

KWARTALNIK

ISSN 1643-8779

4(65)
2017

EDUKACJA

BIOLOGICZNA I ŚRODOWISKOWA



Znaczenie pszczoły miodnej i produktów pszczelich w życiu człowieka

Mechanizmy obronne organizmów przed stresem oksydacyjnym

Gleba – środowisko życia wielu organizmów

Poznawanie zjawisk fizycznych na ekranie komputera

NAUKA

geografia
biologia
zdrowie
chemia
badania
środowisko
fizyka
przyroda

- 3 Łukasz Dylewski
Karaczany jako model do nauczania anatomii owadów
- 10 Kinga Nakonieczna, Natalia Gniado
Patogenne bakterie układu pokarmowego jako problem zdrowia publicznego
- 19 Nikola Sikora, Zuzanna Znajewska, Grażyna Dąbrowska
Wybrane mechanizmy obronne organizmów przed stresem oksydacyjnym ze szczególnym uwzględnieniem dysmutaz ponadtlenkowych
- 32 Magdalena Potempa, Paweł Jonczyk, Beata Kandefer, Kinga Szczerba, Michał Janerka, Marek Kucharzewski
Wpływ chitosanu na gojenie ran u chorych z cukrzycą
- 41 Małgorzata Kłyś, Natalia Malejky
Gleba – środowisko życia wielu organizmów
- 47 Marcin A. Kruszewski, Monika Naumowicz
Znaczenie pszczoły miodnej (*Apis mellifera*) i produktów pszczelich w życiu człowieka

SZKOŁA

narzędzia dydaktyczne
jak uczyć
scenariusze zajęć
narzędzia w internecie
jak zainteresować
zadania

- 54 Jan Amos Jelinek
Poznanie zjawisk fizycznych na ekranie komputera przez uczniów II klasy szkoły podstawowej
- 61 Łukasz Dylewski **KONSPEKT**
Morfologia i anatomia owadów – budowa i funkcjonowanie narządów wewnętrznych

NAUKA – artykuły przede wszystkim o charakterze przeglądowym, adresowane do osób zainteresowanych naukami przyrodniczymi – dotyczą głównie zagadnień biologii i biochemii, ale mogą też obejmować problematykę pozostałych dyscyplin przyrodniczych. W naszym zamierzeniu mają zarówno dostarczyć rzetelną wiedzę, jak i skłonić do dyskusji, jakie treści i w jakiej formie warto proponować nauczycielom, by pomóc im w nauczaniu. Sprawia to, że dział ten ma charakter przede wszystkim pedagogiczny.

SZKOŁA – artykuły lub materiały przedstawiające rozmaite źródła informacji (np. serwisy i kursy internetowe), uwarunkowania nauczania (m.in. prawne i społeczne), a także metody pracy z uczniami, konspekty i scenariusze lekcji. W każdym numerze – najnowsze zadania Pracowni Przedmiotów Przyrodniczych IBE.

KRÓTKO

recenzje
wydarzenia
informacje
najnowsze odkrycia

- 65 Monika Pietraszko, Marcin Warchałowski
Tam gdzie można podglądać nietoperze – obserwatorium w Brennej

szkujecie się ważne wydarzenie?
poinformuj nas o nim
ebis@ibe.edu.pl

KRÓTKO
– recenzje (książek, a nawet płyt z muzyką), zapowiedzi wydarzeń i relacje z nich, depesze o nowościach ze świata nauki oraz dyskusje i komentarze.

Redakcja

Redaktor naczelny: Takao Ishikawa

Sekretarz redakcji: Magdalena Rzeszotek

Redaktorzy merytoryczni:

Urszula Poziomek

Kontakt z redakcją i propozycje tekstów: ebis@ibe.edu.pl

Strona internetowa: ebis.ibe.edu.pl

Adres redakcji: ul. Górczewska 8, 01-180 Warszawa

Rada naukowa

przewodniczący Rady: prof. zw. dr hab. Adam Kołątaj
(Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec),

zast. przewodniczącego: prof. dr hab. Katarzyna Potyrała
(Uniwersytet Pedagogiczny w Krakowie),

a także: dr hab. Ondrej Hronec (Uniwersytet w Presowie, Słowacja),
prof. dr hab. Daniel Raichvarg (Uniwersytet Burgundzki w Dijon,
Francja), prof. dr hab. Valerij Rudenko (Wydział Geograficzny,
Uniwersytet w Czerniowcach, Ukraina),
prof. zw. dr hab. Danuta Cichy (założyciel EBiŚ)
prof. zw. dr hab. Wiesław Stawiński (emerytowany profesor
Uniwersytetu Pedagogicznego w Krakowie),
dr Renata Jurkowska (Uniwersytet w Stuttgarcie, Niemcy),
dr Paul Davies (Institute of Education, University of London)

Poza radą czasopismo posiada również zespoły doradcze
oraz stałych recenzentów – zob. na stronie: ebis.ibe.edu.pl

Wydawnictwo

Wydawca: Instytut Badań Edukacyjnych,
ul. Górczewska 8, 01-180 Warszawa

Projekt okładki: M. Broniszewski i red.;
zdjęcie: Fotolia

Skład i łamanie: Marcin Trepczyński

czasopismo punktowane: **8 punktów**,
indeksowane w bazach CEJSH, CEEOL, EBSCO
i Index Copernicus

wersją referencyjną czasopisma jest wydanie elektroniczne
opublikowane na stronie: ebis.ibe.edu.pl
wszystkie artykuły z abstraktami zostały zrecenzowane

Od redakcji

Takao Ishikawa

Drodzy Czytelnicy,

przełom czerwca i lipca to czas, w którym w szkołach i uczelniach nadchodzi cisza. Wielu dydaktyków także udaje się na zasłużony odpoczynek wakacyjny, a redakcji kwartalnika Edukacja Biologiczna i Środowiskowa udało się przygotować kolejny numer. Zachęcam, by korzystając z tego, że kwartalnik jest wydawany w formie elektronicznej, sięgnęli Państwo po niego w wolnym czasie i poszukali inspiracji do kolejnego roku szkolnego lub akademickiego.

W dziale NAUKA mamy pięknie ilustrowany i bogaty w treść artykuł pt. *Wybrane mechanizmy obronne organizmów przed stresem oksydacyjnym ze szczególnym uwzględnieniem dysmutaz ponadtlenkowych*. Artykuły dotyczące stresu oksydacyjnego pojawiały się już na łamach EBiŚ, ale ten opublikowany w aktualnym numerze kwartalnika ma charakter pracy przeglądowej, po lekturze której

każdy z nas będzie miał pełny obraz dotyczący obrony organizmów przed stresem oksydacyjnym.

Znaczenie pszczoły miodnej (Apis mellifera) i produktów pszczołich w życiu człowieka to kolejny artykuł, który może zainteresować szczególnie tych, którzy w trakcie wakacji będą przebywać na łonie natury. Warto go przeczytać, aby docenić pracę tych – niezbędnych dla człowieka – owadów.

W dziale NAUKA znajdują się także inne ciekawe artykuły, do lektury których serdecznie Państwa zachęcam.

Dział SZKOŁA otwiera artykuł pt. *Poznawanie zjawisk fizycznych na ekranie komputera przez uczniów II klasy szkoły podstawowej*. Miejsce technik informacyjnych w pracy dydaktycznej to jeden z tematów dyskusji wśród osób zajmujących się edukacją. Jestem pewien, że artykuł dostarczy wiele ciekawych spostrzeżeń.



KRÓTKO zachęcamy też do zapoznania się z treścią tekstu pt. *Tam gdzie można podglądać nietoperze – obserwatorium w Brennej*. Może właśnie w tym miejscu pojawi się inspiracja do przyszłej pracy badawczej na Olimpiadę Biologiczną? Na pewno warto zajrzeć nie tylko do tekstu, ale i do samego obserwatorium w Brennej!

Życzę ciepłych i słonecznych wakacji!

Takao Ishikawa

Karaczany jako model do nauczania anatomii owadów

Łukasz Dylewski

DOI: 10.24131/3247.170401

Streszczenie:

Nauczanie i uczenie się morfologii i anatomii zwierząt w szkołach ponadgimnazjalnych ogranicza się do schematów w podręcznikach oraz prezentacji multimedialnych. Użycie materiałów biologicznych podczas zajęć może nie tylko zainteresować uczniów, ale także poprawić ich jakość kształcenia. Doskonałym modelem do nauki morfologii i anatomii owadów jest karaczan madagaskarski, którego struktury wewnętrzne są dobrze widoczne. W tym artykule zaprezentowano techniki preparacji oraz opis najważniejszych struktur wewnętrznych u tego gatunku.

Słowa kluczowe: anatomia, owady, karaczan madagaskarski, organizm modelowy

otrzymano: 19.02.2018; przyjęto: 27.02.2018; opublikowano: 16.03.2018



mgr Łukasz Dylewski: doktorant,
Instytut Zoologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Wstęp

Zainteresowanie uczniów tematyką prowadzoną podczas zajęć w szkole wymaga inicjatywy i pomysłowości ze strony nauczyciela. Podczas nauczania biologii w szkole, nauczyciel może wykazać się kreatywnością, wykorzystując najróżniejsze materiały dydaktycznych: plansze dydaktyczne, prezentacje multimedialne, filmy edukacyjne oraz materiały biologiczne (żywe okazy owadów, preparaty biologiczne, szkielety różnych grup kręgowców). Niestety czasami zdarza się, że materiały dydaktyczne wykorzystywane podczas zajęć są źle wykonane i zawierają błędy.

W przypadku owadów często spotykam się z nieadekwatnymi rycinami przedstawiającymi ich budowę wewnętrzną, w szczególności w podręcznikach przeznaczonych do nauczania biologii. Ryciny zawierają wiele błędów dotyczących umiejscowienia narządów wewnętrznych oraz braku zachowania proporcji pomiędzy poszczególnymi narządami. Lepszą metodą do poznania budowy wewnętrznej różnych grup bezkręgowców jest ich sekcja. Karaczany, a w szczególności karaczan madagaskarski, ze względu na duże rozmiary ciała może posłużyć jako model do nauczania morfologii i anatomii owadów.

Karaczany wraz z termitami należą do rzędu Blattodea. Są to zwierzęta wszystkożerne o nocnym trybie życia, część z nich to gatunki synantropijne, żyjące w środowisku silnie przekształconym przez człowieka. Karaczany są powszechnie uznawane za jedną z grup najstarszych naziemnych stawonogów. Budowa ciała współczesnych gatunków jest bardzo podobna do skamieniałości pochodzącej z okresu karbońskiego. Natomiast tzw. „wiek karaczanów” obejmował środkowy mezozoik, w którym nastąpiła radiacja tego taksonu. Karaczany nie są kolonialne, ale mają skłonności do łączenia się w grupy, są uważane za owady przedspo-

leczne. Podobnie jak większość owadów, karaczany komunikują się ze sobą poprzez uwalnianie feromonów. Odkryto, że zwierzęta te uwalniają węglowodory z organizmu, które następnie są przenoszone przez czułki. Te węglowodory mogą wspomagać komunikację karaluchów, a nawet rozpoznawać czy dany osobnik jest członkiem danej grupy.

Przygotowanie do sekcji

Przed przystąpieniem do sekcji, karaczana należy uśmiercić, jedną z dwóch stosowanych humanitarnych metod. Pierwsza to umieszczenie osobnika w zamkniętym pudełku lub słoiku z nasączoną octanem etylu watą. Jest to najczęstsza z metod stosowana przez entomologów do usypiania owadów. Druga metoda to zamrażanie. Zamrażanie jest szybką, humanitarną i efektywną metodą uśmiercenia. Jednakże zamrażanie ma pewne ograniczenia gdyż może powodować uszkodzenie tkanek. Większość uszkodzeń wywołanych tą metodą zawiera się w skali mikroskopowej i nie ma negatywnego wpływu na elementy budowy narządów podczas wykonywanej sekcji.

Budowa wewnętrzna karaczana madagaskarskiego

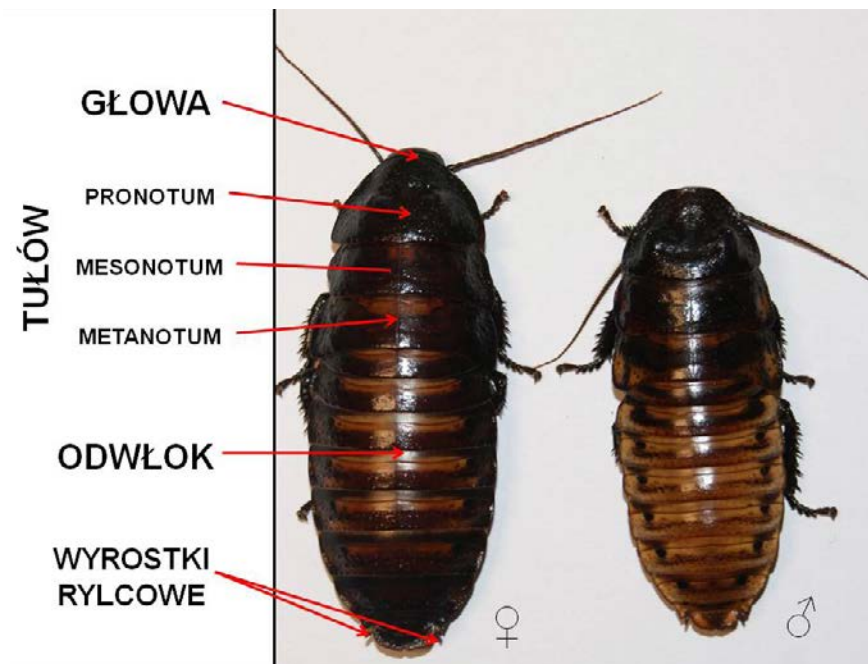
Najlepiej nadającym się gatunkiem do sekcji jest karaczan madagaskarski, którego narządy wewnętrzne są bardzo dobrze widoczne gołym okiem. Inne gatunki jakie można stosować to karaczan brazylijski oraz karaczan argentyński. U wszystkich wymienionych gatunków, możliwe jest łatwe odróżnienie samca od samicy. U karaczana madagaskarskiego samce posiadają na przedtułowiu widoczne wyrostki (Fig.1). U karaczana brazylijskiego i argentyńskiego samce w odróżnieniu od samic posiadają skrzydła.

Jak u wszystkich owadów, karaczan madagaskarski zbudowany jest z trzech części ciała (głowa, tułów i odwłok), posiada trzy pary odnóży, oczy złożone i jedną parę czulek. Tułów dzieli się na przedtułów (*pronotum*), śródtułów (*mesonotum*), zatułów (*metanotum*). Na końcu odwłoka zarówno u samca jak i samicy występują wyrostki rylcowe służące do odbierania wrażeń chemicznych (Fig. 1).

Przystępując do sekcji należy odciąć wszystkie odnóża, gdyż przeszkadzają one w przypięciu owada do tacki. Cięcie, w kształcie litery Y, wykonujemy nożyczkami po stronie brzusznej lub grzbietowej osobnika. Należy delikatnie rozciąć szkielet zewnętrzny by nie uszkodzić narządów wewnętrznych. Po wykonanym cięciu, rozpinamy osobnika na tacce przy pomocy szpilek (Fig. 2).

Po rozchyleniu szkieletu zewnętrznego, widoczna jest biaława struktura, jest to tzw. ciało tłuszczowe, które pełni rolę tkanki zapasowej, uwalnia trehalozę, diglicerydy i białka do hemolimfy, oraz odkłada kwas moczowy – jeden z produktów przemiany azotowej (Fig. 3). W zależności od tego jak odżywiony jest osobnik lub w jakiej jest fazie rozrodczej, ilość ciała tłuszczowego jest różna. U dobrze odżywionych osobników ciało tłuszczowe, może wypełniać praktycznie całe wnętrze odwłoka. Narządy wewnętrzne m. in. wole, jelito środkowe, oplecione są tchawkami przypominające lekko przezroczyste rurki (Fig. 3). W miejscu gdzie występowały odnóża można dostrzec mięśnie poprzecznie prążkowane. Po prawej jak i po lewej stronie, a dokładniej w okolicach czwartego segmentu występują, tzw. narządy do wytwarzania dźwięku, które powstały z przekształconych przetchlinek (Fig. 3). Dzięki tym struktutom, wyglądającym jak zwinięte trąbki, karaczany madagaskarskie wydają specyficzny dźwięk. Charakterystyczne u tego gatunku syczenie, wydawane jest poprzez silne wydmuchnięcie powietrza przez owe struktury.

Fot. 1. Budowa zewnętrzna samicy i samca karaczana madagaskarskiego

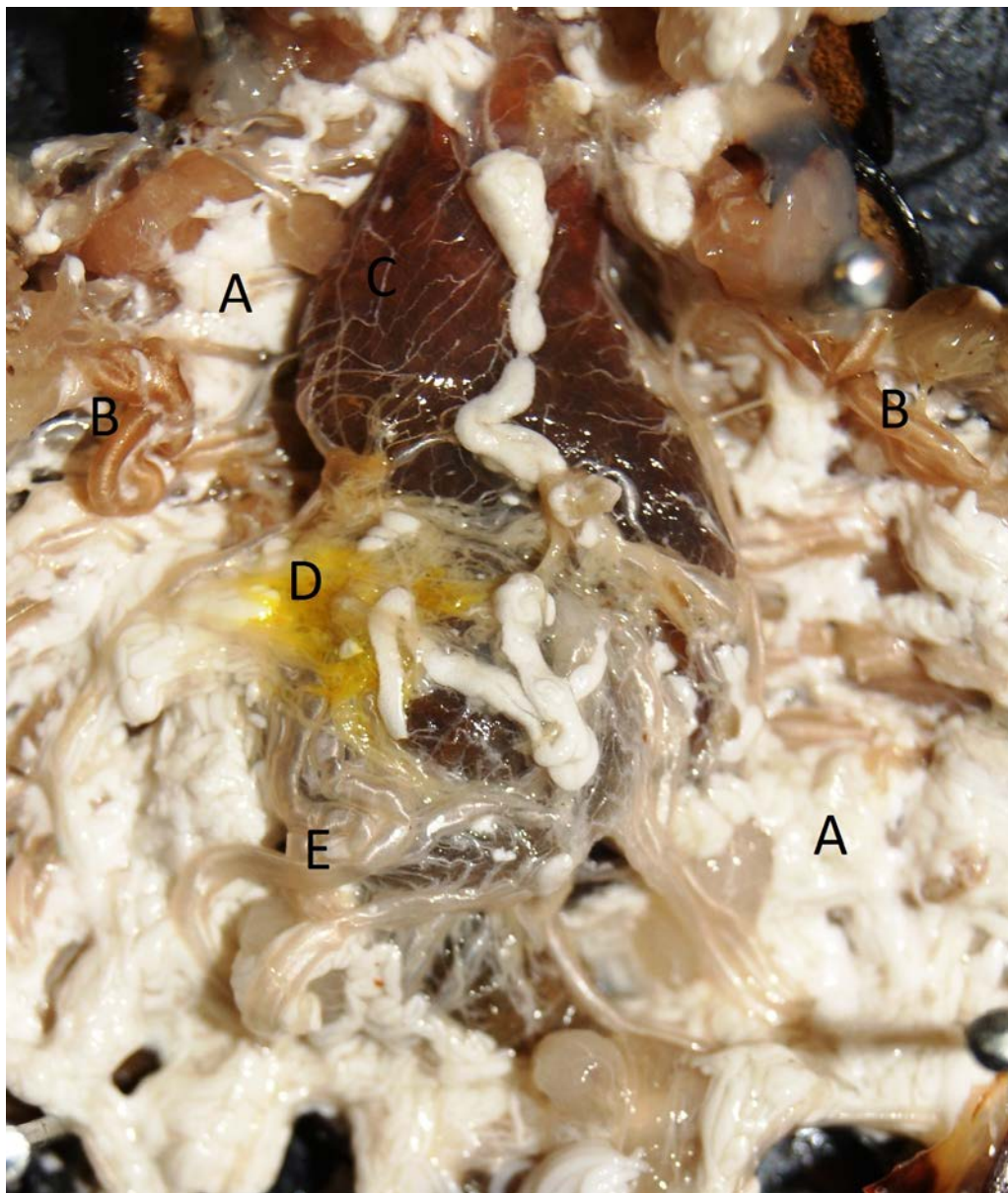


Fot. 2. Prawidłowo przymocowany osobnik karaczana madagaskarskiego do tacki sekcyjnej

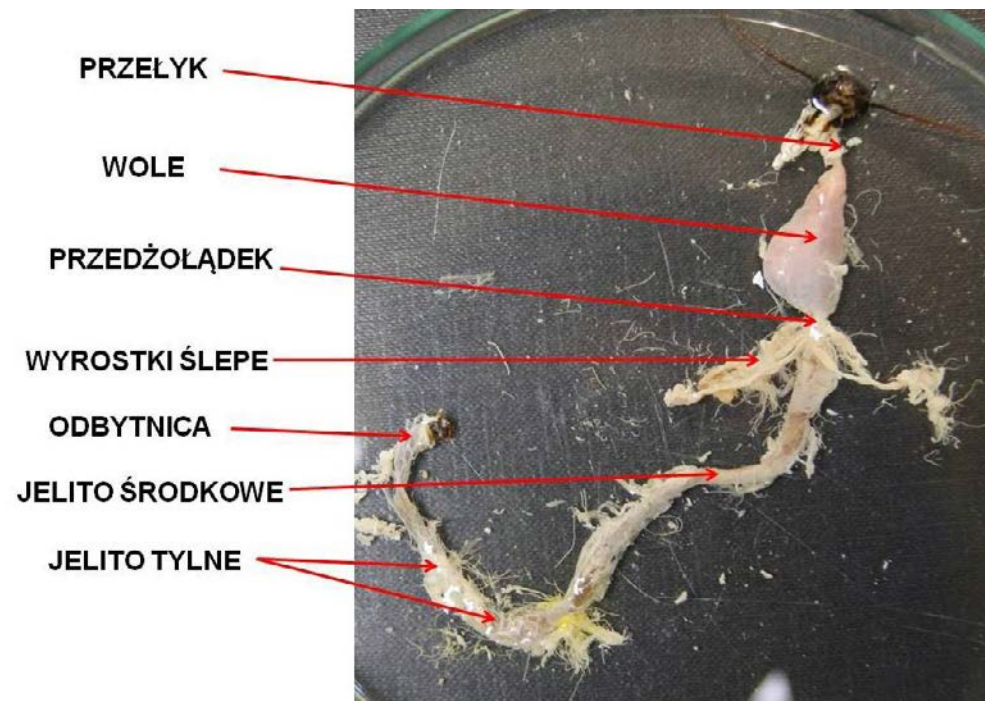


Fot 3. Budowa wewnętrzna karaczana madagaskarskiego

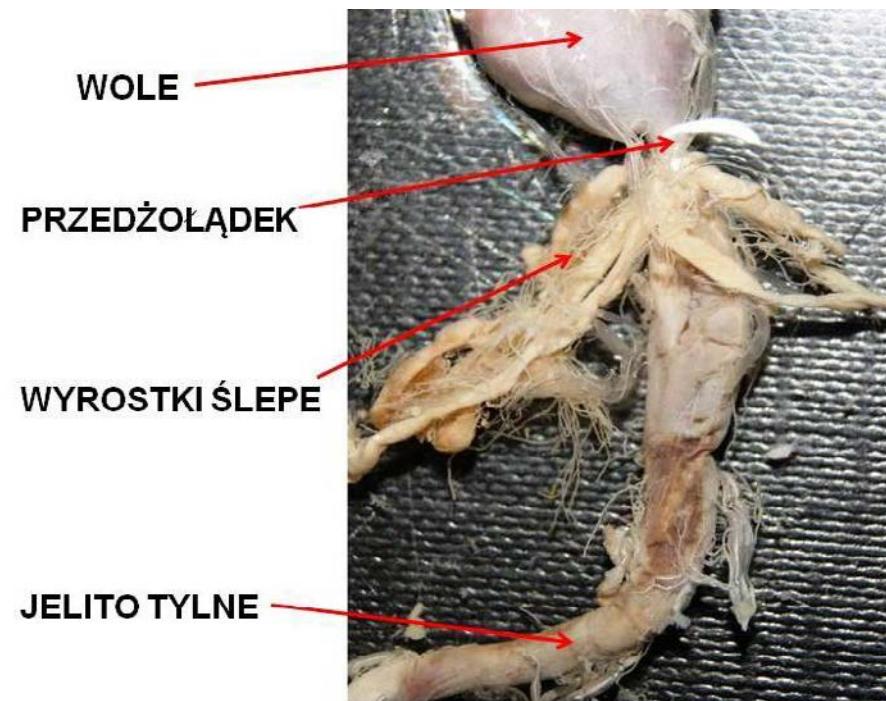
- A – Ciało tłuszczowe,
 B – Narządy do wydawania dźwięku,
 C – wole,
 D – cewki Malpighiego,
 E – tchawki.



Układ pokarmowy jest dwukrotnie większy od samego osobnika. Zadaniem układu pokarmowego jest przetworzenie pobranego pokarmu i absorpcję składników odżywczych oraz wydalenie niestrawionych resztek. W celu wypreparowania tego układu należy użyć igły preparacyjnej i pęsety. Delikatnie wyciągamy cały układ przenosząc do szalki z wodą lub 70% alkoholem (Fig. 4). Następnie posługując się igłą preparacyjną delikatnie rozprostowujemy poszczególne części na szalce, usuwając ciało tłuszczowe i tchawki. Układ pokarmowy składa się z trzech części: jelita przedniego, jelita środkowego i jelita tylnego. W skład jelita przedniego wchodzi: otwór gębowy, gardziel, przełyk, wole oraz przedżołądek (Fig. 4). Pobrany pokarm przez otwór gębowy jest transportowany do umięśnionej gardzieli, której zadaniem jest przepchnięcie pokarmu do dalszych części układu pokarmowego. Dalej poprzez przełyk pokarm trafia do wola (Fig. 5). Wolę służy do gromadzenia oraz u niektórych gatunków rozdrabniania pokarmu. Następnie pokarm przedostaje się do przedżołądka, gdzie jest dalej rozdrabniany. Poniżej przedżołądka u karaczanów występują palcowate wyrostki, tzw. wyrostki ślepe (Fig. 5). Wyrostki ślepe wydzielają enzymy trawienne i uczestniczą w absorbowaniu składników odżywczych. Jelito środkowe pełni dwie zasadnicze funkcje: wydziela enzymy trawienne i wchłania substancje pokarmowe. W jelicie środkowym występują dwa typy komórek: komórki kolumnowe – odpowiadające za funkcje trawienne i pobieranie jonów oraz komórki kielichowe – odpowiedzialne za pochłanianie rozdrobnionych cząstek pokarmu. Na granicy jelita środkowego i jelita tylnego znajduje się tzw. odźwiernik, który reguluje przemieszczanie się treści pokarmu z jelita środkowego do tylnego. Również od tej części uchodzą cewki Malpighiego w postaci nitkowatych żółtych



Fot. 4. Wypreparowany układ pokarmowy karaczana madagaskarskiego



Fot. 5. Fragment układu pokarmowego karaczana madagaskarskiego

wyrostków (Fig. 6). Zadaniem cewek Malpighiego jest produkcja moczu pierwotnego. Ostatnią częścią układu pokarmowego to jelito tylne, które dzieli się na jelito cienkie, jelito grube i jelito proste. Funkcją jelita tylnego jest absorpcja wody, jonów i małych cząstek organicznych. Jelito tylne zakończone jest odbytnicą.

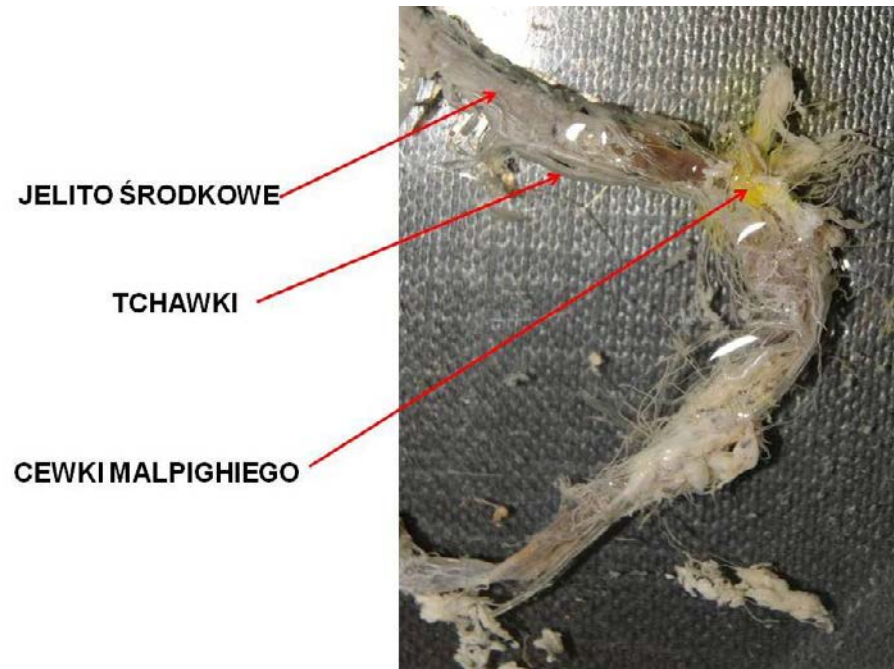
Po wyjęciu całego układu pokarmowego na grzbietowej stronie ciała widoczne są worki powietrzne (Fig. 7). Brzuszy łańcuszek nerwowy możemy wypreparować na dwa sposoby: pierwszym jest rozpoczęcie cięcia po stronie grzbietowej oraz delikatne usunięcie układu pokarmowego, drugim jest użycie do sekcji osobników larwalnych, gdyż nie posiadają one układu rozrodcze-

go, a dodatkowo układ pokarmowy jest mniejszy niż u osobnika dorosłego (Fig. 8). W tym przypadku wykonujemy delikatne nacięcie brzuszne w linii prostej, które umożliwia wypreparowanie brzusznego łańcuszka nerwowego.

Owady posiadają otwarty układ krwionośny. Na układ ten składają się naczynia grzbietowe znajdujące się w odwłoku oraz jego przedłużenie znajdujące się w tułowiu – aorta, przepona grzbietowa i brzuszna, septy oraz dodatkowe organy pulsujące. Naczynia grzbietowe posiada wiele komór ułożonych segmentalnie, w każdej komórce znajduje się para otworów tzw. ostii. Ostia zapobiegają wypływowi krwi z komory serca do

zatoki. Z układu krwionośnego widoczne jest grzbietowe naczynie krwionośne.

Najbardziej widoczną częścią układu rozrodczego u samców podczas sekcji są gruczoły dodatkowe i jądra (Fig. 9). Wydzieliny gruczołów dodatkowych dostarczają plemnikom wartości odżywczych i zapewniają optymalne środowisko niezbędne do ich przeżycia. W zależności od stadium rozrodczego samicy, struktury żeńskiego układu rozrodczego mogą być mniej widoczne (Fig. 10). Zazwyczaj owariole (podstawowa jednostka strukturalna jajników), jajowody i gruczoły dodatkowe można dostrzec gołym okiem. Reszta struktur, tj. nieparzysty jajowód wspólny, komora płciowa



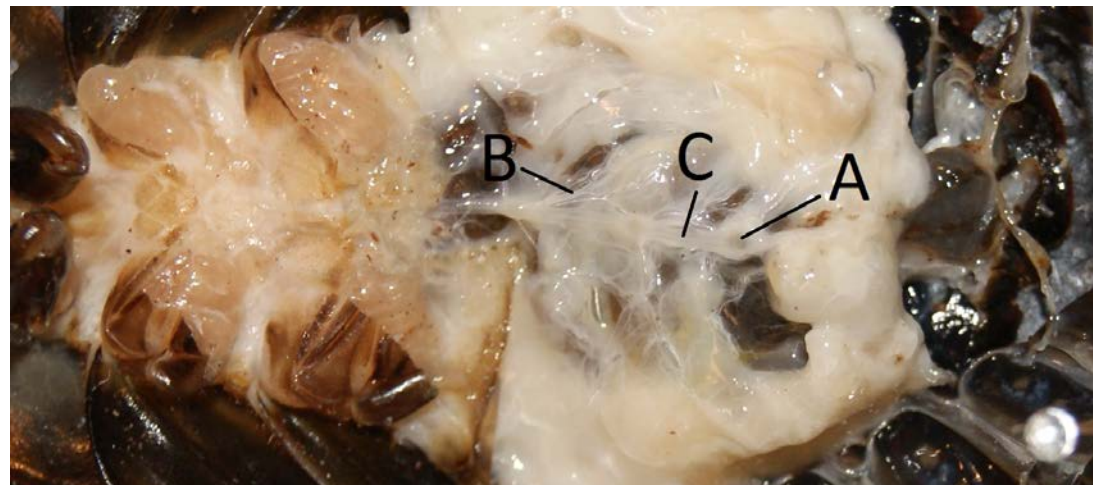
Fot. 6. Fragment układu pokarmowego karaczana madagaskarskiego



Fot. 7. Worki powietrzne (A) u karaczana argentyńskiego

Fot. 8. Fragment brzusznego łańcuszka nerwowego u karaczana argentyńskiego

A – zwój nerwowy,
 B – nerwy,
 C – pień nerwowy.





Fot. 9. Wypreparowany układ rozrodczy męski
A – jądra, B – gruczoł dodatkowy.



Fot. 10. Wypreparowany układ rozrodczy żeński
A – owariole, B – gruczoł dodatkowy.

oraz zbiornik nasienia jest trudno widoczna, często też struktury te można łatwo uszkodzić podczas wykonywania sekcji. Dokładny schemat męskiego i żeńskiego układu rozrodczego przedstawiono na rycinie.

Podsumowanie

Karaczan madagaskarski znakomicie nadaje się jako model do nauczania anatomii owadów. Owad ten jest gatunkiem prostym w utrzymaniu i nie objętym żadną formą ochrony prawnej. Dużym plusem tego gatunku jest jego rozmiar – co przekłada się na wielkość poszczególnych narządów wewnętrznych. Zakup osobników nie jest dużym wydatkiem i mieści się w granicach kilkunastu złotych za 30 osobników. Zajęcia praktyczne są bardzo interesujące dla uczniów. Uczniowie więcej zapamiętają, gdy samodzielnie wykonają sekcję owada, wypreparują pod czujnym okiem nauczyciela poszczególne narządy wewnętrzne. Artykuł ten ma na celu zachęcić nauczycieli do wprowadzenia zajęć praktycznych z materiałem biologicznym. Przedstawione w tym artykule opisy i ryciny powinny ułatwić nauczycielowi przeprowadzenie takich warsztatów.

Cockroach as a model to insect anatomy learning

Łukasz Dylewski

Teaching and learning animal morphology and anatomy in upper secondary schools are limited to diagrams in textbooks and multimedia presentations. The use of biological materials during classes may not only interest students, but also improve quality of their education. An excellent model for learning the morphology and anatomy of insects is Madagascar cockroach, whose internal structures are easily visible. This article presents preparation techniques and a description of the most important internal structures in this species.

Key words: anatomy, insects, Madagascar hissing cockroach, model organism

Patogenne bakterie układu pokarmowego jako problem zdrowia publicznego

Kinga Nakonieczna, Natalia Gniado

DOI: 10.24131/3247.170402

Streszczenie:

W poniższym artykule opisano cztery szczepy bakterii patogennych, występujących w żywności pochodzenia zwierzęcego, które wywołują liczne przypadki infekcji układu pokarmowego człowieka. Zoonozy, inaczej zwane chorobami odzwierzęcymi, są to choroby przenoszone przez zwierzęta. Czynniki chorobotwórcze zoonoz – bakterie – przenoszone są na ludzi w wyniku kontaktu bezpośredniego z zakażonym zwierzęciem, bądź w wyniku spożycia produktów pochodzenia zwierzęcego takich jak mleko, sery czy mięso. Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności – EFSA (ang. *European Food Safety Authority*) oraz Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Zwalczania Chorób – ECDC (ang. *European Centre for Disease Prevention and Control*), co roku publikuje roczne sprawozdanie, dotyczące epidemii żywności, a także źródeł i czynników powstawania chorób odzwierzęcych wśród ludzi. Informacje zawarte w raporcie pochodzą z danych, które przekazywane są do EFSA przez kraje członkowskie Unii Europejskiej. Ostatni raport, opublikowany 12 grudnia 2017 roku, na pierwszym miejscu, ze względu na największą liczbę zachorowań, plasuje kamylobakteriozę wywołowaną przez bakterie z rodzaju *Campylobacter*. Dalej znajdują się takie choroby jak salmonelloza, listerioza czy zakażenie bakterią z rodzaju *Yersinia* (jersinioza) [1].

Słowa kluczowe: zoonozy, kamylobakterioza, listerioza, jersinioza, salmonelloza

otrzymano: 17.01.2018; przyjęto: 22.06.2018; opublikowano: 30.06.2018

Campylobacter spp.

Charakterystyka i występowanie bakterii

Bakterie z rodzaju *Campylobacter* to gram-ujemne, cienkie, długie, charakterystycznie zagięte pałeczki. Ich wielkość waha się od 0,2-0,8 μm . Mają one zdolność ruchu dzięki obecności, polarnie ułożonej jednej lub dwóch rzęsek. Obserwując pod mikroskopem barwione preparaty tych bakterii można zaobserwować charakterystyczne dla nich struktury zwane „skrzydłami mew”, które są połączeniem dwóch komórek bakteryjnych [2, 3, 4].

Campylobacter spp. są bakteriami mikroaerofilnymi. Oznacza to, że wymagają do wzrostu stężenia tlenu niższego niż stężenie tlenu w atmosferze. Jest to wartość od 3% do 15%. Na wzrost *Campylobacter* wpływ ma również stężenie dwutlenku węgla w zakresie od 3% do 5%, a także obecność wodoru w stężeniu nie większym niż 10% [2, 3, 4].

Campylobacter należą do mikroorganizmów termofilnych, co związane jest ze środowiskiem bytowania tych bakterii. Są one bowiem patogenami układu pokarmowego kur, których temperatura ciała wynosi 42°C, a także człowieka (37°C). Jest to zakres temperatur, w którym bakterie z rodzaju *Campylobacter* wykazują najintensywniejszy wzrost [4, 5].

Naturalnym siedliskiem *Campylobacter* jest przewód pokarmowy zwierząt hodowlanych, a także dziko



Kinga Nakonieczna: Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski



Natalia Gniado: Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

żyjących. Badania laboratoryjne umożliwiły zidentyfikowanie obecności tych bakterii u mew (20-70% badanych osobników), gawronów (45% badanych osobników) oraz gołębi (50% badanych osobników). Ptaki wędrowne stanowią długodystansowe wektory dla bakterii *Campylobacter*, co sprzyja ich rozprzestrzenieniu. Ptasi kał powoduje zanieczyszczenie pastwisk, pól uprawnych oraz wód powierzchniowych, co dalej może skutkować zakażeniem zwierząt hodowlanych oraz człowieka [4, 5].

Campylobacter bytują nie tylko w przewodzie pokarmowym. Znaleźć je można również na skórze, sierści, piórach i kopytach zwierząt, a także w węzłach chłonnych [4, 5, 6].

Kamylobakterioza

Choroba wywołana przez bakterie z rodzaju *Campylobacter* nosi nazwę „kamylobakteriozy”. Jest to najczęstsze, odnotowane zakażenie układu pokarmowego wśród ludzi zamieszkujących Europę. Od roku 2005 EFSA obserwuje tendencję wzrostową liczby zachorowań na tę chorobę. W 2016 roku zanotowano ok. 246 tys. przypadków kamylobakteriozy, co stanowi 6,1% więcej zakażeń niż w 2015 roku. Każdy przypadek zachorowania na kamylobakteriozę musi zostać zarejestrowany. Jest to wymóg prawny obowiązujący w Polsce od 2012 roku. Raporty zachorowań dostępne są w postaci „Meldunków o zachorowaniach na choroby zakaźne i zatrucia w Polsce”, a także rocznych komunikatów pt. „Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce” (Tabela 1) [1, 5, 7, 8].

Bakterie z rodzaju *Campylobacter* liczą ok. 20 gatunków. Poddane badaniom mikrobiologicznym próbki pobrane od osób cierpiących na kamylobakteriozę wykazały, że w większości przypadków zakażenia wywołuje bakteria *Campylobacter jejuni* oraz *Campylobacter coli*. Nie wyklucza to jednak możliwości zakażenia

człowieka innym gatunkiem bakterii *Campylobacter* [1, 4, 5, 6].

Efekt chorobotwórczy *Campylobacter*, poza wytwarzaniem toksyn, uwarunkowany jest funkcjonowaniem w komórkach dwóch systemów, którymi są aparat ruchowy umożliwiający rozprzestrzenienie bakterii, a także adhezja (przyleganie) do komórek nabłonkowych gospodarza. Bakterie z rodzaju *Campylobacter* mają zdolność to syntezy toksyn – enterotoksyny oraz cytotoksyny. Enterotoksyny są to białka wydzielane na zewnątrz komórki bakteryjnej, które integrują się z receptorami komórek nabłonkowych jelita cienkie-

go (enterocyty), co w efekcie powoduje zatrzymanie wydzielania przeciwciał i brak zdolności zwalczania infekcji bakteryjnej. Cytotoksyny zaś powodują m.in. zatrzymanie syntezy białek, zaburzenia formowania elementów cytoszkieletu lub lizę (rozkład) błony komórkowej, co wywołuje „wypłynięcie” organelli poza komórkę. Efektem końcowym działania cytotoksyn jest obumieranie komórek gospodarza. Szczepy *C. jejuni* wyizolowane od ludzi cierpiących na biegunkę wykazywały zdolność do wytwarzania enterotoksyn, zaś osoby z krwawą biegunką zakażone były szczepem syntetyzującym cytotoksynę [9, 16, 17]

Wiele kur, krów i innych zwierząt hodowlanych, które nie wykazują oznak choroby, może być nosicielami bakterii *Campylobacter*. Bakterie te mogą bytować w jelitach, wątrobie i podrobach zwierząt. Do przeniesienia bakterii, na jadalne części zwierzęcia, dochodzi podczas uboju. Mleko także może ulec zanieczyszczeniu, gdy krowa ma wymiona zakażone szczepem *Campylobacter*. Inne produkty spożywcze, takie jak owoce i warzywa, zostają zanieczyszczone w wyniku bezpośredniego kontaktu z glebą, w której znajdują się odchody krów, ptaków lub innych zwierząt. Odchody zwierząt mogą również zanieczyścić jeziora i rzeki. Pasteryzacja mleka, mycie owoców i warzyw oraz gotowanie wody pitnej pomaga zapobiegać rozprzestrzenianiu się kampylobakteriozy [1, 4, 6, 9].

Większość infekcji wywołanych przez *Campylobacter* wiąże się z jedzeniem surowego bądź niedogotowanego mięsa drobiowego, a także dochodzi do ich w wyniku zanieczyszczenia innych pokarmów tymi bakteriami. Ludzie mogą zarazić się tymi bakteriami, gdy deska do krojenia, która była używana do przygotowywania surowego kurczaka, nie została dokładnie umyta przed ponownym użyciem, np. do krojenia sałaty lub owoców. Do zakażenia może dojść również w wyniku kontaktu z kałem psa lub kota. *Campylobacter* zazwyczaj nie rozprzestrzenia się w wyniku bezpośredniego kontaktu z osobą chorą. Bardzo rzadko może dochodzić do zakażeń poprzez krew podczas transfuzji [4, 5, 6, 9].

Ogniska zakażeń *Campylobacter* powiązane są najczęściej z drobiem, surowymi (niepasteryzowanymi) produktami mleczarskimi i nieoczyszczoną wodą. Zakażenia *Campylobacter* są powszechne w krajach rozwijających się. Większe ryzyko zarażenia występuje u osób podróżujących za granicę [6, 12].

Do objawów kampylobakteriozy należą: biegunka (często z krwią), gorączka, nudności, wymioty, ból

Województwo	Liczba zachorowań w kwartałach				Liczba zachorowań w roku	Zapadalność na 100 tys.	Hospitalizacja		
	I	II	III	IV			Liczba	%	
POLSKA	2015 r.	117	159	163	214	653	1,70	493	75,5
	2016 r.	169	157	240	221	787	2,05	607	77,1
1. Dolnośląskie	9	11	15	9	44	1,52	33	75,0	
2. Kujawsko-Pomorskie	5	9	3	6	23	1,10	21	91,3	
3. Lubelskie	-	-	-	-	-	-	x	x	
4. Lubuskie	19	12	16	13	60	5,90	59	98,3	
5. Łódzkie	-	-	-	-	-	-	x	x	
6. Małopolskie	27	25	27	51	130	3,85	110	84,6	
7. Mazowieckie	19	25	31	33	108	2,02	101	93,5	
8. Opolskie	-	-	1	-	1	0,10	1	100,0	
9. Podkarpackie	1	2	5	1	9	0,42	9	100,0	
10. Podlaskie	-	-	-	-	-	-	x	x	
11. Pomorskie	-	1	3	4	8	0,35	7	87,5	
12. Śląskie	40	39	71	54	204	4,47	102	50,0	
13. Świętokrzyskie	1	3	9	3	16	1,28	15	93,8	
14. Warmińsko-Mazurskie	18	15	12	13	58	4,03	28	48,3	
15. Wielkopolskie	24	9	29	25	87	2,50	83	95,4	
16. Zachodniopomorskie	6	6	18	9	39	2,28	38	97,4	

Tabela 1. Liczba zachorowań, zapadalność oraz liczba i procent hospitalizowanych na kampylobakteriozę wg województw [7]

i skurcz brzucha. Objawy te zwykle rozpoczynają się w ciągu dwóch do pięciu dni od zakażenia i trwają około tygodnia. Niekiedy zarażone osoby nie mają żadnych objawów. U osób z osłabionym układem odpornościowym *Campylobacter* może wniknąć do krwiobiegu i spowodować infekcję zagrażającą życiu, np. sepsę, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych. Sporadycznie u osób chorych na kamylobakteriozę obserwowane są przypadki powikłań w postaci zespołu Guillaina-Barrego (okresowe porażenie wywołane dysfunkcją układu nerwowego), zespołu Millera-Fischera (choroba układu nerwowego) czy chorób reumatycznych [4, 6, 9].

Na zakażenie pałeczkami *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* narażeni są ludzie ze skrajnych grup wiekowych. Szczególną ostrożność powinny zachować osoby w wieku od 15 do 35 roku życia, dzieci poniżej pięciu lat, osoby z obniżoną odpornością, osoby leczące się immunosupresyjnie, a także pracownicy ubojni, weterynarze oraz osoby podróżujące. Liczba komórek bakteryjnych stanowiących zagrożenie dla człowieka jest bardzo mała i wynosi zaledwie 500-800 [4, 5, 9, 16].

W ostatnich latach obserwowany jest niebezpieczny wzrost oporności bakterii z rodzaju *Campylobacter* (wyizolowanych z żywności, a także od ludzi i zwierząt) na antybiotyki i chemioterapeutyki. Zjawisko to występuje na całym świecie, dlatego Światowa Organizacja Zdrowia WHO (ang. *World Health Organization*) zaświadziła je jako istotny problem zdrowia publicznego [1, 4, 10, 11].

Zapobieganie zakażeniu bakteriami z rodzaju *Campylobacter* możliwe jest poprzez zachowanie higieny tj. mycie rąk, przyborów kuchennych, desek do krojenia oraz blatów kuchennych. Wskazane jest oddzielne przechowywanie surowego mięsa (w szczególności drobiu) oraz żywności gotowej do spożycia w temperaturze poniżej 4°C. Bardzo ważny jest proces przyrządzania

potraw z produktów pochodzenia zwierzęcego. Świeże mięso, przed spożyciem, powinno być poddane obróbce termicznej (pieczenie lub gotowanie) najlepiej z wykorzystaniem termometru do żywności, by mieć pewność, że przygotowywane potrawy mają odpowiednią temperaturę „wewnątrz”. Należy unikać picia surowego mleka i nieuzdatnionej, nieprzegotowanej wody, a także przygotowywania potraw przez osoby z objawami zakażenia jelitowego (biegunka, wymioty) [6, 9, 10].

Zakażenia bakterią *Campylobacter* należą do najczęściej odnotowywanych chorób w państwach członkowskich Unii Europejskiej. Na tle innych państw Polska nie charakteryzuje się wysoką liczbą odnotowanych zakażeń. Statystyki te są jednak zaniżone, co wynika z faktu, że Polacy nie udają się do lekarza, gdy występują u nich objawy biegunki i wymiotów [4, 5, 12, 13].

Listeria

Charakterystyka i występowanie bakterii

Bakterie z rodzaju *Listeria* to gram-dodatnie, cienkie, krótkie i nieprzetrwalnikujące pałeczki. Dotychczas poznano siedemnaście gatunków bakterii *Listeria*. Spośród nich wyodrębniono dwa gatunki patogenne – *Listeria monocytogenes* oraz *Listeria ivanovii*. *L. monocytogenes* infekuje człowieka, zaś *L. ivanovii* jest patogenna dla innych zwierząt [9, 14, 15].

Listeria mają zdolność ruchu, ale wyłącznie w zakresie temperatur od 20 do 25°C, dzięki obecności od 2 do 6 perytrychalnie ułożonych rzęsek. W temperaturze 37°C (temperatura ciała człowieka) bakterie te tracą zdolność do przemieszczania się, gdyż produkcja flageliny, białka budującego rzęskę, zostaje ograniczona [9, 14, 15].

Pałeczki z rodzaju *Listeria* należą do względnych tlenowców, dlatego też ich hodowla może być prowadzona zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych.

Bakterie te hoduje się na agarze wzbogaconym krwią (np. końską). Wzrost można zaobserwować w postaci kolonii, wokół których znajdują się przejaśnienia, tzw. strefy hemolizy. Powstałe przejaśnienie jest wynikiem całkowitego rozpadu erytrocytów (hemoliza typu β). Pałeczki *Listeria* rosnące na podłożu bez krwi tworzą szaro-niebieskie kolonie [9].

Listeria ma zdolność do rozwoju w szerokim zakresie temperatur od 1 do 45°C, a zdolność namnażania wykazuje nawet w temperaturze od -1,5 do +3°C. Charakteryzuje ją tolerancja na wysokie stężenie soli ($\geq 20\%$), a także szeroki zakres pH 4,3-9,6, co jest istotne w aspekcie przemysłu spożywczego [9, 14, 15].

Środowiskiem bytowania *Listeria* spp. są: gleba, gnijące rośliny, wody słodkie, wody słone, ścieki. Z łatwością więc bakterie te przedostają się do przewodu pokarmowego zwierząt. Następnie musi dojść do spożycia przez człowieka źle przetworzonego produktu z zakażonego zwierzęcia. Pojawienie się bakterii w przewodzie pokarmowym człowieka nie warunkuje choroby. Dopiero, gdy bakteria pokona barierę błonową może dostać się do krwi i limfy. Wraz z płynami ustrojowymi *Listeria* trafia do węzłów chłonnych, śledziony i wątroby, gdzie się namnaża. Zdolność do namnażania w hepatocytach (komórkach wątroby), komórkach nabłonka jelitowego, makrofagach, fibroblastach, komórkach śródbłonka naczyń powoduje bakteriemię (zakażenie krwi bakteriami). Następstwem tego zakażenia może być sepsa (posocznica), zakażenia układu nerwowego, zapalenie spojówek, zapalenie otrzewnej, zapalenie skóry, zapalenie opon mózgowych czy reumatoidalne zapalenie stawów. Konsekwencją niektórych z wyżej wymienionych postaci klinicznych zakażeń *L. monocytogenes* jest śmierć pacjenta. Na tle innych państw Stany Zjednoczone charakteryzują się bardzo dużą śmiertelnością ludzi zakażonych pałeczką *L. monocytogenes* [7, 8, 9, 14, 15].

Identyfikacja, różnicowanie, diagnostyka

Badaniami umożliwiającymi identyfikację bakterii z rodzaju *Listeria* są: ruch, zdolność do wytwarzania katalazy, hemoliza, test CAMP, zdolność do wzrostu w temperaturze 4°C, zdolność do fermentacji ramnozy i ksylazy, a także barwienie metodą Grama [9].

Listerioza

Głównym wektorem pałeczek *L. monocytogenes* jest pożywienie. Przyczyną ok. 95% zatruć spowodowanych przez *L. monocytogenes* jest spożycie zanieczyszczonej żywności. Bakterie te wyizolowano z: mięsa wieprzowego, wołowego, drobiowego, wędzonych ryb, kiełbas, półsurowych wędlin oraz pasztetów. Rozpowszechnienie *Listeria* wynika z jej odporności na pasteryzację i mrożenie, a także odporności na zawarte w produktach środki konserwujące czy też stosowane preparaty myjące. Badania laboratoryjne dowodzą, że odróbka termiczna nie powoduje całkowitego wyeliminowania *Listeria* z produktu (zdołano z tych produktów wyizolować *L. monocytogenes*). Spożycie żywności zawierającej od 10² do 10⁴ jednostek tworzących kolonie (jtk) w 1 g powoduje pojawienie się objawów infekcji. Na dawkę infekcyjną bakterii powodujących zakażenie wpływa wiek człowieka, odporność czy przyjmowane leki. Do ogólnych objawów listeriozy zaliczyć można: gorączkę, biegunkę, wymioty, bóle głowy, bóle stawów, kaszel, krótkotrwałą utratę przytomności oraz senność. Łagodny przebieg listeriozy charakteryzuje się szybko ustępującymi objawami przypominającymi grypę, które pojawiają się po ok. 20 godzinach od spożycia zanieczyszczonej żywności [7, 8, 9, 14, 15].

Warto zaznaczyć, że wiele osób jest bezobjawowymi nosicielami *L. monocytogenes* zasiedlającymi przewód pokarmowy lub pochwę. Samo pojawienie się *Listeria* w przewodzie pokarmowym nie powoduje pojawienia

Tabela 2. Listerioza wrodzona/wczesna – liczba zachorowań, zapadalność na 100 tys. urodzeń żywych oraz liczba i procent hospitalizowanych [7]

Województwo *		Liczba zachorowań w kwartałach				Liczba zachorowań w roku	Zapadalność na 100 tys.	Hospitalizacja	
		I	II	III	IV			Liczba	%
POLSKA	2015 r.	-	-	1	-	1	0,27	1	100,0
	2016 r.	-	-	1	2	3	0,78	3	100,0
3. Lubelskie		-	-	-	1	1	5,08	1	100,0
5. Łódzkie		-	-	-	1	1	4,39	1	100,0
7. Mazowieckie		-	-	1	-	1	1,68	1	100,0

się bakterii w układzie krwionośnym i powstania choroby. Uwarunkowane jest to obecnością naturalnej mikroflory przewodu pokarmowego człowieka, która nie pozwala na namnożenie się patogennej bakterii. Jeżeli jednak bakteria pokona barierę błonową układu immunologicznego aktywuje komórki fagocytyczne (fagocyty) mające za zadanie strawienie bakterii. *L. monocytogenes* wytwarza cząsteczki zwane adhezynami, które umożliwiają adhezję (przyłączenie) komórki bakteryjnej do fagocyta. Kiedy bakteria zostanie pochłonięta przez fagocyt, rozpoczyna produkcję enzymów rozkładających błonę fagocyta, tzw. listeriolizyn. Przez powstałe otwory bakteria wydostaje się do cytoplazmy komórki i dalej do komórek sąsiednich [9, 14, 15].

Na zakażenie pałeczkami *L. monocytogenes* najbardziej narażone są kobiety w ciąży, dzieci, osoby starsze oraz ludzie cierpiący na inne choroby (wykazujący obniżoną odporność), dlatego też powinni oni unikać spożywania surowego mięsa, a także niepasteryzowanego mleka. Oprócz tego spożywane produkty nie powinny być długo przechowywane w lodówce. Surowe mięso i produkty mleczne powinny być trzymane w lodówce oddzielnie, aby uniknąć zanieczyszczenia reszty żywności. [14, 15].

Częstym zjawiskiem jest listerioza noworodków. Może pojawić się ona na drodze zakażenia przez łożysko (tzw. listerioza wczesna lub wrodzona) oraz podczas

porodu (tzw. listerioza późna). Listerioza wczesna (Tabela 2) jest wynikiem zakażenia *L. monocytogenes* kobiety w III trymestrze ciąży. Następnie drogą krwionośną bakteria pokonuje barierę krew-łożysko, infekując płód. Zakażony noworodek cierpi na zaburzenia wielonarządowe, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych lub zapalenie płuc. W tym przypadku śmiertelność noworodków jest bardzo wysoka. Konsekwencją zainfekowania noworodka *Listeria* podczas porodu jest zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, lub śmierć dziecka. Kiedy kobieta zostanie zainfekowana *L. monocytogenes* w I lub II trymestrze ciąży wówczas zakażenie to kończy się poronieniem bądź powoduje uszkodzenie płodu [9, 14].

Salmonella

Charakterystyka i występowanie bakterii

Salmonella to rodzaj gram-ujemnej pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*, do których zaliczane są obecnie 3 gatunki liczące ponad 2400 serotypów. Wyodrębniono 6 podgatunków *Salmonella enterica*, z czego większość bakterii patogennych dla człowieka obejmuje *Salmonella enterica subsp. enterica*. Prawie każdy serotyp *Salmonella* może wywoływać u człowieka reakcje bardzo łagodne bądź zagrażające zdrowiu, w zależności od indywidualnej odporności [18, 19, 20, 21, 22].

Bakterie należące do rodzaju *Salmonella* to względnie beztlenowce, zazwyczaj obdarzone rzęskami, o dużej odporności na warunki zewnętrzne. Mogą przetrwać kilka miesięcy w glebie, zaś w wodzie od kilku dni do kilku tygodni. *Salmonella* rozmnaża się w temperaturach 5°C – 46,2°C i może przeżyć w 0°C. Umieszczenie tych bakterii w -75°C powoduje obumarcie tylko części komórek bakteryjnych. Pałeczki *Salmonella* w stanie anabiozy (czyli obniżonej aktywności życiowej w niekorzystnych warunkach środowiska) potrafią przetrwać w wysuszonej żywności przez nieokreślony czas [19, 20, 22].

Rezerwuarem pałeczek *Salmonella* jest gleba, a także przewód pokarmowy zwierząt dzikich i domowych. Gatunki zakaźne dla człowieka przenoszone są przez ptaki: kaczki, gęsi, gołębie, indyki oraz kury. Pisklęta i zarodki tych ptaków mogą być również zakażone. Ponadto bakterie z rodzaju *Salmonella* wyizolowano z ssaków takich jak konie, cielęta, owce, świnie, lisy oraz gryzonie domowe. Ważnym rezerwuarem *Salmonella* są również psy i koty [20, 21, 22].

Salmonelloza

Salmonellozę nazywana jest choroba wywoływana przez bakterie z rodzaju *Salmonella*, z wyjątkiem *Salmonella typhi* (przyczyna duru brzuszego) oraz *Salmonella paratyphi* (przyczyna duru rzekomego) [19,23].

Epidemiologia salmonellozy

W UE w 2016 r. odnotowano 94530 zachorowań, co umiejscowiło salmonellozę na 3 pozycji najczęściej występujących zoonoz w państwach członkowskich. Pomimo tendencji spadkowej obserwowanej w UE w latach 2008-2016, od 2012 liczba zachorowań utrzymuje się na tym samym poziomie. Według PZH w Polsce w 2017 r. zarejestrowano 10007 zachorowań, co jest liczbą po-

równywalną do ostatnich 10 lat (2008-2017). Na terenie kraju najczęściej dochodzi do zatruc wywołanych przez serotypy *S. enteritidis*, *S. typhimurium* i *S. agona* [1, 7, 8, 19, 20, 21].

Drogi zakażenia

Salmonelloza rozpoczyna się drogą pokarmową. Źródłami choroby są zanieczyszczona kałem zwierząt woda oraz produkty spożywcze. Najczęściej zakażenie pochodzi od jaj, mięsa drobiowego oraz przetworów mięsnych. Do zakażenia może dojść bezpośrednio od zwierząt, rzadziej od chorego człowieka. Biernymi przenosicielami bakterii są muchy lub inne owady. W wyjątkowych warunkach (szpitale, domy opieki) bakterie mogą rozprzestrzeniać się kontaktowo lub drogą kropelkową. W grupie szczególnego ryzyka zachorowania znajdują się dzieci, osoby w podeszłym wieku, przewlekle chorzy oraz osoby z immunosupresją [20, 21, 22].

Objawy salmonellozy

Obraz kliniczny salmonellozy może wyglądać bardzo różnie, co zależne jest od właściwości danego serotypu, dawki zakażającej, stanu ogólnej odporności osoby zakażonej. Zdrowe, dorosłe osoby mogą przechodzić chorobę bezobjawowo. Dawka zakażająca – powyżej 10^5 pałeczek – jest niezbędna do pokonania obrony organizmu gospodarza (kwasowość środowiska wewnętrznego żołądka, mikrobiota jelitowa, ruchy perystaltyczne). Najczęściej występująca postać – żołądkowo-jelitowa, objawia się kilkudniowymi dolegliwościami, jak bóle brzucha (typu napadowej kolki), biegunka (wodniste stolce, czasem z domieszką śluzu lub krwi), odwodnienie, zaburzenia gospodarki wodno-elektrolitowej, niekiedy nudności i wymioty. Pokonanie przez bakterie bariery jelitowej i przedostanie się do krwi, a następnie do różnych narządów, może wywołać zmiany chorobowe:

zapalne, ropne i krwotoczne, w zależności od lokalizacji (zapalenie płuc, zapalenie kości, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie wsierdza). Uogólnienie choroby może prowadzić do posocznicy [19, 20, 22, 24].

Patogeneza

Po dostaniu się bakterii do przewodu pokarmowego ich liczba znacząco spada w żołądku. Wskazuje to na wrażliwość *Salmonella* na niskie pH i jednocześnie istotę cech metabolicznych, umożliwiających przetrwanie w środowisku kwasowym jako czynnika wirulencji. Następnie pałeczki przedostają się do światła jelita cienkiego, gdzie namnażają się, będąc konkurencją dla mikrobioty jelitowej. Dzięki inwazyjnym – białkom i substancjom sekrecyjnym – bakterie zakotwiczą się na kosmkach jelita i penetrują komórki M błony śluzowej jelita cienkiego (odpowiedzialnych za wchłanianie makrocząsteczek ze światła jelita), pokrywających kępki Peyera (skupiska grudek limfatycznych). Stamtąd pałeczki mogą przedostać się do krwi i narządów wewnętrznych. Najważniejszą rolę w patogenezie przypisuje się endotoksynie, które w połączeniu z penetracją uszkadza ścianę jelita i odpowiada za biegunkę [21, 23, 24].

Diagnostyka

Rozpoznanie salmonellozy opiera się na obserwacji objawów klinicznych, wywiadzie epidemiologicznym oraz badaniu mikrobiologicznym, polegającym na wyizolowaniu bakterii ze stolca lub krwi oraz płynów ustrojowych (ropa, mocz, żółć, płyn mózgowo-rdzeniowy, szpik), w zależności od lokalizacji zmian chorobowych. Pomocą w diagnostyce są również badania serologiczne, obrazowe przy użyciu USG, TK, RTG oraz rektoromanoskopia [20, 21].

Profilaktyka

Zapobieganie salmonellozom to przede wszystkim ściśle przestrzeganie higieny osobistej oraz zasad sanitarnych podczas produkcji, transportu i przechowywania żywności, zwłaszcza pochodzenia zwierzęcego. Należy odpowiednio myć i dezynfekować sprzęt kuchenny oraz przyrządzać mięso oraz jaja w dostatecznie wysokiej temperaturze. W fermach hodowlanych profilaktyką jest nadzór weterynaryjny. Istotnym zapobieganiem rozprzestrzeniania się bakterii w rzeźniach, przetwórnictwach, magazynach i restauracjach są systematyczne przeprowadzanie dezynsekcji i deratyzacji [20, 21, 22].

Yersinia

Charakterystyka i występowanie bakterii

Rodzaj *Yersinia*, należący do rodziny gram-ujemnych pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*, obejmuje obecnie 17 gatunków, wśród których znajdują się szczepy wywołujące choroby u ssaków, ptaków, gadów, płazów i ryb oraz szczepy niechorobotwórcze. Dla człowieka patogenne są 3 gatunki: odpowiedzialna za dżumę *Yersinia pestis* oraz *Yersinia enterocolitica* i *Yersinia pseudotuberculosis*, wywołujące również u ludzi odzwierzęcą chorobę układu pokarmowego – jersiniozę [18, 25, 26, 27].

Y. enterocolitica i *Y. pseudotuberculosis* mają budowę małych, prostych, czasem owalnych pałeczek. Są katalazo-dodatnimi (wytwarzającymi enzym rozkładający nadtlenek wodoru) względnie beztlenowcami. Optymalnie wzrastają w temperaturze 22-29°C. Ponieważ bakterie te są mało wrażliwe na niskie temperatury oraz potrafią namnażać się w 4-8°C, szybko stają się dominującą mikrobiotą w żywności przechowywanej w chłodniach. Oba gatunki wykazują odporność na niskie pH

otoczenia – potrafią przetrwać i namnażać się w nim przez wiele dni, co umożliwia bakteriom pokonanie bariery kwaśnego środowiska żołądka, a następnie przeniesienie do jelita. Jest to możliwe dzięki syntezie ureazy bezpośrednio alkalizującej otoczenie bakterii. Obie bakterie wytwarzają endotoksyny, a *Y. enterocolitica* produkuje ciepłostalą endotoksynę, powodującą zatrucia pokarmowe [20, 25, 28, 29, 30].

Y. enterocolitica i *Y. pseudotuberculosis* powszechnie występują w środowisku we wszystkich strefach klimatycznych – zostały wyizolowane między innymi z gleby, ścieków, wód powierzchniowych, z powierzchni roślin, żywności oraz od zwierząt zarówno chorych, jak i zdrowych. Patogenne dla człowieka serotypy spotykane są u kotów, psów, krów, koni, wielbłądów, lisów, małp, królików, drobiu, owiec, gryzoni, zwierzyny łownej oraz świń uważanych za ich główny rezerwuar. Miejscami bytowania omawianych bakterii u tych zwierząt są jama gębowa oraz przewód pokarmowy [23, 25, 30, 32].

Jersinioza

Jersinioza to choroba o globalnym charakterze wywołana przez *Y. enterocolitica* lub *Y. pseudotuberculosis*. Czasem zachorowanie powodowane przez *Y. pseudotuberculosis* określane jest jako rodencjoza (gruźlica rzeżyma). Znacznie częściej dochodzi do zarażeń *Y. enterocolitica* niż *Y. pseudotuberculosis* [23, 25, 30, 32].

Epidemiologia

Według raportu EFSA w 2016 r. na terenie UE odnotowano 6861 przypadków zachorowań na jersiniozę, co umieściło ją na 3 pozycji najczęściej występujących zoonoz w UE. Pomimo generalnego trendu spadkowego liczby zachorowań na jersiniozę w Europie (2008-2016), przez ostatnie 5 lat (2012-2016) średnia liczba przypadków zachorowań w roku utrzymuje się na względnie

stałym poziomie. Według Państwowego Zakładu Higieny (PZH) w Polsce liczba notowanych przypadków w 2017 wynosiła 201 [1, 8, 29].

Drogi zarażenia

Do zarażenia jersiniozą dochodzi drogą fekalno-oralną lub przez bardzo uszkodzoną skórę. Liczba bakterii wywołująca zakażenie wynosi 10^8 - 10^9 pałeczek/ml. Najczęstszym źródłem zakażenia są świeże lub niedogotowane mięso, zwłaszcza wieprzowe, niepasteuryzowane mleko oraz zanieczyszczona woda. Żywność może zostać zakażona przy rozbiorze tusz, procesach technologicznych oraz w chłodniach. Rzadziej dochodzi do zarażenia bezpośrednio od zwierzęcia. Szczególnie rzadko źródłem zarażenia jest chory człowiek. *Y. enterocolitica* zalicza się do bakterii przenoszonych za pośrednictwem krwi [19, 20, 23, 25, 30, 31].

Na jersiniozę najczęściej chorują dzieci i młodzież. Do zawodów grupy podwyższonego ryzyka zaliczają się hodowcy zwierząt, lekarze weterynarii, obsługa ogrodów zoologicznych, rzeźnicy oraz pracownicy przemysłu mięsnego, a także osoby mające kontakt ze zwierzęcą łowną [27, 30, 23, 34].

Objawy

Objawami jersiniozy są silne bóle brzucha oraz powiększone węzły chłonne jamy brzusznej oraz ich zapalenie. Występują również okresowe stany podgorączkowe i luźne wypróżnianie, czasem z domieszką krwi w stolcu. U dorosłych choroba przebiega zazwyczaj jako ostre zapalenie jelitowe, a u dzieci zdarza się ostre zapalenie żołądkowo-jelitowe. Przy uogólnieniu zakażenia, może dojść do ciężkiej posocznicy. Późnymi następstwami nierozpoznanej i nieleczonej na wczesnym etapie jersiniozy może być nawracające reaktywne zapalenie stawów [19, 20, 23].

Patogeneza

Zjadliwość *Y. enterocolitica* i *Y. pseudotuberculosis* determinują geny zawarte w chromosomie bakteryjnym oraz w tzw. plazmidzie wirulencji. Bakterie te są wewnątrzkomórkowymi pasożytami. Ich chorobotwórczość wiąże się ze zdolnościami do inwazji, namnażania się wewnątrz gospodarza oraz z produkowaniem enterotoksyn. Po dostaniu się do organizmu przez przewód pokarmowy, bakterie namnażają się w migdałkach podniebiennych lub krezkowych węzłach chłonnych. Jest to możliwe dzięki ich zdolności do wytwarzania w temperaturze 37°C białek powierzchniowych mających szczególne powinowactwo do komórek M błony śluzowej jelita cienkiego. Umożliwia to pałeczkom *Yersinia* wnikanie do tych komórek na drodze fagocytozy, skąd przedostają się do węzłów chłonnych. Innym wirulentnym czynnikiem jest wytwarzanie do środowiska białek Yop, niszczących cytoskielet i zaburzających przekazy międzykomórkowe makrofagów. *Y. enterocolitica* może namnażać się w nabłonku jelita, skąd może przedostać się do krwi. Z kolei za pośrednictwem krwi bakterie mogą trafiać do innych organów wewnętrznych [19, 23, 25, 29].

Diagnostyka

Ze względu na pokrywanie się objawów jersiniozy z chorobami innego pochodzenia, o rozpoznaniu decydują badania laboratoryjne. Jersiniozę potwierdza się przez badanie bakteriologiczne, polegające na wyhodowaniu pałeczek *Y. enterocolitica* lub *Y. pseudotuberculosis* z kału lub krwi. Do diagnostyki wykorzystuje się też badania serologiczne: aglutynacja, odczyn wiązania dopełniacza, odczyn hemaglutynacji, test ELISA [19, 30].

Profilaktyka

Podstawą profilaktyką jest zachowanie odpowiedniej higieny osobistej, zwłaszcza przy kontaktach ze zwierzętami oraz utrzymywanie czystości ich otoczenia. Powszechnie stosowane środki odkażające zabijają bakterie odpowiedzialne za jersiniozę. Zakażeniu

można zapobiec przyrządzając mięso w odpowiednio wysokich temperaturach (np. podczas gotowania, pieczenia) oraz pijąc wyłącznie pasteryzowane mleko. Należy również używać oddzielnych noży i desek do krojenia surowego mięsa. Przy zapobieganiu jersiniozie ma znaczenie również sanitarno-weterynaryjna ocena zdatności do spożycia tusz [23, 32, 33, 34].

Jednostka chorobowa		Definicja przypadku							
		Możliwy		Prawdopodobny		Potwierdzony		Razem	
		Liczba	%	Liczba	%	Liczba	%	Liczba	%
Dur brzuszny (A01.0) ^{UE}		x	x	-	-	2	100,0	2	100,0
Dury rzekome A,B,C (A01.1-A01.3) ^{UE}		x	x	-	-	2	100,0	2	100,0
Salmonelozy	zatrucia pokarmowe (A02.0) ^{UE/PL}	x	x	314	3,2	9387	96,8	9701	100,0
	posocznica (A02.1) ^{PL}	x	x	x	x	195	100,0	195	100,0
	inne zakażenia pozajelitowe (A02.2-A02.9) ^{PL}	x	x	x	x	131	100,0	131	100,0
Czerwonka bakteryjna /szigelozą/ (A03) ^{UE}		x	x	-	-	15	100,0	15	100,0
Inne bakteryjne zakażenia jelitowe	zakażenia <i>E. coli</i> biegunkotwórczą (A04.0-A04.2) ^{PL}	x	x	318	96,4	12	3,6	330	100,0
	zakażenia <i>E. coli</i> enterokrwotoczą (A04.3) ^{UE}	4	50,0	-	-	4	50,0	8	100,0
	kampylobakterioza (A04.5) ^{UE}	x	x	14	1,8	773	98,2	787	100,0
	jersinioza (A04.6) ^{UE}	x	x	-	-	167	100,0	167	100,0
Inne bakteryjne zatrucia pokarmowe: zatrucia jadem kielbasianym (A05.1) ^{UE/PL}		8	30,8	-	-	18	69,2	26	100,0
Giardioza /lamblioza/ (A07.1) ^{UE}		x	x	1	0,1	1445	99,9	1446	100,0
Kryptosporidioza (A07.2) ^{UE}		x	x	-	-	6	100,0	6	100,0
Tularemia (A21) ^{UE}		x	x	-	-	18	100,0	18	100,0
Brucelozą: nowe zachorowania (A23) ^{UE}		x	x	-	-	3	100,0	3	100,0
Leptospiroza (A27) ^{UE}		x	x	-	-	4	100,0	4	100,0
Jersinioza pozajelitowa (A28.2) ^{PL}		x	x	32	84,2	6	15,8	38	100,0
Listerioza (A32) ^{UE}		x	x	-	-	98	100,0	98	100,0

Tabela 3. Zachorowania na wybrane choroby zakaźne zarejestrowane w 2016 r. wg definicji przypadku [7]

Podsumowanie

Kampylobakterioza, salmonelloza, listerioza oraz jersinioza należą do najczęstszych zachorowań zarejestrowanych przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności – EFSA oraz Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Zwalczania Chorób – ECDC, na terenie Unii Europejskiej (Tabela 3).

Wszystkie te choroby mają zazwyczaj charakter epidemicznych, dlatego konieczna jest obserwacja ognisk ich występowania, a także trafne określenie przyczyny wystąpienia epidemii. Aby zapobiec pojawieniu się choroby należy zachować szczególne warunki higieny pamiętając o poprawnym przyrządzeniu posiłków wykonanych z produktów pochodzenia zwierzęcego. Profilaktyka, wiedza i umiejętność zapobiegania pojawieniu się zakażenia, a także prawidłowe stosowanie zasad higieny oraz świadomość konsumentów mogą przyczynić się do zmniejszenia liczby zakażeń, a co za tym idzie obniżenia liczby hospitalizacji i śmiertelności.

Literatura

1. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016; [http:// www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5077], (29.12.2017)
2. Wyszynska A., Życka J., Godlewska R., Jagusztyn-Krynicka E. K. (2008) The *Campylobacter jejuni/coli cjaA* (cj0982c) Gene Encodes an N-Glycosylated Lipoprotein Localized in the Inner Membrane, *Current Microbiology* 57: 181 – 188.
3. Wyszynska A., Pawłowski M., Bujnicki J., Pawelec D., van Putten J. P. M., Brzuszkiewicz E., Jagusztyn-Krynicka E. K. (2006). Genetic characterisation of the *cjaAB* Operon of *Campylobacter jejuni*, *Polish Journal of Microbiology*, 55(2): 85 – 94.
4. Szczepańska B., Andrzejewska M., Śpica D., Klawe J., (2014) *Campylobacter* - niedoceniany w Polsce czynnik etiologiczny zakażeń przewodu pokarmowego, *Problemy Higieny Epidemiologicznej*, 95(3): 574 – 579.
5. Rokosz N., Rastawicki W., Wołkowicz T. (2014) Mikrobiologiczna diagnostyka zakażeń wywołanych przez pałeczki *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* u ludzi, *Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej*, 68: 48 – 56.
6. Center for Disease Control and Prevention – cdc.gov/ – Pathogens and Diseases; Drug-resistant *Campylobacter* [https:// www.cdc.gov/narms/disease.html]
7. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego Państwowy Zakład Higieny – Zakład Epidemiologii, Główny Inspektor Sanitarny. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2016 roku., Warszawa, http:// www.wold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2016/Ch_2016.pdf (29.12.2017)
8. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego Państwowy Zakład Higieny – Zakład Epidemiologii, Główny Inspektor Sanitarny: „Meldunki o zachorowaniach na choroby zakaźne, zakażeniach i zatruciach w Polsce”, Warszawa, http://www.wold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2017/INF_17_12A.pdf (29.12.2017)
9. Szewczyk E.M., Diagnostyka bakteriologiczna, Redaktor Krystyna Kruczyńska, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2013.
10. Silva J., Leite D., Fernandes M., Mena C., Gibbs C.A., Teixeira. (2011) *Campylobacter* spp. as a Foodborne Pathogen: a review, *Front. Microbiol.*, 2: 200, doi: 10.3389/fmicb.2011.00200.
11. Wieczorek K., Osek J. (2016), Raport EFSA dotyczący oporności przeciwdrobnoustrojowej *Campylobacter* i *Salmonella* izolowanych w krajach Unii Europejskiej w 2014 r., *Życie weterynaryjne* 91(6): 405-408.
12. Osek J., Wieczorek K. (2017) Bakteryjne choroby odzwierzęce u ludzi oraz obecność ich czynników etiologicznych u zwierząt i w żywności w krajach Unii Europejskiej w 2015r., *Życie weterynaryjne* 92(4): 290-296.
13. Sadkowska-Todys M., Kucharczyk B. (2016) *Campylobacteriosis* in Poland in 2013 and 2014, *Przegląd Epidemiologiczny - Epidemiological Review*, 70(2): 209-215.
14. Zadernowska A., Chajęcka-Wierzchowska W., Kłębukowska L., Zarzecka U., Łaniewska-Trokenheim Ł. (2017). Kultury ochronne i ich zastosowanie w ograniczeniu rozwoju pałeczek *Listeria monocytogenes* w surowcach i produktach mięsnych, *Kosmos problemy nauk biologicznych*, 66(1): 59-62.
15. Jurkiewicz A., Oleszak-Momot W. (2015). *Listeria monocytogenes* jako problem zdrowia publicznego, *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu*, 21(1): 29-32.
16. Szewczyk R., Wieczorek K., Osek J. (2011). Molekularne mechanizmy chorobotwórczości termotolerancyjnych *Campylobacter*, *Medycyna weterynaryjna* 67(11): 725-732.
17. Bednarski M., Wieliczko A., (2006). *Kampylobakterioza zwierząt - aspekty epidemiologiczne*, *Medycyna weterynaryjna* 62(11): 1211-1214.
18. ww.itis.gov (2017)
19. Dziubek Z. (red. nauk.), *Choroby zakaźne i pasożytnicze*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa (2012).
20. Cianciara J., Juszczyk J. (red. nauk.), *Choroby zakaźne i pasożytnicze*, CZELEJ, Lublin (2012).
21. Gliški Z., Kostro K. (red. nauk.), *Choroby zakaźne zwierząt z elementami epidemiologii i zoonoz*, PWRiL, Warszawa (2011).
22. Magdzik W., Naruszewicz-Lesiuk D., Zieliński A. (red. nauk.), *Choroby zakaźne i pasożytnicze – epidemiologia i profilaktyka*, [Alfa]-Medica Press, Bielsko-Biala (2004).
23. Gliški Z., Kostro K., Buczek J., *Zoonozy*, PWRiL, Warszawa (2008).
24. Finlay B.B., *Molecular and Cellular Mechanisms of Salmonella Pathogenesis*. In: Dangi J.L. (eds) *Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals*, 1994, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol 192. Springer, Berlin, Heidelberg.
25. Mielczarek P., Bałaj M. (2004) *Jersinioza - rzadko rozpoznawana choroba układu pokarmowego*, *Gastroenterologia Polska*, 11(1): 69-74.
26. Abramczyk K., Gałzka A. (2017). Zabójcze drobnoustroje – mikroorganizmy wykorzystywane jako broń biologiczna, *Postępy Mikrobiologii*, 56 (4): 395-404.
27. Facts about yersiniosis, https://ecdc.europa.eu/en/yersiniosis/facts, (12.01.2018r.)
28. Abdela, W., Graham, M., Tsegaye, H., Temesgen, S., Yehualaeshet, T. (2011). Effects of orange juice pH on survival, *urease* activity and DNA profiles of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* stored at 4 degree C, *Journal of Food Safety*, 31(4):487-496.
29. Janowska M., Jędrzejewska B., Janowska J. (2012). *Jersinioza – nowe wyzwanie współczesnej medycyny*, *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu*, 18(3): 257-260.
30. Bartoszewicz L., Kalicki B., Grad A., Jung A., Żuber J. (2008). *Obraz kliniczny i następstwa zakażenia pałeczką Yersinia enterocolitica*, *Pediatr. Med. Rodz.*, 4(3): 164-168.
31. Galindo C.L., Rosenzweig J.A., Kirtley M.L., Chopra A.K. (2011). Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in Human Yersiniosis. *Journal of Pathogens*, ID 182051, doi:10.4061/2011/182051.
32. Gliški Z., Kostro K., (2014). *Zagrożenie człowieka chorobami zakaźnymi od zwierząt towarzyszących. Część II. Jersinioza, bartonelozy, kolibakterioza, zakażenie Mycobacterium marinum, grzybica skóry i kryptokokoza*, *Życie Weterynaryjne*, 89(4): 326-329.
33. *Safe Minimum Cooking Temperatures*, https://www.foodsafety.gov/keep/charts/mintemp.html (12.01.2018.)
34. Gliški Z., Kostro K., (2017). *Profilaktyka zoonoz od grubej zwierzyny łownej*, *Życie Weterynaryjne*, 92(7): 493-495.

Pathogenic gastrointestinal bacteria as a public health problem

Kinga Nakonieczna, Natalia Gniado

The following article describes four strains of pathogenic bacteria found in food of animal origin that cause numerous cases of infection of the human digestive system. Zoonoses, otherwise known as zoonoses, are diseases transmitted by animals. Pathogenic agents zoonoses - bacteria - are transmitted to people as a result of direct contact with an infected animal or as a result of consumption of animal products such as milk, cheese or meat.

European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) publishes an annual report on food epidemics as well as sources and factors of zoonotic diseases in humans. The information contained in the report comes from data that are transmitted to EFSA by the member countries of the European Union. This year's report, published on 12th December 2017, in the first place, due to the highest number of cases, places campylobacteriosis caused by bacteria – genus *Campylobacter*. There are also diseases such as salmonellosis, listeriosis and yersiniosis [1].

Key words: zoonoses, campylobacteriosis, listeriosis, yersiniosis, salmonellosis

Wybrane mechanizmy obronne organizmów przed stresem oksydacyjnym ze szczególnym uwzględnieniem dysmutaz ponadtlenkowych

Nikola Sikora, Zuzanna Znajewska, Grażyna Dąbrowska

DOI: 10.24131/3247.170403

Streszczenie:

Stres oksydacyjny można określić jako brak równowagi pomiędzy reaktywnymi formami tlenu, RFT (tlenem singletowym, anionorodnikiem ponadtlenkowym, rodnikiem hydroksylowym i nadtlenkiem wodoru) a systemem antyoksydacyjnym. Reaktywne formy tlenu reagują ze związkami organicznymi zaburzając homeostazę organizmu. W organizmach są one eliminowane poprzez nieenzymatyczne przeciwutleniacze i enzymy usuwające lub dezaktywujące RFT. Wśród nich kluczową rolę odgrywają dysmutazy ponadtlenkowe (SOD), których poziom w komórkach roślinnych może

być regulowany wieloma czynnikami stresowymi. Dysmutazy ponadtlenkowe obecne są zarówno u organizmów tlenowych jak i beztlenowych, a ich klasyfikacja obejmuje izoformy miedziowo-cynkowe, manganowe, żelazowe i niklowe. W niniejszej pracy scharakteryzowano rodzinę roślinnych dysmutaz ponadtlenkowych, ich rolę podczas stresu oksydacyjnego oraz przedstawiono stopień pokrewieństwa między sekwencjami aminokwasowymi roślinnych i ludzkich SOD, a także tkankowo-specyficzną oraz rozwojowo-zróżnicowaną ekspresję genów *Sod*.

Słowa kluczowe: wzrost i rozwój roślin, stres oksydacyjny, SOD, reaktywne formy tlenu

otrzymano: 14.10.2017; przyjęto: 22.06.2018; opublikowano: 30.06.2018



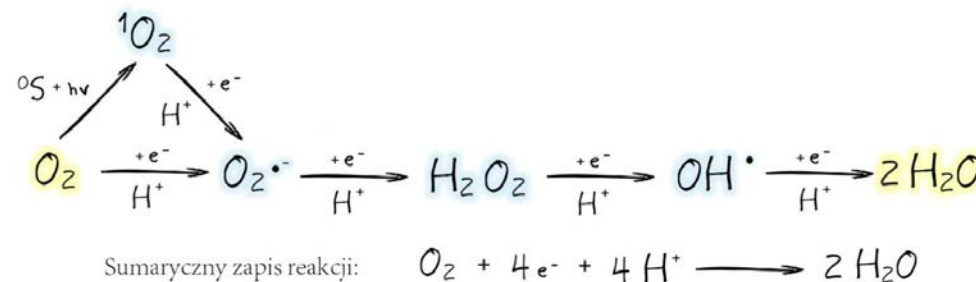
Nikola Sikora: Zakład Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu



mgr Zuzanna Znajewska: Zakład Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu



dr hab. Grażyna Dąbrowska: Zakład Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu



Ryc. 1. Schemat stopniowej redukcji cząsteczki tlenu do wody, w etapach jednoelektronowych lub przy wzbudzeniu, prowadzącej do wytworzenia różnych ROS (■), gdzie 1O_2 to siarka, a $h\nu$ energia

Źródło: oprac. własne na podst.: Scandaliosa (2005).

Wstęp

Wzrost i rozwój organizmów zależy od współdziałania zarówno czynników endo-, jak i egzogennych. Czynniki te wpływają na metabolizm organizmu, przede wszystkim na poziomie ekspresji genów (Tretyn, 2002; Luscombe i wsp., 2004). Każdego roku stres wynikający z zaburzeń działania czynników środowiskowych powoduje znaczne straty w jakości i produktywności pól rolnych (Hatfield i wsp., 2011). Ekspozycja roślin na różnorodne czynniki abiotyczne, takie jak: promieniowanie UV, nadmiar promieniowania fotosyntetycznego (PAR – ang. *photosynthetically active radiation*), wahania temperatury, suszę, metale ciężkie, stres osmotyczny, zanieczyszczenia atmosferyczne (O_3 , SO_2 , NO , NO_2), niektóre herbicydy (np. parakwat), a także czynniki biotyczne (np. atak patogenu) przyczynia się do wytworzenia stresu oksydacyjnego, zwanego również stanem szoku tlenowego (Apel i Hirt, 2004).

Odpowiedź roślin na szok tlenowy może powodować uruchomienie takich procesów jak: lignifikacja, tworzenie brodawek korzeniowych i starzenie się komórek. Ze stanem szoku tlenowego bezpośrednio wiąże się wytworzenie na drodze częściowej redukcji cząsteczki

tlenu (O_2) lub reaktywnych form tlenu (RFT, ROS, ang. *reactive oxygen species*), takich jak: tlen singletowy 1O_2 , anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\cdot-}$, rodnik hydroksylowy OH^{\cdot} i nadtlenek wodoru H_2O_2 (Das i Roychoudhury, 2014) (Ryc. 1).

Reakcja stresu oksydacyjnego rozpoczyna się od nadmiernego wytwarzania przez organizm reaktywnych form tlenu i zaburzenia równowagi antyoksydantów (AOX, ang. *antioxidant*), co doprowadza do naruszenia homeostazy redoks w organizmie (Bhattacharyya i wsp., 2014) (Ryc. 2). Produkcja i akumulacja wolnych rodników jest obserwowana w reakcji organizmów na wiele różnych stresów środowiskowych (Lobo i wsp., 2010).

RFT są potencjalnie szkodliwe dla komórek i poszczególnych organelli komórkowych, ponieważ mogą wchodzić w reakcję z kwasami nukleinowymi, białkami, lipidami i węglowodanami (Baek i Skinner, 2005; Sharma i wsp., 2012).

Rośliny, jak i inne organizmy, posiadają mechanizmy umożliwiające skuteczne i szybkie usuwanie reaktywnych form tlenu, jest to tzw. „system wychwytyjący RFT”, inaczej nazywany antyoksydacyjnym systemem obronnym (Dat i wsp., 2001; Bałabusta i wsp., 2016; Hasanuzzaman i wsp., 2017). System ten skutecznie usuwa wolne rodniki tlenowe z organelli komórkowych, przede wszystkim z chloroplastów, mitochondriów, peroksyosomów oraz glioksysomów (Alscher i wsp., 2002). Wydajne funkcjonowanie antyoksydantów obu rodzajów ma fundamentalne znaczenie dla zachowania prawidłowej struktury i funkcji każdej żywej komórki w warunkach stresowych. Do przeciwutleniaczy nieenzymatycznych zalicza się m.in.: glutation (GSH), α -tokoferol (witaminę E), kwas askorbinowy (witaminę C), a także cysteinę, homoglutation, karotenoidy, flawonoidy i mannitol. Natomiast enzymatyczny system wychwytyjący toksyczne rodniki tlenowe składa się z enzymów bezpośrednio

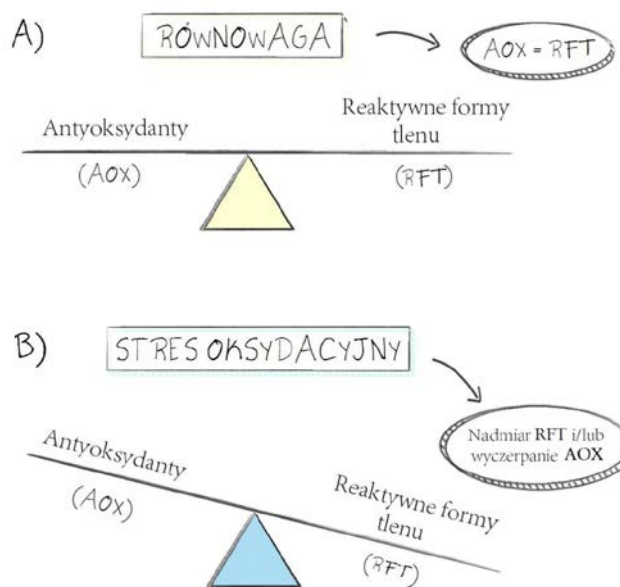
usuujących RFT – dysmutaz ponadtlenkowych (SOD), katalaz (CAT), peroksydaz (POX) oraz z enzymów cyklu Halliwell-Asada, uczestniczących w unieczynnieniu RFT poprzez antyutleniacze niskocząsteczkowe (Dąbrowska i wsp., 2007b). Generowanie RFT ogranicza także alternatywna oksydaza obecna w roślinnych mi-

tochondriach (Małecka i Tomaszewska, 2005; Sharma i wsp., 2012). Złożony antyoksydacyjny system obronny umożliwia roślinom wydajne przekształcanie energii słonecznej w chemiczną i prawidłowe funkcjonowanie w zmiennych warunkach środowiskowych.

Intensywność przemian zachodzących w komórce roślinnej z udziałem RFT zależy od ich stężenia, które jest wynikiem równowagi między szybkością powstawania reaktywnych form tlenu i ich eliminacji. Wzrost stężenia tych cząsteczek prowadzi do stresu oksydacyjnego. Do jego powstania przyczyniają się: zbyt niska/ zbyt wysoka temperatura, deficyt wody lub soli mineralnych, nadmiar jonów, promieniowanie UV, metale ciężkie, nadmiar promieniowania fotosyntetycznego, atak patogenu, stres osmotyczny (Kotchioni i Gachmo, 2006).

Tlen jako pierwiastek życia i śmierci

Tlen (O_2), którego zawartość w dolnych warstwach atmosfery wynosi 21%, w atmosferze występuje jako tlen trypletowy i pełni funkcję najważniejszego biologicznego akceptora elektronów (Zahnle i wsp., 2010). Pierwiastek ten umożliwia życie organizmom tlenowym, ale stanowi także źródło poważnych zagrożeń fizjologicznych, będących nieuniknioną konsekwencją stresu oksydacyjnego i ceną jaką organizmy muszą płacić za życie w środowisku zawierającym tlen. Z tego względu, mówi się o paradoksie związanym z obecnością tlenu w atmosferze. Polega on na tym, że z jednej strony metabolizm tlenowy dostarcza organizmom aerobowym więcej energii w porównaniu z metabolizmem beztlenowym anaerobów, a z drugiej strony stopniowa redukcja O_2 do H_2O prowadzi do powstawania toksycznych dla komórki RFT (Małecka i Tomaszewska, 2005; Müller i wsp., 2012). Presja ewolucyjna wywierana przez toksyczność tlenu doprowadziła do wytworzenia mecha-

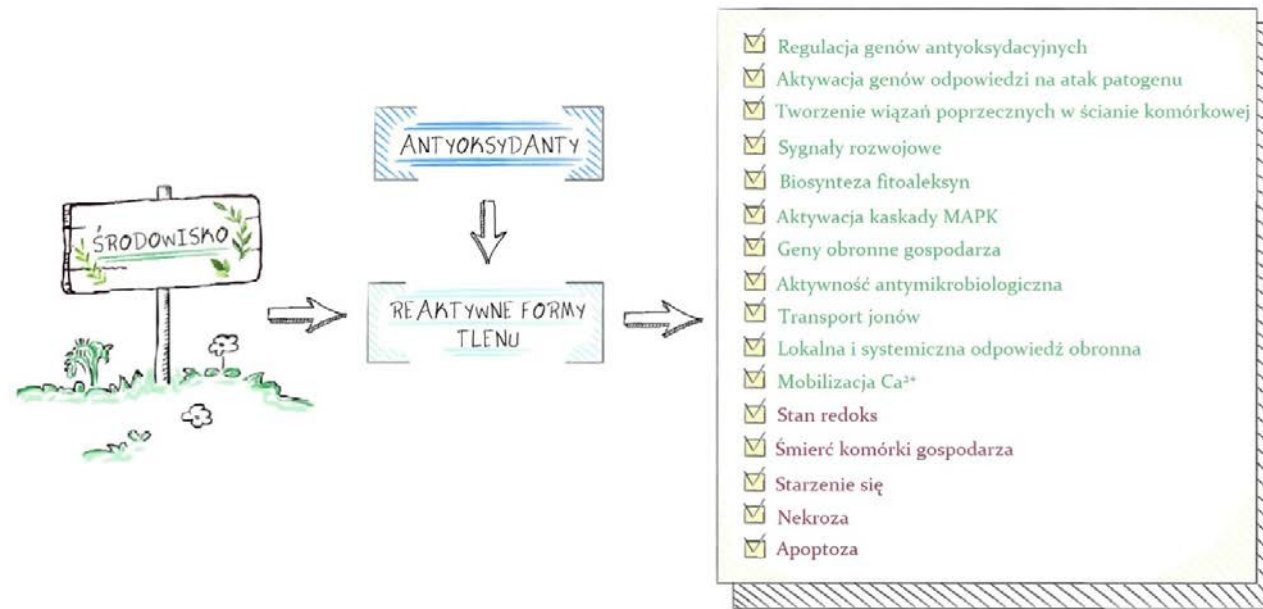


Ryc. 2. Schemat ilustrujący przyczyny stresu oksydacyjnego;

(a) w naturalnych warunkach komórki utrzymują dynamiczną równowagę między produkcją antyoksydantów (AOX) i reaktywnych form tlenu (RFT);

(b) w niekorzystnych warunkach środowiskowych dochodzi do wzrostu poziomów RFT i/lub wyczerpania antyoksydantów, w efekcie czego zakłócona zostaje równowaga redoks, prowadząca do powstania w komórce stresu oksydacyjnego.

Źródło: oprac. własne na podst.: Scandaliosa (2005).



Ryc. 3. Schemat przedstawiający niektóre z korzystnych (kolor zielony) oraz niekorzystnych (kolor czerwony) funkcji RFT; MAPK – kinazy aktywowane mitogenami

Źródło: Kotchioni i Gachmo, 2006.

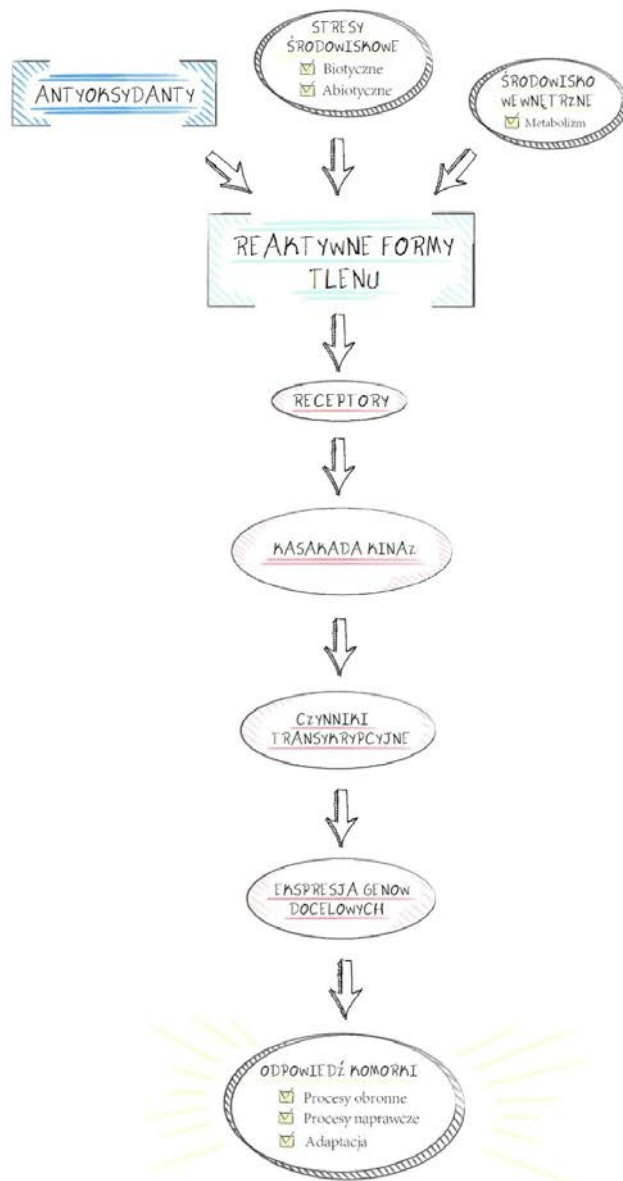
nizmów zmniejszających niepożądane skutki działania RFT oraz do konstruktywnego wykorzystania wolnych rodników tlenowych (Lobo i wsp., 2010; Bhattacharyya i wsp., 2014). Twierdzenie, że wolne rodniki tlenowe są jedynie toksycznymi produktami metabolizmu tlenowego zmieniło się wraz z odkryciem pełnienia przez RFT (szczególnie H_2O_2 i O_2^{\cdot}) roli obronnej przed patogenami oraz funkcji precyzyjnie regulowanych cząsteczek sygnałowych, przekazujących informacje do komórki (Scandalios, 2005; Ślesak i wsp., 2007) (Ryc. 3).

Charakterystyka wybranych genów uruchamianych w odpowiedzi na obecność RFT

W trakcie ewolucji organizmy wykształciły skomplikowane systemy antyoksydacyjne w celu utrzymania równowagi i sprawnego funkcjonowania komórek. Poznane są dwa typy systemów przeciwutleniających: nieenzymatycznych i enzymatycznych. Tokoferol, glutation, flawonoidy, karotenoidy i kwas askorbinowy należą do tych pierwszych, a wśród enzymów można wyróżnić: dysmutazy ponadtlenkowe, peroksydazy (askorbiniano-

wa, glutationowa), katalazy i enzymy utleniające i redukujące askorbinian (Dąbrowska i wsp., 2007).

Zróznicowana ekspresja genów w komórce jest niezbędna dla jej prawidłowego funkcjonowania oraz pełnienia ściśle określonej roli metabolicznej. Organizm może reagować i odpowiadać na różne warunki środowiskowe w ściśle określony sposób, np. poprzez aktywację lub inaktywację wybranych genów. Uważa się, że geny, których ekspresja wzrasta podczas trwania stresu są odpowiedzialne za ochronę przed czynnikami powodującymi stres lub wymaganymi dla przetrwania organizmu w niekorzystnych warunkach. Wciąż potrzebne są badania na temat podstaw molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za rozpoznawanie RFT, poprzez które genom odbiera sygnały środowiskowe i mobilizuje organizm do reakcji. Wiadomo, że u organizmów należących do wyższych eukariontów odpowiedź na stres oksydacyjny jest bardziej złożona w porównaniu do prokariotów i drożdży. W systemie ssaczym w regulację odpowiedzi na stres oksydacyjny zaangażowane są czynniki transkrypcyjne NF- κ B (ang. *nuclear factor κ B*) oraz AP-1 (ang. *activator protein-1*) (Skrzycki i Czeczot, 2004; Scandalios, 2005; Ranninga i wsp., 2014). Ponadto indukcja specyficznych genów antyoksydacyjnych, takich jak: S-transferaza glutationowa (*Gst*), metalotioneina-I i manganowa dysmutaza ponadtlenkowa (*MnSod*), zachodzi za pośrednictwem elementów warunkujących odpowiedź antyoksydacyjną (ARE – ang. *antioxidant responsive element*), występujących w regionach promotorowych tych genów. Miejsca wiązania NF- κ B, AP-1 oraz motywy ARE zostały odkryte także w promotorach genów antyoksydacyjnych (np. w genach kodujących katalazy, *Cat*) u roślin wyższych. Działanie tych czynników nie jest ograniczone jedynie do aktywacji genów kodujących białka chroniące przed wybuchem tlenowym. Wiadomo, że szczególnie NF- κ B pełni ważną rolę w modulacji



Ryc. 4. Schemat ilustrujący szlaki sygnalizacyjne prowadzące do oksydo-redukcyjnej aktywacji genów

Źródło: oprac. własne na podst. Scandalios (2005).

komórkowej odpowiedzi na inne stresy oraz w regulacji metabolizmu podstawowego (Skrzycki i Czczot, 2004; Scandalios, 2005).

Innymi enzymami biorącymi udział w redukcji reaktywnych form tlenu w organizmach są peroksydazy i katalazy. Katalaza to białko posiadające w swojej strukturze hem i katalizuje reakcję dysproporcjonowania nadtlenu wodoru. Występuje w organizmach zwierzęcych, roślinnych, jak i bakteryjnych, przy czym w komórkach eukariotycznych zlokalizowana jest głównie w peroksosomach (Ścibor i Czczot, 2006). Aktywność katalityczna tego enzymu zależy od stężenia nadtlenu wodoru w środowisku. W przypadku niskiego stężenia H_2O_2 następuje jego rozkład do wody i tlenu (Bartosz, 2003; Ścibor i Czczot, 2006). Natomiast wśród peroksydaz jedną z najważniejszych grup antyoksydacyjnych enzymów u roślin jest peroksydaza askorbinianowa (APX). Są to białka zawierające grupę hemo-prostetyczną, podobnie jak katalazy, w której żelazo odgrywa ważną rolę w miejscu katalitycznym enzymu i wpływa na jego aktywność (Dąbrowska i wsp., 2007b). Peroksydazy obecne są praktycznie we wszystkich organizmach, u których ze względu na różną lokalizację, właściwości, czy strukturę podjednostek wyróżnia się 4 ich różne formy. Ich główną rolą jest rozkładanie nadtlenu wodoru, a także działanie zapobiegające deformacji lipidów, dzięki czemu enzymy te chronią błonę komórkową przed uszkodzeniem (Łukaszewicz-Hussain, 2003).

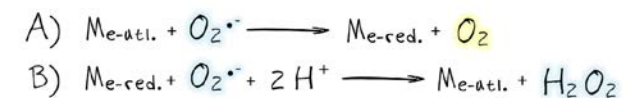
Istnieją dowody potwierdzające indukcję RFT przez różne stresy biotyczne i abiotyczne, w których wolne rodniki tlenowe służą jako wspólny element regulacji różnych szlaków sygnalizacyjnych. Stresy aktywują także kaskadę kinaz białkowych MAPK, dlatego sugeruje się, że MAPK mogłyby być jednym z kilku zbieżnych punktów w obronnej sieci sygnalizacyjnej (Scandalios, 2005; Taj i wsp., 2010; Saucedo-García i wsp., 2015) (Ryc. 4).

Roślinne dysmutazy ponadtlenkowe

Spośród RFT najbardziej toksyczne są rodniki hydroksylowe (OH^\bullet) – niezwykle silne utleniacze, których dyfuzja i reakcje z cząsteczkami organicznymi zachodzą w podobnym tempie, stąd rodniki hydroksylowe nie mogą podlegać bezpośredniej kontroli. Dlatego organizmy tlenowe eliminują mniej reaktywne formy prekursorowe (H_2O_2 i $O_2^{\bullet -}$) najskuteczniej, jak tylko to możliwe (Imlay, 2008; Sharma i wsp., 2012).

W bezpośrednią regulację komórkowego stężenia $O_2^{\bullet -}$ i H_2O_2 zaangażowane są dysmutazy ponadtlenkowe (E.C.1.15.1.1; SOD, ang. *superoxide dismutase*), których funkcja katalityczna została odkryta przez McCorda i Fridovicha (1969). SOD katalizują reakcję dysproporcjonowania (dysmutacji) dwóch anionorodników ponadtlenkowych do nadtlenu wodoru i tlenu cząsteczkowego (Dat i wsp., 2001; Nowak, 2012) (Ryc. 5). Dysmutazy ponadtlenkowe eliminują pierwszy produkt jednoelektronowej redukcji tlenu przekształcając go w nadtlenek wodoru, który usuwany jest następnie przez katalazy lub peroksydazy oraz metalotioneiny (Scandalios, 2005; Koszucka i Dąbrowska, 2006; Lobo i wsp., 2010).

Dysmutazy ponadtlenkowe, wraz z katalazami, uważane są za najskuteczniejsze enzymy antyoksydacyjne



Ryc. 5 Dwuetapowa reakcja dysmutacji anionorodników ponadtlenkowych katalizowana przez SOD

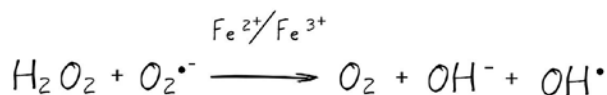
W pierwszym etapie (a) związany z enzymem jon metalu przejściowego ($\text{Me}_{\text{e-utl.}}$ – jon metalu w formie utlenionej) ulega redukcji do jonu metalu zredukowanego ($\text{Me}_{\text{e-red.}}$), a w drugim etapie (b) utlenieniu przez anionorodnik ponadtlenkowy.

Źródło: oprac. własne na podst. Żuchowski (1999).

(Fukai i Ushio-Fukai, 2011). Charakteryzują się bardzo wysoką stałą szybkości katalizowanej reakcji ($K = 2-3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), świadczącą o tym, że jest ona ograniczona praktycznie tylko przez dyfuzję substratu, a stężenie SOD w większości komórek wynosi ok. 10^{-5} M (Fink i Scandalios, 2002; Forman i wsp., 2010). Szybkość reakcji dysmutazy ponadtlenkowej z $\text{O}_2^{\cdot-}$ możliwa jest dzięki mechanizmowi naprowadzania elektrostatycznego (ang. *electostatic guidance*). SOD ma na swojej powierzchni układ naładowanych reszt aminokwasowych, które tworzą gradient pola elektrostatycznego, dzięki czemu anion kierowany jest wprost do centrum aktywnego enzymu (Bartosz, 2003).

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej zabezpiecza przed reakcją nadtlenu wodoru z anionorodnikiem ponadtlenkowym (reakcja Habera-Weissa), która zachodzi w obecności jonów metali przejściowych i prowadzi do powstania, niezwykle toksycznego dla układów biologicznych, rodnika hydroksylowego (Ryc. 6). SOD uważa się za pierwszą linię obrony przed toksycznym działaniem RFT (Alscher i wsp., 2002).

Poszczególne formy izomeryczne enzymu różnią się ponadto wrażliwością na KCN i H_2O_2 . Aktywność Cu/ZnSOD jest hamowana zarówno przez H_2O_2 , jak i KCN. Dysmutazy żelazowe ulegają inhibicji tylko przez cząsteczki H_2O_2 , natomiast MnSOD jest niewrażliwa na oba inhibitory (Bowler i wsp., 1994; Staimer i wsp., 2012).



Ryc. 6. Katalizowana przez jony żelaza reakcja Habera-Weissa (biologiczna reakcja Fentona)

Źródło: oprac. własne na podst.: Bartosz (2003).

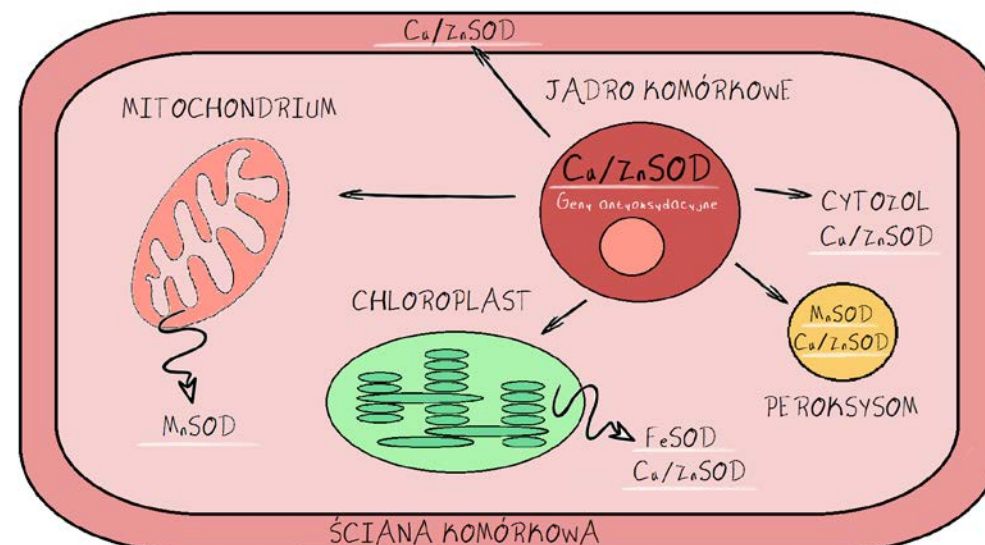
Występowanie i klasyfikacja SOD

Dysmutaza ponadtlenkowa jest bardzo rozpowszechniona w przyrodzie. Jej obecność stwierdzono u większości organizmów tlenowych, anaerobów względnych (beztlenowców fakultatywnych), a nawet u niektórych anaerobów bezwzględnych (beztlenowców obligatoryjnych) (Fink i Scandalios, 2002; Imlay, 2008). Obecność SOD u większości aerobów pełni główną rolę w procesie molekularnej adaptacji do życia w atmosferze tlenowej. Znaczenie SOD dla organizmów tlenowych zostało opisane w licznych badaniach nad pozbawionymi aktywności SOD mutantami, zarówno prokariotycznymi, jak i eukariotycznymi (np. *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*), które są nadwrażliwe na tlen, w konsekwencji czego umierają po ekspozycji na warunki tlenowe (Miller, 2012).

Ze względu na rodzaj, związanego w centrum aktywnym, metalicznego kofaktora wyróżnia się cztery klasy dysmutaz ponadtlenkowych:

- miedziowo - cynkowe dysmutazy ponadtlenkowe [Cu(II), Zn(II); Cu/ZnSOD]
- manganowe dysmutazy ponadtlenkowe [Mn(III); MnSOD]
- żelazowe dysmutazy ponadtlenkowe [Fe(III); FeSOD]
- niklowe dysmutazy ponadtlenkowe [Ni(II/III); Ni-SOD].

Wszystkie wymienione izoformy SOD oprócz ostatniej, którą wykryto tylko u *Streptomyces*, mogą występować u organizmów roślinnych (Fink i Scandalios, 2002). W organizmach roślinnych SOD rozmieszczone są w różnych przedziałach subkomórkowych, tzw. kompartmentach, w których dochodzi do wzmożonego powstawania reaktywnych form tlenu (Ryc. 7).



Ryc. 7. Schemat subkomórkowej lokalizacji SOD u roślin

Źródło: oprac. własne na podst.: Alscher i wsp. (2002).

Cu/ZnSOD zlokalizowana jest zazwyczaj w cytozolu, chloroplastach, głównie na powierzchni błon tylakoidów gran od strony stromy, gdzie zlokalizowany jest fotosystem I (PSI) lub w peroksysomach. Reakcje immunolokalizacji z użyciem przeciwciał skierowanych przeciw cytozolowej Cu/ZnSOD potwierdziły występowanie tego enzymu w jądrze komórkowym i apoplacie. Sądzi się, że apoplastyczna Cu/ZnSOD uczestniczy w procesie lignifikacji, natomiast jądrowa chroni przed skutkami mutacji DNA spowodowanymi przez anionorodnik ponadtlenkowy (Alscher i wsp., 2002; Małecka i Tomaszewska, 2005). Formy cytoplazmatyczne Cu/ZnSOD są homodimerami¹, natomiast enzymy chloroplastowe wykazują budowę homotetrameryczną² (Bordo i wsp., 1994; Sheng i wsp., 2014). Stwierdzono również, że chloroplastowa forma SOD dominuje w elementach zielonych, a enzymy cytozolowe przeważają w kielkach i roślinach etiolowanych (Żuchowski, 1999; Myounga i wsp., 2008). Ponadto ze szpilek *Pinus sylvestris* wyizolowano, niespotykany wcześniej u roślin, rodzaj Cu/ZnSOD określany mianem pozakomórkowej dysmutazy ponadtlenkowej (ECSOD – ang. *extracellular SOD*). Jednakże ECSOD pochodząca z sosny, w przeciwieństwie do swoich zwierzęcych odpowiedników, ma budowę homodimeryczną i nie podlega procesowi glikozylacji (Żuchowski, 1999).

Obecność u roślin homotetramerycznej MnSOD stwierdzono w matriksie mitochondrialnej oraz w peroksysomach. Podobnie jak ogromna większość białek mitochondrialnych, MnSOD kodowane są przez genom jądrowy. Z tego względu syntetyzowane są jako białko prekursorowe, bogate w sekwencję N-końcową kierującą do mitochondriów długości kilkudziesięciu aminokwasów (ok. 30), bogatą w reszty aminokwasów

1 Homodimer – białko, którego struktura IV-rzędowa złożona jest z dwóch identycznych podjednostek.

2 Homotetramer – białko, którego struktura IV-rzędowa składa się z czterech identycznych podjednostek.

zasadowych. Aktywność enzymatyczna proenzymu jest niższa w stosunku do enzymu dojrzałego. Jest on transportowany do mitochondriów, gdzie odcinana jest sekwencja skierowująca (Sheng i wsp., 2014). Peroksysomalna MnSOD została wykryta m.in. u *Pisum sativum*, jednakże u żadnej ze znanych sekwencji MnSOD nie znaleziono charakterystycznego peptydu sygnałowego kierującego białko do peroksysomów (Alscher i wsp., 2002). Masa cząsteczkowa roślinnej MnSOD wynosi około 92 kDa, a każda z czterech podjednostek zawiera dwie domeny: N-końcową, obejmującą pięć odcinków α -helikalnych oraz domenę C-końcową, zawierającą trzy fragmenty o strukturze β i dwie niewielkie α -helisy (Żuchowski, 1999; Pedersen i wsp., 2009).

Roślinne FeSOD zlokalizowane są w stromie chloroplastów i ze względu na różnice w budowie klasyfikuje się je na dwie grupy (Tsang i wsp., 1991; Alscher i wsp., 2002; Sheng i wsp., 2014). Pierwsza grupa obejmuje formy homodimeryczne występujące powszechnie u prokariotów, ale także u kilku gatunków roślin: miłorzębu dwuklapowego (*Ginkgo biloba*), kapusty (*Brassica campestris*) i grążela żółtego (*Nuphar luteum*). Druga grupa FeSOD jest typowa dla większości roślin wyższych i obejmuje enzymy homotetrameryczne (Alscher i wsp., 2002). Występowanie SOD w tak wielu różnych kompartmentach komórkowych jest konsekwencją miejsca wytwarzania oraz właściwości anionorodnika ponadtlenkowego. $O_2^{\cdot -}$ jest cząsteczką hydrofilową, obdarzoną ładunkiem, która z trudnością przechodzi przez błony biologiczne, dlatego musi zostać usunięty przez SOD obecne w tych samych przedziałach komórkowych, w których jest on wytwarzany (Alscher i wsp., 2002; Fink i Scandalios, 2002).

W przeciwieństwie do większości organizmów, które posiadają zazwyczaj tylko jeden enzym z każdej klasy SOD, rośliny mają wiele form każdego rodzaju, kodowanych przez więcej niż jeden gen. Wydaje się, że

występowanie w świecie roślin wielogenowych rodzin SOD jest odzwierciedleniem pełnienia przez nie różnicowanych funkcji oraz konsekwencją większego narażenia roślin na niekorzystne warunki środowiskowe. Rośliny nie mogą bowiem fizycznie unikać czynników stresowych. Ponadto spośród wszystkich organizmów żywych komórkowe stężenie O_2 (źródła RFT) jest u roślin najwyższe, gdyż nie tylko zużywają one tlen jak inne aeroby, ale także wytwarzają go w procesie fotosyntezy (Scandalios, 1993; Fink i Scandalios, 2002).

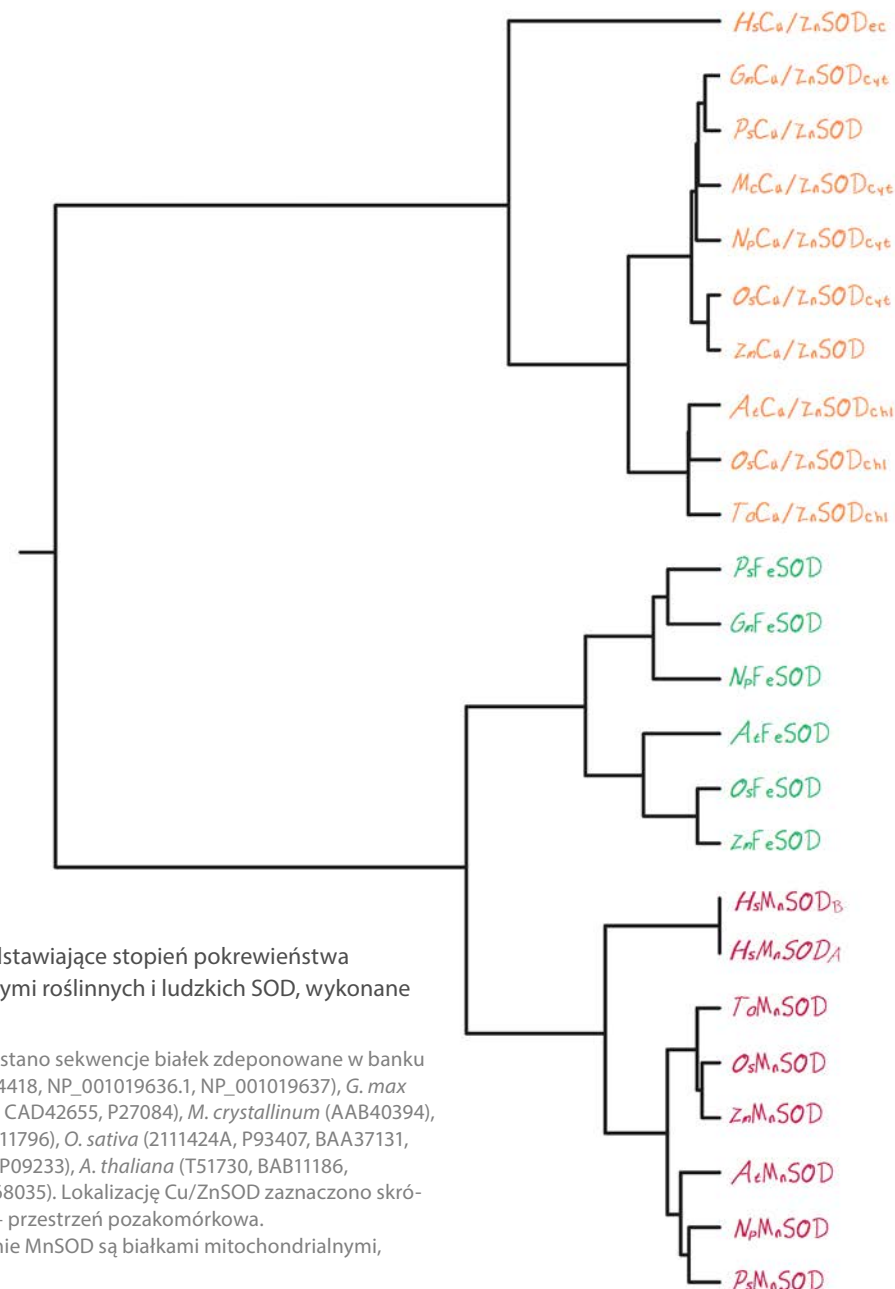
Ewolucja rodziny SOD

Ewolucyjne pochodzenie różnych typów SOD nie zostało jeszcze do końca poznane. Obecny stan wiedzy pozwala przypuszczać, że najstarszą grupą wśród dysmutaz ponadtlenkowych są FeSOD (Pilon i wsp., 2010). Szereg bezwzględnych anaerobów zawiera właśnie ten rodzaj SOD, co sugeruje, że białko to powstało jeszcze przed pojawieniem się znaczących ilości tlenu w atmosferze, co nastąpiło w środku prekambriu, przed 1,5-2 mld lat temu. Z tego względu uważa się, że FeSOD przynajmniej początkowo mogła odgrywać inną niż obecnie rolę fizjologiczną (Bartosz, 2003).

Wiele analiz zarówno samej sekwencji, jak i budowy strukturalnej białek, wskazuje na to, że FeSOD i MnSOD posiadają wspólnego przodka i wyewoluowały najprawdopodobniej z formy FeSOD (Ryc. 8) (Fink i Scandalios, 2002; Perry i wsp., 2010). Zakłada się, że początkowo łatwo dostępne w atmosferze redukującej sole żelazowe (Fe^{2+}), na skutek pojawienia się tlenu w atmosferze, uległy utlenieniu i powstały z nich słabiej rozpuszczalne i trudniej dostępne sole żelazowe (Fe^{3+}). W takich warunkach jony Mn^{2+} mogły stać się bardziej użytecznym zamiennikiem Fe^{2+} . Ponadto za większą użytecznością formy manganowej przemawiał fakt, że w przeciwieństwie do FeSOD, nie jest ona wrażliwa na

działanie H_2O_2 (Bartosz, 2003). Sugeruje się, że druga najprawdopodobniej najstarsza dysmutaza ponadtlenkowa – MnSOD wyewoluowała z przodka FeSOD poprzez Fe/MnSOD. Obecna u archebakterii Fe/MnSOD może wiązać w centrum aktywnym jony żelaza lub manganu, w zależności od tego, który z tych pierwiastków jest bardziej dostępny. Podobne właściwości żelaza i manganu pozwalają funkcjonować Fe/MnSOD z którymkolwiek z tych metali bez istotnych zmian konformacyjnych w strukturze białka (Alscher i wsp., 2002).

Za najmłodszą grupę SOD uważa się Cu/ZnSOD, które pojawiły się prawdopodobnie przed miliardem lat, w późnym prekambrze, kiedy stężenie tlenu w atmosferze osiągnęło około 1% dzisiejszej zawartości. Być może Cu/ZnSOD powstała w wyniku ewolucji białka miedziowego, które nie pełniło żadnej funkcji katalitycznej, a wiązało jedynie miedź. Sugeruję się, że samo wiązanie miedzi mogło mieć istotne funkcje antyoksydacyjne (Bartosz, 2003). Miedziowo-cynkowe SOD przez długi okres uważane były za enzymy wyłącznie eukariotyczne, do czasu wykrycia ich u kilku gatunków bakterii: *Photobacterium leiognathi*, *Caulobacter crescentus* oraz bakterii z rodzaju *Pseudomonas* (Małecka i Tomaszewska, 2005). Wysunięto trzy hipotezy tłumaczące obecność Cu/ZnSOD u *Procaryota*. Pierwsza zakłada niezależną ewolucję tych białek u pro- i eukariotów. Według drugiej, zaproponowanej przez Martina i Fridovicha (1981), geny Cu/ZnSod powstały u *Eucaryota*, po czym zostały przeniesione do *Procaryota*. Taki scenariusz ewolucyjnych zdarzeń znalazł poparcie w badaniach Bannistera i Parkera (1985), wykazujących 30% podobieństwo między sekwencjami aminokwasowymi Cu/ZnSOD ryby kucyka (*Leiognathus splendens*) i jej bakteryjnego symbionta *P. leiognathi*. Jednakże hipoteza ta nie tłumaczy występowania Cu/ZnSOD u prokariotów niebędących symbiontami. Ostatnia



Ryc. 8. Drzewo filogenetyczne przedstawiające stopień pokrewieństwa między sekwencjami aminokwasowymi roślinnych i ludzkich SOD, wykonane w programie proMLK

Do sporządzenia dendrogramu wykorzystano sekwencje białek zdeponowane w banku genów pod numerami: *H. sapiens* (AAH14418, NP_001019636.1, NP_001019637), *G. max* (Q7M1R5, P28759), *P. sativum* (BAD90559, CAD42655, P27084), *M. crystallinum* (AAB40394), *N. plumbaginifolia* (P27082, CAA00826, P11796), *O. sativa* (2111424A, P93407, BAA37131, AAA57130), *Z. mays* (P23345, BAD89495, P09233), *A. thaliana* (T51730, BAB11186, AAC24832), *T. aestivum* (AAB67991, AAB68035). Lokalizację Cu/ZnSOD zaznaczono skrótami: cyt – cytozol, chl – chloroplast, ec – przestrzeń pozakomórkowa. Wszystkie przedstawione w dendrogramie MnSOD są białkami mitochondrialnymi, a FeSOD chloroplastowymi.

z hipotez przyjmuje, że Cu/ZnSOD powstała początkowo u *Prokaryota* i dopiero potem została przeniesiona do *Eucaryota*. Jednakże, powyższe założenie pociąga za sobą nieprawdopodobny wymóg, że wspólny przodek posiadał Cu/ZnSOD jeszcze przed tym jak te dwie grupy organizmów oddzieliły się od siebie i który istniał przed dostępnością jonów Cu^{2+} w atmosferze (Alscher i wsp., 2002).

Enzymy SOD pochodzące z różnych gatunków roślin cechuje wysoki stopień homologii struktury pierwszorzędowej (Żuchowski, 1999). Porównania roślinnych sekwencji aminokwasowych FeSOD i MnSOD wskazują na wyższy stopień homologii w obrębie grupy MnSOD (>70%) aniżeli wśród FeSOD (~60%). Podobieństwo mitochondrialnych MnSOD i chloroplastowych FeSOD u eukariontów do ich odpowiedników u prokariotów stanowi kolejny argument na poparcie teorii o endosymbiotycznym pochodzeniu tych organelli komórkowych. Wysokie podobieństwo MnSOD i FeSOD dotyczy nie tylko struktury pierwszorzędowej (~50% homologii), ale również drugo- i trzeciorzędowej. Znacząca homologia istnieje także między sekwencjami roślinnych Cu/ZnSOD, przy czym wyższy stopień homologii cechuje chloroplastowe (80-90%) niż cytozolowe Cu/ZnSOD (~68%) (Ryc. 8) (Alscher i wsp., 2002; Fink i Scandalios, 2002). Większe różnice obserwuje się porównując dysmutazy roślinne z enzymami pochodzącymi z organizmów zwierzęcych, choć podobieństwo nadal jest znaczne (Ryc. 8) (Żuchowski, 1999).

Wśród roślinnych i zwierzęcych Cu/ZnSOD najwyższa homologia dotyczy C-końca białka, gdzie zlokalizowany jest kanał elektrostatyczny mieszczący się w strukturalnej pętli siódmej tego enzymu. Ponadto wszystkie aminokwasy zaangażowane w koordynację jonów miedzi i cynku są także wysoce konserwowane, podobnie jak aminokwasy biorące udział w tworzeniu mostków dwusiarczkowych. Znaczny stopień homolo-

gii w obrębie MnSOD oraz FeSOD pochodzących z różnych organizmów dotyczy głównie domen odpowiadających pierwszej i drugiej α -helisie oraz aminokwasów zaangażowanych w koordynację jonów metali (Fink i Scandalios, 2002). W przypadku MnSOD, jon manganu, biorący udział w procesie katalitycznym, jest wiązany przez silnie konserwowane – trzy reszty histydyny i resztę kwasu asparaginowego.

Aby lepiej zrozumieć ewolucyjną dywergencję genów *Sod* u roślin wyższych Fink i Scandalios (2002) porównali pozycje i ilość intronów pomiędzy znanymi, genomowymi sekwencjami dysmutaz ponadtlenkowych roślin okrytonasiennych. Uzyskane przez nich wyniki sugerują, że liczba i pozycje intronów są ewolucyjnie konserwowane wśród poszczególnych typów *Sod* u roślin. Geny kodujące cytozolowe Cu/ZnSOD zawierają siedem intronów, podczas gdy geny chloroplastowych form tego enzymu mają ich osiem. Chloroplastowe *Sod* mają dodatkowy intron, który rozdziela sekwencję drugiego eksonu cytozolowych Cu/ZnSod. Wyjątkiem jest gen *Sod1* *Zea mays*, który chociaż koduje chloroplastową Cu/ZnSOD, to nie zawiera dodatkowego intronu, ma więc ich tylko siedem. Sugeruje się, że roślinne Cu/ZnSOD wzięły początek od wspólnego przodka, a później różnicowały się według kompartmentów komórkowych, w których obecnie występują (Ryc. 8). Porównanie liczby i pozycji intronów roślinnych i zwierzęcych Cu/ZnSod wskazuje na znaczne różnice. *Sod* pochodzące np. z *Homo sapiens* i *Rattus norvegicus* mają zaledwie cztery introny we wzajemnie podobnych pozycjach, ale odmiennych niż u roślin. Pozycje i liczba intronów genu *MnSod* są także silnie konserwowane wśród gatunków roślinnych, ale nie między roślinami a zwierzętami. Roślinne *MnSod* zawierają sześć eksonów, podczas gdy zwierzęce geny, np. *Homo sapiens* i *Mus musculus* składają się tylko z pięciu. Sekwencje intronów nie są konserwo-

wane, a ich długości są zmienne (Fink i Scandalios, 2002; Zelko i wsp., 2002). Większość różnic między roślinnymi SOD dotyczy przede wszystkim sekwencji regulatorowych w regionach 5' genów kodujących te białka. Najprawdopodobniej różnice w ekspresji tych genów są spowodowane różnymi warunkami powodującymi stres oksydacyjny (Fink i Scandalios, 2002; Zelko i wsp., 2002).

Regulacja ekspresji genów *Sod*

Zachowanie równowagi antyoksydacyjnej ma podstawowe znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania komórki, dlatego też wszystkie enzymy należące do systemu antyoksydacyjnego muszą podlegać precyzyjnej regulacji na różnych poziomach.

Molekularne mechanizmy prowadzące do ekspresji genów *Sod* są słabo poznane. Wiadomo natomiast, iż wszystkie izoformy SOD są kodowane w genomie jądrowym, a ich ekspresja jest regulowana niezależnie. W warunkach stresu oksydacyjnego indukowane są geny dysmutaz ponadtlenkowych tych przedziałów komórkowych, w których wzrosła zawartość RFT (Żuchowski, 1999; Morano i wsp., 2012). Badania przeprowadzone na różnych gatunkach roślin dowodzą, że do akumulacji mRNA *FeSod* dochodzi, gdy stres generowany jest w chloroplastach, zaś ilość transkryptu *MnSod*, regulowana jest w odpowiedzi na obecność czynników stresowych w mitochondriach (Candas i Li, 2014).

Tsang i wsp. (1991) badali wpływ wysokiej aktywności fotosyntetycznej, fotoinhibicji oraz parakwatu na poziomy mRNA wszystkich typów dysmutazy ponadtlenkowej występujących u *Nicotiana glauca*. Zaobserwowano spadek ilości transkryptów *Sod* w liściach po przeniesieniu roślin do ciemności oraz wzrost (szczególnie mRNA *FeSod*) po ekspozycji roślin na światło. Odmiennie wyniki uzyskano dla etio-

lowanych siewek, w których przeniesienie na światło indukowało jedynie ekspresję genu *FeSod*, natomiast poziomy mRNA mitochondrialnej *MnSod* oraz cytozolowej *Cu/ZnSod* utrzymywane były na stałym, wysokim poziomie. Wysłunięto wniosek, że wysoki poziom transkryptu *MnSod*, który odnotowano po przeniesieniu etiolowanych siewek na światło, jest odzwierciedleniem wzrostu oddychania mitochondrialnego, wynikającego ze zwiększonego rozkładu cukrów na drodze wzmoczonej fotosyntezy (Hartl i Finkemeier, 2012). Rośliny poddane stresowi termicznemu i oświetleniu wędły. Traktowanie zimnem i światłem powodowało jedynie wzrost mRNA *FeSod*, podczas gdy poziomy transkryptów *MnSod* i *Cu/ZnSod* pozostawały niezmienione. Wzrost ilości tych ostatnich obserwowano po przeniesieniu roślin do normalnych warunków wzrostu. Silnie indukowanym przez szok cieplny genem *Sod* u dzikiego tytoniu jest gen kodujący cytozoolową *Cu/ZnSOD* (Tsang i wsp., 1991).

Parakwat (ang. *paraquat/methyl viologen*), bipirydylowy herbicyd, który przechwytuje elektrony, przekazywane zwykle z PSI na NADH^+ i transportuje je na tlen przyczyniając się do powstania w chloroplastach anionorodnika nadtlenkowego. Herbicyd ten wpływa na reakcje transdukcji elektronów w retikulum endoplazmatycznym i mitochondrium (Alscher i wsp., 2002). Badania zmian w poziomach mRNA *Sod* u *N. plumbaginifolia* spowodowane światło- i ciemno-zależną toksycznością parakwatu wskazują na wzrost ilości transkryptów wszystkich typów dysmutazy nadtlenkowej w odpowiedzi na działanie parakwatu w obecności światła. Słabszy wpływ parakwatu zaobserwowano natomiast w ciemności, w której wzrasta tylko poziom transkryptu *Cu/ZnSod* (Tsang i wsp., 1991). Indukcyjne oddziaływanie parakwatu na ekspresję genów *Sod* wykazano także u *Arabidopsis thaliana* (Alscher i wsp., 2002) i *Zea mays* (Bartosz, 1997).

Wzrost transkrypcji *Sod* zaobserwowano ponadto w odpowiedzi na ozon (O_3) i SO_2 . Udowodniono również występowanie pozytywnej regulacji genu *MnSod* przez stres solny, toksyczność manganu (Hossain i Dietz, 2016), stres chłodu (Baek i Skinner, 2003) oraz suszę (Wu i wsp., 1999). W ostatnim z wymienionych przykładów odnotowano różnice w ekspresji genu *MnSod* pomiędzy pszenicą jară i ozimą. Indukcja genu *MnSod* w odpowiedzi na suszę jest bardziej gwałtowna w siewkach pszenicy ozimej w porównaniu do jarej, co może wiązać się z wysoką tolerancją na stres roślin zboża ozimego. Z przeprowadzonych przez Wu i wsp. (1999) badań wynikało, że geny chloroplastowej *Cu/ZnSod* indukowane są przez niską temperaturę zarówno u pszenicy jarej jak i ozimej, natomiast nie ulegają zmianom w warunkach suszy.

Zróżnicowana ekspresja roślinnych genów *Sod* dotyczy nie tylko trzech głównych form dysmutazy nadtlenkowej, ale także członków konkretnej klasy. Zaobserwowano m.in. odmienną ekspresję wśród rodziny *MnSod* w odpowiedzi na kwas abscysynowy i stres osmotyczny u *Zea mays* (Feng i wsp., 2016), niską temperaturę u *Triticum aestivum* (Baek i Skinner, 2005) oraz członków rodziny *FeSod Arabidopsis* w odpowiedzi na światło i rytm okołodobowy (Kliebenstein i wsp., 1998). Istnieją dane świadczące o tkankowo-specyficznej regulacji genów *Sod*. U *N. plumbaginifolia* ekspresja *MnSod* jest bardzo niska w liściach, 2-3 krotnie wyższa w korzeniach i około 50 razy wyższa w hodowanych w ciemności kulturach zawieszinowych komórek. Najprawdopodobniej wysoki poziom ekspresji genu *MnSod* w kulturach zawieszinowych wynika ze zmiany w typie tych komórek lub z odmiennych warunków ich hodowli. Badania wpływu składu pożywki na ekspresję *MnSod* doprowadziły do stwierdzenia, że za wysoki poziom transkryptu obserwowany w kulturze zawieszinowej odpowiedzialne były cukry: sacharoza i glukoza,

ale nie mannitol. Była to zatem obserwacja efektu raczej troficznego niż osmotycznego (Bowler i wsp., 1989). Zróżnicowaną regulację *Sod* zaobserwowano także w organach *Raphanus sativus*. Stwierdzono, że spośród wszystkich typów *Sod* występujących u tego gatunku jedynie *MnSod* ulega wysokiej ekspresji w korzeniach (Kwon i An, 2003). Podobny wynik uzyskano również dla *MnSod Hevea brasiliensis* (Miao i Gaynor, 1993). Występowanie tkankowo-specyficznej oraz rozwojowo-zróżnicowanej ekspresji genów *Sod* wykazano także w badaniach przeprowadzonych na *Prunus persica* (Bagnoli i wsp., 2002).

Niezwykle wysoki poziom transkryptu *MnSod* uzyskano ponadto w kalusie embriogenicznym *Hevea brasiliensis* (Miao i Gaynor, 1993) oraz w somatycznych zarodkach *Aesculus hippocastanum*. W tych ostatnich izozym³ *MnSOD* pojawił się jako jedyny w odpowiedzi na traktowanie kultur tkankowych czynnikami środowiskowymi indukującymi stres oksydacyjny w mitochondriach (Bagnoli i wsp., 1998). Ponadto sprawdzono poziom ekspresji *MnSOD* kalusa *Vicia faba ssp. minor* w trakcie regeneracji w kulturze *in vitro* i stwierdzono, że może być to jeden z markerów różnicowania tkanek w warunkach *in vitro* (Dąbrowska i wsp., 2007a).

Stres oksydacyjny w kulturach tkankowych

Kultury tkankowe są szczególnie narażone na wpływ czynników powodujących stres. W warunkach *in vitro* dochodzi do zmiany charakteru, stężenia i kierunku transportu substancji troficznych obecnych w podłożu. Labilne są także stężenia regulatorów wzrostu, warunki tlenowe i stężenie etylenu. Manipulacja, podczas izolacji eksplantatów, może generować stres oksydacyjny na skutek ekspozycji tkanek, leżących *in vivo* w głębi, na bezpośrednie działanie tlenu atmosferycznego. Pomimo

3 Izozym – jeden z wariantów występowania danego enzymu.

negatywnych skutków, stres może mieć również charakter pozytywny. Boddźce stresowe mogą przyczynić się do przywrócenia komórkom zdolności mitotycznej, a następnie do ponownego różnicowania, kończącego się często regeneracją nowej, kompletnej rośliny (Dubert, 2003). Dodatkowo udowodniono, że manipulacje mechaniczne są bezpośrednią przyczyną powstawania stresu oksydacyjnego w hodowlach komórkowych (Cassells i wsp., 2006).

Akumulację mRNA *MnSod* zaobserwowano dla *H. brasiliensis*. W kalusie embriogenicznym tego gatunku stwierdzono około 50 razy wyższy poziom transkrypty *MnSod* niż w dojrzałych liściach (Miao i Gaynor, 1993).

Wyniki wielu badań dowodzą, że aktywność mitochondrialnej MnSOD odpowiada aktywności oddechowego łańcucha transportu elektronów, co wydaje się być związane z radykalnym wzrostem tempa oddychania oraz ze wzmożoną produkcją anionorodników nadadtlenkowych w odpowiedzi na działanie stresora (Bowler i wsp., 1989). Bowler i wsp. (1989) wykazali również istnienie pozytywnej korelacji między aktywnością oksydazy cytochromowej i ekspresją *MnSod* u *N. plumbaginifolia*.

Stres osmotyczny wydaje się być czynnikiem indukującym ekspresję *MnSod* u wielu gatunków roślin. Wzrost ekspresji genu *MnSod* w odpowiedzi na 10% mannitol lub 10% sacharozę odnotowano w siewkach *Raphanus sativa* (Kwon i An, 2003). Z badań Skrzypek i Szechyńskiej-Hebdy (2005) wynika, że mogą to być również substancje pozwalające określić potencjał morfogenetyczny tkanek. Sacharoza oraz mannitol są to substancje regulujące ciśnienie osmotyczne, wpływające na turgor komórek oraz procesy wymiany substancji między komórką a środowiskiem zewnętrznym. Poziom mRNA *MnSod* zwiększa się pod wpływem sacharozы także u *H. brasiliensis* (Miao i Gaynor, 1993) i *Nicotiana glauca* (Bowler i wsp., 1989). U tytoniu

dzikiego stwierdzono, że reakcja ta jest liniowo skorelowana ze stężeniem sacharozы oraz że mannitol nie stymuluje ekspresji *MnSod*, co wydaje się świadczyć o podłożu troficznym obserwowanej aktywacji transkrypcji. Scandalios i Zhu (1994) odnotowali zróżnicowaną odpowiedź izoform *MnSod* na stres osmotyczny (20% sacharozę) w tarczkach zarodkowych *Zea mays*.

W wielu badaniach wykazano stymulujący wpływ niskiej temperatury na ekspresję genów *Sod*. Baek i Skinner (2003) zasugerowali, że pozytywna regulacja transkrypcji *MnSod* przez zimno może mieć związek z funkcjonowaniem mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów, który wykazuje labilność w obniżonej temperaturze. W warunkach stresu termicznego, elektrony mogą bowiem „wyciekać” z łańcucha oddechowego, przyczyniając się do zwiększonej produkcji anionorodnika nadadtlenkowego – substratu dla SOD. Istotną rolę *MnSod* w tolerancji roślin na chłód wydają się także potwierdzać badania nad roślinami transgenicznymi. Podwyższoną odporność na niską temperaturę stwierdzono m.in. u transgenicznej lucerny z nadekspresją genu *MnSod* tytoniu w chloroplastach lub mitochondriach (McKersie i wsp., 1993).

Uważa się, że aklimatyzacja roślin do warunków chłodu przebiega pod kontrolą hormonów – przede wszystkim kwasu abscysynowego (ABA – ang. *abscisic acid*) oraz etylenu. Dlatego też, przedmiotem intensywnych badań stał się ostatnio udział ABA w selektywnej regulacji ekspresji genów u roślin reagujących na czynniki stresowe. Uważa się, że elementy warunkujące odpowiedź na ABA (ABRE – ang. *ABA-responsive element*), związane są z genami reagującymi na niską temperaturę, suszę i zasolenie (Alscher i wsp., 2002; Osakabe i wsp., 2014). Elementy te znaleziono m.in. w genach *Cu/ZnSod1* i *FeSod3* *A. thaliana* (Alscher i wsp., 2002). Baek i wsp. (2006) badając strukturę i organizację *MnSod* pszenicy wykazali obecność w promotorze tego

genu elementu CE1, działającego w pozycji *cis*, który najprawdopodobniej odpowiada za wywołaną przez obniżoną temperaturę akumulację ABA. O występowaniu w genie *MnSod* *Raphanus sativus* dwóch elementów zaangażowanych w odpowiedź na temperaturę donoszą też Kwon i An (2003). W promotorze genu *MnSod1* *A. thaliana* nie stwierdzono obecności ABRE, wykryto natomiast sekwencję regulatorową HSE (ang. *heat shock element*), charakterystyczną dla promotorów białek szoku cieplnego, miejsca wiązania NF- κ B oraz kasetę Y (ang. *Y-box*), która pośredniczy w redoks-zależnej aktywacji transkrypcji (Alscher i wsp., 2002). Z danych literaturowych wynika, że zróżnicowana regulacja genów antyoksydacyjnych u roślin zachodzi przez interakcje białko-DNA w regionie ARE, NF- κ B i ABRE oraz że bezpośrednią rolę sygnalizacyjną spełnia tu H₂O₂ (Scandalios, 2005). Baek i wsp. (2006) stwierdzili, że miejsce inicjacji transkrypcji genu *MnSod* *T. aestivum* poprzedza promotor bogaty w pary G+C (wyspa CpG), nie zawierający ani kasety TATA ani kasety CAAT, w przeciwieństwie do genów dysmutaz manganowych *A. thaliana*, *H. brasiliensis*, *P. sativum* oraz *O. sativa*, które posiadają kasetę TATA.

Podsumowanie

Stres jest powszechnie postrzegany jako niekorzystny czynnik środowiskowy, prowadzący do miejscowego uszkodzenia lub nawet zamierania tkanek oraz efektów metabolicznych, głównie podwyższonego poziomu oddychania i nagromadzenia się substancji szkodliwych, takich jak RFT i fenole. Roślinne dysmutazy nadadtlenkowe tworzą złożony i bardzo skuteczny system pierwszej linii obrony przed stresem oksydacyjnym. Chociaż rodzina SOD obejmuje kilka izozymów, to udowodniono, że jedynie MnSOD jest niezbędna do przetrwania organizmów w środowisku tlenowym. Regulacja

ekspresji genu *MnSod* w stanie stresu oksydacyjnego pozwala komórce na precyzyjną, zróżnicowaną w sile i czasie trwania odpowiedź na czynniki wywołujące stres. MnSOD, ze względu na lokalizację subkomórową, uważana jest za główny enzym chroniący przed wybuchem ROS w mitochondriach. Sugeruje się, że różne izoformy MnSOD występują w odmiennych subkompartymenciech matryks mitochondrialnej, wydzielonych przez wewnętrzną błonę tych najbardziej narażonych na oksydacyjny atak wolnych rodników.

Szerokie zastosowanie w badaniach procesów różnicowania oraz zmian genetycznych zachodzących w kulturach *in vitro* znalazły markery biochemiczne i molekularne. Wielu naukowców, w wyniku analizy tkanki uzyskanej w kulturze, stwierdziło zróżnicowane wzory izoenzymatyczne dla hodowli embriogenicnej i nieembriogenicnej. Od kilkunastu lat podejmowane są próby identyfikacji markerów różnicowania się tkanki wśród enzymów antyoksydacyjnych. Wydaje się, że oprócz peroksydaz i katalaz to właśnie dysmutazy stanowią ważne źródło oceny kompetencji kultur tkankowych do regeneracji.

Praca częściowo finansowana z funduszy na działalność statutową UMK.

Literatura

- Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot.* 53: 1331-1341.
- Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* 55: 373-399.
- Baek K-H, Skinner DZ (2003). Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. *Plant Sci.* 165: 1221-1227.
- Baek K-H, Skinner DZ (2005). Differential expression of manganese superoxide dismutase sequence variants in near isogenic lines of wheat during cold acclimation. *Plant Cell Rep.* 25: 223-230.
- Baek K-H, Skinner DZ (2006). Differential mRNA stability to endogenous ribonucleases of the coding region and 3' untranslated regions of wheat (*Triticum aestivum* L.) manganese superoxide dismutase genes. *Plant Cell Rep.* 25: 133-139.
- Baek K-H, Skinner DZ, Ling P, Chen X (2006). Molecular structure and organization of the wheat genomic manganese superoxide dismutase gene. *Genome.* 49: 209-218.
- Bagnoli F, Capuana M, Racchi ML (1998). Developmental changes of catalase and superoxide dismutase isoenzymes in zygotic and somatic embryos of horse chestnut. *J Plant Physiol.* 25: 909-913.
- Bagnoli F, Giannino D, Caparrini S, Camussi A, Mariotti D, Racchi ML (2002). Molecular cloning, characterization and expression of manganese superoxide dismutase gene from peach (*Prunus persica* [L.] Batsch). *Mol Genet Genom.* 267: 321-328.
- Balabusta M, Szafrńska K, Posmyk MM (2016). Exogenous Melatonin Improves Antioxidant defense in cucumber seeds (*Cucumis sativus* L.) germinated under chilling stress. *Front Plant Sci.* 7(575):1-12.
- Bannister JV, Parker MW (1985). The presence of a copper/zinc superoxide dismutase in the bacterium *Photobacterium leiognathi*: a likely case of gene transfer from eukaryotes to prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82: 149-152.
- Bartosz G (1997). Oxidative stress in plants. *Acta Physiol Plant.* 19: 47-64.
- Bartosz G (2003). Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. *Wydawnictwo Naukowe PWN*, Warszawa.
- Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE (2014). Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev.* 94: 329-354.
- Bordo D, Djinovic K, Bolognesi M (1994). Conserved patterns in the Cu, Zn superoxide dismutase family. *J Mol Biol.* 238: 366-386.
- Bowler C, Alliotte T, De Loose M, Van Montagu M, Inzé D (1989). The induction of manganese superoxide dismutase in response to stress in *Nicotiana glauca*. *EMBO J.* 8: 31-38.
- Bowler C, Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D (1994). Superoxide dismutase in plants. *Crit Rev Plant Sci.* 13: 199-218.
- Candas D, Li JJ (2014). MnSOD in oxidative stress response-potential regulation via mitochondrial protein influx. *Antioxid Redox Sign.* 20(10): 1599-1617.
- Cassels AC, Jouce SM, O'Herlihy EA, Perez-Sanz MJ, Walsh C (2006). Stress and quality in *in vitro* culture. XXVI International Congress: Biotechnology in Horticultural Crop Improvement: Achievements, Opportunities and Limitation.
- Das K, Roychoudhury A (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front Environ Sci.* 2, 53: 1-13.
- Dat JF, Inzé D, Van Breusegem F (2001). Catalase-deficient tobacco plants: tools for *in planta* studies on the role of hydrogen peroxide. *Redox Rep.* 6: 37-42.
- Dąbrowska G, Kaczmarek K, Skrzypek E, Szechyńska-Hebda M (2007a). Klonowanie cDNA i ekspresja genu kodującego manganową dysmutazę ponadtlenkową *Vicia faba* ssp. *minor* w kalusie regenerującym i nieregenerującym. *Zesz Probl Post Nauk Rol.* 523: 83-92.
- Dąbrowska G, Aleksandra K, Goc A, Szechyńska-Hebda M, Skrzypek E (2007b). Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. *Acta Biol Cracov Bot ser Bot.* 49(1): 7-17.
- Dąbrowska G, Mierek-Adamska A, Goc A (2012). Plant metallothioneins: Putative functions identified by promoter analysis *in silico*. *Acta Biol Cracov Bot ser Bot.* 54(2): 109-120.
- Dubert F (2003). Reakcje tkanek roślinnych *in vitro* na stres temperatury. X Ogólnopolska konferencja kultur *in vitro* i biotechnologii roślin. Biotechnologia roślinna w biologii, farmacji i rolnictwie. *Wydawnictwa Uczelniane Akademii Techniczno-Rolniczej*, Bydgoszcz, 18.
- Feng K, Yu J, Cheng Y, Ruan M, Wang R, Ye Q, Zhou G, Li Z, Yao Z, Yang Y, Zheng Q, Wan H (2016). The SOD Gene Family in Tomato: Identification, Phylogenetic Relationships, and Expression Patterns. *Front Plant Sci.* 7, 1279: 1-12.
- Fink RC, Scandalios JG (2002). Molecular evolution and structure - function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. *Arch Biochem Biophys.* 399:19-36.
- Forman HJ, Maorino M, Ursini F (2010). Signaling Functions of Reactive Oxygen Species. *Biochemistry.* 49(5): 835-842.
- Fukai T, Ushio-Fukai M (2011). Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxid Redox Sign.* 15(6): 1583-1606.
- Hartl M, Finkemeier I (2012). Plant mitochondrial retrograde signaling: post-translational modifications enter the stage. *Front Plant Sci.* 3, 253: 1-7.
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Hossain MS, Al Mahmud J, Rahman A, Inafuku M, Oku H, Fujita M (2017). Coordinated Actions of Glyoxalase and Antioxidant defense systems in conferring abiotic stress tolerance in plants. *Int J Mol Sci.* 18(1): 200-228.
- Hatfield JL, Boote KJ, Kimball BA, Ziska LH, Izaurralde RC, Ort D, Thomson AM, Wolfe D (2011). Climate impacts on agriculture: implications for crop production. *Agron J.* 103(2): 351-370.
- Hossain MS, Dietz KJ (2016). Tuning of Redox Regulatory Mechanisms, Reactive Oxygen Species and Redox Homeostasis under Salinity Stress. *Front Plant Sci.* 7, 548: 1-15.
- Imlay JA (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem.* 77: 755-776.
- Kliebenstein DJ, Monde R, Last RL (1998). Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation

- and protein localization. *Plant Physiol.* 118: 637-650.
- Koszucka B, Dąbrowska G (2006). Roślinne metalotioneiny. *Post Biol Kom.* 33(2): 285-302.
- Kotchioni SO, Gachmo EW (2006). The reactive oxygen species network pathways: an essential pre-requisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. *J Biosci.* 31(3): 389-404.
- Krueger T, Fisher PL, Becker S, Pontasch S, Dove S, Hoegh-Guldberg O, Leggat W, Davy SK (2015). Transcriptomic characterization of the enzymatic antioxidants FeSOD, MnSOD, APX and KatG in the dinoflagellate genus *Symbiodinium*. *BMC Evol Biol.* 15(48): 1-20.
- Kwon SI, An CS (2003). Cloning and expression of mitochondrial MnSOD from the small radish (*Raphanus sativus* L.). *Mol Cell.* 16: 194-200.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Phcog Rev.* 4(8): 118-126.
- Luscombe NM, Babu MM, Yu H, Snyder M, Teichmann SA, Gerstein M (2004). Genomic analysis of regulatory network dynamics reveals large topological changes. *Nature.* 431: 308-312.
- Łukaszewicz-Hussain A (2003). Rola glutationu i enzymów z nim związanych w procesach antyoksydacyjnych organizmu. *Med Pr.* 54 (5): 473-479.
- Małecka A, Tomaszewska B (2005). Reaktywne formy tlenu w komórkach roślinnych i enzymatyczne systemy obronne. *Post Biol Komórki.* 32: 311-325.
- Martin JrJP, Fridovich I (1981). Evidence for a natural gene transfer from the ponyfish to its bioluminescent bacterial symbiont *Photobacter leiognathi*. The close relationship between bacteriocuprein and the copper-zinc superoxide dismutase of teleost fishes. *J Biol Chem.* 256: 6080-6089.
- McCord JM, Fridovich I (1969). Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte. *J Biol Chem.* 244: 6049-6055.
- McKersie BD, Chen Y, de Beus M, Bowley SR, Bowler C, Inzé D, D'Halluin K, Botterman J (1993). Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 103: 1155-1163.
- Miao Z, Gaynor J (1993). Molecular cloning, characterization and expression of Mn-superoxide dismutase from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Mol Biol.* 23: 267-277.
- Mierek-Adamska A, Dąbrowska G, Kotowicz K, Goc A (2014). Analiza funkcjonalna metalotionein rzepaku w komórkach bakteryjnych w warunkach stresu oksydacyjnego. *XLVIII Międzynarodowe Sympozjum Mikrobiologia a Ochrona Środowiska.* 78-79.
- Miller AF (2012). Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett.* 586: 585-595.
- Morano KA, Grant ChM, Moye-Rowley WS (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 190(4): 1157-1195.
- Müller M, Mentel M, van Hellemond JJ, Henze K, Woehle Ch, Gould SB, Yu RY, van der Giezen M, Tielens AGM, Martin WF (2012). Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 76(2): 444-495.
- Myounga F, Hosoda Ch, Umezawa T, Lizumi H, Kuromori T, Motohashi R, Shono Y, Nagata N, Ikeuchi M, Shinozaki K (2008). A heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 20: 3148-3162.
- Nowak M (2012). Wpływ toksycznego stężenia jonów Cu^{2+} na ekspresję genu MnSOD w roślinach pszenicy zwyczajnej, pszenżyta i żyta. *Ann UMCS.* 67(3): 31-38.
- Osakabe Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LS (2014). ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity. *New Phytol.* 202: 35-49.
- Pedersen HL, Willassen NP, Leiros I (2009). The first structure of a cold-adapted superoxide dismutase (SOD): biochemical and structural characterization of iron SOD from *Aliivibrio salmonicida*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Cryst Commun.* 65: 84-92.
- Perry JJP, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA (2010). The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta.* 1804(2): 245-262.
- Pilon M, Ravet K, Tapken W (2011). The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta.* 1807: 989-998.
- Raniga PV, Di Trapani G, Tonissen KF (2014). Cross talk between two antioxidant system, Thioredoxin and DJ-1: consequences for cancer. *Oncosci.* 1(1): 95-110.
- Saucedo-García M, Gavilanes-Ruíz M, Arce-Cervantes O (2015). Long-chain bases, phosphatidic acid, MAPKs, and reactive oxygen species as nodal signal transducers in stress responses in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci.* 6, Article 55: 1-14.
- Scandalios JG (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.* 101: 7-12.
- Scandalios JG (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res.* 38: 995-1014.
- Scandalios JG, Zhu D (1994). Differential accumulation of manganese-superoxide dismutase transcripts in maize in response to abscisic acid and high osmoticum. *Plant Physiol.* 106:173-178.
- Schwarzländer M, Finkemeier I (2013). Mitochondrial Energy and Redox Signaling in Plants. *Antioxid Redox Signal.* 18(16): 2122-2144.
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plant under stressful conditions. *J Bot.* Article ID 217037.
- Sheng Y, Abreu IA, Cabelli DE, Maroney MJ, Miller AF, Teixeira M, Valentine JS (2014). Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chem Rev.* 114: 3854-3918.
- Skrzycki M, Czczot H (2004). Ekspresja genów dysmutazy ponadtlenkowej w stanie stresu oksydacyjnego. *Post Biol Kom.* 31: 81-92.
- Staimer N, Nguyen TB, Nizkorodov SA, Delfino RJ (2012). Glutathione peroxidase inhibitory assay for electrophilic pollutants in diesel exhaust and tobacco smoke. *Anal Bioanal Chem.* 403(2): 431-441.
- Szechyńska-Hebda M, Skrzypek E, Dąbrowska G, Wędzony M (2012). The effect of endogenous hydrogen peroxide induced by cold treatment in the improvement of tissue regeneration efficiency. *Acta Physiol Plant.* 34: 547-560.
- Ścibor D, Czczot H (2006). Katalaza – budowa, właściwości, funkcje. *Post Hig Med Dośw.* 60: 170-180.
- Ślesak I, Libik M, Karpinska B, Karpinski S, Miszański Z (2007). The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochim Pol.* 54(1): 39-50.
- Taj G, Agarwal P, Grant M, Kumar A (2010). Recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. *Plant Signal Behav.* 5(11): 1370-1378.
- Tretny A (2002). Regulacja procesów wzrostu i rozwoju przez czynniki środowiskowe. W: Fizjologia roślin, red. Kopcewicz J, Lewak S. *Wydawnictwo Naukowe PWN*, Warszawa. 167-191.
- Tsang EWT, Bowler C, Hérouart D, Van Camp W, Villarreal R, Genetello C, Van Montagu M, Inzé D (1991). Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *Plant Cell.* 3: 783-792.
- Wu G, Wilen RW, Robertson AJ, Gusta LV (1999). Isolation, chromosomal localization, and differential expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase and chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase genes in wheat. *Plant Physiol.* 120: 513-520.
- Zahnle K, Schaefer L, Fegley B (2010). Earth's Earliest Atmospheres. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2: a004895, 1-17.
- Zelko IN, Mariani TJ, Foltz RJ (2002). Superoxide dismutase multi-gene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* 33: 337-349.
- Żuchowski J (1999). Roślinne dysmutazy ponadtlenkowe. *Kosmos.* 48: 87-93.

Defence mechanisms of organisms against oxidative stress with particular focus on superoxide dismutases

Nikola Sikora, Zuzanna Znajewska, Grażyna Dąbrowska

Oxidative stress may be defined an imbalance between reactive oxygen species, ROS (i.a. singlet oxygen, superoxide anion, hydroxyl radical and hydrogen peroxide and the antioxidant defense system. Reactive oxygen species easily react with organic compounds and disturb homeostasis of the whole organism. In the organism they are eliminated by non-enzymatic antioxidants and by enzymes which remove or inactivate ROS. Among them, superoxide dismutase (SOD) plays a main role, which in the plant cells is regulated by many stress factors. Superoxide dismutases are present in both aerobic and anaerobic organisms, and their classification includes copper-zinc, manganese, iron and nickel isoforms. The family of plant superoxide dismutases, their role in oxidative stress and the relationship between amino acid sequences of plant and human SOD, as well as tissue-specific and developmental-differentiated expression of SOD genes were characterized in this paper.

key words: growth and development of plants, oxidative stress, SOD, reactive oxygen species

Wpływ chitosanu na gojenie ran u chorych z cukrzycą

Magdalena Potempa, Paweł Jonczyk, Beata Kandefer, Kinga Szczurba, Michał Janerka, Marek Kucharzewski

DOI: 10.24131/3247.170404

Streszczenie:

Stale rosnąca w społeczeństwie częstość występowania cukrzycy powoduje, że lekarze praktycy mają do czynienia z coraz większą liczbą powikłań wynikających z zaburzonego poziomu glikemii. Jednym z najpoważniejszych z nich jest upośledzenie gojenia się ran i powstanie tzw. „stopy cukrzycowej”. Leczenie ran u osób z cukrzycą jest procesem długotrwałym i niejednokrotnie nie do końca w pełni skutecznym. W związku z tym poszukiwane są nowe rozwiązania, które mogłyby przyspieszyć proces gojenia tego typu zmian. W tym celu proponuje się wykorzystanie chitosanu, który jest produktem deacetylacji chityny. Jego działanie w leczeniu ran u chorych z cukrzycą okazało się być wyjątkowo skuteczne. W pracy autorzy przedstawiają przegląd piśmiennictwa na ten temat, udowadniając korzyści terapeutyczne płynące z jego zastosowania w terapii chorych ze stopą cukrzycową.

Słowa kluczowe: badanie naukowe, chitosan, cukrzyca, rany przewlekłe

otrzymano: 29.08.2017; przyjęto: 20.06.2018; opublikowano: 30.06.2018



mgr Magdalena Potempa-Jeziorowska: Studium Doktoranckie Wydziału Lekarskiego z oddziałem Lekarsko-dentystycznym w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach



mgr Paweł Jonczyk: Studium Doktoranckie Wydziału Lekarskiego z oddziałem Lekarsko-dentystycznym w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Wstęp

Cukrzyca, ze względu na swoją stale rosnącą częstość występowania w społeczeństwie, nieprzypadkowo została nazwana „globalną epidemią XXI wieku”. Międzynarodowa Federacja Cukrzycy (ang. *International Diabetes Federation* – IDF) szacuje, iż w 2040 r. liczba chorych z tą jednostką chorobową w skali światowej wzrośnie do niemal 642 mln, gdzie dla porównania, w roku 2015 liczba ta wynosiła 415 mln. Zgodnie z tą prognozą, 1 osoba na 10 będzie chorowała na cukrzycę [1]. Potwierdzeniem tego faktu jest ustanowienie Światowego Dnia Cukrzycy obchodzonego w dniu 14 listopada – dniu urodzin odkrywcy insuliny, Fredericka Bantinga [2]. Powikłania cukrzycy stanowią poważne zagrożenie dla życia i zdrowia chorego oraz są przedmiotem coraz szerszych interwencji lekarskich w zakresie ich profilaktyki oraz nierzadko także leczenia. Do jednych z najpoważniejszych konsekwencji cukrzycy, powstających wskutek mikroangiopatii i/lub neuropatii, należy upośledzenie procesu gojenia się ran.



mgr Beata Kandefer: Samodzielny Publiczny Zakład Opieki Zdrowotnej Wojewódzki Szpital Specjalistyczny nr 4 w Bytomiu



mgr Kinga Szczurba: Szpital Specjalistyczny im. H. Klimontowicza w Gorlicach



mgr Michał Janerka: Szpital miejski nr 4 w Gliwicach



prof. Marek Kucharzewski: kierownik Zakładu i katedry Anatomii Opisowej i Topograficznej, Wydział Lekarski z oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

U chorych na cukrzycę rany pod postacią owrzodzeń stanowią trzecie miejsce pod względem częstości występowania ran przewlekłych [3, 4]. Patrząc na ten problem z innej strony, u 15% wszystkich chorych cierpiących na cukrzycę pojawiają się rany niegojące się i trudno poddające leczeniu [5, 6]. Do mikroangiopatii w cukrzycy dochodzi w wyniku toksycznego działania wielu związków powstających na drodze alternatywnych przemian glukozy. Mało aktywne w normoglikemii szlaki metaboliczne takie jak poliolowy, heksozaminy, diacylglicerolu czy glikacji białek, ulegają w cukrzycy intensyfikacji [7]. Tym samym, czynność wielu ważnych białek takich jak kolagen, fibryna czy antytrombina III ulega upośledzeniu. Nasilony stres oksydacyjny towarzyszący tym procesom potęguje zmiany strukturalne m.in. wyżej wymienionych protein oraz powoduje również zaburzenie funkcji śródbłonna – jakże ważnych komórek regulujących funkcjonowanie naczynia krwionośnego. W komórkach endothelium dochodzi do zmniejszonej produkcji i tym samym sekrecji substancji naczyniorozszerzających i przeciwzakrzepowych, głównie tlenku azotu (NO) wskutek jego zmniejszonej syntezy i inaktywacji przez wolne rodniki tlenowe. Przeciwnie do powyższego, zwiększa się ilość wydzielanego przez endothelium czynnika von Willebranda, tkankowego aktywatora plazminogenu i jego inhibitora wraz ze wzrostem wydzielania cząstek adhezyjnych i cytokin prozapalnych (interleukina IL-1, interleukina IL-6, TNF- α). Te procesy nasilają tworzenie się procesu zapalnego, który trwając długotrwale sprzyja powstawaniu procesów angiopatycznych i neuropatycznych. Zahamowanie tym samym tempa gojenia się rany zwiększa skłonność do jej nawrotowych zakażeń [8-10]. Ze względu na wieloczynnikowość w patogenezie ran powstałych na podłożu cukrzycowym leczenie jest trudne, uciążliwe i nierzadko długotrwałe. Co więcej, dość często zdarza się, iż dotychczasowe metody lecze-

nia nie są wystarczająco skuteczne i chory może tylko częściowo doprowadzić do ich „zaleczenia”. Z tej racji są poszukiwane wciąż nowe, lepsze rozwiązania, by jak najlepiej radzić sobie z terapią chorych cierpiących z powodu tego typu ran przewlekłych.

Chitosan – budowa, otrzymywanie, właściwości fizyczne i biologiczne

W ostatnich latach uwaga naukowców skupiona jest na zastosowaniu chitosanu oraz jego pochodnych w leczeniu ran. Ten organiczny związek chemiczny jest pochodną chityny – głównego składnika budulcowego szkieletu zewnętrznego stawonogów, głównie krabów i krewetek (ryc. 1). W przeciwieństwie do chityny, czysty chitosan jest rzadko rozpowszechniony w przyrodzie i na skalę przemysłową uzyskuje się go wskutek chemicznej deacetylacji chityny (przy użyciu wodorotlenku sodu). Pod względem chemicznym chitosan należy do polisacharydów zbudowanych z na przemian ułożonych cząsteczek N-acetyloglukozaminy i glukozaminy, formujących się w strukturę liniową [11–14] (ryc. 2.). Średnia masa cząsteczkowa chitosanu mieści się w granicach 3800 – 500000 g/mol [15]. Obecność grup aminowych w monomerach chitosanu sprawia, iż ze względu na swój odczyn zasadowy jest on łatwo rozpuszczalny w słabych kwasach. Natomiast silnie dodatnio naładowanie grup aminowych ($-NH_3^+$) powoduje wysoką zdolność przylegania do ujemnie naładowanych innych cząsteczek [16]. Dzięki tym właściwościom substancja ta jest najbardziej znana jako odchudzający i hipolipemizujący suplement diety. W obrębie żołądka chitosan pęcznieje i wytwarza dodatnio naładowaną strukturę żelową, która w połączeniu z ujemnie naładowanymi kwasami tłuszczowymi czy żółciowymi powoduje zahamowanie ich wchłaniania z przewodu pokarmowego. W efekcie agregaty chitosanu z tłuszczem zostają wydalone wraz z kałem [17, 18].

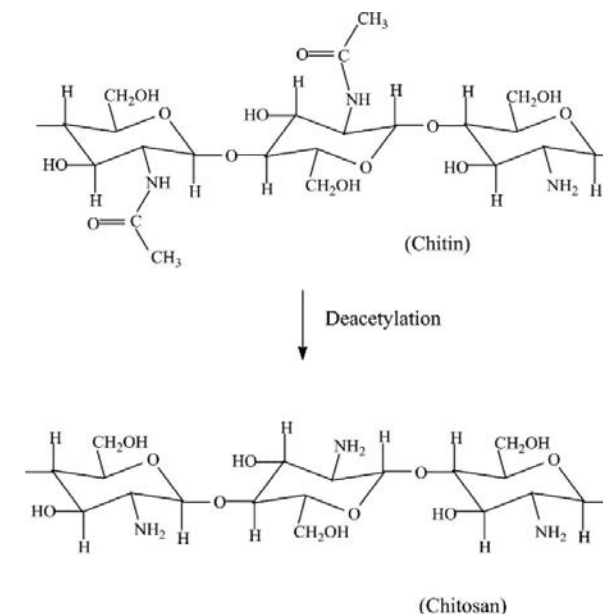


Ryc. 1. Chitynowy pancerz stawonogów (na podstawie [56])

Niedawno pojawiły się również doniesienia o korzystnym wpływie chitosanu na gospodarkę węglowodanową [19]. W leczeniu ran chitosan wykorzystywany jest przede wszystkim w inżynierii biomedycznej jako materiał oraz biomateriał opatrunkowy. Biomateriały powinny posiadać optymalną porowatość, moduł sprężystości oraz mikrostrukturę w celu zapewnienia odpowiedniego połączenia z otaczającym środowiskiem [20–22]. Chitosan powoduje przyspieszenie gojenia się ran dzięki zwiększeniu adhezji i napływu komórek fagocytujących do środowiska rany. Komórki te, wytwarzając niektóre cytokiny (TGF- β 1, IL-1), przyczyniają się do zwiększenia granulacji rany. Dodatkowo związek ten stymuluje migrację i proliferację komórek naczyń endothelium i fibroblastów [23]. Ponadto opatrunki na bazie chitosanu wzmagają produkcję czynników wzrostu (np. VEGF) oraz ich receptorów (VEGF-R) zlokalizowanych na komórkach endothelium w obrębie rany, uruchamiając jednocześnie szlak kinazy tyrozynowej prowadzący do angiogenezy [24]. Wykazano również, że chitosan działa statycznie na wybrane drobnoustroje (głównie bakterie). Grupy aminowe w cząsteczce chitosanu ulegają adsorpcji wokół ściany komórkowej bak-

terii, co powoduje przerwanie jej ciągłości, naruszenie błony komórkowej i w konsekwencji wyciek materiału komórkowego bakterii. Inny mechanizm jego działania polega na wnikięciu chitosanu bezpośrednio do wnętrza komórki bakteryjnej, upośledzeniu syntezy mRNA i działania enzymów komórkowych [25]. Dodatkowymi atutami chitosanu przemawiającymi za jego zastosowaniem w leczeniu ran są:

- absorbowanie jonów metali w środowisku rany,
- zdolność do tworzenia układów hybrydowych z lekami np. z antybiotykami,
- silne właściwości hemostatyczne,
- silne zdolności absorpcyjne do macierzy pozakomórkowej, ułatwiające regenerację rany i przyleganie opatrunku [26–30].



Ryc. 2. Otrzymywanie chitosanu za pomocą procesu acetylacji chityny (na podstawie [14])

W dalszej części pracy autorzy przedstawiają wykorzystanie i skuteczność chitosanu w gojeniu ran powstałych w przebiegu cukrzycy.

Zastosowanie chitosanu w leczeniu ran

Chitosan występujący w formie hydrożelowych opatrunków jest dobrą metodą codziennej pielęgnacji rany [31]. Materiały te są jednymi z częściej używanych środków do pielęgnacji i leczenia ran przewlekłych ze względu na swoją dużą dostępność i łatwość aplikacji. Najkorzystniejszą ich cechą jest utrzymanie rany w stanie wilgotnym, co przyspiesza proces gojenia i pozwala na bezbolesną zmianę opatrunku. Dodatkową korzyścią jest stałe oczyszczanie rany poprzez chłonięcie wysięku wraz z zanieczyszczeniami i tworzenie bariery ochronnej przed zakażeniem. Ponadto nie wykazują one cech antygenowości czy alergizacji tkanek [32].

Hydrożele chitosanowe-alginianowe

Obiektem szczególnego zainteresowania stały się tzw. hydrożele chitosanowo-alginianowe stosowane m.in. w leczeniu oparzeń lub odleżyn. Charakteryzują się one wysokimi zdolnościami sorpcyjnymi, korzystnymi parametrami mechanicznymi (odpowiednia elastyczność, wytrzymałość na rozciąganie) i właściwościami bakteriostatycznymi przeciw *Escherichia coli*, gdy w kompozycji znajduje się siarczan cynku [33].

Doświadczenie oceniające skuteczność kompozytu chitosanowo-alginianowego zostało przeprowadzone przez grupę naukowców z Japonii [34]. W celu utrzymania wilgotnego środowiska w obrębie rany oraz przyspieszenia jej gojenia, hydrokoloïdowa warstwa opatrunkowa została utworzona na bazie alginianu, chitosanu oraz fukoidyny (polisacharyd siarczanowy występujący głównie u wodorostów) (ang. *Alginate, Chitin/chitosan and Fucoïdan - Hydrocolloid Sheet*,

ACF-HS). Grupę badaną stanowiły myszy z wywołaną cukrzycą, u których na tylnej powierzchni grzbietu utworzono pełnościenne uszkodzenie skóry o średnicy 12 mm. Z obszaru rany, na którą nałożono ACF-HS, co kilka dni pobierano materiał do analiz histologicznych. Wyniki badania mikroskopowego ukazały znacznie zaawansowany proces granulacji w ranie i wzmoczenie tworzenia kapilar naczyńiowych w 4, 9 oraz 14 dniu od nałożenia opatrunku ACF-HS, w porównaniu z ran zwierząt leczonych opatrunkami hydrokoloïdowymi. Wyniki tego eksperymentu pokazują, że opatrunek ACF-HS był skutecznym w leczeniu ran.

Hydrożele chitosanowe w połączeniu z czynnikami wzrostu

W badaniu przeprowadzonym przez Ishihara i wsp. [35] wykazano, że hydrożele chitosanowe w połączeniu z czynnikami wzrostowymi, które są uwalniane z hydrożelu, wpływają korzystnie na angiogenezę i powstawanie krążenia obocznego w ranach u myszy z cukrzycą.

Obara i wsp. [36] porównywali skuteczność stosowania hydrożelu chitosanowego z lub bez czynnika wzrostu fibroblastów (ang. *Fibroblast Growth Factor, FGF-2*) na rany zwierząt zdrowych i z cukrzycą. Po wycięciu na grzbiecie myszy pełnościennej warstwy skóry autorzy zastosowali hydrożel chitosanowy. Dodanie FGF-2 do hydrożelu spowodowało przyspieszenie gojenia rany wśród grupy zwierząt z cukrzycą. Natomiast u zdrowych myszy nie zauważono różnic w procesie gojenia się ran przy zastosowaniu opatrunków zawierających i nie zawierających FGF-2. W badaniu histologicznym autorzy stwierdzili u myszy z cukrzycą większą granulację, angiogenezę oraz epitelializację rany.

Wpływ chitosanu i czynnika wzrostu FGF-2 na proces gojenia ran oceniał w innym badaniu także Obara i wsp. [37]. Biomateriał stanowił elastyczny, nierozpuszczalny hydrożel złożony z usieciowanego chitosanu

z dodatkiem FGF-2. Uwolnienie tego czynnika nastąpiło po biodegradacji hydrożelu. Grupy badane stanowiły myszy z cukrzycą (model myszy *db/db*, tj. homozygoty w zakresie mutacji punktowej w receptorze leptyny genu *lepr.*) oraz ich zdrowe rodzeństwo z tego samego miotu (*db/+*). W obu grupach wytworzono rany o pełnej grubości skóry. Na rany stosowano czysty hydrożel chitosanowy lub hydrożel chitosanowy zawierający FGF-2. Grupa kontrolna nie otrzymała żadnego opatrunku. Ocenę skuteczności stosowanego opatrunku dokonano na podstawie preparatów histologicznych z rany. Autorzy oceniali zdolność kurczenia się rany, epitelializację oraz wypełnienie ubytku tkanki w 2, 4, 10 i 16 dniu leczenia. Stwierdzili oni, że u myszy z cukrzycą zastosowanie chitosanu wraz z FGF-2 spowodowało większe zamknięcie rany, aniżeli u zwierząt leczonych samym opatrunkiem chitosanowym. Odmienne wyniki obserwowano u myszy zdrowych – tam nieco wyższą skutecznością odznaczał się sam opatrunek chitosanowy. Autorzy oceniali także ekspresję cząsteczki CD-34 w komórkach endothelium rany. Antygen ten jest najważniejszym pozytywnym markerem dla ludzkich hematopoetycznych i progenitorowych komórek macierzystych. Innymi słowy można powiedzieć, że integralność komórek endothelium jest miarą ekspresji m.in. cząsteczki CD-34. Wysoką jego ekspresję obserwuje się także w początkowych stadiach tworzenia i różnicowania naczyń krwionośnych. Hydrożel z FGF-2 znacząco zwiększał liczbę naczyń CD-34 pozytywnych u myszy z cukrzycą (*db/db*) w czwartym dniu leczenia [37].

W randomizowanym, objętym podwójnie ślepą próbą badaniu przeprowadzonym przez Richard i wsp. [38] badano wpływ opatrunku utworzonego z błony chitosanowej z naniesionym FGF-2 na gojenie się ran u myszy. Błony te były przygotowywane przez liofilizację roztworu buforowego octanu hydroksypropylo-

chitosanu (300 µl, 6% wag.obj.) w teflonowych formach o wymiarach 1 cm x 1 cm. Dla opracowania optymalnej dawki czynnika wzrostowego stworzono błony o trzech różnych stężeniach FGF-2 – 0,6 µg/błonę, 2 µg/błonę oraz 6 µg/błonę. Do badania użyto 10 tygodniowych samic myszy z cukrzycą uwarunkowaną genetycznie. W dniu operacji (dzień 0) na grzbietach myszy wycięto ranę o średnicy 1,6 cm. W celu zmniejszenia ryzyka zakażenia, każdej myszy wstrzykiwano domięśniowo antybiotyk tobramycynę. W grupie pierwszej, kontrolnej (n=12) na ranę zaaplikowano roztwór soli fizjologicznej, w grupie drugiej (n=11) nałożono błonę z samym chitosanem. Natomiast w grupie trzeciej zastosowano błonę chitosanową wraz z FGF-2 o różnych stężeniach tego czynnika wzrostu (n=12 dla stężenia 0,6 µg FGF-2/błonę; n=12 dla stężenia 2 µg FGF-2/ błonę; n=10 dla stężenia 6 µg FGF-2/błonę). Ranę zabezpieczono zamkniętym opatrunkiem zmienianym trzy razy w tygodniu. Powierzchnia rany była mierzona i analizowana co pięć dni przez okres trzech tygodni. Po siedmiu dniach z każdej grupy zabijano jedną mysz, a z rany i otaczającej skóry pobierano materiał do badań histologicznych. Wyniki pokazały, że po tym okresie czasu powierzchnia rany w grupie kontrolnej i w grupie z samym chitosanem była podobna. Natomiast zostało stwierdzone przyspieszenie procesu gojenia rany zależne od stężenia FGF-2 w błonie. Po 15 dniach w grupie, która otrzymała opatrunek w stężeniu wynoszącym 0,6 µg FGF-2/błonę powierzchnia rany nie różniła się ani od grupy kontrolnej ani grupy leczonej samym chitosanem. Powierzchnia ran pokrytych błonami zawierająca wyższe stężenia tego czynnika wzrostu (2 µg i 6 µg) była mniejsza niż w pozostałych grupach, lecz różnica pomiędzy nimi nie była znamienista statystycznie. W badaniach histologicznych proliferacja fibroblastów i angiogeneza były większe w grupie, u której stosowano FGF-2 aniżeli w pozostałych. Mizuno i wsp. [39] poka-

zali, że dzięki połączeniu FGF-2 z chitosanem można dostarczyć dokładną dawkę FGF-2 oraz wydłużyć jego aktywność, co może zostać wykorzystane w gojeniu ran u chorych z cukrzycą posiadających zaburzone mikrokrążenie.

Hydrożel z heparyną

Wykazano także, że dodanie do hydrożelu chitosanowego heparyny spowodowało powstanie jego formy iniekcyjnej (chitosan/IO₄-heparyna), która doskonale spełnia funkcje nośnika dla FGF-2. Fujiita i wsp. [40] oceniali zdolność do angiogenezy i tworzenia tkanki włóknistej przez zastosowanie FGF-2/chitosan w formie iniekcyjnej. Autorzy ci wstrzykiwali badaną substancję do niedokrwionej kończyny szczurom chorującym na cukrzycę. Obserwowali oni znaczący wzrost szybkości angiogenezy, zwiększenie unaczynienia obocznego oraz wzrost ilości tkanki łącznej w pobliżu miejsca podania substancji już w czwartym dniu po podaniu. W 28 dniu po iniekcji tej substancji obserwowali zwiększenie przepływu krwi w miejscach uprzednio niedokrwionych oraz większe natlenowanie krwi przepływającej przez badaną kończynę.

Hydrożele z alkoholu poliwinylowego

Hydrożele z alkoholu poliwinylowego (ang. *Polyvinyl Alcohol* – PVA) produkowane techniką zamrażania-odmrażania, są nietoksycznymi, niekancerogennymi materiałami o dobrej biokompatybilności i biodegradalności. Hydrożele te wraz z chitosanem posiadają ak-

tywność przeciwgrzybiczą oraz przyspieszają produkcję kolagenu przez wzrost fibroblastów. W procesie gojenia ran hydrożel z PVA został również wykorzystany w połączeniu z jadem pszczelim, który ze względu na zawartość wielu czynników aktywnych (enzymy, peptydy, aminy biogenne) wykazuje właściwości przeciwzapalne i przeciwbakteryjne [41, 42].

Badanie Amina i wsp. [43] oceniało skuteczności zastosowania tego rodzaju preparatów w przyspieszaniu leczenia ran u szczurów z cukrzycą. Do badania użyto czterech roztworów chitosanu (o stężeniu 0,2, 0,3, 0,4 oraz 0,6%) rozpuszczonych w kwasie mlekowym, do których dodano roztwory PVA (10%) oraz jad pszczeli (ang. *Bee venom* – BV) w stężeniach 2, 3, 4%. Badania przeprowadzono na samcach szczurów o wadze 150 – 180 g, u których wywołano cukrzycę przez pojedynczą iniekcję monohydratu alloksonu. Następnie w anestezji ketaminowej wykonano na ich grzbietach okrągłe rany skóry o średnicy 18 mm. Zwierzęta podzielono na 4 grupy badane jak pokazano poniżej.

Grupę kontrolną stanowiły szczury, których rany pozostawały nie leczone. Opatrunki w grupach badanych zmieniano dwa razy dziennie, a pomiary powierzchni rany dokonano w 0, 7, 14 i 21 dniu leczenia. Po 14 dniach wygojenie ran uzyskano u 84% szczurów w grupie 3 i 91% w grupie 4. Natomiast po 21 dniach rany zagoiły się u 96% zwierząt w grupie 2 i 100% w grupie 4. W grupie kontrolnej po 14 dniach od wytworzenia rany obserwowano ich zagojenie tylko u 67% szczurów, a po 21 dniach u 80% zwierząt. Ponadto, w ranach zwierząt grupy kontrolnej autorzy zaobserwowali większy rozwój bakterii oraz cechy zapalenia (zaczernienie, obrzęk okolicy rany). W pracy oceniono również właściwości przeciwzapalne hydrożelu PVA/chitosan/BV po wywołaniu obrzęku łapy szczura za pomocą karagenu (polisacharyd izolowany z wodorostów zawierających liczne grupy siarczanowe, stosowany często jako suro-

Stężenie składnika hydrożelu / grupa badawcza	Grupa 1	Grupa 2	Grupa 3	Grupa 4
PVA [%]	10	10	10	10
Chitosan [%]	0,2	0,3	0,4	0,6
BV [%]	0	2	3	4

wiec do produkcji żeli i galaret). Hydrożel o stężeniach jak w grupach badanych (1- 4), aplikowano na 30 minut przed podaniem substancji drażniącej, aby umożliwić jego wchłonięcie. Po 4 godzinach badacze zauważyli, że obrzęk w grupie badanej (z hydrożelem) był o 35-68% mniejszy niż w grupie kontrolnej (bez hydrożelu). Ponadto autorzy wykazali, iż zmniejszenie obrzęku po zastosowaniu hydrożelu w stężeniach stosowanych jak w grupie 4 było wielkościami porównywalne jak po podaniu żelu z 1% diklofenakiem podanym na 30 minut przed podaniem karagenu. Powyższe badanie ujawniło, że mieszanina zawierająca PVA, chitosan i jad pszczeli znacząco przyspiesza proces gojenia ran, a ze względu na łatwe podanie oraz minimalne układowe skutki uboczne może znaleźć zastosowanie w praktyce klinicznej.

Zastosowanie komórek macierzystych

Skuteczne w leczeniu ran okazało się także wykorzystanie komórek macierzystych. W ciekawym badaniu Tonga i wsp. [44] wykorzystano mezenchymalne komórki macierzyste (pochodzące ze szpiku kostnego). Przy użyciu metody sieciowania, na skonstruowane przez siebie trójwymiarowe biomimetyczne rusztowanie (*scaffold*) kolagenowo-chitosanowe autorzy wysiewali komórki macierzyste. Model zwierzęcy stanowiły szczury chore na cukrzycę, u których podwiązano lewą tętnicę udową celem otrzymania obszaru niedokrwionego kończyny. Po tygodniu od podwiązania naczynia, z obszaru niedokrwionego tj. z powierzchni grzbietowej uda, pobrano pełnościenny fragment skóry o średnicy 1 cm. Następnie był on połączony z biomateriałem kolagenowo-chitosanowym w stosunku 1:1, 2:3 i 3:2. Autorzy oceniali wpływ hipoksji na bioaktywność tego biomateriału oraz zbadano też wpływ na żywotność, aktywność proliferacyjną oraz zdolności wydzielnicze

komórek macierzystych w kompleksie kolagen/chitosan. Wykazano, że żywotność komórek macierzystych była bardzo duża nawet w siódmym dniu hipoksji. Co prawda, komórki macierzyste nie cechowały się w tym okresie już tak wyraźną zdolnością do proliferacji, natomiast wydzielaly dużą ilość czynników proangiogennych (HIF-1 α , VEGF oraz PDF) w porównaniu do hodowli tkankowej na tworzywie sztucznym w warunkach normoksji. Doszło również do znacznej redukcji stanu zapalnego, dzięki obniżeniu stężenia IL-6 i zwiększeniu IL-10 w 3, 7 i 14 dniu w porównaniu do warunków normoksji

Hilmi i wsp. [45] oceniali wpływ miejscowego stosowania matryc chitosanowych połączonych z ludzkimi fibroblastami (ang. *Human Dermal Fibroblasts* – HDFs) lub komórkami macierzystymi mieszków włosowych (ang. *Hair Follicle Stem Cells* – HFSCs) na proces gojenia ran. Autorzy pracy poddali napromienianiu 15 szczurów w okolicę grzbietową ciała dawką w wysokości 10 Gy. Zwierzęta te stanowiły grupę badaną. Taka sama liczba zwierząt stanowiła grupą kontrolną. Po okresie dwóch miesięcy po napromienianiu, na grzbiecie wytworzono rany penetrujące całą warstwę skóry. 5 ran zostało pokrytych dwuwarstwowym substytutem skóry, kolejne 5 chitosanowym biomateriałem, a ostatnie 5 wodoodpornym opatrunkiem koloidowym (Duoderm). Autorzy oceniali ilość powstającego kolagenu w 7, 14 oraz 21 dniu leczenia. W siódmym dniu od wytworzenia rany ilości powstałego kolagenu były niewielkie u wszystkich 3 grup. Natomiast w 21 dniu od napromieniania oraz rany nienapromieniowane a pokryte dwuwarstwowym substytutem skóry wykazały największą ilość włókien kolagenowych (3.4 ± 0.25 oraz 3.4 ± 0.40 odpowiednio rany napromienione oraz nienapromieniane). Jakkolwiek rany pokryte biomateriałem chitosanowym uzyskały również wysoką produkcję kolagenu (3.2 ± 0.58 i 2.8 ± 0.37 odpo-

wiednio dla napromieniowanej i nienapromieniowanej grupy) w porównaniu do ran pokrytych wodoodpornym opatrunkiem koloidowym Duoderm (2.0 ± 0.63 i 2.2 ± 0.74 odpowiednio dla napromieniowanej i nienapromieniowanej grupy). Badanie to pokazało, że rusztowanie chitosanowe jest dobrą matrycą, na której z HDFs mogą powstawać i proliferować komórki skóry, tworzące wraz z chitosanem dwuwarstwowy żywy jej substytut.

W badaniu Shen i wsp. [46] oceniali skuteczność gojenia ran przy zastosowaniu skóry właściwej zbudowanej z ludzkich komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej (ang. *Adipose-derived Stem Cells* – ASCs) i kompleksu kwasu poliglutaminowego/chitosan (ang. Poly-L-glutamic Acid/ Chitosan – PLGA/CS) u myszy z cukrzycą wywołaną streptozocyną. Macierzyste komórki otrzymywano w czasie brzusznej liposukcji u zdrowych kobiet. Po odpowiedniej hodowli i pasażu pozyskane komórki nakładano na szkielet PLGA/CS, następnie po 3 godzinnej inkubacji całe rusztowania umieszczano na płytkach hodowlanych. Po kolejnej inkubacji przenoszono je na nowe płytki i hodowano *in vitro* przez 7 dni. W celu zobrazowania wzrostu hodowli, komórki pokryte były związkami fluorescencyjnymi. Badanie zostały przeprowadzone u 45 myszy płci męskiej (BALB/c-nu/nu) w wieku 7-8 tygodni i wadze 20-25 g, które podzielono na 3 równe grupy badane. Po wstrzyknięciu streptozocyny i usunięciu sierści z grzbietu myszy wytworzono tam rany o wymiarach 20 mm x 20 mm. Pierwszą grupę badawczą stanowiły myszy z cukrzycą, których rany zostały pokryte szkieletem PLGA/CS z ASCs. U ran myszy z grupy drugiej zastosowano jedynie PLGA/CS bez ASCs, zaś grupą kontrolną stanowiły myszy bez cukrzycy, których rany pozostały bez opatrunku. Autorzy dokonywali jej oceny w 7, 14 i 21 dniu od daty wykonania ran. Zauważyli oni, że już w 7-mym dniu rany pokryte PLGA/CS z ASCs

wykazywały wyższy stopień gojenia w porównaniu do ran zwierząt z pozostałych grup. Co więcej, po 14 dniach rany u myszy z grupy pierwszej zostały prawie całkowicie zagojone.

Chitosanowe rusztowania komórkowe

Kluczowym zadaniem rusztowania komórkowego, tak zwanych scaffoldów jest fizyczne stworzenie podłoża dla komórek jak i regulacji procesu proliferacji oraz różnicowania. Jeśli komórkom nie dostarczy się naturalnego rusztowania komórkowego bądź jego substytutu, regeneracja jest praktycznie niemożliwa. Podstawowym parametrem odpowiadającym za funkcję rusztowania komórkowego jest jego porowatość. Wielkość i ilość porów ma ogromny wpływ na przenikanie komórek do wnętrza implantu, co w konsekwencji wpływa korzystnie na regenerację uszkodzonej tkanki. Prawidłowy przebieg odbudowy tkanki *in vitro* warunkowany jest nie tylko obecnością komórek i rusztowania, ale także sterujących procesami różnicowania komórek cytokin i czynników wzrostu [47].

Ludzkie skórne fibroblasty inkubowane w chitosanowym rusztowaniu przybierającym strukturę gąbki, pokryty kolagenem typu I, może być wykorzystany jako żywy substytut skóry lub/i materiał opatrunkowy. Wykazano, że zastosowanie 14% jednoosiowego odkształcenia na komórkowe rusztowania ma wpływ na czynność ludzkich skórnych fibroblastów wysianych na chitosanowym rusztowaniu. W badaniu Riehl i wsp. [48] udowodnili, że cykliczne odkształcenia w obrębie tkanek powstałych metodami inżynierii tkankowej modyfikują ich sprawność oraz organizację. Wzmagają komórkową proliferację, aktywność metaloproteiny-2 i ekspresję białek macierzy zewnątrzkomórkowej takich jak fibronektyna. Dodatkowo ekspresja VEGF, IL-6 w komórkach endothelium – związków praktycz-

nie niezbędnych dla gojenia się rany uległa również zwiększeniu.

Wpływ jednoosiowych cyklicznych odkształceń na potencjał proliferacyjny skórnych fibroblastów wysianych na chitosanowym rusztowaniu w procesie gojenia się rany zbadali także Park i wsp. [49]. Na rusztowanie chitosanowe o wymiarach 40 x 15 x 2 mm wysiali ludzkie skórne fibroblasty z gęstością 105 komórek/cm². Tak przygotowany biomateriał był przez okres 24 godzin inkubowany. Następnie biomateriał umieszczony w bioreaktorze i poddany był naprężeniu jednoosiowemu 0, 7 lub 14% przez nieprzerwany okres 3 lub 7 dni. Autorzy wykazali, że 7 lub 14% jednoosiowe naprężenie spowodowało znaczący wzrost liczby fibroblastów, przy czym efekt ten był wyraźniejszy przy 14% naprężeniu. Wykazali oni także, że wystarczy przynajmniej 3-dniowe 14% naprężenie, by znacząco zwiększyć ilość tychże fibroblastów w obrębie chitosanowego rusztowania komórkowego. Wszystkie rusztowania, które poddano 14% naprężeniu, cechowały się ekspresją wimentyny – markera białkowego dla fibroblastów. W badaniu autorzy potwierdzili również, iż pod wpływem naprężenia zwiększa się ekspresja VEGF oraz IL-6 w środowisku komórkowym rany.

Mohandas i wsp. [50] badali zachowanie się chitosanu połączonego z kwasem hialuronowym, czynnikiem wzrostu śródbłonka naczyniowego i nanocząsteczkami fibryny, które stanowiły formę złożonej gąbki przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego. Autorzy wykazali, że kompozyt przygotowany w formie gąbki posiada potencjał do wydzielania VEGF, który przyspiesza gojenie przez wzmaganie angiogenezy.

Z kolei Wang i wsp. [51] przeprowadzili badanie, w którym oceniano skuteczność gojenia świeżych ran przy zastosowaniu gąbki chitosanowo-kolagenowej w połączeniu z FGF-1 (ang. *Chitosan-Crosslinked Collagen Sponge* – CCCS) u szczurów z cukrzycą typu 1

wyidukowaną pojedynczą dawką streptozocyny. Taka forma usieciowanego kolagenowo-chitosanowego opatrunku posiada następujące właściwości: jest jednolita, zwarta, pochłania mniejsze ilości wody i posiada porowatą ultrastrukturę, wysoką odporność na trawienie kolagenazami i powolne uwalnianie FGF z CCCS/FGF. Kolagen otrzymany ze ścięgna bydłęcego został rozpuszczony i użyto go w trzech różnych stężeniach 0,11 mg/ml, 0,22 mg/ml i 0,41 mg/ml wraz z usieciowanym 1% chitosanem w proporcji odpowiednio 10:1, 5:1, 1:1. Powstało w ten sposób 9 zestawów CCCS oraz 3 zestawy gąbki kolagenowej bez chitosanu. Do preparatów CCCS dodano następnie FGF-1. U szczurów z wytworzoną cukrzycą w znieczuleniu eterowym dokonano oparzenia II stopnia. Na rany zakładano opatrunki i obserwowano proces gojenia się ran. W trzecim dniu leczenia wycinano ranę, którą badano histopatologicznie. Stwierdzono, że najkrótszy czas gojenia dotyczył zwierząt leczonych opatrunkiem zawierający FGF-1. Wyniósł on 14 dni w stosunku do 18-21 dni w innych leczonych grupach. Opatrunek FGF-1 z CCCS/FGF wykazał się też najszybszym czasem tworzenia kolagenu oraz cechował się największą proliferacją komórek skóry w porównaniu do innych badanych grup. Wszystkie te wyniki sugerują, że CCCS/FGF może być bardzo skutecznym opatrunkiem do przyspieszania gojenia ran u chorych z cukrzycą.

Chitosanowy nośnik czynników genetycznych

Chitosan okazał się również skutecznym jako nośnik czynników genetycznych bezpośrednio w obrębie środowiska rany. Pracą dokumentującą możliwość wykorzystania chitosanu, jako nośnika plazmidu DNA kodującego wytwarzanie VEGF jest doniesienie Guo i wsp. [52]. Autorzy Ci zastosowali jako substytut skóry gąbki kolagenowo-chitosanowe pokryte sztuczną sili-

konową warstwą. Efektem tego było wyraźne przyspieszenie tempa gojenia ran ciętych poprzez wzmocnienie angiogenezy. Kontynuacją badań nad wykorzystaniem połączenia czynników genowych z chitosanem jako ich „nośnikiem informacji genetycznej” było dodanie do wymienionego wyżej substytutu skóry kompleksu złożonego z TMC (N,N,N-trimetylochlorek chitosanu) i siRNA. Celem tego było wyciszenie funkcji genu odpowiedzialnego za wytwarzanie TGF- β_1 (ang. *Transforming Growth Factor* β_1 – TGF- β_1), którego nadmierny poziom prowadzi do tworzenia blizn. Zastosowanie powyższego kompleksu w badaniu eksperymentalnym na świniach, po 73 dniach doprowadziło do powstania skóry przypominającej budową zdrową tkankę [53]. Ponadto udowodnione zostały również korzyści płynące z połączenia chitosanu z innymi związkami np. ze srebrem.

Inne

Lu i wsp. [54] stworzyli opatrunek z nanokrystalicznego srebra oraz chitosanu i przetestowali go w leczeniu ran niepełnej grubości skóry obejmujących około 10-13% powierzchni grzbietów szczurów. W grupie kontrolnej stosowano opatrunki z samego chitosanu oraz w badawczej dodając do niego srebrzanu sulfadiazyny. Zaobserwowano skrócenie średniego czasu gojenia w grupie badanej o prawie 4 dni w porównaniu do pozostałych grup oraz obecność naskórka na ranach pokrytych opatrunkiem z nanosrebrem.

Moura i wsp. [55] opracowali i zastosowali opatrunki na bazie chitosanu do przedłużonego dostarczania do środowiska rany neurotensyny (NT). Jest to neuropeptyd, który współdziała z leukocytami, komórkami tucznyimi, dendrytycznymi i makrofagami oraz przyczynia się do uwalniania cytokin i uruchomienia zjawiska chemotaksji. Dodatkowo neurotensyna wpływa

na przepuszczalność, aktywność skurczową naczyń krwionośnych i proces nowotworzenia naczyń, przyczyniając się do poprawy unaczynienia w czasie gojenia się rany. W badaniu zostały przetestowane trzy różne pochodne, a mianowicie N-karboksymetylo-chitosan (CMC), chitosan-5-pirolidynonu metylu (MPC) oraz N-sukcynylochitosan (SC). Okazało się, że MPC wykazywał najlepszą zdolność pochłaniania płynów i zdolność do uwalniania neurotensyny. Porównano skuteczność gojenia się rany przy zastosowaniu opatrunków na bazie MPC z oraz bez stosowania NT. Uzyskane wyniki pokazują, że przy użyciu opatrunków z NT następowała szybsza indukcja gojenia rany (powierzchnia rany zmniejszała się o 50%) u myszy z cukrzycą. Ponadto opatrunek z NT doprowadził także do mniejszego stężenia cytokiny prozapalnej – TNF- α oraz szybszej redukcji nacieku zapalnego (już w 3-cim dniu) w środowisku rany aniżeli opatrunek bez NT. Stężenie metaloproteinazy-9 (MMP-9) również uległo zmniejszeniu (w 10-tym dniu), co powodowało znaczący wzrost migracji fibroblastów i ekspresji oraz zwiększenie depozytów kolagenu w ranie.

Oprócz niedokrwiennego tła ran u chorych z cukrzycą, składowa neuropatyczna jest również nie bez znaczenia. Jednak wiedza na temat regeneracji nerwu obwodowego po jego uszkodzeniu w modelach zwierzęcych chorych na cukrzycę nie jest do końca kompletna. Jedne z najnowszych badań zostało przeprowadzone przez Steinberg i wsp. [56]. Autorzy Ci poddali krótkotrwałej (21 dni) ocenie porównawczej zastosowania tuby chitosanowej i autologicznego przeszczepu nerwu w regeneracji odcinka o długości 10 mm nerwu kulszowego. Grupę kontrolną stanowiły zdrowe szczury ze szczepu Wistar natomiast grupę badawczą szczury chore na cukrzycę pochodzące ze szczepu Goto-Kakizaki (GK). Po upływie 3 tygodni od aplikacji materiałów określono m.in. długość aksonalnej wypustki czy

obecność aktywowanych i apoptotycznych komórek osłonki Schwanna. Otrzymane wyniki wskazały wyższą skuteczność regeneracyjną przeszczepu autologicznego nerwu nad tubą chitosanową. Lepsza regeneracja aksonalna była obserwowana w przeszczepionym nerwie aniżeli chitosanowym przewodzie. Wśród szczurów chorych na cukrzycę efekt ten był silniej wyrażony. Ponadto w grupie chorych zwierząt zaobserwowano mniej apoptotycznych komórek osłonki Schwanna. Okazuje się zatem, że preparat chitosanu nie wywiera istotnie korzystnego wpływu na szybkość regeneracji uszkodzonych nerwów obwodowych w przebiegu cukrzycy w populacji badanych zwierząt laboratoryjnych.

Podsumowanie

Autorzy w pracy przedstawili najnowsze wyniki badań naukowych, w których skutecznie wykorzystano chitosan bądź jego pochodne w procesie leczenia ran. Hydrożele chitosanowe oraz inne nowoczesne formy opatrunków, powstałe dzięki osiągnięciom inżynierii biomedycznej, mogą stanowić dobrą perspektywę strategii leczniczej dla chorych z ranami przewlekłymi chorującymi na cukrzycę. Jednakże faktem jest, iż istnieje nadal duża potrzeba prowadzenia dalszych badań naukowych, których końcowym efektem będzie zastosowanie skutecznego opatrunku na bazie chitosanu w praktyce klinicznej.

Literatura

- [1] <http://www.diabetesatlas.org/>
- [2] <http://www.idf.org/news/world-diabetes-day-protecting-our-right-health>
- [3] Jawień A, Grzela T, Ochwat A. Prevalence of chronic venous insufficiency (CVI) in men and women of Poland. Multicenter cross-sectional study of 40095 patients. *Phlebology* 2003; 3 (18): 110–122.

- [4] Skórkowska-Telichowska K, Bugajska-Prusak A, Pluciński P, Rybak Z, Szopa J. Fizjologia i patologia przewlekłe niegojących się owrzodzeń oraz sposoby ich miejscowego leczenia w świetle współczesnej wiedzy medycznej. *Dermatol Prakt* 2009; 1 (5): 15–29.
- [5] Buowari OY. Diabetes Mellitus in Developing Countries and Case Series. *Diabetes Mellitus-insights and perspectives* 2013: 131.
- [6] Boulton AJ, Vileikyte L, Ragnarson-Tennvall G, Apelqvist J. The global burden of diabetic foot disease. *The Lancet* 2005; 366 (9498): 1719–1724.
- [7] Karnafel W. Plejotropowe działanie benfotiaminy. *Alergia* 2014; 59 (1): 42–47.
- [8] Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 2010; 89 (3): 219–229.
- [9] Potempa M, Jonczyk P, Janerka M, Kucharzewski M, Kawczyk-Krupka A. Rany przewlekłe – epidemiologia i czynniki wpływające na proces gojenia. *Leczenie Ran* 2014; 11 (2): 43–50.
- [10] Ochoa O, Torres FM, Shireman PK. Chemokines and diabetic wound healing. *Vascular* 2007; 15 (6): 350–355.
- [11] Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb Technol* 2004; 35 (2-3): 126–139.
- [12] Krajewska B. Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials. *Sep Purif Technol* 2005; 41 (3): 305–312.
- [13] Kumirska J, Stepnowski P. Zastosowanie technik chromatograficznych do analizy chityny i chitosanu. *Lab* 2015; (4): 24–29.
- [14] Castro SPM, Lizárraga Paulín EG. Is Chitosan a New Panacea? Areas of Application. In: Karunaratne DN (ed), *The Complex World of Polysaccharides*, InTech Publisher, 2012, pp: 4–28. Doi: 10.5772/2947
- [15] Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. *Int. J. Biol. Macromol* 1992; 14: 225–228.
- [16] Wydro P, Krajewska B, Hac-Wydro K. Chitosan as a Lipid Binder: A Langmuir Monolayer Study of Chitosan-Lipid Interactions. *Biomacromolecules* 2007; 8 (8): 2611–2617.
- [17] Muzzarelli RAA. Chitosan-Based Dietary. *Foods Carbohydr Polym* 1996; 29 (4): 309–316.
- [18] Ylitalo R, Lehtinen S, Wuolijoki E, Ylitalo P, Lehtimäki T. Cholesterol-lowering properties and safety of chitosan. *Arzneimittelforschung* 2002; 52 (1): 1–7.
- [19] Chang H, Yao H, Chiang M. Effects of High and Low Molecular Weight Chitosan on Plasma Cholesterol, Glucose and Adipocytokines in Diabetic Rats Induced by Streptozotocin and Nicotinamide. *JFDA* 2012; 20 (3): 661–667.
- [20] Dai T, Tanaka M, Huang YY, Hamblin MR. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and woundhealing effects. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011; 9 (7): 857–879.
- [21] Jayakumar R, Nwe N, Tokura S, Tamura H. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *Int J Biol Macromol* 2007; 40 (3): 175–181.
- [22] Muzzarelli AAR. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydr. Polym* 2009; 76 (2): 167–182
- [23] Ueno H, Mori T, Fujinaga T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 52 (2): 105–115.
- [24] Inan ZDS, Saraydin SU. Investigation of the wound healing effects of chitosan on FGFR3 and VEGF immunolocalization in experimentally diabetic rats. *IJBMR* 2013; 1 (1): 1–8.
- [25] Rabea EI, Badawy ME, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 2003; 4 (6): 1457–1465.
- [26] Noel SP, Courtney H, Bumgardner JD, Haggard WO. Chitosan films: a potential local drug delivery system for antibiotics. *Clin Orthop Relat Res* 2008; 466 (6): 1377–1382.
- [27] Arbel J, Rozenbaum E, Reges O et al. Usage of chitosan for Femoral (USF) haemostasis after percutaneous procedures: a comparative open label study. *EuroIntervention* 2011;6 (9): 1104–1109.
- [28] Wan Ngah WS, Teong LC, Hanafiah MAKM. Adsorption of dyes and heavy metal ions by chitosan composites: A review. *Carbohydrate Polymers* 2011; 83 (4): 1446–1456.
- [29] Wyrębiska Ł, Szuter L, Stawska H. Synteza i aplikacja nowych pochodnych wybranych polisacharydów Część I: Przegląd literatury. *Technologia i Jakość Wytrobów* 2014; 59: 1–16. [30] Verheul RJ, Amidi M, van Steenberg MJ et al. Influence of the degree of acetylation on the enzymatic degradation and in vitro biological properties of trimethylated chitosans *Biomaterials* 2009; 30 (18): 3129–3135.
- [31] Albanna MZ, Bou-Akl TH, Blowytsky O, Walters HL 3rd, Matthew HW. Chitosan fibers with improved biological and mechanical properties for tissue engineering applications. *J Mech Behav Biomed Mater* 2013; 20: 217–226.
- [32] Bialik-Wąs K, Pielichowski K. Polimerowe opatrunki hydrożelowe dla zastosowań biomedycznych. *Czasopismo techniczne. Chemia* 2011; 108 (z. 20, z. 2-Ch): 39–52.
- [33] Wiśniewska-Wrona M, Kucharska M, Niekraszewicz A et al. Biokompozyty chitozanolowo-alginianowe w postaci filmów do leczenia odleżyn. *Polimery w Medycynie* 2010;40 (2): 57–64.
- [34] Yanagibayashi S, Kishimoto S, Ishihara M et al. Novel hydrocolloid-sheet as wound dressing to stimulate healing impaired wound healing in diabetic db/db mice. *Bio-Medical Materials and Engineering* 2012; 22 (5): 301–310.
- [35] Ishihara M, Obara K, Nakamura S et al. Chitosan hydrogel as a drug delivery carrier to control angiogenesis. *J Artif Organs* 2006; 9 (1): 8–16.
- [36] Obara K, Ishihara M, Ishizuka T et al. Photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2 stimulates wound healing in healing-impaired *db/db* mice. *Biomaterials* 2003; 24 (20): 3437–3444.
- [37] Obara K, Ishihara M, Fujita M et al. Acceleration of wound healing in healing-impaired *db/db* mice with a photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2. *Wound Repair Regen.* 2005; 13 (4): 390–397.
- [38] Richard JL, Parer-Richard C, Daures JP et al. Effect of topical basic fibroblast growth factor on the healing of chronic diabetic neuropathic ulcer of the foot. A pilot, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Diabetes Care* 1995; 18 (1): 64–69.
- [39] Mizuno K, Yamamura K, Yano K et al. Effect of chitosan film containing basic fibroblast growth factor on wound healing in genetically diabetic mice. *Inc. J Biomed Mater Res* 2003; 64 (1): 177–181.
- [40] Fujiita M, Ishihara M, Shimizu M et al. Therapeutic angiogenesis induced by controlled release of fibroblast growth factor-2 from injectable chitosan/nonanticoagulant heparin hydrogel in a rat hind limb ischemia model. *Wound Repair Regen* 2007;15 (1): 58–65.
- [41] Kwon YB, Lee HJ, Han HJ et al. The water-soluble fraction of bee venom produces antinociceptive and anti-inflammatory effects on rheumatoid arthritis in rats. *Life Sci* 71 (2): 191–204.
- [42] Kim SH, Jung SY, Lee KW et al. Bee venom effects on ubiquitin proteasome system in hSOD1G85R-expressing NSC34 motor neuron cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2013; 13: 179–186.
- [43] Amin MA, Abdel-Raheem IT. Accelerated wound healing and anti-inflammatory effects of physically cross linked polyvinyl alcohol-chitosan hydrogel containing honey bee venom in diabetic rats. *Arch. Pharm. Res* 2014; 37: 1016–1031.
- [44] Tong C, Hao H, Xiab L et al. Hypoxia pretreatment of bone marrow-derived mesenchymal stem cells seeded in a collagen chitosan sponge scaffold promotes skin wound healing in diabetic rats with hindlimb ischemia. *Wound Repair and Degeneration.* 'Accepted Article', doi: 10.1111/wrr.12369.
- [45] Hilmi MAB, Hasan A, Halim AS. A Bilayer Engineered Skin Substitute for Wound Repair in an Irradiation-Impeded Healing Model on Rat. *Advances in Wound Care* 2015; 4 (5): 312–320.
- [46] Shen T, Pan ZG, Zhou X, Hong CY. Accelerated healing of diabetic wound using artificial dermis constructed with adipose stem cells and poly(L-glutamic acid)/chitosan scaffold. *Chin Med J* 2013; 126 (8): 1498–503.
- [47] Ma XP. Scaffolds for tissue fabrication. *Materials Today* 2004; 7 (5): 30–40.
- [48] Riehl BD, Park JH, Kwon IK, Lim JY. Mechanical stretching for tissue engineering: Two-dimensional and three-dimensional constructs. *Tissue Eng Part B Rev* 2012; 18 (4): 288–300.

- [49] Park KS, Lee EG, Son Y. Uniaxial cyclic strain stimulates cell proliferation and secretion of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor of human dermal fibroblasts seeded on chitosan scaffolds. *J Biomed Mater Res Part A* 2014; 102 (7): 2268–2276.
- [50] Mohandas A, Anisha BS, Chennazhi KP, Jayakumar R. Chitosan–hyaluronic acid/VEGF loaded fibrin nanoparticles composite sponges for enhancing angiogenesis in wounds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2015; 127: 105–113.
- [51] Wang W, Lin S, Xiao Y et al. Acceleration of diabetic wound healing with chitosan-crosslinked collagen sponge containing recombinant human acidic fibroblast growth factor in healing-impaired STZ diabetic rats. *Life Sci* 2008; 82 (3-4): 190–204.
- [52] Guo R, Xu S, Ma L, Huang A, Gao C. Enhanced angiogenesis of gene-activated dermal equivalent for treatment of full thickness incisional wounds in a porcine model. *Biomaterials* 2010, 31 (28): 7308–7320.
- [53] Liu X, Ma L, Liang J et al. RNAi functionalized collagen-chitosan/silicone membrane bilayer dermal equivalent for full-thickness skin regeneration with inhibited scarring. *Biomaterials* 2013, 34 (8): 2038–2048.
- [54] Lu S, Gao W, Gu HY. Construction, application and biosafety of silver nanocrystalline chitosan wound dressing. *Burns* 2008, 34 (5): 623–628.
- [55] Moura LIF, Dias AMA, Leal EC et al. Chitosan-based dressings loaded with neurotensin—an efficient strategy to improve early diabetic wound healing. *Acta Biomaterialia* 2014; 10 (2): 843–857.
- [56] Stenberg L, Kodama A, Lindwall-Blom C, Dahlin LB. Nerve regeneration in chitosan conduits and in autologous nerve grafts in healthy and in type 2 diabetic Goto–Kakizaki rats. *European Journal of Neuroscience* 2015: 1–11.
- [57] Ewolucja stawonogów (Arthropoda). Część 1 – początek ewolucji. Materiał wystawowy podczas Muzeum Geologiczne AGH Kraków; Arboretum i Zakład Fizjografii Bolesławy; Ośrodek Kultury Leśnej w Gołuchowie. Organizator Muzeum Przyrodnicze Instytutu Systematyki i Ewolucji Zwierząt PAN w Krakowie

Impact of chitosan on diabetic wounds healing process

Magdalena Potempa, Paweł Jonczyk, Beata Kandefer, Kinga Szczerba, Michał Janerka, Marek Kucharzewski

Constantly growing in all society, the incidence of diabetes mellitus means that clinicians have to handle ever greater number of complications resulting from impaired blood glucose level. One of the most serious medical consequences of them is disturbed wound healing and formation of so-called. diabetic foot has been created. Treatment of diabetic wounds is commonly chronic and unfortunately often leads with insufficient clinical efficiency. In order to above, scientists search for ever new solutions to accelerate and improve wound healing process. In this purpose it has been suggested a chitosan – product of deacetylation of chitin. Its usage in diabetic wounds therapy was proved to be effective. In this article authors have discribed the review of medical literature concernig impact of chitosan on wound healing process.

Key words: research, chitosan, diabetes mellitus, chronic wounds

Gleba – środowisko życia wielu organizmów

Małgorzata Kłyś, Natalia Malejky

DOI: 10.24131/3247.170405

Streszczenie:

Gleba pełni bardzo ważną rolę w funkcjonowaniu wielu ekosystemów. W glebie zachodzą procesy rozkładu martwej materii organicznej przy udziale destruentów (bakterii i grzybów). Proces ten jest wspomagany przez wiele innych organizmów, np. dżdżownic, stawonogów. Różnorodność organizmów glebowych jest olbrzymia. Również ich rola jest znacząca w przebiegu procesów glebotwórczych. Od nich także zależy żyzność gleby.

Słowa kluczowe: gleba, destruenci edafon, bioróżnorodność w glebie

otrzymano: 3.01.2018; przyjęto: 20.06.2018; opublikowano: 30.06.2018



dr hab. Małgorzata Kłyś, prof. nadzw.:

Uniwersytet Pedagogiczny im. KEN w Krakowie, Zakład Ekologii i Ochrony Środowiska, Instytut Biologii



mgr Natalia Malejky:

doktorantka w Zakładzie Ekologii i Ochrony Środowiska w Instytucie Biologii Uniwersytetu Pedagogicznego im. KEN w Krakowie

„Cienka warstwa minerałów, żywych mikroorganizmów, martwych roślin i zwierząt okrywających planetę jest matką wszelkiego ziemskiego życia i stanowi dla każdego narodu najbardziej strategiczny zasób”

David R. Montgomery, geolog,
University of Washington (Nature 2010)

Wprowadzenie

Gleba jest zasobem odnawiającym się bardzo powoli, jej uformowanie może zająć setki lat. Składa się ze stałych składników mineralnych i organicznych o różnej granulacji, oraz z powietrza i wody wypełniających przestrzenie i pory w glebie, a także z bytujących w niej organizmów, czyli edafonu. Mineralne cząstki gleby powstałe z rozkruszenia i zwiertzenia skały macierzystej są różnej wielkości. Stopień granulacji gleby decyduje o jej właściwościach fizycznych, urodzajności oraz o jej walorach jako siedliska życia. W glebie wyróżnia się kilka warstw, które różnią się między sobą właściwościami fizycznymi i chemicznymi. Taki układ warstwowy gleby to profil glebowy sięgający od 1,5 do 2 m głębokości. Jest to stała warstwowa struktura gleby. Podstawowe (występujące w większości rodzajów gleb) poziomy profilu to: poziom organiczny do 30 cm, próchniczny, wzbogacenia (inaczej wymywania) i skała macierzysta (Ciesielska i wsp. 1999).

Gleba jest podsystemem w każdym ekosystemie lądowym, takim jak łąka, las, czy pole uprawne. Stanowi biologiczną całość i bardzo dobrze obrazuje złożoność ekosystemu. Jeśli podsystem ten sprawnie funkcjonuje utrzymywana jest jego zasobność w substancje odżywcze, to produktywność ekosystemu jest wysoka.

Każdy ekosystem charakteryzuje się zamkniętym obiegiem materii. Obejmuje on pierwiastki wchodzące w skład związków budujących organizmy, np. związków

węgla, azotu, fosforu. Pierwiastki te krążą w ekosystemie, będąc stale w obiegu. Pobrane z gleby przez producentów, przechodzą do kolejnych konsumentów o coraz to innym sposobie odżywiania się. Obumarłe szczątki wszystkich organizmów i ich odchody wracają do gleby, gdzie podlegają procesom rozkładu przy udziale destruentów (bakterii i grzybów). Proces ten wspomagają inne organizmy np. chrząszcze, wije, mrówki, roztocze, skoczogonki i wiele innych. Uwolnione, w wyniku rozkładu, pierwiastki mogą być ponownie wykorzystane przez producentów (głównie rośliny). W ten sposób obieg materii zamyka się i cykl może zacząć się od nowa. Ponadto energia zmagazynowana w ciałach martwych organizmów jest wykorzystywana przez destruentów i ostatecznie rozpraszana w postaci ciepła podczas procesów przekształcania związków organicznych w proste związki nieorganiczne (Mackenzie i wsp., 2000).

Należy zdawać sobie sprawę z tego, jak ważne w funkcjonowaniu całego ekosystemu są procesy związane z działalnością destruentów. Gdyby procesy rozkładu materii organicznej zostały zatrzymane, zapasy związków pokarmowych w ekosystemach szybko by się wyczerpały i życie na Ziemi przestałoby istnieć. Dlatego gleba nazywana jest fabryką życia. Szacunkowo ¼ gatunków na Ziemi żyje w glebie. Jej robotnicy to mikroorganizmy, grzyby, zwierzęta bezkręgowce, małe ssaki, a nawet korzenie drzew. Ich miejscem pracy jest gleba, zwłaszcza jej wierzchnie warstwy. Gdy dostarczy się im surowców, czyli martwą materię organiczną, rozpoczynają pracę. Organizmy te tworzą bioróżnorodność gleby. Na przykład w łyżeczce ziemi ogrodowej może znajdować się 10 tysięcy gatunków bakterii i grzybów, miliony osobników i setki metrów grzybni. Szacuje się, że obecnie znamy jedynie 1% mikroorganizmów glebowych (Mackenzie i wsp., 2000; UE 2010, Jeffery i wsp., 2010).

Organizmy żyjące w glebie i ich rola

Bakterie to najmniejsze i najliczniejsze organizmy żyjące w glebie. Mogą żyć w warunkach tlenowych i beztlenowych oraz w bardzo różnych temperaturach. Poza tym są odporne na wysuszenie. Duże znaczenie dla żyzności gleby mają bakterie wiążące wolny azot atmosferyczny. A to bakterie korzeniowe z rodzaju *Rhizobium*, żyjąc w glebie, dostają się do korzeni roślin motylkowatych. Tam intensywnie się namnażają, powodując tworzenie się brodawek na korzeniach. Pobierają azot z powietrza i przetwarzają go w azotany (V). Dzięki temu rośliny motylkowate zawierają dużo tych związków oraz białka, stanowią więc wartościowy pokarm dla zwierząt roślinożernych. Znaczne ilości związków azotowych są też uwalniane z obumarłych szczątków tych roślin i wzbogacają glebę w azot. To dlatego rośliny motylkowate stosuje się jako zielony nawóz. Natomiast bakterie otrzymują od roślin substancje organiczne. To przykład symbiozy obligatoryjnej. W glebie martwa materia organiczna i odchody organizmów ulegają rozkładowi. W procesie amonifikacji powstaje amoniak, który przy udziale bakterii nityfikacyjnych np. *Nitrosomonas*, *Nitrobacter* (w procesie nityfikacji) zostaje utleniony do azotanów (III), a następnie do azotanów (V). Z kolei bakterie denityfikacyjne (*Nitrosomonas*, *Pseudomonas*) przeprowadzają proces denityfikacji, zapewniają powrót azotu do atmosfery, biorąc udział w redukcji azotanów (V) do wolnego azotu. Również wolno żyjące bakterie glebowe, np. *Azotobacter*, *Clostridium* wzbogacają glebę w azot pobrany z powietrza. W glebie żyją też inne bakterie, np. siarkowe, żelazowe, wodorowe (Odum, 1977; Richards, 1979).

Proces rozkładu ściółki leśnej rozpoczynają dżdżownice i stawonogi. Dżdżownice spełniają bardzo ważną rolę w glebie. Drażąc swoje korytarze spulchniają glebę, powodują jej napowietrzenie, a wciągając części



Fot. 1. Dżdżownica ziemna *Lumbricus terrestris* L.

Autor: Michael Linnenbach; (Wikimedia Commons; dostęp 01.08.2017).

organiczne w głąb gleby przyczyniają się także do wymieszania ich z jej składnikami mineralnymi. Działalność dżdżownic zwiększa też aktywność mikroorganizmów glebowych (Richards, 1979; Maślak, 2010). W ich przewodzie pokarmowym następuje wymieszanie pobranych resztek organicznych z glebą. Część z nich jest przyswajana w procesie trawienia, a część jest usuwana z przewodu pokarmowego w postaci drobnych gruzełków, które są bogate w substancje mineralne, korzystne dla rozwoju roślin i stosunkowo odporne na działanie wody. Dżdżownica posiada gruczoły wapienne, dzięki którym ma wpływ na regulowanie odczynu (pH) gle-

by, którą przepuszcza przez swój przewód pokarmowy. Gleba wraz ze szczątkami organicznymi po wydaleniu przez dżdżownicę ma odczyn obojętny lub zasadowy, co stwarza idealne warunki dla działalności drobnoustrojów w procesie tworzenia próchnicy. Gleba przerobiona przez te organizmy jest wzbogacona w azot, a więc jest żyzniejsza od gleby, w której ich nie ma. Ponadto dżdżownice mogą wychwytywać z pokarmu i gromadzić w tkankach metale ciężkie takie jak: ołów, kadm, cynk, rtęć. Zmniejszają ich stężenie w glebie, a tym samym w roślinach. To ważne zwłaszcza w miastach i w pobliżu ruchliwych dróg. Bardzo korzystne działanie dżdżownic spowodowało, że podjęto się hodowli tych zwierząt. W Polsce na skalę produkcyjną hoduje się dżdżownicę kompostową, zwaną czerwoną kalifornijską (*Eisenia fetida*) sprowadzoną z Kalifornii. Karmiona jest różnymi odpadkami organicznymi, które przerabia na bogaty w składniki odżywcze nawóz organiczny zwany wermikompostem (biohumusem). Jego skład zależy od pokarmu, którym karmione są dżdżownice (Brzeski i wsp., 2010).

W Polsce występuje ponad 30 gatunków dżdżownic. Są wśród nich gatunki odżywiające się na powierzchni gleby i te żyją w górnej jej warstwie. Druga grupa typowo glebowa to dżdżownice, które żyją w głębi gleby i rzadko wychodzą na powierzchnię. Pośrednie miejsce zajmuje dżdżownica ziemna (*Lumbricus terrestris*) pospolicie zwana rosówką (Fig. 1). Wychodzenie dżdżownic na powierzchnię gleby w wilgotne i chłodne noce po wcześniejszym ciepłym dniu często tłumaczone jest brakiem tlenu w glebie. Jednak prawdopodobnie jest to spowodowane działaniem siarkowodoru wytwarzanego w dzień przez drobnoustroje glebowe przy braku tlenu (Bogdanowicz i wsp., 2004; Brzeski i wsp., 2010).

Podobne, ale mniej znane i znacznie mniejsze od dżdżownic są żyjące w glebie wazonkowce (Enchytraeidae). Najmniejsze gatunki mają długość ciała ok. 2 mm,

a największe 40 mm. Są białawe, żółtawe, rzadziej czerwone albo zielonkawe. Występują powszechnie. Mają dłuższe pierścienie ciała niż dżdżownice i nie mają pigmentacji. W większości występują w górnej warstwie gleby, bo są wrażliwe na niedobór tlenu i wody. Preferują niską temperaturę. Wazonkowce same nie robią korytarzy, wykorzystują gotowe przestwory w glebie. W glebie spełniają podobną rolę jak dżdżownice (Bogdanowicz i wsp., 2004; Błaszak, 2014).

W glebie licznie występują też nicienie (Nematoda). To organizmy o przezroczystym, nitkowatym kształcie ciała. Ich zagęszczenie w glebie może sięgać nawet 100 tysięcy osobników na 1m². Większość nicieni glebowych ma małe, mikroskopijnej wielkości, rozmiary ciała, niektóre osiągają 2 mm długości. Żyją w górnej warstwie gleby 5-10 cm. Jedne żywią się szczątkami roślinnymi, przyczyniając się do ich rozkładu, inne żywią się bakteriami lub są wszystkożerne. Są też wśród nich szkodniki – pasożyty roślin uprawnych, np. mątwik ziemniaczany, burakowy (Ciesielska i wsp., 1999; Boczek, Lewandowski 2016). Jest też nicień *Halicephalobus mephisto* najgłębiej żyjący pod powierzchnią ziemi gatunek spośród organizmów wielokomórkowych. Odkryto go na głębokościach: 0,9 km, 1,3 km i 3,6 km w RPA w 2011 r. w kopalniach złota w paśmie górskim Witwatersrand. W trakcie badania wydobytej rudy złota natrafiono na żywe osobniki tego gatunku. *H. mephisto* ma wielkość ok. 0,5 mm, odżywia się bakteriami, jest odporny na wysoką temperaturę nawet 48°C i brak tlenu. Dotychczas odkryto w tych górach jedynie trzy stanowiska jego występowania (Borgonie i wsp., 2011; Mosher, 2011).

Stonogi i prosiönki to małe skorupiaki o długości ciała od 2 do 20 mm, występujące powszechnie w środowisku glebowym. Można je spotkać schowane pod kamieniami, w ściółce gdzie prowadzą ukryty tryb życia. Stonogi są wrażliwe na wysychanie, giną w wil-

gotności względnej powietrza poniżej 86%. Posiadają przystosowania zabezpieczające je przed utratą wody, np. prowadzą nocny tryb życia, mają zdolność zwijania się w kulę oraz tworzenia skupisk. W dzień kryją się w ściółce i pochłaniają wodę z otoczenia, a nocą żerują. Gdy stonogi tracą wodę wydzielają charakterystyczny zapach, który zachęca je do tworzenia skupień z innymi osobnikami lub znalezienia schronienia. Skorupiaki te odżywiają się martwą materią organiczną roślinną i zwierzęcą. Najczęściej spotykane gatunki to prosiönek szorstki (*Porcellio scaber*) i stonoga murowa (*Oniscus asellus*) (Maślak, 2010).

Wije to kolejne organizmy, o których warto wspomnieć. Żyją w wilgotnych glebach leśnych, w ściółce i pod kamieniami. Mają wymiary ciała od mikroskopijnych do ok. 30 cm długości. Charakterystyczną cechą wijów jest wydłużone, segmentowane ciało, które składa się z dobrze wyodrębnionej głowy i zakończonego telsonem tułowia. Na głowie mają jedną parę czułków, narządy gębowe i oczy. Ich tułów składa się z różnej liczby podobnie zbudowanych segmentów. Każdy z nich, z wyjątkiem telsonu, wyposażony jest w 1 lub 2 pary odnóży. Liczba odnóży u wijów jest zawsze większa niż 6 (Błaszak i wsp., 2012).

Do wijów należą m.in. krocionogi, czyli dwuparce (Diplopoda) i pareczniki (Chilopoda). Spośród nich najczęściej spotykane, stosunkowo łatwe do rozpoznania i zaobserwowania, są odżywiające się głównie martwą materią roślinną saprofagi krocionogi i drapieżne wije drewniaki. Do najpospolitszych krocionogów należy krocionóg krwawoplamy, brunatny i czarny. Krocionogi mają krótkie czułki w porównaniu z parecznikami. Ich ciało okrywa twardy, przesycony solami wapnia oskórek z otworkami (ujściami gruczołów obronnych), przez które wystrzykiwana jest substancja obronna, a zwierzę wtedy zwija się w kłębek. Krocionogi składają jaja do gleby, nawet na głębokości 1,5 m.

Jednym z najczęściej spotykanych jest krocionóg krwawoplamy (*Blaniulus guttulatus*) ma walcowate ciało o zmiennej barwie od białoszarej do szarozółtej, dł. 7,5 do 14 mm. Wzdłuż każdego boku ciała posiada rząd czerwonych plamek. Są to gruczoły wydzielające m. in. benzochinony i estry kwasów tłuszczowych. Krocionóg krwawoplamy jest coraz bardziej związany z człowiekiem i mu towarzyszy. Występuje na plantacjach truskawek, poziomek, ziemniaków, buraków, ogórków, grochu, fasoli i innych roślin. Żeruje na korzeniach, bulwach i owocach tych roślin. Nocą żeruje na nadziemnych częściach siewek, dniem pod powierzchnią gleby. Odnotowywano inwazyjne, masowe pojawianie się krocionogów w Krakowie w 2011 r. i w Lublinie w 2010 r. wokół budynków i w ich piwnicach. Stawonogi te przenoszą bakterie, które mogą wywoływać zapalenie płuc i powodować zaburzenia przewodu pokarmowego. Dotknięcie krocionoga może także spowodować miejscowe zapalenie skóry. Ponadto problemem jest nieprzyjemny zapach, który wydzielają podrażnione krocionogi broniące się przed atakiem. Z kolei inny kosmopolityczny gatunek krocionoga spotykany w szklarniach i w glebie węzłowiec cieplarniany (*Oxidus gracilis*) produkuje cyjanki w celach obronnych (Kasperska, 2013; Kania i Kłapeć, 2012; Kania i wsp., 2016).

Do krocionogów należą też pospolicie spotykane skulice, ich nazwa związana jest z tym, że mogą zwijać się w kulkę. Skulice nie drążą tuneli, przemieszczając się w glebie przesuwają jej cząstki. Odżywiają się martwą materią organiczną.

Inną ważną gromadą wijów są pareczniki zamieszkujące wilgotne środowiska takie jak: gleba, ściółka czy spróchniałe drewno. Unikają miejsc suchych i zalewanych wodą, bo ich oskórek jest przepuszczalny dla wody. Pareczniki mają 1 parę odnóży na każdym segmencie i długie, wieloczłonowe czułki. Ostatnia para odnóży jest zwykle wydłużona i służy jako organ doty-

ku lub obrony. Natomiast pierwsza para odnóży to duże szczękonoża zaopatrzone w gruczoły jadowe, których wydzielina służy do paraliżowania ofiar. Szczękonoża służą także do chwytania i zjadania zdobyczy. Pareczniki są drapieżnikami. Ich przedstawiciele to pospolite u nas zieminki (*Geophilus*). Kilka gatunków, między innymi *Geophilus electricus*, ma zdolność świecenia. Zaniepokojony wydziela z gruczołów epidermalnych luminescencyjną substancję, która pełni funkcje obronne. Zieminki mają ciało bardzo wydłużone, które może liczyć aż 180 segmentów. Mają krótkie nogi i poruszają się w charakterystyczny, węzowaty sposób. Innym parecznikiem jest wij drewniak (*Lithobius forficatus*) (Fot. 2). Ma ciało barwy kasztanowobrązowej o długości od 18 do 30 mm złożone z kilkunastu segmentów. Głowa drewniaka zaopatrzona jest w parę wieloczłonowych, długich czułków. Jest drapieżnikiem. Poluje na małe owady, dżdżownice, czy nagie ślimaki. Jest gatunkiem synantropijnym (Maślak, 2010; Błaszak, 2012).

Oprócz wspomnianych już dżdżownic, wazonkowców, nicieni, stonóg i wijów w glebie żyje bardzo różnorodna i liczna fauna owadów i pajęczaków. Najliczniej w glebie występują owady bezskrzydłe skoczogonki (*Collembola*). Ich zagęszczenie może sięgać 10 tysięcy osobników na 1m². Ich rola w glebie to rozdrabnianie szczątków organicznych, i przemieszczanie ich do głębszych warstw, gdzie ulegają dalszym etapom rozkładu (Cielsińska i wsp., 1999).

Chrzążce (*Coleoptera*) występują w glebie w postaci dojrzałej i larwalnej, np. kusakowate, biegaczowate, czy żukowate. W glebie często też dochodzi do przeobrażenia larw chrząszczy w poczwarki. Pospolite w naszych lasach są żuki gnojowe (*Geotrupes stercorarius*), chrząszcze z rodziny gnojarszowatych (*Geotrupidae*), przyczyniają się do użyczenia gleby zakopując w niej odchody zwierząt bądź ściółkę. Wykazują troskę o potomstwo zarówno samiec, jak i samica kopią pionowy



Fot. 2. Wij drewniak *Lithobius forficatus* L.

Author: Palica, (Wikimedia Commons; dostęp 01. 08. 2017).

korytarz o długości 50, a nawet ponad 100 cm, a następnie boczne krótsze jego odgałęzienia, które są zakończone komorami gniazdowymi. Chrzążce zapelniają je odchodami, a następnie samice składają w nich jaja. Z jaj wylęgają się larwy odżywiające się zgromadzonymi odchodami (Sandner, 1990).

Larwy chrząszczy z rodziny sprężykowatych (*Elatecidae*) zimują w glebie i próchniejącym drewnie. Mają gładkie ciało pokryte twardym oskórkiem, są w miarę sztywne i stąd ich nazwa drutowce. Larwy są drapieżne, saprofagiczne lub rzadziej roślinożerne, są szkodnikami np. ziemniaka, marchewki. Chrzążce mają wydłużone i zwężone na obu końcach ciało (Fot. 3). Na przedtułowi posiadają wyrostek wchodzący w zagłębienie na śródtułowiu. Gdy położymy chrząszcza na stronie grzbietowej wygina przedtułów ku dołowi, wtedy wyrostek uderza o zagłębienie na śródtułowiu, powoduje to odrzut ciała do góry i dzięki temu chrząszcz obraca się i spada na odnóża (stąd nazwa sprężykowate). Ten ruch powoduje charakterystyczny dźwięk podobny do pstryknięcia palcami (Biej-Bijenko, 1976).



Fot. 3. Osiewnik rolowiec *Agriotes lineatus* L.

Autor: Anevrisme, (Wikimedia Commons; dostęp 02. 08. 2017).

W środowisku glebowym pod opadłymi liśćmi, w spróchniałym drewnie, w mrowiskach licznie występują chrząszcze piórkoskrzydłe (*Ptiliidae*). Są to najmniejsze ze znanych chrząszczy, o długości ciała od 0,4 do 1,2 mm. Ich nazwa związana jest z budową drugiej pary skrzydeł, które przy brzegach są pokryte długimi włoskami i potrójnie się składają przy chowaniu pod skrzydła pokrywowe (Sandner, 1990; Bogdanowicz i wsp., 2004).

W glebie żyją także liczne larwy muchówek (*Diptera*). Są wśród nich gatunki żywiące się martwymi szczątkami roślinnymi i zwierzęcymi, odchodami innych zwierząt oraz formy drapieżne. Dlatego ich udział w rozdrabnianiu i przetwarzaniu materii organicznej jest bardzo ważny.

Mówiąc o życiu w glebie nie sposób nie wspomnieć o mrówkach żyjących na powierzchni ściółki i w glebie (Fot. 4). Zwykle ich kopiec widoczny na powierzchni ziemi to tylko fragment mrowiska. Jego większa część znajduje się pod ziemią. Głębokie podziemne gniazda nawet na głębokości 4 metrów budują mrówki *Messor*

aciculatus żyjące w Japonii. Mrówki są owadami społecznymi o strukturze hierarchicznej i ściśle podzielonych obowiązkach. Robotnice budują gniazdo, bronią go, opiekują się potomstwem i królową, zbierają i dostarczają pożywienie. Robotnice, które mają bardzo silne żuwaczki i wielkie głowy nazywają się żołnierzami. Królowa mrówek nieustannie składa jaja i reguluje działania społeczności mrówek za pomocą feromonów. Samce zapładniają królową, po czym giną. W jednym mrowisku może żyć wiele królowych rzadziej jedna. Samce i samice prawie u wszystkich gatunków są skrzydlate, robotnice bezskrzydłe. Liczba mieszkańców mrowiska może dochodzić do kilkuset tysięcy. Cały czas pracując, mieszają glebę, spulchniają ją i wzbogacają w składniki odżywcze. Żywią się pokarmem roślinnym i zwierzęcym. Dla człowieka są pożyteczne, bo niszczą larwy wielu gatunków szkodników, zwłaszcza w lasach (Wilson, 1979).

Ważną rolę w procesach glebowych odgrywają drobne pajączaki roztocze (Acari) występujące w glebach w ogromnej ilości. Są najliczniejszymi zwierzętami żyjącymi w glebie. Ich liczebność to setki tysięcy w 1 m² gleby. Zwłaszcza roztocze opancerzone. Panczyk zapewnia im odporność na zmiany wilgotności, dlatego mogą występować nawet w dość suchej ściółce i glebie. Poza tym są ruchliwe i roznoszą bakterie i grzyby, a to przyczynia się do szybszego rozkładu ściółki (Richards, 1979; Skubała, 2002).

W glebie żyją też większe zwierzęta należące do gromady ssaków: krety, ryjówki, myszy, nornice, karczowniki i polniki. Kret europejski (*Talpa europaea*) to owadożerny ssak z rzędu ryjówkokształtnych przystosowany do podziemnego życia (Fot. 5). Ma wydłużone, walcowate ciało, pysk o ryjkowatym kształcie zaopatrzony w 44 zęby. Jego uwstecznione oczy o średnicy 1 mm są prawdopodobnie niewrażliwe na światło. Posiada charakterystyczne czarne, gęste i miękkie



Fot. 4. Mrówka rudnica *Formica rufa* L.

Autor: M. Betley, (Wikimedia Commons; dostęp 01. 08. 2017).

futro, a włosy w nim są ustawione pod kątem prostym w stosunku do powierzchni ciała, to ułatwia mu swobodne poruszanie się zarówno do przodu, jak i do tyłu w wąskich korytarzach. Kret ma silne, łopatkowate łapy z mocnymi zagiętymi do tyłu pazurami. Zwłaszcza silne i duże, przystosowane do kopania podziemnych tuneli, są jego łapy przednie o zredukowanych kościach przedramienia. Ponadto ma dobry słuch i węch, dzięki nim lokalizuje pokarm (dżdżownice, larwy owadów, ślimaki). Jego włosy czuciowe na pysku i ogonie są czułe na drgania, dlatego odstraszanie kretów polega na zakładaniu odstraszaczy wibracyjno-akustycznych. Krety spędzają większość życia pod ziemią. Budują podziemne gniazdo wyłożone liśćmi, mchem i suchą trawą, które jest krecią sypialnią i miejscem, w którym samica rodzi i wychowuje młode. Obok niego znajduje się „spizarnia“, w której gromadzi zapas pożywienia na zimę. Są nim żywe, sparaliżowane dżdżownice z umiejętnie nadgryzionym zwojem nerwowym. Kret zimuje w głębszych korytarzach, gdzie gleba nie za-



Fot. 5. Kret europejski *Talpa europaea* L.

Fotografik: Didier Descouens, (Wikimedia Commons; dostęp 01. 08. 2017).

marza, nie zapada w sen zimowy. Krety żyją samotnie, nie tolerują innych kretów na swoim terytorium, stają się wtedy agresywne. Wyjątkiem jest wiosenny okres rui. Kret w ciągu doby ma 3 ośmiogodzinne cykle. W czasie każdego z nich ok. 4 godziny wędruje w korytarzach i żeruje, pozostałe 4 godziny przesypia w gnieździe. Największa aktywność kreta w każdym cyklu występuje we wczesnych godzinach rannych, to dlatego wtedy powstaje najwięcej kretowisk. Obecność kreta jest dokuczliwa zwłaszcza dla właścicieli ogrodów, ale ma duże znaczenie dla funkcjonowania gleby. Krety drążąc korytarze spulchniają i przewietrzają glebę, tam intensywniej zachodzi mieszanie się materii organicznej i mineralnej (Kowalski, 1971; Boczek i wsp., 1980).

Wiele zwierząt korzysta też z podziemnych kryjówek, np. nornica ruda, mysz polna, suseł moręgowany, świstak, wydra europejska, bóbr europejski, borsuk i lis. Nory dają im schronienie przed drapieżnikami, zimą i gorącem. W nich też przechowują swój pokarm.

Podsumowanie

Gleba jest elementem składowym, ważną częścią ekosystemów lądowych. Ma warstwowy układ (profil glebowy), który składa się z poziomów: organicznego, próchniczego, wzbogacenia i ze skały macierzystej. Gleba jest środowiskiem życia wielu organizmów, takich jak: bakterie, grzyby, dżdżownice, wazonkowce, nicienie, stonogi, wiję, skoczogonki, owady i ich larwy, roztocze i wiele innych. W glebie zachodzą procesy rozkładu martwej materii organicznej. Mają one wpływ na jej żyzność i wzrost roślin.

Literatura

- Biej-Bijenko GJ (1979). Zarys entomologii. PWRiL, Warszawa 379ss.
- Błaszak Cz (red) (2012). Zoologia t. 2 cz. 2 Stawonogi. Wyd Nauk PWN, Warszawa, 552ss.
- Błaszak Cz (red) (2014). Zoologia. t. 1 cz. 2 Bezkręgowce. Wyd Nauk PWN, Warszawa, 601-646.
- Boczek J, Brzeski MW, Kropczyńska-Linkiewicz D (1980). Wybrane działy zoologii. PWN Warszawa: 434ss.
- Boczek J, Lewandowski M (2016). Nauka o szkodnikach roślin uprawnych. Wyd. SGGW, Warszawa, 411 ss.
- Bogdanowicz W, Chudzicka E, Pilipiuk I, Skibińska E (2004). Fauna Polski. Wyd. Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warszawa, t. I: 509ss.
- Borgonie G, García-Moyano A, Litthauer D, Bert W, Bester A, Heerden E, Möller C, Erasmus M,
- Onstott TC (2011). Nematoda from the terrestrial deep subsurface of South Africa. *Nature*. 474: 79–82.
- Brzeski MW, Makulec G, Wilk S (1994). Dżdżownice. On-line, dostęp 10.06.2017.
- Ciesielska Z, Marko-Worłowska M, Trzaska R (1999). Szkolny biomonitoring gleby. Centrum Edukacji Ekologicznej Wsi, Krosno: 37ss.
- Fabryka życia. (2010). Dlaczego różnorodność biologiczna gleby jest tak istotna. Luksemburg: Urząd Publikacji Unii Europejskiej.
- Górny M (1975). Zoekologia gleb leśnych. PWRiL, Warszawa.
- Jeffery S, Gardi C, Jones A, Montanarella L, Marmo L, Miko L, Ritz K, Peres G, Römbke J,
- Putten WH (eds.) (2010). European Atlas of Soil Biodiversity. European Commission, Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- Kania G, Kłapeć T (2012). Seasonal activity of millipedes (*Diplopoda*) – their economic and medical significance. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 19: 646–650.
- Kania G, Kowalski R., Pietraś R (2016). Defensive secretions in millipede species of the order Julida (Diplopoda) *Acta Soc Zool Bohem* 80: 17–20.
- Kasperska A (2013). Inwazja krocionogów w Lublinie. Czy jest się czego bać? *Kurier Lubelski*, on-line dostęp 27.07.2017.
- Kowalski K (1971). Ssaki. Zarys teriologii. PWN, Kraków: 641ss.
- Mackenzie A, Ball AS, Virdee SR (2000). Ekologia, Wyd Nauk PWN, Warszawa: 396ss.
- Maślak M (2010). Życie w glebie. Zeszyty Edukacyjne Śląskiego Ogrodu Botanicznego. Wyd. Śląski Ogród Botaniczny, Mikołów: 27ss.
- Montgomery DR (2010). 2020 Visions. *Nature* 463(7): 26-32.
- Mosher D (2011). New “Devil Worm” Is Deepest-Living Animal. *National Geographic*. 2.
- Odum E (1977). Podstawy ekologii. PWRiL, Warszawa: 678ss.
- Richards BN (1979). Wstęp do ekologii gleby. PWN, Warszawa: 326ss.
- Sandner H (1990). Owady. PWN Warszawa: 451ss.
- Skubała P. (2002). Rozwój fauny roztoczy na hałdach, czyli jak przyroda walczy z przemysłem. *Kosmos* 51: 195-204.
- Wilson EO (1979). Społeczeństwa owadów. PWN, Warszawa: 175-212.

Soil – the living environment of many organisms

Małgorzata Kłyś, Natalia Malejky

The soil has very important role in the functioning of the ecosystem. In the soil decomposition of dead organic matter takes place with the participation of destructors (bacteria and fungi). This process supports many other organisms, such as earthworm, arthropods. The diversity of soil organisms is enormous. Also their role is important in the course of soil-creative processes. Soil fertility depends on the organisms living in it.

Key words: soil, destruenci, edafon, soil biodiversity

Znaczenie pszczoły miodnej (*Apis mellifera*) i produktów pszczelich w życiu człowieka

Marcin A. Kruszewski, Monika Naumowicz

DOI: 10.24131/3247.170406

Streszczenie:

Pszczoły miodne (*Apis mellifera*) należą do najpopularniejszych zapylaczy, wytwarzają wiele cennych produktów. Zarówno miód, propolis, pierzga, jad pszczeli wosk jak i mleczko pszczele są często używane w apiterapii. Pszczoły są najlepszymi zapylaczami na całym świecie, istnieje jednak wiele zagrożeń mogących przyczynić się do śmierci rodziny pszczelej. Pszczelarze walczą z wieloma chorobami pszczół: warrozą, zgnilcem amerykańskim, europejskim, nosemozą czy CCD – zespół masowego ginięcia pszczół (*ang.* Colony Collapse Disorder), na które wciąż nie ma skutecznego lekarstwa. W ostatnich latach powstaje bardzo dużo pasiek zlokalizowanych w centrach dużych miast. Pasieki zlokalizowane w miastach są mniej narażone na zatrucia pestycydami. Znaczenie pszczoły miodnej w społeczeństwie znacząco wzrosło na przestrzeni ostatnich dekad.

Słowa kluczowe: pszczoła miodna, zanieczyszczenia środowiska, bioindykator, hotele dla owadów, mleczko pszczele, apiterapia

otrzymano: 23.11.2017; przyjęto: 20.06.2018; opublikowano: 30.06.2018



mgr Marcin A. Kruszewski: Uniwersytet w Białymstoku, Wydział Biologiczno-Chemiczny, Instytut Chemii, Zakład Elektrochemii



dr hab. Monika Naumowicz: Uniwersytet w Białymstoku, Wydział Biologiczno-Chemiczny, Instytut Chemii, Zakład Elektrochemii

Wprowadzenie

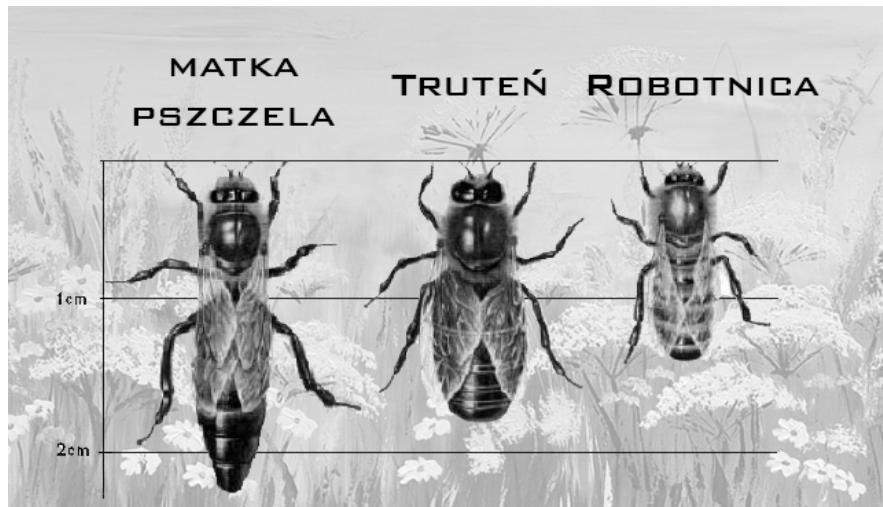
Na przestrzeni milionów lat nastąpiła znaczna ewolucja pszczół. Początkowo żywiły się one wyłącznie pokarmem pochodzenia zwierzęcego, np. mniejszymi owadami, przez co sposobem odżywiania przypominały dzisiejsze osy. W drodze ewolucji pszczoły przystosowały się wyłącznie do pokarmu roślinnego. Ich budowa anatomiczna uległa modyfikacji, w wyniku której wykształciło się wole służące do transportowania pokarmów płynnych oraz koszyczki umożliwiające transport pyłku i propolisu. Zmodyfikowane zostały również zmysły wzroku, smaku oraz powonienia co umożliwiło doskonalsze odszukiwanie i wykorzystanie pożywienia (Michener, 2007).

Od tysiącleci człowiek interesuje się pszczołami i ich produktami. Już w grobowcach faraonów odnajdywano naczynia zawierające miód, będący symbolem władzy i dobrobytu. (Koszowska i wsp., 2013). Zanim hodowcy pszczół wpadli na pomysł ich przesiedlenia z dziupli, w których żyły pierwotnie, do dzisiejszych uli, utrzymywali je w dziuplach starych drzew lub specjalnie wydrążonych drzewach tzw. barciach. Bartnictwo było zawodem dziedzicznym z pokolenia na pokolenie. W średniowiecznej Polsce bartnik musiał oddawać znaczną część produkowanego przez pszczoły miodu i wosku w formie danin. Bartnik był jedynie dzierżawcą dziupli w lesie możnowładcy. Bartnicy od początku zrzeszali się w większe grupy tzw. bractwa bartne. Organizacją zrzeszającą wszystkie bractwa bartne obecne w Polsce była Rzeczpospolita bartna (Żukowski, 1965). Bartnictwa w Królestwie Polskim zakazano w XIX wieku. Do dnia dzisiejszego bartnictwo jest praktykowane we wschodniej części Europy, Baszkirii. Obecnie próbuje się przywrócić tradycyjne bartnictwo również w Polsce dzięki umiejętnościom bartników z Baszkirii (Kucharczak, 2007).

Pszczoły należą do owadów społecznych. W skład rodziny pszczelowej wchodzi zazwyczaj jedna matka pszczela (rys. 1), pewna ilość trutni – samców pszczół oraz przeważająca ilość robotnic. Jediną rolą trutni jest zapłodnienie młodej matki. Trutnie nie posiadają żądeł i nie pełnią żadnych funkcji społecznych w ulu, nie zbierają pyłku ani nektaru. Jesienią są usuwane i wypędzane z rodzin przez robotnice. Pszczoły robotnice pełnią w zależności od wieku i danej sytuacji w ulu szereg różnych czynności (Tab. 1). Młode opiekują się larwami, a następnie pełnią rolę woszczarek – pszczół odpowiedzialnych za „wypacanie” wosku niezbędnego do budowy plastrów. Kolejnym ich zadaniem jest zbieranie pyłku i nektaru, obrona i czyszczenie ula. Narządy rozrodcze robotnic uległy uwsteczniению, a ich rozwój regulują feromony wydzielane przez matkę pszczelą. Kiedy matka ginie, pszczoły mogą wyhodować nową z jaj złożonych jeszcze przez starą matkę. Zazwyczaj pszczoły zakładają kilka lub kilkanaście mateczników – komórek, w których rozwiną się młode matki. Niepowodzenie może jednak spowodować, że u robotnic ulegną aktywacji jajniki i zaczną one składać jaja. Jaja te są niezapłodnione i rozwijają się z nich jedynie trutnie. Zjawisko takie prowadzi do wyginięcia kolonii pszczelej. Pszczoły mogą również zmusić matkę do składania jaj w matecznikach w momencie braku nektaru, pyłku, przegrzania lub braku miejsca w ulu. Z chwilą opuszczenia przez pierwszą matkę matecznika część pszczół wraz ze starą matką opuszcza ul i udaje się w poszukiwaniu nowego miejsca. A młoda matka zaczyna walkę z pozostałymi w ulu młodymi matkami (Ostrowska, 1985; Winston, 1987).

Produkty pszczele

Rozwój cywilizacji miał wpływ na rozwój pszczelarstwa. Na przestrzeni stuleci człowiek nauczył się



Rys. 1. Szkic matki pszczelej, trutnia i robotnicy (Wolarski, 1997)

kierować rozwojem rodziny pszczelej i wykorzystywać produkty pszczele do swoich celów. Do produktów pszczelich należą: miód, propolis, pyłek, pierzga, wosk czy najmniej znane mleczko pszczele (Kalinowski, 1985).

Miód

Najbardziej znanym produktem pochodzącym z ula jest miód (Ferreira, 2009). Pszczoły wytwarzają miód zbierając nektar lub spadź będącą wydzieliną mszyc. Głównymi składnikami miodu są cukry, a także kwasy organiczne, alkohole terpenowe, aminokwasy, flawonoidy oraz cała gama innych związków chemicznych (Krell, 1996). Obecność w miodzie naturalnie występujących cukrów powoduje jego krystalizację. W ostatnich latach nastawienie na zdrową żywność powoduje, iż pszczelarstwo i produkty pszczele przeżywają prawdziwy renesans. Miód posiada dwa prekursorzy: nektar oraz spadź. Nektar to słodka wydzielina nektarników

kwiatów mająca zachęcić owady do zapylania. Spadź natomiast jest wydzieliną owadów roślinożernych. Istnieją dwie odmiany spadzi: spadź liściasta pojawiająca się od połowy kwietnia do późnego lata oraz spadź iglasta występująca od połowy sierpnia do połowy października na drzewach iglastych. Do wystąpienia intensywnego wydzielania spadzi niezbędne są odpowiednie ilości kolonii mszyc. Zarówno spadź, jak i nektar, zbierane przez pszczoły, nasycone są enzymami pochodzącymi z ich śliny. Enzymy te np. inwertaza umożliwiają przekształcenia cukrów złożonych w łatwiej przyswajalne cukry proste (Isidorov, 2013).

Propolis

Kolejnym produktem pozyskiwanym przez pszczele jest propolis. Propolis zwany kitem pszczelim to specyficzna substancja pochodzenia żywicznego zbierana przez pszczoły najczęściej z pączków pospolitych drzew takich jak topole, brzozy, sosny, olchy, a także

Ten czarny pasek jest niepotrzebny	
Wiek robotnicy (dni)	Pełnione zadania
1-4	pielęgnacja komórek plastrów
4-8	karmienie larw
8-15	pierwszy oblot, budowa plastrów, ubijanie pyłku, przyjmowanie nektaru, zasklepianie komórek z czerwiem i miodem
21-38	obrona ula, zbieranie nektaru

Tab. 1. Zestawienie funkcji pełnionych przez robotnice w zależności od wieku (Ostrowska, 1985).

Grupa związków	Przykłady
Miód (Isidorow i wsp., 2015)	
cukry	glukoza, fuktoza, maltoza
fenolokwasy	kwas benzoesowy, kwas p-kumaryowy, kwas kawowy
flawonoidy	luteolina, chryzyna, katechina
kwasy alifatyczne	linolenowy, oleinowy
inne związki	alkohole alifatyczne, estry, alkany, tymol
Propolis (Isidorow i wsp., 2014)	
fenylopropenoidy	kwasy cynamonowy, kwas kawowy, kwas izoferulowy
seskwiterpenoidy	birkenal
flawonoidy i chalkony	pinocembryna, chryzyna, pinobanksyna, kemferol
triprenoidy	dipterokarpol
inne związki	kwasy aromatyczne, alkohole alifatyczne, kwasy alifatyczne
Mleczko pszczele (Isidorow i wsp., 2012)	
cukry	β -glukopiranoza, α -fruktofuranosa
fenolokwasy	kwasy p-kumaryny, kwas kawowy
kwasy nieorganiczne	kwasy solne
inne związki	kwasy dikarboksylowe, fenylopropenoidy

Tab. 2. Skład chemiczny wybranych produktów pszczelich



Rys. 2. Świeży propolis (zdj. autora)



Rys. 3. Plastry wosku (zdj. autora)



Rys. 4. Świeżo zebrany pyłek (zdj. autora)

rzadziej z takich jak kasztanowiec czy wiąz. Produkt ten charakteryzuje się silnymi właściwościami antybiotycznymi i przeciwwzapalnymi. Rodzina pszczela używa go do zabezpieczania i uszczelniania gniazda. Od bardzo dawna ekstrakty propolisu stosowane są w medycynie ludowej do leczenia trudno gojących się ran, czy bólów głowy (Socha i wsp., 2016).

Wosk

Wosk (Rys. 3) wytwarzany przez pszczoły robotnice w procesie „wypacania” płytek wosku służy do budowy gniazda oraz zabezpieczania dojrzałego miodu. Z chemicznego punktu widzenia wosk jest mieszaniną kwasów organicznych (np. kwasu palmitynowego, kwasu cerotynowego, melisowego czy miryrcylowego) oraz innych pochodnych węglowodorów takich jak np. estry kwasu octowego czy walerianowego. W zależności od wieku plastry znajdujące się w gnieździe pszczelim posiadają barwę od białej do ciemnobrązowej. Zmiana koloru plastrów wynika z wieku oraz ilości oprzędu, który

pozostał w plastrach po kolejnych pokoleniach pszczół. Od starożytności ludzie wykorzystują wosk jako źródło paliwa w świecach (Isidorov, 2013).

Pyłek

Roślinom do zapylenia potrzebne jest przeniesienie ziarna pyłku na znamię słupka. Pszczoły zbierając pyłek zapylają rośliny. Zapylenie roślin przez pszczoły na całym świecie przynosi gospodarce światowej niewyobrażalne zyski. Zyski te są o wiele większe niż wartość miodu, który sprzedają pszczelarze. Pszczoły są zapylaczami większości gatunków roślin na świecie. To właśnie dzięki pszczołom możliwa jest produkcja żywności mogącej zaspokoić potrzeby ludzkości. Pszczoły zbierają pyłek formując tzw. obnóża pyłkowe na tylnej parze nóg zaopatrzonej w koszyk (Rys. 4). Powstałe w wyniku mieszania pyłku ze śliną obnóża przenoszone są przez pszczołę do ula gdzie składane są w komórkach plastra. Zmagazynowany w plastrze pyłek ulega przekształceniom w pierzge (Habryka, 2016).

Pierzga

Pierzga (Rys. 5) jest to pyłek roślin umieszczony oraz ubity w komórkach plastra, poddany procesowi fermentacji mlekowej. W temperaturze wnętrza ula



Rys. 5. Pierzga pszczoła w komórkach plastra (zdj. autora)

pod wpływem bakterii mlekowych ulega fermentacji, powstały w ten sposób kwas mlekowy o stężeniu około 3-3,5% dodatkowo konserwuje pierzge. Produkt ten posiada charakterystyczny kwaskowy smak. Stanowi ona podstawowe źródło białka w diecie larw pszczelich, z tego powodu magazynowana jest w miejscach składania jaj przez matkę pszczelą. W pierzdze znajdują się liczne makro- i mikroelementy a także witaminy z grupy B oraz rozpuszczalne w tłuszczach witaminy E, D i K (Habryka, 2016).

Jad pszczeli

W medycynie tradycyjnej wydzielina gruczołów jadowych pszczoły miodnej była od pokoleń cennym lekiem w chorobie reumatoidalnej stawów. Jad pszczeli służy pszczołom do samoobrony oraz ochrony gniazda. Budowa anatomiczna żądła pszczelego powoduje, iż wbite w skórę żądło nie może zostać usunięte i odrywane jest wraz z fragmentem odwłoka powodując śmierć owada. Głównym składnikiem jadu pszczelego jest polipeptyd melityna. Związek ten jest zbudowany z dwudziestu sześciu aminokwasów amfipatycznych. Wykazuje szerokie działanie antybakteryjne: zarówno przeciw bakteriom gram dodatnim jak i gram ujemnym. Białko te jest inhibitorem wirusa mozaiki tytoniowej oraz wirusa opryszczki. Aktywność przeciwwirusową melityny przypisuje się zdolnościom do rozkładu otoczki lipoproteinowej wirusów (Strycharcz-Żak i Piekarska, 2014). W ciągu ostatnich kilkunastu lat prowadzi się intensywne badania nad wykorzystaniem melityny w walce z wirusem HIV (Wachinger i wsp., 1998). Wirus ten należy do retrowirusów i powoduje zespół nabytego niedoboru odporności AIDS (chorobę nazywaną dżumą XX wieku). Mimo wielu lat badań do dzisiejszego dnia nie udało się odnaleźć skutecznego leku. Możliwe jest jedynie stosowanie środków wzmacniających odporność i utrud-

niających rozprzestrzenianie się wirusa (Gelderblom i wsp., 1987).

Mleczko pszczele

Najmniej znanym, ale jak niezwykle cennym produktem pszczelim jest mleczko pszczele. Jest ono wydzieliną gruczołów gardzieliowych pszczół robotnic, barwy biało-żółtej (Lecker i wsp., 1982). Przez całe życie mleczkiem karmiona jest matka pszczela. Larwy pszczół robotnic oraz trutni są również karmione mleczkiem, ale jedynie przez okres 3-4 dni. Skład mleczka pszczelego to w głównej mierze woda, lipidy, kwas organiczne, proteiny oraz cukry (Tab. 2). W składzie mleczka pszczelego znajdują się również substancje o charakterze antyoksydacyjnym (Jamnik i wsp., 2007, Anatineli i wsp., 2003). Mleczko pszczele na skalę przemysłową pozyskuje się z 3-4 dniowych mateczników (komórek, z których rozwiną się młode matki pszczele). Będąca w takiej komórce larwa dosłownie pływa w mleczku, a ilość mleczka wynosi około 235 mg (Genci i Aslan, 1999). Dostępne handlowo mleczko pszczele najczęściej poddawane jest procesowi liofilizacji czyli suszenia sublimacyjnego. Zabezpieczone w ten sposób może być przechowywane przez dłuższy czas nie tracąc właściwości leczniczych (Nagai i wsp., 2006).

Pszczoły jako indykator zanieczyszczeń środowiska

Bioindykatory to organizmy o wąskim zakresie tolerancji zwane stenobiontami. Osobniki te najczęściej wykorzystuje się do określenia zanieczyszczeń: powietrza – porosty, wód i ryby i larwy niektórych owadów, gleb – rośliny (Tonelli, 1990). Pszczoły mogą być doskonałym bioindykatorem, ponieważ mogą wskazywać na zanieczyszczenie środowiska w dwojaki sposób: poprzez wzmogoną śmiertelność owadów oznaczającą

zanieczyszczenie pestycydami oraz zanieczyszczenie produktów pszczelich metalami ciężkimi, radionuklidami czy pozostałościami środków ochrony roślin. O ile większa śmiertelność owadów może być obserwowana gołym okiem, o tyle zanieczyszczenie produktów pszczelich wymaga zastosowania metod laboratoryjnych. Istnieje szereg czynników morfologicznych charakteryzujących pszczołę miodną jako bioindykator: jest powszechnie występującym gatunkiem, łatwym w utrzymaniu i hodowli, jej ciało pokryte jest włoskami zapewniającymi utrzymanie trwałego kontaktu z substancjami, z którymi styka się owad (Porrini i wsp., 2003). Badania dowodzą, że pszczoła miodna może być z powodzeniem wykorzystana jako bioindykator. Pszczoły są bardzo wrażliwe na pestycydy - martwe pszczoły zbierane przed ułem są najważniejszą zmianą, którą należy analizować w przypadku porażenia pestycydem. Wpływ na liczbę martwych pszczół ma kilka czynników: odległość ula od miejsca zastosowania substancji, obecności wiatru i jego siły oraz toksyczność danego pestycydu. Liczba martwych pszczół, jaka może być znaleziona przed ułem, maleje wraz ze wzrostem odległości od miejsca, w którym zastosowano czynnik. Silniejszy pestycyd spowoduje, iż większość pszczół zginie dalej od ula. Wiatr może wzmacniać działanie substancji czynnej poprzez osłabienie pszczół w locie, a tym samym zwiększenie ich podatności. W trakcie kwitnienia roślin zanieczyszczeniu mogą ulec zarówno pyłek jak i nektar zbierany przez pszczoły, w ten sposób zanieczyszczenia przedostają się do produktów pszczelich. Niektóre nowe substancje czynne, obecne w środkach ochrony roślin, nie są bezpośrednią przyczyną śmierci owadów, mogą natomiast powodować ostre zatrucia nawet w małych dawkach. Najbardziej narażone na zanieczyszczenia są zbieraczki, ponieważ to one w pierwszej kolejności mają styczność z pestycydami i to właśnie w ich organizmach następuje wstępne

oczyszczanie zebranych produktów z zanieczyszczeń (Łozowicka, 2008).

Radioaktywne izotopy

Po katastrofie w Czarnobylu, przeprowadzono na Uniwersytecie Bolońskim analizę pozostałości pierwiastków promieniotwórczych w produktach pszczelich. Zbierano do analizy próbki miodu od maja do października 1986 roku, pochodzące z różnych regionów Włoch. We wszystkich próbkach miodu zauważono znaczące podwyższenie poziomu pierwiastków radioaktywnych takich jak: ^{131}I , ^{103}Ru , ^{137}Cs , ^{134}Cs . Najwyższe stężenie zaobserwowano 10 maja 1986 roku. Ze względu na krótki okres półtrwania jodu, wynoszący osiem dni, nie wykryto go już w czerwcu. Pozostałości rutenu były jeszcze wykrywane pod koniec sierpnia. Z tego względu produkty pszczele mogą być wykorzystywane jako praktyczne próbki stosowane do oceny radioaktywności w środowisku. Monitoring skażeń radioaktywnych przy pomocy pszczół wykazuje szczególne znaczenie ze względu na stosunkowo nieduży obszar penetracji terenu przez owady (2-3 km). Obecność izotopów promieniotwórczych w rejonie pozbawionym przemysłu świadczy o wysokim stopniu zanieczyszczenia środowiska (Tonelli, 1990).

Metale ciężkie

Metale takie jak kadm, ołów, czy rtęć mogą być przyczyną ostrych i przewlekłych zatruc organizmów zwierząt i ludzi. Metale te mają zdolność kumulacji w organizmie i mogą działać karcynogennie, dlatego tak niesamowicie ważny jest monitoring żywności, która trafia do spożycia. Pierwiastki te mogą występować naturalnie w środowisku, pojawiać się w wyniku klęsk żywiołowych lub być skutkiem działalności człowieka. Metale te mogą przedostawać się z gleby do nektarników roślin zapylanych przez pszczoły. Badania prze-

prowadzone przez Leita i wsp. (1996) dowodzą, iż w rejonach z wysoką ekspozycją metali ciężkich zawartość tych pierwiastków w ciele owadów jest podwyższona, co wskazuje na usuwanie części zanieczyszczeń przez pszczoły zanim złożą nektar w komórkach plastra.

Apiterapia

Od początków dziejów ludzkości człowiek wykorzystuje naturalne substancje w celu leczenia i zapobiegania różnym dolegliwościom. Jedną z dziedzin medycyny naturalnej jest apiterapia (łac. *Apis* – pszczoła), czyli terapia produktami pszczelimi. Już w opisach biblijnych raj był krainą „mlekiem i miodem płynącą” – miód był symbolem bogactwa i dostojności. Badania opisywane w publikacji Ahuja i Ahuja (2010) wykazują mniejsze ryzyko infekcji oraz zmniejszenie bólu i obrzęku występujących po chirurgicznym usunięciu zębów jeżeli w ranie przed zaszcyciem umieszczono niewielką ilość miodu (Ahuja i Ahuja, 2010; Gendrolis i wsp., 2004). Cukierki miodowe mogą być również użytecznym lekiem w walce z halitozą, co jest związane z właściwościami antybakteryjnymi miodu. Bakterie wykorzystując zawartą w miodzie glukozę do procesów życiowych pozostawiają aminokwasy, z których powstaje kwas mlekowy – niwelujący nieprzyjemny zapach amin i związków siarki (Molan, 2001).

Zagrożenia pszczół

Warroza

Nieustanny rozwój cywilizacji wpłynął niekorzystnie również na pszczoły. Istnieje wiele zagrożeń czyhających na te pożyteczne owady. Głównym problemem, z którym zmagają się pszczoły i człowiek od lat 60. XX w. są roztocza z gatunku *Varroa destructor*. Pasożyt żeruje na pszczole odżywiając się jej hemolimfą. Istnieje

szereg metod walki z roztoczami, niestety ciągle brakuje w pełni skutecznego leku. Nielezione rodziny bardzo często skazane są na zagładę, a choroba jest główną przyczyną giniecia rodzin w trakcie zimy (Rosenkranz i wsp., 2010).

CCD

Choroba ta nie ma ustalonej etiologii, a w Polsce nazywana jest jako zespół masowego giniecia pszczół. Cechuje się nagłym osłabieniem rodziny, pomimo obecności odpowiedniej ilości pyłku i nektaru. Opisywane są przypadki, kiedy z silnych rodzin w ulu pozostaje jedynie matka i niewielka ilość pszczół, z tym że możliwość wyrojenia oraz wytrucia pszczół została wyeliminowana (Gliński i Kostro, 2007).

Nosemoza

Nosemoza jest chorobą pszczół wywołowaną przez mikrosporydia *Nosema apis* i *Nosema ceranae*, jednokomórkowe organizmy zaliczanych do protistów. Choroba atakuje pszczoły w wyniku przedostawania się przetrwalników do jelita owadów, w którym zachodzi rozkład, przez soki trawienne, otoczki ochronnej. Rozwój pasożytów następuje w przewodzie pokarmowym i z przewodu pokarmowego wydalone są kolejne pokolenia przetrwalników. Najbardziej narażone na porażenie tą chorobą są pszczoły wiosną, kiedy nie mogą wypróżnić się na zewnątrz ula, w ten sposób dochodzi do ciągłego zarażania nowych pokoleń pszczół. Latem zainfekowane pszczoły nie wracają do ula. Do zakażenia mikrosporydiami może dojść poprzez niezachowanie właściwej higieny w pasiece, rabujące i błędzące pszczoły, podanie zakażonego miodu, pierzgi czy plastrów z chorych rodzin (Higes i wsp., 2006).

Zgnilec amerykański i europejski

Zgnilec amerykański i europejski to choroby czerwiu pszczelego. Choroby te wywołują odpowiednio *Paenibacillus larvae* oraz *Melissococcus plutonius*, obie choroby mają podłoże bakteryjne. Zgnilec dotyczy jedynie czerwiu i jest trudny do wyleczenia, ponieważ przetrwalniki wytrzymują nawet bardzo wysokie temperatury oraz działanie substancji chemicznych. Przetrwalniki znajdują się również w wolu pokarmowym dorosłych pszczół, więc do porażenia dochodzi w trakcie karmienia młodych larw. Symptomy choroby są bardzo charakterystyczne: dochodzi do zamierania czerwiu objawiającego się dziurkami w zasklepach, zmarłe larwy mają brązowo-brunatną barwę i zapach palonego rogu, a zawartość komórki jest ciągnąca się. W przypadku zgnilca amerykańskiego po wyjęciu larwy z komórki na dnie pozostaje twardy strup, inaczej niż w przypadku zgnilca europejskiego (Frosgren, 2010; Spivak i Reuter, 2001).

Na marginesie można dodać, że w terminologii pszczelarzkiej, jak i w dawnej polszczyźnie, słowo „czerw” jest rzeczownikiem zbiorowym (jak np. „tłum”) i dlatego w dopełniaczu występuje forma „czerwiu” (tak jak „tłumu”).

Odpowiednie „napszczenie” terenu

Lokalizacja i ilość pasiek w danym terenie jest niezwykle ważna w produkcji rolniczej. Już od wielu lat na całym świecie pszczelarze prowadzą gospodarkę wędrowną, w której przemieszczają całe pasieki w miejsca występowania konkretnych pożytków. Zapewnia to pszczelarzom odpowiednie korzyści wynikające ze zwiększonej ilości pozyskanego miodu, rolnikom zapewniając jednocześnie większe plony. Sytuacja w Polsce pod względem liczby rodzin jest zróżnicowana. Najwięcej rodzin pszczelich znajduje się w województwach:

Lubelskim, Warmińsko-Mazurskim, Podkarpackim i Wielkopolskim, najmniej zaś w Podlaskim, Opolskim i Łódzkim. W Polsce średnie napszczenie (liczba rodzin pszczelich przypadająca na 1 km² powierzchni) terenu wynosi około 3,5. W krajach takich jak Czechy, Grecja czy Słowenia liczba ta jest ponad dwukrotnie wyższa. Przez wiele lat pszczelarstwo było domeną ludzi będących już na emeryturze i mieszkających na wsi (Semkiw i wsp., 2007). Zmiany gospodarcze i ustrojowe na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat przyczyniły się do poprawy funkcjonowania pszczelarstwa w Polsce. Nowoczesne technologie wpłynęły na konstrukcję i wykonanie różnego rodzaju uli i innego sprzętu pasiecznego. Coraz chętniej odchodzi się od tradycyjnych drewnianych i ciężkich uli na rzecz lekkich, poręcznych i łatwych w transporcie uli wykonanych ze styropianu czy pianki poliuretanowej. Produkcja wysokiej jakości sprzętu do obróbki produktów pszczelich przyczynia się do sprzedaży tych produktów na bardzo wysokim poziomie. Przez ostatnie kilkanaście lat powstało bardzo dużo nowych pasiek, zakładanych przez ludzi młodych. Stało się to możliwe dzięki pochodzącym z Unii Europejskiej różnorodnym mechanizmom wsparcia pszczelarzy. W ostatnich latach stworzono wiele pasiek zlokalizowanych w centrach miast, nie tylko w parkach, ale też na dachach hoteli czy innych budynków użyteczności publicznej. Pszczoły żyjące w centrach miast są mniej narażone na zagrożenia ze strony środków ochrony roślin. Zwiększa się również świadomość społeczeństwa dotycząca pożyteczności i zagrożeń dla pszczoły miodnej (Semkiw i wsp., 2007; Semkiw, 2016).

Podsumowanie

Pszczoły należą do naturalnych zapyłaczy, dzięki którym możliwa jest wysokowydajna produkcja roślinna i zwierzęca.

Melityna obecna w jadzie pszczelim może być potencjalnym lekiem w walce z wirusem HIV.

Pszczoły mogą być indykatorem zanieczyszczeń środowiska, mogą wskazywać na zanieczyszczenia metalami ciężkimi, radionuklidami czy środkami ochrony roślin.

Apiterapia należy do naturalnych metod leczenia różnych schorzeń produktami pszczelimi.

Choroby pszczele mogą powodować wyniszczenie populacji rodzin pszczelich w danym terenie.

Napszczenie w Polsce jest zróżnicowane i zależy od regionu Polski, największe napszczenie w skali Europy występuje w Czechach, Grecji i Słowenii.

Coraz więcej młodych osób interesuje się pszczelarstwem i korzyściami płynącymi z różnych produktów pszczelich.

Literatura

- Ahuja A., Ahuja V., (2010). *Apitherapy-A sweet approach to dental diseases-Part I: Honey*. *Advances in Dental Research* 1, 81-86.
- Antinelli J.F., Zeggane S., Davico R., Rognone C., Faucon J.P., Lizzani L., (2003). *Evaluation of (E)-10-hydroxydec-2-enoic acid as a freshness parameter for royal jelly*. *Food Chemistry*, 85-89.
- FAO (1996). *Value-added products from beekeeping*. FOA Agricultural Services Bulletin. Rome, Italy: FAO
- Ferreira I. C.F.R., Aires E., Barreira J. C.M., Estevinho L. M., (2009). *Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract*. *Food Chemistry*, 114, 1438-1443.
- Frosgren E., (2010). *European foulbrood in honey bees*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103, S5-S9.
- Gelderblom H. R., Hausmann E. H.S., Özel M., Georg P., Koch M. A., (1987). *Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins*. *Virology* 156, 171-176.
- Genç M., Aslan A., (1999). *Determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid content in pure royal jelly and royal jelly products by column liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A* 839, 265-268.
- Gendrolis A., Ivanauskas L., Lukosius A., Brusokas V., (2004). *Bee products for treatment of diseases of mouth and upper respiratory*

- tract. *Medicina* 40, 768-770.
- Gliński Z., Kostro K., (2007). *Zespół masowego giniecia pszczół nową groźną chorobą pszczoły miodnej*. *Życie weterynaryjne* 82, 651-653.
- Habryka C., (2016). *Pylek pszczele produktem pracy pszczół*. Bio-produkty-pozyskiwanie, właściwości i zastosowanie w produkcji żywności. Wydział nauk o żywności i żywieniu Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Poznań.
- Higes M., Martin R., Meana A., (2006). *Nosema ceranae, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe*. *Journal of Invertebrate Pathology* 92, 93-95.
- Isidorow W.A., Bakier S., Grzech I., (2012). *Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of volatile and extractable compounds of crude royal jelly*. *Journal of Chromatography B* 885-886, 109-116.
- Isidorow W.A., (2013). *Alchemia pszczół pszczoły i produkty pszczele oczami chemika*. *Gospodarstwo Pasieczne „Sądecki Bartnik”, Stróże*.
- Isidorow W.A., Szczepaniak L., Bakier S., (2014). *Rapid GC/MS determination of botanical precursors of Eurasian propolis*. *Food Chemistry* 142, 101-106.
- Isidorow W.A., Bagan R., Bakier S., Świącicka I., (2015). *Chemical composition and antimicrobial activity of Polish herbboneys*. *Food Chemistry* 171, 84-88.
- Jamnik P., Goranovic D., Raspor P., (2007). *Antioxidative action of royal jelly in the yeast cell*. *Experimental Gerontology* 42, 594-600.
- Kalinowski J., (1985). *abc pszczelarza*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa.
- Koszowska A., Dittfeld A., Nowak J., Ziora K., (2013). *Pszczoły i ich produkty-znaczenie dla zrównoważonego rozwoju roślin, zwierząt, i ludzi*. *Medycyna Środowiska-Environmental Medicine* 16, 79-84.
- Kucharczak P., (2007). *Pszczoły. Reaktywacja*. *Gość Niedzielny* 30, 29.
- Leita L., Muhlbachova G., Cesco S., Barbattini R., Mondini C., (1996). *Investigation of the use of honey bees and honey bee products to assess heavy metals contamination*. *Environmental Monitoring and Assessment* 43, 1-9.
- Lercker G., Capella P., Conte L. S., (1982). *Components of royal jelly: II. The lipid fraction, hydrocarbons and sterols*. *Journal of Apicultural Research* 21, 178-184.
- Łozowicka B., (2008). *Zatrucie pszczół środkami ochrony roślin. Postępy w Ochronie Roślin* 48, 792-797.
- Michener C.D., (2007). *The bees of the world*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.
- Molan P.C., (2001a). *Potential of honey in the treatment of wounds and burns*. *American Journal of Clinical Dermatology* 2, 13-19.
- Nagai, T., Inoue, R., Suzuki, N., Nagashima, T., (2006). *Antioxidant properties of enzymatic hydrolysates from royal jelly*. *Journal of Medicine Food* 9, 363-367.
- Ostrowska W., (1985). *Gospodarka pasieczna*, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa.
- Porrini C., Sabatini A.G., Girotti S., Ghini S., Medrzycki P., Grillenzoni F., Bortolotti L., Gattavecchia E., Celli G., (2003). *Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination*. *Apiacta* 38, 63-70.
- Rosenkranz P., Aumeier P., Ziegelmann B., (2010). *Biology and control of Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103, S96-S119.
- Semkiw P., Gerula D., Węgrzynowicz P., (2007). *Pszczelarstwo w Polsce (część I)*. *Pszczelarstwo*.
- Semkiw P., (2016). *Sektor Pszczelarski w Polsce w 2016 roku*. Instytut Ogrodnictwa
- Zakład Pszczelnictwa w Puławach, Puławy.
- Socha R., Habryka C., Juszcak L. (2016). *Wpływ dodatku propolisu na zawartość wybranych związków polifenolowych oraz aktywność przeciwwuleniującą miodu*. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 5, 127-139.
- Spivak M., Reuter G.S., (2001). *Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies Apis mellifera bred for hygienic behavior*. *Apidologie* 32, 555-565.
- Strycharz-Żak M., Piekarska A., (2014). *Ilościowa ocena HBsAg jako istotny parametr w monitorowaniu przebiegu naturalnego i terapii PZW B*. *Postępy Nauk Medycznych* 11, 776-782.
- Tonelli D., Gattavecchia E., Ghini S., Porrini C., Celli G., Mercuri A. M., (1990). *Honey bees and their products as indicators of environmental radioactive pollution*. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 141, 427-436.
- Wachinger M., Kleinschmidt A., Winder D., Von Pechmann N., Ludvigsen A., Neumann M., Holle R., Salmons B., Erle V., Brack-Werner R., (1998). *Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression*. *Journal of General Virology* 79, 731-740.
- Winston M.L., (1987). *The biology of the honeybee*. Harvard University Press England: London.
- Wolarski W., (1997). *Encyklopedia Britannica – edycja polska*. Wydawnictwo Kurpisz, Przeźmierowo.
- Żukowski R., (1965). *Bartnictwo w zagajnicy łomżyńskiej*. Białostockie Towarzystwo Naukowe, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Białystok.

The importance of honey bees (*Apis mellifera*) and bee products in human life

Marcin A. Kruszewski, Monika Naumowicz

Honey bees (*Apis mellifera*) are natural and most popular pollinators, they produce many valuable products. Honey, propolis, bee venom, wax and royal jelly are often used in apitherapy. Honey bees are the best pollinators around the world, but there are many threats for them. Beekeepers fight with many diseases like varroasis, American foulbrood, European foulbrood, nosemosis, or Colony Collapse Disorder. There are no effective method to fight with that diseases. New trend in big cities are apiaries located on the roofs of buildings. Bees which live in cities are healthy because in parks there is no chemical plant protection. The social awareness about these beneficial insects increases.

Key words: honey bee, environmental pollution, bioindicator, hotel for insects, royal jelly, apitherapy

Poznanie zjawisk fizycznych na ekranie komputera przez uczniów II klasy szkoły podstawowej

Jan Amos Jelinek

DOI: 10.24131/3247.170407

Streszczenie:

Artykuł prezentuje wyniki badań, których celem było ustalenie procesu poznawania przez uczniów klasy II szkoły podstawowej zjawisk fizycznych, w trakcie korzystania z programu komputerowego Socrates103. Przy wykorzystaniu programu rejestrującego, działającego w tle programu edukacyjnego, za pomocą kamery zapisywano zachowanie dzieci przed ekranem oraz dokonano zrzutu z ekranu programu edukacyjnego. Dzięki temu badacz „wchodzi” pomiędzy uczące się dziecko, a sytuację edukacyjną kreowaną przez program edukacyjny. Analiza materiału filmowego ujawnia stosowane przez dzieci strategie radzenia sobie podczas korzystania z programu oraz wyjaśnia przyczyny niskiej skuteczności edukacyjnej programu u badanych dzieci.

Słowa kluczowe: uczenie się przy komputerze, programy multimedialne, program Socrates103, poznanie zjawisk fizycznych, uczniowie II klasy, uczniowie 8-, 9-letni

otrzymano: 14.10.2017; przyjęto: 20.06.2018; opublikowano: 30.06.2018



dr Jan Amos Jelinek: Katedra Pedagogiki Małego Dziecka, Akademia Pedagogiki Specjalnej im. Marii Grzegorzewskiej w Warszawie

Wstęp

Fizyka od początku była traktowana jako nauka wyjaśniająca działanie świata przyrody (z gr. *physis*). Jednakże obecne naukowe wyjaśnienia różnią się od tych, które sformułował Arystoteles tysiące lat wcześniej. Zastosowanie obiektywnej metody naukowej doprowadziło do zbudowania wniosków, które w wielu przypadkach przeczą intuicyjnej ocenie. Innymi słowy **współczesna fizyka obejmuje szereg naukowych wyjaśnień i koncepcji, które często naruszają wewnętrzne zasady fizyki intuicyjnej, bazującej na codziennych doświadczeniach** (McCloskey, 1983; Lelonek, 1984; Vosniadou, 2002). Badania dowodzą, że swobodne obserwacje prowadzonych na co dzień doświadczeń (np. ruchu obiektów po łuku) nie prowadzą do wytworzenia się prawidłowych, naukowych wyjaśnień (McCloskey, 1983).

Proces zdobywania przez dzieci wiedzy o świecie jest stopniowy. Na podstawie codziennych informacji otrzymywanych z otoczenia (rodzice, nauczyciele, media), dzieci tworzą teorie wyjaśniające, podobne funkcją i strukturą do naukowych (Gopnik i Wellman, 1992; Carey, 2007). Mimo, że mają charakter nieświadomy, służą do przewidywania obserwowanych w otoczeniu zjawisk i ujawniają się w sytuacjach spontanicznych, w których dziecko dokonuje szybkiej oceny zjawiska. W takiej sytuacji umysł pobieżnie przeszukuje dostępne w pamięci informacje podobne do obserwo-

wanego zjawiska i na tej podstawie formułuje dane wyjaśnienie.

Ponieważ umysł dzieci różni się od umysłu dorosłych nie tylko zasobem zgromadzonych wiadomości, ale także umiejętnością analizowania dostępnych informacji (por. stadia rozwoju poznawczego Piageta (1993)), opisując dziecięcy sposób postrzegania świata w literaturze rozróżnia się fizyczne teorie naukowe od teorii budowanych przez dzieci, a dotyczących zjawisk fizycznych. Używa się pojęć: *intuicyjna fizyka* (McCloskey, 1983; Proffitt i Kaiser, 2006) i *naiwna fizyka* (Vosniadou, 2002). Opisują one dziecięce doświadczenie jako zbiór uporządkowanych elementów wiedzy, które tworzą w umyśle dzieci skomplikowany system pojęciowy. Ze względu na ograniczone możliwości poznawcze (np. duża przerzutność uwagi, intuicyjny charakter wyciąganych wniosków, brak odwracalności myślenia) dzieci ulegają iluzji procesu spostrzegania (synkretyzm) i w konsekwencji tworzą naiwne teorie (Markowska, Lechowicz i in., 2014).

Biorąc pod uwagę dziecięcy sposób poznawania świata nauczanie przyrody i techniki (*science education*) polega na zastąpieniu błędnych, naiwnych wyobrażeń naukowymi (McCloskey, 1983), przy czym, jak zwraca uwagę diSessa (Smith, diSessa i Rochelle, 1993), celem edukacji nie jest wyłącznie korygowanie błędnych przekonań, ale pobudzanie własnej wiedzy na podstawie gromadzonego doświadczenia.

Zagadnienie, na które zwraca uwagę McCloskey jest istotne z punktu widzenia poznawania świata przyrody przy komputerze. **Komputer jako urządzenie multimedialne pozwala tworzyć świat przestrzenny, a zatem może ułatwiać i wzbogacać proces zdobywania doświadczeń w zakresie wyobrażeń dzieci.** Poprzez odpowiednie prowadzenie eksperymentów, może on także skutecznie zachęcać dzieci do konstruowania swojej wiedzy drogą badania. Pojawia się jed-

NAUKA

SZKOŁA

KRÓTKO

nak pytanie, czy rzeczywiście programy komputerowe np. przedstawiając wizualizację ruchu przedmiotów, sprzyjają nabywaniu naukowych wyobrażeń. Być może zobrazowana trajektoria ruchu obiektu na ekranie nie jest dla dzieci czytelna i nie przenoszą jej one na obiekty w świecie realnym (np. w sytuacji problemowej). W podobny sposób możemy mnożyć pytania odnosząc je do innych zjawisk, jakimi zajmuje się fizyka, np.

- czy bawiąc się na ekranie kolorowymi światłami, dzieci poznają jak działa zjawisko syntezy addytywnej;
- czy budując i wymieniając elementy obwodu elektrycznego, dzieci nabywają umiejętności pozwalające im poza komputerem podłączyć przewody do baterii i żarówki, aby ta zaświeciła się;
- czy obserwując i prowadząc na ekranie komputera doświadczenia na wahadle, dzieci będą wiedziały jakie znaczenie ma ustawienie ciężarka w zegarze wahadłowym;
- czy obserwując spuszczone na równi pochyłej przedmioty, dzieci będą wiedziały, że przedmiot zjedzie dalej w zależności od wysokości równi?

Odpowiedzi na powyższe pytania stały się centralnym punktem przeprowadzonych badań¹. Dostarczyły one podstawowych informacji związanych z procesem uczenia się dzieci, a przy okazji odpowiedziały na pytanie, w jakim stopniu użyty w badaniach program komputerowy przeznaczony do prowadzenia eksperymentów fizycznych na ekranie jest skuteczny – w znaczeniu: korzystanie z niego pozwala nabyć wiedzę, którą można wykorzystywać poza programem.

Koncepcja badawcza

W programie badawczym przyjąłem dwa cele: (1) ustalić jak dzieci poznają zjawiska fizyczne korzystając z edukacyjnego programu multimedialnego *Socrates103* oraz (2) czy potrafią wykorzystać wiedzę zdobytą w programie poza wirtualną rzeczywistością.

Wśród dostępnych na rynku programów pozwalających poznać zjawiska fizyczne można wymienić encyklopedie (np. *Jak to działa*), gry-zabawy (np. *Crazy Machines*) i programy edukacyjne. Do badań wykorzystalem program *Socrates103* należący do ostatniej kategorii, ponieważ pełni on rolę wirtualnej platformy doświadczalnej, która zachęca do przeprowadzania eksperymentów i budowania wniosków. Program ten (wydany w 2012 roku) jest przeznaczony dla dzieci od 7 do 12 r.ż. i otrzymał na rynku polskim nagrody (np. VI edycji konkursu „Świat Przyjazny Dziecku” organizowany przez Komitet Ochrony Praw Dziecka).

Badaniami objąłem jedną klasę szkoły podstawowej, w jednej z podwarszawskich miejscowości. Istotny dla wyników badań może okazać się fakt, że uczniowie tydzień przed rozpoczęciem badań odbyli wycieczkę do Centrum Nauki Kopernik, w którym obejrzeni stali wystawę. W jej trakcie wykonywali doświadczenia posługując się dostępnymi eksponatami. W szkole nie realizuje się programu, który miałby rozszerzać wiedzę dzieci z zakresu przyrody nieożywionej (w tym fizyki).

Badania przeprowadziłem wykorzystując metodę eksperymentu pedagogicznego. Rozpocząłem od przeprowadzenia sprawdzianu wiadomości (pretest) z zakresu ośmiu zjawisk fizycznych (*strumień wody wypływający przez otwór w butelce, równia pochyła, tempo wahaniasię obiektu na sznurku (wahadło), powietrze w dwóch strzykawkach połączonych wężykiem, ważenie obiektów na różnej długości szalach wagi, elektryczny obwód zamknięty, synteza addytywna, woda w naczyniach*

połączonych). Sprawdzian polegał na zademonstrowaniu dzieciom doświadczeń bez ich zakończenia. Pokazując przedmioty użyte w doświadczeniu zatrzymywałem się w chwili, po której dziecko mogłoby zobaczyć wynik doświadczenia. W badaniu prosiłem uczestnika o opisanie tego co zaraz się stanie. Np. ustawiałem na stole butelkę z trzema otworami wykonanymi na różnej wysokości butelki. Przed butelką ustawiałem w szeregu trzy niewielkie pojemniki. Wyjaśniałem, że gdyby butelka była pełna wody, a otwory zamknięte plasteliną, w jednej chwili mógłbym zdjąć grudki plasteliny i woda zaczynała by się wylewać do pojemników. Pytałem o to jak woda będzie przelewać się do pojemników. Dziecko miało zaznaczyć na specjalnie przygotowanej kartce z narysowanym schematycznie doświadczeniem, z którego otworu woda będzie przelewała się i do którego pojemnika będzie trafiała. Tak wyglądało doświadczenie „ciśnienie wody w butelce” (zagadnienie to zostało omówione szerzej poniżej).

Po przeprowadzeniu sprawdzianu podzieliłem losowo zespół klasowy uczniów na dwie grupy. Od tego momentu uczniowie grupy eksperymentalnej (12 dzieci) w parach uczestniczyli w spotkaniach z programem komputerowym *Socrates103*. Każda para zrealizowała po 8 spotkań (żadne z nich nie było limitowane czasowo, średni łączny czas korzystania z programu wyniósł 3,5 godziny). Pierwsze 3 spotkania miały charakter zapoznawczy – każde z dzieci miało do dyspozycji swój komputer z zainstalowanym programem edukacyjnym, poznawało go w dowolny dla siebie sposób. Kolejne dwa spotkania (4 i 5) były rozszerzane o ranking zdobytych w programie punktów. Spotkanie 6 – uczniowie siedząc obok siebie mogli spoglądać wzajemnie na swoje ekrany i uczyć się od siebie nawzajem. Spotkanie 7 – para uczniów musiała korzystać z jednego komputera. Sytuacja ta wymuszała konfrontowanie poglądów odnośnie poznawanych doświadczeń. Ostatnie spotkanie (8)

¹ Projekt badawczy „Jak dzieci poznają zjawiska fizyczne korzystając z programu multimedialnego”, BSTP 5/17-I. Projekt finansowany ze środków Akademii Pedagogiki Specjalnej.

ponownie odbywało się na osobnych komputerach, na których uczniowie nie mogli spoglądać na ekran kolegi z pary.

Aby „wejść” między ucznia korzystającego z komputera i sam ekran komputera zainstalowałem program (BlueBerry FlashBack), który za pomocą kamery rejestrował zachowanie ucznia przed komputerem i jednocześnie nagrywał to co dzieje się na ekranie komputera. W efekcie zebrano 40 godzin materiału filmowego, który stał się podstawą analizy zachowania się dzieci.

W czasie, gdy uczniowie z grupy eksperymentalnej korzystali z komputera uczniowie z grupy kontrolnej (12) nie uczestniczyli w spotkaniach z komputerem. W klasie szkolnej – jak wynika z wywiadu z nauczycielem – w trakcie okresu badań nie omawiano – poruszanych podczas badań zjawisk fizycznych i nie prowadzono doświadczeń. Tak więc – zgodnie z założeniem badawczym – uczniowie z grupy kontrolnej nie poznawali zjawisk fizycznych takich jak uczniowie z grupy eksperymentalnej. Po zakończeniu serii spotkań z grupą eksperymentalną ponownie przeprowadziłem sprawdzian wiadomości (posttest) zarówno w grupie eksperymentalnej, jak i kontrolnej. Dodam, że zarówno na etapie pretestu, jak i posttestu, zastosowano to samo narzędzie.

Wyniki

Analizę wyników badań rozpocznę od przedstawienia procesu rozwiązywania zadań i trudności wynikających z tego procesu.

Strategie podejmowane przez uczniów podczas korzystania z programu Socrates103. Aby uczeń mógł zrozumieć przedstawione na ekranie komputera zjawisko (prawidłowo rozwiązać je na ekranie komputera) musiał: (1) rozpoznać wszystkie dostępne na ekranie elementy, (2) przeczytać treść zadania, (3) przeczytać

możliwe odpowiedzi, (4) zrozumieć treść zadania lub poprosić o pomoc dorosłego, (5) przeprowadzić na ekranie komputera doświadczenia dla poszukania rozwiązania (poznawać zjawisko *in silico*), (6) zaznaczyć odpowiedź, (7) w przypadku zaznaczenia nieprawidłowej odpowiedzi mógł przeczytać zaznaczoną przez program prawidłową odpowiedź. Mimo, że w tym zadaniu nie otrzymał już punktu mógł podjąć wysiłek, aby starać się zrozumieć wyjaśnienie zjawiska podanego w programie.

Jak wykazały obserwacje, na każdym z tych etapów rozwiązania zadania, uczniowie rezygnowali z podejmowania wysiłku. Powodów było wiele, przytoczę jednak te najważniejsze: (a) rozwiązywanie zadań w programie wymagało dobrej umiejętności czytania, która wśród niektórych badanych uczniów nie była wystarczająca; (b) zbyt skomplikowany opis doświadczenia; (c) mało poręczne pokrętki w zadaniach programu lub niewidoczne opcje przeprowadzenia doświadczenia; (d) nieczytelne zadania, np. w niektórych doświadczeniach brakowało odniesienia (np. innego zestawu przedmiotów), które ułatwiłoby dostrzeganie zmian zachodzących w doświadczeniu (np. w zadaniu „wahadło”, uczeń musiał ocenić bardzo niewielką różnicę w tempie wychylania się wahadła, w zależności do ustawionego ciężaru).

Uczniowie, natrafiając na trudności stosowali własne strategie. Przechodzili na (1) rozwiązywanie zadań metodą prób i błędów – zamiast podjąć się zrozumienia zadania, (2) uciekali, gdy wydawało im się, że zadanie jest zbyt skomplikowane, a także (3) uczyli się odpowiedzi w programie na pamięć, aby następnym razem zdobyć więcej punktów. Te wymienione strategie były odmienne od strategii autorskich programu i stosowali je wszyscy uczniowie za wyjątkiem Łukasza. Chłopiec ten jako jedyny przez wszystkie spotkania nie zastosował ani razu metody prób i błędów. Ilekroć popełnił błąd (w sumie 61 razy) zamiast przejść

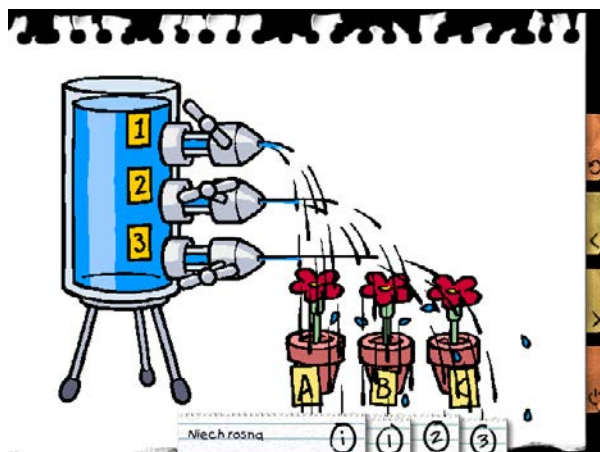
do nowego zadania ponownie czytał treść zadania i wskazaną przez program prawidłową odpowiedź. W efekcie rozwiązał poprawnie najwięcej zadań (210), jak również u niego dało się zauważyć najwięcej zmian w przekonaniach.

Sytuacje zrozumienia zjawiska fizycznego wyraźnie zostały zarysowane na stenogramach opracowanych na podstawie materiału filmowego. Większość z nich nie da się opisać ponad to co już zostało opisane w odniesieniu do uczenia się przez wgląd i odkrycie typu „aha!”. Na przykład Łukasz dwukrotnie uruchomił zadanie o obwodzie elektrycznym pod koniec swoich spotkań (był zmęczony) i nie zwracał już uwagi na wnioski. Jednak na czwartym spotkaniu dało się zauważyć na jego twarzy jakby coś go zaciekawiło (coś mu się nie zgadzało w tym co widział na ekranie komputera), po zaznaczeniu odpowiedzi (błędnej) przeprowadził ponownie doświadczenie (jakby sam dla siebie) i od tego momentu nie uruchamiał już tego zadania, ale na teście widać było, że zmienił swoje przekonanie na prawidłowe (zbliżone do naukowego). Podobne zachowania można było dostrzegać u innych uczniów, którzy zmieniali swoje przekonania.

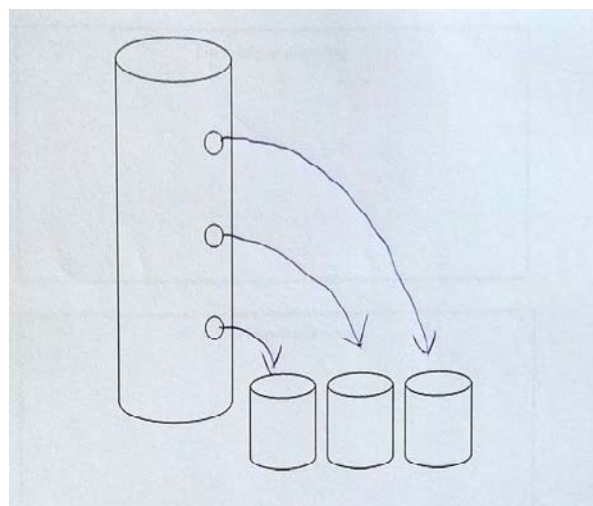
Przejdę teraz do omówienia, **jak zmieniały się przekonania dzieci z grupy eksperymentalnej w odniesieniu do niektórych badanych zjawisk fizycznych.** Porównane zostaną tu trzy elementy: (1) wynik pretestu, który obrazuje stan dziecięcej wiedzy zanim rozpoczęły się badania, (2) informację dotyczącą tego, czego uczniowie uczyli się w trakcie korzystania z programu, oraz (3) wynik posttestu, który pokaże, ile dzieci zmieniło swoje przekonania.

1. Strumień wody wypływający przez otwory w butelce

Zjawisko to związane jest z siłą słupa wody jaki napiera na cząsteczki wody natrafiające na otwór w pojemniku. Im słup wody jest wyższy, tym wypływająca



Ilustracja 1. Zrzut z ekranu programu Socrates103



Ilustracja 2. Przykładowa praca jednego z badanych

przez otwór woda tryska strumieniem na dalszą odległość. W zadaniu przedstawionym w programie (patrz: ilustracja 1) wysoki pojemnik ma trzy identyczne otwory, przez które woda wylewa się trafiając do doniczek z roślinami. Strumień wody wydobywający się z najniższej położonego otworu trafia do ostatniej doniczki.

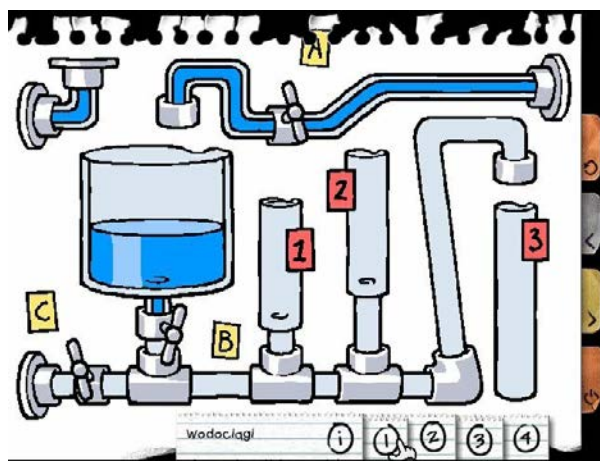
Wyniki wykonanego na początku badania sprawdzianu (pretestu) wykazały, że wszyscy badani uczniowie (24) błędnie wyobrażali sobie wodne strumienie. Twierdzili oni, że woda z górnego otworu trafi do ostatniego pojemnika, a woda z dolnego pojemnika będzie trafiać do pierwszej doniczki. Na ilustracji 2 znajduje się przykładowy schemat wykonany przez jednego z badanych uczniów (Igora).

Jak wykazała analiza zebranego materiału filmowego niektóre dzieci uruchomiły to zadanie w programie siedem razy (Kacper, Patryk) inne tylko raz (Klaudia). Niemniej jednak tylko troje uczniów z grupy eksperymentalnej zmieniło swoje przekonanie (Filip, Łukasz i Sebastian), przy czym Filip uruchomił to zadanie dwukrotnie, Łukasz trzykrotnie, a Sebastian sześciokrotnie.

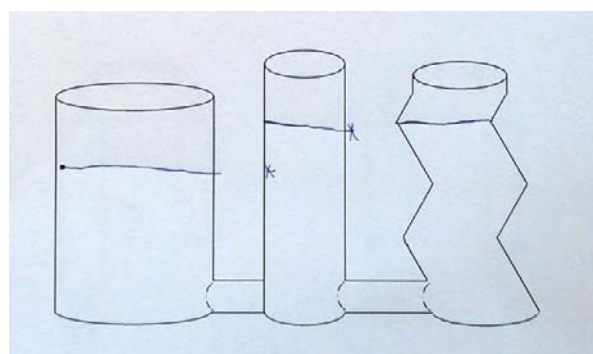
2. Zasada naczyń połączonych

Jeśli pojemniki z wodą są ze sobą połączone, a woda może swobodnie przepływać między nimi wówczas ciecz dąży do zachowania takiego samego poziomu w obu pojemnikach. W programie Socrates103 zjawisko to zostało zobrazowane przy użyciu systemu rur, w którym użytkownik mógł zakręcać i odkręcać krany dla sprawdzenia, czy można podnieść poziom wody w zbudowanej kanalizacji (patrz: ilustracja 3).

Wyniki pretestu wykazały, że z 24 uczniów aż 18 twierdziło (9 z grupy eksperymentalnej i 9 z grupy kontrolnej), że w połączonych ze sobą trzech rurach o różnej średnicy poziom wody będzie różny. Pozostałe 6 osób (3 z grupy eksperymentalnej i 3 z grupy kontrol-



Ilustracja 3. Zrzut z ekranu: zadanie „wodociąg!” program Socrates103.



Ilustracja 4. Przykładowa praca ucznia (Sebastian)

nej) twierdziło, że poziom będzie taki sam we wszystkich naczyniach (przykładowa ilustracja 4).

Po dwóch miesiącach trwania badań 4 osoby (2 z grupy kontrolnej i 2 z grupy eksperymentalnej) nadal twierdziły, że poziom wody we wszystkich pojemnikach będzie taki sam. 7 osób z grupy eksperymentalnej i 8 z grupy kontrolnej utrzymywało błędne przekonanie. 5 osób zmieniło zdanie: 1 z grupy kontrolnej i 1 z grupy eksperymentalnej zrezygnowały z przekonania zbliżonego do naukowego na rzecz błędnego przekonania, a 2 osoby z grupy eksperymentalnej i 1 osoba z grupy kontrolnej zmieniła zdanie z błędnego na przekonanie zbliżone do naukowego. Interesującym jest to, że Patryk, który najwięcej razy (7) uruchomił to zadanie („wodociągi”) udzielił błędnej odpowiedzi w posttestie.

3. Synteza addytywna

Gdyby w ciemnym pomieszczeniu zapalić trzy laski, z czego na jedną założyć czerwony filtr, na drugą zielony, a na trzecią niebieski i skierować ich światło w jeden punkt, wówczas z połączenia tych trzech promieni światła powstało by światło białe.

Żadne z badanych dzieci w preteście nie podało prawidłowej odpowiedzi na pytanie o mieszanie się koloru zielonego z niebieskim (powstaje cyjanowy), zielonego z czerwonym (żółty). Jedynie mieszając trzy kolory razem jedno z dzieci (Michał) wskazał, że powstanie kolor biały. Czworu dzieci (Łukasz, Filip, Michał i Otylia) podało poprawną odpowiedź na pytanie jaki kolor powstanie z połączenia niebieskiego i czerwonego światła (fioletowy).

Podzieliłem wypowiedzi uczniów na trzy poglądy. Jedne dzieci były przekonane, że **wynik mieszania się kolorowych światła (synteza addytywna) będzie analogiczna do efektu mieszania się farb (syntezy subtraktywnej)**, która jest omawiana w klasie szkolnej.

Dzieci przejawiające ten pogląd łącząc kolor czerwony i zielony używały kredki czerwonej i zielonej do zarysowania kartki. Mieszając trzy kolory (czerwony, niebieski i zielony) otrzymywano w efekcie kolor zbliżony do czarnego. Byli także uczniowie, którzy twierdzili, że **kolory będą się wzajemnie uzupełniać**. I tak, używając koloru czerwonego i zielonego uważali, że powstanie trzeci kolor – niebieski, a mieszając trzy kolory podawali wynik na chybił-trafił. Trzecia grupa uczniów wyjaśniała mieszanie się kolorowych światła metodą prób i błędów.

W trakcie rozpoczęcia spotkań z programem edukacyjnym uczniowie, którzy uruchamiali zadanie „zabawa z kolorowym światłem” często mówili, że pamiętają to zadanie ze sprawdzianu (pretestu). Uczniowie z grupy eksperymentalnej uruchamiali to zadanie od 3 (Sebastian) do 9 razy (Filip) mimo to tylko Filip i Łukasz (widział to zadanie 7 razy) zmienili swój pogląd z błędnego na prawidłowy i właściwie wskazali, że mieszając trzy kolory razem otrzymamy biel. Podczas realizacji posttestu **pozostali uczniowie byli świadomi, że wynik nie jest taki jak ten uczony ze szkoły (dostrzegli różnicę), ale jednocześnie nie potrafili sobie przypomnieć kolorów z programu, jako wyniku tego doświadczenia**.

Wnioski

Przeprowadzone badania dostarczyły następujących informacji:

- pierwszy sprawdzian wiadomości (pretest) pozwolił ustalić, jakie są przekonania dzieci odnośnie badanych zjawisk fizycznych (ze względu na ograniczenia wydawnicze w artykule przedstawiono cztery zagadnienia fizyczne): *woda wypływająca z butelki przez otwór, zasada naczyń połączonych, synteza addytywna*.

- ustalić, jak dzieci poznają zjawiska fizyczne korzystając z edukacyjnego programu multimedialnego *Socrates103*. Zagadnienie to jest zazwyczaj analizowane tylko pobieżnie (Jelinek, 2013; Jelinek, 2015). Badając proces uczenia się dzieci przy komputerze zazwyczaj analizuje się wyłącznie stan wiedzy przed przystąpieniem dzieci do korzystania z programu i po zakończeniu tego procesu (różnica między pretestem i posttestem). Nie bierze się pod uwagę sposobu zachowania się dzieci przed ekranem (por. badania Masson, Bub, Lalonde 2011; Linden, Joolingen 2016). W przeprowadzonych badaniach wykorzystano program rejestrujący, który pozwolił zgromadzić materiał filmowy i na jego podstawie analizowano zachowanie dzieci;
- stwierdzić, czy uczniowie korzystający z programu potrafią wykorzystać wiedzę zdobytą w programie poza wirtualną rzeczywistością. Tę informację pozwolił ustalić posttest, a więc drugi sprawdzian wiadomości. Przypomnę zarówno podczas pretestu, jak i posttestu dzieci obserwowały jak obiekty są przygotowywane do doświadczenia. Dzieci, które korzystały z programu *Socrates103* miały – zgodnie z założeniem badawczym – możliwość zapoznać się ze zjawiskami fizycznymi, które następnie mogły wyjaśnić podczas sprawdzianu wiadomości.

Badania wykazały, że wiedza dzieci 8-, 9-letnich w zakresie badanych zjawisk fizycznych jest ograniczona. W wypowiedziach dzieci wyraźnie widać było wpływ edukacji i prowadzonych w niej „standardowych” doświadczeń (np. mieszanie kolorów). Braki w zakresie wiedzy odnośnie elektryczności czy właściwości wody (dążenie do utrzymania takiego samego poziomu) były powodem częstych niepoprawnych odpowiedzi u dzieci.

Z drugiej strony badania potwierdziły, że dzieci są bardzo zainteresowane nie tylko korzystaniem z komputera (jako urządzenia), ale także poznawaniem symulacji zjawisk fizycznych na ekranie. Zachowania dzieci podczas korzystania z programu pozwoliły wyłonić (a) czynności jakie dzieci muszą podejmować by rozwiązać zadanie, (b) ustalić jak zachowują się dzieci w poszczególnych etapach rozwiązywania zadań, w tym: ustalić czy realizują wyznaczone przez autorów programu strategie czy rezygnują z nich dla podejmowania własnych działań (nie związanych z uczeniem się). Badania wykazały, że dzieci natrafiając na trudności techniczne oraz zadania wymagające umiejętności przekraczających ich kompetencje przechodzą na własne strategie – co wydaje się normalnym zabiegiem. Jednak świadczy o niskiej skuteczności programu edukacyjnego. Istotne jest to, że miało to miejsce w sytuacji, gdy uczniowie mogli korzystać z mojej pomocy, mimo to o nią nie poprosili. Z drugiej jednak strony analiza zachowania się dzieci wyłoniła postać Łukasza, który mimo typowych trudności podejmował wysiłek poznania zjawisk. Łukasz od początku korzystania z programu podążał zgodnie z założeniami autorów programu Socrates103.

Porównując pretest z posttestem można ocenić skuteczność programu. Problem w tym, że uczenie się jako zmiana w poglądów może występować w kilku kierunkach: (a) dziecko może cofnąć się i przyjąć potoczne (błędne) wyjaśnienie, (b) utrzymać się w swoim przekonaniu lub (c) może porzucić błędne przekonanie i przyjąć zbliżone do naukowego. Kierunek zmiany A jest regresyjny, kierunek B jest utrzymaniem poglądu, a C dowodzi rzeczywistej, progresywnej zmiany – a więc tym co nazywamy uczeniem się. Takie rozróżnienie pozwala ocenić program Socrates103 w trzech rodzajach zmian. W tabeli I zestawiłem wszystkie rodzaje zmian jakie nastąpiły wśród uczniów z grupy eksperymentalnej.

Na podstawie tak małej grupy badawczej trudno jednoznacznie określić efekt skuteczności programu multimedialnego użytego w badaniu. Przedstawione w tabeli wartości liczbowe są podobne wśród uczniów z grupy kontrolnej i eksperymentalnej i wskazują na to, że zmiany w zakresie przekonań występują zarówno w grupie eksperymentalnej, jak i kontrolnej. Przyczyną tego zjawiska może być wiele: (a) dzieci odpowiadały na postawione pytania na chybił-trafił (choć wydaje się to mało prawdopodobne, ponieważ postawione odpowiedzi nie były intuicyjne). Mogło być tak, że (b) dzieci z grupy kontrolnej, które nie korzystały z programu komputerowego mogły zdobyć wiedzę na temat do-

świadczeń opisanych w programie z innych źródeł. To jednak rozwiązanie również wydaje się mało prawdopodobne, ponieważ z moich informacji wynika, że dzieci nie miały dostępu do użytego w badaniach programu. Najbardziej sensownym wyjaśnieniem wskazującym na dużą zbieżność wyników grupy eksperymentalnej i kontrolnej (w utrzymaniu się pojęcia potocznego, rezygnacji z pojęcia naukowego na rzecz błędnego wyjaśnienia oraz w utrzymaniu się naukowego wyjaśnienia) jest (c) niska skuteczność programu edukacyjnego.

Na podstawie zebranego materiału można powiedzieć, że dzieci uczestniczące w badaniu przejawiały dużą motywację w działaniu, jednak ostatecznie nie

	Utrzymanie naukowego wyjaśnienia		Porzucenie potocznego wyjaśnienia i przyjęcie naukowego		Rezygnacja z naukowego wyjaśnienia na rzecz potocznego		Utrzymanie się potocznego wyjaśnienia	
	Gr. E	Gr. K	Gr. E	Gr. K	Gr. E	Gr. K	Gr. E	Gr. K
1 Ciśnienie w butelce z wodą	0	0	3	1	0	0	9	11
2 Woda w naczyniach połączonych	2	1	2	1	1	1	7	9
3 Synteza addytywna (trzy kolory)	0	0	2	0	1	0	6	12
4 Elektryczny obwód zamknięty	2	3	1	2	0	3	9	4
5 Waga	1	0	1	0	2	0	8	12
6 Powietrze w dwóch strzykawkach	5	1	2	7	0	1	5	3
7 Wahadło	0	0	2	4	6	1	4	7
8 Równia pochyła	4	5	0	0	2	1	6	6

Tabela 1. Zestawienie zmian zachodzących wśród dzieci

Źródło: oprac. własne. Gr. E – grupa eksperymentalna, Gr. K – grupa kontrolna.

można potwierdzić, że wiedzę, którą zdobyli podczas korzystania z programu potrafili wykorzystać poza nim. Dla większości badanych korzystanie z programu miało w znaczącej mierze charakter rozrywki. Podobne wnioski wysunęli inni badacze (Masson, Bub, Lalonde 2011; Linden, Joolingen 2016) wykorzystujący w swoich badaniach programy analogiczne do programu Socrates103. Stwierdzili oni, że multimedialne programy zwierające doświadczenia z zakresu mechaniki wzbogacają jedynie ogólne umiejętności (w tym wyobraźnię) potrzebne w sytuacji planowania ruchu. Uczniowie korzystający z takich programów nie potrafią wykorzystać zdobytych wiadomości w praktyce, poza wirtualną rzeczywistością (Masson, Bub, Lalonde 2011). Do podobnych wniosków doszli Anne van Linden i Wouter van Joolingen (2016), którzy ustalili ponadto, że uczniowie po dłuższym czasie od zakończenia korzystania z programu byli w stanie odtworzyć obrazy z programu multimedialnego (np. sposoby poruszania się przedmiotów). Dodam, że opisane tu badania (zarówno Masson, Bub, Lalonde (2011) jak i Linden, Joolingen 2016)) były prowadzone wśród starszych uczniów (11-15 letnich).

Autorzy *Raportu o stanie edukacji* (Fedorowicz, Choińska-Mika, Walczak, 2014, s. 247-248) wskazują, że rośnie wykorzystanie środków audiowizualnych na zajęciach z dziećmi (szczególnie filmu i prezentacji multimedialnych). Informacja ta może sugerować, że nauczyciele zamiast organizować doświadczenia mogą scedować to zadanie na multimedialne programy komputerowe. Jednak opisane powyżej badania wskazują, że te działania nie będą wystarczające. Badania wykazały, że (1) dzieci są bardzo zainteresowane przeprowadzaniem doświadczeń (2) mają jednak trudności w samodzielnym budowaniu wniosków (3) chętnie jednak przedłużają prowadzone doświadczenia, jeśli są wspierane w projektowaniu prostych badań. (4) Pozostawione same przy komputerze zaczynają się bawić i nie naby-

wają wiedzy na sposób jaki zaplanowali to autorzy programu. Sam program multimedialny nie jest wystarczającym czynnikiem motywującym, który motywuje do podjęcia działania, by dzieci mogły poznać opisane w nim zjawiska. Potrzebują w tym procesie przewodnika – nauczyciela, który zachęci je do prowadzenia ciekawych eksperymentów i doświadczeń.

Literatura

- Carey S (2007). Conceptual Differences Between Children and Adults, *Mind&Language* 3:167-181.
- Gopnik A, Wellman H (1992). Why the child's theory of mind really is a Theory. *Mind&Language*, 7:145-171.
- Hecht H, Proffitt D (1995). *The price of expertise: effects of Experience on the Water-Level Task*. American Psychological Society, 6:90-95.
- Fedorowicz M, Choińska-Mika J, Walczak D (2014). *Raport o stanie edukacji 2013. Liczą się nauczyciele*, Warszawa: Instytut Badań Edukacyjnych.
- Jelinek J (2013). Uczenie się matematyki przez uczniów klasy pierwszej podczas korzystania z programów multimedialnych. *Ruch pedagogiczny* 3:181-194.
- Jelinek J (2015). Program komputerowy jako nauczyciel wspomagający naukę czytania. Wyniki badań. *Ruch pedagogiczny* 2:75-88.
- Lelonek M (1984). *Kształtowanie pojęć przyrody nieożywionej w nauczaniu początkowym*, Warszawa: WSiP.
- Linden A, Joolingen W (2016). A serious game for interactive teaching of Newton's laws. *Proceedings of the 3rd Asia-Europe Symposium on Simulation & Serious Gaming [serial online]*. DOI: 10.1145/3014033.3014040. Dostępny na: <https://dl.acm.org/citation.cfm?id=3014040>. Dostęp: 10.10.2017.
- Masson M, Bub D, Lalonde C (2011). Video-Game Training and Naïve Reasoning About Object Motion. *Applied Cognitive Psychology*, 25:166-173.
- McCloskey M (1983). Intuitive physics. *Scientific American*, 248:122-130.
- Piaget J (1993). *Psychologia dziecka*. Wrocław: Wydawnictwo Siedmioróg.
- Smith J, diSessa A, Rochelle J. (1993). Misconceptions Reconciled: A Constructivist analysis of knowledge in transition. *The Journal of Learning Sciences*. 3:115-183.
- Markowska A, Lechowicz M, Grajowski W, Chrzanowski M, Spalik K, Borgensztajn J, Ostrowska E, Musiałik M, *Błędne przekonania*

nia w nauczaniu przedmiotów przyrodniczych, „Edukacja Biologiczna i Środowiskowa”, 4/2014, s. 56-66.

Vosniadou S (2002). On the nature of naïve physics. In: Limón M, Mason L, ed. *Reconsidering Conceptual Change. Issues in Theory and Practice*, Springer, Dordrecht; 61-76.

Exploring physical phenomena on the computer screen by secondary school students

Jan Amos Jelinek

The article presents the results of research aimed at determining the process of learning physical education by pupils of second grade of primary school while using the program Socrates103. Using the recording program running in the background of the educational program, children behavior was screened by the camera and screen shots were taken from the educational program. This allows the researcher to “enter” between learning and educational situation played by the educational program. Analysis of the footage reveals used by children coping strategies while using the program and in group of researched children's explains the reasons for the low educational effectiveness of the program.

Key words: learning by computer, multimedia programmes, Socrates103 programme, exploring and learning about physical phenomena, pupils of second grade of primary school, 8-9 years old pupils

Morfologia i anatomia owadów – budowa i funkcjonowanie narządów wewnętrznych

Konspekt zajęć edukacyjnych

Łukasz Dylewski

Konspekt nawiązuje do artykułu
Karaczany jako model do nauczania anatomii owadów
– zob. s. 3

Obejmuje też materiały dydaktyczne do pobrania:
<http://ebis.ibe.edu.pl/materialy/dylewski-prez.pdf>
<http://ebis.ibe.edu.pl/materialy/dylewski-cw.pdf>

Adresaci: uczniowie szkół ponadgimnazjalnych realizujący przedmiot biologia w zakresie rozszerzonym

Czas trwania zajęć: 90 minut



mgr Łukasz Dylewski: doktorant,
Instytut Zoologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

I. CELE OGÓLNE

1. Nauka podstawowej wiedzy z budowy anatomicznej owadów oraz funkcji wybranych narządów wewnętrznych
2. Nauka preparowania oraz rozpoznawania narządów wewnętrznych owadów

II. CELE SZCZEGÓŁOWE

1. Zapoznanie uczniów z ogólnym rozmieszczeniem poszczególnych narządów w ciele owadów
2. Omówienie budowy i funkcjonowania następujących układów: mięśniowego, nerwowego, krążenia, oddechowego, pokarmowego, wydalniczego i rozrodczego
3. Omówienie fizjologii oddychania i wentylacji ciała u owadów
4. Zapoznanie uczniów z procesem wydalania z uwzględnieniem końcowych produktów przemiany materii
5. Zaprezentowanie uczniom technik związanych z sekcją owadów, preparatykom poszczególnych narządów i ich rozróżnianiem oraz metod związanych z konserwacją wypreparowanych narządów

III. CELE OPERACYJNE

1. Uczeń wie i rozumie:
 - a) uczeń zna rozmieszczenie narządów u owadów
 - b) uczeń zna budowę i funkcjonowanie wybranych układów
 - c) uczeń wie jak przebiega proces oddychania i wydalania u owadów
2. Uczeń potrafi:
 - a) dokonać sekcji owadów
 - c) zlokalizować i rozpoznać narządy w ciele owadów

- d) wypreparować i zakonserwować wybrane narządy owadów
- e) wymienić narządy wchodzące w skład poszczególnych układów u owadów

IV. METODY

1. Metody podające
 - a) wykład informacyjny
 2. Metody praktyczne
 - a) sekcja owadów
 - b) preparowanie narządów wewnętrznych
 - c) konserwowanie narządów wewnętrznych
 3. Metody eksponujące
 - a) prezentacja multimedialna zawierająca:
 - b) zdjęcia
 - c) filmy
 4. Metody słowne
 - a) uczniowie omawiają funkcję wypreparowanych narządów wewnętrznych
 - b) uczniowie odpowiadają na pytania prowadzącego

V. MATERIAŁY DYDAKTYCZNE

1. Prezentacja multimedialna, przygotowana w programie PowerPoint, zawierająca:
 - a) zdjęcia
 - b) filmy ukazujące wybrane zagadnienia fizjologiczne

pobierz:

<http://ebis.ibe.edu.pl/materialy/dylewski-prez.pdf>

2. Wydruk materiałów ćwiczeniowych przygotowanych dla uczniów przez prowadzącego zajęć zawierające: schemat budowy anatomicznej karaczana madagaskarskiego.

pobierz:

<http://ebis.ibe.edu.pl/materialy/dylewski-cw.pdf>

3. Przedmioty oryginalne – materiał zwierzęcy:
 - a) karaczan madagaskarski, 15 sztuk (wcześniej zabite poprzez zamrożenie)
 Wymieniony gatunek jest zwierzęciem prostym w utrzymaniu i nieobjętym żadną formą ochrony prawnej.
4. Zestaw narzędzi dla zespołu dwuosobowego:
 - a) nożyczki ×2
 - b) lupa ×1
 - c) pęseta ×2
 - d) szalki Periego ×2
 - e) alkohol etylowy 70% (350 ml)
 - f) pipeta
 - g) probówki typu Falcon ×5
 - h) tacka do sekcji (tacka styropianowa z woskiem)
 - i) szpilki ×10

Lekcja I

Plan zajęć

I. Faza przygotowawcza

1. Czynności organizacyjne
 - a) sprawdzenie listy obecności
2. Przedstawienie przebiegu zajęć
 - a) przedstawienie uczniom istotności tematu zajęć
3. Przedstawienie zasad BHP odnoszących się do późniejszej sekcji owadów

II. Faza realizująca

A. Anatomia topograficzna

1. Zapoznanie z rozmieszczeniem poszczególnych narządów w ciele owadów – prezentacja multimedialna
 - a) wskazanie i wymienienie wszystkich narządów w ciele owada

2. Zapoznanie uczniów z grupami mięśni występującymi w ciele owada – prezentacja multimedialna
 - a) uczniowie wymieniają rodzaje mięśni
 - b) zapoznanie z grupą mięśni wchodzących w skład aparatu lotnego
 - c) omówienie mechanizmu lotu u owadów
3. Zapoznanie uczniów z budową centralnego układu nerwowego – prezentacja multimedialna
 - a) uczniowie wymieniają budowę układów nerwowych u wcześniej poznanych grup systematycznych
 - b) omówienie części mózgu owadów (protocerebrum, deutocerebrum i tritocerebrum)
4. Zapoznanie uczniów z elementami i funkcjonowaniem układu krążenia u owadów – prezentacja multimedialna
 - a) omówienie roli naczynia grzbietowego oraz elementy jego budowy
 - b) wyjaśnienie funkcji ostii
 - c) omówienie składu i funkcji hemolimfy
 - d) przedstawienie przepływu hemolimfy u owadów – film
5. Zapoznanie uczniów ze strukturami wchodzącymi w skład układu oddechowego oraz omówienie

fizjologii wymiany gazowej – prezentacja multimedialna

- a) omówienie budowy układu tchawkowego
- b) przedstawienie na schemacie rozmieszczenia pni tchawkowych w ciele owadów
- c) omówienie fizjologii oddychania i wentylacji ciała

F. Układ pokarmowy

6. Zapoznanie uczniów z budową układu pokarmowego owadów – prezentacja multimedialna
 - a) omówienie trzech podstawowych odcinków wchodzących w skład układu pokarmowego oraz ich funkcji
 - b) omówienie i wskazanie na wyświetlanym schemacie poszczególnych części wchodzących w skład układu pokarmowego
 - c) wskazanie i omówienie różnic w budowie układu pokarmowego chrząszczy, błonkówek i muchówek

G. Układ wydalniczy

7. Zapoznanie uczniów z narządami biorącymi udział w procesie wydalania – prezentacja multimedialna
 - a) omówienie budowy cewek Malpighiego
 - b) omówienie znaczenia procesu wydalania
 - c) omówienie związku między cewkami Malpighiego a jelitem tylnym w procesie wydalania
 - d) wymienienie produktów przemian związków azotowych

H. Układ rozrodczy

8. Zapoznanie z budową układu rozrodczego u owadów – prezentacja multimedialna
 - a) omówienie narządów wchodzących w skład

- układu rozrodczego
- b) omówienie różnic w budowie układu żeńskiego i męskiego
- c) omówienie budowy układu rozrodczego owadów partenogenetycznych na przykładzie straszaków

Lekcja II

Sekcja owada i preparatyka narządów wewnętrznych

1. Zaprezentowanie metody sekcji owadów na przykładzie karaczana madagaskarskiego. Prowadzący demonstruje jak prawidłowo preparować odpowiednie narządy oraz jak je prawidłowo zakonserwować
2. Omówienie narządów widocznych po otwarciu powłok ciała
3. Stopniowe preparowanie i omawianie narządów wewnętrznych
4. Zapoznanie uczniów najprostszej metody konserwacji materiału zwierzęcego

Faza podsumowująca

1. Praca własna uczniów w parach
2. Każda grupa otrzymuje dwa osobniki karaczana madagaskarskiego (samca i samicę)
3. Uczniowie dokonują sekcji otrzymanych osobników pod okiem prowadzącego
4. Uczniowie obserwują pod lupą układ pokarmowy, brzuszny łańcuszek nerwowy oraz system tchawkowy
5. Uczniowie wykonują szkice widocznych narządów wewnętrznych (materiały ćwiczeniowe)
6. Uczniowie podpisują na schematach pomocniczych narządy wewnętrzne które wypreparowały (materiały ćwiczeniowe)

7. Grupy prezentują prowadzącemu wypreparowane narządy i omawiają ich budowę

Źródła

- <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Robal.png#/media/File:Robal.png>
- <http://randyoliver.com/test/?p=3>
- http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842004000400022
- <https://www.etsy.com/in-en/listing/176439190/1850-antique-insect-anatomy-print>
- https://en.wikipedia.org/wiki/Insect_flight#/media/File:Indirect_flight_in_insects.gif
- https://en.wikipedia.org/wiki/Insect_flight#/media/File:Motion_of_Insectwing.gif
- http://cronodon.com/BioTech/insect_nervous_systems.html
- http://wwwuser.gwdg.de/~treisch/neuroanatomy_en.html
- <https://www.britannica.com/animal/insect/Circulatory-system>
- <https://www.thoughtco.com/internal-anatomy-of-an-insect-1968483>
- <http://www.shop-mecan.com/top-samlegazo.html>
- <https://biology-forums.com/index.php?action=gallery;sa=view;id=1227>
- <http://www.photomacrography.net/forum/viewtopic.php?p=79449>
- https://en.wikipedia.org/wiki/Invertebrate#/media/File:Cockroach_tracheae_supplying_crop.tiff
- Heyborne, W. H., Fast, M., Goodding, D. D. (2012). The Madagascar hissing cockroach: a new model for learning insect anatomy. *The American Biology Teacher*, 74, 185-189.
- Wilkaniec B. (2009) Entomologia ogólna 1. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne.
- Błaszak C. (2012) Zoologia Tom 2 Część 2. Wydawnictwo Naukowe PWN.

Legenda do ryciny nr 1 zawartej w prezentacji

Schemat budowy anatomicznej owada

A- głowa

B- tułów

C- odwłok

1. czułek
2. ocelli dolne
3. ocelli górne
4. oko złożone (z fasetek)
5. mózg
6. przedtułów
7. aorta
8. układ kapilar oddechowych z tchawkami
9. śródtułów
10. zatulek
11. skrzydło przednie (lub pokrywa skrzydłowa)
12. skrzydło tylne
13. jelito
14. serce
15. jajnik
16. jelito tylne
17. odcinek odbytowy
18. pochwa
19. łańcuszek nerwowy
20. cewki Malpighiego
21. poduszka
22. pazurki
23. stopa
24. goleń
25. udo
26. krętarz
27. wole
28. zwój nerwowy tułowiowy
29. biodro
30. gruczoł ślinowy

31. zwój okołogardzielowy
32. aparat gębowy

Słownik angielsko polski nazw anatomicznych zawartych na rycinach w prezentacji

RYCINA 2

dorsal diaphragm – przepona grzbietowa
 dorsal longitudinal trunk – podłużny pień grzbietowy
 gut – jelito środkowe
 heart – serce
 lateral longitudinal trunk – podłużny pień brzuszny
 nerve cord – łańcuszek brzuszny
 spiracle – przetchlinka
 ventral diaphragm – przepona brzuszna
 visceral trachea – tchawka trzewiowa

RYCINA 6

antennal lobe – płat czułkowy
 antennal nerve – nerw odbierający sygnał z czułków
 compound eye – oko złożone
 frontal commissure – komisura przednia
 frontal ganglion – zwój czołowy
 labral nerve – nerw
 ocelli – przyoczko
 oesophageal connective – konektywa przełykowa
 oesophageal connective – konektywa przełykowa
 optic lobe – płat wzrokowy
 postoesophageal commissures – komisura przeciwprzełykowa
 recurrent nerve – nerw nawracający
 suboesophageal ganglion – zwój podprzełykowy

RYCINA 10

antenna - czułek
 aorta – aorta
 dorsal ampulla – ampułka grzbietowa
 dorsal diaphragm – przepona grzbietowa
 heart – serce
 leg – odnóże
 ostium – ostium
 pericardial sinus – zatoka okołosercowa
 perineural sinus – zatoka okołonerwowa
 perivisceral sinus – zatoka okołotrzewiowa
 ventral diaphragm – przepona brzuszna
 wing – skrzydło

RYCINA 12

body surface – powierzchnia ciała
 muscle – mięsień
 spiracle – przetchlinki
 trachea – tchawki
 tracheole – tracheole

RYCINA 17

anus – otwór odbytowy
 epithelial cells – komórki nabłonkowe
 intestine – jelito tylne
 Malpighian tubules – cewki Malpighiego
 rectum – odbytnica
 stomach – jelito środkowe

Tam gdzie można podglądać nietoperze – obserwatorium w Brennej

Monika Pietraszko, Marcin Warchałowski

Streszczenie:

Nierecenzowany artykuł informacyjny

Celem pracy jest przedstawienie obserwatorium nietoperzy w Brennej oraz możliwości wykorzystania obiektu do celów edukacji ekologicznej oraz prowadzenia lekcji biologii i przyrody.

Słowa kluczowe: edukacja ekologiczna, obserwatorium nietoperzy, ochrona przyrody

Wiele gatunków nietoperzy zamieszkuje miejsca niedostępne dla większości z nas. Zwierzęta te bowiem chętnie zasiedlają dziuple drzew, szczeliny pod odstającą korą, jaskinie, sztolnie, opuszczone bunkry, kanały wentylacyjne, czy przestrzenie pod drewnianymi i metalowymi elewacjami. Czasem ssaki te można spotkać też w specjalnych budkach lub skrzynkach przeznaczonych dla ptaków. Istnieją też takie gatunki, które najchętniej okres lata spędzają na strychach budynków, a zatem w miejscach łatwo dostępnych, gdzie można je z bliska obserwować. Do miejsc takich możemy zaliczyć strych szkoły w Brennej na Śląsku, gdzie znajduje się kryjówka, niezwyklej nietoperzy, podkowców małych.

Brenna to miejscowość położona w malowniczym Beskidzie Śląskim, obszarze w którym występuje wiele chronionych i rzadkich gatunków rodzimej flory i fauny (Wilczek, 2006). Beskid ten oraz pobliskie pogórze

słyną z obecności licznych kolonii rozrodczych, rzadkiego w skali kraju i Europy nietoperza, podkowca małego *Rhinolophus hipposideros* (Warchałowski i wsp., 2011; Warchałowski wsp., 2014a; Warchałowski wsp., 2014b; Warchałowski i Pietraszko, 2014).

W okresie lata samice tego ssaka, czasami dość licznie, gromadzą się na ciepłych strychach budynków i tworzą tak zwane kolonie rozrodcze, gdzie rodzą i odchowują swoje potomstwo. W miejscach tych, przyszłe mamy gromadzą się już w kwietniu i spędzają w nich całe lato, by jesienią powrócić do swoich zimowych kryjówek, jaskiń lub sztolni. Zimą z powodu okresowego braku pokarmu, czyli bezkręgowców, nietoperze zapadają w hibernację. Proces ten wbrew obiegowym opiniom nie trwa ciągle, a jest przerywany momentami wybudzeń, w czasie których nietoperze uzupełniają braki wody poprzez zlizywanie kropli wody z futerka, czy zmianę miejsca zimowania na bardziej dogodne.



Ryc. 1. Warsztaty z chiropterologami ze Stowarzyszenia Dziewięciśń z Lipowej

Obserwatorium to niezwykle miejsce, w którym w sposób bezpieczny dla nietoperzy, w okresie od maja do września możemy na własne oczy podglądać życie nietoperzy. Obiekt ten jest dostępny od 2014 roku,



Ryc. 2. Sprawdzanie stanu skrzydeł nietoperza

na strychu budynku Szkoły Podstawowej im. Janusza Korczaka (dawne Gimnazjum im. Króla Jana III Sobieskiego) w Brennej, na ul. Góreckiej 224. Obserwatorium składa się z sali edukacyjnej oraz specjalnego pokoju na strychu, w którym poprzez weneckie lustro można przyglądać się nietoperzom. Ponadto w salach na monitorach możemy oglądać obraz rejestrowany z kamer znajdujących się wewnątrz kolonii nietoperzy oraz dzięki specjalnym detektorom usłyszeć echolokację podkowców małych. Urządzenie to jest niezbędne, gdyż ludzkie ucho nie jest w stanie usłyszeć „mowy” podkowca małego, ponieważ wydawane przez niego dźwięki, najlepiej słyszalne są na częstotliwości znajdujące się poza naszym górnym zakresem słyszalności (około 110 kHz).

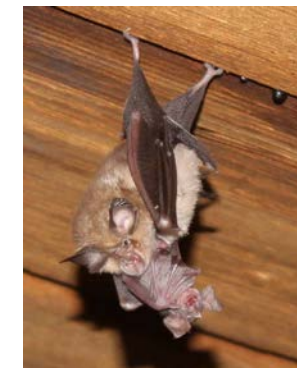
Pamiętając, że edukacja ekologiczna ma pobudzać świadomość ekologiczną, kształtować postawy proekologiczne oraz wpływać na formowanie się wzorów postępowania zgodnego z poszanowaniem środowiska naturalnego (Sobczyk, 2000), można uznać, że obserwatorium nietoperzy stanowi do tego świetne miejsce. Bowiem w szkole tej istnieje możliwość prowadzenia nietypowych i ciekawych zajęć edukacji ekologicznej oraz lekcji biologii bądź przyrody. Bogate zaplecze obiektu w postaci sali dydaktycznej umieszczonej na parterze, dostosowanej do potrzeb osób niepełnosprawnych, pozwala na prowadzenie lekcji dla różnych grup odbiorców, niezależnie od ich wieku i poziomu zaawansowania. Należy też zaznaczyć, że wyposażenie sali pozwala na prowadzenie zajęć z wykorzystaniem wielu metod nauczania jednocześnie. Według Cichego (1984) wyróżniamy bowiem trzy metody nauczania polegające na tworzeniu uczniom sytuacji problemowej, bądź opierającej się na obserwacji lub przekazie słownym. W przypadku pierwszego sposobu istnieje możliwość organizowania procesu poznawczego bezpośrednio w terenie, w miejscu bytowania nietoperzy. Dzięki



Ryc. 3. Podkowiec mały: portret



Ryc. 4. Podkowiec mały: mama z młodym



Ryc. 5. Mama podkowca małego z młodym

tej metodzie uczeń poznaje rzeczywistość przyrodniczą w środowisku naturalnym lub sztucznie stworzonym. Metoda obserwacyjna polega na podpatrywaniu elementów środowiska naturalnego, okazów fauny i flory, a metoda słowna na przekazywaniu informacji i ustnym wyjaśnianiu obserwowanych procesów. Zapewne właśnie z tego powodu, w obserwatorium przeprowadzono już kilka prelekcji i warsztatów dotyczących tych tajemniczych ssaków, m.in. prowadzonych przez chiropterologów (specjaliści zajmujący się nietoperzami) ze Stowarzyszenia Dziewięciśił w Lipowej. Ponieważ obserwatorium nietoperzy w Brennej jest również dogodnym miejscem do prowadzenia badań naukowych, liczni chiropterolodzy chętnie odwiedzają to stanowisko i prowadzą tam badania nad biologią i ekologią nietoperzy: podkowca małego *Rhinolophus hipposideros* oraz nocka dużego *Myotis myotis*. Obserwatorium jest więc również świetnym miejscem do popularyzowania badań naukowych, zarówno wśród uczniów, jak i osób dorosłych.

Obserwatorium nietoperzy w Brennej, wraz z zapleczem dydaktycznym stwarza możliwości prowadzenia

zajęć z zakresu edukacji ekologicznej. Jest bowiem miejscem, gdzie pod jednym dachem współistnieją ludzie i nietoperze, co stwarza dogodne warunki do obserwowania i prawidłowego kształtowania relacji między człowiekiem a przyrodą. Miejsce to uczy także odpowiedzialności za zmiany dokonywane w środowisku, co jest jednym z celów stawianych edukacji ekologicznej (Kiełczewski, 1999) oraz może być świetnym przykładem kreatywnego wykorzystania potencjału obiektu użyteczności publicznej.

Obiekt czynny jest w okresie bytowania nietoperzy na strychu szkoły, w każdy wtorek w godzinach od 10:00 do 14:00 oraz w pozostałe dni po wcześniejszej rezerwacji (Informacja Turystyczna, ul. Wyzwolenia 77, Brenna; tel. (33) 858 69 71; e-mail: it@brenna.org.pl). Kontakt do chiropterologów ze Stowarzyszenia Dziewięciśił: marcin.warchalowski@dziewiecisci.org

Monika Pietraszko: Uniwersytet Wrocławski, Zakład Biologii, Ewolucji i Ochrony Bezkręgowców; Uniwersytet Zielonogórski, Katedra Zoologii

Marcin Warchałowski: Uniwersytet Zielonogórski, Katedra Zoologii, Stowarzyszenie Dziewięciśił

Literatura

- Cichy D (1984). *Przygotowanie młodzieży do ochrony i kształtowania środowiska*. LOP. Warszawa.
- Kielczewski D (1999). *Ekologia społeczna*. Białystok: Wyd. Ekonomia i Środowisko.
- Sobczyk W (2000). *Edukacja ekologiczna i prozdrowotna*. Kraków: Wyd. Naukowe Akademii Pedagogicznej.
- Warchałowski M, Szkudlarek R, Bator A, Paszkiewicz R, Pietraszko M, Płoskoń Ł, Węgiel J, Węgiel A (2011). Nowo odkryte stanowisko kolonii rozrodzkiej podkowca małego *Rhinolophus hipposideros* na Pogórzu Śląskim. *Nietoperze*. 12: 59-60.
- Warchałowski M, Szkudlarek R, Bator A, Paszkiewicz R, Pietraszko M, Płoskoń Ł, Węgiel J, Węgiel A (2014 a). Nowo odkryte stanowiska podkowca małego *Rhinolophus hipposideros* na obszarze Pogórza Śląskiego. *Nietoperze*. 13: 57-59.
- Warchałowski M, Pietraszko M, Cichocki J, Szkudlarek R (2014 b). Nowe stwierdzenia nocka orzęsionego *Myotis emarginatus* na obszarze Beskidów Zachodnich oraz Pogórza Zachodniobeskidzkiego. *Przegląd Przyrodniczy*. 25(1): 79-84.
- Warchałowski M, Pietraszko M (2014). Nowe schronienie podkowca małego (*Rhinolophus hipposideros*) we wsi Grodziec (Śląsk Cieszyński). *Przegląd Przyrodniczy*. 25(3): 68-71.
- Wilczek Z (2006). *Fitosocjologiczne uwarunkowania ochrony przyrody Beskidu Śląskiego*. Katowice: Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego. Katowice.

There where you can peep bats – observatory in Brenna

Monika Pietraszko, Marcin Warchałowski

The aim of this paper was to show bats observatory in Brenna village in the Beskidy Mountains. The observatory is a useful place for conducting ecological education and biology lessons.

Key words: the ecological education, bats observatory, nature conservation