

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **236665**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **427563**

(22) Data zgłoszenia: **29.10.2018**

(51) Int.Cl.

**A61L 2/14 (2006.01)**

**C02F 1/46 (2006.01)**

**H05H 1/34 (2006.01)**

(54)

**Sposób eradykacji bakteryjnych fitopatogenów**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**26.08.2019 BUP 18/19**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**08.02.2021 WUP 03/21**

(73) Uprawniony z patentu:

**POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL**  
**UNIwersytet GDAŃSKI, Gdańsk, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ANNA DZIMITROWICZ, Kamienna Góra, PL**  
**AGATA MOTYKA-POMAGRUK, Gdańsk, PL**  
**PIOTR JAMRÓZ, Wrocław, PL**  
**WOJCIECH ŚLEDŹ, Olsztyn, PL**  
**WERONIKA BABIŃSKA, Gdańsk, PL**  
**EWA ŁOJKOWSKA, Gdańsk, PL**  
**PAWEŁ POHL, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Katarzyna Paprzycka**

**PL 236665 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób eradykacji bakteryjnych fitopatogenów związany z zastosowaniem wodnych roztworów soli nieorganicznych aktywowanych za pomocą stałoprądowego wyładowania jarzeniowego generowanego pod ciśnieniem atmosferycznym (ang. *direct current atmospheric pressure glow discharge*, dc-APGD) w kontakcie z przepływającą ciekłą katodą (ang. *flowing liquid cathode*, FLC) w ciągłym układzie przepływowym.

W publikacji autorstwa M. J. Traylor, M. J. Pavlovich, S. Karim, P. Hait, Y. Sakiyama, D. S. Clark i D. B. Graves pt.: "Long-term antibacterial efficacy of air plasma-activated water" (J. Phys. D. Appl. Phys. 2011, 44(47), 472001) opisano sposób unieczynnienia komórek bakteryjnych oportunistycznego patogena człowieka oraz modelowego mikroorganizmu z gatunku *Escherichia coli* z zastosowaniem roztworu wody post-plazmowej (ang. *plasma-activated water*, PAW) aktywowanego za pomocą wyładowań barierowych (ang. *dielectric barrier discharge*, DBD), generowanych w atmosferze powietrza w stacjonarnym układzie reakcyjno-wyładowczym. W wytworzonym roztworze PAW zostały zidentyfikowane i ilościowo oznaczone wybrane związki zaklasyfikowane do reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS) oraz azotu (ang. *reactive nitrogen species*, RNS), tj. nadtlenuk wodoru ( $H_2O_2$ ), azotany(V) ( $NO_3^-$ ) oraz azotany(III) ( $NO_2^-$ ). We wstępnym etapie badań otrzymany roztwór PAW wykazywał znaczące właściwości antibakteryjne, tj. do 5 logarytmów redukcji w liczbie żywych komórek bakteryjnych. Niestety, po upływie 7 dni od wytworzenia roztworu PAW, jego właściwości eradykacyjne spadły do zera. To dyskwalifikowało użycie zaproponowanego roztworu PAW jako długoterminowego i skutecznego sposobu unieczynnienia drobnoustrojów chorobotwórczych. Ponadto, niewielka objętość traktowanego za pomocą DBD roztworu wody destylowanej, tj.  $10\text{ cm}^3$ , świadczyła o niskiej efektywności procesu wytwarzania roztworu PAW. Preparaty dezynfekcyjne, przeznaczone do zastosowania w skali przemysłowej, powinny charakteryzować się stabilnością właściwości antibakteryjnych w czasie tak, aby stanowiły produkt atrakcyjny dla rynku polskiego i międzynarodowego, a tego warunku nie spełniał roztwór PAW zaproponowany przez Traylora i in. (2011).

W publikacji autorstwa G. Kamgang-Youbi, J. M. Herry, T. Meylheuc, J. L. Brisset, M. N. Bellon-Fontaine, A. Doubla i M. Naitali pt.: "Microbial inactivation using plasma-activated water obtained by gliding electric discharges" (Lett. Appl. Microbiol. 2009, 48(1), 13–18) przedstawiono sposób unieczynnienia mikroorganizmów (bakterie chorobotwórcze względem człowieka oraz drożdże piwowarskie) z zastosowaniem roztworu PAW aktywowanego za pomocą wyładowań łuku ślizgającego się (ang. *gliding arc discharges*, GAD). Wyładowania typu GAD były generowane w stacjonarnym układzie reakcyjno-wyładowczym w atmosferze wilgotnego powietrza. Po 30 min inkubacji analizowanych drobnoustrojów w roztworze PAW osiągnięto następującą redukcję w liczbie żywych planktonicznych komórek (skala logarymiczna): *Staphylococcus epidermidis*:  $6,68 \pm 0,7$ , *Leuconostoc mesenteroides*:  $7,87 \pm 0,12$ , *Hafnia alvei*:  $7,9 \pm 0,13$  oraz *Saccharomyces cerevisiae*:  $6,68 \pm 0,07$ . Ponadto, określono skuteczność unieczynnienia ww. drobnoustrojów poddanych adhezji do powierzchni stałych wykonanych ze stali nierdzewnej AISI 304 oraz wysokiej gęstości polietylenu. 30-minutowa ekspozycja zawiesziny mikroorganizmów na działanie roztworu PAW skutkowało ich eradykacją w liczbie jednostek tworzących kolonie w przedziale od  $3,07 \pm 0,44$  do  $6,09 \pm 0,69$  logarytmu. Niestety, Kamgang-Youbi i in. (2009) nie wyjaśnili podstaw fizykochemicznych antibakteryjnego działania opracowanego przez nich roztworu PAW. Oprócz tego, niewielka objętość traktowanego za pomocą wyładowań typu GAD roztworu wody destylowanej, tj.  $20\text{ cm}^3$ , świadczyła o niskiej efektywności procesu wytwarzania roztworu PAW. Co więcej, badacze nie określili stabilności w czasie własności przeciwdrobnoustrojowych używanego roztworu PAW.

W publikacji autorstwa Y. Xua, Y. Tian, R. Ma, Q. Liu i J. Zhang pt.: "Effect of plasma activated water on the postharvest quality of button mushrooms, *Agaricus bisporus*" (Food Chem. 2016, 197, 436–444) zanalizowano wpływ roztworu PAW (aktywowanego z użyciem DBD generowanych w atmosferze  $Ar/O_2$  w dżecie plazmowym) na kondycję młodych pieczarek, które następnie przechowywano przez okres 7 dni w temperaturze  $20^\circ\text{C}$ . Zastosowanie roztworu PAW skutkowało redukcją w liczbie żywych komórek bakteryjnych oraz grzybowych o odpowiednio 1,5 i 0,5 logarytmu. Poddano również ocenie zmianę właściwości fizykochemicznych jak i biologicznych *A. bisporus* względem grup kontrolnych pod wpływem działania roztworu PAW. Na podstawie analizy własności mechanicznych (twardości), współczynnika respiracji oraz przewodności elektrycznej stwierdzono, że traktowanie pieczarek za pomocą roztworu PAW może opóźniać mięknienie tkanki grzybowej, obserwowane w trakcie ich przechowywania. Jeżeli chodzi o barwę, pH czy właściwości antyoksydacyjne traktowa-

nych za pomocą roztworu PAW grzybów, nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupą badawczą w porównaniu do grupy kontrolnej. Na tej podstawie Xua i in. (2016) zasugerowali, że zastosowanie wytworzonego roztworu PAW może stanowić skuteczną metodę wydłużenia terminu przydatności do spożycia grzybów podstawkowych.

Z polskiego zgłoszenia patentowego nr P424021 (A1) znane jest urządzenie do przeprowadzania plazmowej aktywacji materiałów płynnych, zwłaszcza do zastosowań medycznych, biologicznych i rolniczych. Urządzenie to składa się z generatora wyładowań typu GAD, zaworu elektromagnetycznego i blokady elektromagnetycznej złożonej z obudowy z otworem wylotowym gazu oraz frontowych drzwiczek. Cechami charakterystycznymi urządzenia jest blokada elektromagnetyczna, zamykająca otwór manipulacyjny, obudowa w której znajduje się zamocowany stół wykonujący ruch posuwisto-zwrotny, na którym umieszczony jest otwarty ruchomy zbiornik aktywowanego płynu, natomiast w górnej części obudowy zamocowany jest w osłonie generator wyładowań typu GAD, wyposażony w elektrody. Generator plazmy jest połączony przewodem rurowym z układem przygotowania gazu procesowego, na którym znajduje się zawór elektromagnetyczny natomiast elektrody generatora wyładowań typu GAD są połączone przewodami z układem zasilania prądem zmiennym o regulowanej częstotliwości i napięciu zasilającym posiadającym włącznik połączony przewodami z blokadą elektromagnetyczną oraz z zaworem elektromagnetycznym.

Pomimo tego, że liczni badacze zasugerowali możliwość zastosowania roztworów PAW do dezynfekcji sprzętu medycznego, sprzętu wojskowego, powierzchni gładkich czy choćby uzębienia, zgodnie z naszą najlepszą wiedzą do chwili obecnej nie zaproponowano zastosowania wodnych roztworów soli nieorganicznych, aktywowanych za pomocą wyładowania typu dc-APGD generowanego w kontakcie z FLC w ciągłym układzie przepływowym, przeciwko bakteryjnym fitopatogenom. Ponadto, nie zostały dotychczas opisane w literaturze właściwości antibakteryjnego wodnych roztworów soli nieorganicznych, aktywowanych za pomocą wyładowania typu dc-APGD generowanego w kontakcie z FLC w ciągłym układzie przepływowym, względem bakteryjnych fitopatogenów.

Istota sposobu eradykacji bakteryjnych fitopatogenów, według wynalazku polega na tym, że do inaktywacji bakteryjnych fitopatogenów stosuje się wodne roztwory soli nieorganicznych, aktywowane za pomocą wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD generowanego w kontakcie z FLC w ciągłym układzie przepływowym.

Korzystnie stosuje się wodne roztwory soli nieorganicznych zawierające jony:  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $NO_3^-$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ .

Najkorzystniej stosuje się: 0,4% (v/v) nawóz zawierający jony  $PO_4^{3-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  oraz mikroelementy B, Cu, Fe, Mn, Zn; 0,1% (m/v)  $Fe_2(SO_4)_3$ , 0,1% (m/v)  $K_3PO_4$ , 0,1% (m/v)  $MgSO_4$ , 0,1% (m/v)  $KNO_3$ , 0,1% (m/v) NaCl oraz 0,1% (m/v)  $NH_4NO_3$ .

Korzystnie wyładowanie typu dc-APGD generowane jest pomiędzy stałą metaliczną anodą umieszczoną w odległości od 2,0 do 10,00 mm, najkorzystniej 5 mm względem FLC, przy czym wyładowanie typu dc-APGD jest inicjowane w wyniku przyłożenia do elektrod napięcia w zakresie od 800 do 2000 V, najkorzystniej 1100 V, oraz natężenia prądu w zakresie od 30 do 60 mA, najkorzystniej 45 mA.

Korzystnie wodne roztwory soli nieorganicznych wprowadza się do układu przepływowego z szybkością przepływu w zakresie od 3,0 do 5,0  $cm^3/min$ , najkorzystniej 3,0  $cm^3/min$ .

Korzystnie wodne roztwory soli nieorganicznych wprowadza się do układu w temperaturze pokojowej.

Korzystnie temperatura kinetyczna fazy gazowej wyładowania mieści się w zakresie od 2000 do 3000 K.

Korzystnie sposób eradykacji prowadzi się w czasie od 1 do 60 s, najkorzystniej 30 s.

Korzystnie sposób eradykacji prowadzi się wobec bakteryjnych fitopatogenów roślin, w szczególności z rodzaju *Pectobacterium* lub z rodzaju *Dickeya*.

Właściwości antibakteryjne wytworzonych roztworów postplazmowych ściśle zależą od parametrów generowania wyładowania typu dc-APGD (tj. od natężenia prądu wyładowania, napięcia prądu wyładowania, szybkości przepływu wprowadzanych wodnych roztworów soli nieorganicznych do ciągłego układu przepływowego, polaryzacji elektrod w ciągłym układzie przepływowym, odległości pomiędzy elektrodami, temperatury kinetycznej fazy gazowej wyładowania, czasu aktywacji wodnych roztworów soli nieorganicznych z użyciem wyładowania typu dc-APGD, atmosfery wyładowania), jak również od rodzaju i parametrów fizykochemicznych przygotowanych wodnych roztworów soli nieorganicznych (tj. od ich stężenia, ich temperatury oraz ich składu chemicznego).

Przedmiot wynalazku jest przedstawiony w przykładach jego realizacji nie ograniczając jego zakresu oraz na rysunkach obrazujących co następuje:

– w fig. 1 przedstawiono wykres skuteczności zastosowania post-plazmowych wodnych roztworów 0,1%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , uzyskiwanych przy różnych parametrach pracy ciągłego układu przepływowego z FLC, względem zahamowania wzrostu *D. solani* IFB0099,

– w fig. 2 przedstawiono wykres potwierdzający możliwości zastosowania wodnych roztworów soli nieorganicznych aktywowanych za pomocą wyładowania typu dc-APGD, generowanego w ciągłym układzie przepływowym w kontakcie z FLC, w ograniczeniu intensywności objawów chorobowych wywoływanych przez *P. parmentieri* IFB5308 na plastrach ziemniaka.

#### Przykład 1

Sposób unieczynnienia bakterii fitopatogennych z gatunku *Dickeya solani* (szczep IFB0099) z zastosowaniem 0,1% wodnych roztworów  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , aktywowanych przy użyciu wyładowania typu dc-APGD generowanego w kontakcie z FLC, przy zróżnicowanych szybkościach wprowadzania roztworów do ciągłego układu przepływowego (w zakresie od 3,0 do 5,0  $\text{cm}^3/\text{min}$ ) oraz różnych wartościach natężenia prądu wyładowania (w zakresie od 30 do 60 mA).

W kolbie miarowej o pojemności 100  $\text{cm}^3$  umieszcza się 0,1 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  i uzupełnia do kreski wodą redestylowaną. Następnie, miesza się do całkowitego rozpuszczenia substancji stałej. Tak sporządzony 0,1% (m/v) wodny roztwór  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  wprowadza się do ciągłego układu przepływowego za pomocą czterokanałowej pompy perystaltycznej z najkorzystniejszą szybkością przepływu 3,00  $\text{cm}^3/\text{min}$ , poprzez kwarcowo-grafitową kapilarę (ID = 2,0 mm). W wyniku przyłożenia do elektrod wysokiego napięcia prądu stałego o najkorzystniejszej wartości 1100 V, w 5,0 mm przerwie pomiędzy stałą metaliczną anodą (elektroda wolframowa, ID = 4,0 mm), a wprowadzanym 0,1% (m/v) wodnym roztworem  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , pełniącym funkcję FLC, jest generowane wyładowanie typu dc-APGD. Aby zapewnić najkorzystniejszą, stałą wartość natężenia prądu, tj. 45 mA, należy zastosować rezystor balastowy o oporności 10 k $\Omega$ . Czas oddziaływania wyładowania typu dc-APGD z wprowadzanym do ciągłego układu przepływowego o 0,1% (m/v) wodnym roztworem  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  wynosi 30 s. Aktywowany za pomocą wyładowania typu dc-APGD wodny roztwór  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  należy zebrać do szklanych fiolek i pozostawić do dalszych analiz w celu określenia jego potencjału eradykacyjnego względem bakteryjnych fitopatogenów.

Antybakteryjną efektywność uzyskanych 0,1% (m/v) wodnych post-plazmowych roztworów  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  analizuje się względem zawiesin bakteryjnych, które należy przygotować w następujący sposób: szczep *D. solani* IFB0099, przechowywany w temperaturze  $-80^\circ\text{C}$ , należy wysiać na płytkę z podłożem TSA. Po 24 h inkubacji w temperaturze  $28^\circ\text{C}$  należy wykorzystać pojedynczą kolonię bakteryjną pobraną z podłoża TSA do zaszczepienia podłoża płynnego TSB. Po 24 h inkubacji w temperaturze  $28^\circ\text{C}$  zawiesinę należy odwirować (6000 rpm, 10 min), aby usunąć resztki pożywki, a następnie 2-krotnie przepłukać komórki bakteryjne 0,85% wodnym roztworem NaCl. Komórki bakteryjne należy zawiesić w 0,85% wodnym roztworze NaCl, doprowadzając gęstość optyczną zawiesiny do 0,5 McF. 10  $\mu\text{l}$  tak przygotowanej zawiesiny należy wykorzystać do zaszczepienia 90  $\mu\text{l}$  pożywki TSB suplementowanej 100  $\mu\text{l}$  0,1% (m/v) wodnego post-plazmowego roztworu  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  w płytce 96-dołkowej. Po inokulacji należy zmierzyć wartość absorbancji zaszczepionych hodowli ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ). Uzyskaną wartość należy odjąć od wartości absorbancji zmierzonej po 24 h inkubacji zawiesin w płytkach 96-dołkowych w temperaturze  $28^\circ\text{C}$ . Należy także uwzględnić niezbędne kontrole negatywne, tj. 1: pożywka TSB zawierająca określoną wodę post-plazmową, 2: pożywka TSB zawierająca dodatek 0,1%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  poddana inokulacji zawiesiną bakteryjną, 3: pożywka TSB, 4: pożywka TSB z dodatkiem 0,85% NaCl oraz kontrole pozytywne, tj. 1: pożywka TSB inokulowana bakteriami. Przedstawioną procedurę należy powtórzyć po przechowywaniu uzyskanych roztworów post-plazmowych przez okres 5 miesięcy w temperaturze  $4^\circ\text{C}$ .

Efektywność procesu unieczynnienia: Na figurze 1 przedstawiono wyniki testu zahamowania wzrostu bakterii fitopatogennych *D. solani* IFB0099 z użyciem 0,1% (m/v) wodnego post-plazmowego roztworu  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

Przedstawiono średnie  $\pm$  błąd standardowy z wartości delta  $\text{OD}_{600}$  po 24 h inkubacji w  $28^\circ\text{C}$ . Roztwory, które pełniły rolę FLC są zaznaczone kolorem jasno-szarym, podczas gdy roztwory, które pełniły funkcję płynnej przepływającej ciekłej anody (FLA) reprezentowane są kolorem ciemno-szarym. Próby kontrolne zaznaczono na biało. Zastosowano poniższe parametry syntezy wodnych roztworów post-plazmowych: szybkość przepływu 3,0  $\text{cm}^3/\text{min}$  – próby nr 1, 7; szybkość przepływu 4,0  $\text{cm}^3/\text{min}$  – próby nr 2, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12; szybkość przepływu 5,0  $\text{cm}^3/\text{min}$  – próby nr 3, 9; natężenie prądu

wyładowania 30 mA – próby nr 4, 10; natężenie prądu wyładowania 45 mA – próby nr 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 11; natężenie prądu wyładowania 60 mA – próby nr 6, 12.

Test przeprowadzono w dwóch niezależnych powtórzeniach. Podano różnicę w absorbancji hodowli bakteryjnej ( $\Delta OD_{600}$ ) mierzoną po 24 h inkubacji przy długości fali 600 nm w porównaniu do wartości początkowej, a uzyskaną według wynalazku, poprzez zastosowanie proponowanego sposobu eradykacji bakteryjnych fitopatogenów. Otrzymane wodne post-plazmowe roztwory, zgodnie z wynalazkiem, wykazują niezmienną aktywność antybakteryjną po 5 miesiącach przechowywania w warunkach chłodniczych.

#### Przykład 2

Sposób unieczynnienia bakterii fitopatogennych z gatunków: *Dickeya solani* (na przykładzie szczepu IFB0099), *Pectobacterium parmentieri* (na przykładzie szczepu IFB5308) oraz *Pectobacterium atrosepticum* (na przykładzie szczepu IFB5103), z zastosowaniem wodnych roztworów 0,4% (v/v) Azofoska 0,1% (m/v)  $Fe_2(SO_4)_3$ , 0,1% (m/v)  $K_3PO_4$ , 0,1% (m/v)  $MgSO_4$ , 0,1% (m/v)  $KNO_3$ , 0,1% (m/v) NaCl oraz 0,1% (m/v)  $NH_4NO_3$ , aktywowanych za pomocą wyładowania typu dc-APGD generowanego w kontakcie z FLC w ciągłym układzie przepływowym. Wodne roztwory post-plazmowe soli nieorganicznych uzyskuje się, zachowując następujące parametry generowania wyładowania typu dc-APGD, tj. szybkość wprowadzania roztworu do ciągłego układu przepływowego: 3,0  $cm^3/min$ , natężenie prądu: 45 mA, odległość między elektrodami: 5,0 mm, polaryzacja elektrod w ciągłym układzie przepływowym: stała elektroda metaliczna pełni funkcję anody, natomiast roztwór wprowadzany do ciągłego układu przepływowego pełni funkcję FLC, temperatura kinetyczna fazy gazowej wyładowania: 2000 K, czas aktywacji wodnych roztworów soli nieorganicznych przy użyciu wyładowania typu dc-APGD: 30 s, atmosfera wyładowania: powietrze atmosferyczne.

W kolbie miarowej o pojemności 100  $cm^3$  umieszcza się: 0,4  $cm^3$  roztworu Azofoska i uzupełnia do kreski wodą redestylowaną. Następnie, miesza się do całkowitego rozpuszczenia substancji stałej. Tak sporządzony wodny roztwór 0,4% (v/v) Azofoska wprowadza się do układu ciągłego układu przepływowego za pomocą czterokanałowej pompy perystaltycznej z szybkością przepływu 3,0  $cm^3/min$ , poprzez kwarcowo-grafitową kapilarę (ID = 2,0 mm). W wyniku przyłożenia do elektrod napięcia prądu stałego w zakresie 1100 V, w 5,0 mm przerwie pomiędzy stałą metaliczną anodą (elektroda wolframowa, ID = 4,0 mm), a wprowadzanym wodnym roztworem 0,4% (v/v) Azofoska pełniącym funkcję FLC, jest generowane wyładowanie typu dc-APGD.

Aby zapewnić stałą wartość natężenia prądu, tj. 45 mA, należy zastosować rezystor balastowy o oporności 10 k $\Omega$ . Czas oddziaływania wyładowania typu dc-APGD z wprowadzanym do ciągłego układu przepływowego wodnym roztworem, pełniącym funkcję FLC, 0,4% (v/v) Azofoska wynosi 30 s. Aktywowane za pomocą wyładowania typu dc-APGD wodne roztwory należy zebrać do szklanych fiolek i pozostawić do dalszych analiz w celu określenia ich potencjału eradykacyjnego względem bakteryjnych fitopatogenów.

W ten sam analogiczny sposób otrzymano aktywowane roztwory postplazmowe z użyciem 0,1 g  $NH_4NO_3$ ; 0,1 g  $Fe_2(SO_4)_3$ ; 0,1 g  $K_3PO_4$ ; 0,1 g  $MgSO_4$ ; 0,1 g  $KNO_3$ ; 0,1 g NaCl; 0,1 g  $NH_4NO_3$ .

Antybakteryjną efektywność uzyskanych w ten sposób roztworów post-plazmowych testowano na zawiesinach bakteryjnych *Dickeya solani* (na przykładzie szczepu IFB0099), *Pectobacterium parmentieri* (na przykładzie szczepu IFB5308) oraz *Pectobacterium atrosepticum* (na przykładzie szczepu IFB5103). Zawiesiny przygotowano w następujący sposób: każdy z testowanych szczepów bakteryjnych należy przechowywać w temperaturze -80°C, a następnie należy wysiać na płytkę z podłożem TSA. Po 24 h inkubacji w temperaturze 28°C należy wykorzystać pojedynczą kolonię bakteryjną pobraną z podłoża TSA do zaszczepienia podłoża płynnego TSB. Po 24 h inkubacji w temperaturze 28°C, zawiesinę bakteryjną należy odwirować (6000 rpm, 10 min) by usunąć resztki pożywki, a następnie 2-krotnie przepłukać 0,85% wodnym roztworem NaCl. Komórki bakteryjne należy zawiesić w 0,85% wodnym roztworze NaCl, dostosowując gęstość optyczną zawiesiny do 0,5 McF. 10  $\mu l$  tak przygotowanej zawiesiny należy wykorzystać do zaszczepienia 90  $\mu l$  pożywki TSB suplementowanej 100  $\mu l$  testowanego roztworu post-plazmowego w płytce 96-dołkowej. Po inokulacji należy zmierzyć wartość absorbancji zaszczepionych hodowli OD ( $\lambda = 600$  nm), którą należy porównać do wartości absorbancji uzyskanej po 24 h inkubacji płytek 96-dołkowych w temperaturze 28°C. Uzyskane wyniki przedstawiono w formie analizy jakościowej dla 3 powtórzeń eksperymentu. Należy także uwzględnić kontrole negatywne, tj. 1: pożywka TSB zawierająca określoną wodę post-plazmową, 2: pożywka TSB zawierająca 0,4% (v/v) wodnego roztworu Azofoska lub 0,1% wodnego roztworu (m/v)  $Fe_2(SO_4)_3$  lub 0,1% (m/v) wodnego roztworu  $K_3PO_4$  lub 0,1% wodnego roztworu (m/v)  $MgSO_4$  lub 0,1% (m/v) wod-

nego roztworu  $\text{KNO}_3$  lub 0,1% (m/v) wodnego roztworu  $\text{NaCl}$  lub 0,1% (m/v) wodnego roztworu  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  poddana inokulacji zawiesiną bakteryjną, 3. pożywka TSB, 4. pożywka TSB z dodatkiem 0,85%  $\text{NaCl}$  oraz kontrole pozytywne, tj. 1: pożywka TSB inokulowana bakteriami *Dickeya solani* IFB0099, 2: pożywka TSB inokulowana bakteriami *Pectobacterium parmentieri* IFB5308, 3: pożywka TSB inokulowana bakteriami *Pectobacterium atrosepticum* IFB5103.

Efektywność procesu unieczynnienia: W Tabeli 1 przedstawiono wyniki testu zahamowania wzrostu bakterii fitopatogennych z gatunków *Dickeya solani* (na przykładzie szczepu IFB0099), *Pectobacterium parmentieri* (na przykładzie szczepu IFB5308) oraz *Pectobacterium atrosepticum* (na przykładzie szczepu IFB5103) z użyciem wodnych roztworów 0,4% (v/v) Azofoska; 0,1% (m/v)  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ; 0,1% (m/v)  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ; 0,1% (m/v)  $\text{MgSO}_4$ ; 0,1% (m/v)  $\text{KNO}_3$ ; 0,1% (m/v)  $\text{NaCl}$ ; 0,1% (m/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  aktywowanych za pomocą dc-APGD generowanego w ciągłym układzie przepływowym kontakcie z FLC.

T a b. 1

Roztwór i jego składnik	Testowane stężenie	<i>P. parmentieri</i> IFB5308			<i>P. atrosepticum</i> IFB5103			<i>D. solani</i> IFB0099		
		1 Poniż.	2 Poniż.	3 Poniż.	1 Poniż.	2 Poniż.	3 Poniż.	1 Poniż.	2 Poniż.	3 Poniż.
0,4% Azofoska	50%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25%	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	10%	-	-	+	+	+	+	+	+	+
0,1% $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	50%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	25%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,1% $\text{K}_3\text{PO}_4$	50%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	25%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,1% $\text{MgSO}_4$	50%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25%	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,1% $\text{KNO}_3$	50%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25%	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,1% $\text{NaCl}$	50%	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	25%	+	+	+	-	-	-	+	+	+
	10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,1% $\text{NH}_4\text{NO}_3$	50%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25%	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	10%	+	+	+	-	-	-	+	+	+

Przedstawiono zahamowanie wzrostu bakterii w odniesieniu do różnicy w absorbancji hodowli mierzonej po 24 h inkubacji hodowli w temperaturze 28°C ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ) w porównaniu do wartości absorbancji przed inkubacją, uzyskanych poprzez zastosowanie opracowanego sposobu eradykacji bakteryjnych fitopatogenów. Roztwory wód post-plazmowych zawierających wodne roztwory 0,4% (v/v) Azofoska, 0,1% (m/v)  $\text{MgSO}_4$ , 0,1% (m/v)  $\text{KNO}_3$ , 0,1% (m/v)  $\text{NaCl}$ , 0,1% (m/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , wykazują właściwości antybakteryjne względem patogenów roślin, w tym według wynalazku, 25% stężenie jest wystarczające by dezaktywować drobnoustroje z rodzaju *Pectobacterium*, podczas gdy stężenie 50% tych soli jest niezbędne do eradykacji drobnoustrojów z rodzaju *Dickeya*. Wyjątek stanowi roztwór post-plazmowy zawierający 0,1% (m/v)  $\text{NaCl}$  względem *P. parmentieri* IFB5308.

### Przykład 3

Sposób unieczynnienia bakterii fitopatogennych z gatunku *Pectobacterium parmentieri* (na przykładzie szczepu IFB5308), z zastosowaniem wodnych roztworów 0,4% (v/v) Azofoska, 0,1% (m/v)  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ , 0,1% (m/v)  $\text{K}_3\text{PO}_4$ , 0,1% (m/v)  $\text{MgSO}_4$ , 0,1% (m/v)  $\text{KNO}_3$ , 0,1% (m/v)  $\text{NaCl}$  oraz 0,1% (m/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , aktywowanych przy użyciu wyładowania typu dc-APGD generowanego w kontakcie z FLC

w ciągłym układzie przepływowym. Wodne roztwory post-plazmowe soli nieorganicznych uzyskano zachowując następujące parametry generowania wyładowania typu dc-APGD, tj. szybkość wprowadzania roztworu do ciągłego układu przepływowego: 3,0 cm<sup>3</sup>/min, natężenie prądu: 45 mA, odległość między elektrodami: 5,0 mm, polaryzacja elektrod w ciągłym układzie przepływowym: stała elektroda metaliczna pełni funkcję anody, natomiast roztwór wprowadzany do układu pełni funkcję katody, temperatura kinetyczna fazy gazowej wyładowania: 2000 K, czas aktywacji wodnych roztworów soli nieorganicznych przy użyciu wyładowania typu dc-APGD: 30 s, atmosfera wyładowania: powietrze atmosferyczne.

Aby zapewnić stałą wartość natężenia prądu, tj. 45 mA, należy zastosować rezystor balastowy o oporności 10 kΩ. Czas oddziaływania wyładowania typu dc-APGD z wprowadzanym do ciągłego układu przepływowego wodnym roztworem FLC, stanowiącym 0,4% (v/v) Azofoska lub 0,1% (m/v) Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> lub 0,1% (m/v) K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> lub 0,1% (m/v) MgSO<sub>4</sub> lub 0,1% (m/v) KNO<sub>3</sub> lub 0,1% (m/v) NaCl lub 0,1% (m/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> wynosi 30 s. Aktywowane za pomocą dc-APGD wodne roztwory należy zebrać do szklanych fiolek i pozostawić do dalszych analiz w celu określenia ich zdolności do ograniczenia objawów chorobowych powodowanych przez bakteryjne fitopatogeny na przykładzie szczepu IFB5308 z gatunku *Pectobacterium parmentieri*.

Zdolność wodnych roztworów soli nieorganicznych aktywowanych za pomocą wyładowania typu dc-APGD do zmniejszenia objawów chorobowych wywoływanych przez *Pectobacterium parmentieri* (na przykładzie szczepu IFB5308) testowano na plastrach ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.). Zawiesinę bakterii z gatunku *Pectobacterium parmentieri* (na przykładzie szczepu IFB5308) przygotowano w następujący sposób: szczep bakteryjny należy przechowywać w temperaturze -80°C, a następnie wysiać na płytkę z podłożem TSA. Po 24 h inkubacji w temperaturze 28°C należy wykorzystać pojedynczą kolonię bakteryjną pobraną z podłoża TSA do zaszczepienia podłoża płynnego TSB. Po 24 h inkubacji w temp. 28°C, zawiesinę należy odwirować (6000 rpm, 10 min) by usunąć resztki pożywki, a następnie 2-krotnie przepłukać komórki bakteryjne 0,85% wodnym roztworem NaCl. Komórki bakteryjne należy zawiesić w 0,85% wodnym roztworze NaCl dostosowując gęstość optyczną zawiesiny bakteryjnej do 0,5 McF. 30 μl tak przygotowanej zawiesiny bakteryjnej należy wykorzystać do zaszczepienia plastrów ziemniaka. Plastry ziemniaka należy przygotować w następujący sposób: bulwy ziemniaka odmiany Gala należy umyć pod bieżącą wodą, a następnie inkubować przez 10 min w 10% wodnym roztworze podchlorynu sodu celem ich powierzchniowego wysterylizowania. Podchloryn sodu należy usunąć z bulw ziemniaka poprzez 10 min inkubację bulw w destylowanej wodzie. Bulwy należy wysuszyć przez 30 min w komorze z laminarnym przepływem powietrza, a następnie pokroić nożem w plastry o grubości 1 cm. W każdym plastrze należy wydrążyć 2–3 otwory (każdy o średnicy 0,5 cm). Plastikowe pudełka należy wyłożyć czyściwem przemysłowym na powierzchni którego należy ułożyć uprzednio przygotowane plastry ziemniaka. Do każdej dziurki w plastrze ziemniaka należy wprowadzić 30 μl zawiesiny 0,5 McF szczepu IFB5308 z gatunku *Pectobacterium parmentieri*, a następnie 30 μl analizowanego wodnego roztworu 0,4% (v/v) Azofoska lub 0,1% (m/v) Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> lub 0,1% (m/v) K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> lub 0,1% (m/v) MgSO<sub>4</sub> lub 0,1% (m/v) KNO<sub>3</sub> lub 0,1% (m/v) NaCl lub 0,1% (m/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, aktywowanego za pomocą wyładowania typu dc-APGD. Na powierzchnię czyściwa przemysłowego należy nanieść sterylną wodę destylowaną oraz nałożyć pokrywkę zabezpieczoną przy pomocy parafilmu. Ma to na celu zapewnienie wysokiej wilgotności w trakcie trwania eksperymentu. Pudełka zawierające inokulowane bakteriami plastry ziemniaka należy inkubować przez 48 h w temperaturze 28°C. Po tym czasie należy zmierzyć średnice powstałych plam gnilnych. W badaniu należy uwzględnić kontrolę pozytywną (plastry ziemniaka inokulowane bakteriami bez dodatku wodnych roztworów soli nieorganicznych aktywowanych za pomocą wyładowania typu dc-APGD) oraz kontrole negatywne (plastry ziemniaka inokulowane 0,85% wodnym roztworem NaCl użytym do przygotowania zawiesiny bakteryjnej oraz plastry ziemniaka inokulowane bakteriami i następnie traktowane wodnymi roztworami soli nieorganicznych, które nie były poddane działaniu wyładowania typu dc-APGD).

Efektywność ograniczenia w natężeniu powodowanych objawów chorobowych: Na Figurze 2 przedstawiono wyniki 9 niezależnych powtórzeń oceny zdolności bakterii *Pectobacterium parmentieri* (na przykładzie szczepu IFB5308) do maceracji plastrów ziemniaka przy zastosowaniu wodnego roztworu 0,4% (v/v) Azofoska lub 0,1% (m/v) Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> lub 0,1% (m/v) K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> lub 0,1% (m/v) MgSO<sub>4</sub> lub 0,1% (m/v) NaCl lub 0,1% (m/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, aktywowanego za pomocą wyładowania typu dc-APGD generowanego w kontakcie z FLC w ciągłym układzie przepływowym. Przedstawiono średnią wartość ze średnicy plamy gnilnej plus/minus błąd standardowy, a uzyskaną według wynalazku, poprzez prze-

prorowadzenie opracowanego sposobu eradykacji fitopatogenów. Analizy wykazały, że zastosowanie wodnych roztworów post-plazmowych zawierających 0,1% (m/v)  $K_3PO_4$  lub 0,1% (m/v)  $MgSO_4$  lub 0,1% (m/v)  $NH_4NO_3$  skutkuje uzyskaniem statystycznie istotnej (test t z poprawką Welcha,  $p < 0,05$ ) redukcji w natężeniu wywołanych objawów chorobowych na plastrach ziemniaka odmiany Gala.

### Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób eradykacji bakteryjnych fitopatogenów, **znamienny tym**, że do inaktywacji bakteryjnych fitopatogenów stosuje się wodne roztwory soli nieorganicznych, aktywowane za pomocą wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD generowanego w kontakcie z FLC w ciągłym układzie przepływowym.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się wodne roztwory soli nieorganicznych zawierające jony:  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $NO_3^-$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ .
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że stosuje się: 0,4% (v/v) nawóz zawierający jony  $PO_4^{3-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  oraz mikroelementy B, Cu, Fe, Mn, Zn; 0,1% (m/v)  $Fe_2(SO_4)_3$ , 0,1% (m/v)  $K_3PO_4$ , 0,1% (m/v)  $MgSO_4$ , 0,1% (m/v)  $KNO_3$ , 0,1% (m/v)  $NaCl$  oraz 0,1% (m/v)  $NH_4NO_3$ .
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wyładowanie typu dc-APGD generowane jest pomiędzy stałą metaliczną anodą umieszczoną w odległości od 2,0 do 10,00 mm względem FLC, przy czym wyładowanie typu dc-APGD jest inicjowane w wyniku przyłożenia do elektrod napięcia w zakresie od 800 do 2000 V oraz natężenia prądu w zakresie od 30 do 60 mA.
5. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że wyładowanie typu dc-APGD jest inicjowane w wyniku przyłożenia do elektrod napięcia 1100 V oraz natężenia prądu 45 mA.
6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wodne roztwory soli nieorganicznych wprowadza się do układu przepływowego z szybkością przepływu w zakresie od 3,0 do 5,0  $cm^3/min$ .
7. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że wodne roztwory soli nieorganicznych wprowadza się do układu przepływowego z szybkością przepływu 3,0  $cm^3/min$ .
8. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wodne roztwory soli nieorganicznych wprowadza się do układu w temperaturze pokojowej.
9. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że temperatura kinetyczna fazy gazowej wyładowania mieści się w zakresie od 2000 do 3000 K.
10. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że sposób eradykacji prowadzi się w czasie od 1 do 60 s, najkorzystniej 30 s.
11. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że sposób eradykacji prowadzi się wobec bakteryjnych fitopatogenów roślin, w szczególności z rodzaju *Pectobacterium* lub z rodzaju *Dickeya*.

Rysunki

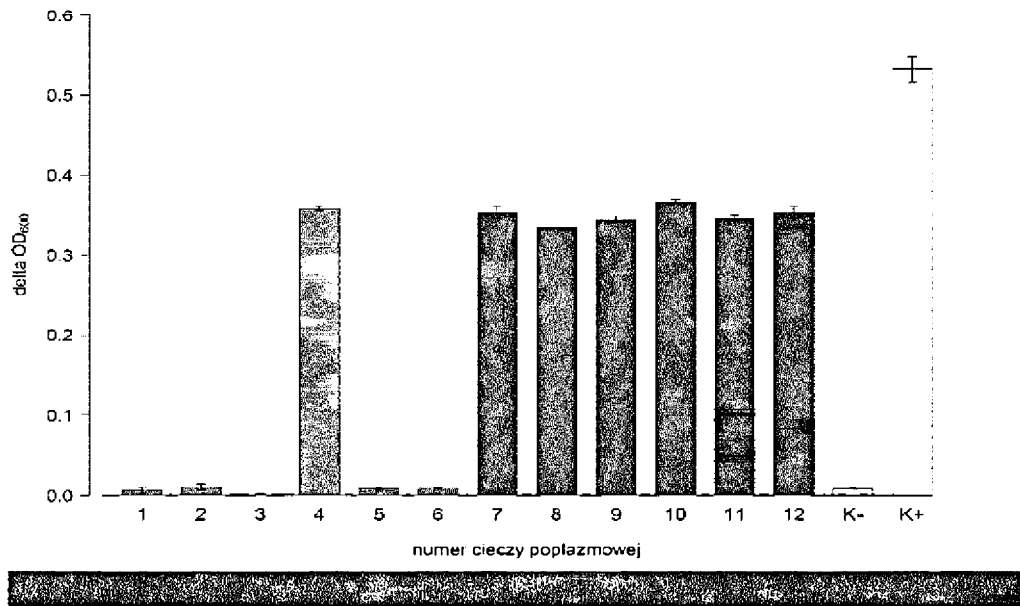


Fig. 1

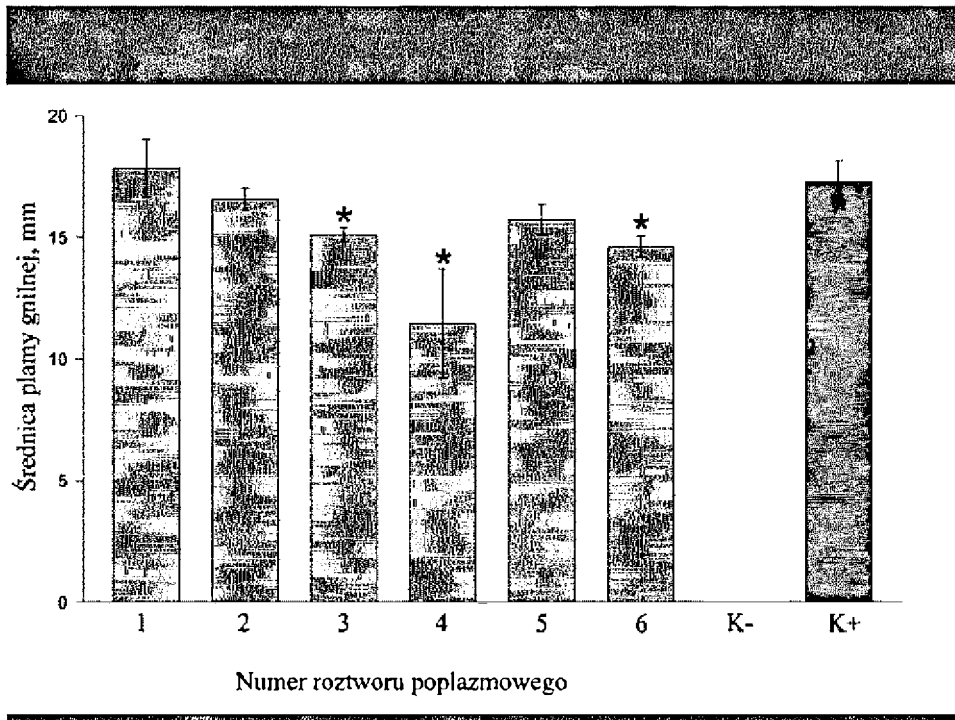


Fig. 2