

**Wiktor Paskal<sup>\*</sup>, Elżbieta Malendowicz<sup>\*,\*\*</sup> i Jan Paczesny<sup>\*\*\*</sup>**

<sup>\*</sup>Katolickie Liceum Ogólnokształcące im. Jana Pawła II  
ul. R. Kalinowskiego 15, 68-200 Żary

<sup>\*\*</sup>I Liceum Ogólnokształcące im. Bolesława Prusa  
ul. Podwale 16, 68-200 Żary

<sup>\*\*\*</sup>Instytut Chemii Fizycznej  
Polska Akademia Nauk  
ul. M. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa  
tel. 22 343 32 39  
email: jpaczesny@ichf.edu.pl

**WPLYW DETERGENTÓW NA ROZWÓJ ROŚLIN UPRAWNYCH<sup>1</sup>****INFLUENCE OF DETERGENTS ON DEVELOPMENT OF DOMESTICATED PLANTS**

**Abstrakt:** W artykule przedstawiamy pracę badawczą, której powstanie było określone wymogami stawianymi przez Komitet Organizacyjny Olimpiady Biologicznej. Pokazujemy, w jaki sposób zrealizować projekt, by uczeń liceum poznał metodykę i wymagania pracy naukowej. Wierzymy, że najlepsi uczniowie chętniej podejmą wyzwania, które dają realne odpowiedzi na nurtujące ich pytania, mimo ich stopnia trudności i poziomu skomplikowania. Chcieliśmy przede wszystkim zademonstrować, że rozwiązanie wielu problemów badawczych leży w zasięgu możliwości licealistów. Pokazujemy przykład pracy zaproponowany przez ucznia - projekt zakładał zbadanie wpływu detergentów (wybrano popularny proszek do prania) na rozwój roślin hodowlanych na przykładzie kapusty białej (*Brassica oleracea*) i rzodkiewki zwyczajnej (*Raphanus sativus* var. *sativus*). W tym celu wykorzystano spektroskopię UV-Vis (do określenia ilości chlorofilu), wysokosprawną chromatografię cieczową faz odwróconych RP HPLC (by sprawdzić, czy jeden, wytypowany związek - Lilial, akumuluje się w liściach kapusty białej) oraz miareczkowanie kompleksometryczne (określenie stężenia niektórych kationów w soku komórkowym).

**Słowa kluczowe:** dydaktyka, ekologia, Olimpiada Biologiczna, proszek do prania

**Abstract:** In this paper we present the concerning scientific report, which was prepared as first requirement of the Organizing Committee of the Biology Contest for the high school students. We show how to encourage the best of high school students to follow the methodology and regime of academic research. We believe that they would take the risk to answer important question irrespective of effort required to fulfill the objectives. Our main aim was to ensure, that such project could be conducted by high school student. However it is often, that the easier project is realized instead of interesting one. We demonstrate the intransigent work. The subject proposed focus on influence of detergents (washing powder) on development of plants: white cabbage (*Brassica oleracea*) and radish (*Raphanus sativus* var. *sativus*). UV-Vis spectroscopy (determination of chlorophylls amounts), high pressure liquid chromatography (RP HPLC; investigation of Lilial accumulation in leaves) and titration (determination of magnesium ions concentration) were used.

**Keywords:** didactics, ecology, high school students the Biology Contest, washing powder

**Wstęp**

Zasady Olimpiady Biologicznej (OB) dla uczniów szkół średnich zobowiązują uczestników do przeprowadzenia pracy badawczej oraz opisanie wyników w formie plakatu, co stanowi pierwszy etap zmagania konkursowych. Tematyka projektów dotyczy wielu aspektów biologii i ekologii. Ze

względu na ograniczenia wynikające z limitu czasu oraz dostępu do aparatury badawczej są to zazwyczaj prace stosunkowo proste, często składające się jedynie z części literaturowej, uzupełnionej prostym eksperymentem, przeprowadzonym według utartego schematu. Wielu

<sup>1</sup> Projekt badawczy wykonywany przez ucznia liceum

uczniów, którzy wykazywali zainteresowanie biochemią i biologią molekularną realizowało projekty dotyczące zupełnie innej tematyki tylko ze względu na ich mniejszy stopień skomplikowania i poziom trudności. W niniejszym artykule pokazujemy, że możliwa jest realizacja projektu z zakresu biochemii i biologii molekularnej przez ucznia liceum na poziomie dorównującym wielu pracom licencjackim. Niemniej wybór tych działów biologii powinien być dostępny jedynie dla najzdolniejszych, którzy jednocześnie wykazują zainteresowanie proponowanymi zagadnieniami. Może się zdarzyć, że uczeń sam sformułuje problem, na który chciałby znaleźć odpowiedź. W takim przypadku ważną rolę odgrywa nauczyciel prowadzący, który ocenia szanse powodzenia projektu oraz możliwość jego realizacji. Podstawowym warunkiem jest tu silna motywacja ucznia przy jednoczesnym wsparciu opiekuna naukowego.

Prezentujemy wyniki projektu badawczego zatytułowanego „Wpływ detergentów na rozwój roślin uprawnych”, który był realizowany w dwóch etapach, odpowiadającym dwóm edycjom OB. W 2009 roku, w ciągu dwóch letnich miesięcy, przebadano wpływ proszku do prania na dwa gatunki roślin - kapustę białą (*Brassica oleracea*) i rzodkiewkę zwyczajną (*Raphanus sativus* var. *sativus*). Skoncentrowano się jedynie na zbadaniu wpływu detergentów na wzrost roślin oraz zawartość chlorofilu w liściach. Raport z tej części projektu dał przepustkę do dalszych etapów olimpiady, której uczeń został laureatem.

W 2010 roku postanowiliśmy skoncentrować się na potwierdzeniu wcześniejszych wyników związanych ze wzrostem oraz ilością chlorofilu jedynie na przykładzie kapusty białej (*Brassica oleracea*). Wybór tej rośliny związany był z jej charakterystyką spożywczą - jadalne liście, które potencjalnie mogły akumulować toksyny. Wydłużono też czas badań z dwóch do pięciu miesięcy. Kolejną ważną przyczyną kontynuowania badań było uzyskanie dostępu do odpowiedniej aparatury, co umożliwiło zbadanie zawartości toksycznych składników w roślinach poddanych działaniu proszku do prania. Ponadto potwierdzono wcześniejsze przypuszczenia dotyczące znacznej roli zeolitów w adsorbowaniu zarówno jonów, jak i komponentów organicznych. Konieczność rezygnacji z badań nad rzodkiewką zwyczajną (*Raphanus sativus* var. *sativus*) wynikała z ograniczenia czasowego dostępu do przyrządów pomiarowych.

Ważną częścią całego projektu było nawiązanie przez ucznia kontaktów naukowych, które umożliwiły przeprowadzenie pomiarów z wykorzystaniem trudno dostępnej aparatury. Z naszego doświadczenia wynika, że ośrodki naukowe są zazwyczaj otwarte na tego typu współpracę. Jest ona niezbędna w projektach z zakresu biochemii i biologii molekularnej.

## Opis projektu

Detergenty są stałym elementem naszej egzystencji. Specyficznym produktem chemicznym powszechnego użytku są proszki do prania. Są one rezerwuarem ogromnej ilości komponentów zarówno organicznych, jak

i nieorganicznych. Analizując skład [1] użytego w badaniach produktu jednej z czołowych marek, można wykazać obecność następujących substancji:

- soli nieorganicznych - regulujących pH, w tym wiele węglanów i fosforanów (ok. 5% masy proszku),
- enzymów lipolitycznych, glikolitycznych oraz proteolitycznych,
- glinokrzemianów - zeolitów, które są odpowiedzialne za adsorpcję wielu substancji m.in. kationów, związków organicznych [2],
- wybielaczy optycznych,
- substancji nadających zapach.

Spośród nich wytypowano 3-(4-*tert*-butylofenylo)-2-metylo-propanal (Lilial), należący do grupy substancji zapachowych, jako związek poszukiwany w liściach roślin poddanych działaniu roztworów detergentu. Decyzja o wyborze Lilialu podyktowana była kilkoma czynnikami: opisaną, znaczną toksycznością [3], możliwością zakupienia go (Fluka) oraz obecnością danych na temat identyfikacji tego związku w literaturze [4, 5], co znacznie uprościło dobór właściwej procedury. Dzięki dyrektywie [6], uchwalonej przez Parlament Europejski, istnieje obowiązek podania informacji dotyczącej zawartości poszczególnych składników zapachowych w produktach kosmetycznych. Dzięki temu wiadomo, że zawartość Lilialu w samym proszku wynosi ponad 0,01% masy całości. Jest to wartość duża, zważając na LD<sub>50</sub> tego związku, które wynosi 1,39 mg/kg masy ciała. Duża zawartość tego składnika w proszku była decydująca przy podejmowaniu decyzji o ustanowieniu Lilialu punktem odniesienia obecności toksycznych związków.

Kolejną ważną frakcją poddaną analizie były glinokrzemiany. Ich znane właściwości adsorpcyjne [2] mogły mieć znaczący wpływ na stężenie jonów i związków chemicznych w ekstraktach roślinnych. Szczególny wpływ mógł dotyczyć adsorpcji kationów niezbędnych roślinom do prawidłowego rozwoju oraz pewnych substancji organicznych naturalnie występujących w środowisku życia roślin.

Najważniejszą frakcją związków chemicznych, pod względem wpływu na wzrost roślin, były sole nieorganiczne. Występowanie ich w dużych ilościach (według producenta masa samych fosforanów stanowi około 5% masy proszku) wskazuje na potencjalnie korzystne oddziaływanie na rośliny. Nawet najlepsze nawozy zawierają w sobie mniej fosforanów od przeciętnego proszku do prania.

Eutrofizacja jest procesem wzbogacania zbiorników i cieków wodnych w substancje odżywcze, co prowadzi do ich zarastania. Wiadomo, że proces ten może być wywoływany zarówno przenawożeniem, jak i nadmiernym używaniem detergentów, co skutkuje zaburzeniami ekosystemów. Celem badań było wykazanie znaczenia wpływu nieodpowiedniego odprowadzania ścieków oraz gospodarki komunalnej na uprawiane rośliny. Powszechny w Polsce problem związany z rozwojem sieci kanalizacyjnych (szczególnie na terenach wiejskich) był podstawą do sprawdzenia, czy te zaniedbania mogą mieć konsekwencje. Przyczyną wydostawania się ścieków mogą

być awarie lub brak infrastruktury kanalizacyjnej, co skutkuje pozbywaniem się ścieków na przykład do rowów melioracyjnych często występujących w pobliżu arealów uprawnych. Największym emitentem tego typu zanieczyszczeń są jednak wielkie miasta i przemysł.

### Część eksperymentalna

W roku szkolnym 2009/2010 przeprowadzono pierwszy etap badań. W okresie letnim zasiano i obserwowano wzrost dwóch gatunków roślin - rzodkiewki zwyczajnej (*Raphanus sativus* var. *sativus*) oraz kapusty białej (*Brassica oleracea*). Szesnastego dnia po wysianiu nasion (jeden producent - W. Legutko) przepikowano rośliny do sześciu osobnych skrzynek z tą samą glebą (pH = 6,7÷6,9) i identycznymi warunkami zewnętrznymi, zapewnionymi przez użycie szklarni (według zaleceń producenta nasion). Dla każdego gatunku wyodrębniono trzy populacje, każda po 20 osobników: grupa kontrolna, grupa badana 1# oraz grupa badana 2#. Grupy kontrolne podlewane były wodą wodociągową, grupy badane 1# zamiast wody otrzymywały 0,55% roztwór wodny proszku do prania o pH = 10 (stężenie podane przez producenta detergentu jako stężenie robocze proszku), natomiast grupy badane 2# otrzymywały 0,25% roztwór tego detergentu (pH = 8,3÷8,9). Jako rozpuszczalnik posłużyła woda wodociągowa, ta sama, którą podlewano grupy kontrolne. Analiza wzrostu polegała na mierzeniu długości części nadziemnych roślin. Następnym krokiem było uzyskanie ekstraktu acetonowego [6], umożliwiającego przeprowadzenie pomiarów spektrofotometrycznych UV-Vis.

W drugim etapie badań (przeprowadzonym w roku szkolnym 2010/2011) zmodyfikowano nieznacznie procedury eksperymentalne, korzystając ze zdobytych doświadczeń oraz uwag recenzenta raportu (Olimpiada Biologiczna). Wyznaczono cztery populacje kapusty białej (*Brassica oleracea*), jedną kontrolną oraz trzy, którym podawano roztwory proszku do prania o stężeniach różniących się od stężenia roboczego (grupa badana 1; 0,55%) o rząd (grupa badana 2; 0,055%) oraz dwa rzędy wielkości (grupa badana 3; 0,0055%). Grupie kontrolnej podawano zwykłą wodę wodociągową, która posłużyła również jako rozpuszczalnik do przygotowania roztworów, którymi podlewane były rośliny z grup 1, 2 oraz 3.

Wszystkie grupy roślin były umieszczone w jednej szklarni, w tych samych warunkach cieplnych, odizolowane od opadów. Zostały wysiane, a następnie przepikowane na tej samej glebie (Substral, ziemia uniwersalna) po dwadzieścia osobników w doniczce, co spełniało wymogi rozwojowe podane przez producenta nasion (PlantiCo). Wszystkie grupy były podlewane taką samą ilością roztworów, która zależała od temperatury i potrzeb. We wrześniu nastąpił zbiór liści w celu przeprowadzenia analiz. Ekstrakty przygotowywano według dobrze opisanej procedury [7].

Szczegółowe dane dotyczące analiz ekstraktów z liści obu gatunków roślin zebrano w tabeli 1.

Do określenia ilości chlorofilu w liściach użyto zarówno klasycznego wzoru Arnona [9]:

$$C_{\text{chlorofil a+b}} = (20,2 \cdot A^{645} + 8,02 \cdot A^{662}) \cdot V \cdot (1000W)^{-1}$$

gdzie  $W$  - masa próbki (liści) [g],  $A$  - absorbancja [-],  $V$  - całkowita objętość ekstraktu [ $\text{cm}^3$ ],  $C$  - stężenie wyrażone w mg przypadających na 1 g liści użytych do przygotowania ekstraktu; jak i jego uaktualnionej wersji [10]:

$$C_{\text{chlorofil a+b}} = (17,76 \cdot A^{646} + 7,34 \cdot A^{663}) \cdot 20$$

gdzie  $C$  - stężenie chlorofilu [ $\mu\text{g/g}$  liści].

W czasie realizacji projektu wykorzystano aparaturę RP HPLC firmy Lumex z zestawem detektorów Perkin Elmer i kolumnami C-18 firmy Cosmosil. Pomiar absorbancji UV-Vis wykonano z użyciem aparatu Shimadzu 2450. W pomiarach HPLC wykorzystano rozpuszczalniki o odpowiedniej czystości. W innych badaniach użyto odczynników o jakości cz.d.a.

### Wyniki

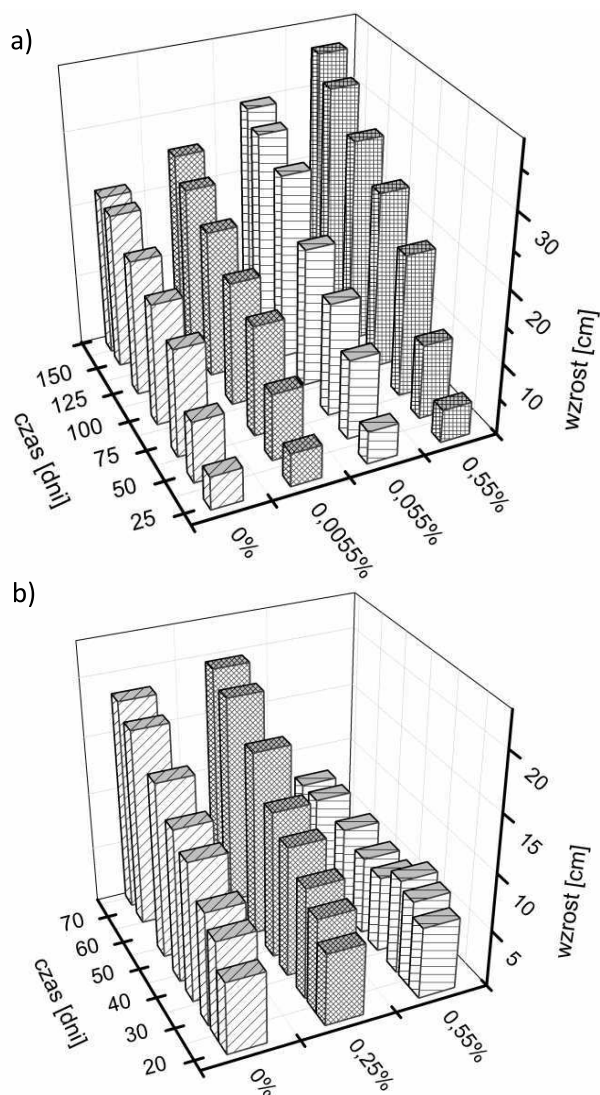
#### ETAP I (2009/2010); kapusta biała (*Brassica oleracea*) i rzodkiewka zwyczajna (*Raphanus sativus* var. *sativus*)

Roztwór detergentu o stężeniu bazowym (równym optymalnemu w procesie prania, które według producenta wynosi 0,55%) okazał się zabójczy dla rzodkiewki zwyczajnej (*Raphanus sativus* var. *sativus*), której badana populacja 1# została zniszczona. Hodowla została przerwana, ponieważ ponad 60% osobników obumarło, a różnice wzrostu w stosunku do grupy kontrolnej były bardzo duże.

Tabela 1. Szczegółowy opis przeprowadzonych analiz

Table 1. Detailed description of performed analyses

	ETAP 1		ETAP 2	
	Spektrofotometria UV-Vis		HPLC	Kompleksometria
Preparacja próbek	5 g rozdrobnionych liści, aceton lub acetonitryl (MeCN), sącdek 20 $\mu\text{m}$ [6]			1 g materiału roślinnego, stężony kwas azotowy(V), płyta elektryczna, perhydrol, woda destylowana [8]
Przebieg analizy	1. Rozcieńczenie ekstraktów rozpuszczalnikiem w stosunku 1 : 9 (1 $\text{cm}^3$ ekstraktu i 9 $\text{cm}^3$ acetonu) 2. Rejestracja widm kolejnych próbek	1. Rozcieńczenie ekstraktów rozpuszczalnikiem w stosunku 1:1 (1,5 $\text{cm}^3$ ekstraktu i 1,5 $\text{cm}^3$ rozpuszczalnika) 2. Rejestracja widm kolejnych próbek	1. Zainstalowanie kolumny w aparaturze oraz konfiguracja warunków analizy [4] 2. Umieszczenie klarownych roztworów w autosamplerze	1. Mianowanie roztworu EDTA (stężenie 0,005 $\text{mol/dm}^3$ ) 2. Przygotowanie wskaźnika - czerni eriochromowej T 3. Pięciokrotne miareczkowanie każdej próbki 0,005 molowym roztworem EDTA w obecności wskaźnika



**Rys. 1.** Wzrost pędów: a) kapusty białej i b) rzodkiewki zwyczajnej w funkcji czasu i stężenia roztworów proszku do prania, którymi podlewano badane grupy roślin. W przypadku kapusty białej wyniki uzyskane w obu etapach badań są jakościowo identyczne (pokazano wyniki z etapu drugiego)

**Fig. 1.** The growth of sprouts: a) *Brassica oleracea* and b) *Raphanus sativus* as a function of time and concentration of detergent solutions used. In case of *Brassica oleracea* the results of two series of experiments were qualitatively identical (only results for second phase of the presented studies are shown)

Grupa badana 2# wykazała natomiast nieznacznie większe długości pędu niż grupa kontrolna (rys. 1).

W badanym zakresie stężeń kapusta biała (*Brassica oleracea*) wykazuje prawie liniowe korelacje między stężeniem detergentu i szybkością wzrostu roślin. W przypadku największej ilości dostarczanego proszku (0,55%) liście zmieniły kolor na fioletowy, a jednocześnie zaobserwowano szybszy wzrost niż w grupie kontrolnej. Prawdopodobnie większe stężenie roztworów detergentu spowodowałoby zmniejszenie szybkości wzrostu (jak w przypadku rzodkiewki zwyczajnej). Proszek do prania spowodował szybszy wzrost roślin, ponieważ zawiera duże ilości fosforanów i azotanów (zawartość na jednostkę masy większa niż w przypadku nawozów rolniczych). Jednak po przekroczeniu pewnego granicznego stężenia, zależnego od badanego gatunku, zaczyna dominować toksyczność pozostałych związków chemicznych zawartych w proszku i następuje zmniejszenie szybkości wzrostu roślin.

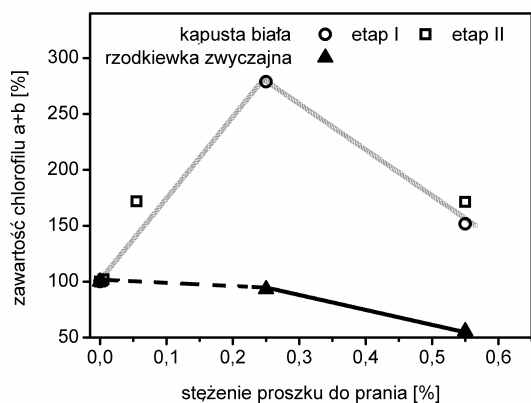
Wpływ roztworów proszku do prania na stężenie chlorofilu zależy od gatunku. Bez względu na stężenie detergentu populacje rzodkiewki negatywnie reagowały na podawane roztwory; stężenie 0,25% powodowało tylko nieznaczne zmiany w stosunku do grupy kontrolnej (tab. 2), a wpływało pozytywnie na wcześniej opisane długości pędów. Stężenie bazowe (0,55%) powodowało zmniejszenie zawartości chlorofilu o połowę w porównaniu do grupy kontrolnej.

W przypadku kapusty roztwory detergentu miały pozytywny wpływ na zawartość chlorofilu *a* i *b* w liściach. Obserwuje się wyraźne maksimum ilości chlorofilu w funkcji stężenia proszku. Co interesujące, wzrost długości pędów nie jest skorelowany ze zmianami ilości chlorofilu (rys. 2). Maksimum ilości chlorofilu obserwowane jest przy mniejszym stężeniu niż maksimum szybkości wzrostu pędów (dla kapusty poza obszarem badanych stężeń). W przypadku kapusty białej maksimum występuje przy stężeniu około 0,25% (za mało punktów pomiarowych, by jednoznacznie określić, czy zawiera się w przedziale 0,055÷0,25% czy 0,25÷0,55%), mimo że maksimum wzrostu pędu występuje przy stężeniu 0,55% proszku. W przypadku rzodkiewki zwyczajnej maksimum prawdopodobnie występuje w przedziale stężeń od 0 do 0,25%, a pierwszy punkt pomiarowy (0,25%) odpowiada już spadkowi ilości chlorofilu, co zgadza się z danymi dotyczącymi tempa wzrostu (rys. 1).

Tabela 2. Porównanie zawartości chlorofilu (oznaczone za pomocą spektroskopii UV-Vis) w grupach kontrolnych oraz podlewanych roztworami detergentu o różnych stężeniach. Wyniki uzyskane z wykorzystaniem klasycznego wzoru Arnona i jego uaktualnionej wersji różnią się bardzo nieznacznie

Table 2. The comparison of the contents of chlorophylls (according to UV-Vis measurements) in control group and in groups watered with detergent solutions of different concentrations. The results obtained with use of the Arnon equation and its improved version do not differ significantly

Procentowa zawartość chlorofilu	Rzodkiewka (etap I)			Kapusta (etap I)			Kapusta (etap II)			
	grupa kontrolna	1# 0,55%	2# 0,25%	grupa kontrolna	1# 0,55%	2# 0,25%	grupa kontrolna	1 0,55%	2 0,055%	3 0,0055%
Wzór Arnona	100	56,9	93,35	100	153,19	279,52	100	171,27	171,84	102,07
Uaktualniony wzór Arnona	100	55,65	93,26	100	151,8	278,9	100	171,29	171,86	102,05



Rys. 2. Zmiany ilości chlorofilu w zależności od stężenia roztworu proszku, którym podlewano badane rośliny

Fig. 2. Dependence of chlorophylls contents on concentration of detergent solution used

### ETAP II (2010/2011); kapusta biała (*Brassica oleracea*)

W etapie drugim powtórzono badania opisane powyżej, a ich wyniki są jakościowo identyczne. Dlatego w tej części opiszemy jedynie wyniki eksperymentów, których nie można było przeprowadzić w etapie I.

W pomiarach średnich wzrostów roślin (rys. 1) pomijano martwą część populacji. Z obserwacji wynioskowano, że detergent jest niebezpieczny dla rozwoju kapusty, ponieważ może wywoływać anomalie. Niewielka część roślin, przede wszystkim osobniki ulokowane w zagłębieniach gleby, wykazywała defekty rozwojowe. Na pozostałe osobniki proszek wpływał jak najlepszy nawóz. W trakcie analizy morfologii roślin w grupach od 1 do 3 zaobserwowano nasilenie wad wzrostu proporcjonalne do stężenia detergentu. Najczęściej pojawiały się fioletowe przebarwienia blaszek liściowych, zwinęte i skurczone blaszki oraz karłowatość części populacji. Żadnej z tych cech nie zaobserwowano w grupie kontrolnej. Przyczyną fioletowych odbarwień jest drastyczna zmiana pH gleby (pH = 6,7÷6,9) na zasadowe (pH > 8,5; pomiar papierkiem lakmusowym). Odwracalne przebarwienia części nadziemnych roślin były najprawdopodobniej związane z charakterem antocyjanów, które przy dużym pH (wywołanym większym stężeniem proszku do prania) przybierają fioletowe zabarwienie. Wysokie pH soku komórkowego bez wątpienia miało wpływ na metabolizm organizmu.

Częste chlorozy, zamieniające się w nekrozy, towarzyszyły nieustannie populacjom poddanych działaniu roztworów proszku do prania. Te objawy mogły sugerować, iż rośliny zmagają się z niedoborami żelaza i magnezu. Przyczyną mogły być zeolity [2, 8] - glinokrzemiany odpowiedzialne za zmiękczenie wody i jej uzdatnianie, czyli wiązanie jonów dodatnich, by nie powstawały nierozpuszczalne sole surfaktantów. Potwierdzeniem przypuszczeń są wyniki przeprowadzonych miareczkowań kompleksometrycznych [11]. Miareczkowanie przeprowadzono pod kątem jonów wiązanych przez kwas

etylenodiaminotetraoctowy (EDTA), które w większości pokrywają się z tymi absorbowanymi przez zeolity. W tabeli 3 pokazano uśrednione wyniki pięciu miareczkowań. Ilość zużytego, mianowanego roztworu EDTA w grupie kontrolnej przewyższa znacznie objętości dodane w grupach podlewanych roztworami proszku. Oznacza to, że ilość kationów (m.in. wapnia i magnezu) maleje wraz ze wzrostem stężenia detergentu. Nie przeliczaliśmy uzyskanych wyników bezpośrednio na zawartość jonów, ponieważ EDTA może wiązać wiele jonów obecnych w soku komórkowym, a użyty wskaźnik (czern eriochromowa T) nie jest w pełni jonoselektywny.

Tabela 3. Kompleksometryczne miareczkowanie ekstraktów z liści jednoznacznie świadczy o zmniejszeniu ilości jonów dodatnich wraz ze wzrostem stężenia roztworów detergentów

Table 3. Results of complexometric titration of extracts of leaves indicate the decrease of the cations content with the increase of the concentration of detergent used for plants watering

	Uśredniona objętość zużytego titranta (0,005 molowego EDTA) w cm <sup>3</sup>
Grupa kontrolna	22,325 cm <sup>3</sup>
1 - 0,55%	15,291 cm <sup>3</sup>
2 - 0,055%	18,631 cm <sup>3</sup>
3 - 0,0055%	19,714 cm <sup>3</sup>

Pomimo sporadycznego występowania opisanych powyżej defektów, odnotowano ogólnie pozytywny wpływ na wzrost i znacznie zwiększoną zawartość chlorofilu w grupach poddanych działaniu roztworów proszku do prania w porównaniu do populacji kontrolnej. Osoby postronne, proszone o wskazanie grupy kontrolnej, często wskazywały grupy 1 i 2 jako potencjalnie zdrowe i dobrze się rozwijające.

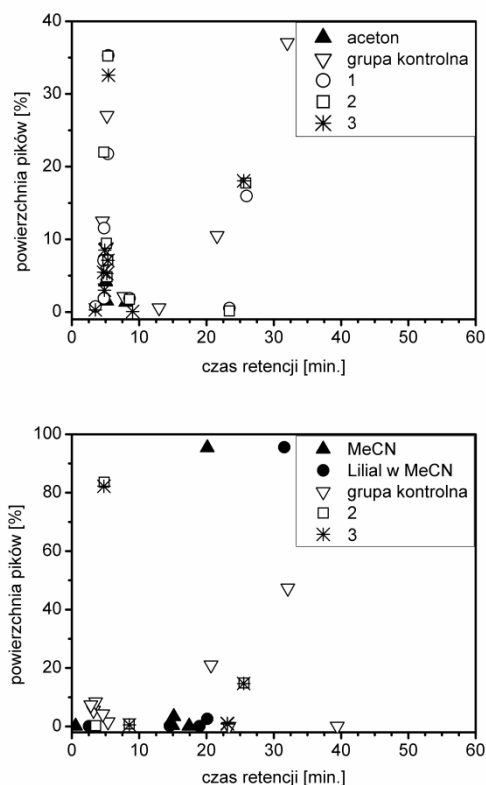
Tabela 4. Zawartość chlorofilu (suma chlorofilu a i b) [µg przypadających na jeden gram blaszki liściowej]. Dane odpowiadają wartościom pokazanym w tabeli 2

Table 4. Chlorophylls content (chlorophyll a + b) [µg per one gram of the lamina]. Data correspond to Table 2

	Zawartość chlorofilu a i b wyrażona w [µg/g blaszki liściowej]
Grupa kontrolna	316,94 (100%)
1 - 0,55%	542,9 (171,29%)
2 - 0,055%	544,6 (171,86%)
3 - 0,0055%	323,4 (102,05%)

Wszystkie widma absorbancji oraz czasy retencji (*R<sub>t</sub>*) [12] poszczególnych grup roślin, podlewanych roztworami proszku do prania, porównywano z wynikami uzyskanymi dla ekstraktów z liści grupy kontrolnej oraz czystego Liliału, rozpuszczonego zarówno w acetonitrylu (MeCN), jak i acetonie. Ważnym, nierozwiązanym, problemem był brak pasm w chromatogramie (HPLC) czystego Liliału rozpuszczonego w acetonie. Dane analityczne dla tego związku pochodzą wyłącznie z wyników uzyskanych dla ekstraktów acetonitrylowych. Pomijając jednak problemy z oznaczaniem Liliału, wyniki otrzymane w badaniach ekstraktów acetonowych i acetonitrylowych są spójne, co wynika z podobnych właściwości fizykochemicznych obu rozpuszczalników.

W przypadku acetonitrylu nie udało się przeprowadzić pomiarów HPLC dla ekstraktów grupy 1. Może to być spowodowane, statystycznie najczęstszą, degradacją roślin podlewanych 0,55% roztworem detergentu. Uszkodzone rośliny mają zaburzony metabolizm, a zatem słabiej asymilują związki chemiczne z gleby. Potwierdzeniem tego przypuszczenia są wyniki pomiarów spektrofotometrycznych, ponieważ próbka 1 wykazuje jedynie niewielki wzrost absorpcji w stosunku do kontroli. Ekstrakty z roślin grupy 2 i 3 charakteryzują się znacznym wzrostem absorpcji w zakresie długości fali  $\lambda = 220\div 320$  nm. Mogło się zdarzyć, że przez przypadek do sporządzenia ekstraktu grupy 1 użyto liści roślin zdegenerowanych, jednak bez widocznych wyraźnych objawów zewnętrznych.



**Rys. 3.** Wykresy zostały sporządzone jako funkcja % powierzchni pików od czasu retencji ( $R_t$ ). Próby nakładania nieznormalizowanych danych były niesatysfakcjonujące ze względu na liczbę pasm. Procedura ekstrakcji przeprowadzana była zawsze w ściśle określony sposób, jednak bezpośrednio porównywać można wyniki otrzymane jedynie dla tej samej próbki (były powtarzalne)

**Fig. 3.** Percentage of area of bands as a function of retention time ( $R_t$ ) is shown. Attempts to present the data without normalization were unsatisfying due to large number of bands. The extraction procedure were identical for all of the samples, however only results obtained for single sample were comparable

Na rysunku 3 przedstawiono jedynie piki o powierzchni przekraczającej 0,2%, by nie analizować danych na granicy rozdzielczości metody. Jest to również powodem absencji niektórych pików w grupach 1, 2 i 3, a szczególnie tych o małej intensywności, które były zauważalne w grupie kontrolnej. W przypadku roślin poddanych działaniu

roztworów detergentu w chromatogramach występuje więcej związków i pasm, przez co procentowy udział powierzchni pików odpowiadających naturalnym składnikom zmniejsza się. Najbardziej zaskakujące jest zanikanie, w wyniku dodania proszku, wyraźnego, szerokiego pasma, które eluowało po czasie równym około 31 minut. Można wnioskować, że nastąpiła agregacja związków chemicznych, o stosunkowo niewielkiej polarności, z czynnikami dostarczonymi w proszku. Podejrzenia padają na zeolity, których zawartość jest bardzo duża, a charakteryzują się bardzo rozwiniętą powierzchnią przypadającą na jednostkę masy. Aktywność i obecność zeolitów została potwierdzona miareczkowaniem kompleksometrycznym (tab. 3). Występuje duże prawdopodobieństwo fizykosorpcji związków na zeolitach. W takim przypadku związki te nie są ekstrahowane w przeprowadzanej procedurze i pasmo w chromatogramach zanika. Wniosek taki wymaga uwzględnienia akumulacji zeolitów nie tylko w glebie, ale i w liściach roślin. Wydaje się to mało prawdopodobne, brak jednak innego wyjaśnienia zanikania omawianego pasma.

Najważniejszym wynikiem jest zaobserwowanie dwóch nowych pasm (przy czasach retencji około 7 i 26 minut), które nie są obecne w próbie kontrolnej, a pojawiają się po podlewaniu roślin proszkiem. Nie ma wątpliwości, że pasma te odpowiadają związkom dostarczonym wraz z detergentem. Wydaje się jednak mało prawdopodobne, by był to Lilial, którego czas retencji w identycznych warunkach wynosi około 31 minut. Możliwe jest jednak, że jest to produkt metabolizmu Lilialu. Możliwe również, że absorbuje on na zeolitach, przez co jego aktywność biologiczna w proszku jest mniejsza niż w przypadku czystego związku.

Analiza wyników UV-Vis jest zdecydowanie utrudniona przez fakt, że w ultrafiolecie absorbuje wiele związków. Skutkuje to wysokimi wartościami absorpcji w zakresie od 200 do 300 nm, pomimo znacznego rozcieńczenia próbek. Uniemożliwia to jednoznaczny detekcję Lilialu, który ma maksimum absorpcji przy długości fali  $\lambda = 218$  i 225 nm (w acetonitrylu). Dalsze zmniejszanie stężenia ekstraktów uniemożliwiło określenie ilości chlorofilu w liściach (istotne pasma przy długości fali  $\lambda = 645$  i 663 nm).

Wyraźnym efektem dodania proszku jest przesunięcie maksymalnych wartości absorpcji w kierunku fal dłuższych, w porównaniu do kontroli: od około 220 do 320 nm; jest to bezpośredni dowód na działanie wybielaczy optycznych (absorbujących w tych długościach fal), które są obecne w dużych ilościach w każdym proszku.

### Podsumowanie badań

- Zauważono zdecydowanie negatywny wpływ wysokiego stężenia roztworów proszku do prania na wzrost i morfologię rzodkiewki zwyczajnej (*Raphanus sativus* var. *sativus*) oraz na zawartość chlorofilu w jej liściach.
- Zaskakująca jest pozytywna zależność wpływu stężenia roztworów proszku do prania na wzrost i zawartość chlorofilu w liściach kapusty białej (*Brassica oleracea*), potwierdzona w obu seriach badań.

- Potwierdzono obecność toksycznych komponentów w tkankach jadalnych *Brassica oleracea*, co eliminuje skażone rośliny jako pokarm. Brak jednoznaczności co do obecności Lilialu.
- Wydaje się, że zawarte w proszku zeolity są ważnym czynnikiem utrudniającym prawidłowy rozwój roślin - adsorbowane jony powodują chlorozy, nekrozy, skurczenie liści oraz inne ich niedorozwoje, które nie występowały w grupie kontrolnej.

## Wnioski

Dobrze sformułowany temat projektu badawczego jest bardzo ważnym czynnikiem motywacyjnym. W opisywanym przypadku uczeń (Wiktor Paskal) sam zasugerował, jaki problem jest dla niego interesujący. Dzięki temu pracował efektywnie. Samodzielnie określał cel pomiarów i poszukiwał metod eksperymentalnych pozwalających na jego osiągnięcie. Nie pominął próby oznaczania stopnia akumulacji w liściach związków dostarczanych z detergentem, mimo poziomu skomplikowania tego zagadnienia i konieczności wykorzystania trudno dostępnej aparatury (RP HPLC). Wszystkie eksperymenty wykonywał samodzielnie, również pomiary aparaturowe (po przeszkoleniu przez specjalistów), jedynie pod opieką osób doświadczonych (zgodnie z zasadami BHP). Dzięki temu zapoznał się z metodyką pracy badawczej (konieczność wykonania serii pomiarowej, prób kontrolnych, zachowania identycznych warunków przeprowadzania eksperymentów, rzetelności naukowej itd.) oraz zaawansowanymi technikami laboratoryjnymi (UV-Vis oraz HPLC). Dużym zaskoczeniem dla młodego naukowca była ogromna ilość danych literaturowych, z których należało wybrać jedynie te najważniejsze z punktu widzenia realizowanego projektu. Uczeń zapoznał się z angielskojęzycznymi bazami danych, takimi jak Scopus oraz ISI Web of Knowledge. Sam nawiązał współpracę z ośrodkami akademickimi. Ważnym elementem dydaktycznym było również przygotowanie raportów i prac konkursowych tak, by były jak najbardziej klarowne i przystępne dla odbiorców. Opinie otrzymane od recenzentów, wyznaczonych przez organizatorów Olimpiady

Biologicznej, były bardzo dobre zarówno w 2009, jak i 2010 roku. Ponadto jego praca została zakwalifikowana do finałów eliminacji międzynarodowego konkursu *European Union Contest for Young Scientists* (EUCYS) w 2011 roku. Jest jedną z trzynastu prac, które zostały wybrane przez recenzentów jako najlepsze w Polsce.

## Podziękowania

Składamy serdeczne podziękowania Katedrze Biotechnologii Uniwersytetu Zielonogórskiego, szczególnie jej kierownikowi - prof. UZ drowi hab. Jackowi J. Koziolowi, za udostępnienie aparatury analitycznej oraz wsparcie merytoryczne.

Jan Paczesny jest stypendystą w ramach Poddziałania 8.2.2 „Regionalne Strategie Innowacji”, Działania 8.2 „Transfer Wiedzy”, Priorytetu VIII „Regionalne Kadry Gospodarki” Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, współfinansowanego z Europejskiego Funduszu Społecznego Unii Europejskiej i z budżetu państwa (DFS.VI.3361-4-37-033/10).

## Literatura

- [1] <http://www.info-pg.com>, skład użytego detergentu.
- [2] Auerbach S.M., Carrado K.A. i Dutta P.K.: Handbook of Zeolite Science and Technology. CRC Press, 2003.
- [3] Charles A.K. i Darbre P.D.: J. Appl. Toxicol., 2008, **29**, 422-434
- [4] Villa C., Gambaro R., Dorato S. i Mariani E.: J. Pharmac. Biomed. Anal., 2007, **44**, 755-762.
- [5] Tranchida P.Q., Purcaro G., Fanali C., Dugo P., Dugo G. i Mondello L.: J. Chromatogr. A, 2010, **1217**, 4160-4166 oraz odnośniki tam zamieszczone.
- [6] Dyrektywa 2003/15/EC Parlamentu Europejskiego z dnia 27 lutego 2003 roku dotycząca kosmetyków.
- [7] Boczoń W., Brózda D. i Milecki J.: Biochemia. Wybór ćwiczeń. Wyd. Nauk. UAM, Poznań 2001.
- [8] <http://www.erep.com.pl>; [www.zcha.pwr.wroc.pl/chc2012/cw3.doc](http://www.zcha.pwr.wroc.pl/chc2012/cw3.doc).
- [9] Arnon D.I.: Plant Physiol., 1949, **24**, 1-15.
- [10] Porra R.J.: Photosynth. Res., 2002, **73**, 149-156.
- [11] Lipiec T. i Szmaj Z.S.: Chemia analityczna z elementami analizy instrumentalnej. Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 1996.
- [12] Szczepaniak W.: Metody instrumentalne w analizie chemicznej. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 1996.