

## WPLYW RODZAJU FRAKCJI S9 Z WĄTRÓB MYSZY I SZCZURÓW NA GENOTOKSYCZNOŚĆ ZWIĄZKÓW OCENIANĄ TESTEM SOS CHROMOTEST

Krzysztof DEMKOWICZ-DOBRZAŃSKI, Anita BONISŁAWSKA, Józef SAWICKI  
Warszawski Uniwersytet Medyczny, Zakład Badania Środowiska, ul. S. Banacha 1, 02-097 Warszawa,  
krzysztof.dobrzanski@wum.edu.pl

W środowisku człowieka występują bardzo liczne związki naturalne o działaniu mutagennym, a także różne związki mutagenne powstające w wyniku działalności przemysłowej. Ponieważ liczne chemiczne mutageny są także karcinogenami i mogą indukować powstawanie nowotworów, zatem wykrywanie tych związków ma istotne znaczenie dla ochrony człowieka przed ich działaniem. Opracowano szereg testów pozwalających określić potencjalne działanie mutagenne i karcinogenne związków chemicznych. W testach tych wykorzystuje się zarówno organizmy wyższe (ssaki) jak i niższe a także hodowle komórek ssaków. Testy krótkoterminowe wykorzystujące do badań bakterie i hodowle komórkowe są szczególnie przydatne dla wstępnej oceny związku. Do grupy bakteryjnych testów krótkoterminowych zalicza się test SOS Chromotest. Jest to test bakteryjny, w którym stosowany jest odpowiednio przygotowany szczep *Escherichia coli*. Związki uszkadzające DNA wywołują u szczepu testowego szereg funkcji znanych pod nazwą reperacji SOS. W teście tym wykorzystano fuzję operonu umieszczając gen *lacZ*, gen strukturalny dla  $\beta$ -galaktozydazy, pod kontrolą genu *sfiA*. Szczep testowy posiada delecję normalnego regionu *lac*, tak więc aktywność  $\beta$ -galaktozydazy mierzona w teście zależy wyłącznie od ekspresji genu *sfiA* i jest odbiciem poziomu indukcji tego genu, która to indukcja jest zależna od stopnia uszkodzenia DNA przez związek genotoksyczny. Ilościową miarą działania genotoksycznego związków jest wartość współczynnika IF i współczynnika SOSIP. Ponieważ bakterie stosowane w testach wykrywania mutagenności związków nie zawierają całego spektrum monoooksygenaz, które występują u wyższych organizmów, nie jest możliwe wykazanie takich właściwości w przypadku związków, które wymagają aktywacji, aby nabyć właściwości mutagenne lub rakotwórcze. Aktywację takich związków przeprowadza się inkubując je, w postmitochondrialnym supernatancie komórek wątrób ssaków (tj. we frakcji S9). Frakcja S9 zawiera większość różnych monoooksygenaz i innych enzymów potrzebnych do aktywacji potencjalnych mutagenów i kancerogenów. Zalecana i najczęściej stosowana jest frakcja S9 uzyskana z wątrób szczurów rasy Sprague-Dawley. Do aktywacji związków genotoksycznych oprócz frakcji S9 pochodzącej z wątrób szczurów rasy Sprague-Dawley stosowana jest również frakcja S9 uzyskana z wątrób myszy rasy B10.A, będących częstym obiektem badań z zakresu kancerogenezy chemicznej. Uzyskane wyniki nie wskazują jednoznacznie, która z frakcji S9 – mysia czy szczurza – silniej aktywuje promutageny. W przypadku benzo(a)pirenu oraz acetyloaminofluorenu silniejszą aktywację uzyskano stosując frakcję mysią, w przypadku aminoantracenu frakcja szczurza aktywowała badany związek lepiej niż mysia, natomiast dla metylocholantrnu uzyskano zbliżone wyniki dla obu rodzajów frakcji. Wyniki potwierdzają konieczność stosowania w testach frakcji S9 pochodzących od różnych gatunków i ras zwierząt.

## WYKORZYSTANIE CZTERECH BIOINDYKACYJNYCH METOD W OCENIE ZANIECZYSZCZENIA ŚRODOWISKA W REJONIE PRZEMYSŁOWYM

Wojciech DMUCHOWSKI

Wyższa Szkoła Ekologii i Zarządzania w Warszawie

Ogród Botaniczny – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej PAN w Warszawie

Badania wykonano w rejonie Olkusza uznanego za jeden z najbardziej zanieczyszczonych metalami ciężkimi obszar w Europie. Hutnictwo cynku i ołowiu na tych terenach istniało od XVIII wieku. Największym źródłem emisji metali ciężkich w tym rejonie jest zlokalizowany w pobliżu miejscowości Bukowno koło Olkusza Kombinat Górniczo-Hutniczy „Bolesław”, który rozpoczął działalność w 1952 r. Rejon ten znajduje się również pod wpływem emisji przemysłowych z Górnego Śląska, Krakowa i Moraw. W badaniach wykorzystano cztery często stosowane metody bioindykacji zanieczyszczenia środowiska metalami ciężkimi: metodę transplantacyjną „moss-bag” polegającą na określeniu akumulacji metali w eksponowanym mchu *Sphagnum falax*, oraz w rosnącym mchu *Pleurozium schreberi*, a także akumulacji metali w liściach brzozy brodawkowatej (*Betula pendula* Roth) i igłach sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.). Czynnikiem różnicującym bezwzględny wynik stopnia zanieczyszczenia środowiska, wyrażony poziomem akumulacji arsenu w bioindykatorach, jest przede wszystkim czas ekspozycji wynikający ze specyfiki zastosowanej metody bioindykacyjnej, źródło zanieczyszczenia (powietrza, gleba) oraz cechy (budowa morfologiczna) rośliny wskaźnikowej. Mimo zastosowanie różnych technik bioindykacyjnych i różnych roślin wskaźnikowych przestrzenny rozkład zanieczyszczeń arsenem na mapach był zbliżony, potwierdzony statystyczną analizą wyników. Wielkości bezwzględne akumulacji różniły się, ale ich obraz rozmieszczenia był podobny. Zastosowana metoda prezentacji wyników w postaci map emisji zanieczyszczenia, pozwoliła wskazać obszary szczególnego zagrożenia dla zdrowia mieszkańców i ekosystemów. Huta ołowiu i cynku w Bukownie i hałda odpadów przemysłowych tej fabryki, zostały zidentyfikowane, jako największe źródła zanieczyszczenia arsenem w badanym obszarze.

## ZMIANY ZAWARTOŚCI ŻELAZA I MOLIBDENU W GLEBIE I ŻYCIICY WIELOKWIATOWEJ POD WPLYWEM STOSOWANIA ODPADOWYCH WĘGLI BRUNATNYCH, OSADÓW ŚCIEKOWYCH I ICH MIESZANIN

Stanisław KALEMBASA, Barbara SYMANOWICZ

Akademia Podlaska, Wydział Przyrodniczy, Katedra Gleboznawstwa i Chemii Rolniczej, ul. B. Prusa 14, 08-110 Siedlce, kalembasa@ap.siedlce.pl

W ostatnich latach obserwuje się gwałtowne obniżanie poziomu próchnicy w glebach Polski. Główną przyczyną tej sytuacji jest zmniejszanie średniej dawki obornika do 5,6 t/ha. Poza tym zachodzi ciągła mineralizacja substancji organicznej, a także przemieszczanie jej w głąb profilu w wyniku pogłębionej orki. Taka sytuacja zmusza do poszukiwania innych, niekonwencjonalnych źródeł materii organicznej. Mogą to być między innymi osady ściekowe i odpadowe węgle brunatne, które są źródłem mikroelementów i pierwiastków śladowych. Celem niniejszych badań było prześledzenie zmian w zawartości żelaza i molibdenu w materiałach organicznych, utworze glebowym i życicy wielokwiatowej (*Lolium multiflorum* Lam.) pod wpływem stosowania odpadowych węgli brunatnych, osadów ściekowych oraz ich mieszanin. Trzyletnie doświadczenie wazonowe przeprowadzono metodą całkowicie losową z obiektem kontrolnym (piasek gliniasty lekki) w trzech powtórzeniach. Do wazonów wypełnionych utworem glebowym (8kg) dodano odpadowe węgle brunatne, osady ściekowe, ich mieszaniny i obornik w ilości 7,5% masy gleby w wazonie. Stosowano także nawożenie mineralne w g/wazon, w formie polifoski 8 (przedsiewnie) i saletry amonowej (pogłównie po I i II pokosie) w stosunku 1:1:1 (N:P:K). Nasiona życicy wielokwiatowej (*Lolium multiflorum* Lam.) odmiany *Kroto* wysiewano w ilości 1g na wazon. W sezonie wegetacyjnym zbierano cztery pokosy trawy. Pobrane próby wysuszono i rozdrobniono. Po zakończeniu eksperymentu pobrano próby materiału glebowego, wysuszono i przesiano przez sito o średnicy 1mm. W tak przygotowanych materiałach oznaczono zawartość Fe i Mo metodą ICP-AES na spektrometrze emisyjnym z indukcyjnie wzbudzaną plazmą, po uprzedniej mineralizacji „na sucho”. Poziom oznaczonych pierwiastków śladowych w analizowanych materiałach wyjściowych był bardzo zróżnicowany. Największe ilości Fe oznaczono w odpadowym węglu brunatnym z Sieniawy, natomiast Mo w osadzie ściekowym z Siedlec. Średnia zawartość żelaza ogółem w podłożu glebowym po zakończeniu badań wynosiła 3254,6 mg/kg, a molibdenu 0,96 mg/kg. Odpadowe węgle brunatne z Konina i Sieniawy, osady ściekowe z Siedlec, Łukowa i Drosedu oraz ich mieszaniny istotnie różnicowały zawartość Fe i Mo w suchej masie życicy wielokwiatowej (*Lolium multiflorum* Lam.) w kolejnych latach prowadzenia badań. Średnia zawartość żelaza oznaczona w suchej masie rośliny testowej wynosiła 250,5 mg/kg, a molibdenu 3,11 mg/kg. W kolejnych latach badań nastąpiło obniżenie zawartości Fe i Mo w suchej masie życicy wielokwiatowej. Zawartość oznaczonych pierwiastków w suchej masie trawy mieściła się w zakresie liczb granicznych dopuszczalnych dla pasz.

## **PROFILOWE ZRÓŻNICOWANE ZAWARTOŚCI CYNKU, MIEDZI I NIKLU W LEŚNYCH GLEBACH BIELICOZIEMNYCH NA NIZINIE POŁUDNIOWOPODLASKIEJ**

D. KALEMBASA, M. BECHER, K. PAKUŁA

Akademia Podlaska, Katedra Gleboznawstwa i Chemii Rolnej, ul Prusa 14, 08-110 Siedlce,  
kalembasa@ap.siedlce.pl

Badania glebowe prowadzono w wybranych kompleksach leśnych (LMśw, BMśw, Bśw) Niziny Południowopodlaskiej o możliwie małym wpływie antropogenicznym na przebieg procesów pedogenicznych (leśne rezerваты przyrody, starodrzewy). Obiektami badań było 12 dobrze wykształconych profili gleb rdzawych właściwych, bielkowo-rdzawych i bielcowych. W wyróżnionych poziomach organicznych (n=30) i mineralnych (n=61) oznaczono podstawowe właściwości gleb metodami powszechnie stosowanymi w laboratoriach gleboznawczych. Zawartość metali oznaczono na atomowym spektrometrze emisyjnym z indukcyjnie wzbudzoną plazmą (ICP-AES), po mineralizacji próbek na „sucho” (w temperaturze 450°C) i sporządzeniu wyciągów pierwiastków w 20% HCl. Badania prowadzono w trzech powtórzeniach, a otrzymane wyniki obliczono w stosunku do absolutnie suchej masy gleby. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie (średnia, odchylenie standardowe, korelacja prosta), obliczono współczynniki wzbogacenia w metale poziomów organicznych i mineralnych (w stosunku do ich zawartości w skale macierzystej).

W badanych glebach bielicoziemnych na zawartość cynku, miedzi i niklu największy wpływ miała naturalna zasobność skały macierzystej, akumulacja biologiczna oraz antropogenizacja środowiska. Profilowe rozmieszczenie badanych metali ciężkich zróżnicowały procesy pedologiczne, a zwłaszcza wytworzenie się poziomów organicznych i próchnicznych oraz proces bielicowania i (w mniejszym stopniu) rdzawienia. Największą zawartość metali stwierdzono w poziomach organicznych. W poziomach mineralnych ich zawartość wyraźnie zmniejszała się wraz z głębokością profilu (przy modyfikującym wpływie procesu bielicowania). Badane leśne gleby Niziny Południowopodlaskiej należy raczej zaliczyć do gleb o naturalnej zawartości cynku, miedzi i niklu. Tylko w niektórych poziomach organicznych stwierdzono niewielkie przekroczenie dopuszczalnych zawartości Zn ( $>100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i Ni ( $>35 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Najsilniejsze związki korelacyjne stwierdzono pomiędzy zawartością badanych metali a zawartością materii organicznej, pojemnością sorpcyjną i stosunkiem C/N, a w poziomach mineralnych także z zawartością żelaza, glinu i ilastej frakcji glebowej.

## **ŻELAZO, GLIN I MANGAN W GLEBACH TORFOWO-MURSZOWYCH DOLINY GÓRNEGO LIWCA**

D. KALEMBASA, K. PAKUŁA, M. BECHER

Katedra Gleboznawstwa i Chemii Rolniczej, Akademia Podlaska, 08-110 Siedlce, ul. Prusa 14;  
tel. (025)6431287; kalembasa@ap.siedlce.pl

Dolina rzeczna oraz powytopiskowe zagłębienia sprzyjają akumulacji materiału glebotwórczego, który może być objęty bagiennym procesem glebotwórczym. Zróżnicowanie fizjograficzne i hydrologiczne terenu, różne sposoby użytkowania oraz zabiegi melioracyjne wpływają na dużą zmienność glebową w dolinie rzeki Liwiec. Rzeka ta jest lewobrzeżnym dopływem dolnego Bugu i jedną z większych na terenie Niziny Południowopodlaskiej.

Celem badań było oznaczenie zawartości żelaza, glinu i manganu w płytkich i średnio głębokich glebach torfowo-murszowych (12 profili) o zróżnicowanym stopniu zmurszenia, zlokalizowanych na trwałych użytkach zielonych pierwszego tarasu zalewowego górnego biegu rzeki Liwiec oraz ocena wpływu procesów pedogenicznych i stopnia antropopresji na zawartość i rozmieszczenie tych pierwiastków w profilu glebowym.

W materiale glebowym oznaczono podstawowe właściwości fizykochemiczne i chemiczne metodami powszechnie stosowanymi w laboratoriach gleboznawczych. Zawartość ogólną Fe, Al i Mn oznaczono metodą ICP–AES. Analizy prowadzono w trzech powtórzeniach, a otrzymane wyniki obliczono w stosunku do absolutnie suchej masy gleby. W warstwach murszu (Mt), torfu (Otni) oraz podłożu mineralnych (D) badanych gleb, stwierdzono zróżnicowaną zawartość analizowanych metali. Średnie zawartości tych pierwiastków ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) można ułożyć w następujące szeregi malejących wartości dla warstw murszu (Mt): Fe (24300) > Al (3380) > Mn (547); torfu (Otni): Fe (13400) > Al (2710) > Mn (182); dla podłożu mineralnych (D): Al (1500) > Fe (1330) > Mn (30,7).

Warstwy murszu w stosunku do warstw torfu zawierały więcej żelaza, glinu i manganu. Wzbogacenie warstw powierzchniowych w te pierwiastki świadczy o ilościowych i jakościowych przeobrażeniach masy glebowej pod wpływem procesu murszenia materii organicznej oraz wytrącenie ich w strefie aeracji wraz z kongrecjami żelazistymi, co jest charakterystyczne dla gleb, w których dynamicznie zmienia się położenie wody kapilarnej w profilu glebowym.

## MANGAN, WANAD I NIKIEL W ORGANIZMACH PTAKÓW DRAPIEŻNYCH

E. KALISIŃSKA, H. BUDIS, O. KAPCZYŃSKA, E. MIKOŁAJSKA

Katedra Zoologii, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Akademia Rolnicza w Szczecinie;  
ul. Doktora Judyma 20, 71-466 Szczecin, elzbieta.kalisinska@biot.ar.szczecin.pl

W wykrywaniu poważnych zagrożeń środowiska wynikających z działalności człowieka ptaki drapieżne odgrywały istotną rolę w przeszłości i nadal stanowią cenne źródło informacji o jego zanieczyszczeniach, w tym metalami ciężkimi. W organizmach ptaków drapieżnych z rzędu *Falconiformes*, stanowiących końcowe ogniwa łańcuchów pokarmowych, nagromadzają się znaczne ilości różnych metalicznych pierwiastków śladowych, wśród których pewne pełnią ważne funkcje fizjologiczne u stałocieplnych kręgowców (żelazo, cynk, miedź, chrom, molibden i kobalt), rola innych nie jest jeszcze w pełni poznana i przez WHO są klasyfikowane jako prawdopodobnie niezbędne dla człowieka (mangan, wanad, nikiel), a inne uznano za wybitnie toksyczne – ołów, kadm i rtęć (HRAG 2007). U ptaków drapieżnych rzadko określa się stężenia manganu, wanadu i niklu, a w Polsce istnieją jedynie pojedyncze prace na ten temat (Falandysz i in. 2000, Kalisińska i in. 2008), chociaż ekotoksykolodzy coraz częściej podkreślają konieczność pogłębiania studiów nad tymi pierwiastkami ze względu na ich coraz większe rozpowszechnianie w środowisku przyrodniczym. Dotyczy to zwłaszcza manganu, którego związki dodawane są do tzw. paliw bezołowiowych. W badaniach zanieczyszczenia środowiska metalami ciężkimi z wykorzystaniem dziko żyjących zwierząt (bioindykatorów) do właściwej interpretacji wyników niezbędne jest poznanie ich stężeń odzwierciedlających tło geochemiczne oraz gromadzenie rozmaitych danych porównawczych. W niniejszej pracy podjęto próbę oceny stężeń trzech pierwiastków – manganu, wanadu i niklu – w mózgowiu i wątrobie pustułki (*Falco tinnunculus*, n=9) i myszołowa (*Buteo buteo*, n=9), które zginęły w różnych okolicznościach. Oba te gatunki reprezentują rząd Falconiformes, a liczebność ich populacji w Europie szacuje się odpowiednio na ponad 330 oraz 710 tys. par lęgowych i są one określane jako stabilne (BirdLife International, 2004). Spośród trzech badanych metali największe stężenia osiągał mangan: w wątrobie wahało się ono od 4,41 do 24,07, a w mózgowiu od 1,09 do 1,93 mg/kg mokrej masy. U obu gatunków w wątrobie było ono większe w porównaniu do mózgowia ( $p \leq 0,001$ ), przy czym nie stwierdzono żadnych statystycznie istotnych różnic między myszołowem a pustułką (do porównań zastosowano nieparametryczny test U Manna-Whitneya). Koncentracja wanadu w wątrobie wahała się od 0,097 do 1,444, a w mózgowiu od 0,107 do 1,424 mg/kg m.m. U pustułki średnie stężenia tego metalu w obu narządach były zbliżone, ale u myszołowa było ono wyraźnie większe w mózgowiu niż w wątrobie ( $p \leq 0,05$ ). Myszołów miał więcej wanadu w mózgowiu ( $p \leq 0,05$ ) i wątrobie ( $p \leq 0,01$ ) w porównaniu do pustułki. W zasadzie najmniejsze stężenia obserwowano w przypadku niklu (w mózgowiu nie przekraczały one wartości 0,260, a w wątrobie 0,230 mg/kg m.m.). Średnie stężenia niklu w badanych narządach były u obu gatunków podobne. Jednakże w wątrobie jednej pustułki wykryto niemal 2 mgNi/kg m.m. Zarówno w mózgowiu, jak i wątrobie średnie stężenie niklu osiągało większe wartości u pustułki niż u myszołowa (odpowiednio  $p \leq 0,03$  i  $p \leq 0,02$ ).

## **WSTĘPNA OCENA RYZYKA EKOLOGICZNEGO NA TERENIE ROLNICZYM NARAŻONYM NA ODDZIAŁYWANIE WWA**

Agnieszka KLIMKOWICZ-PAWLAS, Barbara MALISZEWSKA-KORDYBACH,  
Bożena SMRECZAK, Beata SUSZEK

Zakład Gleboznawstwa Erozji i Ochrony Gruntów, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa –  
Państwowy Instytut Badawczy ul. Czarotoryskich 8, 24-100 Puławy; e-mail: agnes@iung.pulawy.pl

Najistotniejszą funkcją dla gleb użytkowanych rolniczo jest funkcja produkcyjna gleby, w ogromnym stopniu uzależniona od czynników biologicznych, czyli od możliwości pełnienia przez glebę roli siedliska dla organizmów glebowych oraz roślin (Maliszewska-Kordybach i Smreczak 2003). Jednym z głównych zagrożeń dla siedliskowych funkcji gleb użytkowanych rolniczo jest zanieczyszczenie substancjami chemicznymi, w tym związkami organicznymi z grupy WWA. Zbyt wysoka zawartość zanieczyszczeń może wpływać negatywnie na organizmy glebowe, na obniżenie bioróżnorodności i pogorszenie jakości gleb (Maliszewska-Kordybach i in. 2007). Ze względu na ogromną różnorodność zarówno czynników stwarzających zagrożenie i substancji zanieczyszczających, jak i organizmów, dla których istnieje ryzyko narażenia na stres, problem oceny ryzyka jest zagadnieniem bardzo trudnym.

Ocena ryzyka ekologicznego (ERA) jest procesem, w którym ocenia się prawdopodobieństwo wystąpienia negatywnych skutków ekologicznych w wyniku narażenia na oddziaływanie jednego lub więcej czynników (US EPA 1998). Proces ten obejmuje trzy podstawowe etapy: 1) sformułowanie problemu, 2) analizę i 3) ocenę ryzyka. Pierwszy etap polega na wyznaczeniu celów i opracowaniu metodyk badań. Celem tego etapu jest uzyskanie odpowiedzi na pytanie, jak potencjalne zanieczyszczenie może wpłynąć na strukturę i funkcje ekosystemu. Etap analizy obejmuje ocenę dróg narażenia na oddziaływanie badanego czynnika (stresora) i ocenę zależności pomiędzy oddziaływaniem stresora i efektami ekologicznymi. W trzeciej fazie ocenia się ryzyko ekologiczne poprzez integrację profili narażenia i reakcji wybranych organizmów na oddziaływanie czynników powodujących zagrożenia (US EPA 1998, Tarazona i Vega 2002). Celem pracy było przeprowadzenie wstępnych etapów oceny ryzyka na wybranym obszarze użytków rolnych w sferze oddziaływania źródła zanieczyszczenia substancjami chemicznymi.

Jako teren badań do oceny ryzyka ekologicznego związanego z obecnością zanieczyszczeń organicznych w glebach wytypowano tereny użytkowane rolniczo (ok. 100 km<sup>2</sup>) zlokalizowane w pobliżu miejscowości Czerwionka w południowo-zachodniej części Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego (woj. Śląskie, powiat rybnicki). Obszar ten zlokalizowany jest w rejonie oddziaływania koksowni, zakładów produkcji asfaltu oraz hałd pokopalnianych. Wyboru terenu dokonano w oparciu o wyniki badań wstępnych, które wskazywały na wysoką zawartość WWA w glebach. Z badanego obszaru pobrano 24 próbki gleb, które scharakteryzowano pod względem właściwości gleb oraz zawartości WWA i wybranych metali ciężkich. Wyznaczono wskaźniki poziomu zanieczyszczenia badanych gleb przez WWA (w oparciu o aktualne regulacje prawne i kryteria jakości gleb) i wytypowano punkty badawcze o zwiększonym ryzyku ekologicznym, wymagające dalszych badań ekotoksykologicznych.

## **EURO-SOILS I SIM-EURO-SOILS - GLEBOWE MATERIAŁY REFERENCYJNE W BADANIACH EKOTOKSYKOLOGICZNYCH**

Barbara MALISZEWSKA-KORDYBACH, Agnieszka KLIMKOWICZ-PAWLAS,  
Bożena SMRECZAK

Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa-Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Gleboznawstwa,  
Erozji i Ochrony Gruntów, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy

W badaniach ekotoksykologicznych prowadzonych w środowisku glebowym, dobór właściwych materiałów referencyjnych ma podstawowe znaczenie ze względu na istnienie zależności pomiędzy obserwowanymi efektami i właściwościami gleb [1]. Zastosowanie nieodpowiednich materiałów może w istotny sposób zniekształcać uzyskane wyniki i prowadzić do fałszywych wniosków. Pomimo licznych prób podejmowanych przez odpowiednie organizacje międzynarodowe działające w tym zakresie (np. OECD, ISO TC190) problem ten do chwili obecnej nie znalazł zadowalającego rozwiązania. Testy ekotoksyczności prowadzone są zasadniczo w dwóch celach: a/ oceny ekotoksyczności substancji chemicznych wprowadzanych do gleb (np. w celach rejestracji nowych substancji chemicznych), b/ oceny właściwości ekotoksycznych gleb zanieczyszczonych (np. w celu oceny ryzyka) [2,4]. W pierwszym przypadku glebą referencyjną (kontrolną) jest przeważnie gleba wykorzystywana w badaniach, ale bez dodatku badanej substancji. Natomiast w drugiej sytuacji problem jest trudniejszy. Zgodnie z zaleceniami ISO, może to być gleba nie zanieczyszczona o właściwościach „tak zbliżonych do gleby badanej, jak jest to możliwe” lub sztuczna mieszanina tzw. „gleba OECD”. Obydwa rozwiązania budzą wiele wątpliwości i nie ułatwiają porównywania wyników.

Jednym z alternatywnych proponowanych rozwiązań jest wykorzystanie wybranej grupy gleb typowych dla określonych obszarów geograficznych w Europie, tzw. „EURO-Soils”. Zidentyfikowano siedem gleb reprezentujących wybrane obszary w krajach „starej UE” [2,3]; gleby te jednak są dostępne w bardzo ograniczonym zakresie. Zaproponowano więc [2] posługiwanie się w badaniach glebami referencyjnymi o charakterystyce zbliżonej do właściwości EURO-Soils (tzw. SIM-EURO-Soils), podkreślając równocześnie brak odpowiednich informacji z zakresu dostępności tych gleb na szerszych obszarach (np. w aktualnych granicach UE) [4]. Celem przedstawionej pracy była ocena możliwości wykorzystywania odpowiednich materiałów referencyjnych w badaniach ekotoksyczności w środowisku glebowym oraz określenie możliwości identyfikacji gleb o właściwościach odpowiadających SIM-EURO-Soils na terenie Polski.



## STĘŻENIA WYBRANYCH PIERWIĄTKÓW TOKSYCZNYCH W OSOCZU CHORYCH Z PRZEWLEKŁYM ZAPALENIEM, STANAMI PRZEDRAKOWYMI I RAKIEM KRTANI

Maciej RUTKOWSKI<sup>1</sup>, Krzysztof GRZEGORCZYK<sup>3</sup>, Elżbieta RAPACKA<sup>2</sup>,  
Alicja LIPKA-KOCISZEWSKA<sup>4</sup>

Uniwersytet Medyczny w Łodzi: <sup>1</sup>Katedra Chemii i Biochemii Klinicznej, <sup>2</sup>Zakład Fizjologii Człowieka  
Katedry Nauk Podstawowych i Przedklinicznych; <sup>3</sup>Pracownia Endoskopii Zabiegowej Wojewódzkiego  
Specjalistycznego Szpitala im. Wł. Biegańskiego w Łodzi; <sup>4</sup>Oddział Laryngologii Wojewódzkiego  
Specjalistycznego Szpitala im. M. Pirogowa w Łodzi

Czynnikami zwiększonego ryzyka zapadalności mieszkańców dużych miast na nowotwory są m.in. emisje i ścieki z zakładów przemysłowych, smog wielkomiejski oraz niektóre metale mające styczność z wodą pitną i żywnością. Do powstawania zmian nowotworowych w gardzieli i krtani przyczyniają się pochodzące z powyższych źródeł pierwiastki toksyczne. Celem pracy była ocena stężeń glinu (Al), ołowiu (Pb) i kadmu (Cd) w osoczu osób z wymienionymi niżej chorobami krtani i ich porównanie z wynikami uzyskanymi dla osób zdrowych. Badaniami objęto 4 grupy dorosłych osób obojga płci: I (kontrolna) – 33 zdrowych, II – 33 chorych z przewlekłym zapaleniem krtani, III – 33 chorych ze stanami przedrakowymi krtani, IV – 34 chorych z rakiem krtani. Próbkę osocza pobieranej od nich krwi mineralizowano mieszaniną 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 65% HNO<sub>3</sub> (1:4, v/v) z ogrzewaniem w piecu mikrofalowym przez 45 minut. Po ostudzeniu i rozcieńczeniu wodą dejonizowaną poddawano je oznaczeniom metodą atomowej spektrometrii emisyjnej z indukcyjnym wzbudzeniem plazmowym (AES-ICP). Stężenia wszystkich oznaczanych pierwiastków były największe w grupie IV (Al 4,98±1,08; Pb 7,7±2,1; Cd 0,043±0,006 µg/100 cm<sup>3</sup>), wykazując znamienne statystycznie różnice (p<0.05) wobec wartości dla grupy I oprócz kadmu (Al 3.86±0.97; Pb 6.9±2,0; Cd 0,040±0,007 µg/100 cm<sup>3</sup>). Dla Pb znamienne też były wszystkie różnice jego stężeń wśród grup I-III, dla Cd tylko między grupą I a III, natomiast dla Al nie stwierdzono żadnej znamienności różnic stężeń między grupami I, II i III. Uzyskane wyniki wskazują na współzależność między wielkością stężenia Pb w osoczu, a stadiami rozwoju raka krtani, świadcząc o istotnym wpływie tego pierwiastka na proces karcynogenezy. Odnośnie Cd należy sądzić, że przyczynia się on do wczesnych stadiów zmian rakowych krtani, a Al oddziałuje na ich końcową fazę. Oznaczanie stężeń powyższych pierwiastków w osoczu może być więc pomocne w diagnostyce raka krtani.

## BIOMONITORING ZANIECZYSZCZENIA RÓŻNORODNYCH ŚRODOWISK FLUOREM PRZY UŻYCIU PTAKÓW

Wiesław SALICKI, Elżbieta KALISIŃSKA

Akademia Rolnicza w Szczecinie, Katedra Zoologii, ul. T. Judyma 20, 71-466 Szczecin

Badaniami zawartości fluoru w popiele i suchej masie kości skokowych (*tarsometatarsus*) objęto pięć gatunków ptaków: roślinożernego grzywacza (*Columba palumbus*) związanego ze środowiskiem lądowym, wszystkożerną krzyżówkę (*Anas platyrhynchos*), która zdobywa pokarm w środowisku lądowo-wodnym oraz ogorzalkę (*Aythya marila*), lodówkę (*Clangula hyemalis*) i gągoła (*Bucephala clangula*) odżywiające się pokarmem zwierzęcym w środowisku wodnym. W przypadku grzywacza (n=176), krzyżówki (n=77) i ogorzalki (n=68) badania przeprowadzono na dwóch grupach wiekowych: młodych – do pierwszego roku życia i dorosłych – powyżej pierwszego roku życia. Lodówka (n=15) i gągoł (n=9) reprezentowane były tylko przez młode osobniki. Wszystkie badane ptaki pochodziły z terenu północno-zachodniej Polski: okolic Szczecina, Zalewu Szczecińskiego i wybrzeża Bałtyku. Porównania osobników młodych i dorosłych (grzywacz, krzyżówka i ogorzalka) ujawniły bardzo wyraźne różnice w stężeniach fluoru zarówno w popiele, jak i suchej masie kości. W każdym przypadku dużo więcej fluoru stwierdzono u dorosłych osobników. Spośród zbadanych gatunków ptaków najwięcej fluoru w kościach dorosłych osobników wykryto u wszystkożernej krzyżówki związanej ze otwartymi wodami śródlądowymi. Najmniej tego pierwiastka stwierdzono u roślinożernego i żerującego wyłącznie na lądzie grzywacza. Przeprowadzona analiza porównawcza wykazała, że istnieje wyraźna różnica (jedynie w przypadku dorosłych osobników) pomiędzy stężeniem fluoru w popiele kości ptaków odżywiających się pokarmem roślinnym i żerującym na lądzie (grzywacz) a ptakami pobierającymi z wody i lądu dietę mieszaną – roślinno-zwierzęcą (krzyżówka). Stwierdzono, że nie różniły się między sobą wymienionym parametrem grzywacz i kaczki pobierające zwierzęcy pokarm wyłącznie w wodzie. Żadnych różnic, w omawianym aspekcie, nie odnotowano w przypadku stężeń fluoru w suchej masie kości. Stwierdzono przydatność różnych gatunków ptaków do biomonitoringowych studiów nad zanieczyszczeniem środowiska fluorem, przy czym konieczne jest uwzględnienie ich wieku.

Praca naukowa sfinansowana ze środków przeznaczonych na naukę w latach 2004–2006 jako projekt badawczy 2 P04G 020 27.

## WPLYW WIEKU, PŁCI I ŚRODOWISKA NA ZAWARTOŚĆ MIEDZI WE WŁOSACH MIESZKAŃCÓW POMORZA ŚRODKOWEGO

Czesława TROJANOWSKA\*, Piotr TROJANOWSKI\*\*, Jan TROJANOWSKI\*,  
Józef ANTONOWICZ\*

\*Pomorska Akademia Pedagogiczna, Zakład Chemii Środowiskowej, ul. Arciszewskiego 22,  
76-200 Słupsk, trojanowski@pap.edu.pl, \*\*Szpital Psychiatryczny „Dziekanka”, 62–200 Gniezno

W latach 2003–2006 przeprowadzono badania włosów pochodzących od 416 osób z Pomorza Środkowego. Osoby te reprezentowały szerokie spektrum wiekowe, od 10-miesięcznego dziecka do 75-letniej osoby starszej. Do badań dobierano je w sposób losowy. Badania miały na celu ustalić zależność między zawartością miedzi we włosach ludzkich a ich wiekiem, płcią, wagą, wzrostem, stanem zdrowia, sposobem odżywiania, środowiskiem i barwą włosów. Wszystkie badane osoby podzielono na cztery grupy wiekowe: I – poniżej 16 lat, II – od 16 do 25 lat, III – od 26 do 50 lat i IV – powyżej 50 lat. Na podstawie zebranych wyników stwierdzono, że ilość kumulowanej miedzi we włosach badanych ludzi zależała w istotny sposób od wszystkich wymienionych wyżej czynników z wyjątkiem płci, wzrostu i wagi. Najwięcej tego metalu gromadziły włosy młodzieży (II grupa wiekowa) – średnio 15,6 µg/g, przy szerokim zakresie 5,8–32,0 µg/g. Włosy III i IV grupy wiekowej zawierały średnio taką samą ilość miedzi – około 11 µg/g. W II i III grupie wiekowej zawartość miedzi we włosach zmniejszała się wraz z wiekiem, charakteryzując się istotnym współczynnikiem korelacji ( $r=0,63$ ). Stwierdzono, że osoby spożywające produkty mleczne i mięsne zawierały we włosach przeszło 50% więcej miedzi niż ludzie, którzy unikali tych potraw. Natomiast osoby, których głównym pokarmem były produkty mleczne zawierały podobną ilość miedzi co osoby, które spożywały głównie potrawy mięsne. Osoby mieszkające na wsi zawierały mniej tego metalu (około 14%) niż mieszkające w miastach. Jedynie wśród dzieci nie obserwowano istotnych różnic. Włosy rude wykazały większą zdolność do akumulacji miedzi niż włosy o innej barwie. Zawartość cynku we włosach wiązała się również ze stanem zdrowia. Osoby zdrowe zawierały przeciętnie 12,4 µg/g miedzi we włosach, osoby chore na cukrzycę typu II – 14,5 µg/g, a osoby z miażdżycą 9,2 µg/g.

## ZALEŻNOŚĆ MIĘDZY ZAWARTOŚCIĄ Pb I Cd WE WŁOSACH A MIEJSCEM ZAMIESZKANIA, SPOSOBEM ODŻYWIANIA I STANEM ZDROWIA

Jan TROJANOWSKI\*, Piotr TROJANOWSKI\*\*

Pomorska Akademia Pedagogiczna, Zakład Chemii Środowiskowej, ul. Arciszewskiego 22,  
76–200 Słupsk, trojanowski@pap.edu.pl, \*\*Szpital Psychiatryczny „Dziekanka”, 62–200 Gniezno

Analiza włosów od wielu lat znalazła zastosowanie nie tylko w diagnostyce i patologii klinicznej, ale również w toksykologii sądowej i w określaniu stopnia odżywienia organizmu. W ostatnim dziesięcioleciu włosy są wykorzystywane do biologicznego monitoringu ekspozycji zawodowej i środowiskowej na metale ciężkie. Oznaczanie tych pierwiastków we włosach określonej populacji może służyć jako sposób wykrywania terenów nadmiernie zanieczyszczonych przez poszczególne metale oraz do porównania rozmiaru skażeń różnych środowisk. W latach 2003–2006 zbadano 416 osób w wieku 1÷75 lat, w tym 210 płci żeńskiej i 206 płci męskiej. Badaną populację podzielono na cztery grupy wiekowe. W próbkach pobranych włosów oznaczano zawartość ołowiu i kadmu przy pomocy spektrofotometru absorpcyjnego AAS-3. Średnia zawartość ołowiu we włosach badanych osób wynosiła 3,20 µg/g, a kadmu 0,284 µg/g. Największą zawartość ołowiu (około 3,88 µg/g) stwierdzono we włosach osób z grupy wiekowej 61÷75 lat, a kadmu (0,406 µg/g) z grupy wiekowej 26÷50 lat. Natomiast najmniejszą (dla obydwu metali odpowiednio 2,07 i 0,152 µg/g) – z grupy wiekowej 0÷15 lat. Większość osób (przeszło 50%) zawierała we włosach od 2,01 do 4,00 µg/g ołowiu i około 40% osób zawierało od 0,001 do 0,300 µg/g. Przeprowadzone badania wykazały istotną zależność koncentracji ołowiu i kadmu we włosach w zależności od płci badanych osób. Włosy kobiet zawierały mniej Pb (średnio 2,63 µg/g) i Cd (średnio 0,236 µg/g) niż włosy mężczyzn (odpowiednio 3,79 i 0,334 µg/g). Środowisko, w którym żyją badane osoby również w istotny sposób wpływa na kumulację tych metali w ich włosach. Mieszkańcy wsi zawierali znacznie mniej tych metali (średnio Pb – 2,39, Cd – 0,214 µg/g) niż mieszkańcy miasta (odpowiednio 4,17 i 0,361 µg/g). Na zawartość Pb i Cd we włosach ma również wpływ sposób odżywiania się. Osoby, które nie unikały konsumpcji produktów mięsnych i mlecznych zawierały we włosach najwięcej tych metali (średnio Pb – 3,54 µg/g, Cd – 0,315 µg/g), natomiast osoby, które unikały w swojej diecie tych produktów zawierały najmniej ołowiu i kadmu (odpowiednio 2,08 i 0,141 µg/g). Przeprowadzone badania wykazały również, że kumulacja tych metali we włosach ściśle wiązała się ze stanem zdrowia badanych osób. Osoby chorujące na rozrost gruczołu krokowego, niedokrwistość i alergicy zawierali we włosach znacznie więcej ołowiu niż osoby zdrowe (3,05 µg/g). Znacznie ponad poziom kadmu odpowiadający osobom bez objawów chorobowych (0,257 µg/g) mieli we włosach chorzy na niewydolność nerek, miażdżycę, rozrost gruczołu krokowego oraz alergicy. Z kolei osoby chorujące na nadciśnienie tętnicze miały we włosach znacznie mniejsze ilości tych metali (odpowiednio 1,73 i 0,182 µg/g).

## TOKSYCZNOŚĆ HODOWLI GRZYBÓW KSEROFILNYCH I KSEROTOLERANCYJNYCH W POŻYWKACH ZAWIERAJĄCYCH ODPAD GLICERYNOWY LUB GLICERYNĘ

K. ULFIG<sup>1</sup>, G. NAŁĘCZ-JAWECKI<sup>2</sup>, G. PŁAZA<sup>3</sup>, K. JANDA-ULFIG<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biomateriałów i Technologii Mikrobiologicznych, Instytut Polimerów, Politechnika Szczecińska, ul. Pułaskiego 10, 70-322 Szczecin; k\_ulfig@ps.pl; <sup>2</sup>Zakład Badania Środowiska, Wydział Farmacji, Warszawski Uniwersytet Medyczny, 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1; grzes@farm.amwaw.edu.pl;

<sup>3</sup>Zespół Mikrobiologii Środowiska, Zakład Biotechnologii Środowiskowych, Instytut Ekologii Terenów Przemysłowych, ul. Kossutha 6, 40-844 Katowice; pla@ietu.katowice.pl; <sup>4</sup>Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiska, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Akademia Rolnicza, ul. Słowackiego 17, 71-434 Szczecin; kjanda@agro.ar.szczecin.pl.

Przy produkcji paliwa Biodiesel powstają duże ilości gliceryny. W procesie destylacji gliceryna oczyszczana jest w stopniu umożliwiającym jej wykorzystanie w przemyśle kosmetycznym i farmakologicznym. W procesie tym wytwarzany jest jednak toksyczny odpad, zawierający glicerynę, mono- i diglicerydy oraz znaczne ilości związków mineralnych (pozostałość po prażeniu w 600 °C – 20,5%), zwłaszcza potasu i siarczanów. Ponieważ odpad ten stanowi znaczące obciążenie dla środowiska, uzasadnione jest poszukiwanie technologii mających na celu jego unieszkodliwienie.

Wyniki badań Ulfiga i wsp. (2008) wskazują, że rozcieńczony w pożywce mineralnej odpad glicerynowy utylizowany jest przez grzyby kserofilne i kserotolerancyjne. Grzyby te przystosowane są do wzrostu w warunkach niskiej aktywności wody i mogą wykorzystywać glicerynę jako źródło węgla i energii (Samson i wsp., 2000). Celem pracy było określenie, jak utylizacja przez grzyby odpadu glicerynowego oraz czystej chemicznie gliceryny wpływa na toksyczność przesączów pochodzących.

Przeprowadzono dwie serie doświadczeń mające na celu określenie produkcji suchej masy i ubytku gliceryny w hodowli mieszanej szczepów *Eurotium herbariorum* L1 i *Aspergillus tubingensis* L2, wyodrębnionych z zapleśniałych suszów ziołowych. W pierwszej serii do płynnej pożywki mineralnej Czapka wprowadzono azotan amonowy w ilości 6 i 12 g/dm<sup>3</sup> lub pepton (enzymatyczny hydrolizat kazeiny) w ilości 20 i 40 g/dm<sup>3</sup> oraz odpad glicerynowy w ilości 45 i 180 g/dm<sup>3</sup>, a w drugiej - zamiast odpadu glicerynowego do pożywki dodano glicerynę (cz.d.a.; POCh) w ilości 30 i 110 g/dm<sup>3</sup>. Odczyn (pH) pożywek wynosił 7,0. Pożywki rozlewano do kolbek Erlenmeyera o pojemności 300 cm<sup>3</sup> w ilości 200 cm<sup>3</sup> na każdą. Próbkę inokulowano zawiesiną zarodników. Kontrolę stanowiły próbki niezaszczepione zarodnikami. Inkubacja z wytrząsaniem próbek trwała 14 dni w 25°C. Doświadczenia przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Suchą masę próbek oznaczano metodą gravimetryczną. Zawartość gliceryny w przesączach oznaczano według European Pharmacopoeia 2005:496, zawartość węgla organicznego - analizatorem Shimadzu TC, a ChZT - metodą miareczkową.

W analizie toksykologicznej przesączów pochodzących wykorzystano test Microtox<sup>®</sup>. Wyniki toksyczności podano jako EC<sub>50</sub>, czyli stężenie wywołujące 50% reakcję bakterii testowych *Vibrio fischeri*. Wartości te przeliczono na jednostki toksyczności TU = 1/EC<sub>50</sub> \* 100%.

W pierwszej serii doświadczeń wysokie wartości ubytku gliceryny (56–76%) uzyskano w pożywce zawierającej pepton; w pożywce z azotanem amonowym ubytek gliceryny był znacząco niższy (0–17%). Wysoką produkcję suchej masy netto uzyskano w hodowli grzybów w pożywce z peptonem i odpadem glicerynowym (19–67 g/dm<sup>3</sup>); w pożywkach z azotanem amonowym produkcja suchej masy była znacząco niższa (6,5–10,5 g/dm<sup>3</sup>). Wartości TU<sub>15min</sub> dla próbek kontrolnych mieściły się w zakresie od 24,5 do 102,5, a dla próbek inokulowanych grzybami – w zakresie od 7,7 do 33,4. Stwierdzono dodatnie korelacje pomiędzy wartościami TU<sub>15min</sub> a zawartością gliceryny ( $r = 0,58$ ), TOC (0,76) i ChZT (0,66), na poziomie istotności  $p \leq 0,05$ .

W drugiej serii doświadczeń wysokie wartości ubytku gliceryny (72–91%) uzyskano w pożywce zawierającej pepton, jak również w pożywce zawierającej azotan amonowy w ilości 6 g/dm<sup>3</sup> (64–77%). Najwyższą wartość produkcji suchej masy netto uzyskano w hodowli grzybów w pożywce z peptonem w ilości 40 g/dm<sup>3</sup> (41,5–43 g/dm<sup>3</sup>), a najniższą – w hodowli grzybów w pożywce zawierającej azotan amonowy w ilości 6 g/dm<sup>3</sup> (7–8 g/dm<sup>3</sup>). Wartości TU<sub>15min</sub> dla próbek kontrolnych mieściły się w zakresie od 1,1 do 5,7, a dla próbek inokulowanych grzybami – w zakresie od 6,3 do 13. Na poziomie istotności  $p \leq 0,05$ , nie stwierdzono korelacji pomiędzy wartościami TU<sub>15min</sub> a zawartością gliceryny, TOC i ChZT.

Wyciągnięto następujące wnioski: (1) pożywka zawierająca odpad glicerynowy charakteryzowała się znaczną toksycznością; zgodnie z zasadami klasyfikacji ścieków (Persoone i wsp., 2003) większość badanych próbek (81%) należała do klasy IV (wysoka ostra toksyczność;  $10 < TU < 100$ ), a dwie próbki miały bardzo wysoką ostrą toksyczność, tzn.  $TU > 100$ ; (2) gliceryna nie była głównym determinantem toksyczności odpadu; (3) grzyby spełniały funkcję detoksykacyjną w pożywkach zawierających odpad glicerynowy, nawet przy małym ubytku gliceryny i niskiej produkcji suchej masy; (4) grzyby produkowały substancje toksyczne (zapewne różne metabolity wtórne), ale ich toksyczność była mała w porównaniu z toksycznością odpadu glicerynowego.

## AKTYWNOŚĆ DEHYDROGENAZ, UREAZY I FOSFATAZ W GLEBIE ZANIECZYSZCZONEJ BENZYNĄ

Jadwiga WYSZKOWSKA, Mirosław WYSZKOWSKI  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, pl. Łódzki 3, 10-727 Olsztyn,  
jadwiga.wyszowska@uwm.edu.pl

Zanieczyszczenie środowiska naturalnego związkami ropopochodnymi stanowi bardzo poważny problem, a produkty przemysłu petrochemicznego: węglowodory alifatyczne, olefinowe, naftenowe oraz aromatyczne znajdują się na czele listy najbardziej niebezpiecznych ksenobiotyków. Zanieczyszczenia te przyczyniają się do utraty biologicznej sprawności gleby nawet na wiele lat. Naruszają jej strukturę, powodują pogorszenie właściwości powietrzno-wodnych i chemicznych, a w efekcie także zachwianie równowagi biologicznej. Dlatego też przeprowadzono doświadczenie, którego celem było określenie wpływu zanieczyszczenia benzyną na kształtowanie się biochemicznych właściwości gleby oraz wykazanie czy aplikacja kompostu, bentonitu oraz wapna może przywrócić jej równowagę biologiczną. Badania przeprowadzono w hali wegetacyjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie w polietylenowych wazonach (w 4 powtórzeniach). Do badań wykorzystano materiał glebowy pobrany z poziomu orno-próchnicznego. Glebę zanieczyszczono benzyną w następujących ilościach: 2,5; 5 i 10 cm<sup>3</sup>/kg gleby. Doświadczenie przeprowadzono w czterech seriach: kompost w ilości 3%, bentonit w dawce 2% w stosunku do masy gleby i wapno w ilości odpowiadającej jednej pełnej kwasowości hydrolitycznej. Glebę przed umieszczeniem w wazonach przesiano przez sito o oczkach średnicy 1 cm<sup>2</sup> i wymieszano z nawozami mineralnymi oraz w odpowiednich obiektach z benzyną oraz kompostem, bentonitem i wapnem. Tak przygotowane próbki gleby (po 9,5 kg) umieszczono w wazonach, doprowadzono wilgotność do 60% kapilarnej pojemności wodnej i posiano rzepak jary (*Brassica napus* var. *oleiferd*) odmiany Mazowiecki. Po wschodach w każdym wazonie pozostawiono po 8 roślin. Bezpośrednio po zbiorze plonu głównego w fazie kwitnienia (58 dzień wegetacji) i pobraniu próbek do analiz biochemicznych wysiano jako roślinę następczą – owies (*Avena sativa* L.) odmiany Borowik. Po wschodach pozostawiono w wazonie po 15 roślin owsa. Zbiór owsa dokonano w fazie wysuwania wiech (52 dzień wegetacji) i powtórnie pobrano próbki glebowe do analiz. Przez cały czas trwania doświadczenia (110 d) utrzymywano stałą wilgotność na poziomie 60% kapilarnej pojemności wodnej. Analizy biochemiczne polegały na oznaczeniu: aktywności dehydrogenaz glebowych, ureazy, fosfatazy kwaśnej i fosfatazy alkalicznej. Wyniki zostały opracowane statystycznie z wykorzystaniem analizy wariancji dwuczynnikowej ANOYA.

W wyniku badań stwierdzono, że zanieczyszczenie gleby benzyną w ilości od 2,5 do 10 cm<sup>3</sup>/kg naruszało jej równowagę biochemiczną. Substancja ta, niezależnie od aplikacji kompostu, bentonitu i wapna oraz gatunku roślin ograniczała aktywność dehydrogenaz, ureazy i fosfatazy kwaśnej. Większy ujemny wpływ benzyny na aktywność ureazy i fosfatazy kwaśnej odnotowano w glebie spod rośliny głównej – rzepaku jarego niż rośliny następczej – owsa. W przypadku dehydrogenaz wystąpiły

zależności odwrotne. Największe zmiany aktywności testowanych enzymów stwierdzono w przypadku dehydrogenaz, a najmniejsze w aktywności ureazy. Aktywność fosfatazy alkalicznej w glebie spod rzepaku jarego wyraźnie wzrosła, podczas gdy po zbiorze owsa – malała (jednak w stosunkowo niewielkim zakresie w porównaniu do innych enzymów glebowych). Aplikacja do gleby kompostu, bentonitu i wapna okazała się skuteczna w łagodzeniu negatywnego wpływu benzyny na aktywność enzymów glebowych. Wzbogacenie gleby w kompost, bentonit i wapno stymulowało aktywność ureazy i fosfatazy alkalicznej oraz ograniczało aktywność fosfatazy kwaśnej. Wpływ bentonitu i wapna był większy niż kompostu. Wapno i w mniejszym zakresie kompost oddziaływały pozytywnie na aktywność dehydrogenaz w glebie, podczas gdy bentonit działał wyraźnie ujemnie, zwłaszcza w przypadku rośliny głównej – rzepaku jarego. Aktywność dehydrogenaz, ureazy i fosfatazy kwaśnej, w odróżnieniu od aktywności fosfatazy alkalicznej, była wyższa w glebie spod rzepaku jarego niż owsa.

Badania wykonano w ramach projektu własnego MNiSW nr 2P06S01628.



## **SELECTED PROBLEMS OF TOXICOLOGY, CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF FULLERENES**

P.K. ZARZYCKI, F.B. HARASIMIUK

Section of Toxicology and Bioanalytics, Department of Environmental Biology, Koszalin University of Technology, Śniadeckich 2, 75-453 Koszalin; Poland; e-mail pkzarcz@wp.pl;  
www.wbiis.tu.koszalin.pl/labtox/

Fullerenes are well-known sphere-shaped low molecular mass compounds (less than 1000) that are consisting of at least 60 or more carbon atoms. Because of their unique physical and chemical properties they are still within of an extensive interest for the number of research groups including toxicology and chromatography communities. Particularly, due to high electrophilicity, superior ability of generating singlet oxygens and high reactivity toward free radicals, fullerenes and their soluble in water derivatives, are an attractive target molecules for number of biological applications and medical technologies. The main goal of this research communication is to discuss an overall status and challenges for assessing of fullerenes toxicity, based on up-to date scientific literature review. Especially, trends and research needs in this relatively new toxicology field will be discussed. Moreover, the author's contribution concerning application of thermostated micro planar chromatography for fast separation and quantification of C60 and C70 fullerenes will be presented. Particularly, it has been found that C60/C70 fullerenes separation performed on HPTLC micro plates with a developing distance of 45 mm can be better for those observed on a 25 cm length analytical HPLC column, under similar conditions to that on carbon coverage of the stationary phase, n-hexane as the mobile phase and separation temperature. The advantage of the planar chromatographic separation of fullerenes presented is a short elution time of less than 6 minutes. Furthermore, the reported separation protocol shows a capability for the evaluation of fullerenes quantity in commercial samples [6]. In addition, an application of such simple and inexpensive method for sensitive and robust detection as well as fast quantification of C60/C70 fullerenes residues, which may be created during electric arch steel cutting technology, performed under air and underwater conditions will be discussed.

## APPLICATION OF THERMOSTATED MICRO PLANAR CHROMATOGRAPHY FOR FAST SEPARATION AND QUANTIFICATION OF COMPLEX SAMPLES CONSISTING OF SELECTED STEROIDS AND ALGAE DYES

P.K. ZARZYCKI, M.B. ZARZYCKA

Section of Toxicology and Bioanalytics, Department of Environmental Biology, Koszalin University of Technology, Śniadeckich 2, 75-453 Koszalin, Poland, pkzarz@wp.pl, www.wbiis.tu.koszalin.pl/labtox/

The main objective of present chromatographic studies was to explore the capability of temperature controlled micro thin-layer chromatography toward simultaneous separation and quantification of steroids complex mixtures consisting of testosterone and its derivatives including methyltestosterone, testosterone propionate, isobutyrate, phenylpropionate, isocaproate, enanthate and caprate as well as selected estrogens like estetrol, estriol, estradiol and estrone. Particularly, steroids standards were chromatographed on 5x5 cm glass plates covered with silica and wetttable with water octadecylsilica as well as aluminium oxide under saturated chamber conditions. TLC chamber unit was placed inside aluminum oven that was connected to circulating thermostat and separation temperature was set at 20°C. Chromatographic properties of steroids were investigated across whole range of binary mixtures from 0 to 100% (v/v) including methanol/water, acetonitrile/water, methanol/dichloromethane and acetone/n-hexane. Moreover, the effect of temperature ranging from minus 20 to plus 60°C under saturated and unsaturated chamber conditions was also investigated. It has been found that the best condition for testosterone and methyltestosterone separation can be obtained on aluminium oxide plates and mobile phases composed of more than 10% acetone in n-hexane. The best separation within testosterone esters group was observed on RP18W plates developed with methanol/water mobile phases. Interestingly, wetttable with water octadecylsilica covered plates may work as NP or RP system depends on the acetonitrile concentration in mobile phase. Moreover, our preliminary results indicate that micro TLC system investigated can be applied as a fast fractionation device or simple and robust quantitative tool for determination of testosterone residue containing testosterone derivatives in complex pharmaceutical, biological or environmental samples. High separation throughput of the micro-planar chromatography will be also demonstrated by presenting the results of application of the reported technique for efficient separation of the natural product extracts. Particularly, fast screening of the extraction process efficiency of the *Spirulina maxima* dyes from the pharmaceutical formulation using water based cyclodextrins solutions (native  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -CD and their hydroxypropyl derivatives) as well as organic liquids including methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, THF, acetonitrile, acetone, n-hexane, toluene and dichloromethane will be reported. Resulting matrix that is composed of the separated bands intensity (variables) for each extraction solvent (objects) will be explored using Cluster Analysis and Principal Component Analysis multivariate methods. Possible application of the reported quantification protocols for ecotoxicological studies will be discussed.

## DETERMINATION OF EDCS LIKE COMPOUNDS FROM SURFACE WATER SAMPLES USING TEMPERATURE DEPENDENT INCLUSION CHROMATOGRAPHY

P. K. ZARZYCKI, E. WŁODARCZYK, M. BARAN

Section of Toxicology and Bioanalytics, Department of Environmental Biology, Koszalin University of Technology, Śniadeckich 2, 75-453 Koszalin; Poland; e-mail pkzarz@wp.pl; www.wbiis.tu.koszalin.pl/labtox/

Quantification of Endocrine Disrupting Compounds (EDC's) in biological and environmental samples presents unique challenges for sample extraction, concentration and separation. Basic methodologies that are currently in use for measurements of such compounds, particularly steroid hormones, include RIA, mass spectrometry, chromatography and electrophoresis. All of them have significant limitations in scope, throughput and quantification. This is because EDCs are highly non-homogenous group of compounds that vary in concentration, polarity, structure, light-sensitivity, volatility and stability. Therefore, no one technology can effectively quantify whole range of EDCs and their metabolites that are present in complex biological or environmental samples. The first aim of this research communication is to present and discuss a simple optimization strategy for efficient SPE pre-concentration and isocratic HPLC separation of multicomponent mixtures composed of UV-non-transparent low molecular EDCs. The effect of temperature on separation efficiency and capability of temperature driven HPLC system for quantification of complex mixtures will be discussed from practical point of view. Particularly, this work was focused on separation of number of natural (a) and artificial steroids (b) as well as non-steroidal compounds (c) that may be considered as the environmental biomarkers for the endocrine disrupting phenomenon including:

- a) d-equilenin, equilin, estetrol, estriol, estrone,  $17\beta$ -estradiol,  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone,  $20\alpha$ -hydroxyprogesterone, cortisol, cortisone, progesterone, testosterone, tetrahydrocortisol and tetrahydrocortisone,
- b) ethynylestradiol, norgestrel isomers, medroxyprogesterone, mestranol, methyltestosterone, norethindrone,  $17\alpha$ -estradiol,
- c) diethylstilbesterol, bisphenol A, 4-tert-butylphenol, dimethyl phthalate, dibutyl phthalate and dioctyl phthalate.

The second aim of this contribution concerns determination of listed above chemicals and related compounds from surface water samples derived from selected lakes and rivers characterized by different sources of EDCs loading (and different amounts and composition expected), which are present within a short (up to 50 km) distance from Koszalin. These waters are located within the same geological and climatic region what enables comparisons, but differ also in their physical stability, temperature regime, trophic and overall microbial activities, what is expected to act as factors affecting metabolism of EDCs and their persistence in ecosystems.

The experimental work summarized in this communication was supported by the Ministry of Education and Science (Grant No 2P04G 107 29, Poland).

## **FAST SCREENING OF FREE STEROIDS AND RELATED LOW MOLECULAR MASS COMPOUNDS FRACTION IN ENVIRONMENTAL SAMPLES DERIVED FROM SEWAGE WATER**

P.K. ZARZYCKI, E. WŁODARCZYK, M. BARAN

Section of Toxicology and Bioanalytics, Department of Environmental Biology, Koszalin University of Technology, Śniadeckich 2, 75-453 Koszalin; Poland; e-mail: pkzarz@wp.pl; www.wbiis.tu.koszalin.pl/labtox/

Quantification of Endocrine Disrupting Compounds (EDC's) in biological and environmental samples presents unique challenges for sample extraction, concentration and separation [1]. Basic methodologies that are currently in use for measurements of such compounds, particularly steroid hormones, include RIA, mass spectrometry, chromatography and electrophoresis. All of them have significant limitations in scope, throughput and quantification. This is because EDCs are highly non-homogenous group of compounds that vary in concentration, polarity, structure, light-sensitivity, volatility and stability. Therefore, no one technology can effectively quantify whole range of EDCs and their metabolites that are present in complex biological or environmental samples [2,3].

The aim of this study is to present the results of our work concerning:

- a) optimization of solid phase extraction protocol using binary eluents and C-18 tubes (sample concentration ratio 1:10000);
- b) high throughput isocratic separation procedure based on the temperature-dependent inclusion chromatography involving  $\beta$ -cyclodextrin and its hydroxypropyl derivative as the inclusion modifiers of HPLC mobile phase;
- c) DAD-HPLC quantification of steroids fraction and related low molecular compounds which are present in the environmental samples derived from drinking and sewage water samples.

The main groups of the component of interest include wide range of natural and artificial steroids as well as non-steroidal substances that may be considered as the environmental biomarkers for the endocrine disrupting phenomenon. Moreover, the pre-purification, separation and quantification protocols described can be easily implemented for biomedical and environmental analysis of low molecular mass bioactive compounds that are present in the multicomponent samples containing high level of interfering substances.

### Acknowledgements

The experimental work summarized in this communication was partially supported by the Ministry of Education and Science (Grant No N 523 043 32/1477 Poland).