

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 243531 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **439149**

(22) Data zgłoszenia: **2021.10.07**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.04.11 BUP 15/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.09.04 WUP 36/2023**

(51) MKP:

C12P 19/04 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**ZACHODNIOPOMORSKI UNIWERSYTET
TECHNOLOGICZNY W SZCZECINIE,
Szczecin, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**KAROL FIJAŁKOWSKI, Szczecin, PL
MIROSŁAWA EL FRAY, Dobra Szczecińska, PL
RADOSŁAW DROZD, Szczecin, PL
ANNA ŻYWICKA, Łobez, PL
PIOTR SOBOLEWSKI, Szczecin, PL
DARIA CIECHOLEWSKA-JUŚKO, Szczecin, PL
MAGDALENA SZYMAŃSKA, Szczecin, PL**

(74) Pełnomocnik:

Monika Wielecka, Szczecin, PL

(54) Tytuł:

**Sposób wytwarzania modyfikowanej celulozy bakteryjnej o właściwościach
przeciwdrobnoustrojowych**

PL 243531 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania modyfikowanej *ex situ* bionanocelulozy (BNC) wytwarzanej w warunkach hodowli stacjonarnej lub dynamicznej z wykorzystaniem szczepu z rodzaju *Komagataeibacter* (wcześniej *Gluconacteobacter*), korzystnie *Komagataeibacter xylinus* o właściwościach przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybiczych i przeciwwirusowych. Materiały BNC wytworzone metodą według wynalazku zapewniają inaktywację czynnika zakaźnego dzięki funkcjonalizacji membrany BNC za pomocą plazmy niskociśnieniowej, czyli zjonizowanych cząsteczek gazu i mogą znaleźć zastosowanie między innymi w medycynie np. jako materiał opatrunkowy w terapii zakażonych, przewlekłych i trudno gojących się ran. Zaletą metody opracowanej według wynalazku, jest wykorzystanie na wszystkich jej etapach tylko tzw. „zielonych” technik, niewymagających zastosowania szkodliwych substancji chemicznych i nie generujących toksycznych odpadów czyniąc cały proces w pełni proekologicznym. Istotnym aspektem opracowanego rozwiązania jest ponadto możliwość wykorzystania odpadów przemysłu rolno-spożywczego jako nowych źródeł składników odżywczych dla bakterii syntetyzujących celulozę (jako przykład, pożywki produkcyjnej na bazie soku komórkowego z bulw ziemniaków, w tym jako produktu odpadowego przemysłu krochmalniczego, opisanej w zgłoszeniu patentowym PL 433327).

Wykorzystanie BNC w medycynie, między innymi jako materiału opatrunkowego oraz sztucznych organów, jest możliwe dzięki takim jej właściwościom jak wysoka czystość, wytrzymałość mechaniczna, zdolność chłonięcia cieczy, nietoksyczność i biokompatybilność. Ponadto materiał uzyskiwany z BNC jest porowaty, elastyczny, w pełni biodegradowalny, łatwy w zastosowaniu i przechowywaniu, zapewnia optymalną wilgotność sprzyjającą gojeniu się ran i może być sterylizowany termicznie. Właściwie oczyszczone błony celulozowe, wytworzone metodą hodowli stacjonarnej, mogą stanowić materiał opatrunkowy spełniający standardy przypisane nowoczesnym opatrunkom. Błony celulozowe są również bardzo dobrymi nośnikami służącymi do immobilizacji różnorodnych substancji bioaktywnych, przyspieszających proces gojenia lub o charakterze przeciwdrobnoustrojowym.

W opisie patentowym PL 171952 przedstawiono sposób wytwarzania BNC w postaci błon na drodze hodowli stacjonarnej bakterii *Acetobacter xylinum* P23 na podłożu agarowym opartym o glukozę. Uzyskane błony o zawartości 90–97% α -celulozy mogą być stosowane jako środek opatrunkowy w chirurgii i dermatologii. Opis patentowy PL 185337 dotyczy sposobu wytwarzania BNC z zastosowaniem szczepu *Acetobacter xylinum* w postaci błon stosowanych jako biomateriał opatrunkowy. Prezentowana metoda jest dwuetapowa, przy czym w pierwszym etapie przygotowania inokulum stosowana jest eza szczepu na 25–50 cm³ podłoża (czas inkubacji 40–48 h), zaś w drugim etapie przygotowania inokulum, pożywką z utworzoną na niej błoną, po intensywnym zmieszaniu, zaszczepia się podłoże (5–10% wag. zawiesiny na 200–300 cm³ podłoża; czas inkubacji 40–48 h). Zastosowanie tej metody pozwala na uzyskanie wysokokrystalicznej α -celulozy bakteryjnej w postaci folii o grubości 0,01–0,5 mm, o czystości wynoszącej ~97%, o stopniu polimeryzacji 2000–6000 oraz cechującej się wysoką jednorodnością i gęstością powierzchniową (22–24 g·m⁻²). Z opisu patentowego PL 216180 znany jest sposób wytwarzania BNC o właściwościach opatrunku na uszkodzenia skóry, przeznaczonej do zastosowania dla wyrobów medycznych i dermatologiczno-kosmetycznych w postaci czystych, wilgotnych, suszonych, liofilizowanych lub napawanych z użyciem substancji czynnych i/lub pomocniczych lub ich kombinacji, który charakteryzuje się tym, że BNC wytwarza się na drodze hodowli szczepu bakterii *G. xylinus* E₂₅, przechowywanym w postaci liofilizatu z 5–15% odtłuszczonego mleka lub w postaci liofilizatu z 5–15% glicerolu, z których przygotowuje się inokulum starterowe do zaszczepienia podłoża hodowlanego zawierającego: 2% glukozy, 0,90% etanolu, 0,10% kwasu cytrynowego, 0,50% ekstraktu drożdżowego oraz sole mineralne: 0,05% MgSO₄·7H₂O, 0,30% Na₂HPO₄. W zgłoszeniu patentowym PL 430888 przedstawiono sposób wytwarzania modyfikowanej BNC, który polega na impregnacji oczyszczonej BNC w mieszaninie 20% roztworu kwasu cytrynowego, a następnie przeprowadzeniu reakcji sieciowania w obecności 5–15% roztworu wodorofosforanu disodu i/lub wodorowęglanu sodu jako katalizatora (korzystnie w stosunku wagowym kwasu cytrynowego do katalizatora od 1 : 1 do 6 : 1, w temperaturze 120–200°C). Chemicznie modyfikowana poprzez reakcję sieciowania BNC, z zastosowaniem katalizatorów, posiada właściwości, które ukierunkowują jej zastosowanie w medycynie lub kosmetyce, jako wysokochłonne materiały o dowolnym kształcie i kompozycji: w formie czystej lub jako nośniki wysycane różnego rodzaju substancjami o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, przeciwzapalnym, nawilżającym lub łagodzącym. Tak modyfikowane błony BNC mogą być szczególnie przydatne do przygotowania opatrunków znajdujących zastosowanie w leczeniu rozległych, trudno gojących się ran oraz łagodzeniu

uszkodzeń skóry po zabiegach leczniczych oraz dermatologiczno-kosmetycznych. Opatrunki takie mogą znaleźć również zastosowanie w leczeniu ran wysokowysiękowych, gdyż są w stanie pochłaniać przez długi okres duże ilości substancji płynnych (np. wysięk z rany). Z opisu patentowego US 7390499 B2 znany jest sposób otrzymywania celulozy mikrobiologicznej w warunkach statycznej hodowli z zastosowaniem szczepu *A. xylinum* charakteryzującej się zdolnością do oddawania nadmiaru płynów na rzecz stopniowego wysychania, ale i do pobierania nadmiaru płynu po wyschnięciu, a tym samym znajdującą zastosowanie do produkcji opatrunków przeznaczonych do leczenia ran przewlekłych, owrzodzeniowych, odleżynowych i stopy cukrzycowej.

Pomimo opisanych powyżej sposobów otrzymywania BNC i możliwych aplikacji tego unikalnego biomateriału jako opatrunków lub nośników dla substancji bioaktywnych, istnieje ciągła potrzeba doskonalenia jego właściwości w celu zwiększenia możliwości jego zastosowania w specyficznych aplikacjach medycznych i biotechnologicznych. Związane jest to z faktem, iż istniejące metody i technologie ciągle nie pozwalają osiągnąć maksymalnych, a często nawet wystarczających parametrów, jakie można uzyskać w przypadku biomateriałów na bazie BNC, a tym samym w pełni wykorzystać ich potencjał aplikacyjny.

Jednym ze znanych sposobów, pozwalających na modyfikację polimerów, w tym biopolimerów takich jak BNC, w celu poprawy ich właściwości fizycznych i biologicznych jest modyfikacja za pomocą plazmy, czyli zjonizowanych cząsteczek gazu (Cools i in., 2019). Najczęściej stosowana jest plazma niskotemperaturowa, określana powszechnie jako „zimna” plazma, która może być generowana w procesach niskociśnieniowych lub przy ciśnieniu atmosferycznym. Obecnie znanych i skomercjalizowanych jest wiele metod otrzymania plazmy, opartych o wyładowania koronowe, wyładowania jarzeniowe lub wykorzystujące generatory o częstotliwości radiowej i generatory mikrofalowe. W technologii tej również szeroko stosowane są różnego rodzaju gazy i ich mieszaniny jak np. powietrze atmosferyczne, tlen, azot, argon, hel, wodór czy amoniak. Jako sposób modyfikacji powierzchni, plazma jest metodą „zieloną” ponieważ w procesie nie stosuje się rozpuszczalników organicznych, produkt nie wymaga dogłębnego płukania, a sam proces jest niskoodpadowy.

W sektorze ochrony zdrowia, zastosowanie plazmy jest znane od lat 1960, począwszy od opisu wynalazku US3383163A przedstawiającego sterylizację wnętrza pojemników szklanych lub polimerowych za pomocą plazmy argonowej lub azotowej. Kolejnym bardzo istotnym zastosowaniem plazmy w tym sektorze jest wykorzystanie plazmy tlenowej, azotowej, halogenowej oraz ich mieszanin do funkcjonalizacji powierzchni polimerów oraz metali w celu otrzymania wybranych grup funkcyjnych, co zostało ujawnione w opisie wynalazku US4452679A. Przykładowo, technika ta może być zastosowana do nadawania właściwości adhezyjnych pojemnikom lub szalkom polistyrenowym wykorzystywanym w hodowli komórek oraz tkanek.

W opisie patentowym US10016533B2 przedstawiono dwuetapowy sposób powlekania plazmowego urządzeń medycznych, w tym stentów, cewników, rozruszników serca i biosensorów, w celu uzyskania powierzchni o polepszonej długoterminowej biokompatybilności.

Nie ma jednak żadnych doniesień literaturowych pokazujących możliwości zastosowania modyfikacji w materiałach na bazie BNC. W artykule naukowym pt. „Hydrophobic modification of bacterial cellulose using oxygen plasma treatment and chemical vapor deposition” (Leal i in., 2020), opisano metodę, w której BNC była poddawana aktywacji za pomocą plazmy tlenowej (przez 15 minut przy regulowanym przepływie gazu w celu utrzymania stałego ciśnienia w reaktorze 100 Pa), natomiast dalsza modyfikacja krzemoorganiczna była przeprowadzona poprzez konwencjonalne chemiczne osadzanie z fazy gazowej.

W publikacji naukowej pt. „Surface modification of bacterial cellulose by nitrogen-containing plasma for improved interaction with cells” (Pertile i in., 2010), opisano możliwość zastosowania plazmy azotowej (proces prowadzono przez 30 minut, przy przepływie gazu 10 sccm), w celu zwiększenia właściwości adhezyjnych tego biopolimeru wobec komórek zwierzęcych. Z kolei w innym artykule pt. „Biofunctionalized bacterial cellulose membranes by cold plasmas” (Kurniawan i in., 2012), BNC była poddawana działaniu plazm z szerszego zakresu gazów (azot, tlen, CF₄), (proces prowadzono przez 60 s, przy przepływie gazu 20 sccm) również w celu dalszego polepszenia właściwości adhezyjnych.

Sposób wytwarzania modyfikowanej bionanocelulozy (BNC), według wynalazku, polegający na przygotowaniu inokulum poprzez zaszczerpienie na podłożu płynnym Hestrin-Schramm zawierającym glukozę, ekstrakt drożdżowy, pepton bakteryjny, kwas cytrynowy, Na₂HPO₄, MgSO₄·H₂O, w płynnej wysterylizowanej pożywce hodowlanej bakterii fermentacji octowej z rodzaju *Komagataeibacter*,

korzystnie szczepem bakterii *Komagataeibacter xylinus*. Następnie wymieszaniu przez 15 minut i inkubowaniu przez 7 dni w temperaturze 25–30°C, ponownym wymieszaniu przez 5 minut, i, przeniesieniu tak otrzymanego inokulum w ilości 5–20% objętościowych do podłoża produkcyjnego i prowadzeniu hodowli stacjonarnej przez 3–20 dni w temperaturze 25–30°C. Następnym oczyszczaniu za pomocą 0,1 M roztworu NaOH w 80°C przez 30 min i przepłukiwaniu wodą destylowaną do momentu ustabilizowania pH na poziomie 6,5–7,5 i wysuszeniu. Istota wynalazku polega na tym, że materiał BNC poddaje się modyfikacji za pomocą plazmy niskociśnieniowej, czyli zjonizowanych cząsteczek gazu przez czas 1–30 minut. Proces prowadzi się w generatorze plazmy przy przepływie gazu w zakresie 5–50 sccm.

Jako zjonizowane cząsteczki gazu stosuje się argon albo azot albo mieszanę azot/wodór albo powietrze albo hel.

Sposób produkcji biomateriałów BNC według wynalazku, dzięki modyfikacji z wykorzystaniem PNC pozwala na uzyskanie materiału o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Wytworzony materiał jest biokompatybilny, co oznacza, że nie wykazuje on efektu cytotoksycznego względem hodowli komórek *in vitro*. Materiały BNC wytworzone metodą według wynalazku zapewniają inaktywację czynnika zakaźnego dzięki funkcjonalizacji membrany BNC za pomocą PNC, czyli zjonizowanych cząsteczek gazu i mogą znaleźć zastosowanie między innymi w medycynie np. jako materiał opatrunkowy w terapii zakaźnych, przewlekłych i trudno gojących się ran.

Przykład 1

Przygotowano inokulum. W tym celu na podłożu H-S zaszczerpiono bakterie *K. xylinus*. Podłoże H-S zawierało: glukozę (2 w/v%), ekstrakt drożdżowy (0,5 w/v%), pepton bakteryjny (0,5 w/v%), kwas cytrynowy (0,115 w/v%), Na₂HPO₄ (0,27 w/v%), MgSO₄·H₂O (0,05 w/v%). Podłoże było wysterylizowane oraz wzbogacone alkoholem etylowym (1 v/v%). Bakterie *K. xylinus*, przechowywane były na stałym podłożu o składzie: glukoza (2 w/v%), ekstrakt drożdżowy (0,5 w/v%), pepton bakteryjny (0,5 w/v%), kwas cytrynowy (0,115 w/v%), Na₂HPO₄ (0,27 w/v%), MgSO₄·7H₂O (0,05 w/v%) agar bakteriologiczny (2 w/v%), również wysterylizowanym i wzbogaconym alkoholem etylowym (1 v/v%). Po zaszczerpieniu bakterii hodowlę mieszano na wytrząsarce laboratoryjnej przez 15 minut i inkubowano przez kolejne 7 dni w temperaturze 25–30°C. Po 7 dniach inkubacji uzyskaną hodowlę ponownie mieszano na wytrząsarce typu worteks przez 5 minut. Otrzymane w ten sposób inokulum przenoszono na świeże podłoże produkcyjne oparte na glukozie i jej pochodnych (np. medium H-S o takim samym składzie jak podano powyżej). Hodowle produkcyjne prowadzono w pojemnikach hodowlanych o dowolnym kształcie i rozmiarze, korzystnie na tacach ze stali nierdzewnej, lub naczyniach laboratoryjnych (szklanych i plastikowych), wyposażonych w pokrywki posiadające filtry membranowe umożliwiających wymianę gazową w warunkach sterylnych (pory o średnicy 0,22 µm), w warunkach stacjonarnych lub dynamicznych (mieszanych/wytrząsanych) w temperaturze 25–30°C w czasie 3–20 dni.

Po zakończeniu hodowli uzyskany materiał zważono na wadze analitycznej, a następnie otrzymane membrany celulozowe przenoszono do czystych pojemników i przemywano wodą destylowaną. W kolejnym etapie celulozę oczyszczono poprzez inkubację w 0,1 M wodnym roztworze NaOH w temperaturze 80°C przez 30 minut i ponownie ważono. Oczyszczoną celulozę płukano w wodzie destylowanej do momentu ustabilizowania pH na poziomie 6,5–7,5. Następnie, celulozę suszono i poddawano modyfikacji za pomocą plazmy niskociśnieniowej (PNC), z wykorzystaniem argonu przez 10 min przy przepływie gazu 10 sccm.

W celu potwierdzenia skuteczności modyfikacji za pomocą PNCA membrany celulozowe analizowano techniką spektroskopii w podczerwieni wykorzystującej zjawisko osłabionego całkowitego odbicia promieniowania IR (ATR-FTIR). Metoda ta pozwala na dokładną analizę powierzchni otrzymanych membran BNC i potwierdzenie obecności na jej powierzchni określonych grup funkcyjnych. W wyniku modyfikacji powierzchni materiałów BNC przez PNCA na otrzymanych widmach ATR-FTIR stwierdzono obecność grup karbonylowych (tym samym potwierdzono skuteczność zastosowanej metody modyfikacji). Potwierdzono, że membrany przechowywane w warunkach ze swobodnym dostępem powietrza atmosferycznego, jak i w warunkach próżniowych charakteryzują się wysoką stabilnością (trwałością) zastosowanych modyfikacji (minimum 3 miesiące).

Właściwości przeciwdrobnoustrojowe analizowano względem bakterii patogennych zróżnicowanych po względem kształtów, rozmiarów oraz budowy ściany komórkowej: Gram dodatnie ziarniaki *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, Gram ujemne pałeczki *Escherichia coli* ATCC 8739, a także grzyby *Candida albicans* ATCC 10231. Analizowano również właściwości przeciwwirusowe względem 6 różnych bakteriofagów różniących się kształtem i rozmiarem. Wykorzystano także bakteriofaga *Pseudomonas phi6*, który ze względu na swój rozmiar i otoczkę białkową stanowi modelowy mikroorganizm

rekomendowany w badania dotyczących wirusa SARS-CoV-2. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe analizowano według normy ISO 20743:2013 – *Wyznaczanie aktywności antybakteryjnej wyrobów włókienniczych*. Ustalono, że modyfikowane materiały wykazywały 100% redukcję liczby analizowanych bakterii i bakteriofagów. Próbkę modyfikowaną PNCA zachowywały pełną aktywność przeciwdrobnoustrojową przez minimum 3 miesiące przechowywania (nie wykazano różnic w aktywności przeciwdrobnoustrojowej w przypadku prób przechowywanych w opakowaniach z dostępem powietrza lub w opakowanych próżniowych).

BNC modyfikowana z wykorzystaniem PNCA nie wykazywała również właściwości cytotoksycznych, co potwierdzono testami toksyczności względem komórek mysich fibroblastów w warunkach *in vitro*.

Przykład 2

Sposób jak w przykładzie pierwszym, z tym, że modyfikację przeprowadza się z wykorzystaniem PNC wytworzonej poprzez jonizację cząsteczek azotu. Zastosowanie azotu nie zmieniało właściwości materiałowych BNC, w porównaniu do metody opisanej w Przykładzie 1, natomiast skuteczność redukcji liczby *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* wynosiła 90%, a bakteriofagów 100%.

Przykład 3

Sposób jak w przykładzie pierwszym, z tym, że modyfikację przeprowadza się z wykorzystaniem plazmy niskociśnieniowej wytworzonej poprzez jonizację cząsteczek mieszanki gazów azot/wodór. Zastosowanie mieszanki azot/wodór nie zmieniało właściwości materiałowych BNC, w porównaniu do metody opisanej w Przykładzie 1, natomiast skuteczność redukcji liczby *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* wynosiła 80%, a bakteriofagów 100%.

Przykład 4

Sposób jak w przykładzie pierwszym, z tym, że modyfikację przeprowadza się z wykorzystaniem plazmy niskociśnieniowej wytworzonej poprzez jonizację cząsteczek powietrza. Zastosowanie powietrza nie zmieniało właściwości materiałowych BNC, w porównaniu do metody opisanej w Przykładzie 1, natomiast skuteczność redukcji liczby *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* wynosiła 70%, a bakteriofagów 100%.

Przykład 5

Sposób jak w przykładzie pierwszym, z tym, że modyfikację przeprowadza się z wykorzystaniem plazmy niskociśnieniowej wytworzonej poprzez jonizację cząsteczek helu. Zastosowanie helu nie zmieniało właściwości materiałowych BNC, w porównaniu do metody opisanej w Przykładzie 1, natomiast skuteczność redukcji liczby *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* wynosiła 90%, a bakteriofagów 100%.

Przykład 6

Sposób jak w przykładzie pierwszym albo drugim albo trzecim albo czwartym albo piątym, z tym, że jonizację prowadzi się przez czas 30 minut przy przepływie gazu 5 sccm. Zastosowane parametry procesu jonizacji nie zmieniają właściwości materiałowych oraz przeciwdrobnoustrojowych BNC w porównaniu do parametrów opisanych w przykładzie pierwszym albo drugim albo trzecim albo czwartym albo piątym.

Przykład 7

Sposób jak w przykładzie pierwszym albo drugim albo trzecim albo czwartym albo piątym z tym, że jonizację prowadzi się przez czas 1 minuty przy przepływie gazu 50 sccm. Zastosowane parametry procesu jonizacji nie zmieniają właściwości materiałowych oraz przeciwdrobnoustrojowych BNC w porównaniu do parametrów opisanych w przykładzie pierwszym albo drugim albo trzecim albo czwartym albo piątym.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania modyfikowanej bionanocelulozy (BNC) polegający na przygotowaniu inokulum poprzez zaszczerpienie na podłożu płynnym Hestrin-Schramm zawierającym glukozę, ekstrakt drożdżowy, pepton bakteryjny, kwas cytrynowy, Na_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, w płynnej wysterylizowanej pożywce hodowlanej bakterii fermentacji octowej z rodzaju *Komagataeibacter*, korzystnie szczepem bakterii *Komagataeibacter xylinus*, następnie wymieszaniu przez 15 minut i inkubowaniu przez 7 dni w temperaturze 25–30°C, ponownym wymieszaniu przez 5 minut, i, przeniesieniu tak otrzymanego inokulum w ilości 5–20% objętościowych do podłoża produkcyjnego i prowadzeniu hodowli stacjonarnej przez 3–20 dni w temperaturze 25–30°C, następnym oczyszczaniu za pomocą 0,1 M roztworu NaOH w 80°C przez 30 min i przepłukiwaniu wodą destylowaną do momentu ustabilizowania pH na poziomie 6,5–7,5 i wysuszeniu

znamienny tym, że materiał BNC poddaje się modyfikacji za pomocą plazmy niskociśnieniowej przez czas 1–30 minut, a proces prowadzi się w generatorze plazmy przy przepływie gazu w zakresie 5–50 sccm.

2. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że jako zjonizowane cząsteczki gazu stosuje się argon.
3. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że jako zjonizowane cząsteczki gazu stosuje się azot.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako zjonizowane cząsteczki gazu stosuje się mieszkankę azot/wodór.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako zjonizowane cząsteczki gazu stosuje się powietrze.
6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako zjonizowane cząsteczki gazu stosuje się hel.