

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **236055**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **419246**

(22) Data zgłoszenia: **26.10.2016**

(51) Int.Cl.

A61L 2/14 (2006.01)

C02F 1/46 (2006.01)

C02F 103/26 (2006.01)

C02F 103/32 (2006.01)

H05H 1/24 (2006.01)

(54) **Sposób eradykacji bakteryjnych fitopatogenów z zastosowaniem stałoprądowego wyładowania jarzeniowego**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
03.01.2018 BUP 01/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
30.11.2020 WUP 19/20

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(y) wynalazku:

ANNA DZIMITROWICZ, Kamienna Góra, PL
AGATA MOTYKA, Gdańsk, PL
WOJCIECH ŚLEDŹ, Olsztyn, PL
PIOTR JAMRÓZ, Wrocław, PL
PAWEŁ POHL, Wrocław, PL
EWA ŁOJKOWSKA, Gdańsk, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Katarzyna Paprzycka

PL 236055 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób eradykacji bakteryjnych fitopatogenów, wykorzystujący stałoprądowe wyładowanie jarzeniowe pod ciśnieniem atmosferycznym (dc-APGD). Z amerykańskiego zgłoszenia patentowego nr US5876663 (A) znany jest sposób sterylizacji cieczy z wykorzystaniem stacjonarnego wyładowania jarzeniowego (z ang. Stady State Glow Discharge, SSGD), generowanego pod ciśnieniem jednej atmosfery, w przestrzeni między dwiema elektrodami – elektrodą górną oraz elektrodą dolną, wykonanymi z substancji przewodzącej np. z miedzi bądź aluminium. Do wytwarzania wyładowania jarzeniowego typu SSGD konieczne było dostarczenie do układów gazów wyładowczych tj. helu, argonu, neonu, dwutlenku węgla, tlenku azotu(IV) lub mieszaniny gazów szlachetnych z powietrzem, w stosunku objętościowym od 99:1 do 1:99. Wyładowanie jarzeniowe typu SSGD było generowane zarówno w układach o charakterze przepływowym, jak i stacjonarnym. W przypadku układów reakcyjno-wyładowczych, pracujących w systemie przepływowym, ciecz zanieczyszczoną mikroorganizmami wprowadzono z określoną szybkością (od 0,2 do 10 ml/sec), regulowaną za pomocą przepływomierza lub zaworu, do zbiornika usytuowanego pomiędzy elektrodami, gdzie inicjowane było wyładowanie. W odniesieniu do stacjonarnych układów reakcyjno-wyładowczych, ciecz poddawana sterylizacji umieszczona była w zbiorniku o wymiarach 25x25 cm, a ten z kolei znajdował się nad dolną elektrodą, nad którą inicjowano wyładowanie. W omawianej konstrukcji elektrody pokryto warstwą dielektryka i umieszczono w odległości 0,1–5 cm względem siebie. Ponadto zastosowano chłodzenie układu za pomocą wody, aby zapobiec odkształceniu powierzchni dolnej elektrody, dzięki czemu wytworzone wyładowanie było przestrzennie jednorodne. Generacja wyładowania jarzeniowego typu SSGD była związana z dostarczeniem do elektrod prądu zmiennego o częstotliwości od 1 do 100 kHz i napięcia od 1 do 10 kV. Wykorzystując opisywane wyładowanie jarzeniowe typu SSGD istnieje możliwość sterylizacji cieczy oraz żeli, zarówno o wysokiej, jak i o niskiej lepkości (tj. mleko, woda, piwo, krew itd.), prowadzące do unieczynnienia mikroorganizmów (grzybów w tym drożdży, bakteriofagów, bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych). Czas oddziaływania wytworzonej plazmy na zawieszinę poddawaną sterylizacji mieścił się w przedziale od 10 s do 20 minut.

W powyższym zgłoszeniu patentowym przedstawiono dwie formy układów reakcyjno-wyładowczych (przepływową oraz stacjonarną), w których wyładowanie jarzeniowe typu SSGD generowane jest z wykorzystaniem prądu zmiennego o wysokiej częstotliwości i wysokim napięciu oraz gazów wyładowczych. Ze względu na koszty przeprowadzania omawianego procesu sterylizacji, przedstawione układy reakcyjno-wyładowcze wydają się być wysoce nieekonomiczne.

W publikacji autorstwa M. Y. Alkawareek, Q. T. Algwari, G. Laverty, S. P. Gorman, W. G. Graham, D. O'Connell, B. F. Gilmore pt. „Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by atmospheric pressure non-thermal plasma”, opublikowanej w PLoS ONE 7(8) (2012):e44289, opisano sposób eradykacji biofilmu *P. aeruginosa* PA01 za pomocą nietermicznej plazmy generowanej pod ciśnieniem atmosferycznym w postaci strugi gazowej. Przedstawiony układ składał się z dwóch pierścieni-elektrod miedzianych o szerokości 2 mm umieszczonych na kwarcowej rurce (o średnicy wewnętrznej 4 mm i średnicy zewnętrznej 6 mm) w odległości 25 mm względem siebie. Do elektrod przykładano prąd zmienny o częstotliwości radiowej 20 lub 40 kHz oraz napięciu wynoszącym 6000 V. System zasilano za pomocą mieszaniny gazów wyładowczych składającej się z 0,5% tlenu oraz 99,5% helu. W przewężeniu pomiędzy elektrodami generowano plazmę, która wystawała ok. 5 mm poza jedną i drugą krawędź kwarcowej rurki w postaci stożków. Określono możliwość wykorzystania uzyskanej pod ciśnieniem atmosferycznym nietermicznej plazmy do eradykacji biofilmu *P. aeruginosa*. W pierwszym doświadczeniu wykazano, że wytworzony stożek plazmowy jest zdolny do unieczynnienia planktonicznej hodowli *P. aeruginosa* PA01 na podłożu agarowym MHA. Zmierzone strefy zahamowania wzrostu wynosiły kilka centymetrów, podczas gdy stożek plazmy miał średnicę mniejszą niż 5 mm. Ponieważ przeprowadzony test miał charakter przesiewowy i w znaczący sposób odbiegał od sytuacji spotykanej poza laboratorium mikrobiologicznym, naukowcy zainicjowali wytworzenie biofilmu przez *P. aeruginosa* PA01 na komercyjnie dostępnej płytce CBD (z ang. Calgary Biofilm Device). Po ekspozycji pozyskanego biofilmu na nietermiczną plazmę, generowaną z wykorzystaniem częstotliwości 20 kHz, zaobserwowano redukcję liczby żywych komórek bakteryjnych o ponad 4 logarytmy. Całkowitą eradykację drobnoustroju osiągnięto po 10 min. ekspozycji. Prezentowana metoda wydaje się być innowacyjna do sterylizacji urządzeń i cewników powszechnie używanych w medycynie, a zasiedlanych wtórnie przez lekooporne patogeny człowieka, występujące powszechnie w środowisku szpitalnym. Wymienione drobnoustroje są

szczególnie niebezpieczne dla życia pacjentów o obniżonej odporności. Jednakże zastosowanie przedstawionego układu do unieczynnienia drobnoustrojów obecnych w zawiesinach takich jak odpady po produkcyjne wydaje się być wysoce wątpliwe. Jako przyczynę można podać zbyt długi czas ekspozycji niezbędny do całkowitej eradykacji patogenów (>10 min.), punktowe działanie, a także małą przenikliwość wytworzonego stożka plazmowego.

W publikacji autorstwa K. Kučerová oraz K. Hensel pt. „Biological and chemical effect of DC transient spark discharge on *Escherichia coli*”, opublikowanej w *WDS'15 Proceedings of Contributed Papers-Physics* (2015) 192–198, ujawniono wpływ zimnej plazmy atmosferycznej, wytworzonej z zastosowaniem modulowanego stałoprądowego wyładowania iskrowego (z ang. Transient Spark Discharge, TSD), generowanego w atmosferze powietrza, na komórki *E. coli* CCM3954 obecne w planktonicznych zawiesinach odpowiednio w roztworze wodnym bądź w buforze fosforanowym. Na stacjonarną, uziemioną elektrodę układu wyładowczego, nad którą w odległości 1 cm umieszczono elektrodę podłączoną do generatora modulowanego prądu stałego o wysokim napięciu, wprowadzono zawiesinę komórek *E. coli* CCM3954 o gęstości 10^7 jtk/cm³. Wyładowanie typu TSD wytwarzano stosując napięcie w zakresie 10000–13000 V; szybkość wprowadzania zawiesiny bakteryjnej do układu wynosiła 14 cm³/min., natężenie przepływu powietrza 2 dm³/min., natężenie prądu wyładowania 5–18 A, a częstotliwość modulacji 1,5–4 kHz. W celu określenia skuteczności wyładowania typu TSD względem inaktywacji komórek *E. coli* wykorzystano standardową metodę seryjnych rozcieńczeń, posiewów i zliczania jednostek tworzących kolonie obecnych w zawieszynie przed potraktowaniem drobnoustrojów wyładowaniem typu TSD, jak również po ich ekspozycji na działanie zimnej plazmy w czasie do 15 min. W wyniku oddziaływania omawianego wyładowania typu TSD zaobserwowano spadek liczby jednostek tworzących kolonie *E. coli* na cm³ (jtk/cm³) roztworu wodnego z początkowych 10^7 jtk/cm³ do 10^4 jtk/cm³ po 10 min. pracy układu. Ważnym czynnikiem warunkującym wydajność procesu okazała się być siła jonowa wprowadzanego roztworu, ponieważ redukcja w liczbie żywych komórek bakteryjnych *E. coli* po czasie ekspozycji wynoszącym 5 min. sięgnęła ok. 3 logarytmów gdy do układu wprowadzono roztwór wodny i odpowiednio ok. 1 logarytmu, gdy bakterie zawieszono w buforze fosforanowym. Ponadto istotną wadą przedstawionej metody eradykacji jest konieczność zastosowania dużej mocy wyładowania przy uzyskaniu relatywnie niskiej redukcji w liczbie żywych komórek *E. coli*, a także konieczność stosowania przepływu gazu wyładowczego w celu wytworzenia stabilnego wyładowania typu TSD.

Dotychczas nie został opisany w literaturze fachowej lub patentowej sposób eradykacji bakteryjnych fitopatogenów z zastosowaniem stałoprądowego wyładowania jarzeniowego generowanego pod ciśnieniem atmosferycznym (z ang. direct current Atmospheric Pressure Glow Discharge, dc-APGD) w kontakcie z przepływającą zawiesiną bakteryjnych fitopatogenów.

Istotą rozwiązania, według wynalazku, jest sposób eradykacji bakteryjnych fitopatogenów z zastosowaniem stałoprądowego wyładowania jarzeniowego dc-APGD, który polega na tym, że zawiesinę bakteryjnych fitopatogenów wprowadza się do układu reakcyjno-wyładowczego, do komory wyładowczej w której w przestrzeni pomiędzy anodą, będącą stałą elektrodą wolframową, a przepływającą ciekłą katodą, będącą wprowadzaną do układu zawiesiną bakteryjnych fitopatogenów, bezpośrednio w atmosferze otaczającego powietrza inicjuje się i utrzymuje stabilne wyładowanie jarzeniowe typu dc-APGD, co powoduje efektywną inaktywację bakteryjnych fitopatogenów.

Korzystnie z zastosowaniem tego sposobu mogą być inaktywowane zawiesiny zawierające bakteryjne fitopatogeny z gatunków *Dickeya solani*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *X. campestris* pv. *Campestris* oraz *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, Korzystnie zawiesinę bakteryjnych fitopatogenów wprowadza się do układu reakcyjno-wyładowczego z szybkością od 1 do 6 cm³/min., najkorzystniej 3,5 cm³/min.

Korzystnie zawiesinę bakteryjnych fitopatogenów wprowadza się do układu reakcyjno-wyładowczego w temperaturze pokojowej.

Korzystnie proces eradykacji prowadzi się stosując prąd wyładowania o natężeniu 20–60 mA, najkorzystniej 50 mA.

Korzystnie proces eradykacji prowadzi się dostarczając do układu napięcie od 100–2000 V, najkorzystniej 1100 V.

Korzystnie odległość pomiędzy elektrodą wolframową a roztworem ciekłej katody wynosi od 1 do 6 mm, najkorzystniej 5 mm.

Korzystnie w procesie eradykacji temperatura kinetyczna fazy gazowej wyładowania utrzymuje się na poziomie od 2000 do 3000 K.

Efektywność prezentowanego sposobu przetestowano z użyciem zawiesin drobnoustrojów, należących do 4 różnych gatunków i sklasyfikowanych w obrębie 10 najbardziej istotnych z ekonomicznego punktu widzenia bakteryjnych fitopatogenów wg. Mansfielda i innych (2012). Hodowle badanych fitopatogenów, inkubowane przez 24 h w optymalnych warunkach, poddano wirowaniu, usunięciu pożywki i po etapie płukania zawieszono w jałowej soli fizjologicznej (0,85% roztwór NaCl). Gęstość zawiesin bakteryjnych doprowadzono do $OD_{600} \approx 0,1$. Przygotowane zawiesiny bakteryjne seryjnie rozcieńczono do 10^{-6} oraz wysiano po 100 μl z każdego z uzyskanych rozcieńczeń na podłoża agarowe, by oszacować liczbę jednostek tworzących kolonie na cm^3 (jtk/cm^3) obecnych w przygotowanych zawiesinach. Następnie, z szybkością 3,5 cm^3/min . wprowadzano kolejno badane zawiesiny do prezentowanego przepływowego układu reakcyjno-wyładowczego i poddawano oddziaływaniu plazmy przez kilka sekund. Czynności związane z podawaniem mieszanin reakcyjnych do wspomnianego układu, jak i z ich zbieraniem były przeprowadzane w warunkach jałowych. Dodatkowo, w celu wykluczenia przenoszenia komórek drobnoustrojów pomiędzy poszczególnymi seriami, układ każdorazowo wyjaławiano, przepuszczając przez niego 70% roztwór etanolu. Następnie etanol wypłukano nadmiarową ilością jałowego 0,85% NaCl, by nie pozostawić resztek tego rozpuszczalnika wewnątrz układu. Poprawność zaproponowanej metody zweryfikowano stosując próby kontrolne – wprowadzając zawiesinę drobnoustrojów do układu bez zainicjowania wyładowania, a także badając tzw. próby ślepe zawierające jedynie jałowy 0,85% NaCl. Po przejściu poszczególnych zawiesin bakteryjnych przez układ reakcyjno-wyładowczy, zbierano je do jałowych probówek. Następnie każdą zawiesinę bakteryjną poddaną działaniu wyładowania seryjnie rozcieńczono do 10^{-6} i wysiewano po 100 μl rozcieńczonych zawiesin na podłoża agarowe. Skuteczność proponowanej metody eradykacji stwierdzono na podstawie redukcji liczby żywych komórek w zawieszynie po przejściu przez układ reakcyjno-wyładowczy dc-APGD.

Znaczna efektywność procesu eradykacji bakteryjnych fitopatogenów z wykorzystaniem wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD jest związana zarówno z bardzo wysoką temperaturą kinetyczną gazu wytworzonej plazmy, jak również z wytworzeniem reaktywnych form tlenu i azotu, fotonów UV, a także jonów dodatnich, np. H_2O^+ , które biorą udział w procesie inaktywacji komórek bakteryjnych. Zaobserwowane antybakteryjne działanie plazmy na komórki bakteryjne wynika między innymi z tworzonych uszkodzeń w materiale genetycznym DNA czy w obrębie wewnętrznej błony komórkowej, a także degradacji zewnętrznej błony komórkowej drobnoustrojów. Wspomniane zmiany w obrębie bakteryjnej błony komórkowej przypisuje się działaniu powstających w wyładowaniu jarzeniowym typu dc-APGD wolnych rodników tlenowych jak anionorodnik ponadtlenkowy O_2^- , rodnik wodoronadtlenkowy HO_2 i rodnik hydroksylowy HO^\cdot , które reagują z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi występującymi w dwuwarstwie lipidowej tworzącej błonę komórkową. Postulowany jest również znaczący udział wzbudzonych atomów tlenu (O^*) w antybakteryjnym działaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD w porównaniu do wpływu promieniowania UV, rodników OH , O_2 , czy wzbudzonych cząsteczek tlenu azotu (NO^*).

Zaletą omawianego sposobu eradykacji bakteryjnych fitopatogenów, według wynalazku, jest możliwość prowadzenia procesu w sposób ciągły, co znacznie zwiększa jego efektywność przy inaktywacji zawiesin o dużych objętościach, a zawierających szkodliwe bakteryjne drobnoustroje fitopatogenne. Możliwość kontroli parametrów pracy układu reakcyjno-wyładowczego tj. natężenia prądu wyładowania, szybkości wprowadzania zawiesiny komórek bakteryjnych do układu czy objętości wprowadzanej zawiesiny mikroorganizmów umożliwia przeprowadzenie procesu jałowienia z dużą dokładnością i skutecznością. Brak konieczności stosowania gazów wyładowczych do inicjacji wyładowania typu dc-APGD znacznie upraszcza konstrukcję w porównaniu do wcześniej opisywanych w literaturze układów reakcyjno-wyładowczych. Wszystko to sprawia, że metoda jest niezwykle ekonomiczna i konkurencyjna pod względem wykorzystywania jej do eradykacji bakteryjnych fitopatogenów.

Opracowany sposób inaktywacji bakteryjnych patogenów roślin z zastosowaniem wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD jest niezwykle skuteczny, szybki, ekonomiczny, a także przyjazny dla środowiska. Potencjalne zastosowania opisanej metody eradykacji mikroorganizmów obejmują:

- 1) jałowienie płynnych odpadów poprodukcyjnych pochodzących z przemysłu przetwórczego bądź spożywczego (w płynach uwalnianych do środowiska mogą być obecne patogeny roślin);
- 2) utylizację odpadów niebezpiecznych pochodzących z Państwowej Inspekcji Ochrony Roślin, laboratoriów diagnostycznych oraz naukowo-badawczych.

Przedmiot wynalazku jest przedstawiony w przykładach realizacji oraz na rysunku przedstawiającym schemat układu reakcyjno-wyładowczego.

Przykład 1

Sposób eradykacji bakterii fitopatogennych z gatunku *Dickeya solani*, na przykładzie szczepu IFB0099 z zastosowaniem wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD, wytwarzanego w przestrzeni pomiędzy powierzchnią ciekłej katody a stałą elektrodą wolframową.

10 cm³ zawiesiny komórek bakteryjnych *D. solani* IFB0099 o gęstości optycznej OD₆₀₀ ≈ 0.1, zawieszonych w jałowym roztworze 0,85% NaCl, wprowadza się do układu reakcyjno-wyładowczego (Rys.) za pomocą pompy perystaltycznej 1 oraz wężyka doprowadzającego 12, poprzez rurkę kwarcową 2, umieszczoną wewnątrz rurki grafitowej 3, z szybkością przepływu 3,5 cm³/min. i poddaje oddziaływaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD. Stabilne wyładowanie jarzeniowe typu dc-APGD 4 inicjowane jest w atmosferze otaczającego powietrza, w przestrzeni pomiędzy anodą 5, będącą stałą elektrodą wolframową, a tzw. ciekłą katodą 6, będącą wprowadzaną do układu zawiesiną komórek bakteryjnych *D. solani* IFB0099, po przyłożeniu do elektrod napięcia zasilającego ~1100V, wytwarzanego w wyniku pracy generatora wysokiego napięcia 7. Elektrody umieszcza się w odległości 5 mm względem siebie. Wartość natężenia prądu w układzie wynosi 50 mA, co jest związane z zastosowaniem opornika balastowego o odpowiedniej rezystancji. Układ reakcyjno-wyładowczy stanowi komora szklana 8, z czterema otworami rewizyjnymi, które umożliwiają odpowiednio:

- doprowadzenie zawiesiny komórek bakteryjnych do układu 6 za pomocą rurki kwarcowej 2, umieszczonej wewnątrz rurki grafitowej 3 i zamocowanie tych rurek;
- zamocowanie elektrody wolframowej 5 współosiowo w stosunku do przepływającej ciekłej katody 6;
- doprowadzenie wysokiego napięcia 7 do elektrod;
- odprowadzenie zawiesiny komórek bakteryjnych poddanych działaniu wyładowania z układu 9, poprzez otwór ze szlifem 10 z dołączonym wężykiem odpływowym 11.

Po przejściu zawiesiny komórek *D. solani* IFB0099 przez układ reakcyjno-wyładowczy, jest ona zbierana do jałowych probówek np. o objętości 15 cm³. Następnie wykonuje się seryjne rozcieńczenia zawiesiny w jałowej soli fizjologicznej do 10⁻⁶ i wysiewa po 100 μl ze wszystkich uzyskanych rozcieńczeń na płytki z podłożem TSA. Ponadto wykonuje się seryjne rozcieńczenia do 10⁻⁶ w jałowej soli fizjologicznej zawiesiny bakterii *Dickeya solani* IFB0099 o OD₆₀₀ ≈ 0.1, z której pobrano wprowadzane do układu 10 cm³. Wysiewa się po 100 μl z każdego z uzyskanych rozcieńczeń na płytki z podłożem TSA celem określenia liczby jednostek tworzących kolonie na cm³ (jtk/cm³). Płytki z podłożem TSA inkubuje się w temp. 28°C przez 48 godzin. Następnie zlicza się kolonie bakteryjne, które wyrosły na płytkach agarowych i wylicza liczbę jtk/cm³ w zawieszynie bakterii *D. solani* IFB0099 przed i po ekspozycji zawiesiny na działanie wyładowania jarzeniowego. Efektywność eradykacji *D. solani* IFB0099 określa się w postaci procentu redukcji liczby jtk/cm³ w zawieszynie bakteryjnej po przejściu przez opisywany układ reakcyjno-wyładowczy. Przedstawione doświadczenie wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach.

Efektywność procesu eradykacji: w Tabeli 1 zebrano wyniki dla trzech niezależnych powtórzeń procesu eradykacji bakterii fitopatogennych *D. solani* IFB0099 zużyciem wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD. Podano gęstość zawiesiny *D. solani* IFB0099 w jtk/cm³ przed jej wprowadzeniem do układu reakcyjno-wyładowczego, po przejściu przez opisany w niniejszym zgłoszeniu patentowym układ reakcyjno-wyładowczy, jak i procent redukcji liczby żywych komórek *D. solani* IFB0099 uzyskany, według wynalazku, poprzez przeprowadzenie proponowanego sposobu eradykacji fitopatogenów.

T a b e l a 1. Wpływ działania zastosowanego wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD na zawieszinę *D. solani* IFB0099.

| | Gęstość zawiesiny <i>D. solani</i> IFB0099 przed działaniem wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD [jtk/cm ³] | Gęstość zawiesiny <i>D. solani</i> IFB0099 po działaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD [jtk/cm ³] | Redukcja liczby jtk/cm ³ <i>D. solani</i> IFB0099 [%] |
|---------------|--|--|--|
| Powtórzenie 1 | 6,9 x 10 ⁷ | 0 | 100,00 |
| Powtórzenie 2 | 1,51 x 10 ⁸ | 0 | 100,00 |
| Powtórzenie 3 | 1,25 x 10 ⁸ | 0 | 100,00 |

Przykład 2

Sposób eradykacji bakterii fitopatogennych z gatunku *Pectobacterium atrosepticum*, na przykładzie szczepu IFB5103, z zastosowaniem wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD, wytwarzanego w przestrzeni pomiędzy powierzchnią ciekłej katody, a stałą elektrodą wolframową.

10 cm³ zawiesiny komórek bakteryjnych *P. atrosepticum* IFB5103 o gęstości optycznej OD₆₀₀ ≈ 0.1, zawieszonych w jałowym roztworze 0,85% NaCl, wprowadza się do układu reakcyjno-wyładowczego (Rys.) za pomocą pompy perystaltycznej 1 oraz wężyka doprowadzającego 12, poprzez rurkę kwarcową 2, umieszczoną wewnątrz rurki grafitowej 3, z szybkością przepływu 3,5 cm³/min. i poddaje oddziaływaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD. Stabilne wyładowanie jarzeniowe typu dc-APGD 4 inicjowane jest w atmosferze otaczającego powietrza, w przestrzeni pomiędzy anodą 5, będącą stałą elektrodą wolframową, a tzw. ciekłą katodą 6, będącą wprowadzaną do układu zawieszoną komórek bakteryjnych *P. atrosepticum* IFB5103, po przyłożeniu do elektrod napięcia zasilającego ~1100V, wytwarzanego w wyniku pracy generatora wysokiego napięcia 7. Elektrody umieszcza się w odległości 5 mm względem siebie. Wartość natężenia prądu w układzie wynosi 50 mA, co jest związane z zastosowaniem opornika balastowego o odpowiedniej rezystancji. Układ reakcyjno-wyładowczy stanowi komora szklana 8, z czterema otworami rewizyjnymi, które umożliwiają odpowiednio:

- a) doprowadzenie zawiesiny komórek bakteryjnych do układu 6 za pomocą rurki kwarcowej 2, umieszczonej wewnątrz rurki grafitowej 3 i zamocowanie tych rurek;
- b) zamocowanie elektrody wolframowej 5 wspólnie w stosunku do przepływającej ciekłej katody 6;
- c) doprowadzenie wysokiego napięcia 7 do elektrod;
- d) odprowadzenie zawiesiny komórek bakteryjnych poddanych działaniu wyładowania z układu 9, poprzez otwór ze szlifem 10 z dołączonym wężykiem odpływowym 11.

Po przejściu zawiesiny komórek *P. atrosepticum* IFB5103 przez układ reakcyjno-wyładowczy, jest ona zbierana do jałowych probówek np. o objętości 15 cm³. Następnie wykonuje się seryjne rozcieńczenia zawiesiny w jałowej soli fizjologicznej do 10⁻⁶ i wysiewa po 100 μl ze wszystkich uzyskanych rozcieńczeń na płytki z podłożem TSA. Ponadto wykonuje się seryjne rozcieńczenia do 10⁻⁶ w jałowej soli fizjologicznej zawiesiny bakterii *P. atrosepticum* IFB5103 o OD₆₀₀ ≈ 0.1 z której pobrano wprowadzane do układu 10 cm³. Wysiewa się po 100 μl z każdego z uzyskanych rozcieńczeń na płytki z podłożem TSA celem określenia liczby jednostek tworzących kolonie na cm³ (jtk/cm³). Płytki z podłożem TSA inkubuje się w temp. 28°C przez 48 godzin. Następnie zlicza się kolonie bakteryjne, które wyrosły na płytkach agarowych i wylicza liczbę jtk/cm³ w zawiesinie bakterii *P. atrosepticum* IFB5103 przed i po ekspozycji zawiesiny na działanie wyładowania jarzeniowego. Efektywność eradykacji *P. atrosepticum* IFB5103 określa się w postaci procentu redukcji liczby jtk/cm³ w zawiesinie bakteryjnej po przejściu przez opisany układ reakcyjno-wyładowczy. Przedstawione doświadczenie wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach.

Efektywność procesu eradykacji: w Tabeli 2 zebrano wyniki dla trzech niezależnych powtórzeń procesu eradykacji bakterii fitopatogennych *P. atrosepticum* IFB5103 z użyciem wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD. Podano gęstość zawiesiny *P. atrosepticum* IFB5103 w jtk/cm³ przed jej wprowadzeniem do układu reakcyjno-wyładowczego, po przejściu przez opisany w niniejszym zgłoszeniu patentowym układ reakcyjno-wyładowczy, jak i procent redukcji liczby żywych komórek *P. atrosepticum* IFB5103 uzyskany, według wynalazku, poprzez przeprowadzenie proponowanego sposobu eradykacji fitopatogenów.

T a b e l a 2. Wpływ działania zastosowanego wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD na zawiesinę *P. atrosepticum* IFB5103.

| | Gęstość zawiesiny <i>P. atrosepticum</i> IFB5103 przed działaniem wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD [jtk/cm ³] | Gęstość zawiesiny <i>P. atrosepticum</i> IFB5103 po działaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD [jtk/cm ³] | Redukcja liczby jtk/cm ³ <i>P. atrosepticum</i> IFB5103 [%] |
|---------------|--|---|---|
| Powtórzenie 1 | 2,28 x 10 ⁷ | 0 | 100,00 |
| Powtórzenie 2 | 2,84 x 10 ⁷ | 5,91 x 10 ³ | 99,98 |
| Powtórzenie 3 | 1,7 x 10 ⁷ | 0 | 100,00 |

Przykład 3

Sposób eradykacji bakterii fitopatogennych z gatunku *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, na przykładzie szczepu IFB5118, z zastosowaniem wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD, wytwarzanego w przestrzeni pomiędzy powierzchnią ciekłej katody, a stałą elektrodą wolframową.

10 cm³ zawiesiny komórek bakteryjnych *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* IFB5118 o gęstości optycznej OD₆₀₀ ≈ 0.1, zawieszonych w jałowym 0,85% NaCl, wprowadza się do układu reakcyjno-wyładowczego (Rys.) za pomocą pompy perystaltycznej 1 oraz wężyka doprowadzającego 12, poprzez rurkę kwarcową 2, umieszczoną wewnątrz rurki grafitowej 3, z szybkością przepływu 3,5 cm³/min i poddaje oddziaływaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD. Stabilne wyładowanie jarzeniowe typu dc-APGD 4 inicjowane jest w atmosferze otaczającego powietrza, w przestrzeni pomiędzy anodą 5, będącą stałą elektrodą wolframową, a tzw. ciekłą katodą 6, będącą wprowadzaną do układu zawiesiną komórek bakteryjnych *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* IFB5118, po przyłożeniu do elektrod napięcia zasilającego ~1100V, wytwarzanego w wyniku pracy generatora wysokiego napięcia 7. Elektrody umieszcza się w odległości 5 mm względem siebie. Wartość natężenia prądu w układzie wynosi 50 mA, co jest związane z zastosowaniem opornika balastowego o odpowiedniej rezystancji.

Układ reakcyjno-wyładowczy stanowi komora szklana 8, z czterema otworami rewizyjnymi, które umożliwiają odpowiednio:

- doprowadzenie zawiesiny komórek bakteryjnych do układu 6 za pomocą rurki kwarcowej 2, umieszczonej wewnątrz rurki grafitowej 3 i zamocowanie tych rurek;
- zamocowanie elektrody wolframowej 5 współosiowo w stosunku do przepływającej ciekłej katody 6;
- doprowadzenie wysokiego napięcia 7 do elektrod;
- odprowadzenie zawiesiny komórek bakteryjnych poddanych działaniu wyładowania z układu 9, poprzez otwór ze szlifem 10 z dołączonym wężykiem odpływowym 11.

Po przejściu zawiesiny komórek *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* IFB5118 przez układ reakcyjno-wyładowczy, jest ona zbierana do jałowych probówek np. o objętości 15 cm³. Następnie wykonuje się seryjne rozcieńczenia zawiesiny w jałowej soli fizjologicznej do 10⁻⁶ i wysiewa po 100 μl ze wszystkich uzyskanych rozcieńczeń na płytki z podłożem TSA. Ponadto wykonuje się seryjne rozcieńczenia do 10⁻⁶ w jałowej soli fizjologicznej zawiesiny bakterii *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* IFB5118 o OD₆₀₀ ≈ 0.1 z której pobrano wprowadzane do układu 10 cm³. Wysiewa się po 100 μl z każdego z uzyskanych rozcieńczeń na płytki z podłożem TSA celem określenia liczby jednostek tworzących kolonie na cm³ (jtk/cm³). Płytki z podłożem TSA inkubuje się w temp. 28°C przez 48 godzin. Następnie zlicza się kolonie bakteryjne, które wyrosły na płytkach agarowych i wylicza liczbę jtk/cm³ w zawieszynie bakterii *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* IFB5118 przed i po ekspozycji zawiesiny na działanie wyładowania jarzeniowego. Efektywność eradykacji *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* IFB5118 określa się w postaci procentu redukcji liczby jtk/cm³ w zawieszynie bakteryjnej po przejściu przez opisywany układ reakcyjno-wyładowczy. Przedstawione doświadczenie wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach.

Efektywność procesu eradykacji: w Tabeli 3 zebrano wyniki dla trzech niezależnych powtórzeń procesu eradykacji bakterii fitopatogennych *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* IFB5118 z użyciem

wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD. Podano gęstość zawiesiny *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* IFB5118 w jtk/cm³ przed jej wprowadzeniem do układu reakcyjno-wyładowczego, po przejściu przez opisany w niniejszym zgłoszeniu patentowym układ reakcyjno-wyładowczy, jak i procent redukcji liczby żywych komórek *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* IFB5118 uzyskany, według wynalazku, po przeprowadzeniu proponowanego sposobu eradykacji fitopatogenów.

T a b e l a 3. Wpływ działania zastosowanego wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD na zawiesinę *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* IFB5118.

| | Gęstość zawiesiny <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> IFB5118 przed działaniem wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD [jtk/cm ³] | Gęstość zawiesiny <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> IFB5118 po działaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD [jtk/cm ³] | Redukcja liczby jtk/cm ³ <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> IFB5118 [%] |
|---------------|---|---|---|
| Powtórzenie 1 | 2,8 x 10 ⁷ | 7,76 x 10 ³ | 99,97 |
| Powtórzenie 2 | 2,81 x 10 ⁷ | 0 | 100,00 |
| Powtórzenie 3 | 3,2 x 10 ⁷ | 1,2 x 10 ⁴ | 99,96 |

Przykład 4

Sposób eradykacji bakterii fitopatogennych z gatunku *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, na przykładzie szczepu LMG 582, z zastosowaniem wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD, wytwarzanego w przestrzeni pomiędzy powierzchnią ciekłej katody, a stałą elektrodą wolframową.

10 cm³ zawiesiny komórek bakteryjnych *X. campestris* pv. *campestris* LMG 582 o gęstości optycznej OD₆₀₀ ≈ 0.1, zawieszona w jałowym 0,85% NaCl, wprowadza się do układu reakcyjno-wyładowczego (Rys.) za pomocą pompy perystaltycznej 1 oraz wężyka doprowadzającego 12, poprzez rurkę kwarcową 2, umieszczoną wewnątrz rurki grafitowej 3, z szybkością przepływu 3,5 cm³/min. i poddaje oddziaływaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD. Stabilne wyładowanie jarzeniowe typu dc-APGD 4 inicjowane jest w atmosferze otaczającego powietrza, w przestrzeni pomiędzy anodą 5, będącą stałą elektrodą wolframową, a tzw. ciekłą katodą 6, będącą wprowadzaną do układu zawiesiną komórek bakteryjnych *X. campestris* pv. *campestris* LMG 582, po przyłożeniu do elektrod napięcia zasilającego ~1100V, wytwarzanego w wyniku pracy generatora wysokiego napięcia 7. Elektrody umieszcza się w odległości 5 mm względem siebie. Wartość natężenia prądu w układzie wynosi 50 mA, co jest związane z zastosowaniem opornika balastowego o odpowiedniej rezystancji. Układ reakcyjno-wyładowczy stanowi komora szklana 8, z czterema otworami rewizyjnymi, które umożliwiają odpowiednio:

- doprowadzenie zawiesiny komórek bakteryjnych do układu 6 za pomocą rurki kwarcowej 2, umieszczonej wewnątrz rurki grafitowej 3 i zamocowanie tych rurek;
- zamocowanie elektrody wolframowej 5 wspólnie w stosunku do przepływającej ciekłej katody 6;
- doprowadzenie wysokiego napięcia 7 do elektrod;
- odprowadzenie zawiesiny komórek bakteryjnych poddanych działaniu wyładowania z układu 9, poprzez otwór ze szlifem 10 z dołączonym wężykiem odpływowym 11.

Po przejściu zawiesiny komórek *X. campestris* pv. *campestris* LMG 582 przez układ reakcyjno-wyładowczy, zbiera się ją do jałowych probówek np. o objętości 15 cm³. Następnie wykonuje się seryjne rozcieńczenia zawiesiny w jałowej soli fizjologicznej do 10⁻⁶ i wysiewa po 100 μl ze wszystkich uzyskanych rozcieńczeń na płytki z podłożem TSA. Ponadto wykonuje się seryjne rozcieńczenia do 10⁻⁶ w jałowej soli fizjologicznej zawiesiny bakterii *X. campestris* pv. *campestris* LMG 582 o OD₆₀₀ ≈ 0.1 z której pobrano wprowadzane do układu 10 cm³. Wysiewa się po 100 μl z każdego z uzyskanych rozcieńczeń na płytki z podłożem TSA celem określenia liczby jednostek tworzących kolonie na cm³ (jtk/cm³). Płytki z podłożem TSA inkubuje się w temp. 28°C przez 48 godzin. Następnie zlicza się kolonie bakteryjne, które wyrosły na płytkach agarowych i wylicza liczbę jtk/cm³ w zawieszynie bakterii *X. campestris* pv. *campestris* LMG 582 przed i po ekspozycji zawiesiny na działanie wyładowania jarzeniowego. Efektywność eradykacji *X. campestris* pv. *campestris* LMG 582 określa się w postaci procentu redukcji liczby

jtk/cm³ w zawiesinie bakteryjnej po przejściu przez opisywany układ reakcyjno-wyładowczy. Przedstawione doświadczenie wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach.

Efektywność procesu eradykacji: w Tabeli 4 zebrano wyniki dla trzech niezależnych powtórzeń procesu eradykacji bakterii fitopatogennych *X. campestris* pv. *campestris* LMG 582 z użyciem wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD. Podano gęstość zawiesiny *X. campestris* pv. *campestris* LMG 582 w jtk/cm³ przed jej wprowadzeniem do układu reakcyjno-wyładowczego, po przejściu przez opisany w niniejszym zgłoszeniu patentowym układ reakcyjno-wyładowczy, jak i procent redukcji liczby żywych komórek *X. campestris* pv. *campestris* LMG 582 uzyskany, według wynalazku, poprzez przeprowadzenie proponowanego sposobu eradykacji fitopatogenów.

T a b e l a 4. Wpływ działania zastosowanego wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD na zawiesinę *X. campestris* pv. *campestris* LMG 582.

| | Gęstość zawiesiny <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> LMG 582 przed działaniem wyładowania jarzeniowego typu dc- APGD [jtk/cm ³] | Gęstość zawiesiny <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> LMG 582 po działaniu wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD [jtk/cm ³] | Redukcja liczby jtk/cm ³ <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> LMG 582 typu dc- APGD [%] |
|---------------|---|--|--|
| Powtórzenie 1 | 2,87 x 10 ⁷ | 0 | 100,00 |
| Powtórzenie 2 | 2,98 x 10 ⁷ | 0 | 100,00 |
| Powtórzenie 3 | 3,17 x 10 ⁷ | 0 | 100,00 |

Wykaz oznaczeń na rysunku:

- 1 – pompa perystaltyczna
- 2 – rurka kwarcowa
- 3 – rurka grafitowa
- 4 – wyładowanie jarzeniowe typu dc-APGD
- 5 – elektroda wolframowa
- 6 – zawiesina bakteryjnych fitopatogenów
- 7 – generator wysokiego napięcia
- 8 – szklana komora wyładowcza
- 9 – produkt: oczyszczona mieszanina reakcyjna za pomocą wyładowania jarzeniowego typu dc-APGD
- 10 – otwór odprowadzający z odpowiednio dopasowanym szlifem
- 11 – przewód wyprowadzający
- 12 – przewód wprowadzający

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób eradykacji bakteryjnych fitopatogenów z zastosowaniem stałoprądowego wyładowania jarzeniowego dc-APGD, **znamienny tym**, że zawiesinę bakteryjnych fitopatogenów wprowadza się do układu reakcyjno-wyładowczego, do szklanej komory wyładowczej (8) w której w przestrzeni pomiędzy anodą, będącą stałą elektrodą wolframową (5), a przepływającą ciekłą katodą (6), będącą wprowadzaną do układu zawiesiną bakteryjnych fitopatogenów, bezpośrednio w atmosferze otaczającego powietrza generuje się i utrzymuje stabilne wyładowanie jarzeniowe typu dc-APGD (4) co powoduje efektywną inaktywację bakteryjnych fitopatogenów.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces eradykacji prowadzi się w stosunku do bakteryjnych fitopatogenów z gatunków: *Dickeya solani*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *X. campestris* pv. *Campestris*.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zawiesinę bakteryjnych fitopatogenów (6) wprowadza się do układu reakcyjno-wyładowczego, do szklanej komory wyładowczej (8), z szybkością od 1 do 6 cm³/min.
4. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że zawiesinę bakteryjnych fitopatogenów (6) wprowadza się do układu reakcyjno-wyładowczego, do szklanej komory wyładowczej (8), z szybkością 3,5 cm³/min.
5. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że zawiesinę bakteryjnych fitopatogenów (6) wprowadza się do układu reakcyjno-wyładowczego, do szklanej komory wyładowczej (8), w temperaturze pokojowej.
6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces eradykacji prowadzi się stosując prąd wyładowania o natężeniu 20–60 mA.
7. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że proces eradykacji prowadzi się stosując prąd wyładowania o natężeniu 50 mA.
8. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces eradykacji prowadzi się dostarczając do układu napięcie od 100–2000 V.
9. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że proces eradykacji prowadzi się dostarczając do układu napięcie 1100 V.
10. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w procesie eradykacji temperatura kinetyczna fazy gazowej wyładowania jarzeniowego dc-APGD utrzymuje się na poziomie od 2000 do 3000 K.

Rysunek

