



Praca oryginalna
Original paper

Krystyna Piotrowska-Weryszko¹, Kamil Wydra², Natalia Korcz²

Spektrum sporomorf pobranych z powierzchni skóry i ubrania osób w powiecie włodawskim w okresie letnim

The spectrum of sporomorphs collected from the surface of the skin and clothes of some people in Włodawa County during the summer

¹Katedra Botaniki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Polska

²Student Biologii Sadowej, Studenckie Koło Naukowe Biologów i Hodowców Zwierząt, Sekcja Biochemii, Wydział Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Polska

¹Department of Botany, University of Life Sciences in Lublin, Poland

²Student of Forensic Biology, Biology and Animal Breeders Student Research Association, Biochemistry Section, Faculty of Biology, Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, Poland

Streszczenie

Wprowadzenie: Ziarna pyłku ze względu na mikroskopijne rozmiary, wszechobecność i odporność na zniszczenie stanowią niezwykle cenny materiał biologiczny, który może być wykorzystany w postępowaniu dochodzeniowym.

Cel pracy: Określenie składu gatunkowego ziaren pyłku osadzonych na ubraniu i skórze ciała osób spacerujących w okolicach powiatu włodawskiego w okresie letnim.

Materiał i metody: Badaniom zostały poddane ziarna pyłku zdeponowane na powierzchni skóry i elementach garderoby osób spacerujących w czterech miejscowościach powiatu włodawskiego. Materiał pobierano na preparaty z taśmą dwustronnie klejącą. Skład jakościowy oraz ilościowy ziaren pyłku oceniono po analizie preparatów mikroskopowych przy powiększeniu 400-krotnym.

Wyniki: W przeprowadzonych badaniach zidentyfikowano ziarna pyłku roślin kwitnących w lecie, czyli w okresie, w jakim został przeprowadzony eksperyment. Z analizy palinologicznej wynika, że najdogodniejszym miejscem osadzania się ziaren pyłku jest powierzchnia ubrania na ramionach oraz powierzchnia skóry na przedramionach, natomiast najmniej ziaren znaleziono na powierzchni skóry na łydkach. Z analizy statystycznej wynika, że różnice w liczebności sporomorf zdeponowanych na różnych powierzchniach nie są istotne statystycznie.

Wnioski: Materiał palinologiczny zabezpieczany z podejrzanych lub ofiar powinien być pobierany z różnych części ubrania i skóry, ponieważ nie przyłącza się do nich w jednakowy sposób.

Słowa kluczowe: pyłek, palinologia kryminalistyczna, postępowanie dochodzeniowe, pobieranie prób, analiza mikroskopowa.

Abstract

Introduction: Due to their microscopic size, ubiquity, and resistance to destruction, pollen grains are an especially valuable biological material that can be used in forensic investigations.

Aim of the study: Determination of the species composition of pollen grains deposited on the clothing and skin of the people walking in Włodawa County during the summer.

Material and methods: Pollen grains deposited on the surface of the skin and garments of individuals walking in four villages of Włodawa County were analysed. The material was sampled using two-sided adhesive tape. The qualitative and quantitative composition of pollen grains was evaluated after analysis of microscopic slides at 400-x magnification.

Results: In the present investigations, we identified pollen grains of plants flowering in summer, i.e. in the experimental period. The palynological analyses indicate that the surface of clothes on the shoulders and the surface of the forearm skin are the most suitable areas for deposition of pollen grains, whereas the lowest amounts of pollen were noted on the calves. The statistical analysis shows that the differences in the number of sporomorphs deposited on the different surfaces are not statistically significant.

Conclusions: Palynological material collected from suspects or victims should be taken from various parts of clothing and skin, because it does not attach to them in the same way.

Key words: pollen, forensic palynology, investigation proceeding, sampling, microscopic analysis.

Wprowadzenie

Palinologia kryminalistyczna to nauka zajmująca się badaniem ziaren pyłku oraz zarodników, które mogą stanowić materiał dowodowy w kontekście postępowania dochodzeniowego. Mimo że pierwsze wzmianki o zastosowaniu palinologii kryminalistycznej pochodzą z lat 40. XX w., jest ona rzadko stosowana w praktyce. Obecnie ziarna pyłku są zabezpieczane i wykorzystywane w sprawach karnych w Nowej Zelandii, Australii i Wielkiej Brytanii [1, 2]. Przydatność ziaren pyłku w badaniach kryminalistycznych wynika z kilku charakterystycznych cech. Po pierwsze są one niezwykle odporne na zniszczenie, gdyż zewnętrzna warstwa ściany ziaren pyłku (egzyna) utworzona jest z substancji organicznej zwanej sporopoleniną. Dzięki niej pyłek i zarodniki paprotników szczególnie dobrze zachowują się w stanie kopalnym przez dziesiątki tysięcy lat. Badania laboratoryjne wykazały, że materiał ten nie ulega zniszczeniu, gdy ogrzeje się go do temperatury 300°C oraz nie wywołują jego destrukcji nawet stężone kwasy i zasady [3]. Kolejnym faktem przemawiającym za stosowaniem ziaren pyłku w związku z postępowaniem dochodzeniowym są ich rozmiary, które mieszczą się w zakresie 7–250 µm, przy czym najczęściej spotykane ziarna pyłku mają wielkość 20–60 µm. Są to struktury, których nie można dostrzec gołym okiem, a przestępcy nie wiedzą, że zabierają dowód ze sobą, np. na obuwiu lub odzieży. Poza tym każda pora roku i każdy region geograficzny charakteryzują się innym zestawem ziaren pyłku, które prawidłowo sklasyfikowane naprowadzają badaczy na konkretny rodzaj lub gatunek rośliny macierzystej [3, 4]. Ziarna pyłku i zarodniki osadzają się na wszystkim, z czym mają kontakt, i łatwo utrzymują się na różnych nośnikach. Może to być ciało

Introduction

Forensic palynology is a science examining pollen grains and spores, which can provide evidence in forensic proceedings. Although forensic palynology was first mentioned from the 1940s, it is still seldom applied in practice. Currently, pollen grains are secured and used in forensic investigations in New Zealand, Australia, and Great Britain [1, 2]. The suitability of pollen in forensic proceedings is facilitated by several traits of this material. Pollen grains are extremely resistant to damage because the outer layer of the pollen grain wall (exine) is formed by an organic compound called sporopollenin. It efficiently conserves fossil pollen and fern spores for tens of thousands of years. Laboratory tests have shown that the material is not damaged when exposed to temperatures of up to 300°C or by even highly concentrated acids and bases [3]. Another argument for the use of pollen grains in forensic investigations is their size, ranging from 7 to 250 µm, with the most common size of 20–60 µm. These structures cannot be seen with the naked eye, and criminals are not aware of the fact that they carry the evidence on their footwear or clothes. Also, each season and each geographic region is characterised by a different set of pollen grains; when classified properly, they prompt researchers about a particular genus or species of parent plant [3, 4]. Pollen grains and spores are deposited on any object with which they have contact and persist on various carriers, e.g. the human body, clothes, and other items. Pollen grains and spores can be deposited

człowieka, jego ubranie, a także różnego rodzaju przedmioty. Ziarna pyłku i zarodniki mogą osadzać się na człowieku, przez co każda osoba mająca kontakt z tymi strukturami może być ich biernym nośnikiem. Podczas oddychania ziarna pyłku wchłaniane są do układu oddechowego i osadzone głównie w przestrzeni nosowo-gardłowej [5, 6]. Przydatność palinologii w praktyce śledczej została wielokrotnie potwierdzona [7–12]. Ziarna pyłku mające kryminalistyczne znaczenie najczęściej ujawniane są na odzieży, obuwiu z pozostałościami ziemi i innych obiektach, w tym także na zewnętrznych elementach pojazdów: karoserii, oponach, nadkolach, jak i wewnętrznych: wykładzinach tapicerskich, podłogach, pedałach sprzęgła, hamulca nożnego i gazu. Zarówno ziarna pyłku, jak i zarodniki znajdujące się pierwotnie na miejscu zdarzenia, z powodu łatwego wiązania się z każdym podłożem, mogą znajdować się np. na odzieży sprawcy i ofiary, podczas pokonywania drogi do miejsca przestępstwa, ucieczki, walki czy przemieszczania ofiary w inne miejsce [13]. Dzięki analizie pyłkowej można uzyskać odpowiedzi na pytania, gdzie i w jakim czasie doszło do zdarzenia będącego przedmiotem procesu śledczego. Palinologia kryminalistyczna pozwala:

- a) powiązać podejrzanego z miejscem zdarzenia albo miejscem ujawnienia (np. zwłok),
- b) powiązać dowód rzeczowy zabezpieczony na miejscu zdarzenia albo miejscu ujawnienia z podejrzanym,
- c) potwierdzić lub wykluczyć alibi osoby podejrzanej o popełnienie zarzucanego jej czynu,
- d) zawęzić grupę podejrzanych,
- e) ustalić drogę, jaką przebyły dowody (np. substancje psychotropowe lub narkotyki),
- f) uzyskać informacje na temat środowiska, z którego pochodzi dowód rzeczowy,
- g) ustalić lokalizację ukrytych grobów oraz szczątków ludzkich,
- h) ustalić, co działo się z ofiarą zabójstwa przed śmiercią,
- i) powiązać miejsce ujawnienia zwłok z miejscem, w którym doszło do zabójstwa. Dogłębna analiza pozwoli odpowiedzieć na pytanie, czy śmierć nastąpiła w miejscu, gdzie znaleziono ciało, czy ciało zostało przeniesione do tej lokalizacji. Ziarna pyłku pobrane w wymazie z nosa mogą również potwierdzić, czy ofiara jeszcze żyła, gdy została pozostawiona w danym miejscu,
- j) określić czas wydarzenia, w tym ściśle określić miesiąc bądź porę roku [1, 8, 13–15].

on the human body; hence, each person in contact with these structures can be a passive carrier. During respiration, pollen grains are inhaled into the respiratory tract and deposited mainly in the nasopharyngeal area [5, 6]. The usefulness of palynology in forensic practice has been repeatedly proven [7–12]. Pollen grains with forensic importance are usually detected on clothes, soil-bearing footwear, and other objects, including car exterior elements such as the bodywork, tyres, and inner wheel arches and car interior equipment such as upholstery, floor, and foot pedals. Given the ease of attachment to any substrate, pollen grains and spores that are initially present at the scene of the crime can be carried on the clothing of the perpetrator and the victim while escaping from the scene of the crime, fighting, or moving the victim to another place [13]. Analysis of pollen provides answers to questions about the place and time of the investigated crime. Forensic palynology facilitates:

- a) association of the suspect with the scene of the crime or discovery of e.g. the victim's body,
- b) association of the material evidence secured at the scene of the crime or discovery with the suspect,
- c) confirmation or exclusion of the alleged suspect's alibi,
- d) limitation of the number of suspects,
- e) determination of the route covered by physical evidence (e.g. psychotropic substances or drugs),
- f) acquisition of information about the environment of origin of the material evidence,
- g) localisation of hidden graves and human remains,
- h) determination of the fate of the victim before death,
- i) association of the site of body discovery with the actual crime scene. Detailed analysis provides answers to the question of whether the victim died at the discovery site or whether he/she was brought to that location. Pollen grains collected from the nasal swab can confirm whether the victim was still alive at the time he/she was left at the site of finding thereof.
- j) determination of the time of the crime, even the exact month or season of the year [1, 8, 13–15].

Kluczową rolę w przypadku badań z zakresu palinologii kryminalistycznej odgrywa sposób zabezpieczenia śladów biologicznych. Próbkę powinny być przechowywane w sterylnych pojemnikach. Materiał roślinny do wykonania preparatów porównawczych należy pakować w torebki lub papierowe koperty, a następnie wysuszyć. Próby z odzieży pobiera się za pomocą specjalnych grzebyków do wyczesywania ziaren pyłku. Można także stosować szkiełka podstawowe z naklejoną przezroczystą taśmą obustronnie klejącą. Tak przygotowany materiał palinolog analizuje za pomocą mikroskopu. Ważne jest także, aby na miejscu zdarzenia wykonać dokumentację fotograficzną zarówno miejsca pobrania materiału, jak i otoczenia, z uwzględnieniem rosnącej w pobliżu roślinności [8, 12, 14].

Cel pracy

Celem pracy było określenie składu gatunkowego ziaren pyłku osadzonych na ubraniu i skórze ciała osób przemieszczających się w okolicach powiatu włodawskiego w okresie letnim.

Materiał i metody

Badania prowadzono na terenie powiatu włodawskiego w czterech miejscowościach: Zamołodycze, Nowy Brus, Włodawa, Okuninka w 2016 r. w okresie 5–7.07 i 10.07 (pierwsza seria badań) oraz 5–8.08 (druga seria badań). W poszczególnych miejscowościach w eksperymencie uczestniczyły po 2 osoby, które spacerowały w godzinach popołudniowych przez godzinę każdego dnia badań (w sumie 16 powtórzeń). W miejscowości Zamołodycze i Nowy Brus osoby spacerowały poboczem drogi powiatowej, natomiast we Włodawie po chodniku przy drodze powiatowej, a w Okunince po chodniku znajdującym się w pobliżu jeziora, pomiędzy plażą a ośrodkami wypoczynkowymi.

W celu pobrania ziaren pyłku na szkiełku podstawowym umieszczono dwucentymetrowe fragmenty przezroczystej taśmy dwustronnie klejącej. Następnie tak przygotowany preparat przykładano do ubrań i powierzchni skóry osób biorących udział w badaniach. Osoby uczestniczące w badaniach miały na sobie spodnie do połowy łydki i bluzkę z krótkim rękawem. Od każdej z osób pobrano 5 próbek z następujących części ciała i odzieży:

- z zewnętrznej części nogawki spodni w okolicy łydki,
- z zewnętrznej części nogawki spodni w okolicy uda,
- z powierzchni skóry na łydkach,
- z powierzchni bluzki na ramionach,
- z powierzchni skóry na przedramionach.

A key role in forensic palynology is played by the mode of securing biological material. Samples should be stored in sterile containers. Plant material should be packed in bags or paper envelopes and dried. Samples from clothes are collected with the use of pollen brushes. Microscope slides with transparent adhesive tape on both sides can be used as well. Material prepared in this way is analysed by a palynologist under a microscope. It is also important to make photographic documentation at the material sampling site and from the environment with surrounding vegetation [8, 12, 14].

Aim of study

The aim of the study was to determine the species composition of pollen grains deposited on the clothing and skin of the bodies of people walking in Włodawa County in summer.

Material and methods

The investigations were conducted in four villages of Włodawa County: Zamołodycze, Nowy Brus, Włodawa, and Okuninka in 2016 between 5–7.07 and 10.07 (first investigation series) and from 5.08 to 8.08 (second series). In each locality, 2 participants of the study walked for an hour every day (total 16 repetitions). They walked along the side of a county road in Zamołodycze and Nowy Brus, along a pavement near a county road in Włodawa, and along a pavement near a lake between the beach and resorts in Okuninka.

Two-millimetre fragments of a transparent two-sided adhesive tape were placed on a microscopic slide to collect pollen grains. The slide prepared in this way was applied to the clothes and skin surface of the investigation participants. The participants of the study were wearing mid-calf trousers and a short-sleeved shirt/blouse. Five samples were collected from each person from the following parts of the body and clothes:

- the outer side of the trouser leg in the calf area,
- the outer side of the trouser leg in the thigh area,
- the calf skin surface,
- the blouse surface in the shoulder area,
- the forearm skin surface.

Każdy preparat opisano, uwzględniając następujące dane: miejsce, datę, godzinę, numer osoby biorącej udział w badaniu, drogę, po której spacerowano, oraz fragment ciała, z którego został pobrany materiał do badań. W celu uzyskania porównawczego materiału palinologicznego podczas spaceru inna osoba zbierała w papierowe koperty kwiatostany roślin aktualnie kwitnących. Następnie w laboratorium wykonano z nich preparaty porównawcze.

Z uzyskanych próbek przygotowano preparaty mikroskopowe. Do tego celu zastosowano glicerożelatynę zabarwioną fuksyną zasadową, która wybarwiła ziarna pyłku na kolor różowy. Zastosowanie fuksyny umożliwiło dokładniejsze obserwacje szczegółów budowy ziaren pyłku i dzięki temu łatwiejsze ich rozpoznanie. Preparaty analizowano z zastosowaniem mikroskopu świetlnego przy powiększeniu 400x. Oznaczenie taksonomiczne sporomorf opierało się na unikalnej i charakterystycznej budowie egzyny. Przy klasyfikacji ziaren pyłku brano również pod uwagę następujące cechy budowy: wielkość i kształt ziarna, rodzaj, liczbę i ułożenie apertur. Do rozpoznawania ziaren pyłku wykorzystano preparaty porównawcze oraz atlasy pyłkowe [16, 17].

Zastosowano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa do sprawdzenia, czy różnice w liczebności sporomorf zdeponowanych na różnych powierzchniach są istotne statystycznie, oraz test U Manna-Whitneya dla porównania dwóch serii badań.

Wyniki

Na terenie przeprowadzonych badań oznaczono różne gatunki roślin drzewiastych i zielnych – zestawiono je w tabeli I. We wszystkich miejscowościach występowała sosna zwyczajna oraz lipa drobnolistna lub szerokolistna.

Podczas prowadzonych badań przygotowano i przeanalizowano łącznie 80 preparatów mikroskopowych z ziarnami pyłku pobranymi z odzieży i ciała osób biorących udział w eksperymencie. Zidentyfikowano sporomorfy należące do 15 taksonów roślin. W pierwszej serii badań przeprowadzonej w lipcu oznaczono 8 typów ziaren pyłku oraz zarodniki paproci nercznicy samczej (*Dryopteris filix-mas*), które obok ziaren pyłku traw (*Poaceae*) były najliczniej reprezentowane w analizowanych próbach (ryc. 1).

Each sample was described with the following data: location, date, time, participant's number, walking route, and area of the body from which the analysis material was collected. To obtain comparative palynological material, inflorescences of plants flowering at that time were collected in paper envelopes by another person. They were later used for preparation of comparative slides in the laboratory.

Microscopic slides were prepared from the collected samples. Glycerinated gelatine with basic fuchsin was used to stain the pollen grains pink. The use of fuchsin facilitated detailed observation of the pollen grain structure and contributed to easier identification thereof. The preparations were analysed under a light microscope at 400x magnification. The taxonomic determination of the sporomorphs was based on the unique and characteristic structure of exine. The classification of the pollen grains was based on the following structural traits: the size and shape of grains and the type, number, and arrangement of apertures. The pollen grains were identified with the use of comparative slides and pollen atlases [16, 17].

The non-parametric Kruskal-Wallis test was used to check whether the differences in the number of sporomorphs deposited on different surfaces are statistically significant, and the Mann-Whitney U test was used for the comparison of two series of research.

Results

Varied species of arborescent and herbaceous plants were fixed in the area where the investigations were carried out; they are listed in Table I. *Pinus silvestris* and *Tilia cordata* or *T. platyphyllos* occurred in all localities.

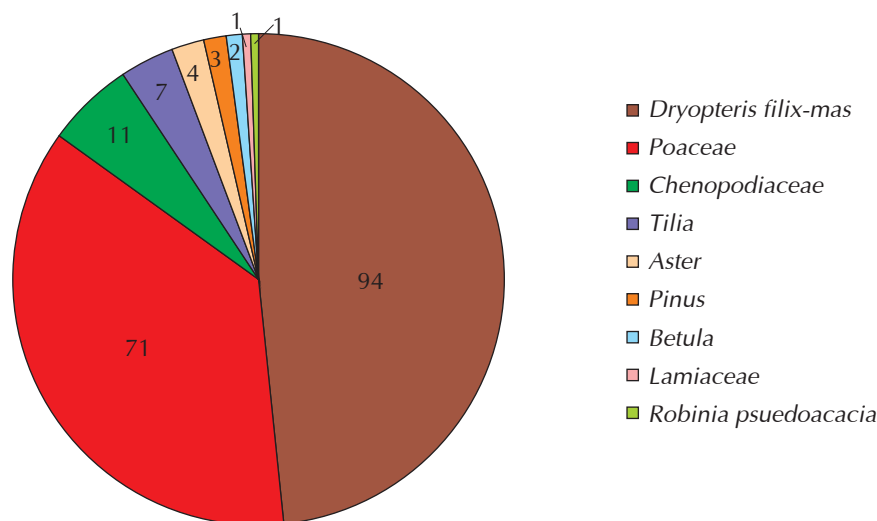
The investigations involved analysis of 80 microscopic slides with pollen grains collected from the clothing and bodies of people participating in the experiment. Sporomorphs of 15 plant taxa were identified. In the first series conducted in July, 8 types of pollen grains and spores of the male fern (*Dryopteris filix-mas*) were identified; besides grass (*Poaceae*) pollen, they were characterised by the greatest abundance in the analysed samples (Fig. 1).

Tabela I. Wykaz gatunków roślin występujących na terenie badań
Table I. List of species of plants growing in the research area

Gatunek Species	Włodawa	Nowy Brus	Zamołodycze	Okuninka
Sosna zwyczajna (<i>Pinus sylvestris</i>)	x	x	x	x
Świerk pospolity (<i>Picea abies</i>)	x	x		x
Modrzew europejski (<i>Larix decidua</i>)	x			
Żywotnik zachodni 'Smaragd' (<i>Thuja occidentalis</i> 'Smaragd')	x			
Leszczyna pospolita (<i>Corylus avellana</i>)			x	
Brzoza brodawkowata (<i>Betula verrucosa</i>)			x	x
Dąb szypułkowy (<i>Quercus robur</i>)		x		
Buk pospolity (<i>Fagus sylvatica</i>)		x		x
Wierzba biała (<i>Salix alba</i>)			x	x
Klon jawor (<i>Acer pseudoplatanus</i>)		x	x	
Klon zwyczajny (<i>Acer platanoides</i>)	x			
Lipa drobnolistna (<i>Tilia cordata</i>)	x			x
Lipa szerokolistna (<i>Tilia platyphyllos</i>)	x	x	x	
Wiąz pospolity (<i>Ulmus minor</i>)				x
Robinia akacjowa (<i>Robinia pseudoacacia</i>)		x		
Kasztanowiec zwyczajny (<i>Aesculus hippocastanum</i>)			x	x
Śliwa tarnina (<i>Prunus spinosa</i>)	x			
Czeremcha amerykańska (<i>Prunus serotina</i>)			x	x
Róża pomarszczona (<i>Rosa rugosa</i>)			x	
Berberys zwyczajny (<i>Berberis vulgaris</i>)	x			
Sumak octowiec (<i>Rhus typhina</i>)	x			
Pokrzywa zwyczajna (<i>Urtica dioica</i>)	x	x	x	
Komosa biała (<i>Chenopodium album</i>)	x		x	
Szarłat szorstki (<i>Amaranthus retroflexus</i>)	x			
Babka lancetowata (<i>Plantago lanceolata</i>)	x	x		
Babka zwyczajna (<i>Plantago major</i>)			x	
Szczaw zwyczajny (<i>Rumex acetosa</i>)		x		
Szczaw rozpierzchły (<i>Rumex thyrsiflorus</i>)			x	x
Bylica piołun (<i>Artemisia absinthium</i>)			x	
Rumianek pospolity (<i>Matricaria chamomilla</i>)		x		x
Rumianek bezpromieniowy (<i>Matricaria discoidea</i>)			x	
Stokrotka pospolita (<i>Bellis perennis</i>)	x	x		
Chaber bławatek (<i>Centaurea cyanus</i>)			x	
Mydlnica lekarska (<i>Saponaria officinalis</i>)			x	
Powój polny (<i>Convolvulus arvensis</i>)	x		x	

Tabela I. Cd.
Table I. Cont.

Gatunek Species	Włodawa	Nowy Brus	Zamołodycze	Okuninka
Pięciornik pośredni (<i>Potentilla intermedia</i>)	x			
Liliowiec pospolity (<i>Hemerocallis x hybrida</i>)			x	
Turzyca pospolita (<i>Carex nigra</i>)		x		x
Wiechlina zwyczajna (<i>Poa trivialis</i>)	x		x	x
Wiechlina spłaszczona (<i>Poa compressa</i>)		x		
Życica trwała (<i>Lolium perenne</i>)		x		
Szczotlika siwa (<i>Corynephorus canescens</i>)		x	x	
Trzcinnik piaskowy (<i>Calamagrostis epigejos</i>)		x	x	x
Śmiątek pogięty (<i>Deschampsia flexuosa</i>)		x	x	
Kupkówka pospolita (<i>Dactylis glomerata</i>)	x		x	x
Trzcina pospolita (<i>Phragmites communis</i>)				x
Nerecznica samcza (<i>Dryopteris filix-mas</i>)				x

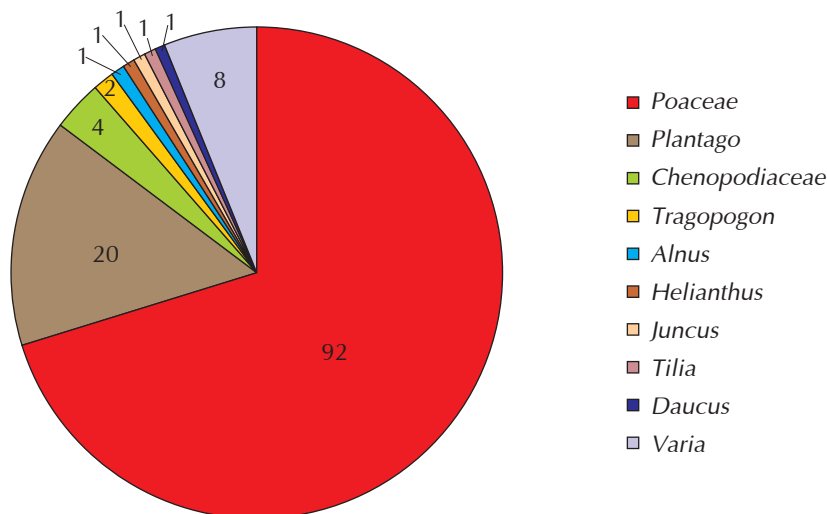


Ryc. 1. Porównanie liczby ziaren pyłku i zarodników poszczególnych taksonów oznaczonych w próbach palinologicznych w pierwszej serii badań

Fig. 1. Comparison of the number of pollen grains and spores of taxa identified in the palynological samples in the first sampling series

W próbach palinologicznych z wymienionego okresu w znacznie mniejszych ilościach występowały ziarna pyłku należące do następujących taksonów: komosowatych (*Chenopodiaceae*), lipy (*Tilia*), astra (*Aster*), sosny (*Pinus*), brzozy (*Betula*), jasnotowatych (*Lamiaceae*) i grochodrzewu (*Robinia*) (ryc. 1).

The palynological samples collected in the period mentioned above contained substantially fewer pollen grains from the following taxa: *Chenopodiaceae*, linden (*Tilia*), aster (*Aster*), pine (*Pinus*), birch (*Betula*), *Lamiaceae*, and black locust (*Robinia*) (Fig. 1).



Ryc. 2. Porównanie liczby ziaren pyłku poszczególnych taksonów oznaczonych w próbach palinologicznych w drugiej serii badań

Fig. 2. Comparison of the number of pollen grains and spores of taxa identified in the palynological samples in the second sampling series

W drugiej serii badań przeprowadzonej w sierpniu oznaczono 9 typów pyłku oraz sporomorfy zdegradowane, niemożliwe do rozpoznania, które określono jako *Varia*. Wśród ziaren pyłku w próbach palinologicznych dominowały trawy, w mniejszym stopniu zanotowano obecność babki (*Plantago*), nieliczne ziarna *Chenopodiaceae* oraz pojedyncze ziarna kozibrodu (*Tragopogon*), słonecznika (*Helianthus*), situ (*Juncus*), marchwi (*Daucus*), lipy (*Tilia*) i olszy (*Alnus*) (ryc. 2).

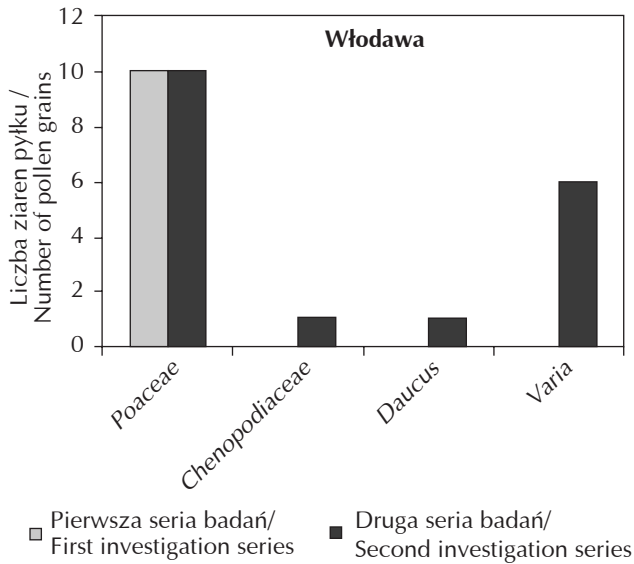
W próbach pochodzących z miejscowości Włodawa, Nowy Brus i Zamołodycze dominowały ziarna pyłku traw, natomiast w Okunince stwierdzono najwięcej zarodników paproci *Dryopteris filix-mas* (ryc. 3–6). Najmniejsze zróżnicowanie taksonomiczne spektrum pyłkowego wykazano we Włodawie oraz w Nowym Brusie (w drugiej serii badań) (ryc. 3–4). We wsi Zamołodycze oznaczono oprócz ziaren pyłku traw także znaczne ilości ziaren pyłku *Chenopodiaceae*, *Tilia* i *Plantago* (ryc. 5).

Z porównania liczby sporomorf zdeponowanych na różnych powierzchniach wynika, że średnio najwięcej ich występowało na bluzce na ramionach oraz na skórze na przedramionach, natomiast najmniej na powierzchni skóry na łydkach. Najwięcej zarodników paproci stwierdzono również na tych samych

In the second sampling series conducted in August, 9 types of pollen were identified, and any degraded sporomorphs that were impossible to identify were found and classified as *Varia*. The pollen grains in the palynological samples were dominated by grasses; there was also lower abundance of plantain (*Plantago*), a few pollen grains of *Chenopodiaceae*, and single grains of goatsbeard (*Tragopogon*), sunflower (*Helianthus*), rush (*Juncus*), carrot (*Daucus*), linden (*Tilia*), and alder (*Alnus*) (Fig. 2).

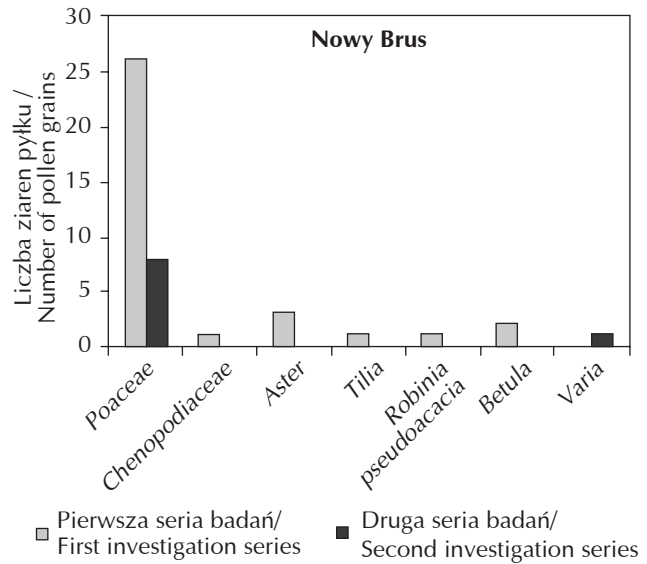
The samples collected in Włodawa, Nowy Brus, and Zamołodycze were dominated by grass pollen grains, whereas the samples from Okuninka contained the greatest numbers of *Dryopteris filix-mas* spores (Fig. 3–6). The lowest taxonomic diversity of the pollen spectrum was demonstrated in the samples from Włodawa and Nowy Brus (second sampling series) (Fig. 3–4). In Zamołodycze, significant numbers of *Chenopodiaceae*, *Tilia*, and *Plantago* pollen grains were detected besides grass pollen (Fig. 5).

The comparison of the abundance of sporomorphs deposited on the different surfaces demonstrated the presence of the highest mean number of sporomorphs on the shoulder area of the shirt/blouse and on the forearm skin, while the lowest amounts were observed on the skin of participants'



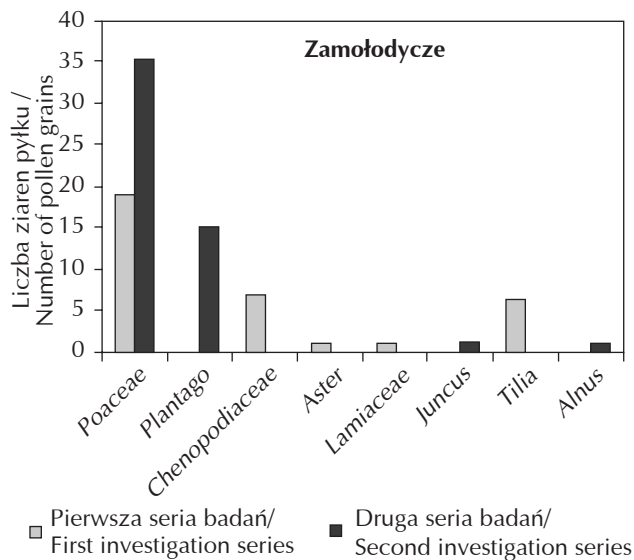
Ryc. 3. Ilościowy rozkład ziaren pyłku poszczególnych taksonów roślin określonych w próbach z miejscowości Włodawa

Fig. 3. Quantitative distribution of pollen grains of plant taxa identified in Włodawa samples



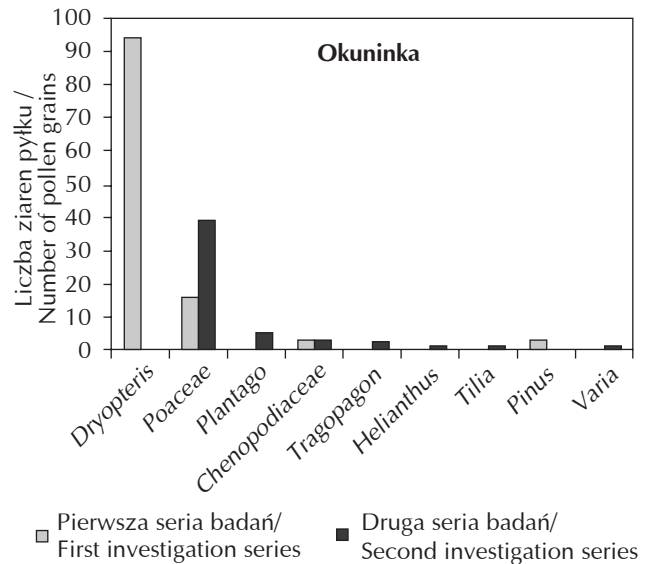
Ryc. 4. Ilościowy rozkład ziaren pyłku poszczególnych taksonów roślin określonych w próbach z miejscowości Nowy Brus

Fig. 4. Quantitative distribution of pollen grains of plant taxa identified in Nowy Brus samples



Ryc. 5. Ilościowy rozkład ziaren pyłku poszczególnych taksonów roślin określonych w próbach z miejscowości Zamolodycze

Fig. 5. Quantitative distribution of pollen grains of plant taxa identified in Zamolodycze samples

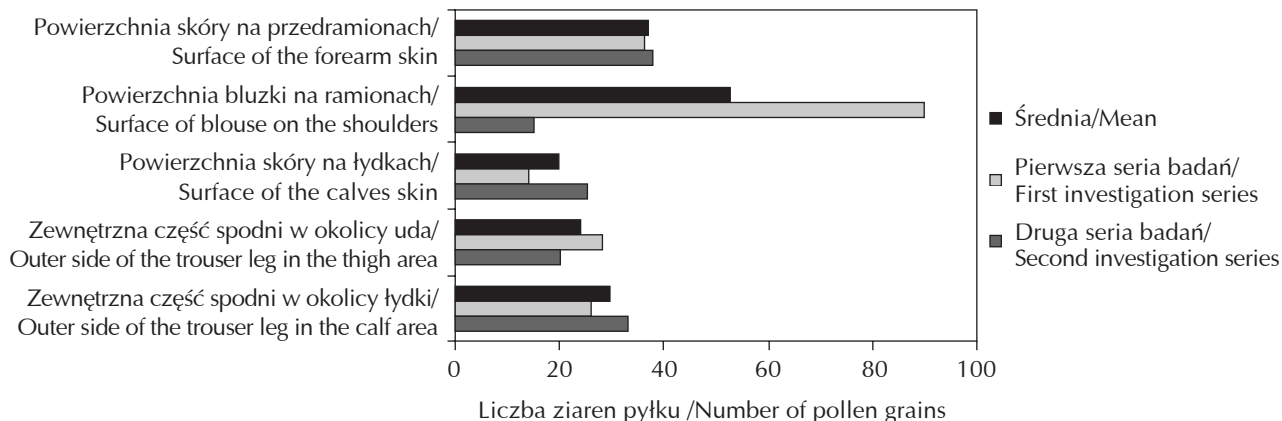


Ryc. 6. Ilościowy rozkład zarodników paproci oraz ziaren pyłku poszczególnych taksonów roślin określonych w próbach z miejscowości Okuninka

Fig. 6. Quantitative distribution of fern spores and pollen grains of plant taxa identified in Okuninka samples

powierzchniach, natomiast na pozostałych stwierdzono pojedyncze zarodniki. Wśród ziaren pyłku pochodzących z badanych powierzchni dominowały ziarna pyłku traw. Wynik testu Kruskala-Wallisa wskazuje brak istotnych statystycznie różnic w li-

calves. Also, the most spores of fern were found in the same places, while on the other sampling surfaces, single spores were determined. Grass grains predominated among the pollen grains from the studied areas. The Kruskal-Wallis test result indicates no sta-



Ryc. 7. Porównanie liczby ziaren pyłku oznaczonych w próbach pochodzących z różnych części ciała i garderoby
Fig. 7. Comparison of the number of pollen grains in samples collected from different parts of participants' bodies and clothes

czebności sporomorf zdeponowanych na badanych powierzchniach ($H = 1,51$; $p = 0,8248$). Szczegółowa analiza danych pokazuje, że występowały różnice w liczebności ziaren pyłku oznaczonych na różnych powierzchniach w zależności od okresu prowadzonego doświadczenia (ryc. 7). W pierwszej serii badań najwięcej ziaren pyłku określono na powierzchni bluzki na ramionach, natomiast w drugiej serii w tym miejscu oznaczono ich najmniej. W pozostałych miejscach pobierania prób stwierdzono stosunkowo liczne ziarna pyłku, a różnice między seriami badań były znacznie mniejsze (ryc. 7). Na podstawie analizy wyników testu U Manna Whitneya stwierdzono, że nie ma istotnych różnic pomiędzy seriami badań ($z = -0,34$; $p = 0,73$).

Dyskusja i wnioski

Przeprowadzone badania potwierdzają, że wyniki analizy pyłkowej wykorzystywane w procesie dochodzeniowym dostarczają cennych informacji, które mogą mieć istotny wpływ na przebieg śledztwa.

Większość typów pyłku oznaczonych w analizach pochodziła z roślin wiatropylnych, których pyłek uwalniany jest do atmosfery w ogromnych ilościach i unosi się w niej w określonym czasie, ściśle związanym z okresem kwitnienia. Kolejność pojawiania się ziaren pyłku poszczególnych taksonów roślin jest sezonowa i co roku taka sama. Na podstawie zawartości ziaren pyłku w powietrzu konstruuje się kalendarze pyłkowe, które są charakterystyczne dla poszczególnych regio-

tistically significant differences in the number of sporomorphs deposited on the tested surfaces ($H = 1.51$; $p = 0.8248$). Detailed analysis of the data revealed differences in the number of pollen grains sampled from the different surfaces depending on the experimental period (Fig. 7). In the first investigation series, the highest numbers of sporomorphs were found on the blouse shoulder area, whereas the lowest amount of pollen was recorded in this area in the second series. In the other sampling areas there were relatively abundant pollen grains, and the differences between the series were significantly smaller (Fig. 7). Based on the analysis of the Mann-Whitney U test results, it was found that there are no significant differences between the two series of research ($z = -0.34$; $p = 0.73$).

Discussion and conclusions

This study confirms that pollen analyses employed in the forensic practice provide valuable information that can significantly influence the course of investigation proceedings.

The majority of pollen types identified in these analyses originated from anemophilous plants, which release large amounts of pollen into the atmosphere, and which persist for a specified time strictly linked with the flowering season. The order of appearance of pollen grains of plant taxa is seasonal and does not differ between years. Based on the air-borne pollen content, pollen calendars, which are specific to each region, are de-

nów [18, 19]. Kalendarze pyłkowe przedstawiają średni przebieg sezonów pyłkowych dla poszczególnych taksonów roślin. Mają zastosowanie przede wszystkim w alergologii przy diagnozowaniu i kontroli leczenia alergii pyłkowej oraz w fenologii, a ostatnio w badaniach związanych ze zmianami klimatu [20–22]. W palinologii kryminalistycznej wykorzystywane są do określenia czasu zdarzenia na podstawie okresów występowania pyłku danego taksonu w powietrzu [23, 24].

Zarówno w czasie pierwszej, jak i drugiej serii badań zidentyfikowano sporomorfy roślin kwitnących latem, czyli w okresie, w jakim materiał został pobrany. Z analizy otrzymanych wyników w zestawieniu z kalendarzem pyłkowym można określić z dużym prawdopodobieństwem czas zdarzenia. Z kalendarza pyłkowego skonstruowanego dla Lubelszczyzny wynika, że pyłek traw obecny jest w powietrzu w okresie od początku maja do początku października, z najwyższymi stężeniami w lipcu. Pyłek komosowatych (*Chenopodiaceae*) występuje głównie w lipcu i sierpniu, a pojedyncze ziarna pyłku roślin należących do tej rodziny notowane są też pod koniec czerwca i we wrześniu. Ziarna pyłku babki (*Plantago*) rejestrowane są w atmosferze od początku maja do połowy września, a pyłek astrowatych od końca czerwca do końca września. Stosunkowo krótki sezon pyłkowy jest charakterystyczny dla lipy (*Tilia*), gdyż trwa od połowy czerwca do końca lipca [25]. Ziarna pyłku lipy zarejestrowane w pierwszej serii badań wskazują z dużą dokładnością na przedział czasowy, w którym mogło dojść do zdarzenia. Ze względu na charakterystyczne cechy budowy, pyłek niektórych drzew kwitnących wiosną (m.in. *Alnus*, *Betula*, *Pinus*) długo utrzymuje się w powietrzu. Może być przenoszony na duże odległości i w niewielkich ilościach notowany przez cały rok [25]. Pojedyncze ziarna pyłku tych roślin oznaczone w próbach nie mają znaczenia przy wyznaczeniu czasu popełnienia przestępstwa, gdyż mogą pochodzić z redepozycji. Uzyskane wyniki potwierdzają przydatność analiz palinologicznych do określenia orientacyjnego czasu zdarzenia.

Obecność charakterystycznych dla danego siedliska czy regionu roślin oraz sezonowość kwitnienia sprawiają, że obecne w glebie czy na powierzchni obiektów ziarna pyłku tworzą specyficzne dla danego miejsca zespoły pyłkowe. Są to „palinologiczne odciski palców” (ang. *palynological fingerprints*) [5, 9]. W kryminalistyce największe znaczenie mają ziarna

veloped [18, 19]. Pollen calendars show the mean course of pollen seasons for individual plant taxa. They are mainly used in allergological diagnosis and control of treatment of pollen allergy, in phenology, and in recent climate-change studies [20–22]. In forensic palynology, they are useful for determination of the time of the crime based on the periods of the presence of air-borne pollen of a given taxon [23, 24].

Both during the first and second series, sporomorphs of plants flowering in summer, i.e. in the period of collection of the material, were identified. Comparison of the results with the pollen calendar can contribute to determination of the time of a criminal event with high probability. The pollen calendar developed for the Lublin region indicates that grass pollen is present in the air from early May to early October, with the highest concentrations recorded in July. *Chenopodiaceae* pollen is mainly released in July and August, and single pollen grains of representatives of this family are noted in late June and September. Plantain (*Plantago*) pollen grains are detected in the atmosphere from the beginning of May to mid-September, and Asteraceae pollen is present from late June to late September. A relatively short pollen season, i.e. from mid-June to the end of July, is noted in the case of linden (*Tilia*) [25]. The linden pollen grains recorded in the first investigation series can be used for highly precise determination of the possible time of a crime. Given its characteristic structural traits, the pollen of some spring flowering plants (e.g. *Alnus*, *Betula*, *Pinus*) persists in the air for a long time. It can be carried over long distances and small amounts can be recorded throughout the year [25]. Single pollen grains of these plants identified in samples are not relevant for determination of the time of the crime because they may originate from re-deposition. The results obtained confirm the usefulness of palynological analyses in the determination of the possible time of a criminal event.

Due to the habitat or regional specificity of plants and seasonality of flowering, pollen grains deposited in the soil or on the surface of various objects form pollen assemblages characteristic for a locality. These are so-called “palynological fingerprints” [5, 9]. In forensics, the greatest importance is ascribed to the pollen

pyłku roślin owadopylnych, zwłaszcza rzadko występujących, które związane są z określonymi obszarami [1]. Pyłek tych roślin nie rozprzestrzenia się na duże odległości, obecny jest zwykle w pobliżu rośliny macierzystej. W obecnej pracy oznaczono przede wszystkim ziarna pyłku roślin wiatropylnych, które pospolicie występują na terenie Polski. Do określenia miejsca zdarzenia mogą być przydatne zarodniki paproci ze względu na ich słabe rozprzestrzenianie się. W próbach pochodzących z miejscowości Okuninka nad Jeziorem Białym stwierdzono liczne zarodniki paproci *Dryopteris filix-mas*. Ich dużą koncentrację wyjaśnia fakt, że od strony południowej Jezioro Białe otoczone jest lasem należącym do Sobiborskiego Parku Krajobrazowego, gdzie występuje wymieniona paproć. Nerecznica samcza jest gatunkiem paproci występującym pospolicie w całym kraju. Rośnie w umiarkowanym cieniu, na podłożu wilgotnym. Występuje przede wszystkim w lasach, sadzona jest też w parkach i ogrodach jako roślina ozdobna. Okres zarodnikowania tego gatunku przypada na lipiec–wrzesień.

Zróźnicowanie w ilości zdeponowanego pyłku na poszczególnych powierzchniach może być spowodowane tym, że ziarna pyłku unoszące się w powietrzu osadzają się w sposób losowy na różnych obiektach. Osoby, które brały udział w przeprowadzonych badaniach, nie miały bezpośredniego kontaktu z roślinami, a ziarna pyłku lub zarodniki osadzały się na ich ciele lub odzieży w wyniku swobodnego opadania. Z analizy otrzymanych danych wynika, że materiał palinologiczny zabezpieczany w postępowaniu dochodzeniowym powinien być pobierany z różnych części ubrania i skóry, ponieważ nie przyczepia się do nich w jednakowy sposób.

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

of entomophilous plants, especially pollen of rare species associated with specific areas [1]. The pollen of these plants does not spread over long distances and is usually present near the parent plant. In the present study, the majority of the identified pollen grains originated from anemophilous plants that are common in Poland. Due to their poor spread, fern spores can be useful for determination of the crime scene. The samples collected in Okuninka on Białe Lake contained numerous spores of the *Dryopteris filix-mas* fern. Their great concentration can be explained by the presence of a forest belonging to the Sobibór Landscape Park, where the fern grows, situated south of the lake. The male fern is a common species across the country. It grows on moist substrates in moderate shade. It is primarily found in forests but is also planted in parks and gardens as an ornamental species. The species produces spores in July–September.

The variation in the quantity of pollen deposited on the different surfaces can be associated with the random mode of deposition of air-borne pollen grains on different objects. The participants of these investigations had no direct contact with the plants, and the pollen grains or spores were deposited on their bodies or clothes by free fall. The analysis of the data obtained in this study indicates that the palynological material collected from suspects or victims should be taken from various parts of clothing and skin because it does not attach to these surfaces in the same way.

The authors declare no conflict of interest.

Piśmiennictwo

References

1. Konduracka A. Ziarno prawdy – czyli o zastosowaniu palinologii w kryminalistyce. W: Zelka M (red.). III Dni Kryminalistyki Wydziału Prawa i Administracji Uniwersytetu Rzeszowskiego, Rzeszów 2009; 315-323.
2. Dobrescu ME, Olteanu IG, Sima E. Defining the elements of new scientific disciplines – palynoforensics. International Journal of Criminal Investigation 2011; 1: 87-94.
3. Dyakowska J. Podręcznik palinologii. Wydawnictwo Geologiczne, Warszawa 1959.
4. Dybova-Jachowicz S, Sadowska A. Palinologia. Wydawnictwo Instytut Botaniki PAN, Kraków 2003.
5. Madeja J. Palynology and its application to criminalistics. Institute of Forensic Research 2006; 65: 5-12.
6. Zachuta A. Wybrane zagadnienia z kryminalistyki. Ślady roślinnych pyłków i zarodników. Kultura Bezpieczeństwa. Nauka – Praktyka – Refleksje 2012; 12: 28-50.

7. Coyle MH, Cheng-Lung L, Wen-Yu L, Lee CH, Palmbach MT. Forensic Botany: Using Plant Evidence to Aid in Forensic Death Investigation. *Croatian Medical Journal* 2005; 46: 606-612.
8. Mildenhall DC, Wiltsire JEP, Bryant NV. Palinologia kryminalistyczna – dlaczego ją stosować i jak? *Forensic Science International* 2006; 16: 163-172.
9. Gunatilake LGP, Edussuriya HD, Bandaranayake V. Proceedings of the Peredeniya University Research Sessions, Sri Lanka 2009; 14: 380-382.
10. Jantunen J, Saarinen K. Pollen transport by clothes. *Aerobiologia* 2011; 27: 339-343.
11. Mali BD. Pollens to Catch Criminals. *Science Reporter* 2015: 14-18.
12. Passarelli ML. Forensic Palynology in Argentina. An alternative treatment for tape method is proposed. *Peertech J Forensic Sci Technol* 2015; 2: 001-003.
13. Zachuta A. Palinologia kryminalistyczna. *Prokuratura i Prawo* 2004; 10: 129-145.
14. Dembowski K. Zastosowanie śladów palinologicznych w kryminalistyce. *Kortowski Przegląd Prawniczy* 2014; 3: 41-47.
15. Mucha N. Palinologia kryminalistyczna. W: Zdunek B, Olszówka M (red.). *I Ogólnopolska Konferencja Naukowa Krimed. Metody badawcze w kryminalistyce i medycynie sądowej. Abstrakty. Fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL* 2015; 44.
16. Hyde HA, Adams KF. *An Atlas of Airborne Pollen Grains*. Macmillan & Co LTD, London 1958.
17. Nilsson S, Praglowski J, Nilsson L. *Atlas of Airborne Pollen Grains and Spores in Northern Europe*. Natur och Kultur, Stockholm 1977.
18. Montali E, Mercuri MA, Grandi TG, Accorsi AC. Towards a „crime pollen calendar” – Pollen analysis on corpses throughout one year. *Forensic Science International* 2006; 163: 211-223.
19. Weryszko-Chmielewska E (red.). *Aerobiologia*. Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Lublinie, Lublin 2007.
20. Obtulowicz K, Szczepanek K, Radwan J, Grzywacz M, Adamus K, Szczeklik A. Correlation between airborne pollen incidence, skin prick tests and serum immunoglobulin in allergic people in Cracow, Poland. *Grana* 1991; 30: 136-141.
21. Myszkowska D, Stępalska D, Obtulowicz K, Porębski G. The relationship between airborne pollen and fungal spore concentrations and seasonal pollen allergy symptoms in Cracow in 1997–1999. *Aerobiologia* 2002; 18: 153-161.
22. Rapiejko P. *Alergeny pyłku roślin*. Wydawnictwo Medical Education, Warszawa 2008.
23. Madeja J, Skiba A, Myszkowska D. Pollen grains on the face – comparison of results with pollen calendar data and their usefulness in determining date of origin of samples. *Problems of Forensic Sciences* 2010; 83: 223-232.
24. Bajerlein D, Wojterska M, Grewling Ł, Kokociński M. Forensic botany: current state of knowledge and possible applications in investigative practice. *Issues of Forensic Science* 2015; 283: 72-83.
25. Piotrowska-Weryszko K, Weryszko-Chmielewska E. The airborne pollen calendar for Lublin, central-eastern Poland. *Ann Agr Env Med* 2014; 2: 541-545.

Adres do korespondencji

Krystyna Piotrowska-Weryszko
Katedra Botaniki
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 15
20-950 Lublin, Polska
e-mail: krystyna.piotrowska@up.lublin.pl

Address for correspondence

Krystyna Piotrowska-Weryszko
Department of Botany
University of Life Sciences in Lublin
15 Akademicka St.
20-950 Lublin, Poland
e-mail: krystyna.piotrowska@up.lublin.pl