko poprzez, np. wspomnianą rozbudowę dróg, czy rozwój komunikacji rośnie emisja zanieczyszczeń i zauważalne stają się liczne zmiany ekologiczne. Spływy powierzchniowe mogą zawierać następujące zanieczyszczenia: zawiesiny, substancje olejowe np. chlorki, związki

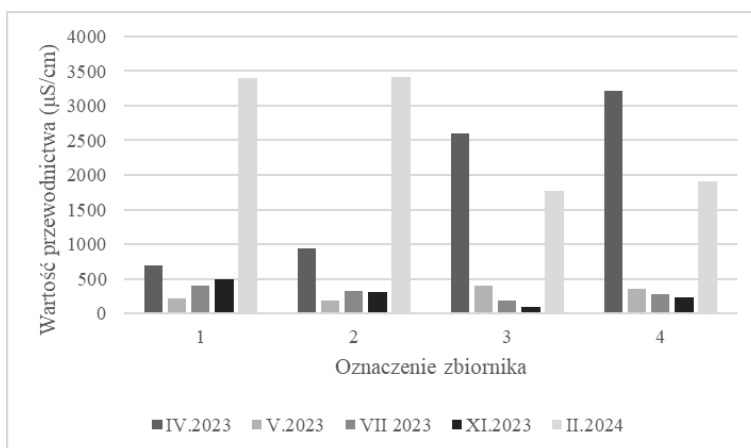
biogenne, takie jak: fosfor, potas, azot, poza nimi również metale ciężkie, mikrozanieczyszczenia [3]. Głównym zanieczyszczeniem wpływającym na jakość wody badanych zbiorników jest sól drogowa stosowana przez służby utrzymujące drogę do likwidowania śliskości na powierzchni jezdni.

Część eksperymentalna: Eksperyment miał na celu zbadanie wody pochodzącej z czterech zbiorników retencyjnych obwodnicy Lublina na odcinku między węzłami Sławinek oraz Elizówka. Pobrania odbyły się w czterech miesiącach 2023 roku, tj. w kwietniu, maju, lipcu i listopadzie oraz w lutym 2024 roku. Numeracja prób odpowiada pojedynczym zbiornikom retencyjnym. Materiał badawczy, jakim była woda, został odpowiednio pobrany do plastikowych pojemniczków, zabezpieczony zakrętkami i dostarczony do laboratorium Katedry Hydrobiologii i Ochrony Ekosystemów Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie w celu przeprowadzenia analizy fizyko-chemicznej. Wykorzystano w tym celu: pH-metr, którym określono odczyn wody; miernik wielopomiarowy YSI, z pomocą którego zmierzono przewodnictwo elektrolityczne i zawiesinę ogólną; spektrofotometr Pastel UV, którym wykonano oznaczenia: węgla organicznego, związków powierzchniowo czynnych (surfaktantów), chemicznego zapotrzebowania na tlen (COD) i biologicznego zapotrzebowania na tlen (BOD).

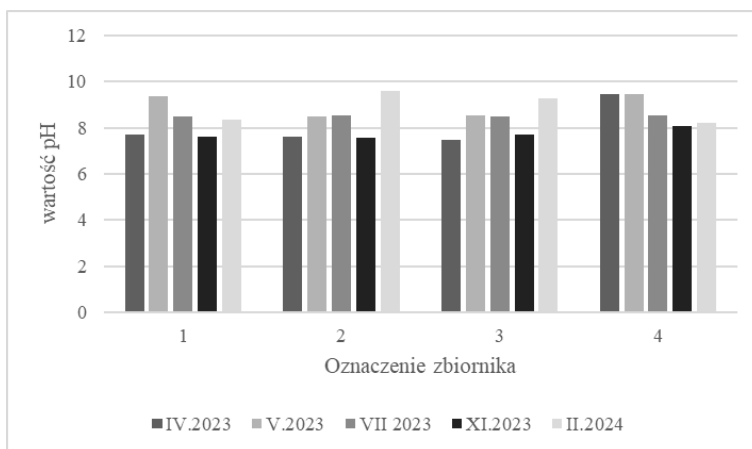
Wyniki: Uśrednione wartości wyników analiz wszystkich stanowisk wyniosły kolejno: TSS (rzeczywista waga suchej zawiesiny) - 21,44 mg/l, TOC (ogólny węgiel organiczny) - 5,67 mg/l, NO₃ (azotany) - 0,43 mg/l, SUR (surfakanty) - 2,48 mg/l, COD (chemiczne zapotrzebowanie na tlen) - 14,14 mg/l, BOD (biologiczne zapotrzebowanie na tlen) - 7,97 mg/l, przewodnictwo elektrolityczne - 1069,68 μS/cm, odczyn - 8,43 pH. Szczególnie dynamicznymi właściwościami okazały się być przewodnictwo elektryczne, odczyn wody i chemiczne zapotrzebowanie na tlen. Reszta parametrów utrzymywała się zwykle w granicach normy dla tego typu zbiorników. Przewodnictwo elektrolityczne wody określa jej zdolność do przewodzenia prądu elektrycznego, co zależy od ilości zanieczyszczeń znajdujących się w wodzie. Wraz ze wzrostem zanieczyszczenia wody wzrasta jej wartość przewodnictwa [4]. W przypadku badanych zbiorników wysokie przewodnictwo powodowane było wpływem zasolonych wód z powierzchni drogowych. Najwyższe wartości odnotowano pod koniec zimy. Następnie wraz z rozwojem roślinności wodnej i rozwojem fitoplanktonu zaobserwowano stopniowy spadek przewodnictwa, który pod koniec sezonu wegetacyjnego osiągało wartości typowe dla wód naturalnych. Chemiczne zapotrzebowanie na tlen (ang. chemical oxygen demand, COD) to umowny wskaźnik jakości wody. Opisuje on ilość tlenu (w mg) potrzebną do utlenienia związków chemicznych znajdujących się w 1 dm³ wody [5]. Wartość pH jest ujemnym dziesiętnym logarytmem ze stężenia molowego kationów wodorowych. Określa, ile moli jonów H⁺ znajduje się w 1 dm³ wody. Optymalny odczyn dla badanych zbiorników wynosi pomiędzy 6,5 a 8,5 pH. Dla organizmów wodnych szkodliwa jest zarówno za wysoka jak i za niska wartość tego wskaźnika. Dzieje się tak, ponieważ jony amonowe NH₄⁺ będące produktem przemiany materii u ryb przekształcają się w znacznie bardziej toksyczny amoniak (NH₃) wraz ze wzrostem wartości pH. Z kolei wraz ze spadkiem wartości pH zwiększa się toksyczność azotynu, który jest pośrednim produktem rozkładu materiału organicznego na azotan. Poza tym nieobojętne dla organizmów wodnych są duże wahania odczynu wody, które powodują u nich stres, szczególnie niebezpieczny dla wielu gatunków bakterii potrzebnych do rozkładu substancji szkodliwych [6].



Rys. 1. Chemiczne zapotrzebowanie na tlen w badanych zbiornikach.



Rys. 2. Wahania przewodnictwa elektrolitycznego wody w badanych zbiornikach.



Rys. 3. Odczyn wody w badanych zbiornikach w czasie trwania eksperymentu.

Wnioski: Przeprowadzone badania wykazały, że najpoważniejszym zanieczyszczeniem drogowym jest sól spływająca w okresie kiedy służby drogowe likwidują śliskość nawierzchni. Powoduje ona wzrost przewodnictwa elektrolitycznego w zbiornikach aż do wartości dochodzących dla wód słonawych. Jednak rozwój roślin naczyniowych i fitoplanktonu efektywnie wbudowuje rozpuszczoną sól w biomasę powodując relatywnie szybkie oczyszczenie zbiorników. Pozostałe parametry są typowe dla małych zbiorników w różnych etapach eutrofizacji.

Literatura:

1. M. Suchocka, , M. Siedlecka, Powierzchniowe systemy infiltracyjne z możliwością retencji wody jako metoda odwadniania nawierzchni dróg i ulic. *Drogownictwo*, 4 (2017) 128.
2. Z. Kajak: *Hydrobiologia-limnologia. Ekosystemy wód śródlądowych*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998.
3. J. Gawdzik, *Mobilność wybranych metali ciężkich w osadach ściekowych*, Wydawnictwo Politechniki Świętokrzyskiej, Kielce 2013.
4. E. Bajkiewicz-Grabowska, Z. Mikulski, *Hydrologia ogólna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007.
5. J. Dowgiałło, A. Kleczkowski, A. Macioszczyk, A. Rożkowski, *Słownik hydrogeologiczny*, PiG, Warszawa 2002.
6. R. P. Lana, J. B. Russell, M. E. Van Amburgh, *J. Animal. Sci.*, 76 (1998) 2190.

GLICEROL JAKO SUROWIEC DO PRODUKCJI BIOETANOLU W PROCESIE FERMENTACYJNYM

D. SOBOCIŃSKI, R. ZAGRODNIK, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Wydział Chemii, Zakład Technologii Chemicznej, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań

Abstrakt: Biopaliwa w tym bioetanol stanowią alternatywę dla paliw kopalnych. Bioetanol może być produkowany np. na drodze procesów fermentacyjnych wobec glicerolu będącego odpadem produkcji biodiesla. W badaniu oceniono skład pożywki oraz warunki prowadzenia procesów fermentacyjnych na produkcję bioetanolu z glicerolu. Zebrane wyniki wykazały, że najlepszą produkcję etanolu oraz najwyższy stopień przereagowania glicerolu można uzyskać stosując suplementację pożywki kwasem octowym. Pozwoliło to na optymalizację składu pożywki do dalszych badań oraz zastosowania bioetanolu w koncepcji biorafinerii.

Wprowadzenie: Ciągłe wahania cen ropy naftowej oraz degradacja środowiska sprawiają, że konieczne jest zastąpienie paliw kopalnych biopaliwami. Tego typu paliwa generowane są na drodze procesów biologicznych, stanowiąc biodegradowalną, ekonomiczną oraz ekologiczną alternatywę. Bioetanol jest przykładem biopaliwa, którego produkcja w ostatnich latach gwałtownie wzrasta. Wynika to z możliwości jego stosowania w różnych gałęziach przemysłu: w motoryzacji w formie czystej lub jako mieszanina z benzyną (gazohol) do napędzania silników [1], produkcji kosmetyków, żywności, napojów oraz w przemyśle farmaceutycznym. Obecnie produkcja bioetanolu w znacznej części oparta jest na roślinach spożywczych tj. kukurydza i trzcina cukrowa. Negatywnym tego skutkiem jest wzrost cen żywności [2]. Dlatego konieczne jest znalezienie innych surowców, które byłyby równie tanie i efektywne jak biomasa np. glicerol. Szacunkowa cena etanolu wyprodukowanego na bazie glicerolu jest niższa niż w przypadku tradycyjnej produkcji opartej np. na kukurydzy i wynosi odpowiednio 0.2694 US\$ oraz 0.3381 US\$ za litr [3]. Źródłem glicerolu może być odpad z produkcji biodiesla, który produkowany jest na skalę przemysłową jako substytut oleju napędowego. Szacuje się, że 1 kg glicerolu tworzy się podczas produkcji 10 kg biodiesla [3]. Odpadowy glicerol jest zanieczyszczony. Dlatego jego dalsze przemysłowe wykorzystanie wymaga kosztownego procesu oczyszczania. Dodatkowo popyt na glicerol jest znacznie mniejszy niż jego produkcja, przez co glicerol stał się łatwo dostępnym surowcem, którego cena zmniejszyła się 10-krotnie [4]. Stwarza to szansę na wykorzystanie go jako substratu w procesach fermentacyjnych, ograniczając jego negatywny wpływ na środowisko [5]. Jednym z mikroorganizmów zdolnych do produkcji etanolu, wodoru oraz kwasu bursztynowego na drodze procesów fermentacyjnych jest szczep *Escherichia coli* [6]. Warto zaznaczyć, że w przypadku etanolu oraz wodoru odnotowuje się wyższą wydajność produkcji, gdy źródłem węgla jest glicerol niż cukry. Celem badań było ustalenie optymalnych warunków do bioprodukcji etanolu z glicerolu na drodze procesów fermentacyjnych przez *E. coli* MG1655 (K12). W trakcie badań dokonano oceny wpływu pH (6,3 oraz 7,0), ekstraktu drożdżowego oraz peptonu w stężeniu 1 g/L oraz 3 g/L, kwasu oc-

towego (HAc) 2 g/L oraz początkowych warunków beztlenowych na produkcję bioetanolu oraz biowodoru.

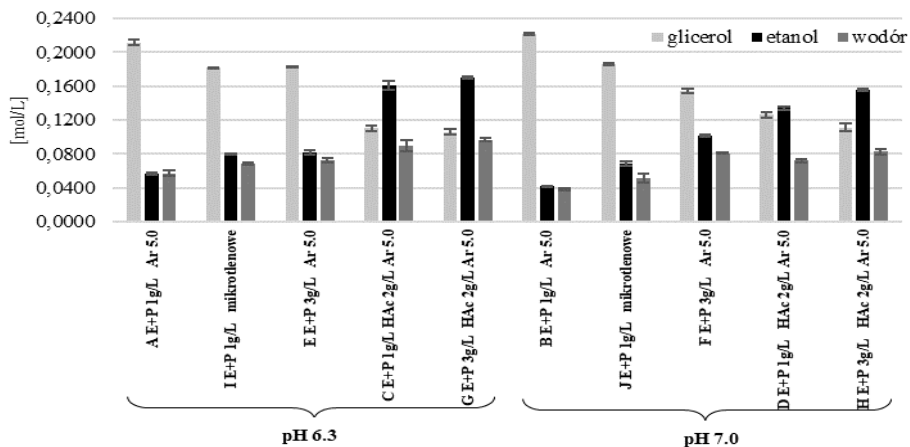
Część eksperymentalna: W ramach eksperymentu przygotowano 10 układów pomiarowych w trzech powtórzeniach. Procesy fermentacyjne prowadzono w kulturach okresowych w butelkach szklanych (bioreaktorach) przy objętości roboczej 25 mL. Pożywka składała się z: glicerolu (99,5%) 25 g/L, K_2HPO_4 1,74 g/L, KH_2PO_4 2,715 g/L, $MgSO_4 \times 7H_2O$ 0,2 g/L, $CaCl_2 \times 7H_2O$ 0,05 g/L, $FeSO_4 \times 7H_2O$ 0,05 g/L, 1 mL mikroelementów. Zawierała ona również pepton, ekstrakt drożdżowy oraz kwas octowy w ilościach podanych w Tabeli 1. Butelki z pożywką po korekcie pH (Tab. 1) za pomocą 3 M NaOH i 3 M HCl zamknięto korkami z gumy butylowej, zakapslowano aluminiowym kapsłem oraz sterylizowano w autoklawie w temp. 120°C przez 20 minut. W układach A-H zapewniono warunki beztlenowe przez barbotaż Ar 5.0 układów przed zaszczepieniem wszystkich bioreaktorów 10% (v/v) aktywną kulturą bakteryjną *E. coli* MG 1655. Badania prowadzono w temp. 35°C przez 23 doby zapewniając stałe mieszanie z szybkością 180 rpm (ELMI DOS-10M). Wartość pH była utrzymywana na stałym poziomie przez cały czas trwania eksperymentu poprzez okresowe pomiary pH (elektroda szklana Hydromet typ ERH-13-6, pH-metr typu N5170E) oraz dozowanie sterylnego 4 M NaOH. Zawartość biowodoru w biogazie oceniono metodą GC na chromatografii gazowej Varian CP-3800 z kolumną CPCarboPLOT P7 oraz detektorem TCD wobec argonu 5.0 jako gazu nośnego. Związki organiczne oznaczono metodą HPLC przy pomocy chromatografu Dionex Ultimate 3000, ThermoScientific, SHODEX kolumna SH 1011, detektor RI i UV, wobec 13 mM H_2SO_4 jako eluentu, przy przepływie 1 mL/min i temp. 60°C.

Tabela 1. Układy badane w trakcie prowadzonego eksperymentu.

Nazwa układu	pH	Stężenie [g/L]		kwas octowy (HAc) [g/L]	Ar 5.0
		pepton	ekstrakt drożdżowy		
Układ A	6,3	1	1	-	x
Układ B	7,0	1	1	-	x
Układ C	6,3	1	1	2	x
Układ D	7,0	1	1	2	x
Układ E	6,3	3	3	-	x
Układ F	7,0	3	3	-	x
Układ G	6,3	3	3	2	x
Układ H	7,0	3	3	2	x
Układ I	6,3	1	1	-	-
Układ J	7,0	1	1	-	-

Wyniki: Głównymi produktami powstającymi w procesach fermentacyjnych był etanol oraz wodór. Porównując zawartość etanolu i wodoru w bioreaktorach (rys. 1) można zauważyć, że prowadzenie procesów fermentacyjnych przy pH 6,3 skutkuje ich wyższą zawartością niż przy pH 7,0 we wszystkich badanych układach z wyjątkiem bioreaktorów zawierających ekstrakt drożdżowy i pepton w stężeniu 3 g/L (E i F). Potwierdziło to, że optymalnym pH do produkcji etanolu z glicerolu jest pH 6,3 [6], zwłaszcza przy

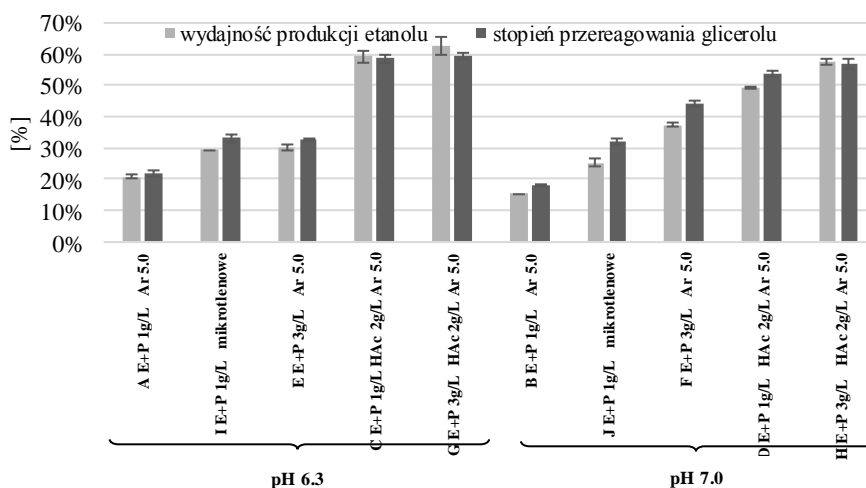
niskim stężeniu ekstraktu drożdżowego oraz peptonu w pożywce. W układzie F stężenie etanolu było o 23% wyższe przy pH 7,0 niż przy pH 6,3 (układ E) i wynosiło $0,1013 \pm 0,0012$ mol/L, natomiast stężenie wodoru było równe $0,0810 \pm 0,0010$ mol/L. W bioreaktorach A i B pracujących przy 3-krotnie niższym stężeniu ekstraktu i peptonu zawartość etanolu i wodoru była niższa niż w układach E i F. Tym samym można wnioskować, że w przypadku wyższych stężeń ekstraktu drożdżowego oraz peptonu preferowanymi warunkami do prowadzenia procesów fermentacyjnych jest pH równe 7,0.



Rys. 1. Stężenie poszczególnych metabolitów w zależności od warunków prowadzenia procesów fermentacyjnych.

Na podstawie przeprowadzonych badań wnioskowano, że ekstrakt drożdżowy oraz pepton wspomaga wzrost bakterii *E. coli* MG1655, efektem czego jest wzrost stopnia przereagowania glicerolu z 18% do $44 \pm 1\%$ w przypadku układów B i F (rys. 2). Jednak wysokie stężenie tych związków w pożywce może powodować wysokie koszty produkcyjne w skali przemysłowej zmniejszając rentowność procesu [7]. Wyższą produkcję etanolu oraz wodoru odnotowano również w układach mikrodenowych, powstałych na skutek braku odtleniania pożywki Ar 5.0. Efektem czego obserwujemy 1,4-krotny oraz 1,65-krotny wzrost stężenia etanolu odpowiednio dla układów I i J w stosunku do układów, które poddano odtlenieniu (układy A i B). Wydajność produkcji etanolu w warunkach mikrodenowych wzrosła do 29% dla układu o pH 6,3 oraz do $25 \pm 1\%$ dla układu o pH 7,0 (rys. 2). Produkcja wodoru w warunkach mikrodenowych wynosiła $0,0684 \pm 0,0011$ mol/L oraz $0,0517 \pm 0,0049$ mol/L odpowiednio dla pH 6,3 oraz 7,0. Najwyższą produkcję etanolu oraz wodoru uzyskano w przypadku układów suplementowanych kwasem octowym przy pH 6,3 tj. układach C i G. Dla układu C stężenie etanolu wynosiło $0,1606 \pm 0,0050$ mol/L. Stężenie to było 2,84 razy wyższe od stężenia etanolu uzyskanego bez suplementacji kwasem octowym (układ A). Natomiast w przypadku bioreaktora G było podobne i wynosiło $0,1695 \pm 0,0014$ mol/L (2-krotny wzrost w stosunku do układu E). Produkcja wodoru utrzymywała się na poziomie $0,0901 \pm 0,0067$ mol/L oraz $0,0968 \pm 0,0018$ mol/L wodoru odpowiednio w bioreaktorach C i G. Wysokie stężenie etanolu znajdującego się w bioreaktorach C i G było skorelowane z około 60% stopniem przereagowania glice-

rolu oraz wydajnością produkcji etanolu utrzymującą się na tym samym poziomie. Wartości te były najwyższe na tle wszystkich badanych układów. Suplementacja glicerolu kwasem octowym podobnie jak niewielkie ilości tlenu obecnego w pożywce w warunkach mikrotlenowych pełnią rolę akceptorów [8] elektronów, pozwalając na zrównoważenie reakcji redoks zachodzącej w komórce. Użycie kwasu octowego jako kosubstratu zmniejsza nadmiar NADH w warunkach beztlenowych, ponieważ jest on zużywany do produkcji etanolu z kwasu octowego poprzez acetylo-CoA, poprawiając produkcję etanolu oraz rozkład glicerolu [7].



Rys. 2. Wydajność produkcji etanolu oraz stopień przereagowania glicerolu w poszczególnych w zależności od warunków prowadzenia procesów fermentacyjnych.

Wnioski: Optymalnymi warunkami do produkcji etanolu oraz wodoru z glicerolu jest pH 6,3 oraz stężenie ekstraktu drożdżowego oraz peptonu (3 g/L) z dodatkiem kwasu octowego (2 g/L). Jednak z uwagi na wysokie koszty ekstraktu drożdżowego oraz peptonu, a także nieznaną różnicę w ostatecznej zawartości etanolu w bioreaktorach o ich różnym stężeniu zalecane jest prowadzenie badań przy niższym stężeniu tych substancji. Uzyskane wyniki zachęcają do prowadzenia dalszych badań zwłaszcza w systemie ciągłym, stwarzając szansę na połączenie z innymi procesami fermentacyjnymi w koncepcji biorafinerii.

Literatura:

1. A. Sawasdee, N. Vikromvarasiri, N. Pisutpaisal, Biomass Conversion and Biorefinery, (2021) 13.
2. A. Adnan, S. Suhaimi, S. Abd-Aziz, M. Hassan, L.Y. Phang, Renewable Energy, 66 (2014) 625.
3. J.N. Sunarno, P. Prasertsan, W. Duangsuwan, B. Cheirsilp, K. Sangkharak, Biomass. Bioenergy., 134 (2020) 105503.
4. O. Cofré, M. Ramírez, J.M. Gómez, D. Cantero, Biomass. Bioenergy, 37 (2012) 275.
5. E.L. Almeida, J.E. Olivo, C.M.G. Andrade, Fermentation, 9 (2023) 869.
6. M. Ngadi, J. Bioprocess. Biotech., (2012) 1.
7. S. Boecker, S. Espinel-Ríos, K. Bettenbrock, S. Klamt, Metabolic Engineering, 73 (2022) 50.
8. A.W. Westbrook, D. Miscevic, S. Kilpatrick, M.R. Bruder, M. Moo-Young, C.P. Chou, Biotechnol. Adv., 37 (2019) 538.

SPIS AUTORÓW

B

Banaszek P. 33
Bandosz T.J. 151
Barańska J. 131
Barczak M. 151
Bartkowska A. 273, 292
Batyra A. 95
Bąk J. 269
Biedrzycka A. 262
Bielecka W. 66
Bilokinna A. 280
Borowski P. 151
Bregier-Jarzębowska R. 123
Burdzy K. 276

C

Charmas B. 135
Chmiel D. 240
Choma A. 74
Czech B. 159, 288
Czemierska M. 42
Czerwiński J. 193
Czerwonka J. 253
Czichy M. 213

D

Danilczuk A. 232
Dobrowolski R. 171
Dobrzyńska J. 171
Dowbysz A. 38
Dziedzic J. 107

F

Fiałek M. 205
Fila D. 143
Flieger J. 184
Florkowski G. 253

Fokt B. 103
Frymark J. 127

G

Gawryś W. 249
Gęca M. 155
Gdula K. 54
Gładysz-Płaska A. 147
Głuszyńska A. 86
Goliszek M. 240
Gołębiowska K. 284
Gorylewski D. 180, 221,
225
Gorzkiwicz K. 99
Górska J. 273, 292
Graba S. 95
Grabarczyk M. 175, 205
Grabias-Blicharz E. 147, 184
Grochowicz M. 14
Gruszkiewicz N. 245
Gryboś A. 273, 292
Grządka E. 284
Grzelka M. 147
Grzesiak M. 29

H

Hubicki Z. 143, 167

J

Jagleniec D. 91
Janasik P. 213
Jaszek M. 70
Jaszek N. 95
Janusz G. 178
Jarosz W. 258
Jarosz-Wilkołazka A. 42
Jastrząb R. 18, 119, 123, 127,
131
Jaszek M.

Jedynak K. 135
Jędrys W. 54
Joka-Yildiz M. 217
Jonik I. 78
Józwicka W. 25, 240
Józwicki M. 25, 240
Jurak M. 50, 62

K

Kalinowska M. 217
Karasiewicz J. 189
Karaś M.A. 103, 228
Kassem M. 86
Keller A. 180, 221, 225
Kiczor A. 21
Kołodyńska D. 42, 269
Komaniecka I. 139, 209
Konieczna A. 66
Konopka P. 18
Koroniak-Szejn K. 18, 131
Koronkiewicz K. 217
Kosman J. 86
Kowalczyk B. 50
Kowalska K. 151
Kowalska Kl. 266
Krasowska M. 66
Krawczyk J. 189
Kruczek I. 111
Krzewski P. 143
Krzyszczak-Turczyn A. 288
Kukfisz B. 38
Kukowska S. 139
Kutkowska J. 91, 99
Kutyła M. 54, 95, 111, 253
Kutyrieva-Nowak N. 82
Kwiatkowska O. 78

L

Leszczuk A. 82

Ł	Pastuszek K. 50, 62	Szewczyk E. 66
Łopucki R. 280	Pawlak A. 197	Szewczuk-Karpisz K. 139
Łuczowska I. 232	Pesta J. 38	
Łuszczak K. 74	Piątek-Golda W. 58	Ś
	Pizoń M. 184	Świdorski G. 217
M	Pluta E. 54	Świetlicka G. 240
Maciejewska M. 14	Płaska B. 147, 232, 245	
Majdan M. 147	Płaska W. 273, 292	T
Majewska M. 46	Podgórski M. 33	Tarasiuk B. 10
Makara M. 29	Podkościelna B. 10, 70, 236	Tarasiuk J. 50, 62
Malinowska P. 240	Poturaj K. 29	Tokarska K. 107
Maximenko A. 147	Przybyło M. 66	Tomasik J. 273, 292
Mandziuk-Nizińska J. 245		Trytek M. 54, 95, 111, 253
Marek-Kozaczuk M. 107	R	Tyniecka G. 115
Mergo P. 21, 25, 29	Rachwał K. 78	Tyszczyk-Rotko K. 180, 221, 225
Mierzwa N. 66	Rochowska D. 66	Tyszko M.46
Młynarczyk K. 70		Tyśkiewicz K. 253
Morlo K. 171	S	
Mózer V. 38	Sadok I. 78, 201, 280	V
Morawska K. 213	Sadowska P. 123, 288	Vozdihan Y. 66
	Samsonowicz M. 38	
N	Sieczkowska K. 228	W
Namroży K. 66	Sitarski J. 273, 292	Wald F. 38
Nesterak M. 209	Skowronek M. 280	Wardak C. 213
Nosal-Wiercińska A. 197	Skwarek E. 262, 266	Wardak M. 213
Noskowicz W. 66	Sobociński D. 296	Wawruch A. 175
Nowicki P. 139, 155	Sofińska-Chmiel W. 240	Wawrzaszek B. 135
Nowosad J. 273, 292	Sokołowski A. 159	Wawszczak A. 42, 269
	Sokołowski W. 107	Wąsewicz E. 66
O	Stachowiak K. 119	Wdowiak-Wrobel S. 107
Osińska-Jaroszuk M. 58, 70	Stanec K. 180, 221, 225	Wiater A. 253
Ożga K. 201	Stefanek S. 178	Wiśniewska M. 155
	Stoś D. 111	Włazłowska E. 205
P	Suchora M. 276	Wlizło K. 66
Paientko V. 266	Sulej J. 58	Wojdat K. 189
Pakaszewski W. 236	Swatek A. 209	Wójcik A. 236
Palusińska-Szyszl M. 50, 62	Szwed K. 245	Wójcik G. 167
Panek R. 269	Szabelska A. 236	Wrześniewska K. 193
Parcheta M. 163	Szałkowska S. 10	

Z	Zawada I. 111
Zabizsak M. 119, 127, 131	Zdunek A. 82
Zagrodnik R. 296	Zieliński K. 280
Zajac A. 249	Zinkowska K. 167
Zamłyńska K. 74, 258	Żuk N. 184

Wspierają nas:



PATRONAT HONOROWY
JAROSŁAW STAWIARSKI
MARSZAŁEK
WOJEWÓDZTWA LUBELSKIEGO

PATRONAT HONOROWY
WOJEWODA LUBELSKI
KRZYSZTOF KOMORSKI



PATRONAT
HONOROWY



PREZYDENT MIASTA LUBLIN
KRZYSZTOF ŻUK



 **Łukasiewicz**
Instytut Nowych
Syntezy Chemicznych



**przemysł
chemiczny**

Laboratorium
PRZEGLĄD OGÓLNOPOLSKI



AKADEMICKE
98.2FM RADIO
CENTRUM



CENTRUM PRASOWE
UMCS

**Accreditation certificate
No. AB 1548**

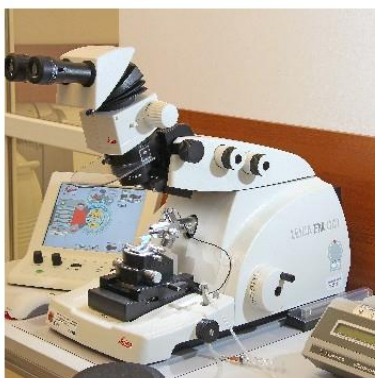
<https://www.umcs.pl/pl/lab.htm>

Analytical Laboratory

Institute of Chemical Sciences
Faculty of Chemistry
Maria Curie-Skłodowska University
3 Maria Curie-Skłodowskiej Square
20-031 Lublin



**XRF fluorescence
X-ray diffraction
Atomic force microscopy
Optical microscopy
Optical profilometry
XPS spectroscopy**



**Infrared spectroscopy
Raman spectroscopy
Adsorption and chemisorption
Transmission electron microscopy
Scanning electron microscopy**



Maintenance of the equipment in the Analytical Laboratory is co-financed by
the INFRASTARt project



**Rzeczpospolita
Polska**



UMCS

NCBR
Narodowe Centrum Badań i Rozwoju

Jesteśmy liderem w dostarczaniu i wdrażaniu nowoczesnych rozwiązań z branży Analizy Instrumentalnej, Diagnostyki Molekularnej i Genomiki.

Oferujemy chromatografy, spektrometry mas, spektrometry atomowe, spektrofotometry i inne urządzenia wykorzystywane w analizie instrumentalnej oraz akcesoria laboratoryjne. Posiadamy także własne Laboratorium Aplikacyjne, które wraz z dedykowanym zespołem inżynierów aplikacyjnych, stanowi wsparcie merytoryczne dla naszych Klientów.

Disponujemy wykwalifikowanym zespołem ponad 30 inżynierów serwisu, którzy na terenie całego kraju dbają o sprawność instrumentów i ciągłość badawczą.



Revident LCMS Q-TOF Agilent Technologies

Potrójny kwadrupol LC/MS 6495D
w połączeniu z 1290 Infinity II LC Agilent Technologies



Analizatory węgla organicznego (TOC)
Sievers M9 firmy Veolia

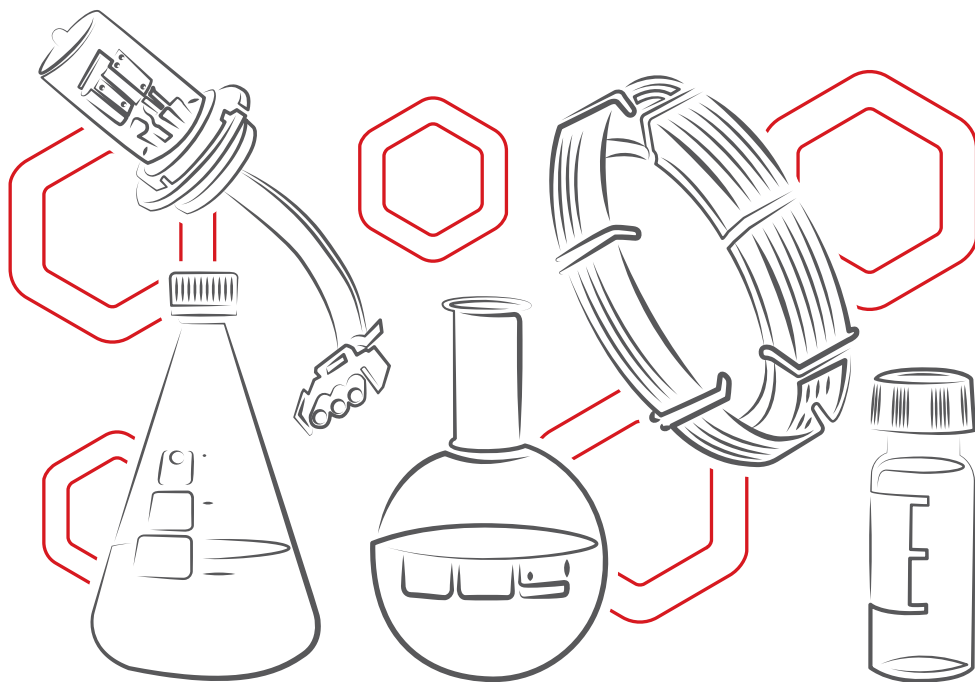






Optyczny Spektrometr Emisyjny
5900 SVDV ICP-OES Agilent Technologies







GCMS model 5977C
oraz GCMS model 7000E
i 7010C Agilent Technologies

Akcesoria laboratoryjne



-  Akcesoria Chromatograficzne
-  Akcesoria Spektroskopowe
-  BIO Kolumny i Odczynniki
-  Wzorce i Materiały Odniesienia

-  Przygotowanie Próbek
-  Drobny Sprzęt Laboratoryjny
-  Szkło Laboratoryjne i Miarowe
-  Wsparcie Merytoryczne i Aplikacyjne



Selwa Sp. z o.o. jest autoryzowanym przedstawicielem firm:



• **SCION Instruments** scioninstruments.com

Chromatografy gazowe, cieczowe spadkobiercy światowego lidera firmy Varian w tej dziedzinie:

- niezawodne chromatografy gazowe nowej generacji serii 8300/8500
 - zaawansowane chromatografy gazowe ze spektrometrami masowymi SQ (8700) i TQ (8900)
 - chromatografy cieczowe serii 6000-LC w różnych konfiguracjach
 - systemy do przygotowania próbek headspace HT-3 i Versa (wcześniej Teledyne Tekmar)
 - serie analizatorów do analizy próbek środowiskowych, petrochemicznych itp.
 - wszystkie niezbędne akcesoria, części oraz kolumny do chromatografii gazowej i cieczowej
 - oprogramowanie sterujące chromatografami cieczowymi i gazowymi większości marek na świecie
- charakteryzujące się łatwością obsługi oraz nieograniczonym zakresem możliwości obróbki danych



• **Nanalysis Corporation** nanalysis.com

Nastółowe, wszechstronne spektrometry rezonansu magnetycznego dostępne pod ręką w każdym laboratorium. Spektrometry dostępne w dwóch wersjach 60MHz i 100MHz i każda w opcji ekonomicznej i profesjonalnej. Pomiary izotopów 1H, 7Li, 11B, 13C, 19F, 31P. Praca z standardowymi rurkami 5mm wykorzystywanymi dotychczas w stacjonarnych spektrometrach NMR. Urządzenia ze stałym magnesem bez konieczności chłodzenia kriogenicznego. Wyposażone w prosty, dotykowy interfejs.



• **F-DGSi** f-dgs.selwa-lab.pl

Generatory gazów czystych i ultraczystych do wytwarzania gazów w dowolnym miejscu:

- generatory wodoru - czystość do 99,9999%, maksymalne ciśnienie do 12 bar
- generatory azotu - czystość do 99,995%, maksymalne ciśnienie do 8 bar
- generatory czystego i ultraczystego powietrza
- zintegrowane stacje dostarczające wodór, azot, powietrze

• **LabTech Srl** www.labtechsrl.com

Podstawowe wyposażenie każdego laboratorium:

- wysokiej jakości wyparki próżniowe pionowe i diagonalne
- niezawodne mieszadła magnetyczne z grzaniem
- płyty grzewcze oraz bloki do mineralizacji próbek
- cyrkulatory i łaźnie wodne o szerokim zakresie zastosowania



ISBN 978-83-227-9806-5