

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 242412 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **431823**

(22) Data zgłoszenia: **2019.11.15**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2020.11.16 BUP 24/2020**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.02.20 WUP 08/2023**

(51) MKP:

C02F 1/46 (2006.01)

A61L 2/14 (2006.01)

H05H 1/24 (2006.01)

B09B 3/00 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

UNIWERSYTET GDAŃSKI, Gdańsk, PL

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

AGATA MOTYKA-POMAGRUK, Gdańsk, PL

ANNA DZIMITROWICZ, Kamienna Góra, PL

WOJCIECH ŚLEDŹ, Olsztyn, PL

PAWEŁ POHL, Wrocław, PL

TYMOTEUSZ KLIŚ, Dębica, PL

PIOTR JAMRÓZ, Wrocław, PL

EWA ŁOJKOWSKA, Gdańsk, PL

(74) Pełnomocnik:

Justyna Pawłowska, Gdynia, PL

(54) Tytuł:

Sposób dezaktywacji antybiotyków w roztworach wodnych

PL 242412 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób dezaktywacji antybiotyków z roztworów wodnych z zastosowaniem stałoprądowego wyładowania jarzeniowego, generowanego pod ciśnieniem atmosferycznym (ang. direct current atmospheric pressure glow discharge, dc-APGD) w kontakcie z przepływającą cieczą w ciągłym układzie przepływowym. Wynalazek umożliwia dezaktywację antybiotyków przed uwolnieniem ich do środowiska naturalnego i w efekcie ograniczenie rozprzestrzeniania się oporności na antybiotyki, m.in. wśród bakterii patogennych względem człowieka czy też zwierząt hodowlanych i użytkowych.

Mając na uwadze powszechne wykorzystanie antybiotyków w medycynie bądź ich prewencyjne podawanie zwierzętom hodowlanym (w celu osiągnięcia przez nie szybszego przyrostu biomasy oraz obniżenia padnięć), antybiotyki przenikają do środowiska naturalnego, tj. gleb czy też wód powierzchniowych, przyczyniając się do zwiększenia powszechności występowania zjawiska wielolekooporności wśród mikroorganizmów. Z tego względu, znalezienie skutecznej metody dezaktywacji antybiotyków jest niezwykle ważne. Odpowiedzią na ten problem może być przedstawiony w zgłoszeniu wynalazek, który może znaleźć zastosowanie zwłaszcza w medycynie, w przemyśle farmaceutycznym, przy hodowli zwierząt, w rolnictwie do dezaktywacji antybiotyków rozpuszczalnych w wodzie – zwłaszcza ampicyliny, chloramfenikolu oraz penicyliny G.

Znane są różne układy stosowane do generowania zimnych plazm atmosferycznych wykorzystujące m.in. wyładowania barierowe (ang. dielectric barrier discharge, DBD), wyładowania jarzeniowe (ang. glow discharge, GD), ślizgające wyładowania łukowe (ang. gliding arc discharge, GAD) oraz wyładowania iskrowe generowane w cieczy (ang. underwater spark discharge, USD). Poza rodzajem wyładowań wykorzystywanych do generowania zimnych plazm atmosferycznych, wspomniane układy różnią się m.in. parametrami pracy, tj. napięciem, natężeniem prądu, stosowanym gazem wyładowczym oraz konstrukcją.

W publikacji autorstwa K.-S. Kim, C.-S. Yang, Y.S. Mok pt.: „*Degradation of veterinary antibiotics by dielectric barrier discharge plasma*” (Chemical Engineering Journal 2013, 219, 19–27) opisano sposób degradacji antybiotyków (linkomycyny, cyprofloksacyny, enrofloksacyny, chlorotetracykliny, oksytetracykliny, sulfatiazolu, sulfametoksazolu, sulfametazyny oraz trimetoprimu w stężeniu 5 mg L⁻¹) z roztworów wodnych z użyciem wyładowań barierowych (ang. dielectric barrier discharge, DBD). Zastosowany do degradacji antybiotyków reaktor plazmowy z wyładowaniami DBD składał się z kwarcowej rurki, stalowej elektrody oraz ceramicznego dyfuzora gazu. Wyładowania DBD były generowane w atmosferze tlenu bądź powietrza, w wyniku zasilania reaktora plazmowego prądem zmiennym o częstotliwości 60 Hz. Efektywna długość tak powstałej plazmy wynosiła 20 cm, natomiast objętość traktowanego roztworu za pomocą wyładowań DBD wynosiła 1000 cm³.

W kontekście wykorzystania metody do unieczynnienia antybiotyków wykazano jednakże, że współczynniki degradacji tych chemioterapeutyków zależą głównie od ilości dostarczonej energii oraz efektywnego wytwarzania ozonu. W celu uzyskania 60% efektywności degradacji danego antybiotyku z użyciem DBD generowanych w atmosferze powietrza potrzebne były nakłady energetyczne 0,26 kJ/mg (dla sulfatiazolu) oraz 1,49 kJ/mg (dla cyprofloksacyny), podczas gdy 90% dezaktywacja analizowanych chemioterapeutyków z zastosowaniem DBD generowanych również w atmosferze powietrza wymagała zastosowania energii 0,39 kJ/mg (dla sulfatiazolu) oraz 2,06 kJ/mg (dla cyprofloksacyny). Unieczynnienie cyprofloksacyny, trimetoprimu oraz sulfametoksazolu okazało się być efektywniejsze niż sulfatiazolu, chlorotetracykliny oraz oksytetracykliny. Przykładowo, stężenie trimetoprimu malało do ok. zera przy ekspozycji roztworu tego antybiotyku na wyładowania DBD o mocy 5,2, 6,8 bądź 8,9 przez odpowiednio 20, 25 bądź 30 min. Czas ten można uznać za relatywnie długi, mogący mieć wpływ na możliwe ograniczenia w przyszłym zastosowaniu tego rozwiązania. Dodatkowo, bez względu na przyłożoną moc, dostarczenie energii rzędu 10 kJ okazało się być niezbędne do całkowitej degradacji trimetoprimu (w stężeniu 5 mg/dm³) w roztworze wodnym. Jest to stosunkowo wysoka wartość, zwiększająca znacząco koszty proponowanej metody dezaktywacji antybiotyków z użyciem technologii plazmowej.

W artykule K.-S. Kim, S. K. Kam oraz Y. S. Mok pt.: „*Elucidation of the degradation pathways of sulfonamide antibiotics in a dielectric barrier discharge plasma system*” (Chemical Engineering Journal 2015, 271, 31–42), opisano wyniki prac badawczych nt. możliwości wykorzystania wyładowań DBD do degradacji wodnych roztworów antybiotyków sulfonamidowych, tj. sulfatiazolu, sulfametazyny i sulfa-

metoksazolu w stężeniu 50 mg/dm^3 . Wspomniane wyładowania DBD były generowane w reaktorze plazmowym, w atmosferze powietrza bądź tlenu. Parametry pracy wspomnianego reaktora były takie same jak w poprzedniej pracy tego zespołu pt. „Degradation of veterinary antibiotics by dielectric barrier discharge plasma”.

Odnosząc się do możliwości wykorzystania wyładowań DBD do dezaktywacji antybiotyków, spośród analizowanych chemioterapeutyków sulfametazyna okazała się być najbardziej wrażliwym związkiem na działanie wygenerowanych w reaktorze plazmowym wyładowań DBD, w przeciwieństwie do sulfametoksazolu, którego degradacja była najmniej efektywna. Jak zasugerowali badacze, jest to związane z różnicą w strukturze chemicznej tych związków. Porównując wpływ gazów wyładowczych na skuteczność procesu dezaktywacji antybiotyków, opisano, że zastosowanie tlenu zamiast powietrza skutkowało możliwością uzyskania całkowitego rozkładu analizowanych antybiotyków, co wyjaśniono zwiększeniem stężenia wygenerowanego w takich warunkach ozonu (z $5,6 \text{ mg/dm}^3$ do $14,2 \text{ mg/dm}^3$). Korzystne działanie ozonu wynika też z jego pośredniego działania, gdyż w efekcie rozpuszczania w wodzie ozonu generowane są rodniki hydroksylowe o silniejszych właściwościach utleniających (potencjał oksydacyjny $2,8 \text{ V}$) od tych wykazywanych przez samą molekułę ozonu (potencjał oksydacyjny $2,07 \text{ V}$). Aby uzyskać 60% wydajność rozkładu sulfatiazolu, sulfametazyny i sulfametoksazolu należało dostarczyć energię wynoszącą odpowiednio $67,2$, $53,1$ bądź $80,2 \text{ J/mg}$ (w atmosferze powietrza) lub $36,1$, $30,8$ bądź $41,3 \text{ J/mg}$ (w atmosferze tlenu), podczas gdy 90% efektywność degradacji powyższych sulfonamidów została uzyskana przy odpowiednio $87,2$, $70,7$ oraz $104,8 \text{ J/mg}$ (w atmosferze powietrza) lub $43,7$, $37,8$ bądź $50,3 \text{ J/mg}$ (w atmosferze tlenu). Moc zmierzona przy przyłożonym napięciu $20,1 \text{ kV}$ oscylowała od $2,82 \text{ W}$ (w atmosferze powietrza) do $4,06 \text{ W}$ (w atmosferze tlenu). Ponadto, stwierdzono, że proces mineralizacji produktów degradacji sulfonamidów zachodzi efektywniej w atmosferze tlenu w porównaniu do stosowanej atmosfery powietrza, co wynika ze wzrostu w zmierzonej przewodności elektrycznej oraz spadku pH traktowanych za pomocą DBD wodnych roztworów antybiotyków. Procentowa różnica w zawartości całkowitego węgla organicznego skorelowana z efektywnością usuwania sulfatiazolu, sulfametazyny bądź sulfametoksazolu z roztworu wyniosła odpowiednio $10,9\%$, $16,3\%$ bądź $12,1\%$ (atmosfera powietrza) lub $34,7\%$, $24,2\%$ bądź $24,3\%$ (atmosfera tlenu) w trakcie wyładowania generowanego przez 60 min. Zaobserwowano, że wynika to z formowania się niskocząsteczkowych związków organicznych. Oprócz wspomnianych powyżej niskocząsteczkowych związków organicznych, w roztworze poddanym działaniu DBD (generowanego w obu zadanych warunkach) wykryto również jony azotanowe (V), amonowe (IV) oraz siarczanowe (VI). Czas ekspozycji wyładowania barierowego na roztwór, wynoszący 15 min bądź 25–40 min (w zależności od tego czy układ pracował w atmosferze tlenu czy suchego powietrza) był niezbędny, aby dezaktywować antybiotyki w stężeniu 50 mg/dm^3 z wodnych roztworów. Metoda ta wykazuje niedogodności związane z powstawaniem licznych produktów ubocznych podczas tak prowadzonego rozkładu i aby osiągnąć całkowitą mineralizację chemioterapeutyków, wymagane jest zastosowanie dłuższych czasów ekspozycji i/lub dostarczenie większej ilości energii do układu.

W manuskrypcie S. Rong i Y. Sun pt.: „*Wetted-wall corona discharge induced degradation of sulfadiazine antibiotics in aqueous solution*” (Journal of Chemical Technology & Biotechnology 2014, 89(9), 1351–1359), opisano możliwość wykorzystania wyładowań koronowych generowanych w kontakcie z filmem cieczy do degradacji sulfadiazyny. Sulfadiazyna to antybiotyk klasyfikowany do sulfonamidów, stosowany w medycynie i weterynarii w celu inaktywacji mikroorganizmów chorobotwórczych. Ze względu na powszechne wykorzystanie tego chemioterapeutyku w hodowli zwierząt, jego podstawowa forma strukturalna (bądź acetylowa pochodna powstająca w wyniku przemian metabolicznych) często przenika z aplikowanych na pola nawozów pochodzenia odzwierzęcego do środowiska naturalnego (gleb czy też wód powierzchniowych), przyczyniając się do zwiększenia powszechności występowania zjawiska wielolekooporności wśród mikroorganizmów. W publikacji opisano zastosowanie wyładowania koronowego (ang. corona discharge CD), generowanego w dwucylindrycznym układzie reakcyjno-wyładowczym, w kontakcie z filmem cieczy, tj. roztworem wodnym antybiotyku przeznaczonym do unieczynnienia, z zastosowaniem generatora prądu zmiennego w atmosferze powietrza. Szybkość przepływu roztworu wodnego sulfadiazyny przez układ plazmowy wynosiła według opisanej metodyki $50 \text{ cm}^3/\text{min}$. Aby dezaktywować roztwór wodny zawierający 10 mg/dm^3 sulfadiazyny, wyładowania koronowe były generowane przez 30 min w 150 mm obszarze wyładowczym podczas kontaktu z filmem cieczy. Opisano wpływ wielu czynników zewnętrznych jak np. obecność jonów Fe^{2+} na efektywność metody. Pomimo długiego czasu oddziaływania (30 min) wyładowań DBD na poddawany dezaktywacji roztwór antybiotyku, dalej stwierdzano obecność produktów pośrednich zachodzącej reakcji rozkładu

sulfadiazyny. Opisana metoda ma zatem pewne niedogodności, znacząco ograniczające późniejsze zastosowanie przemysłowe w przedstawionej formie.

Jak dotąd możliwości wykorzystania technologii plazmowej do degradacji antybiotyków, zostały opisane w nielicznych pracach, zwłaszcza pod kątem praktycznego zastosowania plazmy do unieczynienia antybiotyków. Wiele danych wskazuje również na ograniczenia dotąd podjętego kierunku badań. Warto podkreślić, że w dostępnej literaturze szacowano metodami analitycznymi jedynie efektywność degradacji wspomnianych leków oraz dyskutowano możliwe mechanizmy rozkładu tych związków w kontekście wykrywanych form pośrednich. Co istotne, według naszej najlepszej twórców przedmiotowego wynalazku, nie przedstawiono w znanym stanie techniki dowodów na możliwość zniwelowania antybakteryjnych właściwości antybiotyków z użyciem technologii plazmowej.

Należy nadmienić, że obecnie antybiotyki są masowo uwalniane do środowiska naturalnego, przez co powstaje presja selekcyjna skutkująca efektywnym rozprzestrzenianiem się bakterii wielolekoopornych, między innymi wśród bakterii patogennych względem człowieka i zwierząt hodowlanych. Opracowanie skutecznej metody dezaktywacji antybiotyków mogłoby przyczynić się do ograniczenia tego niekorzystnego trendu. Istotnym jest, że usuwanie aktywnych cząsteczek chemioterapeutyków z ciekłych odpadów medycznych, produktów ubocznych pochodzących z koncernów farmaceutycznych, wód pochodzących z hodowli czy wód kanalizacyjnych, metodami powszechnie stosowanymi w oczyszczalniach ścieków, jest skrajnie nieefektywne ze względu na silne właściwości biobójcze tej grupy związków chemicznych. Stanowiło to cel przedstawionego wynalazku.

Twórcy metody wykazali możliwość wykorzystania plazmy przy opracowanej charakterystyce metody.

Według wynalazku roztwór antybiotyków traktuje się wyładowaniem jarzeniowym typu dc-APGD w celu degradacji antybiotyków powszechnie stosowanych w medycynie i weterynarii. Według wynalazku, opracowano metodykę do unieczynienia antybiotyków z wykorzystaniem plazmy generowanej poprzez wyładowania typu dc-APGD. Istota sposobu dezaktywacji antybiotyków, według wynalazku, polega na tym, że roztwór wodny antybiotyku w stężeniach 0,0001 do 1000 mg/dm³ poddaje się działaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD w ciągłym układzie przepływowym, przy czym wodny roztwór antybiotyku wprowadza się w temperaturze pokojowej z szybkością przepływu w zakresie 0,1–20,0 cm³/min do układu reakcyjno-wyładowczego za pomocą wężyka perystaltycznego do kwarcowej kapilary, na której umieszczona jest rurka grafitowa. Wyładowanie jarzeniowe typu dc-APGD generuje się, na skutek przyłożenia do elektrod napięcia w zakresie 200–2000 V oraz natężenia prądu 15–60 mA w przestrzeni pomiędzy stałą metaliczną anodą a przepływającą ciekłą katodą, będącą dezaktywowanym roztworem antybiotyku, i traktuje się nim pełniący funkcję przepływającej ciekłej katody analizowany wodny roztwór antybiotyku aż do jego dezaktywacji. Korzystnie, wodny roztwór antybiotyku wprowadza się w temperaturze pokojowej z szybkością przepływu w zakresie 3,0 cm³/min. Korzystnie, wyładowanie jarzeniowe typu dc-APGD generuje się, na skutek przyłożenia do elektrod napięcia w zakresie 1200 V oraz natężenia prądu 40 mA. Korzystnie roztwór wodny antybiotyku w stężeniach 5 mg/dm³, poddaje się działaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD. Korzystnie, przestrzeń pomiędzy stałą metaliczną anodą a przepływającą ciekłą katodą, będącą dezaktywowanym roztworem antybiotyku ma długość 4,0 mm. Korzystnie, do dezaktywacji wodnych roztworów antybiotyków stosuje się roztwory po dodaniu jonów zwiększających siłę jonową roztworu, najkorzystniej Na⁺ oraz Cl⁻.

Najlepsze wyniki zaobserwowano dla podanych poniżej wartości parametrów.

Korzystnie jest dezaktywować wodne roztwory antybiotyków w przypadku obecności substancji zwiększających siłę jonową roztworu, najkorzystniej przy dodaniu NaCl do stężenia końcowego 0,85%.

Najlepiej jest wprowadzać do układu reakcyjno-wyładowczego z wyładowaniem jarzeniowym typu dc-APGD roztwory antybiotyków o temperaturze w zakresie 15–25°C (temperatura pokojowa).

Z zastosowaniem wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD wodne roztwory antybiotyków nawet z roztworów zawierających te związki w stężeniach zdecydowanie wyższych niż opisywane dotąd w literaturze jako odnotowywane w ściekach, ciekach wodnych czy środowisku naturalnym. Najkorzystniej dezaktywuje się wodne roztwory antybiotyków w stężeniu 5 mg/dm³.

Opracowana metoda, według wynalazku, zapewnia utratę lub znaczące obniżenie (w zależności od analizowanego stężenia) antybakteryjnej aktywności wodnych roztworów antybiotyków, co pokazano w odniesieniu do epidemiologicznie istotnych drobnoustrojów chorobotwórczych względem ludzi i zwierząt. Wykazano, że metoda prowadzi do dezaktywacji, z zastosowaniem wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD roztworów wodnych antybiotyków powszechnie stosowanych w medycynie, weterynarii

i rolnictwie, w szczególności ampicyliny, penicyliny G oraz chloramfenikolu. Metoda umożliwia dezaktywację antybiotyków prowadząc do utraty przez te związki właściwości antybakteryjnych względem bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, najkorzystniej przynależących do gatunków *Staphylococcus aureus* oraz *Escherichia coli*, co wykazano w badaniach.

Przedmiot wynalazku jest przedstawiony w przykładach jego realizacji nieograniczających jego zakresu oraz na figurach obrazujących co następuje:

- na fig. 1 zaprezentowano schemat układu reakcyjno-wyładowczego z wyładowaniem jarzeniowym typu dc-APGD, stosowanego do dezaktywacji wodnych roztworów antybiotyków. Na fig. 1. elementy konstrukcyjne układu z wyładowaniem jarzeniowym typu dc-APGD opisano w następujący sposób: (1) – wodny roztwór analizowanego antybiotyku; (2) – dc-APGD; (3) – wężyk perystaltyczny; (4) – czterokanałowa pompa perystaltyczna; (5) – kwarcowa kapilara; (6) – rurka grafitowa; (7) – elektroda wolframowa; (8) – generator wysokiego napięcia; (9) – dezaktywowany za pomocą wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD wodny roztwór antybiotyku.
- na fig. 2 przedstawiono obniżenie aktywności antybakteryjnej chloramfenikolu względem szczepu referencyjnego *Escherichia coli* ATCC 25922, uzyskane poprzez traktowanie wodnych roztworów chloramfenikolu w stężeniach 250 mg/dm³, 500 mg/dm³ oraz 1000 mg/dm³ wyładowaniem jarzeniowym typu dc-APGD, zgodnie z istotą wynalazku. Innymi słowy, fig. 2. obrazuje zmiany w średnicy stref zahamowania wzrostu wspomnianego patogena w teście dyfuzyjno-krażkowym, wynikające z różnic w antybakteryjnej aktywności wodnych roztworów chloramfenikolu traktowanych za pomocą wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD, w porównaniu do roztworów nietraktowanych tym wyładowaniem.
- na fig. 3 przedstawiono obniżenie aktywności antybakteryjnej ampicyliny względem szczepu referencyjnego *Escherichia coli* ATCC 25922, uzyskane poprzez traktowanie wodnych roztworów ampicyliny w stężeniach 250 mg/dm³, 500 mg/dm³ oraz 1000 mg/dm³ wyładowaniem jarzeniowym typu dc-APGD, zgodnie z istotą wynalazku. Fig. 3 obrazuje zmiany w średnicy stref zahamowania wzrostu wspomnianego patogena w teście dyfuzyjno-krażkowym, wynikające z różnic w antybakteryjnej aktywności wodnych roztworów ampicyliny traktowanych za pomocą wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD, w porównaniu do roztworów nietraktowanych tym wyładowaniem.
- na fig. 4 przedstawiono spadek aktywności antybakteryjnej penicyliny G względem trzech szczepów *Staphylococcus aureus*: Newman, USA 300, ATTC 25923 (uwzględniono zarówno szczepy metycylinooporne o dużym znaczeniu klinicznym jak i metycylinowrażliwe), uzyskany poprzez traktowanie dc-APGD zgodnie z istotą wynalazku, wodnego roztworu penicyliny G w stężeniu 5 mg/dm³. Uwzględnione w analizie stężenie antybiotyku jest bardziej zbliżone do stężeń chemoterapeutyków obserwowanych w środowisku naturalnym, tj. przykładowo dla sulfatiazolu, sulfametazyny czy sulfametoksazolu stężenia odnotowywane w wodach powierzchniowych wynoszą odpowiednio 0–2,11 µg/dm³, 0–1,36 µg/dm³ bądź 0–0,48 µg/dm³ (Chemical Engineering Journal 2015, 271, 31–42). Fig. 4 obrazuje zmiany w średnicy stref zahamowania wzrostu wspomnianych patogenów w teście dyfuzyjno-krażkowym, wynikające z różnic w antybakteryjnej aktywności 5 mg/dm³ wodnego roztworu penicyliny G traktowanego za pomocą wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD, w porównaniu do roztworu 5 mg/dm³ tego antybiotyku nietraktowanego tym wyładowaniem.
- na fig. 5 przedstawiono przykładowy wynik testu dyfuzyjno-krażkowego, z widocznymi strefami zahamowania wzrostu bakterii patogennej wywołanymi aktywnością antybiotyku oraz brak stref zahamowania wzrostu, gdy antybiotyk poddano wcześniej działaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD.

Przykład 1

Sposób degradacji antybiotyków, na przykładzie wodnych roztworów zawierających chloramfenikol w stężeniu 250, 500 i 1000 mg/dm³, polegający na dezaktywacji tych związków za pomocą wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD, generowanego w kontakcie z przepływającą cieczą w ciągłym układzie przepływowym.

10,00 cm³ wodnego roztworu antybiotyku (1), w tym przypadku chloramfenikolu w stężeniu 250, 500 lub 1000 mg/dm³, po dodaniu NaCl aż do uzyskania stężenia 0,85%, zapewniającego optymalną siłę jonową roztworu, wprowadza się do układu reakcyjno-wyładowczego (fig. 1) z wyładowaniem jarze-

niowym typu dc-APGD (2) za pomocą sterylnego węża perystaltycznego (3), połączonego z cztero-kanalową pompą perystaltyczną (4), z szybkością przepływu $3,0 \text{ cm}^3/\text{min}$. Poddawany dezaktywacji wodny roztwór antybiotyku (1) o zadanym stężeniu jest wprowadzany z węża perystaltycznego do kwarcowej kapilary (5), na której umieszczono rurkę grafitową (6). Istotnym elementem układu reakcyjno-wyładowczego z dc-APGD jest wolframowa elektroda (7), zamontowana w odległości 4,00 mm, współosiowo do rurki kwarcowo-grafitowej. W wyniku przyłożenia do rurki grafitowej (poprzez drucik platynowy) oraz do wolframowej elektrody wysokiego napięcia rzędu 1200 V z generatora wysokiego napięcia (8), w przestrzeni pomiędzy wprowadzanym do układu dezaktywowanym wodnym roztworem chloramfenikolu – przepływającą ciekłą katodą (1) a stałą metaliczną anodą (7) inicjowane jest wyładowanie jarzeniowe typu dc-APGD (2). Wartość natężenia prądu w badanym układzie reakcyjno-wyładowczym wynosi 40 mA. Po traktowaniu wodnego roztworu chloramfenikolu wyładowaniem jarzeniowym typu dc-APGD jest ten roztwór zbierany do jałowych probówek o pojemności $10,00 \text{ cm}^3$ (9).

Następnie przygotowuje się zawiesinę bakterii *E. coli* ATTC 25922 w soli fizjologicznej (0,85 NaCl). Szczep bakterii *E. coli* ATTC 25922 przetrzymywany w warunkach głębokiego zmrożenia w -80°C wysiewany jest sposobem redukcyjnym na podłoże hodowlane LA. Tak inokulowane podłoże inkubuje się w cieplarni, w temperaturze 37°C , przez okres 24 h. Następnie pobiera się jedną kolonię *E. coli* ATTC 25922 i inokuluje pożywkę płynną LB. Tak uzyskaną hodowlę inkubuje się w temperaturze 37°C przez okres 24 h z wytrząsaniem 120 rpm. Następnie $1,50 \text{ cm}^3$ hodowli nocnej komórek *E. coli* ATTC 25922 przenosi się do probówki typu Eppendorf i wiruje przy 6500 rpm przez 10 min. Supernatant jest usuwany. Pozostały osad bakteryjny zawiesza się w $1,5 \text{ cm}^3$ jałowej soli fizjologicznej. Wykonuje się następnie kolejne płukanie tj. zawieszone komórki wiruje się przy 6500 rpm przez 10 min, usuwa supernatant i raz jeszcze zawiesza w $1,50 \text{ cm}^3$ jałowej soli fizjologicznej. Po wykonaniu kolejnego wirowania (6500 rpm przez 10 min), komórki bakteryjne *E. coli* ATTC 25922 wprowadza się do jałowej soli fizjologicznej w szklanej probówce tak, aby na podstawie pomiarów densytometrycznych, gęstość uzyskanej zawiesiny bakteryjnej wyniosła 0,5 McF.

Tak przygotowaną zawiesinę komórek bakteryjnych *E. coli* ATTC 25922 o gęstości 0,5 McF używa się do przeprowadzenia testów dyfuzyjno-krażkowych, w których analizuje się właściwości antibakteryjne roztworów chloramfenikolu poddanych działaniu dc-APGD. $100 \mu\text{l}$ zawiesiny bakteryjnej komórek *E. coli* ATTC 25922 wysiewa się metodą posiewu na murawę na płytkę zawierającą 20 cm^3 podłoża Mueller-Hinton. Na powierzchni płytki Petriego o średnicy 92 mm układa się jałowe krażki bibułowe o średnicy 5 mm (min. 2 cm odległości pomiędzy krażkami; maksymalnie 4 krażki na płytkę z podłożem Mueller-Hinton); po 1 krażku dla każdego z testowanych roztworów o różnych stężeniach chloramfenikolu, tj. 250, 500 lub $1000 \text{ mg}/\text{dm}^3$, poddanych działaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD oraz po 1 krażku przeznaczonym na naniesienie każdego wodnego roztworu chloramfenikolu w stężeniach 250, 500 lub $1000 \text{ mg}/\text{dm}^3$, nietraktowanych za pomocą wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD. Na jeden krażek nanosi się $10 \mu\text{l}$ testowanego wodnego roztworu chloramfenikolu w stężeniu 250, 500 lub $1000 \text{ mg}/\text{dm}^3$, poddanego działaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD bądź $10 \mu\text{l}$ takiego samego stężenia wodnego roztworu chloramfenikolu, ale niepoddanego działaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD, stanowiącego próbę kontrolną. Następnie tak przygotowane hodowle inkubuje się w temperaturze 4°C przez 1 h, a kolejno w temperaturze 37°C przez 24 h. Efektywność degradacji chloramfenikolu określa się przez obserwowane zmniejszenie właściwości antibakteryjnych roztworów chloramfenikolu poddanych działaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD względem *E. coli* ATTC 25922, w porównaniu do prób kontrolnych nietraktowanych za pomocą wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD. Efektywność dezaktywacji chloramfenikolu jest wyrażana poprzez redukcję średnicy zahamowania wzrostu tego drobnoustroju (tzw. strefy „halo”). Przedstawione doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach.

Efektywność degradacji chloramfenikolu: na Fig. 2. przedstawiono obniżenie właściwości antibakteryjnych chloramfenikolu względem szczepu referencyjnego *Escherichia coli* ATCC 25922, uzyskane poprzez traktowanie wodnych roztworów chloramfenikolu w stężeniach 250, 500 lub $1000 \text{ mg}/\text{dm}^3$ za pomocą wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD, zgodnie z istotą wynalazku. Fig 3. obrazuje średnicę (średnia $\pm$ odchylenie standardowe) stref zahamowania wzrostu wspomnianego patogena (czyli średnicę strefy halo) w teście dyfuzyjno-krażkowym, wynikającą z aktywności antibakteryjnej roztworów chloramfenikolu poddanych działaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD oraz tych nietraktowanych tym wyładowaniem, a stanowiących próby kontrolne. Gwiazdką oznaczono statystycznie istotne różnice (test t-studenta przy $p < 0,05$).

W ten sposób wykazano, że wodne roztwory chloramfenikolu o zadanych stężeniach, traktowane wyładowaniem jarzeniowym typu dc-APGD według wynalazku, wykazują znacząco niższe właściwości antybakteryjne względem szczepu referencyjnego *Escherichia coli* ATCC 25922 (analogicznie do efektu przedstawionego na fig. 5), także po uwolnieniu do środowiska naturalnego nie będą powodować równie silnej presji selekcyjnej w porównaniu do roztworów antybiotyków niepoddanych dezaktywacji. Ze względu na powyższe, rozprzestrzenianie się wielolekooporności wśród patogenów ludzi i zwierząt hodowlanych może zostać znacząco ograniczone.

Przykład 2

Sposób degradacji antybiotyków, na przykładzie wodnych roztworów zawierających ampicylinę w stężeniu 250, 500 i 1000 mg/dm³, polegający na ich dezaktywacji za pomocą wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD, generowanego w kontakcie z przepływającą cieczą w ciągłym układzie przepływowym.

10,00 cm³ wodnego roztworu antybiotyku (1), w tym przypadku ampicyliny w stężeniu 250, 500 lub 1000 mg/dm³, po dodaniu NaCl do uzyskania stężenia 0,85%, zapewniającego optymalną siłę jonową roztworu, wprowadza się do układu reakcyjno-wyładowczego (fig. 1) z wyładowaniem jarzeniowym typu dc-APGD (2) za pomocą sterylnego wężyka perystaltycznego (3), połączonego z czterokanałową pompą perystaltyczną (4), z szybkością przepływu 3,0 cm³/min. Poddawany dezaktywacji wodny roztwór ampicyliny o zadanim stężeniu jest wprowadzany z wężyka perystaltycznego do kwarcowej kapilary (5), na której umieszczono rurkę grafitową (6). Istotnym elementem układu reakcyjno-wyładowczego z dc-APGD jest wolframowa elektroda (7), zamontowana w odległości 4,00 mm, współosiowo do rurki kwarcowo-grafitowej. W wyniku przyłożenia do rurki grafitowej (poprzez drucik platynowy) oraz do wolframowej elektrody wysokiego napięcia rzędu 1200 V z generatora wysokiego napięcia (8), w przestrzeni pomiędzy wprowadzanym do układu wodnym roztworem ampicyliny – przepływającą cieczą katodą a stałą metaliczną anodą inicjowane jest wyładowanie jarzeniowe typu dc-APGD (2). Wartość natężenia prądu w badanym układzie reakcyjno-wyładowczym wynosi 40 mA. Po traktowaniu wodnego roztworu ampicyliny wyładowaniem jarzeniowym typu dc-APGD jest on zbierany do jałowych probówek o pojemności 10,00 cm³ (9).

Następnie przygotowuje się zawiesinę bakterii *E. coli* ATCC 25922 w soli fizjologicznej (0,85 NaCl). Szczep bakterii *E. coli* ATCC 25922 przetrzymywany w warunkach głębokiego zmrożenia w -80°C wysiewany jest sposobem redukcyjnym na podłoże hodowlane LA. Tak inokulowane podłoże inkubuje się w cieplarni, w temperaturze 37°C, przez okres 24 h. Następnie pobiera się jedną kolonię *E. coli* ATCC 25922 i inokuluje pożywkę płynną LB. Tak uzyskaną hodowlę inkubuje się w temperaturze 37°C przez okres 24 h z wytrząsaniem 120 rpm. Następnie 1,50 cm³ hodowli nocnej komórek *E. coli* ATCC 25922 przenosi się do probówki typu Eppendorf i wiruje przy 6500 rpm przez 10 min. Supernatant jest usuwany. Pozostały osad bakteryjny zawiesza się w 1,5 cm³ jałowej soli fizjologicznej. Wykonuje się następnie kolejne płukanie tj. zawieszone komórki wiruje się przy 6500 rpm przez 10 min, usuwa supernatant i raz jeszcze zawiesza w 1,50 cm³ jałowej soli fizjologicznej. Po wykonaniu kolejnego wirowania (6500 rpm przez 10 min), komórki bakteryjne *E. coli* ATCC 25922 wprowadza się do jałowej soli fizjologicznej w szklanej probówce tak, aby na podstawie pomiarów densytometrycznych, gęstość uzyskanej zawiesiny bakteryjnej wyniosła 0,5 McF.

Tak przygotowaną zawiesinę komórek bakteryjnych *E. coli* ATCC 25922 o gęstości 0,5 McF używa się do przeprowadzenia testów dyfuzyjno-krażkowych, w których analizuje się właściwości antybakteryjne roztworów ampicyliny poddanych działaniu dc-APGD. 100 µl zawiesiny bakteryjnej komórek *E. coli* ATCC 25922 wysiewa się metodą posiewu na murawę na płytkę zawierającą 20 cm³ podłoża Mueller-Hinton. Na powierzchni płytki Petriego o średnicy 92 mm układa się jałowe krążki bibułowe o średnicy 5 mm (min. 2 cm odległości pomiędzy krążkami; maksymalnie 4 krążki na płytkę z podłożem Mueller-Hinton); po 1 krążku dla każdego z testowanych roztworów o różnych stężeniach ampicyliny, tj. 250, 500 lub 1000 mg/dm³, poddanych działaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD oraz po 1 krążku przeznaczonym na naniesienie każdego wodnego roztworu ampicyliny w stężeniach 250, 500 lub 1000 mg/dm³, nietraktowanych za pomocą wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD. Na jeden krążek nanosi się 10 µl testowanego wodnego roztworu ampicyliny w stężeniu 250, 500 lub 1000 mg/dm³, poddanego działaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD bądź 10 µl takiego samego stężenia wodnego roztworu ampicyliny, ale niepoddanego działaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD, stanowiącego próbę kontrolną. Następnie tak przygotowane hodowle inkubuje się w temperaturze 4°C przez 1 h, a kolejno w temperaturze 37°C przez 24 h. Efektywność degradacji ampicyliny określa się przez obserwowane zmniejszenie właściwości antybakteryjnych roztworów ampicyliny poddanych

działaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD względem *E. coli* ATCC 25922, w porównaniu do prób kontrolnych nietraktowanych za pomocą wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD. Efektywność dezaktywacji ampicyliny jest wyrażana poprzez redukcję średnicy zahamowania wzrostu tego drobnoustroju (tzw. strefy „halo”). Przedstawione doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach.

Efektywność degradacji ampicyliny: na Fig. 3. przedstawiono obniżenie aktywności antybakteryjnej roztworów ampicyliny względem szczepu referencyjnego *Escherichia coli* ATCC 25922, uzyskane poprzez traktowanie wodnych roztworów ampicyliny w stężeniach 250, 500 lub 1000 mg/dm³ za pomocą wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD, zgodnie z istotą wynalazku. Fig. 3. obrazuje średnicę (średnia $\pm$ odchylenie standardowe) stref zahamowania wzrostu (czyli średnicę strefy halo) wspomnianego patogena w teście dyfuzyjno-krażkowym, wynikającą z aktywności antybakteryjnej roztworów ampicyliny poddanych działaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD oraz tych nietraktowanych tym wyładowaniem, a stanowiących próby kontrolne. Gwiazdką oznaczono statystycznie istotne różnice (test t-studenta przy $p < 0,05$).

W ten sposób wykazano, że wodne roztwory ampicyliny o zadanych stężeniach, traktowane wyładowaniem jarzeniowym typu dc-APGD według wynalazku, wykazują znacząco niższe właściwości antybakteryjne względem szczepu referencyjnego *Escherichia coli* ATCC 25922 (analogicznie do efektu przedstawionego na fig. 5), także po uwolnieniu do środowiska naturalnego nie będą powodować równie silnej presji selekcyjnej w porównaniu do roztworów antybiotyków niepoddanych dezaktywacji. Ze względu na powyższe rozprzestrzenianie się wielolekooporności wśród patogenów ludzi i zwierząt hodowlanych może zostać znacząco ograniczone.

Przykład 3

Sposób degradacji antybiotyków, na przykładzie wodnego roztworu zawierającego penicylinę G w stężeniu 5 mg/dm³, polegający na jego dezaktywacji za pomocą wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD, generowanego w kontakcie z przepływającą cieczą w ciągłym układzie przepływowym.

10,00 cm³ wodnego roztworu antybiotyku (1), w tym przypadku penicyliny G w stężeniu 5 mg/dm³, po dodaniu NaCl do uzyskania stężenia 0,85% (m/v), zapewniającego optymalną siłę jonową roztworu, wprowadza się do układu reakcyjno-wyładowczego (fig. 1) z wyładowaniem jarzeniowym typu dc-APGD (2), za pomocą sterylnego wężyka perystaltycznego (3), połączonego z czterokanałową pompą perystaltyczną (4), z szybkością przepływu 3,0 cm³/min. Poddawany dezaktywacji wodny roztwór penicyliny G o zadanej stężeniu (1) jest wprowadzany z wężyka perystaltycznego do kwarcowej kapilary (5), na której umieszczono rurkę grafitową (6). Istotnym elementem układu reakcyjno-wyładowczego z dc-APGD jest wolframowa elektroda (7), zamontowana w odległości 5,00 mm, współosiowo do rurki kwarcowo-grafitowej. W wyniku przyłożenia do rurki grafitowej (poprzez drucik platynowy) oraz do wolframowej elektrody wysokiego napięcia rzędu 1200 V z generatora wysokiego napięcia (8), w przestrzeni pomiędzy wprowadzanym do układu wodnym roztworem penicyliny G – przepływającą ciekłą katodą a stałą metaliczną anodą inicjowane jest wyładowanie jarzeniowe typu dc-APGD (2). Wartość natężenia prądu w badanym układzie reakcyjno-wyładowczym wynosi 40 mA. Po traktowaniu wodnego roztworu penicyliny G wyładowaniem jarzeniowym typu dc-APGD, jest on zbierany do jałowych probówek o pojemności 10,00 cm³ (9).

Następnie przygotowuje się zawiesinę bakterii *S. aureus* szczepu Newman w soli fizjologicznej (0,85% (m/v) NaCl). *S. aureus* szczep Newman przetrzymywany w warunkach głębokiego zmróżenia w -80°C wysiewany jest sposobem redukcyjnym na podłoże hodowlane LA. Tak inokulowane podłoże inkubuje się w cieplarni, w temperaturze 37°C, przez okres 24 h. Następnie pobiera się jedną kolonię *S. aureus* szczepu Newman i inokuluje pożywkę płynną LB. Tak uzyskaną hodowlę inkubuje się w temperaturze 37°C przez okres 24 h z wytrząsaniem 120 rpm. Następnie 1,50 cm³ hodowli nocnej komórek *S. aureus* szczepu Newman przenosi się do probówki typu Eppendorf i wiruje przy 6500 rpm przez 10 min. Supernatant jest usuwany. Pozostały osad bakteryjny zawiesza się w 1,5 cm³ jałowej soli fizjologicznej. Wykonuje się następnie kolejne płukanie tj. zawieszone komórki wiruje się przy 6500 rpm przez 10 min, usuwa supernatant i raz jeszcze zawiesza w 1,50 cm³ jałowej soli fizjologicznej. Po wykonaniu kolejnego wirowania (6500 rpm przez 10 min), komórki bakteryjne *S. aureus* szczepu Newman wprowadza się do jałowej soli fizjologicznej w szklanej probówce tak, aby na podstawie pomiarów densytometrycznych, gęstość uzyskanej zawiesiny bakteryjnej wyniosła 0,5 McF. Analogicznie przygotowuje się zawiesiny bakteryjne o gęstości 0,5 McF dla *S. aureus* szczepu USA 300 oraz *S. aureus* szczepu ATCC 25923.

Tak uzyskane zawiesiny komórek bakteryjnych *S. aureus* szczepu Newman, USA 300 oraz ATTC 25923 o gęstości 0,5 McF używa się do przeprowadzenia testów dyfuzyjno-krażkowych, w których testuje się właściwości antybakteryjne wodnego roztworu penicyliny G o stężeniu 5 mg/dm³, traktowanego za pomocą wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD. 100 µl zawiesiny bakteryjnej komórek *S. aureus* szczepu Newman wysiewa się metodą posiewu na murawę na płytkę zawierającą 20 cm³ podłoża Mueller-Hinton. Na powierzchni płytki Petriego o średnicy 92 mm układa się jałowe krążki bibułowe o średnicy 5 mm (min. 2 cm odległości pomiędzy krążkami; maksymalnie 4 krążki na płytkę z podłożem Mueller-Hinton); stosuje się 1 krążek do nałożenia wodnego roztworu penicyliny G o stężeniu 5 mg/dm³ poddanego działaniu dc-APGD jak i 1 krążek na naniesienie wodnego roztworu penicyliny G w stężeniu 5 mg/dm³, nieekspozowanego na wpływ wyładowań jarzeniowych typu dc-APGD. Na jeden krążek nanosi się 5 µl wodnego roztworu penicyliny G poddanego działaniu dc-APGD bądź 5 µl wodnego roztworu penicyliny G w stężeniu takim samym jak w przypadku roztworu traktowanego plazmą, ale niepoddanego działaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD, co stanowi próbę kontrolną. Następnie tak przygotowane hodowle inkubuje się w temperaturze 4°C przez 1 h, a kolejno w temperaturze 37°C przez 24 h. Efektywność degradacji penicyliny G jest wyrażana poprzez redukcję średnicy zahamowania wzrostu (tzw. strefy „halo”) *S. aureus* szczepu Newman określoną na podstawie obserwowanych właściwości antybakteryjnych penicyliny G poddanej działaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD względem *S. aureus* szczepu Newman w porównaniu do próby kontrolnej, czyli efektu aplikacji roztworu penicyliny G nietraktowanego za pomocą wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD. Przedstawione doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach. Analogicznie przeprowadzono doświadczenie ze szczepami *S. aureus* USA 300 oraz ATTC 25923.

Efektywność degradacji penicyliny G: na Fig. 4. przedstawiono całkowite zniesienie właściwości antybakteryjnych wodnego roztworu penicyliny względem *S. aureus* szczepu Newman, *S. aureus* szczepu USA 300 oraz *S. aureus* szczepu ATTC 25923, uzyskane poprzez traktowanie wodnego roztworu penicyliny G w stężeniu 5 mg/dm³ za pomocą wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD, zgodnie z istotą wynalazku. Fig. 4. obrazuje średnicę (średnia ± odchylenie standardowe) stref zahamowania wzrostu (czyli średnicę strefy „halo”) wspomnianych patogenów w teście dyfuzyjno-krażkowym, wynikającą z aktywności antybakteryjnej wodnego roztworu penicyliny G nietraktowanego z użyciem wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD, w porównaniu do braku aktywności antybakteryjnej obserwowanej w przypadku naniesienia wodnego roztworu penicyliny G traktowanego tym wyładowaniem. Gwiazdką oznaczono statystycznie istotne różnice (test t-studenta przy $p < 0,05$).

W ten sposób wykazano, że wodne roztwory ampicyliny o zadanych stężeniach, traktowane wyładowaniem jarzeniowym typu dc-APGD, według wynalazku, wykazują brak właściwości antybakteryjnych względem trzech szczepów *S. aureus* tj. Newman, USA 300 oraz ATTC 25923 (analogicznie do efektu przedstawionego na fig. 5). Można na tej podstawie stwierdzić, że po uwolnieniu do środowiska naturalnego traktowany za pomocą wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD roztwór wodny antybiotyku nie będzie wywierać znaczącej presji selekcyjnej. Stąd, rozprzestrzenianie się wielolekooporności wśród patogenów ludzi i zwierząt hodowlanych może zostać znacząco ograniczone.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób dezaktywacji antybiotyków z roztworów za pomocą wyładowania jarzeniowego, **znamienny tym**, że roztwór wodny antybiotyku w stężeniach 0,0001 do 1000 mg/dm³ poddaje się działaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD w ciągłym układzie przepływowym, przy czym wodny roztwór antybiotyku wprowadza się w temperaturze pokojowej z szybkością przepływu w zakresie 0,1–20,0 cm³/min do układu reakcyjno-wyładowczego za pomocą wężyka perystaltycznego do kwarcowej kapilary, na której umieszczona jest rurka grafitowa, a wyładowanie jarzeniowe typu dc-APGD generuje się, na skutek przyłożenia do elektrod napięcia w zakresie 200–2000 V oraz natężenia prądu 15–60 mA w przestrzeni pomiędzy stałą metaliczną anodą a przepływającą ciekłą katodą, będącą dezaktywowanym roztworem antybiotyku, i traktuje się nim pełniący funkcję przepływającej ciekłej katody analizowany wodny roztwór antybiotyku aż do jego dezaktywacji.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wodny roztwór antybiotyku wprowadza się w temperaturze pokojowej z szybkością przepływu w zakresie 3,0 cm³/min.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wyładowanie jarzeniowe typu dc-APGD generuje się, na skutek przyłożenia do elektrod napięcia w zakresie 1200 V oraz natężenia prądu 40 mA.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że roztwór wodny antybiotyku w stężeniach 5 mg/dm^3 , poddaje się działaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że przestrzeń pomiędzy stałą metaliczną anodą a przepływającą ciekłą katodą, będącą dezaktywowanym roztworem antybiotyku ma długość 4,0 mm.
6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do dezaktywacji wodnych roztworów antybiotyków stosuje się roztwory po dodaniu jonów zwiększających siłę jonową roztworu, najkorzystniej Na^+ oraz Cl^- .

Rysunki

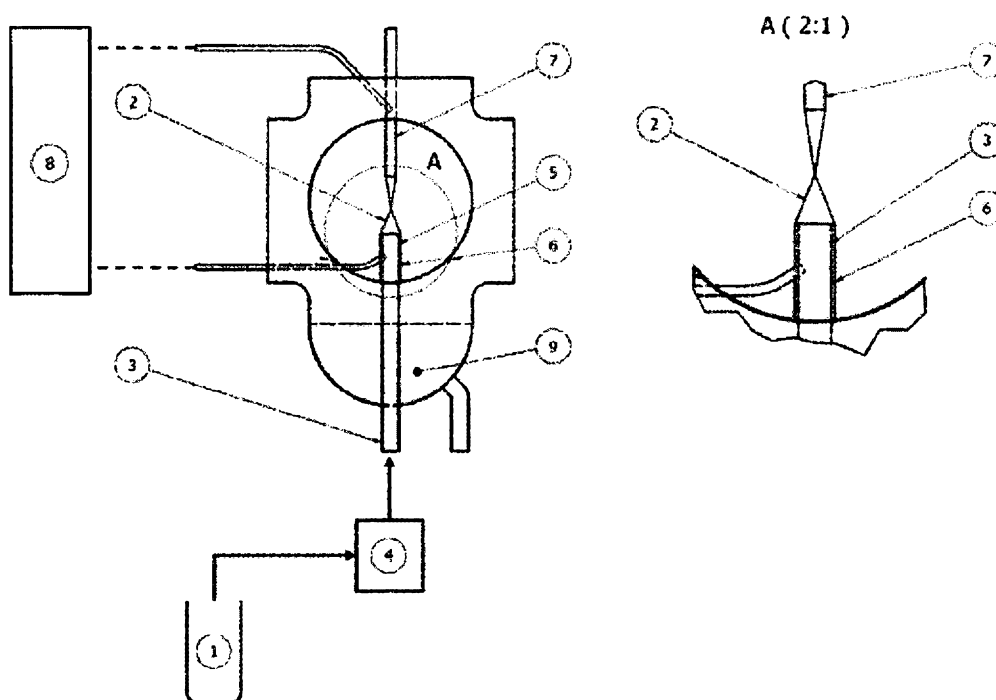


Fig. 1.

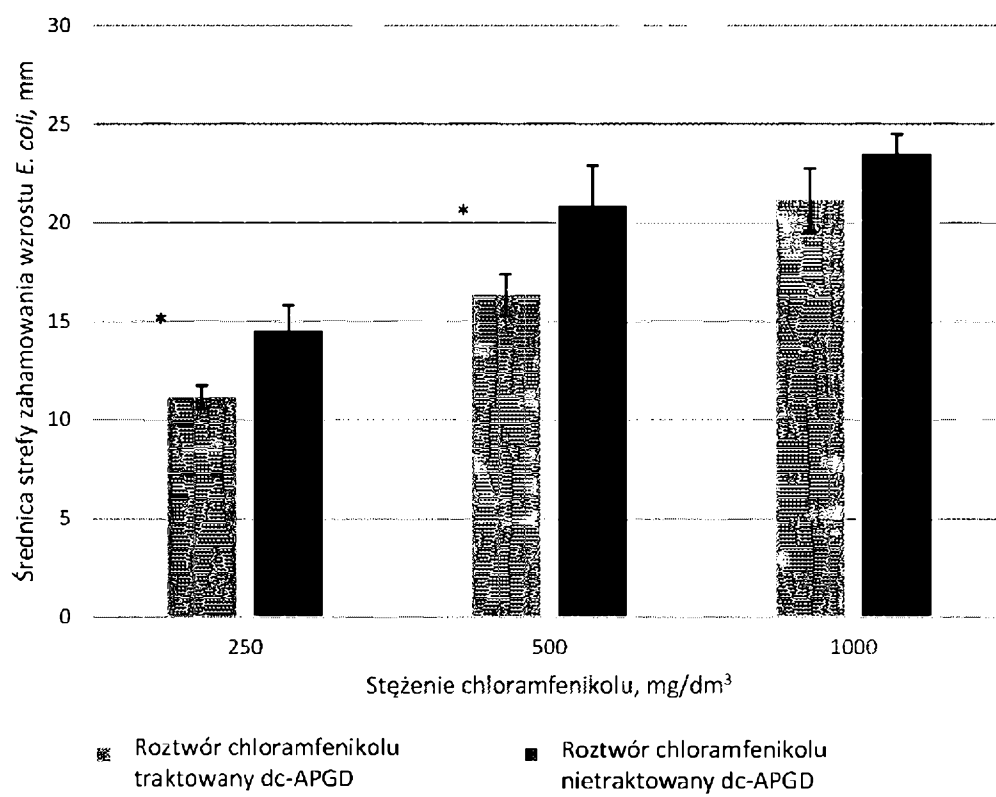


Fig. 2

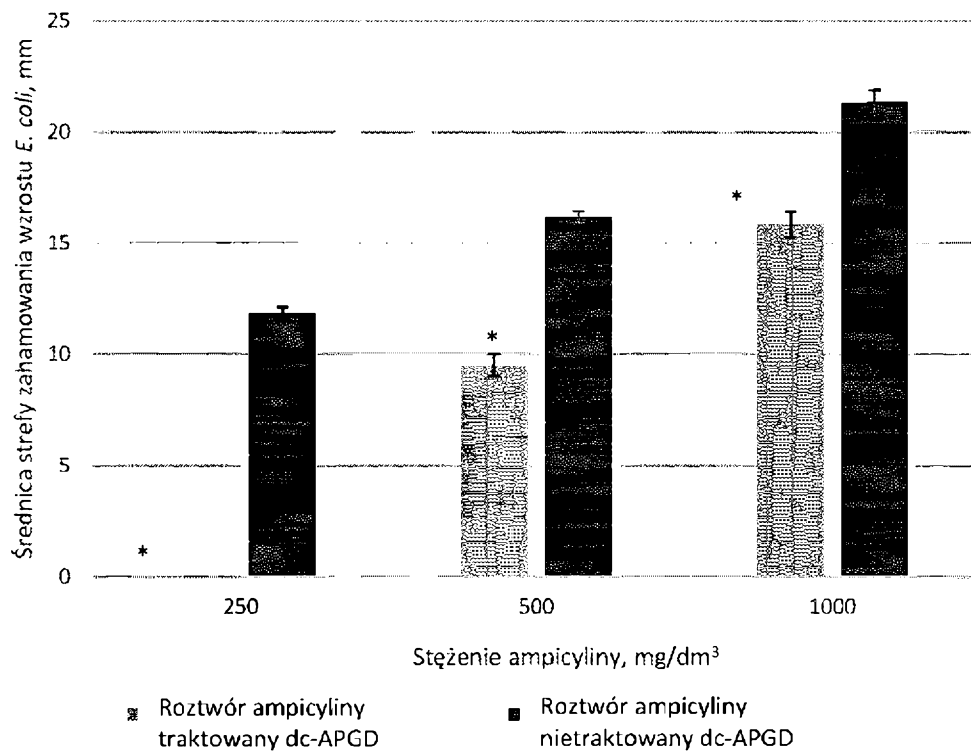


Fig. 3

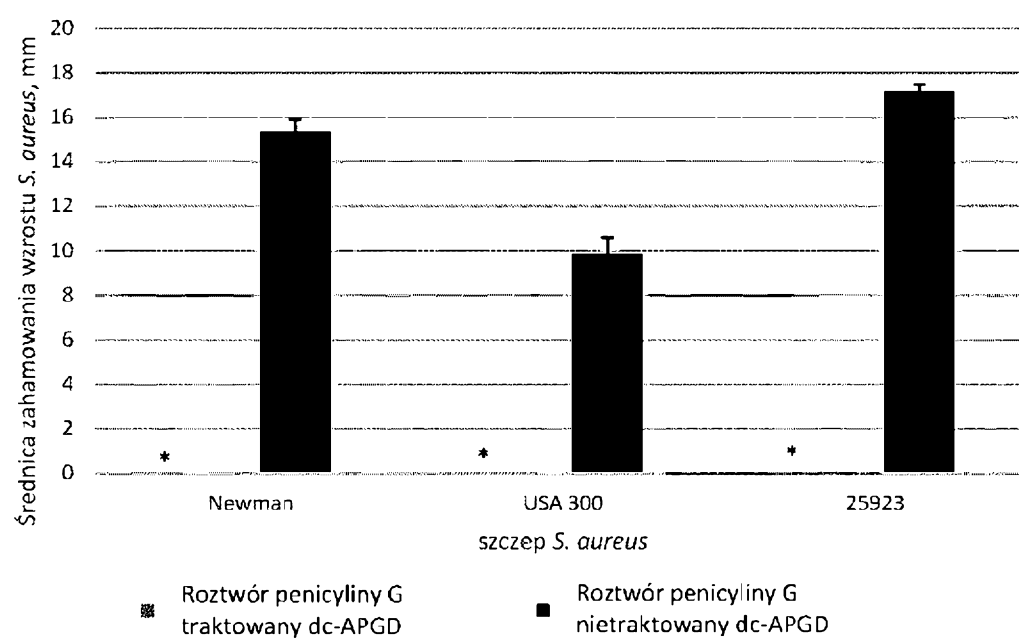


Fig. 4



Fig. 5