

# Implementacja niskotemperaturowej plazmy generowanej pod ciśnieniem atmosferycznym do eliminacji patogenów roślinnych z powierzchni nasion ważnych ekonomicznie roślin

Jakub Orłowski<sup>1</sup>, Agata Motyka-Pomagruk<sup>1</sup>, Anna Dzimitrowicz<sup>2</sup>, Weronika Babińska<sup>1</sup>, Dominik Terefinko<sup>2</sup>, Michał Prusiński<sup>1</sup>  
 Michał Rychłowski<sup>3</sup>, Paweł Pohl<sup>2</sup>, Piotr Jamróż<sup>2</sup>, Ewa Łojkowska<sup>1</sup>, Wojciech Śledź<sup>1\*</sup>

1. Zakład Ochrony Roślin i Biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Gdańsk

2. Katedra Chemii Analitycznej i Metalurgii Chemicznej, Politechnika Wroclawska, Wrocław

3. Zakład Biologii Molekularnej Wirusów, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Gdańsk



## Rodzina *Pectobacteriaceae*

Bakterie z rodziny *Pectobacteriaceae* mogą wywoływać mokrą zgniliznę roślin należących do różnych rodzin, np. *Solanaceae*, *Brassicaceae*, *Asteraceae* czy *Asparagaceae*. Można je znaleźć na wszystkich kontynentach. Ziemniak (*Solanum tuberosum* L.) należy do najważniejszych ekonomicznie produktów rolnych infekowanych przez te bakterie.

Za mokrą zgniliznę i czarną nóżkę ziemniaka odpowiadają bakterie z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium*.

*Pectobacteriaceae* odpowiadają za szkody w uprawach ziemniaka w wysokości 46 mil euro rocznie na terenie krajów Unii Europejskiej (Dupuis, i inni. 2021).

W uprawach ziemniaka straty mogą sięgać nawet 30 % produkcji.

## Wstęp




[A] Mokra zgnilizna ziemniaka.

[B] czarna nóżka ziemniaka.

## Wykorzystanie plazmy

Właściwości antybakteryjne plazmy niskotemperaturowej

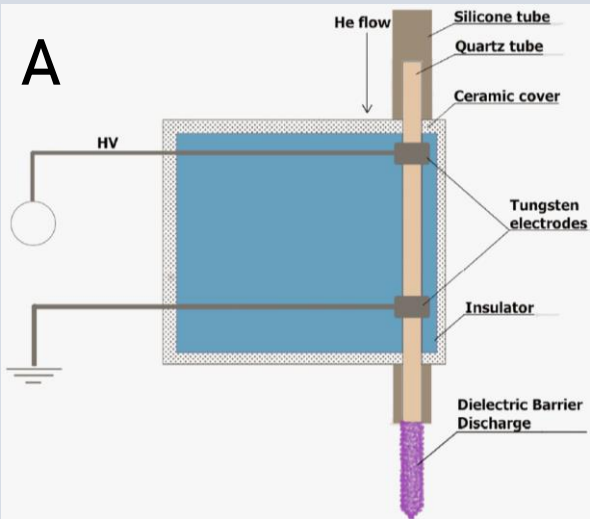
- Reaktywne formy tlenu
  - Promieniowanie UV
  - Promieniowanie cieplne
  - Pole elektromagnetyczne
  - Wolne elektrony
- 
- Nowe sposoby ochrony roślin
  - Alternatywa dla pestycydów
  - Wspomaganie kiełkowania

## Cel badania

Badanie bakteriobójczych właściwości bezpośredniego zastosowania niskotemperaturowej plazmy atmosferycznej na fitopatogeny znajdujące się na powierzchni zakażonych nasion fasoli mung, a także ustalenie wpływu ekspozycji na to wyładowanie w kontekście kiełkowania nasion.

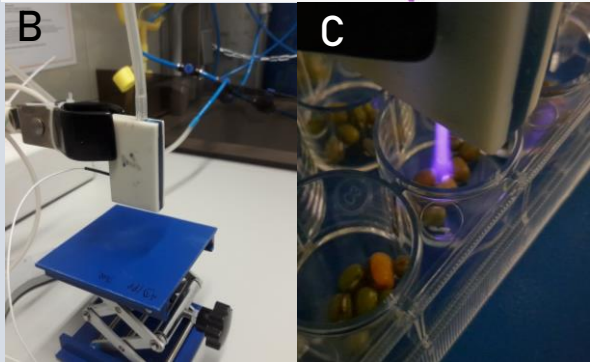
# Materiały | Metody

## Pióro plazmowe; wyładowania barierowe



Wyładowanie barierowe zachodzi pomiędzy dwoma elektrodami wolframowymi oddzielonymi tubą z ceramicznego izolatora.

Plazma tworzona poprzez zastosowanie tego rodzaju wyładowania ma temperaturę około 40 °C.



[A] Schemat opatentowanego przenośnego urządzenia do wytwarzania plazmy (patent P.438360)

[B] Zdjęcie generatora plazmy

[C] Oddziaływanie pióra plazmowego na nasiona

Gaz poddawany jonizacji: Hel (99,999%)

Przepływ gazu:  $5,0 \frac{L}{min}$

Częstotliwość modulacji: 2,17 kHz

Stopień wypełnienia: 68%

## Wpływ plazmy na wzrost roślin



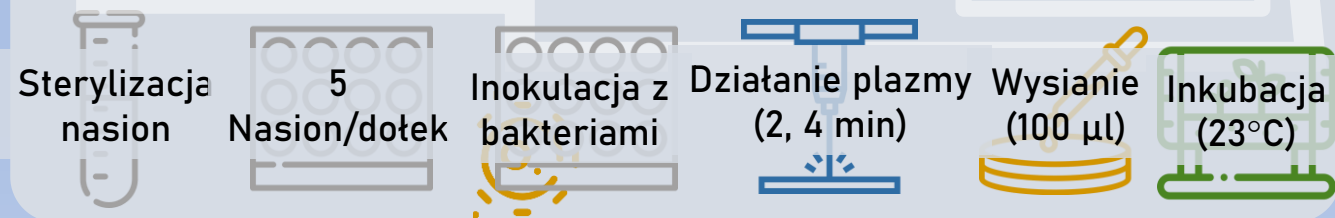
24, 48, 96 h | Zliczanie wykiełkowanych nasion i mierzenie długości kiełków.

## Ewaluacja właściwości antybakteryjnych pióra plazmowego

*Pectobacteriaceae* użyte w trakcie badania

- Dickeya solani* IFB0099
- Pectobacterium atrosepticum* IFB5103
- Pectobacterium carotovorum* IFB5118

48 h | liczenie jednostek tworzących kolonie



## Określenia sposobu działanie plazmy na komórki bakteryjne

Transmisyjny mikroskop elektronowy (TEM)

Wizualizacja zmian w morfologii komórek poddanych działaniu plazmy

Wybarwienie komórek

Barwienie LIVE/DEAD celem określenia integralności błon komórkowych badanych bakterii.

Laserowa mikroskopia konfokalna (CLSM)

Wizualizacja uszkodzeń błon komórek bakteryjnych

# Wyniki

## Wpływ na kiełkowanie nasion

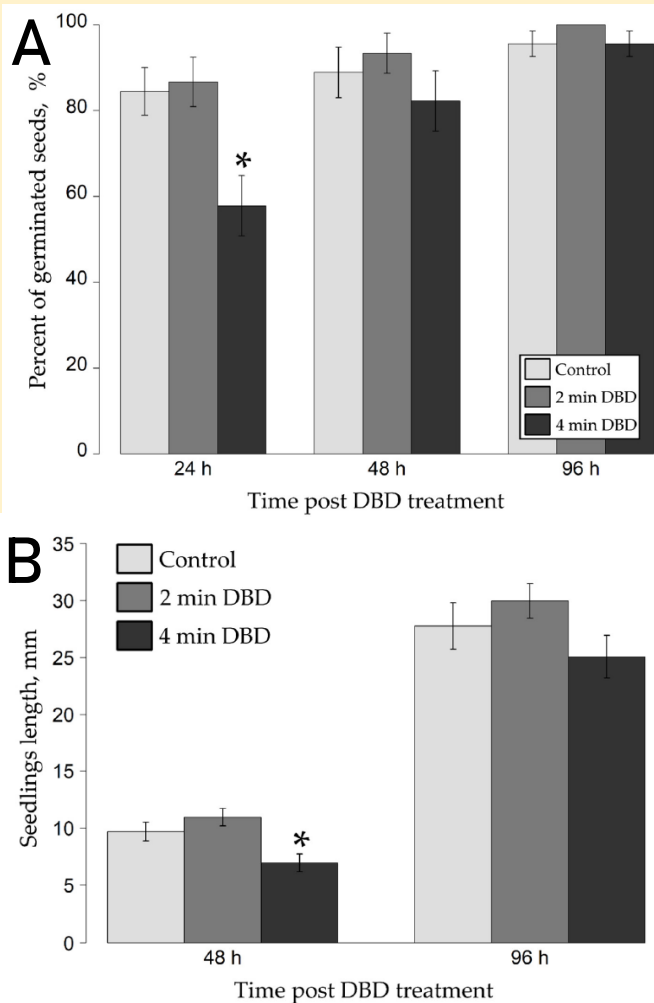


Fig. 1. Procent wykiełkowanych nasion (A) oraz długość siewek (B) po traktowaniu nasion zimną plazmą ( $p < 0.05$ )

## Eradykacja bakterii

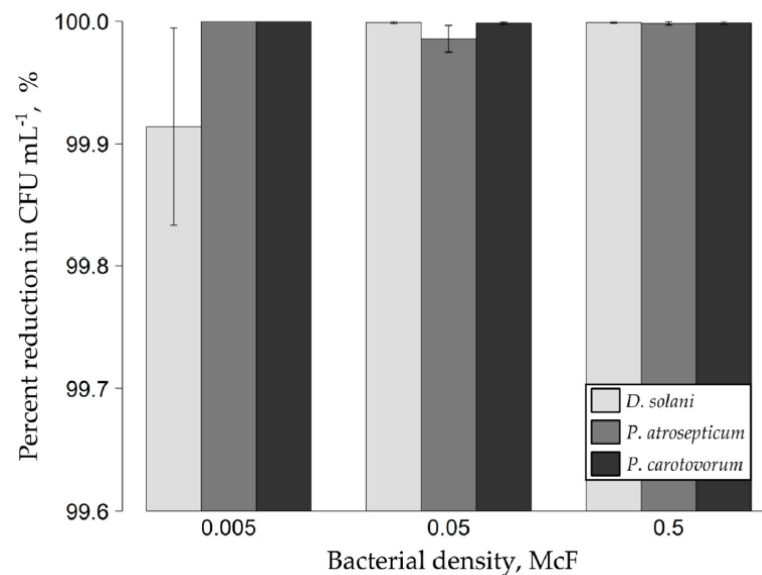
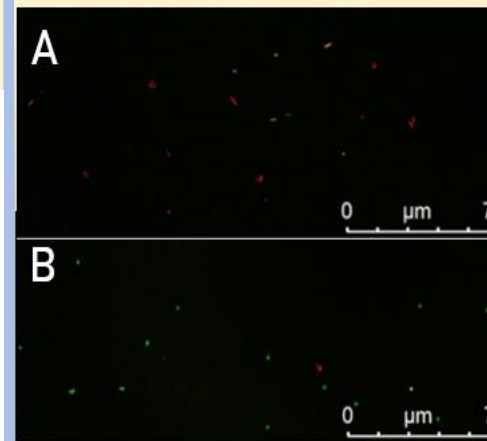
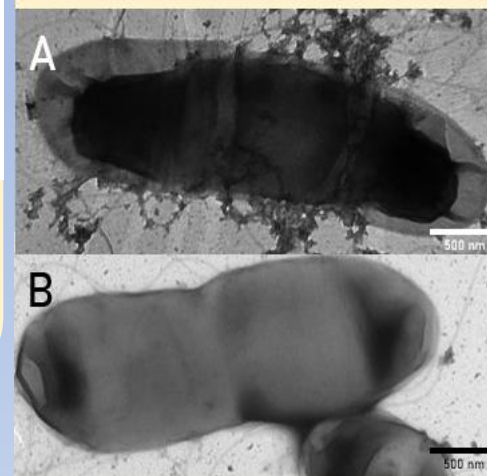


Fig. 2. Procent redukcji w liczbie żywych komórek bakteryjnych *Pectobacteriaceae* ( $p < 0.05$ )

## Wpływ na morfologię komórek



Fotomikrografie CLSM komórek *D. solani* po 5-min traktowaniu plazmą (A) w porównaniu do kontrolnych (B). Próby barwione zestawem LIVE/DEAD zawierającym SYBR 14 (zielone, żywe) oraz jodek propidyny (czerwone, martwe).



Fotomikrografie TEM komórek *D. solani* po 5-min traktowaniu plazmą (A) w porównaniu do kontrolnych (B). Mikrofotografie wykazały zwiększoną gęstość elektronową wewnątrz komórek oraz wyciek zawartości cytoplazmy po ekspozycji komórek na plazmę.

# Podsumowanie

Krótsza (2 min) ekspozycja na działanie plazmy sprzyjała kiełkowaniu nasion fasoli mung i wzrostowi siewek.

Wszystkie odnotowane procentowe stopnie redukcji wynikające z ekspozycji na DBD przekroczyły 99,914%. Prawie 100% redukcja w liczbie jednostek tworzących kolonie dla wszystkich badanych szczepów bakteryjnych dowodzi, że pióro plazmowe jest skutecznym podejściem do eradykacji komórek *Pectobacteriaceae*.

Mikroskopijne wizualizacje ujawniły, że denaturacja i agregacja bakteryjnego DNA, białek i rybosomów oraz wypłynięcie zawartości cytoplazmy spowodowane pęknięciami w błonie komórkowej stanowią prawdopodobne przyczyny bakteriobójczego działania zimnej plazmy helowej.

Przedstawione badanie jest pierwszym udokumentowanym przykładem działania zimnej plazmy atmosferycznej na bakterie z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium*, powodujących czarną nóżkę i mokrą zgniliznę wielu gatunków roślin

Finansowanie z Narodowego Centrum Nauki (NCN) OPUS 17 UMO-2019/33/B/NZ9/00940 przyznanego Dr. Wojciechowi Śledziowi

Zgłoszenie patentowe o numerze P.438360 oraz publikacja „Implementation of a non-thermal atmospheric pressure plasma for eradication of plant pathogens from a surface of economically important seeds”

Adres kontaktowy:  
[wojciech.sledz@biotech.ug.edu.pl](mailto:wojciech.sledz@biotech.ug.edu.pl)