

Politechnika Wrocławska
Wydział Chemiczny
Katedra Chemii Organicznej i Medycznej

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Ocena skuteczności atmosferycznej plazmy
niskotemperaturowej przeciwko fitopatogennym grzybom**

Mgr inż. Daria Katarzyna Nowinski

Promotor: Dr hab. Irena Maliszewska, prof. PWR

Wrocław, 2024

Podziękowania

Pragnę serdecznie podziękować wszystkim osobom, które wniosły wkład w realizację tej pracy, a w szczególności:

Promotorowi, Dr hab. Irenie Maliszewskiej,
za opiekę merytoryczną, cenne uwagi, wszelką pomoc i zaangażowanie, a także
przekazaną wiedzę.

Dr inż. Tomaszowi Czapce,
za udostępnienie reaktora plazmy nietermicznej oraz pomoc w jego obsłudze.

Dr Milanowi Šimek,
za wykonanie charakterystyki plazmy metodą optycznej spektroskopii emisyjnej.

Dr inż. Andrzejowi Żakowi,
za wykonanie obrazowania grzybni za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego.

Dr hab. inż. Izabeli Polowczyk,
za udostępnienie aparatury oraz pomoc w obrazowaniu grzybni za pomocą mikroskopu
światlnego.

Prof. dr hab. inż. Katarzynie Matczyszyn i mgr inż. Dominice Benkowskiej-Biernackiej,
za udostępnienie aparatury oraz pomoc obrazowania grzybni za pomocą mikroskopu
fluorescencyjnego.

Dr hab. inż. Annie Baturo-Cieśniewskiej,
za identyfikację molekularną szczepów grzybów wyizolowanych ze środowiska.

Mgr inż. Piotrowi Bortnowskiemu,
za pomoc w opracowaniu modelu Weibulla do analizy inaktywacji komórek grzybów za
pomocą atmosferycznej plazmy niskotemperaturowej.

Rodzicom i mężowi,
za nieustanne wsparcie i motywację.

Streszczenie

Utrata i marnotrawstwo żywności stanowią poważny problem zarówno z punktu widzenia społecznego, gospodarczego, jak i środowiskowego. Zapobieganie stratom żywności wymaga działań na wszystkich etapach łańcucha żywnościowego, szczególnie w zakresie ograniczenia przenoszenia patogennych mikroorganizmów ze środowiska do produktów spożywczych.

Plazma niskotemperaturowa jest uważana za obiecującą alternatywą dla konwencjonalnych metod sterylizacji. Wychodząc naprzeciw rosnącemu zainteresowaniu plazmą niskotemperaturową, zbadano skuteczność tej metody w inaktywacji grzybów należących do rodzajów *Fusarium*, *Alternaria* oraz *Botrytis* na materiałach powszechnie stosowanych w przemyśle rolno-spożywczym.

Badania wykazały, że zimna plazma atmosferyczna generuje różne reaktywne formy tlenu i azotu, działające biobójczo na komórki grzybów poprzez niszczenie błony komórkowej oraz zwiększenie jej przepuszczalności. Efekt inaktywacji komórek grzybów wzrastał wraz z czasem traktowania plazmą i zależał od szczepu mikroorganizmu.

Przeprowadzono również ocenę bezpieczeństwa tej metody w kontekście ryzyka rozwoju tolerancji oraz pojawienia się niekorzystnych zmian morfologicznych i fizjologicznych po wielokrotnej ekspozycji, potencjalnie prowadzących do zwiększonej patogenności wobec roślin, zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*.

Zaobserwowano między innymi deformacje struktury ściany komórkowej oraz zmiany szybkości wzrostu i produkcji biomasy, a także zmiany wrażliwości na środki przeciwgrzybicze i stres oksydacyjny. Plazma wpłynęła również na cechy patogenności grzybów, w tym na zdolność komórek do adhezji i formowania biofilmów, produkcję enzymów rozkładających polisacharydy ściany komórkowej roślin oraz białka i lipidy, a także toksyczność metabolitów zewnątrzkomórkowych. Zmiany cech patogenności zależały od szczepu grzyba i liczby ekspozycji na subletalną dawkę plazmy niskotemperaturowej.

Eksperymenty *in vivo* wykazały, że wielokrotne traktowanie grzybni plazmą niskotemperaturową zmniejsza patogenność większości badanych szczepów grzybów. Wyniki sugerują, że technologia zimnej plazmy może poprawić bezpieczeństwo żywności poprzez redukcję strat wynikających z zanieczyszczeń krzyżowych, niemniej jednak zalecane jest dostosowanie warunków inaktywacji indywidualnie dla każdego zastosowania.

Abstract

Food loss and waste are a significant problem from both social, economic and environmental perspectives. Preventing food loss requires efforts at all stages of the food supply chain, especially in reducing the transfer of pathogenic microorganisms from the environment to food products.

Low-temperature plasma is considered a promising alternative to conventional sterilization methods. In order to meet the growing attention to low-temperature plasma, the effectiveness of this method in inactivating fungi belonging to the genera *Fusarium*, *Alternaria* and *Botrytis* on materials commonly used in the agro-food industry was investigated.

The study showed that cold atmospheric plasma generates various reactive oxygen and nitrogen species, which have a biocidal effect on fungal cells by damaging the cell membrane and increasing its permeability. The inactivation effect on fungal cells increased with plasma treatment time and varied depending on the microorganism strain.

Safety assessments of this method have also been conducted, evaluating the risk of developing tolerance and adverse morphological and physiological changes after repeated exposure, potentially leading to increased pathogenicity towards plants in both *in vitro* and *in vivo* studies.

Observations included deformations in cell wall structure, changes in fungal growth rate and biomass production, altered susceptibility to antifungal agents and oxidative stress. Plasma also affected fungal pathogenic traits, including cell adhesion, biofilm formation, production of polysaccharide-degrading enzymes, and extracellular metabolite toxicity. Changes in pathogenicity were strain-dependent and influenced by the number of exposures to sublethal doses of low-temperature plasma.

In vivo experiments demonstrated that multiple treatments of fungal hyphae with low-temperature plasma reduced the pathogenicity of most tested fungal strains. The findings suggest that cold plasma technology could enhance food safety by reducing losses due to cross-contamination. However, individual adjustment of inactivation conditions is recommended for each specific application.

Spis treści

Wykaz użytych skrótów i symboli	13
1. Wprowadzenie	17
1.1 Rys historyczny	17
1.2 Ograniczenie strat żywności jako szansa poprawy bezpieczeństwa żywnościowego	20
1.3 Wpływ grzybów fitopatogennych na bezpieczeństwo żywnościowe	22
1.4 Grzybowe patogeny roślin.....	29
1.5 Czynniki wirulencji grzybów fitopatogennych	31
1.6 Charakterystyka wybranych grzybów fitopatogennych	36
1.7 Strategie kontroli grzybów fitopatogennych	43
1.8 Zimna plazma atmosferyczna.....	51
2. Cel i zakres pracy.....	59
3. Materiały i metody.....	61
3.1 Podłoża hodowlane oraz bufory	61
3.2 Szczepy grzybów i warunki hodowli	63
3.3 Materiały opakowaniowe przeznaczone do kontaktu z żywnością.....	64
3.4 Reaktor plazmowy z wyładowaniami dielektrycznymi barierowymi	64
3.5 Nasiona ogórka gruntowego (<i>Cucumis sativus</i>).....	65
3.6 Owoce pomidora koktajlowego (<i>Solanum lycopersicum</i>).....	65
3.7 Charakterystyka plazmy generowanej w reaktorze DBD	66
3.8 Izolacja i identyfikacja grzybów strzępkowych ze środowiska	66
3.9 Ocena skuteczności inaktywacji komórek grzybów przez atmosferyczną plazmę niskotemperaturową	67
3.9.1 Przygotowanie zawiesin grzybów i sztuczne zanieczyszczanie powierzchni materiałów opakowaniowych.....	67
3.9.2 Traktowanie plazmą niskotemperaturową materiałów sztucznie inokulowanych zawiesiną grzybów fitopatogennych	68
3.9.3 Traktowanie drewna skrzyń plazmą niskotemperaturową	69
3.10 Badanie mechanizmu działania plazmy niskotemperaturowej na komórki grzybów fitopatogennych	70
3.10.1 Przygotowanie grzybni traktowanej subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej	70

3.10.2	Testy żywotności i integralności błony komórkowej grzybów fitopatogennych oparte na fluorescencji	70
3.10.3	Testy integralności błony komórkowej oparte na wpływie składników wewnątrzkomórkowych	71
3.11	Badanie wpływu wielokrotnej ekspozycji grzybów fitopatogennych na subletalną dawkę atmosferycznej plazmy niskotemperaturowej	73
3.11.1	Przygotowanie zawiesin grzybów fitopatogennych po wielokrotnym traktowaniu subletalną dawką atmosferycznej plazmy niskotemperaturowej... ..	73
3.11.2	Ocena szybkości wzrostu grzybów fitopatogennych poddawanych wielokrotnej ekspozycji na plazmę niskotemperaturową	74
3.11.3	Mikroskopia optyczna i skaningowa mikroskopia elektronowa.....	75
3.11.4	Oznaczanie żywotności komórek grzybów fitopatogennych po wielokrotnej ekspozycji plazmę niskotemperaturową	75
3.11.5	Oznaczenie poziomu stresu oksydacyjnego w komórkach grzybów fitopatogennych po wielokrotnej ekspozycji na plazmę niskotemperaturową ..	76
3.11.6	Wrażliwość grzybów fitopatogennych wielokrotnie traktowanych plazmą niskotemperaturową na nadtlenuk wodoru	77
3.11.7	Badanie rozwoju tolerancji grzybów fitopatogennych wielokrotnie traktowanych plazmą niskotemperaturową na środki grzybobójcze	78
3.11.8	Badanie rozwoju tolerancji na działanie plazmy niskotemperaturowej u grzybów fitopatogennych.....	80
3.12	Ocena zmian patogenności grzybów po wielokrotnej ekspozycji na plazmę niskotemperaturową	80
3.12.1	Ocena zdolności zarodników grzybów do adhezji i formowania biofilmu ...	80
3.12.2	Oznaczenie aktywności enzymów rozkładających ścianę komórkową roślin	82
3.12.3	Oznaczenie aktywności proteolitycznej.....	84
3.12.4	Oznaczenie aktywności lipolitycznej.....	86
3.12.5	Określenie toksyczności filtratów po hodowli grzybów fitopatogennych wielokrotnie traktowanych plazmą niskotemperaturową	87
3.12.6	Wzrost grzybów fitopatogennych wielokrotnie poddanych działaniu subletalnej dawki plazmy niskotemperaturowej w żywej tkance roślinnej ...	88

3.12.7	Zdolność grzybów fitopatogennych poddanych wielokrotnemu działaniu plazmy do infekcji nasion ogórka	89
3.12.8	Zdolność grzybów fitopatogennych poddanych wielokrotnemu działaniu plazmy do infekcji roślin ogórka.....	90
3.12.9	Analiza statystyczna	91
4.	Wyniki i dyskusja	93
4.1	Charakterystyka plazmy generowane w reaktorze DBD	93
4.2	Identyfikacja grzybów izolowanych ze środowiska.....	94
4.3	Kinetyka inaktywacji grzybów fitopatogennych przez plazmę nietermiczną oraz wyznaczenie dawek subletalnych.....	95
4.4	Skuteczność inaktywacji drobnoustrojów z powierzchni drewnianych skrzynek	98
4.5	Mechanizm działania plazmy niskotemperaturowej na komórki grzybów fitopatogennych	99
4.6	Wpływ wielokrotnego traktowania grzybów fitopatogennych plazmą niskotemperaturową na zmiany morfologiczne i fizjologiczne	105
4.6.1	Ocena zmian morfologii kolonii (makroskopowa) po wielokrotnej ekspozycji grzybnia na plazmę niskotemperaturową.....	105
4.6.2	Ocena zmian morfologii strzępek (mikroskopowa) grzybów po wielokrotnej ekspozycji na plazmę niskotemperaturową.....	115
4.6.3	Wpływ wielokrotnego traktowania plazmą niskotemperaturową na produkcję biomasy przez grzyby fitopatogenne.....	118
4.6.4	Poziom stresu oksydacyjnego w grzybnia wielokrotnie traktowanej plazmą niskotemperaturową	121
4.6.5	Tolerancja stresu oksydacyjnego przez grzyby fitopatogenne poddawane wielokrotnej ekspozycji na plazmę niskotemperaturową.....	124
4.6.6	Wrażliwość grzybów fitopatogennych poddawanych wielokrotnej ekspozycji na plazmę niskotemperaturową wobec środków grzybobójczych	126
4.6.7	Ocena ryzyka rozwoju tolerancji na plazmę niskotemperaturową u grzybów fitopatogennych po wielokrotnej ekspozycji.....	132
4.7	Wpływ wielokrotnego traktowania grzybów fitopatogennych plazmą niskotemperaturową na zmiany wybranych czynników patogenności	134
4.7.1	Wpływ plazmy niskotemperaturowej na zdolności zarodników grzybów fitopatogennych do formowania biofilmów	134

4.7.2	Zmiany aktywności wybranych enzymów hydrolitycznych po wielokrotnym traktowaniu grzybów fitopatogennych plazmą niskotemperaturową	137
4.7.3	Wpływ filtratów po hodowli grzybów fitopatogennych poddawanych wielokrotnej ekspozycji na subletalną dawkę plazmy niskotemperaturowej na kiełkowanie nasion i rozwój roślin w początkowych fazach.....	148
4.7.4	Wpływ wielokrotnego traktowania grzybów fitopatogennych subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej na zdolność do infekowania nasion ..	154
4.7.5	Wzrost grzybów fitopatogennych w żywej tkance roślinnej	160
4.7.6	Wpływ plazmy niskotemperaturowej na patogeniczność grzybów względem roślin	163
5.	Podsumowanie i wnioski	171
6.	Bibliografia.....	181
7.	Spis tabel, wykresów i rysunków	217
8.	Dorobek naukowy autora	226

Wykaz użytych skrótów i symboli

Wykaz skrótów

ABA	kwabscysynowy
AFU	umowne jednostki fluorescencji
BAL	podłoże do oznaczania aktywności lipolitycznej
BAP	podłoże do oznaczania aktywności proteolitycznej
BBJ	podłoże Bilay'a i Joffe'a
BDP	bulion do oznaczania drożdży i pleśni
BSA	albumina surowicy bydłej
Ca	wapń
ClO ₂	ditlenek chloru
CMC	karboksymetyloceluloza
CMCaza	karboksymetylocelulaza
CWDE	enzymy rozkładające ścianę komórkową roślin
CuSO ₄	siarczan(VI) miedzi(II)
DBD	wyładowanie barierowe dielektryczne
DCF	2',7'-dichlorofluoresceina
DNA	kwadeoksyrybonukleinowy
DNS	kwab3,5-dinitrosalicylowy
dsDNA	dwuniciowy kwadeoksyrybonukleinowy
F	fungicyd
FeSO ₄ ·7H ₂ O	siarczan żelaza (II) siedmiowodny
G	kiełkowanie
G/mm	gęstość siatki dyspersyjnej
h	godzina
H ₂ DCF	2',7'-dichlorodihydrofluoresceina
H ₂ DCF-DA	dioctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny
H ₂ O	woda
HO ₂ •	rodnik hydroksyperoksyłowy
H ₂ O ₂	nadtlenek wodoru
HCl	kwachlorowodorowy
ICP-OES	spektrometria mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie
ICCD	intensyfikowany układ z przesunięciem ładunku

ITS	wewnętrznie transkrybowany region spacerowy
jtk	jednostka tworząca kolonię
K	potas
KCl	chlorek potasu
K ₂ HPO ₄	fosforan dipotasowy
KH ₂ PO ₄	fosforan monopotasu
KNO ₃	azotan potasu
M	molarność
MFC	minimalne stężenie grzybobójcze
Mg	magnez
mg	miligram
MgCl ₂	chlorek magnezu
MgSO ₄ ·7H ₂ O	siarczan magnezu siedmiowodny
MHA	agar Müller-Hintona
MIC	minimalne stężenie hamujące
min	minuta
ml	mililitr
MTT	bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-2,5-difenylotetrazoliowy
N	azot atomowy
N ₂	azot cząsteczkowy
NO	tlenek azotu
N ₂ O ₅	pięciotlenek azotu
NH ₄ Cl	chlorek amonu
Na	sód
NaCl	chlorek sodu
NaOH	wodorotlenek sodu
Na ₂ HPO ₄	wodorofosforan di-sodu
NH ₄ NO ₃	azotan amonu
(NH ₄) ₂ SO ₄	siarczan amonu
NCP	zimna plazma o niskiej zawartości ozonu
O	tlen atomowy
¹ O ₂	tlen singletowy
O ₂ ⁻	anionorodnik nadadtlenkowy
O ₂	tlen cząsteczkowy

O ₃	ozon
OES	optyczna spektroskopia emisyjna
OH•	rodnik hydroksylowy
P	fosfor
PAA	kwis nadoctowy
PBS	roztwór soli fizjologicznej buforowanej fosforanem
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy
PDA	agar ziemniaczano-glukozowy
PI	jodek propidyny
ppm	liczba części na milion (ang. parts per milion)
RNA	kwis rybonukleinowy
RFT	reaktywne formy tlenu
RFA	reaktywne formy azotu
SEM	skaningowa mikroskopia elektronowa
S	siarka
s	sekunda
SDACh	agar Sabourauda z dekstrozą i chloramfenikolem
SM	sucha masa
SWVI	wskaźnik wigoru masy siewek
t	czas
TCA	kwis trichlorooctowy
Tris-HCl	bufor tris(hydroksymetylo)aminometan-HCl
U	jednostka enzymatyczna
USA	Stany Zjednoczone Ameryki Północnej
UV	ultrafiolet
UV-Vis	spektroskopia w ultrafiolecie i świetle widzialnym

1. Wprowadzenie

1.1 Rys historyczny

Problem zapewnienia bezpieczeństwa żywnościowego podejmowany był od lat 30. ubiegłego wieku. Na odbywającej się w 1943 roku konferencji Organizacji Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa w Hot Springs (Wirginia, USA) podjęto pierwszego międzynarodowego zobowiązania do wyeliminowania głodu. Jako cel obrano walkę z niedostatkiem żywności i zapewnienie bezpieczeństwa żywnościowego, które zgodnie z definicją oznaczało fizyczną dostępność żywności. Jednocześnie podkreślono, że podaż żywności powinna być gwarantowana (dostępna, ang. secure), adekwatna (ilość żywności dostosowana do potrzeb konsumenta, ang. adequate) oraz odpowiednia (żywność o właściwej zawartości składników odżywczych, ang. suitable) dla każdego człowieka (Byerlee i Fanzo, 2019; Thompson, 1943). Na konferencji rozpoczęto także prace przygotowawcze do utworzenia Organizacji do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (ang. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO). Moment ten został uznany za przełomowy w historii światowego bezpieczeństwa żywnościowego (Thompson, 1943).

Od początku lat 60. ubiegłego wieku liczba ludności na świecie wzrosła z trzech do ponad sześciu miliardów. W tym samym okresie światowa produkcja żywności wzrosła o 145% (Godfray i in., 2010; Pretty, 2008). Znaczny wzrost zapotrzebowania na żywność zaspokojony został dzięki połączeniu postępu naukowego i technologicznego, polityce rządów, interwencji instytucjonalnych i inwestycji przedsiębiorstw, innowacji i dostaw. Globalny problem głodu i niedożywienia zwalczano dzięki wykorzystaniu nadwyżek produkcyjnych z krajów rozwiniętych w ramach pomocy żywnościowej, poprzez tworzenie rezerw żywnościowych w krajach rozwijających się, negocjowanie międzynarodowych umów handlowych oraz zwiększenie świadomości społecznej na temat głodu i niedożywienia na świecie (Cole i in., 2018; Godfray i in., 2010). W wyniku tych działań pod koniec lat 60. XX wieku sytuacja żywnościowa na świecie zaczęła się poprawiać. Globalna produkcja żywności wzrosła o ponad połowę, a jej ilość w przeliczeniu na osobę zwiększyła się o 22%. W tym kontekście wydawało się, że odpowiednia ilość pożywienia jest warunkiem wystarczającym do zapewnienia bezpieczeństwa żywnościowego, dlatego też pierwsza definicja bezpieczeństwa żywnościowego odnosiła się wyłącznie do strony podażowej żywności w wymiarze globalnym (Shaw, 2007).

Na początku lat 70. XX wieku doszło do pierwszego światowego kryzysu żywnościowego, który był konsekwencją długoterminowych problemów gospodarczych oraz niekorzystnych warunków pogodowych, prowadzących do pierwszego od ponad 20 lat spadku produkcji żywności. Wydarzenia te pokazały, jak nieprzewidywalna i niestabilna była sytuacja żywnościowa na świecie (Shaw, 2007). Z tego powodu podczas Światowego Szczytu Żywnościowego w 1996 roku przyjęto nową definicję bezpieczeństwa żywnościowego, która podkreślała kompleksowość tego pojęcia (FAO, 1996). Oprócz fizycznego dostępu do żywności uwzględniono dodatkowo aspekty ekonomiczne, fizyczne i społeczne dostępu do żywności. Bezpieczeństwo żywnościowe zdefiniowano jako sytuację, w której „wszyscy ludzie przez cały czas mają ciągły dostęp fizyczny, społeczny i ekonomiczny do wystarczającej, bezpiecznej i pożywnej żywności, zaspokajającej ich potrzeby żywieniowe i preferencje dla prowadzenia aktywnego i zdrowego trybu życia” (El Bilali i in., 2019; FAO, 1996).

W 1996 roku na Światowym Szczycie Ziemi (ang. World Food Summit, WFS) przyjęto cel, który zakładał zmniejszenie liczby osób niedożywionych o połowę w latach 1990-2015 (Shaw, 2007). Na początku XXI wieku produkcja żywności, szacowana na podstawie kalorii dla prawidłowej (zdrowej) diety, ponad dwukrotnie przekroczyła zapotrzebowanie na żywność dla przeciętnego człowieka (Roser i in., 2013). Pomimo tak znaczącego postępu w globalnej produkcji żywności, w tym samym czasie wciąż ponad 800 milionów ludzi cierpiało z powodu głodu lub braku odpowiedniego dostępu do żywności. Wynikało to głównie z nierównej koncentracji dochodów, produkcji oraz wiedzy, ujawniając kolejne przyczyny zjawiska głodu, jako problemu nie tylko produkcji żywności, ale także jej logistyki i dystrybucji (Dias i in., 2021; FAO i in., 2012; Pretty, 2008).

Istotną rolę w ponownym zaangażowaniu globalnej społeczności w walkę z głodem odegrały Milenijne Cele Rozwoju (ang. Millennium Development Goals, MDG), znane również jako Milenijne Cele Tysiąclecia. Jeden z przyjętych celów zakładał zmniejszenie o połowę liczby ludności cierpiącej głód do 2015 roku w porównaniu z rokiem 1990. Cel ten został w dużej mierze osiągnięty na poziomie globalnym, choć dostęp do żywności był nierównomierny w różnych regionach (United Nations, 2014). Odsetek niedożywionych ludzi zmniejszył się z 13,1% w latach 2000-2002 do 8,4% w latach 2010-2012, a milenijny cel rozwoju wydawał się być w zasięgu ręki (Cole i in., 2018). W 2015 roku podjęto kolejne wyzwania realizacji Celów Zrównoważonego Rozwoju (ang. Sustainable

Development Goals, SDG), ustanowionych przez Organizację Narodów Zjednoczonych w celu wyeliminowania głodu do 2030 roku (Dora i in., 2021).

Liczba osób głodujących i cierpiących z powodu braku bezpieczeństwa żywnościowego stopniowo rosła od 2014 roku do początku pandemii COVID-19. Kryzys związany z pandemią przyspieszył tę tendencję, doprowadzając do wzrostu wskaźników niedożywienia, szczególnie wśród dzieci (Erokhin i Gao, 2020; FAO i in., 2021). W 2021 roku aż 828 mln ludzi było dotkniętych głodem, co oznacza wzrost o około 46 milionów od 2020 roku i 150 milionów od 2019 roku. Obecnie szacuje się, że około 3,1 miliarda ludzi nie ma dostępu do zdrowej diety (FAO i in., 2022; FAO i UNEP, 2022).

Znaczący wzrost produktywności upraw i zwierząt gospodarskich w ostatnim półwieczu napędzany był przez zwiększone zużycie nawozów i pestycydów, wody do nawadniania, rozwoju technologii rolniczych oraz zwiększania powierzchni gruntów. Zbyt optymistyczne byłoby założenie, że w przyszłości możliwe będzie kontynuowanie tych strategii (Pretty, 2008). Wzrost liczby ludności prowadzi bowiem do zmniejszenia powierzchni gleb użytkowanych rolniczo, ze względu na przeznaczenie ich na cele pozarolnicze, związane z postępującą urbanizacją i zajmowaniem coraz większych powierzchni gruntów pod budowę dróg, zabudowań mieszkalnych, przemysłu i innych. Konkurencja o te grunty sprawia, że pozyskiwanie nowych obszarów pod uprawę jest rozwiązaniem coraz mniej prawdopodobnym i kosztownym, zwłaszcza w obliczu ochrony różnorodności biologicznej i dóbr publicznych zapewnianych przez naturalne ekosystemy. Dodatkowo, część gruntów rolnych została utracona w wyniku pustynnienia, zasolenia, erozji gleby i innych konsekwencji niezrównoważonego gospodarowania gruntami (Godfray i in., 2010; Pretty, 2008). Najbardziej prawdopodobny staje się więc scenariusz konieczności produkowania większej ilości żywności z tej samej (lub nawet mniejszej) powierzchni ziemi (Godfray i in., 2010; Pretty, 2008).

Według przewidywań Organizacji Narodów Zjednoczonych (ONZ), liczba ludności na świecie będzie rosła i przekroczy 8,5 miliardów w 2030 roku, a w 2050 roku może sięgnąć nawet 9,7 miliardów (Godfray i in., 2010; Keating i in., 2014). Największy przyrost liczby ludności w historii wiąże się z wieloma wyzwaniami. Ostatnie badania sugerują, że do 2050 roku ogólna produkcja rolna będzie musiała wrosnąć o 70% do 100% w stosunku do lat 2005-2007 (FAO, 2009; Godfray i in., 2010; Royal Society of London, 2009).

Podsumowując, świat stoi obecnie przed potrójnym wyzwaniem dostosowania szybko zmieniającego się popytu na żywność ze strony większej i zamożniejszej populacji do jej

produkcji żywności w sposób zrównoważony pod względem środowiskowym i społecznym oraz zapewnienia wyżywienia dla najbiedniejszych regionów na świecie. Te wyzwania wymagają zmian w sposobie produkcji, przechowywania, przetwarzania, dystrybucji i dostępu do żywności (Godfray i in., 2010).

1.2 Ograniczenie strat żywności jako szansa poprawy bezpieczeństwa żywnościowego

Straty żywności odnoszą się do zmniejszenia masy lub pogorszenia jakości (wartości odżywczej) żywności, z wyłączeniem pasz oraz części produktów, które są niejadalne (Gustavsson i in., 2011; Lipinski i in., 2013).

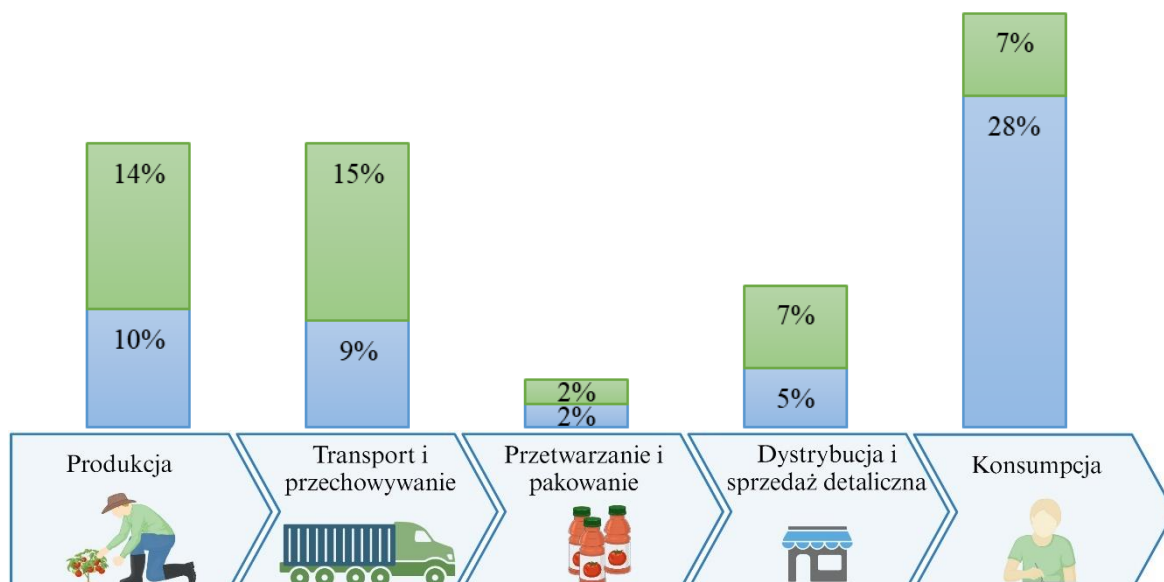
Ograniczenie strat żywności jest oczywistą szansą na poprawę bezpieczeństwa żywnościowego, bez konieczności zwiększenia obciążeń środowiskowych związanych z produkcją (Cole i in., 2018; Godfray i in., 2010; Kumar i Kalita, 2017). Według szacunków FAO żywność, która jest tracona i marnowana każdego roku, wystarczyłaby do zaspokojenia potrzeb 1,26 miliarda ludzi (Von Grebmer i in., 2022). Ograniczenie tych strat prowadziłoby zatem do zwiększenia ilości dostępnej żywności, która mogłaby posłużyć do zaspokojenia potrzeb żywieniowych rosnącej populacji oraz redukcji zjawiska głodu na świecie (Cattaneo i in., 2021; Willett i in., 2019).

Do utraty żywności dochodzi wzdłuż całego łańcucha dostaw. Łańcuch dostaw żywności (ang. food supply chain, FSC) składa się z kilku etapów, w których żywność kierowana jest od producentów do konsumentów, począwszy od produkcji i zbiorów plonów w gospodarstwie, poprzez transport, przechowywanie, przetwarzanie i pakowanie oraz dystrybucję, aż do miejsca, w którym produkt spożywczy trafia do konsumenta (konsumpcja) (Lindgren i in., 2018; Nicasastro i Carillo, 2021; Wunderlich i Martinez, 2018).

Straty żywności zarówno w krajach rozwiniętych, jak i rozwijających się wahają się od 30% do 40%, natomiast ich udział na poszczególnych etapach łańcucha żywnościowego znacznie się różni (rysunek 1). W krajach rozwijających się największe straty występują na początkowych etapach łańcucha żywnościowego, w szczególności na etapie uprawy i zbioru (14%), po zbiorze (15%) oraz podczas przetwórstwa (2%) (Gustavsson i in., 2011; Nicasastro i Carillo, 2021; Prusky, 2011).

W krajach rozwiniętych i uprzemysłowionych krajach azjatyckich podobny udział strat (28%) występuje na etapie konsumpcji, natomiast straty żywności na środkowych etapach łańcucha dostaw są stosunkowo niewielkie, ze względu na dostępność zaawansowanych technologii oraz wydajne systemy obsługi i przechowywania plonów

(Kumar i Kalita, 2017). Niemniej jednak, ilość żywności marnowanej przez konsumentów każdego roku w krajach rozwiniętych (222 mln ton) jest niemal równa całkowitej produkcji żywności netto w Afryce Subsaharyjskiej (230 mln ton) (Gustavsson i in., 2011; Nicastro i Carillo, 2021; Prusky, 2011).



Rysunek 1. Udział strat żywności (wyrażony jako procent utraconych kalorii) na poszczególnych etapach łańcucha dostaw żywności w krajach rozwiniętych (niebieskie słupki) i rozwijających się (zielone słupki) Opracowanie własne na podstawie (Gustavsson i in., 2011; Nicastro i Carillo, 2021; Prusky, 2011).

Do utraty żywności na początkowych etapach łańcucha dostaw żywności dochodzi głównie wskutek klęsk żywiołowych, niekorzystnych warunków klimatycznych, a także w wyniku nieefektywności, takich jak: słaba infrastruktura i logistyka, brak technologii, niewystarczające umiejętności i zdolności zarządzania uczestników łańcucha dostaw oraz brak dostępu do rynków szybko po zbiorach (Ishangulyyev i in., 2019; Wunderlich i Martinez, 2018).

Straty żywności występujące na końcowych etapach łańcucha żywnościowego (sprzedaż detaliczna i konsumpcja) określane są zazwyczaj „marnotrawstwem żywności” (ang. food waste) (Gustavsson i in., 2011). Marnotrawstwo żywności wynika głównie z zaniedbania lub świadomej decyzji sprzedawców i konsumentów o jej wyrzuceniu przed lub po upływie daty ważności, a także wskutek wykluczenia produktów niespełniających rygorystycznych standardów jakości i bezpieczeństwa mimo, że żywność ta jest nadal odpowiednia do spożycia przez ludzi (Lipinski i in., 2013; Wunderlich i Martinez, 2018).

Rozważając utratę żywności według kategorii, obejmuje ona 40-50% roślin okopowych, owoców i warzyw; 35% ryb i owoców morza; 30% zbóż oraz 20% mięsa, nasion oleistych i produktów mlecznych (Leyva Salas i in., 2017).

Straty i marnotrawstwo żywności (ang. Food Loss and Waste, FLW) pod względem jakości (wartości odżywczej) i ilości (masy) stały się problemem zarówno z punktu widzenia społecznego, gospodarczego, jak i środowiskowego. Wpływają one negatywnie nie tylko na bezpieczeństwo żywnościowe, ale również na gospodarkę lokalną i krajową, zasoby naturalne, strumień odpadów oraz środowisko (Cattaneo i in., 2021; Lindgren i in., 2018; Scialabba, 2015). Oprócz faktycznej utraty żywności, dochodzi również do utraty wszystkich zasobów, które przyczyniły się do jej wytworzenia. Marnowana jest ziemia, która została wykorzystana do uprawy roślin, woda użyta do nawadniania, a także praca ludzka, nasiona, nawozy i wszelkie inne inwestycje związane z uprawą i obróbką produktów (Prusky, 2011). Ponadto, ekspansja rolnictwa jest głównym motorem emisji gazów cieplarnianych i często prowadzi do wylesiania, a tym samym uwalnia zmagazynowany dwutlenek węgla i zmniejsza zdolność gruntów do jego magazynowania (Raihan i in., 2023; Stevanović i in., 2017). Niewykorzystana żywność powoduje dodatkowe uwalnianie dwutlenku węgla oraz metanu podczas gnicia na polach lub na wysypiskach. Szacunkowo, około 8-10% globalnej emisji gazów cieplarnianych jest efektem utraty i marnotrawienia żywności, a ich ograniczenie stanowi integralną część strategii walki z kryzysem klimatycznym (Goodwin, 2023).

Skala i konsekwencje utraty żywności doprowadziła w 2015 roku do włączenia przez ONZ celu dotyczącego redukcji odpadów w poczet 17 światowych Celów Zrównoważonego Rozwoju. Cel Zrównoważonego Rozwoju 12.3 wzywa do ograniczenia o połowę globalnej ilości odpadów żywnościowych na mieszkańca do roku 2030 (Arora i Barua, 2022).

1.3 Wpływ grzybów fitopatogennych na bezpieczeństwo żywnościowe

Rośliny dostarczają ponad 80% żywności konsumowanej przez ludzi i są głównym źródłem pożywienia dla zwierząt gospodarskich (Rizzo i in., 2021).

Patogeny grzybowe stanowią największe biotyczne zagrożenie dla produkcji ważnych gospodarczo roślin podczas uprawy zarówno w warunkach polowych, jak i szklarniowych, a także po zbiorach (Peng i in., 2021). Około 8000 gatunków grzybów wywołuje blisko 100 000 chorób roślin, a jeden gatunek może powodować choroby u wielu różnych gatunków roślin (Shuping i Eloff, 2017). Zapewnienia bezpieczeństwa żywnościowego wymaga zatem dobrze zorganizowanego zarządzania chorobami roślin i skutecznych praktyk kontroli w rolnictwie. Badania nad rolą grzybów w stratach żywności stanowią

zatem integralną część starań zapewnienia bezpieczeństwa żywnościowego (Avery i in., 2019).

Choroby wywołane przez grzyby fitopatogenne powodują utratę do około 20-30% światowych plonów roślin uprawnych, co rocznie wystarczyłoby na wyżywienie 600 milionów ludzi, podczas gdy wytwarzane przez grzyby mikotoksyny dodatkowo zmniejszają dostępność bezpiecznej żywności (Avery i in., 2019; Davies i in., 2021; Shuping i Eloff, 2017). Problem znaczenia mikotoksyn w stratach żywności zostanie opisany w dalszej części pracy.

Nasilenie i skala chorób grzybiczych w uprawach wzrasta od połowy XX wieku w wyniku intensyfikacji rolnictwa (Fisher i in., 2012; Savary i in., 2006). Uprawy rozległych obszarów genetycznie jednorodnych roślin przyczyniły się do rozwoju nowych, bardziej wirulentnych i opornych na fungicydy szczepów (Fisher i in., 2018). Brak rotacji plonów sprzyja nagromadzeniu w glebie patogenów, które mogą przetrwać i atakować kolejne uprawy (Strom i in., 2020; Zhou i in., 2017). Ponadto, ochrona monokultur przed chorobami grzybowymi opiera się na stosowaniu dużych ilości pestycydów, prowadzących do rozwoju oporności u grzybów (Steinberg i Gurr, 2020; Yang i in., 2021).

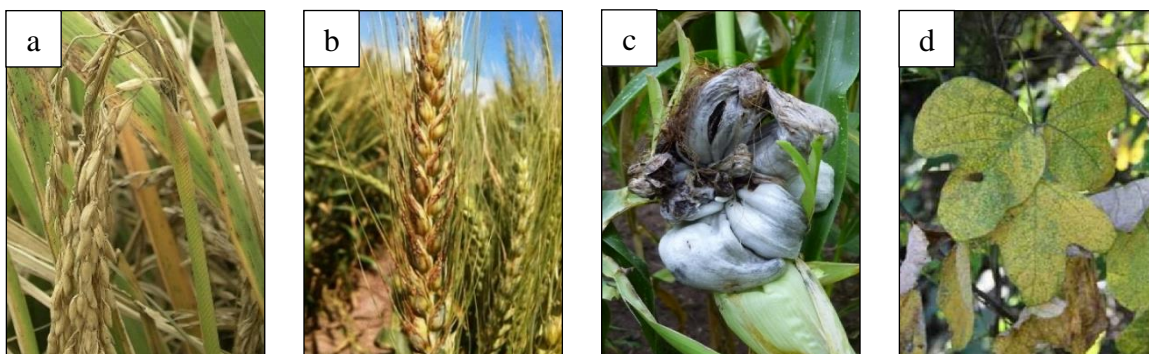
Zmiany klimatyczne również wpływają na rozwój chorób grzybiczych, częstotliwość ich występowania oraz nasilenie. Ekstremalne zjawiska pogodowe, takie jak burze, powodzie, susze itp. wywołują stres i osłabienie odporności u roślin, co sprawia, że stają się one bardziej podatne na infekcje grzybicze (Fisher i in., 2012; Pautasso i in., 2012). Dodatkowo, ocieplenie klimatu sprzyja ekspansji wielu gatunków na nowe szerokości geograficzne. Zagrożenie to jest tym większe, że niektóre grzyby mogą przystosowywać się do wyższej temperatury poprzez selekcję termiczną (Fausto i in., 2019). Wreszcie globalny handel i transport roślin i produktów rolnych umożliwia dalsze rozprzestrzenienie patogenów do krajów i regionów, w których wcześniej nie występowały (Dita i in., 2018; Steinberg i Gurr, 2020).

Wiele grzybów chorobotwórczych dla roślin ma krótkie cykle rozwojowe i szybkie tempo reprodukcji, wytwarzając dużą liczbę propagul (zwykle zarodników), które mogą być przenoszone na znaczne odległości, a ich duża zmienność genetyczna, podatność na mutacje, poziomy transfer genów i hybrydyzację, generują znaczną różnorodność szczepów. Wszystkie te czynniki wywierają naciski selekcyjne na populacje drobnoustrojów, a tym samym przyspieszają tempo adaptacji i ewolucji patogenów (Covo, 2020; Fones i in., 2020; Lucas, 2017).

Choroby roślin wywołane grzybami fitopatogennymi na początkowych etapach łańcucha rolno-spożywczego

Szacuje się, że straty spowodowane porażeniem upraw chorobotwórczymi grzybami wynoszą około 20% całkowitego plonu (Fisher i in., 2018; Leyva Salas i in., 2017). Rozprzestrzenianie się w powietrzu zarodników sprawia, że grzyby mogą szybko zaatakować całą uprawę, prowadząc do skażenia, skolonizowania, a w konsekwencji do utraty plonów (Alegbeleye i in., 2022; Jain i in., 2019).

Grzyby niszczą podstawowe uprawy kaloryczne, takie jak ryż, pszenica, kukurydza i soja (Oerke i Dehne, 2004; Steinberg i Gurr, 2020). Żywność pochodząca z tych upraw stanowi nie tylko podstawę diety dla światowej populacji, ale jest również wykorzystywana jako pasza dla zwierząt, a zatem ma dalszy pośredni wkład w dietę ludzi poprzez mięso, nabiał i inną żywność pochodzenia zwierzęcego (Davies i in., 2021; Fones i in., 2020). *Magnaporthe oryzae*, wywołujący zarazę ryżu (rysunek 2 a), jest szeroko rozpowszechnionym patogenem, powodującym straty wielkości 10-35% w zależności od odmiany upraw i warunków środowiskowych. W przypadku ciężkich porażen *M. oryzae*, może dochodzić nawet do całkowitej utraty plonów (Davies i in., 2021; Godfray i in., 2016). Pszenica jest atakowana przez rdzę łądźgową *Puccinia graminis* (i inne gatunki *Puccinia*), a w szczególności formę *tritici*, która może powodować do 70% strat w plonach (rysunek 2 b). W przypadku kukurydzy najczęściej występującym patogenem grzybiczym jest głownia kukurydziana, *Ustilago maydis* (rysunek 2 c), która rozprzestrzeniła się już na większości obszarów upraw i może prowadzić do 20% strat w plonach (Davies i in., 2021; Fones i in., 2020). Z kolei choroby wywoływane przez *Phakopsora pachyrhizi* (rysunek 2 d), mogą spowodować nawet do 80% strat plonów soi (Fones i in., 2020; Godfray i in., 2016; Savary i in., 2019).



Rysunek 2. Objawy **a** - zarazy ryżu (zaczepnięto z Galhano i Talbot, 2011, za zgodą Elsevier); **b** - rdzy żółtawej pszenicy (zaczepnięto z Zhao i Kang, 2023, publikacja w otwartym systemie dostępu); **c** - głowni guzowatej kukurydzy (zaczepnięto z Djamei i Kahmann, 2012, publikacja w otwartym systemie dostępu); **d** - rdzy soi (zaczepnięto z Kelly i in., 2015; publikacja w otwartym systemie dostępu).

Stabilność gospodarcza niektórych krajów jest uzależniona od zdolności generowania przychodów z eksportu towarów narażonych na choroby spowodowane grzybami (Godfray i in., 2016). Choroby grzybowe dziesiątkują uprawy towarowe, takie jak maniok i orzechy nerkowca, będące ważnymi uprawami w Afryce (Monteiro i in., 2015; Sanginga i Mbabu, 2015); ziarna kawowca i kakaowca w Ameryce Środkowej i Południowej (Avelino i in., 2015; Delgado-Ospina i in., 2021); ryż i bawełnę w Azji (Gupta i in., 2015; Tarazi i in., 2019); winogrona i pszenicę w Europie (Fones i Gurr, 2015; Steel i in., 2013); wilec ziemniaczany (batat) i pszenicę w Oceanii (Chen, 2020; Michael i Peter, 2023) oraz kukurydzę i ziemniaki w Ameryce Północnej (Guenther i in., 2001; Wu i in., 2010). Ochrona przed fitopatogenami oraz efektywne zarządzanie ryzykiem stanowią więc nieodzowne elementy utrzymania stabilności gospodarczej i podtrzymania zrównoważonego rozwoju w tych krajach, z jednoczesnym zapewnieniem bezpieczeństwa żywnościowego (Avery i in., 2019; Godfray i in., 2016; Steinberg i Gurr, 2020).

Choroby roślin wywołane grzybami fitopatogennymi na dalszych etapach łańcucha rolno-spożywczego

Kolejne 10% plonów traconych jest wskutek chorób grzybiczych występujących na dalszych etapach łańcucha żywnościowego, począwszy od zbioru, aż do ich spożycia przez konsumentów (Fisher i in., 2018). Do głównych grzybów pozbiornych należą *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp. i *Fusarium* spp. Wszystkie te patogeny charakteryzują się szeroką gamą żywicieli i odpowiadają za znaczne straty gospodarcze na całym świecie (Siddique i in., 2018; Wang i in., 2022).

Do inokulacji żywności grzybami patogennymi dochodzi zwykle jeszcze podczas uprawy na polu, ale także w wyniku kontaktu z zanieczyszczonymi narzędziami podczas dalszych etapów łańcucha dostaw (Alegbeleye i in., 2022; Bano i in., 2023). Zarodniki grzybów mogą unosić się w powietrzu w postaci aerozoli, które z czasem osadzają na powierzchni produktów spożywczych, sprzętu oraz urządzeń (Bernardi i in., 2019).

Rozwój chorób grzybiczych w przechowywanych produktach rolnych zależy od wielu czynników, zarówno wewnętrznych, jak i zewnętrznych, do których zaliczamy: zawartość wody w zanieczyszczonym produkcie (tj. aktywność wodna), czas przechowywania, zdrowie i kondycja fizyczna i fizjologiczna produktu przeznaczonego do przechowywania, obecność owadów i roztoczy, temperatura i wilgotność podczas przechowywania, a także rodzaj struktury magazynowej (Alegbeleye i in., 2022; Mohapatra i in., 2017). Wysoka wilgotność w połączeniu z umiarkowaną temperaturą stanowią szczególnie sprzyjające

środowisko dla rozwoju grzybów fitopatogennych (Mesterházy i in., 2020; Sanzani i in., 2016).

Surowce i produkty żywnościowe cechuje znaczne zróżnicowanie pod względem trwałości. Do najmniej trwałych należą te, które zachowują cechy żywych organizmów, takie jak warzywa czy owoce (Dudeja i Singh, 2017). Wszystkie świeże rośliny są organizmami aktywnymi metabolicznie do czasu ich przetworzenia lub spożycia. Po odcięciu ich od naturalnego zaopatrzenia w składniki pokarmowe dochodzi do zmian fizjologicznych oraz chemicznych w budowie tkanek i metabolizmie. Dojrzewanie, starzenie się i uszkodzenia mechaniczne znacznie zwiększają podatność świeżych produktów na ataki drobnoustrojów powodujących gnicie (Alegbeleye i in., 2022; Ziv i Fallik, 2021).

Na całym świecie w ciągu roku ginie około 20-25% wszystkich owoców i warzyw w wyniku gnicia wywołanego przez patogeny grzybowe. Produkty te są szczególnie podatne na infekcje grzybowe podczas przechowywania ze względu na naturalnie wysoką zawartość wody oraz składników pokarmowych, w tym wolnych aminokwasów i węglowodanów, które tworzą korzystne środowisko dla rozwoju grzybów (rysunek 3) (Petrasch i in., 2019).



Rysunek 3. Objawy szarej pleśni po trzech tygodniach przechowywania w temperaturze 7°C (zaczepnięto z Krasnow i Ziv, 2022, publikacja w otwartym systemie dostępu).

Do zakażenia surowców najczęściej dochodzi w wyniku uszkodzenia mechanicznego tkanki, spowodowanego czynnikami abiotycznymi lub biotycznymi oraz przez naturalnie występujące otwory w tkankach roślinnych, takie jak aparaty szparkowe i szypułkę (Bano i in., 2023). Grzyby fitopatogenne rozwijające się w tkankach roślinnych prowadzą do szybkiego pojawienia się objawów chorobowych. Wydzielane enzymy rozkładają tkanki roślinne, a powstające produkty uboczne powodują zmiany wyglądu, konsystencji i smaku. Oprócz pogorszenia cech organoleptycznych, infekcja grzybicza zmienia także skład chemiczny i wartość odżywczą surowców w wyniku tworzenia kwasów, rozpadu

węglowodanów i kumulacji metabolitów drobnoustrojów (Bano i in., 2023). Zmiany fizjologiczne wywołane gniciem oraz przyspieszone mięknięcie tkanki znacznie obniżają wartość rynkową towarów i powodują skrócenie okresu ich przechowywania. Wprawdzie najistotniejszym skutkiem chorób grzybiczych są straty społeczno-ekonomiczne, to obecność tych organizmów może stanowić również zagrożenie dla zdrowia konsumentów, począwszy od wywoływania reakcji alergicznych na zarodniki przenoszone przez powietrze, po zanieczyszczenia mikotoksynami, które przenikają do tkanek roślinnych (Alegbeleye i in., 2022; Kustrzeba-Wójcicka i in., 2014; Mohapatra i in., 2017; Saleh i Al-Thani, 2019).

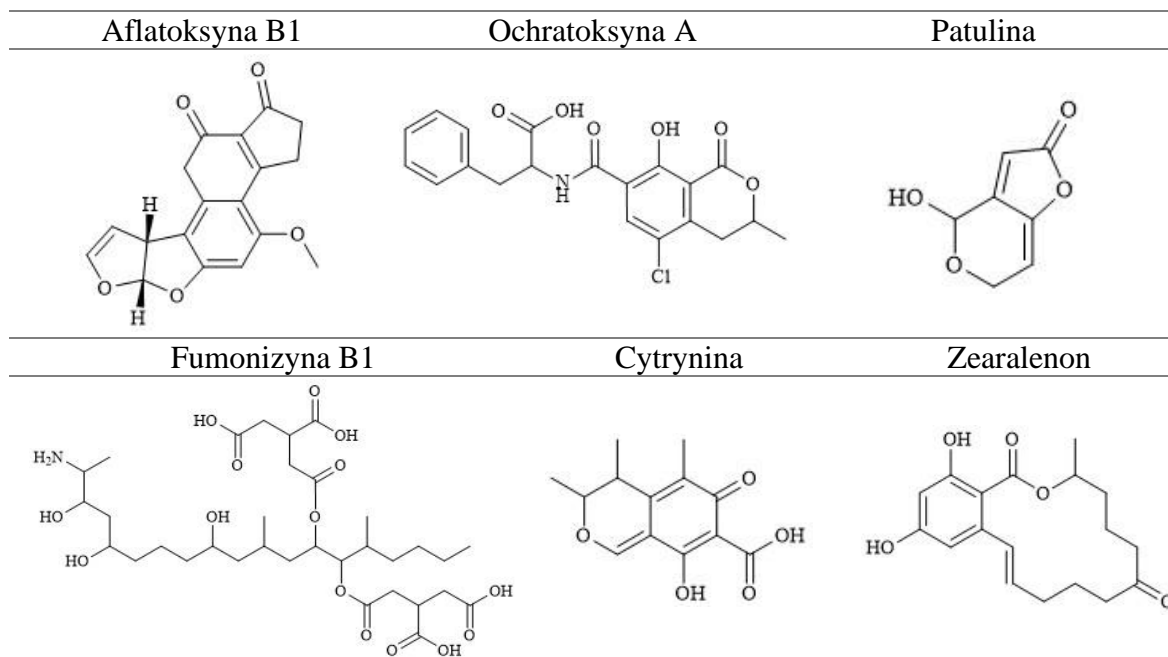
Utrata żywności w wyniku zanieczyszczenia mikotoksynami

Mikotoksyny to metabolity wtórne o niskiej masie cząsteczkowej, wytwarzane przez niektóre gatunki grzybów strzępkowych, które zasadniczo nie są niezbędne grzybom do życia. Stanowią chemicznie i toksygenicznie zróżnicowaną grupę związków, definiowanych poprzez ich zdolność do wywoływania chorób i śmierci wielu organizmów (Bennett i Klich, 2003).

Chociaż wszystkie mikotoksyny są pochodzenia grzybowego, nie wszystkie toksyczne związki wytwarzane przez grzyby są nazywane mikotoksynami. Zarówno cel, jak i stężenie metabolitu są kluczowe w tej kategoryzacji. Dany metabolit może być więc określany jako zootoksyna, jeśli wykazuje szkodliwe działanie względem człowieka i zwierząt. Antybiotyki (takie jak penicylina) są mikotoksynami hamującymi wzrost drobnoustrojów. Natomiast substancje toksyczne dla roślin określane są mianem fitotoksyn (Bennett i Klich, 2003; Przysaś i in., 2012). Rola fitotoksyn w patogenezie zostanie opisana w podrozdziale 1.5.

Mikotoksyny wykazują toksyczną aktywność w niskich stężeniach, natomiast inne metabolity grzybów o niskiej masie cząsteczkowej, takie jak etanol, które działają w wysokich stężeniach, nie są klasyfikowane jako mikotoksyny (Bennett i Klich, 2003).

Około 150 gatunków grzybów posiada zdolność biosyntezy ponad 400 mikotoksyn, takich jak aflatoksyny, ochratoksyny, patulina, fumonizyny, cytrynina, zearalenon (Alegbeleye i in., 2022; Mohapatra i in., 2017; Saleh i Al-Thani, 2019). Struktury chemiczne przykładowych mikotoksyn przedstawiono na rysunku nr 4. Do głównych producentów mikotoksyn należą drobnoustroje z rodzajów *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* i *Alternaria* (Nan i in., 2022).



Rysunek 4. Struktury chemiczne wybranych mikotoksyn. Opracowanie własne na podstawie (Bano i in., 2023; Ten Bosch i in., 2017).

Według szacunków około 25-50% światowych produktów rolnych zostaje zanieczyszczona mikotoksynami na różnych etapach łańcucha żywnościowego (El-Sayed i in., 2022). Ponadto zdecydowana większość tych związków jest termostabilna, co oznacza, że nie ulegają zniszczeniu podczas przetwarzania przemysłowego, a jedynie niewielka, częściowa degradacja zachodzi wskutek gotowania, smażenia lub pasteryzacji (Kabak, 2009).

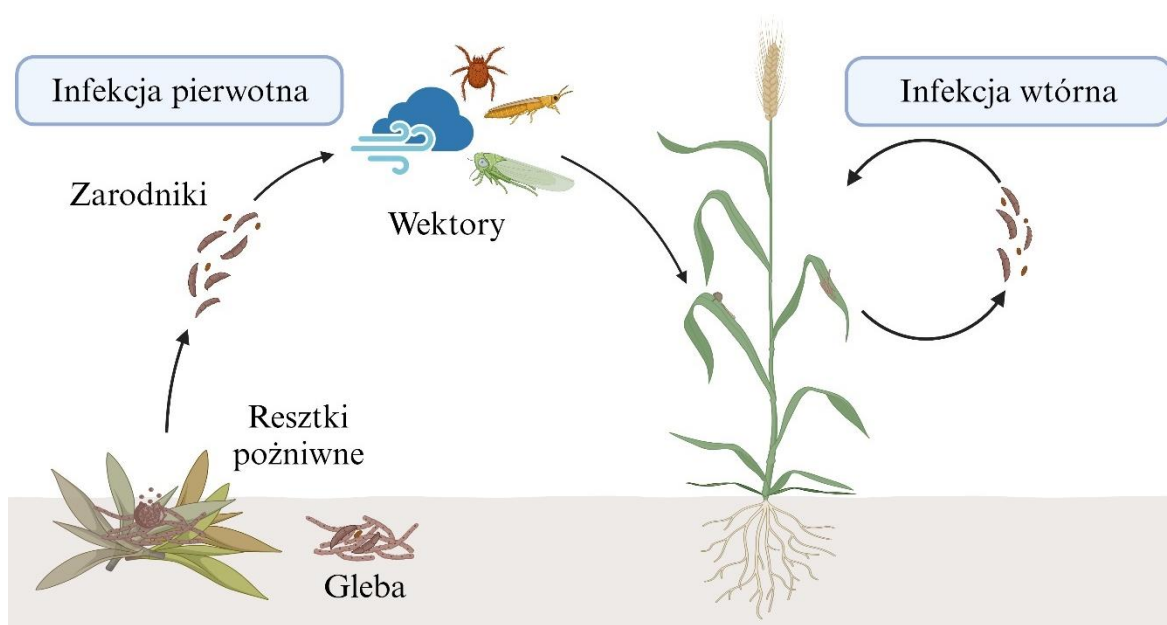
Mikotoksyny mają tendencję do gromadzenia się w tkankach roślinnych, a ich spożycie stanowi zagrożenie dla zdrowia organizmów, zwłaszcza ludzi (Perincherry i in., 2019). Nawet w niskich dawkach mogą prowadzić do patologicznych zmian w wątrobie, nerkach i przewodzie pokarmowym, a także wykazywać działanie immunosupresyjne, rakotwórcze, teratogenne i mutagenne (Mirza Alizadeh i in., 2021; Nan i in., 2022). Objawy spożycia zanieczyszczonej mikotoksynami żywności obejmują występowanie biegunki i wymiotów, zmniejszenie apetytu, zapalenie żołądka i jelit, zaburzenia wzrostu, a w ciężkich przypadkach mogą prowadzić nawet do śmierci (Mohapatra i in., 2017). Ponadto skażenie paszy mikotoksynami może powodować zmniejszenie produkcji mleka przez bydło o 5-10% (Ahmad i Gholib, 2016; Davies i in., 2021).

1.4 Grzybowe patogeny roślin

Królestwo grzybów (*Fungi*) obejmuje szacunkowo ponad 1,5 miliona gatunków, jednak do tej pory opisano zaledwie około 148 tysięcy, do których należą między innymi drożdże, grzyby strzępkowe i grzyby makroskopowe (Haelewaters i in., 2022).

Grzyby strzępkowe, potocznie nazywane pleśniami, są organizmami eukariotycznymi, zbudowanymi z komórek zwanych strzępkami o cylindrycznym, wydłużonym i nitkowatym kształcie (Riquelme i in., 2018). Strzępki rosną poprzez wydłużanie wierzchołka i okresowe rozgałęzienia tworzące złożoną, połączoną sieć, którą uważa się za pojedynczy organizm i określa mianem kolonii grzybów lub grzybnią (Vidal-Diez de Ulzurrun i in., 2017). Wszystkie grzyby strzępkowe są obligatoryjnymi heterotrofami, tj. wykorzystują organiczne źródła węgla jako substrat, który pobierają ze środowiska (Ritz, 2005). Bezwzględna cudzożywność grzybów strzępkowych przesądza o tym, że mogą one należeć do saprofitów, komensali, symbiontów lub patogenów (Cairns i in., 2021).

Podstawowymi etapami w cyklu chorobowym grzybów fitopatogennych są rozprzestrzenianie się, kolonizacja (inwazja), wzrost i reprodukcja oraz przetrwanie patogenu pod nieobecność żywiciela, to znaczy zimowanie lub przesezonowanie (González-Fernández i in., 2010). Rysunek nr 5 przedstawia uproszczony schemat infekcji roślin przez grzyby fitopatogenne.

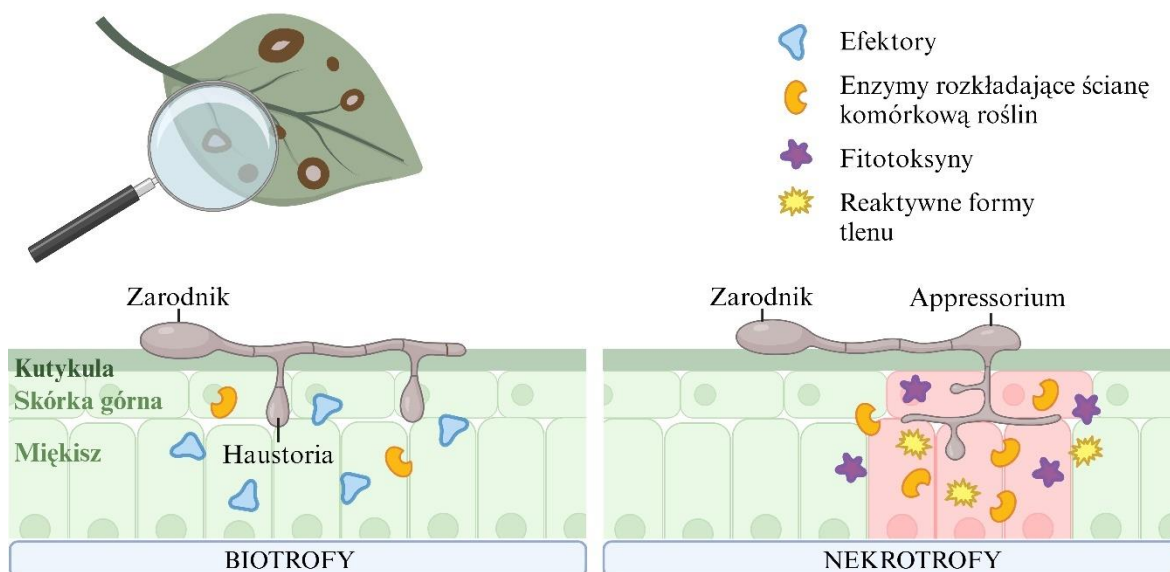


Rysunek 5. Schemat infekcji roślin przez grzyby fitopatogenne na przykładzie *Fusarium* sp. i pszenicy. Gleba i resztki poźniwne stanowią rezerwuuar inokulum. Zarodniki przenoszone są przez wiatr, wodę lub wektory owadów na powierzchnię rośliny, gdzie następuje kolonizacja, wzrost i reprodukcja patogenu (infekcja pierwotna) lub z wcześniej zainfekowanych części roślinnych (infekcja wtórna). Zarodniki i grzybnia mogą przetrwać w glebie do następnego sezonu, by rozpocząć kolejny cykl życiowy. Opracowanie własne na podstawie (Moonjely i in., 2023; Todorović i in., 2023). Utworzono za pomocą BioRender.com.

Patogeny roślin (fitopatogeny) są często klasyfikowane na podstawie ich strategii kolonizacji i wywoływania choroby u gospodarza oraz sposobu, w jaki żywią się jego tkankami (González-Fernández i in., 2010). Grzyby biotroficzne pozyskują składniki odżywcze z żywych tkanek gospodarza i dlatego muszą utrzymywać żywotność żywiciela. Drobnoustroje te są zdolne do tworzenia specjalnych struktur, tak zwanych strzępków ssawnych (haustoria), które wnikają do komórek roślinnych, umożliwiając im pobieranie substancji odżywczych bez powodowania śmierci komórek gospodarza na początkowym etapie infekcji. Biotrofy utrzymują stałą równowagę pomiędzy zjadliwością a unikaniem wykrycia przez żywiciela, wykorzystując cząsteczki efektorowe do tłumienia śmierci komórek roślinnych i manipulowania metabolizmem gospodarza (Horbach i in., 2011; Laluk i Mengiste, 2010; Shao i in., 2021). W przypadku patogenów biotroficznych wydzielanie enzymów rozkładających ścianę komórkową roślin jest zlokalizowane i kontrolowane, aby utrzymać swojego gospodarza przy życiu (rysunek 6, lewa strona) (Lorrai i Ferrari, 2021).

Nekrotrofy natomiast aktywnie zabijają zainfekowaną tkankę żywiciela, w celu pozyskania składników odżywczych z martwych lub obumierających tkanek (González-Fernández i in., 2010). Zakażenie grzybami nekrotroficznymi obejmuje kolejno etapy adhezji zarodników, kiełkowania, penetracji tkanek żywiciela, tworzenia pierwotnej zmiany chorobowej, ekspansji zmiany chorobowej i maceracji tkanki, po której następuje sporulacja (rysunek 6, prawa strona) (Horbach i in., 2011; Shao i in., 2021).

Zarodniki grzyba przywierają do powierzchni rośliny żywicielskiej za pomocą niewielkich sił adhezyjnych (takich jak oddziaływania hydrofobowe) (Bano i in., 2023). Penetracja roślinnej ściany komórkowej może być osiągnięta za pomocą aktywnych mechanizmów (appressoria) oraz degradacji enzymatycznej, lub biernie, poprzez rany i aparaty szparkowe. Po ustanowieniu infekcji tkanka roślinna jest rozkładana wskutek dalszego rozkładu składników komórkowych. Do inicjowanej śmierci komórek dochodzi w wyniku działania enzymów hydrolitycznych, toksycznych poziomów reaktywnych form tlenu i toksyn o niskiej masie cząsteczkowej (Horbach i in., 2011). Podczas infekcji grzyby nekrotroficzne aktywnie manipulują maszyną komórkową gospodarza w celu tłumienia mechanizmów obronnych (Horbach i in., 2011; Laluk i Mengiste, 2010).



Rysunek 6. Strategie kolonizacji roślin przez grzyby fitopatogenne. Opracowanie własne na podstawie (Pradhan i in., 2021). Utworzono za pomocą BioRender.com

Patogeny, które wykazują początkowy tryb życia biotroficzny, a następnie przechodzą do nekrotrofii i zabicia rośliny nazywane są hemibiotrofami. Ponadto, niektóre grzyby mogą być warunkowo biotroficzne lub nekrotroficzne, w zależności od warunków środowiskowych i interakcji z gospodarzem roślinnym (Horbach i in., 2011; Shao i in., 2021).

1.5 Czynniki wirulencji grzybów fitopatogennych

Czynniki wirulencji stanowią zestaw cech i mechanizmów molekularnych, strukturalnych i biochemicznych, które umożliwiają organizmom chorobotwórczym skuteczne infekowanie, rozmnażanie i przetrwanie w tkankach żywiciela, prowadząc do rozwoju choroby (Khaledi i in., 2017). W niniejszej pracy szerzej omówione zostaną wybrane czynniki wirulencji, do których należą: zdolność zarodników do adhezji i tworzenia biofilmów na powierzchni rośliny żywiciela, enzymy rozkładające ścianę komórkową roślin, enzymy proteolityczne i lipolityczne oraz czynniki wywołujące śmierć komórek gospodarza (fitotoksyny).

Adhezja zarodników do powierzchni rośliny żywiciela

Kontakt i adhezja zarodników do powierzchni żywiciela są pierwszymi etapami wymaganymi do kiełkowania i służą jako czynnik wirulencji podczas ustanawiania infekcji roślin (Apoga i in., 2001).

Grzyby fitopatogenne są rzadko opisywane jako organizmy tworzące biofilm, prawdopodobnie dlatego, że nie spełniają dokładnie definicji biofilmu opartej na modelach

bakteryjnych. Niemniej jednak, zgodnie z zestawem kryteriów przedstawionych przez Harding i in. (Harding i in., 2009), wzrost grzybów strzępkowych wykazuje właściwości podobne do biofilmu. Należą do nich obecność zewnątrzkomórkowych materiałów polimerowych (ang. extracellular matrix, ECM) oraz komunikacja międzypopulacyjna za pomocą sygnałów zewnątrzkomórkowych, a także odmienna ekspresja genów i zwiększona oporność na związki przeciwgrzybicze w porównaniu z komórkami rozproszonymi lub luźno związanymi (planktonowymi).

Inicjacja tworzenia biofilmu u grzybów nitkowatych następuje po fazie planktonicznej, kiedy zarodniki lub fragmenty grzybni przyczepiają się do powierzchni i zaczynają się rozmnażać (Harding i in., 2009). Zarodniki, które nie są w stanie przyłgnąć do powierzchni rośliny łatwo ulegają przemieszczeniu pod wpływem warunków atmosferycznych (Falanga i in., 2022; Whitehead i in., 2021). Rozwijające się strzępki tworzą monowarstwę lub mikrokolonie, pokryte macierzą pozakomórkową. Macierz pozakomórkowa (ECM) składa się głównie z polisacharydów, białek, DNA i lipidów, które chronią komórki przed szkodliwymi warunkami żywiciela oraz środowiskowymi (Apoga i in., 2001; Liu i in., 2022). Na późniejszych etapach rozwoju biofilmu strzępki przeplatają się i zaczynają tworzyć warstwowe i/lub zagregowane skupiska, często pokryte bardziej obfitym ECM. Dojrzały biofilm tworzy struktury rozrodcze, umożliwiające rozprzestrzenianie się poprzez uwalnianie zarodników (Apoga i in., 2001; Harding i in., 2010). Zdolność do wytwarzania biofilmu może zapewnić patogenowi grzybowemu przewagę w zakresie przetrwania w niekorzystnych warunkach, a także zwiększyć oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe (Peiqian i in., 2014).

Enzymy rozkładające ścianę komórkową roślin

Ściana komórkowa roślin stanowi heterogeniczną strukturę, złożoną z polisacharydów, białek i polimerów aromatycznych, która pełni funkcję fizycznej bariery, chroniącej przed przedostawaniem się patogenów do wnętrza komórek roślinnych (Malinovsky i in., 2014). Skład ściany różni się w zależności od rodzaju rośliny, tkanki oraz funkcji jaką pełni, zachowując jednak wspólne podstawowe cechy budowy: mikrofibryle celulozy osadzone są w matrycy pektyn, hemiceluloz, lignin oraz protein strukturalnych (Houston i in., 2016).

Grzyby fitopatogenne wydzielają szereg enzymów degradujących ścianę komórkową (ang. cell wall degrading enzymes, CWDE) w celu kolonizacji i pozyskiwania składników odżywczych z tkanek roślinnych. CWDE zmiękczejają roślinną ścianę komórkową, ułatwiając penetrację i rozprzestrzenianie patogenu w tkankach gospodarza oraz

zwiększając dostępność składników ściany komórkowej do dalszej degradacji. Ponadto, wszystkie grzyby fitopatogenne wymagają tych enzymów na późniejszych etapach inwazji. Enzymatyczna degradacja składników ściany komórkowej zapewnia bowiem dostęp do substancji odżywczych oraz promuje wyciek tych składników z protoplastu (Ortega i in., 2013). Do CWDE zaliczamy enzymy rozkładające celulozę (celulazy), pektyny (pektynazy) oraz ksylan (ksylanazy) (Schmitz i in., 2019).

Celuloza jest homopolimerem zbudowanym z reszt D-glukozy połączonych wiązaniami β -1,4-glikozydowymi. Grupy od 100 do 10 000 cząsteczek celulozy połączonych wiązaniami wodorowymi tworzą mikrofibryle. Pomędzy mikrofibrilami celulozy rozmieszczony jest materiał macierzy, składający się z substancji pektynowych, hemiceluloz i białek strukturalnych (Kubicek i in., 2014). Enzymy celulolityczne można podzielić w zależności od sposobu hydrolizy i specyficzności substratowej na trzy główne typy: β -1,4-endoglukanazy, egzoglukanazy i β -glukozydazę. Pierwsze z nich, β -1,4-endoglukanazy, losowo hydrolizują wewnątrz wiązania łańcuchów celulozy, tworząc oligomery, na które z kolei działają egzoglukanazy, uwalniając reszty celobiozy i innych oligosacharydów. Wreszcie, β -glukozydaza może hydrolizować celobiozę lub krótkołańcuchowe oligosacharydy do glukozy. Synergistyczne działanie tych enzymów jest zatem odpowiedzialne za całkowity rozkład celulozy (Ma i in., 2019; Sohail i in., 2011).

Kolejnym ważnym składnikiem budulcowym roślinnej ściany komórkowej są hemicelulozy, heteropolimery zbudowane głównie z D-glukozy, D-galaktozy, D-mannozy, D-ksylozy, L-arabinozy oraz kwasów heksauronowych (galakturonowego, glukuronowego i metyloglukuronowego). Do najważniejszych hemiceluloz należą ksylany, mannany, galaktany i galaktomannany (Wesołowska-Trojanowska i Targoński, 2015).

Ksylan stanowi główny składnik hemicelulozowy ściany komórkowej roślin. Tworzy złożoną strukturę składającą się ze szkieletu reszt D-ksylozy połączonych wiązaniami β -1,4-glikozydowymi, mniej lub bardziej podstawionymi różnymi grupami (acetylową, arabinofuranozylową, galaktozylową, glukuronylową i metyloglukuronylową) (Kubicek i in., 2014; Li i in., 2020). Endo- β -1,4-ksylanazy rozkładają szkielet ksylanu poprzez katalizowanie hydrolizy wiązań β -1,4 i mogą odgrywać ważną rolę podczas infekcji roślin, nie tylko w wyniku degradacji ściany komórkowej, ale także poprzez wywoływanie nekrozy w tkankach gospodarza (Nakajima i Akutsu, 2014; Paccanaro i in., 2017).

Trzecim najobficiej występującym składnikiem ściany komórkowej roślin są pektyny. Stanowią one grupę złożonych i wysoce heterogenicznych polisacharydów, których

głównym składnikiem szkieletu są jednostki kwasu D-galakturonowego, połączone wiązaniami α -1,4-glikozydowymi z cukrami obojętnymi, takimi jak arabinoza, galaktoza, ksyloza i L-ramnoza obecnymi w łańcuchach bocznych (Kubicek i in., 2014; Kumar i in., 2012).

Degradacja pektyny wymaga jednoczesnego działania wielu enzymów ze względu na złożoną i niejednorodną strukturę. Należą do nich zarówno enzymy działające na szkielet, takie jak endo-poligalakturonazy, egzo-poligalakturonazy (jeśli rozszczepiają odpowiednio wewnątrz lub na końcu łańcucha substratu), liazy pektynowe i pektynianowe, a także enzymy działające na łańcuchy boczne, takie jak metyloesterazy pektynowe i endoarabinazy (Schmitz i in., 2019). Uważa się, że enzymy pektynolityczne przyczyniają się do zjadliwości patogenów roślin. Są bowiem jednymi z pierwszych enzymów wydzielanych przez wiele fitopatogenów, co wskazuje, że ich aktywność jest niezbędna w degradacji składników strukturalnych ściany komórkowej roślin (Kumar i in., 2012; Lorrai i Ferrari, 2021).

Enzymy lipolityczne

Kutykula pokrywająca nadziemne organy roślin tworzy skuteczną barierę przed wysuszeniem, a także zmniejsza podatność roślin na ataki patogenów, zapewniając mechaniczną odporność na choroby (Feng i in., 2005). Warstwa ta jest złożoną i zróżnicowaną mieszaniną długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, węglowodorów, aldehydów, alkoholi pierwszorzędowych i drugorzędowych, ketonów i estrów wosków, natomiast naskórek składa się z nierozpuszczalnego materiału polimerowego zwanego kutyną (Feng i in., 2005; Laskoś i Czyczyło-Mysza, 2023).

Wiele grzybów fitopatogennych, atakujących nadziemne części roślin, bezpośrednio przenika przez kutykulę żywiciela, wykorzystując zestaw zewnątrzkomórkowych enzymów hydrolitycznych, w tym lipaz (Subramoni i in., 2010).

Lipazy (acylohydrolazy triacyloglicerolu) hydrolizują wiązania estrowe w triacyloglicerolach na granicy faz oleju i wody, uwalniając kwasy tłuszczowe i glicerol. Enzymy te mogą przyczyniać się do patogenezы poprzez degradację woskowiny, naskórka i ścian komórkowych, umożliwiając w ten sposób adhezję patogenu do powierzchni rośliny i inwazję tkanek roślinnych oraz zapewniając dostęp do substancji odżywczych (Berto i in., 1999; Subramoni i in., 2010). Dodatkowo, lipazy grzybowe mogą odgrywać rolę w degradacji lipidów zapasowych, lipidów zawartych w roślinnej błonie komórkowej

oraz w przekazywaniu sygnałów poprzez uwalnianie wtórnych przekaźników (Feng i in., 2005).

Enzymy proteolityczne

Ściany komórkowe, oprócz polisacharydów, zawierają również białka, takie jak glikoproteiny i ekstensyny oraz wodę (Kubicek i in., 2014). Enzymy katalizujące proteolizę, określane jako proteazy, stanowią kolejną grupę enzymów istotnych w procesie patogenez. Wraz z CWDE działają na wczesnym etapie infekcji, umożliwiając adhezję do komórek gospodarza, penetrację, kolonizację i rozprzestrzenianie się wewnątrz tkanek roślinnych (Chandrasekaran i in., 2016; Ortega i in., 2013).

Proteazy hydrolizują wiązania peptydowe i prowadzą do rozkładu białek do peptydów lub aminokwasów. Enzymy te klasyfikowane są na podstawie miejsca hydrolizy (endopeptydazy i egzopeptydazy), optymalnego pH (proteazy kwasowe, zasadowe i obojętne) lub grupy funkcyjnej w miejscu aktywnym (aspartylowe, cysteinowe, metalo-, serynowe, treoninowe) (Chandrasekaran i in., 2016).

Podczas inwazji gospodarza, enzymy proteolityczne odgrywają kluczową rolę w degradacji białek strukturalnych, co prowadzi do osłabienia i zniszczenia struktury tkanki roślinnej. Uwolnione peptydy i aminokwasy mogą działać jako sygnały stresowe lub aktywować reakcje obronne rośliny. Ponadto, enzymy proteolityczne mogą być zaangażowane w unikanie lub neutralizowanie odpowiedzi obronnej rośliny poprzez degradację białek związanych z reakcjami obronnymi (Chandrasekaran i in., 2016).

Fitotoksyny

Toksyny produkowane przez grzyby fitopatogenne, wykazujące szkodliwe działanie względem roślin nazywane są fitotoksynami, niezależnie od ich wpływu na inne organizmy (Xu i in., 2021). Fitotoksyny to nieenzymatyczne metabolity wtórne o niskiej masie cząsteczkowej, uwalniane przez grzybnię w momencie ustanowienia infekcji. Należą do czynników wirulencji, a więc prowadzą do nasilenia objawów chorobowych w roślinie (Ortega i in., 2013; Peng i in., 2021).

Mechanizm działania fitotoksyn jest bardzo złożony i obejmuje zaburzenia funkcji błony komórkowej, mitochondriów i chloroplastów, ponadto metabolity te hamują syntezę białek i kwasów nukleinowych w roślinie żywicielskiej (Peng i in., 2021).

Inhibicja enzymów uczestniczących w biosyntezie lipidów i białek przez fitotoksyny prowadzi do zakłócenia struktury błony komórkowej i wzrostu przepuszczalności, co z kolei sprzyja wyciekowi związków wewnątrzkomórkowych, zaburzeniom równowagi

jonowej oraz utracie funkcji metabolicznych (Karuna i Sashidhar, 2008; Möbius i Hertweck, 2009; Williams i in., 2007). Uszkodzenia komórek i tkanek mają dalszy wpływ na zaburzenia procesów fizjologicznych rośliny, takich jak transport wody, asymilację fotosyntetyczną oraz oddychanie komórkowe, prowadząc do więdnienia, zahamowania wzrostu, chlorozy, martwicy lub plamistości liści (Anjorin i Inje, 2014; Karuna i Sashidhar, 2008; Shi i in., 2023). Niektóre fitotoksyny mogą również wpływać na poziom hormonów roślinnych, takich jak kwas abscysynowy (ABA), etylen czy auksyny. Zaburzenia w równowadze hormonalnej wpływają na różnicowanie się tkanek, rozwój korzeni, kwitnienie czy odpowiedzi na stres abiotyczny i prowadzą do zakłóceń w prawidłowym wzroście i rozwoju rośliny (Chanclud i Morel, 2016).

Większość toksyn jest nioselektywna lub niespecyficzna względem gospodarza, co przejawia się szkodliwym działaniem dla szerokiej gamy roślin. Grzyby fitopatogenne wytwarzające toksyny nioselektywne należą do najbardziej szkodliwych organizmów w rolnictwie, powodujących znaczne straty ekonomiczne. Tak zwane toksyny selektywne lub specyficzne dla gospodarza, należą do drugiej i mniejszej klasy fitotoksyn. Są one aktywne tylko w roślinach żywicielskich posiadających genetycznie uwarunkowaną wrażliwość na daną toksynę (Prell i Day, 2001).

1.6 Charakterystyka wybranych grzybów fitopatogennych

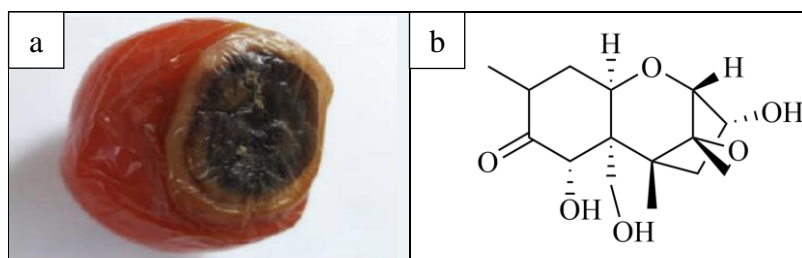
W niniejszej pracy przedstawiono wpływ działania atmosferycznej plazmy niskotemperaturowej na grzyby z rodzajów *Fusarium*, *Botrytis* i *Alternaria*, jako przedstawicieli grzybów o szczególnym znaczeniu dla rolnictwa w Polsce (Jędrzycka i Kaczmarek, 2012; Kurzawińska i Machura, 2017; Remlein-Starosta i in., 2012; Stępniewska-Jarosz i in., 2017). Ich obecność w uprawach skutkuje bezpośrednimi stratami ekonomicznymi oraz ograniczeniem dostępności zdrowej żywności. Poza tym produkowane toksyny oraz alergeny stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego, co dodatkowo zwiększa znaczenie opracowania skutecznych metod ich eliminacji.

Grzyby z rodzaju *Fusarium*

Fusarium to rodzaj grzybów należący do workowców (*Ascomycota*), klasy *Sordariomycetes*, rzędu *Hypocreales*, rodziny gruzełkowatych (*Nectriaceae*) (Index Fungorum). Rodzaj *Fusarium* obejmuje szacunkowo ponad 1500 gatunków, do których należą pasożyty, endofity oraz patogeny (Arie, 2019).

Fusarium spp. należą do jednych z najczęściej izolowanych patogenów roślin uprawnych na świecie. Powodują ogromne straty, wynikające z wysokiej patogenności i toksynotwórczości, a także szerokiego spektrum roślin żywicielskich (Sadowska i in., 2021; Suchorzyńska i Misiewicz, 2009). Gatunki patogene porażają zboża, takie jak pszenicę, owies, jęczmień, żyto, pszenżyto i kukurydzę (Arie, 2019; Różewicz i in., 2021). Fuzariozy zbóż występują przede wszystkim podczas uprawy na polu, ale mogą również rozwijać się po zbiorach, jeśli mokre ziarno nie zostanie skutecznie i szybko wysuszone (Perincherry i in., 2019). Przedstawiciele rodzaju *Fusarium* atakują także inne rośliny, takie jak banany, ananasy, soczewicę, pomidory i groch (rysunek 7 a) (Wagacha i Muthomi, 2007). Choć *Fusarium* spp. wykorzystują wiele strategii infekcji, grzyby te uważane są za hemibiotrofy zdolne do przejścia w nekrotroficzny tryb życia w zależności od specyficznych warunków środowiskowych (Rampersad, 2020).

Wielozwicielowość tych grzybów oraz zdolność do infekowania różnych tkanek i organów prowadzi do spadku plonowania roślin i obniżenia jakości produktów rolnych (Fonseca-Guerra i in., 2022). Ponadto, niektóre gatunki są zdolne do wytwarzania mikotoksyn, które mogą powstawać w porażonych roślinach podczas uprawy na polu lub w czasie przechowywania (Bottalico, 1998; Gebremariam i in., 2020). Do mikotoksyn produkowanych przez rodzaj *Fusarium* należą fumonizyny, zearalenon i trichoteceny (rysunek 7 b, na przykładzie deoksyniwalenolu) (Ekwomadu i in., 2021).



Rysunek 7. **a** - Objawy fuzariozy w owocu pomidora (zaczepnięto z Jeewon i in., 2024, publikacja w otwartym systemie dostępu); **b** - Struktura chemiczna deoksyniwalenolu (opracowanie własne na podstawie Wu i in., 2017).

Fusarium oxysporum uznawany jest za powszechny patogen, występujący głównie w glebach uprawnych we wszystkich strefach klimatycznych. Zarodniki mogą zostać łatwo przeniesione za pomocą zakażonych materiałów sadzeniowych i nasion, narzędzi rolniczych i maszyn. Dodatkowo, patogeny te są w stanie przetrwać w glebie pod nieobecność żywiciela ponad 20 lat, głównie w postaci grubościennych przetrwalnikowych (chlamydospor), które są odporne na wysychanie oraz niesprzyjające warunki

środowiskowe. Długoterminowemu przetrwaniu sprzyja również infekcja chwastów i innych roślin, które stanowią rezerwuuar inokulum (Dita i in., 2018).

F. oxysporum powoduje zgniliznę korzeni, więdnienie i nekrozę u ponad 120 gatunków roślin żywicielskich i zajmuje piąte miejsce spośród 10 najważniejszych patogenów roślin o znaczeniu gospodarczym (Cai i in., 2022; Dean i in., 2012). Patogen ten infekuje i wywołuje objawy chorobowe między innymi u roślin z rodziny psiankowatych (*Solenaceae*), obejmującej pomidory, ziemniaki, paprykę i psiankę podłużną, a także u roślin strączkowych, sałaty i bananów (Joshi, 2018).

Mimo, że *F. oxysporum* charakteryzuje się szerokim zakresem roślin żywicielskich, to poszczególne szczepy tego gatunku wykazują selektywną patogeniczność w stosunku do mniej lub bardziej wąskiego zakresu żywicieli. Szczepy z tym samym zakresem żywicieli pogrupowane są w ponad 100 *formae speciales* (ff. spp.; lp. *forma specialis*, f. sp.). Na przykład szczepy odpowiedzialne za więdnienie pomidora należą do *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *cubense* jest specyficzny wobec bananów a *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* wobec ogórków (Joshi, 2018).

Patogenne szczepy *F. oxysporum* wywołują za dwa rodzaje objawów. Najczęściej prowadzą do więdnienia naczyniowego lub rzadziej do gnicia (Edel-Hermann i Lecomte, 2019). *F. oxysporum* powodujący więdnienie przenika do korzeni żywiciela i kolonizuje tkankę ksylemu. W odpowiedzi zaatakowana roślina produkuje kalozę, tylozę lub żełe, które zatrzymują transport wody w ksylemie, w celu ograniczenia rozprzestrzeniania się patogenu w tkankach żywiciela. Prowadzi to do zablokowania naczyń i więdnienia zainfekowanych części rośliny. Wydzielane przez *F. oxysporum* toksyny dodatkowo przyspieszają więdnienie tkanek poprzez uszkodzenie błony komórkowej roślin i wyciek wody. Objawami infekcji są żółknięcie liści, postępujące więdnienie i defoliacja, a w końcu obumieranie rośliny w wyniku zatykania naczyń oraz toksyczności ogólnoustrojowej (Arie, 2019; Michielse i Rep, 2009; Sun i in., 2017).

F. oxysporum wywołujący gnicie postępuje w korzeniach i tkankach kory hipokotylowej, nie docierając do układu naczyniowego. Rozwój choroby skutkuje pojawieniem się przebarwionych tkanek, które przekształcają się w brązowe lub czarne nekrotyczne plamy. Choroby z objawami gnicia nazywane są fuzaryjną zgorzelą lub zgnilizną, a porażone rośliny wykazują zahamowanie wzrostu (Cai i in., 2022; Edel-Hermann i Lecomte, 2019).

Podczas procesu infekcji *F. oxysporum* wytwarza szereg czynników zjadliwości, obejmujących enzymy degradujące ścianę komórkową (CWDE), białka efektorowe i mikotoksyny (Dutta i in., 2018; Michielse i Rep, 2009; Perincherry i in., 2019).

Kolejny przedstawiciel rodzaju *Fusarium*, *F. culmorum*, jest wszechobecnym grzybem glebowym, występującym głównie w klimacie umiarkowanym, szczególnie w chłodniejszych obszarach, takich jak północna, środkowa i zachodnia Europa. Rozmnaża się bezpłciowo za pomocą zarodników (konidiów), które są główną drogą rozprzestrzeniania się. *F. culmorum* ma szeroką gamę roślin żywicielskich, do których należą głównie zboża, takie jak pszenica, jęczmień, owies, żyto, kukurydza, sorgo i różne trawy. Poraża również inne rośliny, takie jak burak cukrowy, len, fasola, groch, szparagi, chmiel, świerk pospolity, truskawkę i ziemniaki (Scherf i in., 2013; Schiwek i in., 2022). Patogen ten jest czynnikiem sprawczym zgnilizny korzeni zbóż, zgnilizny kolb kukurydzy i suchej zgnilizny bulw ziemniaka. Jest również patogenem pozbiornym, szczególnie w przypadku niewłaściwie wysuszonego i przechowywanego ziarna (Scherf i in., 2013). Do głównych mikotoksyn wytwarzanych przez *F. culmorum* należą trichoteceny, niwalenol, 3-acetyloodeksyniwalenol i zearalenon które stanowią potencjalne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt (Wagacha i Muthomi, 2007).

Grzyby z rodzaju *Botrytis*

Rodzaj *Botrytis* (gronowiec) należy do grzybów workowych (*Ascomycota*), klasy patyczniaków (*Leotiomycetes*), rzędu tocznikowców (*Helotiales*), rodziny twardnicowatych (*Sclerotiniaceae*) (Index Fungorum).

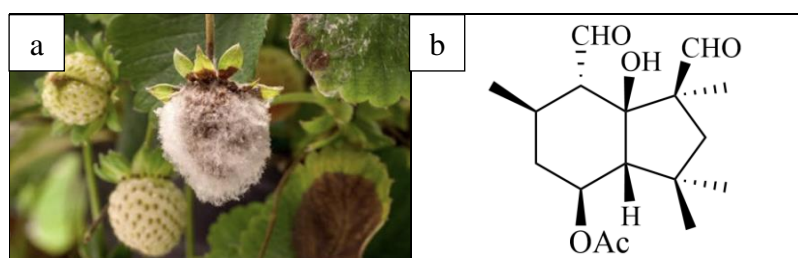
Rodzaj *Botrytis* obejmuje dotychczas 34 uznane gatunki (Schumacher, 2017; Valero-Jiménez i in., 2019). Są to przede wszystkim nekrotrofy, które mogą porażać ponad 1400 różnych gatunków roślin, powodując straty w szerokim zakresie upraw o znaczeniu gospodarczym. Opisano także ogólnoustrojowe i bezobjawowe zakażenia *Botrytis* spp., co pokazuje, że mogą również funkcjonować jako endofity (Shaw i in., 2016; Valero-Jiménez i in., 2019).

Typowymi objawami prowadzącymi do strat żywności są rozprzestrzeniające się, szybko rosnące zmiany martwicze z dużą ilością pigmentowanych, hydrofobowych konidiów (Shaw i in., 2016).

Większość *Botrytis* spp. ma wąski zakres żywicieli, w odróżnieniu do *B. cinerea*, który nie wykazuje wyraźnej specyficzności wobec gospodarza i może infekować ponad 200 gatunków roślin, prowadząc do poważnych strat przed i po zbiorach w produkcji

istotnych gospodarczo owoców, warzyw i kwiatów ozdobnych (rysunek 8 a) (Petrasch, Knapp, i in., 2019; Woudenberg i in., 2015). *B. cinerea*, zwany także szarą pleśnią, zajmuje drugie miejsce wśród dziesięciu grzybów powodujących największe straty gospodarcze na świecie (Dean i in., 2012).

Patogen wnika do tkanek żywiciela głównie przez rany lub naturalne otwory. Niezależnie od rodzaju infekcji, na początku cyklu chorobowego zazwyczaj przechodzi krótką, bezobjawową fazę biotroficzną. Gdy tkanki roślinne zaczynają się starzeć lub dojrzewać następuje agresywna faza nekrotroficzna, prowadząca do ich szybkiego rozkładu (Petrasch, Knapp, i in., 2019). Po zbiorze pozornie zdrowych plonów może dojść do ich zepsucia w czasie przechowywania, transportu, sprzedaży detalicznej lub u konsumenta (Dean i in., 2012).



Rysunek 8. a - Objawy zakażenia *B. cinerea* w truskawce (zaczepnięto z Petrasch, Knapp, i in., 2019, publikacja w otwartym systemie dostępu); b - Struktura chemiczna botrydialu (opracowanie własne na podstawie Huang i in., 2021).

Infekcja, kolonizacja i tłumienie mechanizmów obronnych żywiciela przez *B. cinerea* odbywa się za pośrednictwem enzymów litycznych, toksyn, wysokich stężeń reaktywnych form tlenu, czynników wywołujących martwicę i szeregu metabolitów wtórnych. Poza tym grzyb ten rozwija appressoria, struktury infekcyjne rosnące na powierzchni rośliny, z których wydzielane są oksydazy, kutynazy i lipazy w celu aktywnej penetracji warstw kutyny i wosku roślinnego (Laluk i Mengiste, 2010). *B. cinerea* może również wydzielać kwas szczawiowy, który obniża pH tkanek żywiciela, prowadząc do zwiększenia aktywności enzymów a także do zakłócenia integralności ściany komórkowej przez chelatowanie jonów wapnia w strukturze pektyny. Kwas szczawiowy może również wywołać zaprogramowaną śmierć komórki (Williamson i in., 2007). Enzymy degradujące ścianę komórkową, takie jak lakazy, proteazy, pektynazy, a zwłaszcza endopoligalakturonazy umożliwiają *B. cinerea* rozluźnianie struktury ściany komórkowej i rozkład składników komórek roślinnych w celu dalszej penetracji tkanek (Petrasch, Knapp, i in., 2019).

B. cinerea wytwarza również botrydial, będący głównym fitotoksycznym metabolitem nieselektywnym względem żywiciela. Botrydial został powiązany ze zjadliwością, ponieważ jego egzogenne zastosowanie wywołuje chlorozę, zapadanie się komórek i ułatwia grzybom penetrację tkanki roślinnej (rysunek 8 b) (Laluk i Mengiste, 2010).

Szara pleśń stanowi zatem poważne zagrożenie dla rolnictwa i przemysłu spożywczego ze względu na szeroki zakres roślin żywicielskich, zdolność adaptacji do różnorodnych warunków środowiskowych oraz szybkie tempo produkcji grzybni (Dean i in., 2012; Williamson i in., 2007).

Grzyby z rodzaju *Alternaria*

Rodzaj *Alternaria* należy do workowców (*Ascomycota*), klasy *Dothideomycetes*, rzędu *Pleosporales*, rodziny *Pleosporaceae* (Index Fungorum). Niektóre gatunki *Alternaria* są bezpłciowymi anamorfami workowca *Pleospora*, podczas gdy inne przypuszcza się, że są anamorfami *Leptosphaeria* (Thomma, 2003).

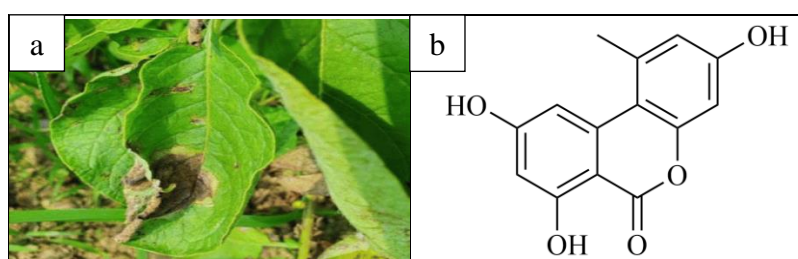
Rodzaj *Alternaria* obejmuje około 300 gatunków, z czego większość to saprofity, powszechnie występujące w glebie lub rozkładających się tkankach roślinnych. Szacuje się, że gatunki patogenne wywołują choroby u ponad 400 gatunków roślin, obejmujących między innymi zboża, pomidory, jabłka, winogrona, rośliny oleiste, pomarańcze, cytryny, melony, ogórki, ziemniaki, paprykę i mandarynki (Lee i in., 2015; Meena i in., 2017; Thomma, 2003).

Kluczową cechą taksonomiczną rodzaju *Alternaria* jest wytwarzanie dużych, wielokomórkowych, ciemno zabarwionych (melanizowanych) konidiów z podłużnymi i poprzecznymi przegrodami. Melaniny, oprócz roli w rozwoju konidiów, wydają się mieć pośrednią, jak również bezpośrednią funkcję w zjadliwości. Chronią grzyby przed stresem środowiskowym oraz niesprzyjającymi warunkami, takimi jak ekstremalne temperatury, promieniowanie ultrafioletowe (UV) i związki wydzielane przez antagonistyczne drobnoustroje (Thomma, 2003).

Zarodniki są przenoszone na powierzchnie roślin głównie przez wiatr, gdzie kolonizują i porażają nadziemne części roślin, zwłaszcza liście. Powodują stosunkowo powolne niszczenie tkanek żywiciela w wyniku zmniejszenia potencjału fotosyntetycznego i powstawania zmian martwiczych. Grzyb znajduje się w centrum zmiany, która jest otoczona niezaatakowaną chlorotyczną strefą, powstającą w wyniku dyfuzji toksycznych metabolitów (rysunek 9 a). Zazwyczaj osłabienie tkanki, spowodowane stresem,

starzeniem się lub zranieniem, są bardziej podatne na infekcję *Alternaria* spp. niż tkanki zdrowe (Escrivá i in., 2017; Thomma, 2003).

Optymalna temperatura wzrostu grzybów z rodzaju *Alternaria* mieści się w zakresie od 22 do 30°C. Jednakże, odnotowano niższe temperatury wzrostu w zakresie od 2,5 do 6,5°C, a nawet od 0 do -5°C w chłodniejszych regionach (Juan i in., 2016). Ich wszechobecność oraz zdolność do namnażania się i wytwarzania toksyn nawet w niesprzyjających warunkach (niska temperatura i mała aktywność wody) sprawiają, że rodzaj ten jest odpowiedzialny za psucie się wielu towarów podczas transportu i przechowywania (Escrivá i in., 2017).



Rysunek 9. **a** - Objawy brązowej plamistości na liściach ziemniaka (zaczepnięto z Park i in., 2024 publikacja w otwartym systemie dostępu); **b** - struktura chemiczna alternariolu (opracowanie własne na podstawie Saha i in., 2012).

Alternaria alternata jest patogenem prawie 100 gatunków roślin, w związku z czym jest grzybem o istotnym znaczeniu gospodarczym, prowadzącym do utraty i zanieczyszczenia żywności i paszy (Lee i in., 2015; Thomma, 2003; Wenderoth i in., 2019). *A. alternata* poraża głównie liście, owoce i młode pędy, powodując nekrozę, defoliację, skrócenie cyklu wzrostu oraz rozkład tkanek po zbiorach (Kumar i in., 2022; Liu i in., 2021). Oprócz utraty plonów w wyniku infekcji roślin, *A. alternata* powoduje ogromne szkody w rolnictwie w wyniku skażenia żywności oraz paszy mikotoksynami (Thomma, 2003; Wenderoth i in., 2019). Należą do nich alternariol (rysunek 9 b), eter monometylowy alternariolu oraz albertoksyny I i II. Obok mechanizmów penetracji i procesów enzymatycznych, toksyny te są uważane za ważny czynnik zjadliwości (Meena i in., 2017). *A. alternata* jest uważany również jako jedna z głównych przyczyn alergii na grzyby u ludzi i zwierząt (Wenderoth i in., 2019). Zidentyfikowano 16 alergenów *A. alternata*, wywołujących astmę i infekcje górnych dróg oddechowych u ludzi (Kustrzeba-Wójcicka i in., 2014; Woudenberg i in., 2015).

1.7 Strategie kontroli grzybów fitopatogennych

Prewencja i zwalczanie chorób grzybowych w uprawach rolnych

Kontrolowanie zanieczyszczenia grzybami na wszystkich etapach łańcucha rolno-spożywczego odgrywa kluczową rolę w ograniczaniu strat żywności. Do etapów szczególnie narażonych na występowanie chorób grzybiczych roślin uprawnych należy uprawa na polu, gdzie woda, gleba i powietrze stanowią naturalne środowiska bytowania patogenów (Davies i in., 2021; Leyva Salas i in., 2017).

W przypadku upraw polowych zanieczyszczenie grzybami jest zwykle kontrolowane za pomocą fungicydów, a także poprzez stosowanie niektórych praktyk zarządzania uprawami, takich jak płodozmian oraz wybór odmiany odpornej lub tolerancyjnej na porażenie przez grzyby (Fernandez-San Millan i in., 2021; Leyva Salas i in., 2017). Istnieje również duże zainteresowanie wprowadzeniem genetycznie zmodyfikowanych odmian odpornych na choroby, strategiami zwalczania patogenów opartymi na RNAi, a także stosowaniem środków kontroli biologicznej drobnoustrojów (ang. microbial biological control agents, MBCA). Jednak fungicydy pozostają obecnie najpotężniejszą bronią przeciwko patogenom upraw (Köhl i in., 2019; Steinberg i Gurr, 2020).

Fungicydy to syntetyczne lub naturalne związki chemiczne, stosowane w celu zapobiegania oraz kontroli infekcji grzybiczych w uprawach roślin, a co za tym idzie, do minimalizacji strat w plonach. Działają poprzez ukierunkowane zaburzenie procesów zachodzących w komórkach patogenów, takich jak zachowanie integralności błon plazmatycznych, podział komórek lub oddychanie mitochondrialne, prowadząc do zahamowania wzrostu i rozmnażania oraz do śmierci komórek (Oliver i Hewitt, 2014).

Syntetyczne fungicydy można podzielić zgodnie ze strategią działania na specyficzne (inhibitory o pojedynczym miejscu docelowym, ang. single-site) oraz fungicydy o kilku celach w komórce grzyba (ang. multi-site). Fungicydy specyficzne są wysoce aktywne względem określonych gatunków grzybów, co skutkuje łagodzeniem choroby przy bardzo niskich dawkach. Natomiast fungicydy typu multi-site mogą być stosowane do zapobiegania lub zwalczania szerszego zakresu patogenów roślin (Yang i in., 2019).

Dominującą grupą fungicydów o pojedynczym miejscu docelowym są azole, hamujące biosyntezę ergosterolu, składnika istotnego dla stabilności błony komórkowej i organelli, prowadzące do osłabienia struktury komórkowej i śmierci grzyba (Oliver i Hewitt, 2014). Z kolei strobiluryny i inhibitory dehydrogenazy bursztynianowej zakłócają

łańcuch przenoszenia elektronów w oddychaniu mitochondrialnym. Wraz z azolami te fungicydy stanowią około 77% rynku (Steinberg i Gurr, 2020).

Chociaż środki grzybobójcze o pojedynczym miejscu docelowym są skuteczne w zwalczaniu patogenów grzybiczych, ich stosowanie wiąże się z dużym ryzykiem rozwoju oporności w ciągu kilku lat użytkowania (Oliver i Hewitt, 2014; Steinberg i Gurr, 2020). W przypadku benzimidazoli zaledwie dwa lata intensywnego stosowania wystarczyły, aby u parcha jabłoni (*Venturia inaequalis*) oraz szarej pleśni (*Botrytis cinerea*) rozwinęła się oporność. Podobnie w przypadku innych inhibitorów o pojedynczym miejscu docelowym, takich jak fenyloamidy i strobiluryny, odporne szczepy pojawiły się już w ciągu dwóch lat od wprowadzenia na rynek (Deising i in., 2008).

Nabywanie oporności na środki grzybobójcze może wynikać z mutacji genów kodujących cel dla środków grzybobójczych (jakościowa oporność na środki grzybobójcze). Mutacje w komórkach grzybów powstają spontanicznie lub pod wpływem czynników zewnętrznych, takich jak światło UV czy substancje chemiczne. Zwiększenie stężenia danego środka grzybobójczego nie wpływa na poprawę skuteczności w zwalczaniu opornych osobników (Deising i in., 2008).

Rozwój oporności na środek grzybobójczy może również wynikać z różnych mechanizmów indukowanych przez subletalny stres grzybobójczy (ilościowa oporność na środki grzybobójcze). Większość tych mechanizmów opiera się na utrzymywaniu wewnątrzkomórkowego stężenia środka grzybobójczego poniżej progu krytycznego poprzez: syntezę białkowych transporterów usuwających środek grzybobójczy z komórki, modyfikację błon plazmatycznych w celu zmniejszenia przepuszczalności względem środka grzybobójczego oraz syntezę enzymów rozkładających środki grzybobójcze. Wśród innych czynników mogących powodować wzrost tolerancji grzybów na fungicydy wymienia się zwiększenie ekspresji białek docelowych dla fungicydów oraz syntezę alternatywnych enzymów, zastępujących funkcję tych, które zostały zablokowane przez fungicyd. Powtarzanie zabiegów grzybobójczych powoduje selekcję tolerancyjnych osobników, a ponadto subletalny stres grzybobójczy stymuluje dalszy rozwój tolerancji względem środka, aż w końcu cała populacja będzie składać się z osobników prawie całkowicie opornych (Deising i in., 2008).

Oporność może być dziedziczona i stać się cechą populacji. Oporne mutanty stają się dominujące w populacji, prowadząc do zmniejszenia skuteczności fungicydów i utrudniając kontrolę chorób grzybowych. Może to skutkować koniecznością stosowania wyższych dawek (w przypadku oporności ilościowej) lub silniejszych fungicydów

(w przypadku oporności jakościowej), zwiększając tym samym koszty i potencjalnie jeszcze bardziej szkodząc środowisku (Leadbeater, 2014; Šudoma i in., 2021).

Fungicydy mogą być szkodliwe dla organizmów niebędących celem zwalczania, takich jak pożyteczne owady, organizmy wodne i mikroorganizmy glebowe, ponieważ wpływają na podstawowe procesy biologiczne, które nie są specyficzne dla grzybów (Komárek i in., 2010; Marinho i in., 2020). Niektóre fungicydy wykazują właściwości długotrwałego utrzymywania się w środowisku poprzez akumulację w glebie, zbiornikach wodnych, tkankach roślinnych, a poprzez łańcuch pokarmowy mogą przedostawać się nawet do tkanek zwierząt. Bioakumulacja tych związków może mieć zatem długoterminowy wpływ na ekosystemy i potencjalnie stanowić zagrożenie dla zdrowia ludzi (Fisher i in., 2021; Oliveira i in., 2015; Šudoma i in., 2021).

Pojawienie się problemów środowiskowych związanych z pozostałościami chemicznymi i selekcją opornych na fungicydy patogenów doprowadziło w końcu do wprowadzenia bardziej restrykcyjnych przepisów regulujących ich stosowanie. Ponadto, koszty i ramy czasowe opracowywania i komercjalizacji nowych fungicydów są na tyle wysokie, że zazwyczaj tylko duże uprawy mogą przyciągnąć niezbędne inwestycje w przemyśle rolno-chemicznym (Davies i in., 2021; Jankowska i in., 2016). W 1995 roku koszty odkrycia i opracowania nowego środka ochrony roślin wynosiły około 152 miliony dolarów, natomiast w 2016 roku koszty te sięgały już 286 milionów dolarów, a średni czas opracowywania nowego środka grzybobójczego wzrósł z 8,3 do 11,3 lat (Villa i in., 2017).

W Polsce stosowanie fungicydów i innych środków ochrony roślin jest regulowane przez prawo krajowe oraz unijne. Głównym aktem prawnym dotyczącym tego problemu jest Ustawa z dnia 18 grudnia 2003 roku o ochronie roślin (Dz.U. z 2004 r. Nr 11, poz. 94, z późn. zm.), która została dostosowana do przepisów unijnych.

Metody ochrony płodów rolnych przed grzybami fitopatogennymi na dalszych etapach łańcucha rolno-spożywczego

Należy zauważyć, że stosowanie skutecznych strategii zwalczania grzybów w trakcie uprawy może przynieść pozytywne efekty na dalszych etapach łańcucha rolno-żywnościowego, ograniczając ryzyko występowania chorób poźniowych (Deshi i in., 2014). Kolonizacja tkanek roślinnych przez patogenny sprawia bowiem, że dotarcie do nich środków odkażających lub innych metod oczyszczania jest praktycznie niemożliwe (Alegbeleye i in., 2022; Różewicz i in., 2021).

Przechowywanie w chłodni jest najczęściej stosowaną praktyką w celu zmniejszenia aktywności metabolicznej patogenów i ograniczenia rozwoju mikroorganizmów. Warunki przechowywania w niskiej temperaturze muszą być jednak dostosowane i zoptymalizowane dla każdego rodzaju produktu (Ziv i Fallik, 2021). Zalecany zakres temperatur przechowywania wynosi od 0 do 5°C, chociaż niektóre produkty są wrażliwe na niskie temperatury i należy je przechowywać w wyższych temperaturach, zwykle około 7°C. Jednakże niektóre grzyby psychrotroficzne powodują psucie się żywności nawet w warunkach niskich temperatur (Alegbeleye i in., 2022). Istotną wadą chłodzenia, jest konieczność zapewnienia stałego zasilania energetycznego, co prowadzi do wysokich kosztów operacyjnych, szczególnie w dużych chłodniach i podczas długotrwałego przechowywania (Karacan i in., 2023). Dodatkowo, przechowywanie w chłodni wymaga odpowiedniej infrastruktury logistycznej, w tym specjalistycznych pojazdów do transportu chłodniczego, co zwiększa koszty związane z dystrybucją produktów spożywczych. Poza tym, niektóre produkty spożywcze pod wpływem niskich temperatur mogą zmieniać swoje właściwości, między innymi teksturę, smak, a nawet skład chemiczny (Han i in., 2021).

Stosowanie różnych technik pakowania chroni żywność przed uszkodzeniami mechanicznymi, które są najczęstszą przyczyną infekcji mikrobiologicznych. Zastosowanie próżni, atmosfery modyfikowanej lub środków wiążących tlen dodatkowo wydłuża okres przydatności do spożycia świeżych produktów (Davies i in., 2021; Leyva Salas i in., 2017). Większość technik pakowania generuje odpady, szczególnie że część z nich nie nadaje się do recyklingu, co zwiększa problem zarządzania odpadami i dodatkowo obciąża środowisko. Materiały opakowaniowe mogą mieć również potencjalnie szkodliwe działanie dla zdrowia konsumentów poprzez reakcje chemiczne z żywnością oraz uwalnianie niebezpiecznych substancji chemicznych i mikroplastiku do produktów spożywczych (Abdullahi, 2014).

W zależności od rodzaju surowca mogą być wykorzystywane różne metody utrwalania żywności obejmujące: obróbkę termiczną, takie jak pasteryzacja oraz sterylizacja w wysokiej temperaturze (ang. ultra-high temperature, UHT); usuwanie wody poprzez suszenie, liofilizację, wędzenie; redukcję aktywności wody w wyniku wysokich stężeń cukru i soli; modyfikację pH przez zanurzenie w occie lub innych kwasach (Leyva Salas i in., 2017). Mimo, że utrwalanie żywności tymi metodami jest skuteczne w inaktywacji grzybów odpowiedzialnych za psucie, wpływają jednak na pogorszenie właściwości odżywczych oraz cech sensorycznych (zmiany wyglądu, smaku, zapachu). Poza tym są bardzo kosztowne ze względu na wysokie zużycie energii (Chiozzi i in., 2022).

Środki grzybobójcze, takie jak fungicydy oraz chemiczne środki dezynfekujące są stosowane w celu zmniejszenia obciążenia grzybami świeżych owoców i warzyw również po zbiorach (Davies i in., 2021; Leyva Salas i in., 2017). Do metod obróbki chemicznej należą chlorowanie w postaci popłuczyn z rozpuszczonymi solami podchlorynowymi, stosowanie dwutlenku chloru (ClO_2), alkoholi, siarczanu miedzi (CuSO_4), kwasów organicznych, nadtlenku wodoru (H_2O_2), ozonu (O_3) i kwasu nadoctowego (PAA). Częstym wyzwaniem związanym z większością zabiegów chemicznych jest zależność ich skuteczności od dawki i czasu obróbki, przy jednoczesnym zachowaniu jakości produktu (Davies i in., 2021).

Pomimo wysokiej skuteczności środków chemicznych w hamowaniu aktywności drobnoustrojów, ich stosowanie w celu sanityzacji świeżych produktów ma pewne ograniczenia, takie jak niska stabilność chemiczna (H_2O_2 , PAA, O_3), obawy związane z bezpieczeństwem podczas użytkowania (ClO_2 , PAA, O_3) oraz osadzanie szkodliwych produktów ubocznych i pozostałości na surowcach (CuSO_4 , ClO_2) (Davies i in., 2021; Ziv i Fallik, 2021). Kolejną poważną wadą metod chemicznych jest powstawanie płynnych ścieków, których oczyszczanie stanowi dodatkowy etap przetwarzania, zwiększający całkowity koszt procesu (Davies i in., 2021; Pankaj i in., 2014).

W celu kontrolowania lub dezaktywacji mikroorganizmów i zarodników w żywności przetworzonej stosowane są chemiczne środki konserwujące w tym benzoesan, propionian, sorbinian, azotany, azotyny i siarczyny (Leyva Salas i in., 2017). Rosnące oczekiwania konsumentów dotyczące zdrowszej i bezpieczniejszej żywności spowodowały wzrost popytu na produkty pozbawione środków chemicznych. Eliminacja konserwantów z żywności może jednak wiązać się ze zmniejszoną stabilnością w trakcie przechowywania i niesie ryzyko jej zepsucia (Alegbeleye i in., 2022; Kora i in., 2005).

Dezynfekcja powierzchni mających kontakt z żywnością

Wykrywanie potencjalnych zanieczyszczeń mikrobiologicznych i podejmowanie skutecznych działań w celu ich ograniczenia w środowisku produkcyjnym jest jednym z najskuteczniejszych sposobów ograniczenia psucia się żywności, a tym samym wydłużenia okresu przydatności do spożycia (Bernardi i in., 2019). Duże znaczenie ma higiena środowiska (zarówno powietrza, jak i powierzchni roboczych), ponieważ ogranicza ryzyko transferu mikroorganizmów patogennych z powierzchni kontaktowych na produkty spożywcze (Alegbeleye i in., 2022; Kora i in., 2005).

Stosowane do przechowywania żywności pojemniki mogą być nośnikami szkodliwych mikroorganizmów, ponieważ często są niewłaściwie zaprojektowane lub wykonane z materiałów trudnych do czyszczenia. Trudno dostępne obszary, w których mogą gromadzić się resztki żywności, wilgoć i brud sprzyjają wzrostowi i namnażaniu się mikroorganizmów, natomiast porowate lub chropowate powierzchnie sprzyjają zatrzymywaniu drobnoustrojów, nawet po dokładnym umyciu (Alegbeleye i in., 2022).

Pojemniki wykonane są z różnego rodzaju materiałów, w tym drewna, tektury falistej i tworzyw sztucznych (Alegbeleye i in., 2022; Giordano i in., 2021). Do zbierania, przechowywania i handlu szeroką gamą produktów, w tym świeżych owoców i warzyw, wykorzystywane są najczęściej drewniane skrzynie, palety i pudła. Drewno jest generalnie uznawane za odpowiednie pod względem higienicznym do stosowania w przemyśle spożywczym. Należy jednak unikać obecności pleśni na drewnianych materiałach opakowaniowych na każdym etapie łańcucha żywnościowego. Rozwój grzybów, obejmujący kiełkowanie zarodników i wzrost strzępek prowadzi bowiem do formacji widocznej grzybni, co sprawia, że drewno staje się nieakceptowalne pod względem estetycznym i higienicznym do bezpośredniego kontaktu z produktami spożywczymi (Giordano i in., 2021).

Grzyby patogene odpowiedzialne za choroby przechowywanych towarów przenoszone są z porażonych produktów i ich resztek na powierzchnię materiałów opakowaniowych. Patogene inokulacje są źródłem tzw. zanieczyszczeń krzyżowych, prowadzących do rozwoju chorób w kontakcie z kolejną partią surowców (Kora i in., 2005; Pankaj i in., 2014). Dlatego zaleca się odpowiednią dezynfekcję skrzynek jako ważny środek zapobiegawczy, który zmniejsza ryzyko występowania skażeń podczas przechowywania surowców (Kora i in., 2005).

Materiały przeznaczone do przechowywania żywności podlegają szczególnym przepisom. Obowiązujące w Europie rozporządzenie nr 1935/2004 (Dz.U. L 338 z 13.11.2004) stanowi, że materiały przeznaczone do bezpiecznego kontaktu z żywnością nie mogą zmieniać właściwości żywności pod względem chemicznym, mikrobiologicznym i sensorycznym.

Kluczowe znaczenie mają dobre praktyki higieniczne oraz system analizy zagrożeń i krytycznych punktów kontroli (ang. hazard analysis and critical control points, HACCP), który skupiają się na identyfikowaniu, ocenie i kontrolowaniu zagrożeń związanych z bezpieczeństwem żywności (Leyva Salas i in., 2017).

W zakładach przetwórstwa spożywczego stosowane są odpowiednie procedury czyszczenia oraz dezynfekcji w celu kontrolowania skażenia mikrobiologicznego magazynów, obszarów przetwarzania i pakowania oraz użytkowanego sprzętu (Kora i in., 2005). Czyszczenie jest pierwszym etapem polegającym na fizycznym lub mechanicznym usuwaniu resztek i brudu z powierzchni, w celu wstępnej redukcji obciążenia mikrobiologicznego. Dodatkowo, zastosowanie środków chemicznych powoduje zmniejszenie siły wiązania z powierzchnią i ułatwia ich usunięcie. W kolejnym etapie użycie odpowiednich metod dezynfekujących zmniejsza żywotność mikroorganizmów pozostałych po etapie czyszczenia (Dallagi i in., 2023).

W przemyśle spożywczym powszechnie stosowane są metody dezynfekcji oparte na działaniu wysokiej temperatury, środków chemicznych lub promieniowania.

Sterylizacja termiczna

Metody termiczne opierają się na biobójczym działaniu wysokiej temperatury wody, pary wodnej lub powietrza. Metody te wykazują wysoką skuteczność wobec różnych zanieczyszczeń mikrobiologicznych, wymagają krótkiego czasu ekspozycji i nie pozostawiają zanieczyszczeń chemicznych. Wadami metod termicznych są natomiast wysokie zużycie energii i wody oraz konieczność stosowania materiałów odpornych na wysoką temperaturę oraz korozję (Katsigiannis i in., 2022).

Chemiczne metody sterylizacji

Aby zmniejszyć zużycie energii i wody, preferowane są nietermiczne metody dezynfekcji i sterylizacji, zazwyczaj z użyciem środków chemicznych, takich jak kwasy i zasady organiczne (np. kwas nadoctowy), alkohole, tlenek etylenu, czwartorzędowe związki amoniowe, związki chloru, ozon i nadtlenek wodoru (Jildeh i in., 2021; Katsigiannis i in., 2022).

Podchloryn sodu (NaClO) jest powszechnie stosowany jako tani środek o szerokim spektrum działania w przemyśle spożywczym do dezynfekcji urządzeń i przyborów sanitarnych oraz obiektów. Związek ten musi być jednak przechowywany w ciemności i w umiarkowanej temperaturze, aby uniknąć utraty właściwości (Bernardi i in., 2019).

Ozon (O_3) działa jako bardzo silny środek utleniający, który przenika przez błonę komórkową, dzięki czemu może atakować różne struktury komórkowe, prowadząc do śmierci komórki (Hojnik i in., 2019). W wyniku dysocjacji ozonu powstaje cząsteczka tlenu i rodnik tlenowy, charakteryzujące się dużą reaktywnością i potencjałem

utleniającym. Ozon jest jednak wysoce niestabilny i nie można go przechowywać ani transportować (Jildeh i in., 2021).

Roztwory nadtlenu wodoru (H_2O_2) o różnym stężeniu są szeroko stosowane do sterylizacji powierzchni w sektorze spożywczym. Mechanizm działania opiera się na uwalnianiu wolnych rodników tlenowych (rodników hydroksylowych), które uszkadzają struktury komórkowe, prowadząc do inaktywacji mikroorganizmów. Zaletami tego środka jest łatwość stosowania oraz nietoksyczne, bezwonne i przyjazne dla środowiska produkty końcowe w postaci wody i tlenu (Jildeh i in., 2021).

Niektóre chemiczne środki czyszczące i odkażające charakteryzują się toksycznością, z tego względu konieczne jest zachowanie szczególnej ostrożności podczas ich stosowania. Poza tym istnieje ryzyko przeniesienia szkodliwych pozostałości na żywność w wyniku kontaktu z dezynfekowaną powierzchnią. Innym aspektem są uszkodzenia, jakie dany środek odkażający może spowodować na traktowanej powierzchni, ponieważ sprzyjają one gromadzeniu się materii organicznej i formowaniu biofilmu mikrobiologicznego (Katsigiannis i in., 2022). Ponadto stosowanie środków chemicznych generuje ogromne ilości ścieków, co stanowi dodatkowe obciążenie ekonomiczne oraz środowiskowe (Hojnik i in., 2019).

Techniki radiacyjne

Oprócz powyższych, znane są również techniki radiacyjne, do których zaliczamy napromieniowanie UV i światłem pulsacyjnym, napromieniowanie gamma i X (Hojnik i in., 2019). Działanie tych metod opiera się na pośrednim oddziaływaniu elektronów (e^-), rodników hydroksylowych ($OH\cdot$), rodników hydroksyperoksyłowych ($HO_2\cdot$), nadtlenu wodoru (H_2O_2) i innych reaktywnych form powstających w wyniku radiolizy wody komórkowej, prowadzących do uszkodzenia struktur komórkowych, takich jak pęknięcie nici DNA, rozerwanie błony komórkowej czy mechaniczne uszkodzenia ścian komórkowych, co skutkuje śmiercią komórek grzybów (Hojnik i in., 2019). Im promienie mają krótsze fale, tym są bardziej przenikliwe, gdyż mają większą energię. Promienie UV są zatrzymywane przez cienką warstwę szkła, natomiast promienie gamma i X przechodzą przez szkło i inne materiały opakowaniowe (Szczawińska i Ignatowicz, 1998).

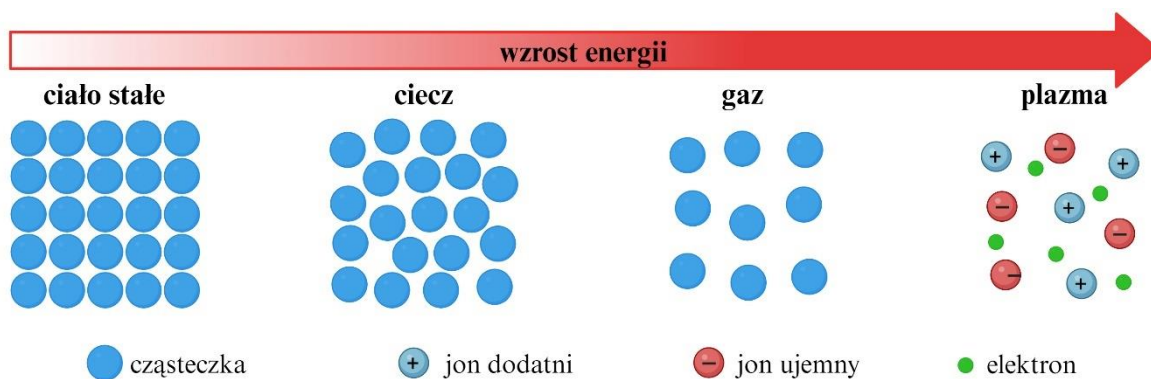
Nowoczesnym technologiom stawiane są coraz wyższe kryteria, takie jak poprawa wydajności, wydłużenie okresu przydatności żywności do spożycia, zachowanie składników odżywczych, cech organoleptycznych oraz świeżości produktów, a także poprawa jakości i bezpieczeństwa żywności. Coraz więcej uwagi poświęca się zatem

nowym technologiom nietermicznym, w tym napromieniowaniu jonizującym i niejonizującym, przetwarzaniu wysokociśnieniowemu (HPP), pulsacyjnemu polu elektrycznemu (PEF), pulsacyjnemu świetle (PL), zimnej plazmie (CP) lub myciu wspomaganym ultradźwiękami (US) (Mirza Alizadeh i in., 2021; Misra i in., 2014).

1.8 Zimna plazma atmosferyczna

Plazma jest powszechnie określana jako czwarty stan materii obok ciała stałego, cieczy i gazu. Jako granicę oddzielającą fazę gazową od plazmy uznaje się moment zmiany właściwości fizycznych gazu, w którym wskutek jonizacji pojawia się przewodnictwo elektryczne wraz z towarzyszącą temu utratą zdolności izolacyjnych. Zjawisko to jest odwracalne (Skryplonek, 2016; Stryczewska, 2009).

Stopień jonizacji i skład plazmy są bardzo zróżnicowane. Plazma wysokotemperaturowa składa się wyłącznie z jonów i swobodnych elektronów powstających w wyniku całkowitej jonizacji gazu (rysunek 10). Natomiast plazma używana do sterylizacji jest częściowo zjonizowana i stanowi kwasi-neutralną mieszaninę jonów dodatnich i elektronów oraz niezjonizowanych cząsteczek, w której wypadkowy ładunek jest równy zero. Jonizacja pewnych związków chemicznych w zakresie niskich temperatur może dodatkowo prowadzić do wytworzenia jonów o ładunku ujemnym (Bourke i in., 2017; Moisan i in., 2001; Stryczewska, 2009).



Rysunek 10. Opracowanie własne na podstawie (Hojnik i in., 2019). Utworzono za pomocą BioRender.com

Plazma nietermiczna zwana jest również niskotemperaturową lub zimną plazmą, w odniesieniu do temperatury gazu, która jest dokładnie taka sama lub zbliżona do temperatury pokojowej (Ehlbeck i in., 2011). Plazma nietermiczna wytwarzana jest przez poddanie gazu lub mieszaniny gazów działaniu pola elektrycznego o stałej albo zmiennej amplitudzie (Moisan i in., 2001). Dostarczenie energii do gazu prowadzi do oderwania elektronów od atomów lub cząsteczek, w wyniku czego powstają jony dodatnie i ujemne oraz swobodne elektrony. Te ostatnie rozbijają cząsteczki i pobudzają lub jonizują atomy

oraz cząsteczki gazu wyładowczego, tworząc mieszaninę cząstek naładowanych i niezjonizowanych. Większość sprzężonej energii przekazywana jest do elektronów, w rezultacie jony i atomy gazu obojętnego zyskują tylko niewielką ilość energii i pozostają zimne (Ehlbeck i in., 2011; Moisan i in., 2001; Mravlje i in., 2021).

Istnieje kilka metod wytwarzania zimnej plazmy atmosferycznej, do których zaliczamy wyładowania z barierą dielektryczną (ang. dielectric barrier discharge, DBD), wyładowania bariery powierzchniowej (ang. surface barrier discharge, SBD), wyładowania łuku ślizgowego (ang. gliding arc, GA), strumień plazmy (ang. plasma jet, PJ), wyładowania koronowe (ang. corona discharge, CD), wyładowania częstotliwości radiowej (ang. radio frequency, RF) i wyładowania mikrofalowe (ang. microwave, MW). Plazmę można wytworzyć w dowolnym gazie obojętnym. Powszechnie stosowanymi gazami roboczymi są powietrze, tlen, azot, hel, argon lub ich mieszaniny (Ehlbeck i in., 2011; Hojnik i in., 2019; Moisan i in., 2001).

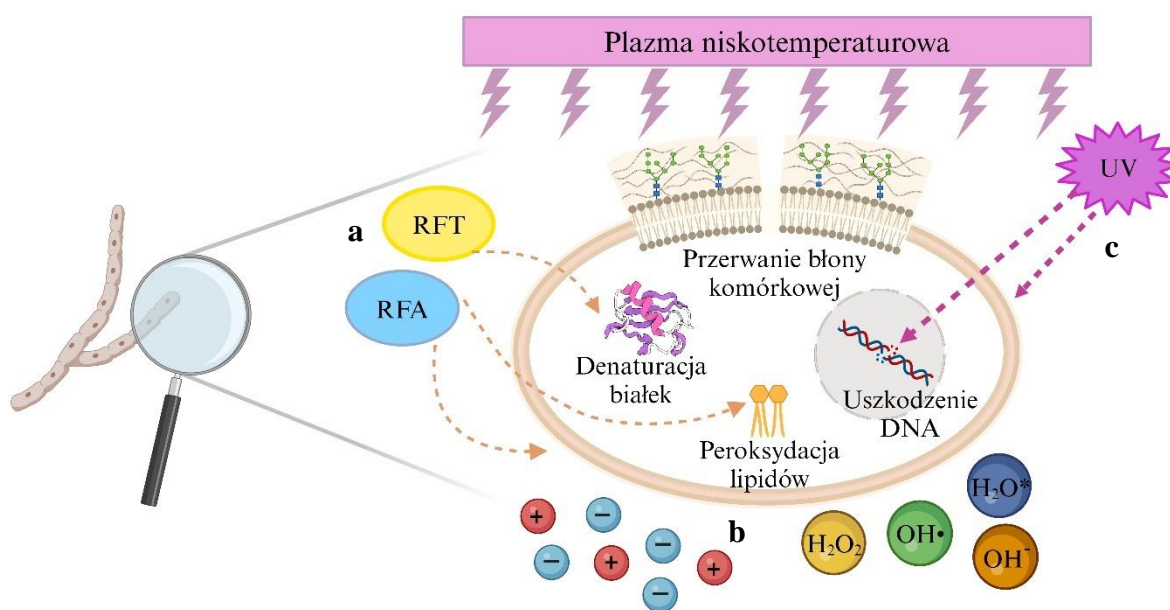
Gaz (lub gazy) zasilający nie ma działania biobójczego, dopóki nie zostanie aktywowany przez wyładowanie elektryczne (Moisan i in., 2001). W wyniku złożonych procesów fizycznych i chemicznych w plazmie niskotemperaturowej dochodzi do generacji szerokiego zakresu czynników biologicznie aktywnych, w tym elektronów oraz jonów dodatnich i ujemnych, wolnych rodników, wzbudzonych atomów i cząsteczek, a także promieniowania ultrafioletowego i zmiennego pola elektrycznego (Bourke i in., 2017; Ehlbeck i in., 2011). Reaktywne formy mają bardzo krótką żywotność i nie są już obecne w ciągu kilku nano- do milisekund po wyłączeniu pola elektrycznego (Moisan i in., 2001; Siddique i in., 2018). Reaktywne formy wytwarzane przez powszechnie stosowane źródła plazmy obejmują reaktywne formy tlenu (RFT, ang. reactive oxygen species, ROS), takie jak tlen atomowy (O), tlen singletowy ($^1\text{O}_2$), anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-) i ozon (O_3), a także reaktywne formy azotu (RFA, ang. reactive nitrogen species, RNS), takie jak azot atomowy (N), wzbudzony azot (N_2), tlenek azotu (II) (NO) i pięciotlenek azotu (N_2O_5). Jeśli w środowisku obecna jest woda, generowane są dodatkowo wzbudzone cząsteczki wody (H_2O^*), jon wodorotlenkowy (OH^-), rodnik hydroksylowy ($\text{OH}\bullet$) lub nadtlenek wodoru (H_2O_2) (Bourke i in., 2017; Gorbanev i in., 2018).

Dokładne mechanizmy inaktywacji mikroorganizmów za pomocą zimnej plazmy są nadal dyskutowane (Pankaj i Keener, 2017). Liczne badania dostarczają natomiast dowodów na biobójcze właściwości poszczególnych składników plazmy (Ehlbeck i in., 2011; Hoppanová i Kryštofová, 2022; Niedźwiedz i in., 2019; Scarlett i in., 2009; Sreedevi

i Suresh, 2023). Uproszczony schemat działania zimnej plazmy na komórki grzybów strzępkowych przedstawiono na rysunku nr 11.

Reaktywne formy tlenu oraz azotu indukują stres oksydacyjny, prowadząc do uszkodzenia błon komórkowych mikroorganizmów, destabilizacji struktury DNA i enzymów, a także inaktywacji białek kluczowych dla przetrwania komórek, co prowadzi do ich zniszczenia lub śmierci (rysunek 11 a) (Ehlbeck i in., 2011; Hoppanová i Kryštofová, 2022).

Jednocześnie, powstające w plazmie jony, elektrony i rodniki gromadzą się przy powierzchni komórek, wytwarzając lokalne naprężenia elektrostatyczne (rysunek 11 b). Kiedy naprężenia elektrostatyczne przekroczą wytrzymałość błony komórkowej na rozciąganie, dochodzi do jej perforacji i wycieku składników cytoplazmatycznych z komórek, umożliwiając także wejście toksyn do wnętrza komórek (Niedźwiedz i in., 2019; Scarlett i in., 2009; Sreedevi i Suresh, 2023).



Rysunek 11. Mechanizm działania składników plazmy niskotemperaturowej na komórki grzybów strzępkowych. **a** - stres oksydacyjny wywołany przez reaktywne formy tlenu (RFT) i azotu (RFA), **b** - elektroporacja błony wskutek nagromadzenia jonów, elektronów i rodników, **c** - uszkodzenia wywołanie promieniowaniem UV. Opracowanie własne na podstawie (Ehlbeck i in., 2011; Hoppanová i Kryštofová, 2022). Utworzono za pomocą BioRender.com

Dodatkowo, fotony UV emitowane przez plazmę niskotemperaturową posiadają właściwości fotokatalityczne, które wpływają na uszkodzenie struktur komórkowych i materiału genetycznego (rysunek 11 c). Niemniej jednak fotony UV pochodzące z plazmy odgrywają jedynie niewielką rolę w procesie inaktywacji komórek, ze względu na ograniczoną penetrację do wnętrza komórki. Ponadto, wiele mikroorganizmów zawiera

w ścianie komórkowej pigmenty ochronne, takie jak melaniny, które w pewnym stopniu mogą chronić przed uszkodzeniami wywołanymi promieniowaniem UV. Synergistyczne działanie wszystkich składników plazmy prowadzi do wzmocnienia ich właściwości, zapewniając efekt biobójczy (Hoppanová i Kryštofová, 2022).

Na skuteczność zimnej plazmy wpływają konstrukcja urządzenia i parametry pracy systemu, takie jak skład gazu, natężenie przepływu gazu, wilgotność i temperatura otoczenia, napięcie i częstotliwość oraz odległość pomiędzy celem a emitery plazmy, a także cechy materiału poddawanego obróbce, między innymi rodzaj produktu, charakterystyka powierzchni oraz rodzaj, stężenie i stan fizjologiczny mikroorganizmów (Bourke i in., 2017; Ehlbeck i in., 2011; Siddique i in., 2018).

Różne mikroorganizmy wykazują odmienną wrażliwość na działanie plazmy. Przykładami cech drobnoustrojów, które wpływają na wrażliwość względem zimnej plazmy są grubość i skład chemiczny ściany komórkowej, struktura błony komórkowej, ochrona DNA przez struktury rdzeniowe, produkcja form przetrwalnikowych oraz zdolność do oddychania tlenowego lub beztlenowego (Ehlbeck i in., 2011; Klämpfl i in., 2012; Ma i in., 2008).

Skuteczność działania plazmy niskotemperaturowej na materiał biologiczny zależna jest od dawki, przy czym "dawka" nie jest pojęciem precyzyjnie zdefiniowanym i może być wyrażona w jednostkach mocy plazmy, czasu ekspozycji materiału biologicznego lub odległości materiału względem źródła plazmy (Hoppanová i Kryštofová, 2022).

Zastosowania zimnej plazmy atmosferycznej

Technologia zimnej plazmy znalazła szerokie zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu produkcyjnego, medycynie oraz ochronie środowiska (Chen i in., 2022; Gorbanev i in., 2018; Jarrige i Vervisch, 2006; Kumar i in., 2021; Pankaj i Keener, 2017; Skryplonek, 2016). Istotnymi obszarami zastosowań zimnej plazmy są rolnictwo i produkcja żywności, obejmujące zarówno aspekty ochrony roślin (poprawa kiełkowania nasion, dekontaminacja powierzchni roślin) jak i poprawy jakości żywności (Bourke i in., 2018; Skryplonek, 2016).

Uważa się, że atmosferyczna plazma niskotemperaturowa może przezwyciężyć wiele ograniczeń tradycyjnych technik biobójczych i uważana jest za jedną z najbardziej obiecujących metod sterylizacji (Chang i Chen, 2016; Sakudo i in., 2019). Metoda ta oferuje wyraźne korzyści dla środowiska i zrównoważonej kontroli chorób roślin, z których najważniejsze to: wysoka skuteczność inaktywacji patogenów w warunkach

niskich temperatur; wytwarzanie substancji czynnych wyłącznie w czasie obróbki; „zasobooszczędność”, wynikająca z braku zużycia wody oraz innych rozpuszczalników, z jednoczesnym brakiem pozostałości lub szkodliwych produktów ubocznych oraz ścieków po obróbce; możliwość wykorzystania powietrza, jako gazu roboczego (Siddique i in., 2018).

Badania wykazały, że plazma może skutecznie zmniejszać liczbę mikroorganizmów patogennych, takich jak bakterie, grzyby i wirusy, a także rozkładać toksyny, alergeny oraz pestycydy w produktach spożywczych (Gorbanev i in., 2018; Hoppanová i Kryštofová, 2022; Sakudo i in., 2019).

Większość przeprowadzonych badań skupia się jednak na wykorzystaniu plazmy do zwalczania bakteryjnych patogenów związanych z bezpieczeństwem żywności, takich jak *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* oraz *Salmonella enterica*, ograniczając się do skali laboratoryjnej (Fernández i in., 2012; Kim i in., 2021; Niemira i in., 2014).

Bakterie w formie wegetatywnej (np. *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*) są bardziej wrażliwe na plazmę niż formy przetrwalne bakterii (np. *Bacillus subtilis*, *Geobacillus stearothermophilus*) (Klämpfl i in., 2012). Z kolei biofilmy (np. *Salmonella*) wykazują umiarkowaną wrażliwość na plazmę (Niemira i in., 2014).

Istnieją również doniesienia, które wskazują na możliwość zastosowania zimnej plazmy do zwalczania patogenów grzybowych, w tym drożdży i wielokomórkowych pleśni, które charakteryzują się mniejszą wrażliwością względem tej metody w porównaniu do bakterii (Niedźwiedź i in., 2019).

Skuteczną inaktywację zarodników przez zimną plazmę wykazano dla kilku rodzajów fitopatogennych grzybów, takich jak *Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Fusarium* i *Penicillium* (Ambrico i in., 2020; Hojnik i in., 2019; Lu i in., 2014; Wang i in., 2022; Ye i in., 2012). W badaniach tych zastosowano różne źródła plazmy oraz kombinacje gazów w celu wyeliminowania zarodników grzybów zawieszonych w płynnej pożywce hodowlanej lub wodzie oraz z powierzchni podłoża stałego w warunkach laboratoryjnych. Eliminacja zarodników grzybów za pośrednictwem zimnej plazmy może przyczynić się do ograniczenia rozprzestrzeniania się chorób roślin po zbiorach. Oprócz zarodników, celem działania plazmy były także strzępki grzybów (Avramidis i in., 2010; Molina-Hernandez i in., 2022).

Tabela 1. Skuteczność inaktywacji mikroorganizmów na powierzchni różnych materiałów za pomocą zimnej plazmy.

Typ urządzenia i parametry pracy	Gaz zasilający	Materiał	Mikroorganizm	Redukcja (log jtk/czas traktowania)	Źródło
Bakterie					
DBD Napięcie 10 kV _{pp} Częstotliwość 1 kHz Gęstość mocy wyładowania 35 mW/cm ² Dystans 8 mm	Powietrze	Podłoże stałe Müllera-Hintona	<i>Bacillus cereus</i>	5,4 log jtk. / 30 s	(Klämpfl i in., 2012)
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	5,4 log jtk. / 30 s	
			<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	5,2 log jtk. / 30 s	
		Stal nierdzewna, PTFE, PVC	<i>Escherichia coli</i> K12	4,8 log jtk. / 30 s	
			<i>E. coli</i> ATCC 9637	4,4 log jtk. / 30 s	
			Spory <i>B. subtilis</i> DSM 13019	3,7 log jtk. / 1 min	
			Spory <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372	2,6 log jtk. / 1 min	
Spory <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953	1,0 log jtk. / 1 min				
MW Częstotliwość 2,45 GHz Moc 1,1 kW Dystans 25 cm	Powietrze	Szkło	<i>S. aureus</i> DSM 799	6,0 log jtk. / 15 min	(Schnabel i in., 2014)
			<i>E. coli</i> K12 DSM 11250	6,0 log jtk. / 15 min	
			Spory <i>B. atrophaeus</i> Nakamura 1989 DSM 675	3,3 log jtk. / 15 min	
DBD Napięcie 20 kV Częstotliwość 60 kHz Dystans 3-5 mm	Powietrze	Szkło	<i>S. aureus</i> ATCC6538	6,0 log jtk. / 8 s	(Ma i in., 2008)
			<i>E. coli</i> ATCC8099	6,0 log jtk. / 7 s	
GA 23-48 kHz, Moc 522 W Dystans 5-7,5 cm	Powietrze	Szkło	biofilm <i>Salmonella</i> Anatum F4317,	1,6 log jtk. / 5 s	(Niemira i in., 2014)
			<i>S. Stanley</i> H0558,	1,82 log jtk. / 10 s	
			<i>S. Enteritidis</i> PT30	2,1 log jtk. / 15 s	
DBD Napięcie 1,1 kV Częstotliwość 43 kHz Dystans 3 mm	Azot	Drewno cyprysowe Hinoki	<i>E. coli</i> ATCC 11229, KCCM 11234, KCCM 12181	1,6 log jtk. / 60 min	(Kim i in., 2021)
			<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802, ATCC 27969, NCCP 33844	1,3 log jtk. / 60 min	

Grzyby					
DBD Napięcie 230 V Częstotliwość 50 Hz Dystans 20 mm	Powietrze	Podłoże stałe Sabourauda	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> DBM 4282	5,0 log jtk. / 40 min	(Julák i in., 2018)
			Zarodniki <i>Alternaria</i> sp. DBM 4002	3,0 log jtk. / 40 min	
			Zarodniki <i>A. oryzae</i> DBM 4002	3,0 log jtk. / 40 min	
DBD Napięcie 10 kV _{pp} Częstotliwość 1 kHz Gęstość mocy wyładowania 35 mW/cm ² Dystans 8 mm	Powietrze	Podłoże stałe Müllera-Hintona	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	4,0 log jtk. / 30 s	(Klämpfl i in., 2012)
SBD Napięcie 15 kV Częstotliwość 40 kHz Gęstość mocy wyładowania 0,79 W/cm ² Dystans 5 mm	Powietrze	Szkło	Zarodniki <i>A. flavus</i> EXF-532	> 5,0 log jtk. / 8 min	(Hojnik i in., 2019)
SBD Napięcie 10 kV Częstotliwość 15 kHz Moc 400 W	Powietrze	Membrana celofanowa	<i>A. flavus</i> CCM F-171	7,3 log jtk. / 30 s	(Šimončicová i in., 2018)
DBD Prędkość liniowa 100 mm/s Częstotliwość 68 kHz Moc 90 W (Ar) Moc 500 W (powietrze/N ₂)	Argon	Drewno dębu amerykańskiego	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> CECT 11045	2,89 log CFU / g drewna	(González- Arenzana i in., 2021)
	Powietrze			5,46 log CFU / g drewna	
	Azot			5,46 log CFU / g drewna	

Z oceny dostępnej literatury jasno wynika (tabela 1), że zimna plazma ma ogromny potencjał jako metoda dekontaminacji, którą można z powodzeniem wykorzystać na różnych etapach łańcucha produkcji żywności w celu ograniczenia rozprzestrzeniania chorób roślin, a tym samym zwiększenia bezpieczeństwa żywnościowego. Badania pokazują, że odpowiednie ustawienie parametrów urządzenia, takich jak napięcie, częstotliwość i dystans, a także wybór gazu zasilającego, mają kluczowe znaczenie dla efektywności eliminacji mikroorganizmów z różnych powierzchni.

Pomimo zachęcających wyników dotyczących inaktywacji grzybów fitopatogennych, nadal istnieje niewiele badań dotyczących wpływu zimnej plazmy na patogeniczność grzybów w uprawach (Wang i in., 2022). Istnieją bowiem doniesienia, iż stres środowiskowy może wpływać na zwiększenie tolerancji lub nabycie oporności grzybów strzępkowych wobec danego czynnika stresowego (Branco i in., 2022). Strategie adaptacyjne grzybów fitopatogennych prowadzą do zmian w morfologii i fizjologii, umożliwiających im utrzymanie żywotności w niesprzyjających warunkach (Singh i in., 2021). Zrozumienie tych mechanizmów jest kluczowe dla projektowania skutecznych procedur plazmy nietermicznej, zwalczających mikroorganizmy patogenne.

2. Cel i zakres pracy

Celem niniejszej pracy była ocena skuteczności plazmy niskotemperaturowej generowanej za pomocą reaktora z wyładowaniami z barierą dielektryczną pod ciśnieniem atmosferycznym z powietrzem jako gazem roboczym w inaktywacji patogenów grzybowych na powierzchni materiałów powszechnie stosowanych w przechowywaniu, na przykładzie tektury i drewna. Jako przedstawiciele patogenów pozbiorecznych użyto szczepów *Fusarium oxysporum* DSM 12646, *Fusarium culmorum* DSM 1094, *Alternaria alternata* DSM 62010, *Botrytis cinerea* DSM 877 oraz dwóch szczepów wyizolowanych ze środowiska, których przynależność systematyczna została określona za pomocą metod molekularnych jako *Fusarium tricinctum* Ft11S-23 oraz *Aalternaria alternata* Aa10S-23.

Cel ten realizowano poprzez przeprowadzenie badań nad mechanizmem działania plazmy niskotemperaturowej na komórki grzybów fitopatogennych, które obejmowały:

- ocenę integralności błony komórkowej grzybów fitopatogennych,
- analizę kinetyki inaktywacji grzybów fitopatogennych na powierzchni tektury i drewna,
- ocenę skuteczności inaktywacji mikroorganizmów zasiedlających powierzchnię drewnianych skrzyń wykorzystywanych do przechowywania ziemniaków.

Skuteczność plazmy niskotemperaturowej oceniono także w kontekście zmian cech morfologicznych i fizjologicznych po wielokrotnej ekspozycji badając:

- szybkość wzrostu kolonii i produkcję biomasy grzybni,
- zmiany w strukturach morfologicznych,
- zmiany wrażliwości komórek grzybów wobec wybranych środków przeciwgrzybiczych oraz nadtlenu wodoru.

Ważną część pracy stanowi ocena wpływu wielokrotnego traktowania komórek grzybów plazmą niskotemperaturową na zmiany patogeniczności w badaniach *in vitro* i *in vivo*, które obejmowały:

- pomiar aktywności enzymów rozkładających ścianę komórkową oraz enzymów proteolitycznych i lipolitycznych,
- ocenę toksyczności filtratów pochodzących względem nasion ogórka,
- ocenę zdolności grzybów fitopatogennych do wzrostu w żywej tkance roślinnej,
- ocenę zdolności grzybów fitopatogennych do infekcji nasion,
- ocenę wpływu grzybów fitopatogennych na wzrost i rozwój roślin uprawianych w inokulowanej glebie.

3. Materiały i metody

3.1 Podłoża hodowlane oraz bufory

Chemikalia i odczynniki użyte w badaniach pochodziły od Sigma-Aldrich (Poznań, Polska), chyba że wskazano inaczej. Skład pożywek stałych i płynnych oraz buforów użytych w badaniach podano w tabeli nr 2.

Pożywki hodowlane zakupione w postaci gotowych proszków przygotowano zgodnie z instrukcją podaną przez producenta i uzupełniono agar-agar do końcowego stężenia 2% (w/v). W przypadku podłoży sporządzanych samodzielnie z pojedynczych składników postępowano zgodnie z procedurami podanymi przez autorów źródła literaturowego. Odpowiednie naważki gotowych proszków lub składników wymieszano z wodą dejonizowaną w odpowiednich proporcjach i skorygowano odczyn w razie potrzeby za pomocą 0,5 M HCl lub 0,1 M NaOH. Podłoża sterylizowano w autoklawie w temperaturze 121°C przez 15 min, po czym pozostawiano do wystygnięcia w temperaturze pokojowej. Przygotowane podłoża przechowywano do dalszych badań zgodnie z zaleceniami producenta lub (jeśli nie podano) w temperaturze 4°C nie dłużej niż 28 dni. Przed użyciem podłoża inkubowano przez 24 h w temperaturze 25°C w celu kontroli sterylności.

Tabela 2. Skład podłoży mikrobiologicznych oraz buforów wykorzystywanych w badaniach.

Nazwa (oznaczenie)	Skład [g l ⁻¹]	Producent/źródło
Sól fizjologiczna buforowana fosforanami (0,1 M) (PBS)	NaCl	8,00
	KCl	0,20
	Na ₂ HPO ₄	1,44
	KH ₂ PO ₄	0,24
	pH 7,4±0,1	
Bufor octanowy (0,1 M)	octan sodu (0,07 M)	5,77
	kwas octowy (0,03 M)	1,78
	pH 5,0±0,1	(Perincherry i in., 2021)
Bulion do oznaczania drożdży i pleśni (BDP)	NH ₄ NO ₃	1,00
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00
	K ₂ HPO ₄	4,00
	KH ₂ PO ₄	2,00
	NaCl	1,00
	ekstrakt drożdżowy	1,00
	glukoza	10,0
pH 5,0±0,1		
Podłoże Bilay'a i Joffe'a (BBJ)	KH ₂ PO ₄	1,00
	KNO ₃	1,00
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,50
	KCl	0,50
	sacharoza	0,20
	glukoza	0,20
pH 5,5±0,1		
Podłoże do oznaczania aktywności proteolitycznej (BAP)	NH ₄ NO ₃	1,00
	K ₂ HPO ₄	1,00
	KCl	0,50
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,50
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01
	pepton sojowy	0,50
	ekstrakt drożdżowy	0,50
	sacharoza	30,0
pH 7,0±0,1		
Podłoże do oznaczania aktywności lipolitycznej (BAL)	NH ₄ Cl	5,00
	Na ₂ HPO ₄	1,00
	CaCl ₂	0,40
	MgCl ₂	0,10
	ekstrakt drożdżowy	3,60
	glukoza	1,00
	oliwa	28,5
pH 7,0±0,1		

Ciąg dalszy tabeli 2.

Nazwa (oznaczenie)	Skład [g l ⁻¹]	Producent/źródło
Agar wodny	agar-agar	20,0 (Ambrico i in., 2020)
Podłoże syntetyczne do oznaczania drożdży i pleśni (DPA)	NH ₄ NO ₃	1,00
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00
	K ₂ HPO ₄	4,00
	KH ₂ PO ₄	2,00
	NaCl	1,00
	ekstrakt drożdżowy	1,00
	glukoza	10,0
	agar-agar	15,0
Müller-Hinton Agar (MHA)	pH 3,5±0,1	
	ekstrakt wołowy	2,00
	hydrolizat kazeiny	17,5
	skrobia	1,50
	agar-agar	17,0
Sabouraud Dextrose Agar chloramfenikolem (SDACh)	pH 7,3±0,1	Pol-Aura Chemical Reagents, Zabrze, Polska
	hydrolizat kazeiny	5,00
	hydrolizat tkanki zwierzęcej	5,00
	glukoza	40,0
	chloramfenikol	0,05
	agar-agar	15,0
Potato Dextrose Agar (PDA)	pH 5,6±0,2	GRASO Biotech, Owidz, Polska
	glukoza	20,0
	ekstrakt ziemniaczany	4,00
	agar-agar	15,0
	pH 6,9±0,2	BTL Sp. z o. o., Łódź, Polska

3.2 Szczepy grzybów i warunki hodowli

Szczepy grzybów pozyskano z niemieckiej kolekcji mikroorganizmów Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures i przechowywano w postaci zliofilizowanej w temperaturze -70°C (*Fusarium culmorum* DSM 1094, *Botrytis cinerea* DSM 877, *Alternaria alternata* DSM 62010) lub jako aktywna hodowla (*Fusarium oxysporum* DSM 12646) w temperaturze 4°C. Do fiołki z szczepami liofilizowanymi wprowadzono kilka kropel sterylnej wody dejonizowanej. Zawartość fiołki przeniesiono do próbówki z 5 ml sterylnej wody dejonizowanej w celu rehydratacji szczepów. Hodowle wyjściowe otrzymano poprzez zaszczepienie 100 ml płynnego podłoża BDP, a następnie inkubację na wytrząsarce przy 120 obr min⁻¹ w temperaturze 25°C przez 7 dni. Z hodowli wyjściowych pobrano po 100 µl i wykonano

posiew dywanowy na podłoże stałe DPA za pomocą głaszczki. Płytki pozostawiono do inkubacji w temperaturze 25°C przez 7 dni, a następnie przechowywano w temperaturze 4°C, nie dłużej niż 28 dni. Szczepy regularnie przesiewano na podłoże stałe.

3.3 Materiały opakowaniowe przeznaczone do kontaktu z żywnością

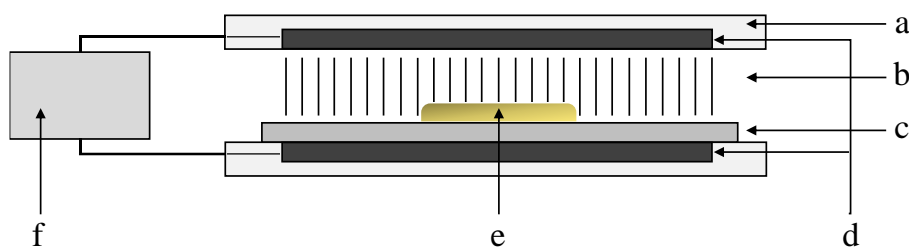
Jako przykład materiałów powszechnie wykorzystywanych do przechowywania żywności użyto drewna sosnowego oraz tektury falistej. Drewno pozyskano z lokalnego przedsiębiorstwa przetwórstwa drzewnego (Tartaczniactwo W. Koczek, Polska), z kolei tekturę dostarczył producent opakowań (Makart-Box, Polska). Krążki drewniane oraz tekturowe o średnicy 8 mm i grubości 1 mm sterylizowano w autoklawie w temperaturze 121°C przez 15 min w zamkniętym naczyniu.

Drewno ze skrzyń wykorzystywanych do przechowywania ziemniaków pozyskano z magazynu w okolicach Środy Wielkopolskiej. Próbki drewna pobrano do sterylnych woreczków i przetransportowano do laboratorium, gdzie zostały pocięte na kawałki o rozmiarach 10×10 mm. Kawałki drewnianych skrzyń przechowywano w sterylnych woreczkach w temperaturze 4°C do kolejnych badań.

3.4 Reaktor plazmowy z wyładowaniami dielektrycznymi barierowymi

Dielektryczne wyładowania barierowe generowane są w szczelinie między dwiema elektrodami wysokonapięciowymi poprzez przyłożenie prądu o wysokim napięciu, podczas gdy co najmniej jeden dielektryk ogranicza prąd wyładowania, zapobiega przejściu wyładowania plazmowego w łuk elektryczny i utrzymuje wyładowanie w stanie rozproszenia (Ehlbeck i in., 2011). Obróbkę plazmową badanych próbek prowadzono przy użyciu skonstruowanego przez dr inż. Tomasza Czapkę (Politechnika Wrocławska) płasko-równoległego reaktora plazmowego z wyładowaniami w barierze dielektrycznej, pracującego pod ciśnieniem atmosferycznym z powietrzem jako gazem roboczym. Układ wyładowczy składał się z dwóch elektrod aluminiowych, oddzielonych od siebie warstwą dielektryka w postaci płyty z tlenku glinu (Al_2O_3) o grubości 1 mm. Warstwę dielektryczną umieszczono na uziemionej elektrodzie. Pole powierzchni każdej elektrody wynosiło w przybliżeniu 120 cm². Reaktor plazmowy zasilany był z wysokonapięciowego generatora impulsów o modulowanej częstotliwości (Dora PS, Wrocław, Polska). Amplituda impulsu, częstotliwość i moc wyładowania wynosiły odpowiednio 5,5 kV, 38 kHz i 12 W. Średnia gęstość mocy rozpraszanej na badanych próbkach wyniosła 75 mW

cm⁻². Wysokość szczeliny wyładowczej wynosiła 4 mm. Schemat reaktora plazmowego DBD stosowanego w inaktywacji patogenów grzybowych przedstawiono na rysunku nr 12.



Rysunek 12. Schemat reaktora plazmowego DBD, wykorzystywanego w badaniach: **a** - obudowa izolacyjna, **b** - szczelina wyładowcza, **c** - dielektryk, **d** - elektrody, **e** - próbka, **f** - zasilacz. Opracowanie własne.

3.5 Nasiona ogórka gruntowego (*Cucumis sativus*)

Nasiona ogórka gruntowego (*Cucumis sativus*, odmiana Śremski F1) pozyskano z lokalnego sklepu ogrodniczego. Nasiona zdezynfekowano powierzchniowo poprzez wytrząsanie w roztworze 15% H₂O₂ przez 30 min, a następnie trzykrotnie przepłukano 10 ml sterylnej wody dejonizowanej (Gammoudi i in., 2022). Nasiona następnie umieszczono w płytkach Petriego wyłożonych sterylnym ręcznikiem papierowym i suszono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej pod komorą laminarną. Skuteczność sterylizacji nasion ogórka potwierdzono poprzez pobranie 100 µl wody z ostatniej partii użytej do płukania nasion i posiew na stałe podłoże DPA oraz MHA. Płytki z podłożem DPA inkubowano przez 48 h w 25°C, natomiast płytki z podłożem MH inkubowano przez 24 h w temperaturze 30°C, w celu obserwacji wzrostu odpowiednio grzybów i bakterii. Do dalszych badań przeznaczono wyłącznie nasiona, dla których potwierdzono skuteczność sterylizacji (brak kolonii na podłożach po okresie inkubacji).

3.6 Owoce pomidora koktajlowego (*Solanum lycopersicum*)

Owoce pomidora koktajlowego (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) zostały pozyskane z lokalnego sklepu i wybrane na podstawie dojrzałości, wielkości, koloru oraz braku uszkodzeń fizycznych lub widocznej infekcji (Xue i in., 2018). Następnie powierzchnię owoców wysterylizowano kolejno poprzez przemycie dużą ilością bieżącej wody wodociągowej, zanurzenie w 70% alkoholu etylowym na 15 min, trzykrotne przemycie 10 ml sterylnej wody dejonizowanej oraz osuszenie na sterylnym ręczniku papierowym. Skuteczność sterylizacji owoców pomidora zweryfikowano przez pobranie po 100 µl wody z ostatniej partii użytej do płukania i posiew na stałe podłoże DPA oraz MHA zgodnie z procedurą opisaną powyżej. Do dalszych badań wykorzystano owoce, dla

których potwierdzono skuteczność sterylizacji powierzchni (brak kolonii na podłożach stałych po okresie inkubacji).

3.7 Charakterystyka plazmy generowanej w reaktorze DBD

Analizę wzbudzonych form (RFT, RFA) generowanych w reaktorze DBD przeprowadzono za pomocą optycznej spektroskopii emisyjnej (ang. optical emission spectroscopy, OES). Badania te zostały wykonane przez zespół pod kierownictwem dr Milana Šimek w Katedrze Pulsacyjnych Systemów Plazmowych (Instytut Fizyki Plazmy Czeskiej Akademii Nauk). Emisję indukowaną plazmą rzutowano za pomocą kwarcowego światłowodu na szczelinę wejściową spektrometru iHR320 wyposażonego w detektor ICCD (Andor iStar ICCD DH740i-18U-03). Widma emisyjne wykonano bez rozdzielczości przestrzenno-czasowej przy użyciu siatek dyspersyjnych 300, 1200 i 3600 G/mm.

Stężenie ozonu powstającego w reaktorze plazmowym DBD zbadano za pomocą analizatora ozonu BMT 965 C (BMT Messtechnik GmbH, Niemcy). Z uwagi na otwartą konstrukcję reaktora plazmowego, umieszczono go w komorze z ustalonym przepływem powietrza wynoszącym 500 ml min^{-1} , zachowując stałe ciśnienie powietrza (tj. atmosferyczne) w komorze podczas przeprowadzania badań. Stężenie ozonu mierzono w ciągu 10 minut pracy reaktora plazmowego. Monitorowano także temperaturę powierzchni elektrody wysokiego napięcia oraz warstwy ceramicznej tworzącej barierę dielektryczną. Do pomiaru temperatury wykorzystano termoparę typu K. Doświadczenie przeprowadzone zostało przez dr inż. Tomasza Czapkę w trzech powtórzeniach.

3.8 Izolacja i identyfikacja grzybów strzępkowych ze środowiska

Próbki pobrano z powierzchni drewnianych skrzyń, wykorzystywanych do przechowywania warzyw (ziemniaków) w gospodarstwach rolnych w okolicach Środy Wielkopolskiej. Wykonano odciski z wewnętrznej powierzchni skrzyń z widoczną inwazją grzybnia za pomocą płytek kontaktowych, zawierających podłoże SDACH. Płytki inkubowano w temperaturze 25°C w cieplarni laboratoryjnej przez 7 do 10 dni. Po okresie inkubacji wyizolowano czyste kolonie metodą izolacji pojedynczych zarodników lub poprzez wycięcie końcówki strzępek z marginesu kolonii, jak opisali Chang i in. (2018). Izolaty grzybów przesiano na podłoże PDA i inkubowano w temperaturze 25°C przez 7 dni. Do dalszych badań wybrano dwa szczepy wyizolowane z powierzchni skrzyń.

Wybrane izolaty wstępnie sklasyfikowano na podstawie cech morfologicznych, takich jak pigmentacja, kształt, wzniesienie oraz brzegi kolonii, a także charakterystyki zarodników i konidioforów, zgodnie ze standardowym systemem taksonomicznym. Identyfikacja gatunkowa wybranych izolatów została przeprowadzona metodą molekularną opartą na łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. polymerase chain reaction, PCR) przez dr hab. inż. Annę Baturo-Cieśniewską (Politechnika Bydgoska).

Procedurę identyfikacji szczepów pobranych ze środowiska przeprowadzono poprzez pobranie grzybni z dziesięciodniowej hodowli na podłożu PDB, przepłukanie sterylną wodą, zliofilizowanie i homogenizację. DNA izolowano wykorzystując metodę opisaną przez Doyle i Doyle (1991), z modyfikacjami. DNA zawieszono w wodzie i rozcieńczano do 10 ng μL^{-1} .

Wstępnej identyfikacji izolatów *Alternaria* sp. i *Fusarium* sp. dokonano na podstawie sekwencji regionów ITS z użyciem starterów ITS1 i ITS4. Produkty weryfikowano elektroforetycznie na żelu agarozowym i sekwencjonowano. Dalsze analizy specyficzne gatunkowo przeprowadzono starterami ITS5 i MR dla *Alternaria* sp., natomiast dla *Fusarium* sp. starterami JIAF i JIAR oraz tri1 i tri2. Wielkości produktów wynosiły odpowiednio 505 pz, 660 pz i 215 pz. Wyniki odczytywano elektroforetycznie na podstawie obecności lub braku oczekiwanych produktów.

Hodowle wyjściowe szczepów wyizolowanych ze środowiska otrzymano poprzez zaszczerpienie 100 ml płynnego podłoża BDP grzybnią zebraną z krawędzi kolonii czystej kultury na podłożu PDA za pomocą sterylnej ezy, a następnie inkubację na wytrząsarce przy 120 obr min^{-1} w temperaturze 25°C przez 7 dni. Po tym czasie pobrano 100 μl hodowli wyjściowej i wykonano posiew dywanowy na podłoże stałe DPA. Płytki inkubowano w temperaturze 25°C przez 7 dni, a następnie przechowywano w temperaturze 4°C, nie dłużej niż 28 dni. Szczepy regularnie przesiewano na podłoże DPA i przechowywano w temperaturze 4°C.

3.9 Ocena skuteczności inaktywacji komórek grzybów przez atmosferyczną plazmę niskotemperaturową

3.9.1 Przygotowanie zawiesin grzybów i sztuczne zanieczyszczanie powierzchni materiałów opakowaniowych

Zawiesinę grzybni otrzymano poprzez pokrycie powierzchni siedmiodniowych czystych kultur grzybów fitopatogennych na stałym podłożu DPA 10 ml sterylnej wody

dejonizowanej z dodatkiem 0,1% Tween 80 i delikatne zeszkrobanie grzybni wraz z zarodnikami za pomocą sterylnej ezy. Zawiesinę dokładnie wymieszano na wytrząsarce laboratoryjnej przez 5 min, a następnie przefiltrowano przez podwójną warstwę sterylnej gazy w celu usunięcia dużych fragmentów grzybni. Zawiesinę komórek wirowano przy 7500 obr min⁻¹ przez 5 min i rozcieńczono sterylną wodą dejonizowaną do końcowego stężenia 10⁵-10⁶ jtk ml⁻¹ stosując komorę do zliczania Howarda. Stężenie każdego inokulum potwierdzano metodą szeregu dziesięciokrotnych rozcieńczeń i posiewu na podłoże stałe DPA (Los i in., 2020).

Sterylnie krążki drewniane lub tekturowe umieszczono pojedynczo w szalce Petriego a następnie sztucznie zanieczyszczano poprzez nakropienie na powierzchnię 20 µl (10⁵-10⁶ jtk ml⁻¹) zawiesiny grzybów. Krążki pozostawiono do wyschnięcia przez 24 h pod komorą laminarną w temperaturze pokojowej.

3.9.2 Traktowanie plazmą niskotemperaturową materiałów sztucznie inokulowanych zawiesiną grzybów fitopatogennych

Większość doświadczeń, w których badano skuteczność działania zimnej plazmy na inaktywację grzybów strzępkowych opiera się na wykorzystaniu zarodników lub uśpionych reprodukcyjnych komórek, ze względu na łatwiejszą procedurę przygotowania i operowania próbką (Dasan i in., 2017; Mravlje i in., 2021). W niniejszych badaniach wykorzystano metabolicznie aktywną grzybnię, w celu określenia złożoności odpowiedzi komórek grzybów fitopatogennych na obróbkę zimną plazmą. Zbadano wpływ plazmy nietermicznej, generowanej przez DBD pod ciśnieniem atmosferycznym z powietrzem jako gazem roboczym na inaktywację grzybów fitopatogennych z powierzchni drewna lub tektury, jako materiału modelowego stosowanego w przechowalnictwie żywności.

Krążki drewniane oraz tekturowe sztucznie inokulowane zawiesiną grzybów umieszczano pojedynczo w centralnej części reaktora pomiędzy elektrodami, a następnie poddawano działaniu plazmy. Tylko zanieczyszczona strona próbki miała bezpośredni kontakt z plazmą. Kontrolę stanowiły krążki zanieczyszczone zawiesiną grzybów, które nie zostały poddawane działaniu plazmy (t=0). Skuteczność inaktywacji komórek grzybów fitopatogennych określono przez posiew na podłoże stałe. Krążki przeniesiono do próbek zawierających 1 ml sterylnej wody dejonizowanej i starannie wymieszano za pomocą wytrząsarki laboratoryjnej. Następnie wykonano szereg kolejnych dziesięciokrotnych rozcieńczeń. Z każdego rozcieńczenia pobrano po 100 µl i wykonano

posiew dywanowy za pomocą głaszczki na stałe podłoże DPA w dwóch powtórzeniach. Płytki inkubowano przez 24-72 h w ciemności w temperaturze 25°C do wyrośnięcia grzybni. Po tym czasie wybrano płytki, na których liczba kolonii mieściła się w zakresie od 10 do 150, a następnie obliczono średnią liczbę jednostek tworzących kolonie (jtk) w jednym mililitrze z obu powtórzeń (co odpowiada średniej liczbie jednostek tworzących kolonie znajdujących się na powierzchni krążka). Wyniki podano w jednostce jtk cm⁻² powierzchni krążka. Każde doświadczenie przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

Inaktywacja mikroorganizmów plazmą opisywana jest zazwyczaj za pomocą modelu Weibulla (Ma i in., 2019). Dane opisujące wpływ inaktywacji drobnoustrojów dopasowano za pomocą wzoru nr 1:

$$\log_{10} \left(\frac{N}{N_0} \right) = - \left(\frac{t}{\delta} \right)^p \quad (1)$$

gdzie: N_0 – początkowa liczba mikroorganizmów [jtk cm⁻²];

N – liczba żywych mikroorganizmów [jtk cm⁻²] pozostających po danym czasie traktowania plazmą nietermiczną;

t – czas traktowania zimną plazmą [min];

δ – parametr czasu [min], jest to czas odpowiadający pierwszej redukcji dziesiętnej, czyli czas niezbędny do zredukowania populacji początkowej N_0 do $N_0/10$, δ odpowiada czasowi, w którym $\log_{10}S(t)=-1$ (Buzrul, 2022);

p – współczynniki kształtu krzywej przeżycia, opisuje stopień krzywoliniowości. Rozkład Weibulla jest wklęsły, jeśli $p < 1$ i wypukły, jeśli $p > 1$. Model liniowy jest szczególnym przypadkiem modelu Weibulla, w którym $p=1$ (Mecha i in., 2020).

Skuteczność inaktywacji komórek grzybów za pomocą zimnej plazmy oceniono na podstawie wartości dziesiętnego czasu redukcji (δ).

3.9.3 Traktowanie drewna skrzyń plazmą niskotemperaturową

Próbki skrzynek wykorzystywanych do przechowywania ziemniaków (10×10 mm) umieszczono w centralnej części reaktora i wystawiano na działanie plazmy. Tylko zanieczyszczona strona próbki miała bezpośredni kontakt z plazmą. Następnie wykonano odcisk potraktowanej powierzchni na płytce kontaktowej zawierającej podłoże SDACH. Dla określenia początkowej liczby komórek grzybów zanieczyszczających powierzchnię skrzyni wykonano odcisk nietraktowanej powierzchni na płytce kontaktowej. Płytki

inkubowano przez 24-72 h w temperaturze 25°C. Każde doświadczenie przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

Skuteczność biobójczą zimnej plazmy zdefiniowano jako redukcję liczby żywotnych komórek grzybów (jtk) zanieczyszczających powierzchnię 1 cm² drewnianej skrzynki.

3.10 Badanie mechanizmu działania plazmy niskotemperaturowej na komórki grzybów fitopatogennych

3.10.1 Przygotowanie grzybni traktowanej subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej

Na szkiełko mikroskopowe nakrywkowe naniesiono 100 µl zawiesiny grzybów fitopatogennych o stężeniu 10⁵-10⁶ jtk ml⁻¹ przygotowanej zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.9.1, a następnie pozostawiono do wyschnięcia w sterylnej szalce Petriego pod komorą laminarną w temperaturze pokojowej przez 24 h. Szkiełko umieszczono w reaktorze DBD i traktowano subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej (termin „dawki subletalnej” zostanie wyjaśniony w podrozdziale 4.3, wartości dawek subletalnych dla każdego szczepu podano w tabeli nr 5). Kontrolę stanowiła grzybnia nietraktowana zimną plazmą (oznaczana w dalszej części pracy jako P0).

3.10.2 Testy żywotności i integralności błony komórkowej grzybów fitopatogennych oparte na fluorescencji

Do oceny żywotności komórek grzybów i integralności błony komórkowej po traktowaniu plazmą nietermiczną wykorzystano SYTO 9 i jodek propidyny (PI), dostarczone przez LIVE/DEAD BackLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, USA), zgodnie z instrukcją producenta z niewielkimi modyfikacjami (Ott i in., 2021).

SYTO 9 (zielono-fluorescencyjny barwnik kwasu nukleinowego) znakuje wszystkie komórki, podczas gdy PI (czerwona fluorescencja) znakuje tylko komórki z uszkodzoną błoną komórkową, powodując zmniejszenie fluorescencji barwnika SYTO 9 w przypadku obecności obu barwników. Komórki martwe barwią się zatem na czerwono (SYTO 9⁻, PI⁺), komórki z uszkodzoną błoną mogą przyjmować kolor żółty (SYTO 9⁺, PI⁺), natomiast żywe komórki z nienaruszoną błoną komórkową barwią się na kolor zielony (SYTO 9⁺, PI⁻).

Grzybnię potraktowaną subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej (oznaczaną dalej jako P1) oraz grzybnię nietraktowaną plazmą (P0) przygotowano zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.10.1. Grzybnię przemyto sterylną wodą

dejonizowaną i przeniesiono do czarnych probówek typu Eppendorf, a następnie uzupełniono sterylną wodą dejonizowaną do końcowej objętości 1 ml. Równe części SYTO 9 i jodku propidyny zawartego w zestawie Live/Dead zmieszano w czarnej probówce typu Eppendorf. Do każdej zawiesiny grzybów dodano 3 μ l mieszaniny barwników. Próbki inkubowano w ciemności przez 15 min w temperaturze 25°C. Grzybnię odwirowano przy 7500 obr min^{-1} i przepłukano wodą dejonizowaną. Pobrano 10 μ l zawiesiny grzybów i umieszczono pomiędzy szkiełkiem podstawowym a szkiełkiem nakrywkowym. Komórki wizualizowano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego OLYMPUS BX60. Fotografie wykonano za pomocą aparatu Panasonic DMC-G2.

3.10.3 Testy integralności błony komórkowej oparte na wpływie składników wewnątrzkomórkowych

Wyciek zawartości komórek drobnoustrojów może wskazywać na uszkodzenie błony komórkowej podczas obróbki plazmą niskotemperaturową (Los i in., 2020).

Grzybnię traktowano plazmą niskotemperaturową zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 3.10.1. Kontrolę stanowiła grzybnia nietraktowana zimną plazmą (P0). Grzybnię przemyto sterylną wodą dejonizowaną i przeniesiono do probówek typu Eppendorf. Objętość końcową każdej próbki uzupełniono do 1 ml. Próbki wirowano przy 7500 obr min^{-1} przez 15 minut w temperaturze 4°C. Otrzymane ciecze z nad osadów (zwane dalej „supernatantami”) skierowano do dalszych analiz. Eksperyment przeprowadzono w dwóch powtórzeniach.

Pomiar stężenia DNA i białek uwolnionych z komórek grzybów fitopatogennych

Do ilościowego określenia stężenia DNA i białka, uwolnionych w wyniku utraty integralności błony komórkowej wykorzystano metodę opisaną przez Los i in. (2020).

Supernatanty przeniesiono do kuwety kwarcowej i zmierzono wartość absorbancji za pomocą spektrofotometru Cary UV-Vis (Agilent Technologies, USA) przy długości fali $\lambda=260$ nm w dwóch powtórzeniach wobec wody dejonizowanej. Przyjmuje się, że absorbancja promieniowania ultrafioletowego o długości fali $\lambda=260$ nm dla roztworu wodnego dwuniciowego DNA o stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ wynosi 1,0 (przy długości drogi optycznej równej 1 cm).

Stężenie dwuniciowego DNA (dsDNA, ang. double stranded), obliczono przy użyciu wzoru nr 2 (Los i in., 2020):

$$\text{dsDNA} [\mu\text{g ml}^{-1}] = 50 \cdot \bar{A} \cdot \text{df} \quad (2)$$

gdzie: 50 – stężenie dwuniciowego DNA, dla którego wartość absorbancji przy długości fali $\lambda=260$ nm wynosi $1,0 [\mu\text{g ml}^{-1}]$;

\bar{A} – średnia wartość absorbancji przy długości fali $\lambda=260$ nm dla dwóch powtórzeń;

df – współczynnik rozcieńczenia (ang. dilution factor).

Stężenie białek oznaczono metodą spektrofotometryczną opisaną przez Bradforda (Bradford, 1976; Kruger, 2009) z użyciem błękitu Coomassie (Coomassie Blue G250, Cepham Life Sciences, Inc., USA). Metoda ta wykorzystuje zjawisko tworzenia kompleksu barwnik-białko, którego natężenie barwy mierzy się spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda=595$ nm. Wartość absorbancji jest proporcjonalna do stężenia białka w badanej próbce.

Na 96-dołkową mikropłytkę przeniesiono po 90 μl badanej próbki i dodano 90 μl błękitu Coomasie. Po 15 min inkubacji w temperaturze pokojowej odczytano wartość absorbancji przy $\lambda=595$ nm, używając spektrofotometru mikropłytkowego (Multiskan FC, Thermo Scientific, Polska). Pomiar absorbancji wykonano w dwóch powtórzeniach. Stężenie białka oceniano w odniesieniu do krzywej wzorcowej przygotowanej przy użyciu albuminy surowicy bydlęcej (BSA, Sigma) o różnych stężeniach 1,0; 2,5; 5,0; 10; 20; 40 $\mu\text{g/ml}$ w buforze PBS (pH 7,4).

Analiza składu chemicznego metodą spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie

Skład chemiczny supernatantów otrzymanych zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.10.3 określono za pomocą spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ang. inductively coupled plasma - optical emission spectrometry, ICP-OES). Technika ta wykorzystuje indukcyjnie sprzężoną plazmę do wzbudzenia atomów w próbce. Zjonizowane atomy emitują promieniowanie o długości fali charakterystycznej dla danego pierwiastka, które są rejestrowane przez spektrometr. Intensywność emisji światła jest proporcjonalna do stężeń pierwiastka w próbce.

Supernatanty stanowiły jednorodny i klarowny roztwór, który nie wymagał mineralizacji (roztworzenia w obecności kwasów nieorganicznych, najczęściej wspomaganego mikrofalami). Do 0,5 g próbki dodano 4 ml wody dejonizowanej oraz

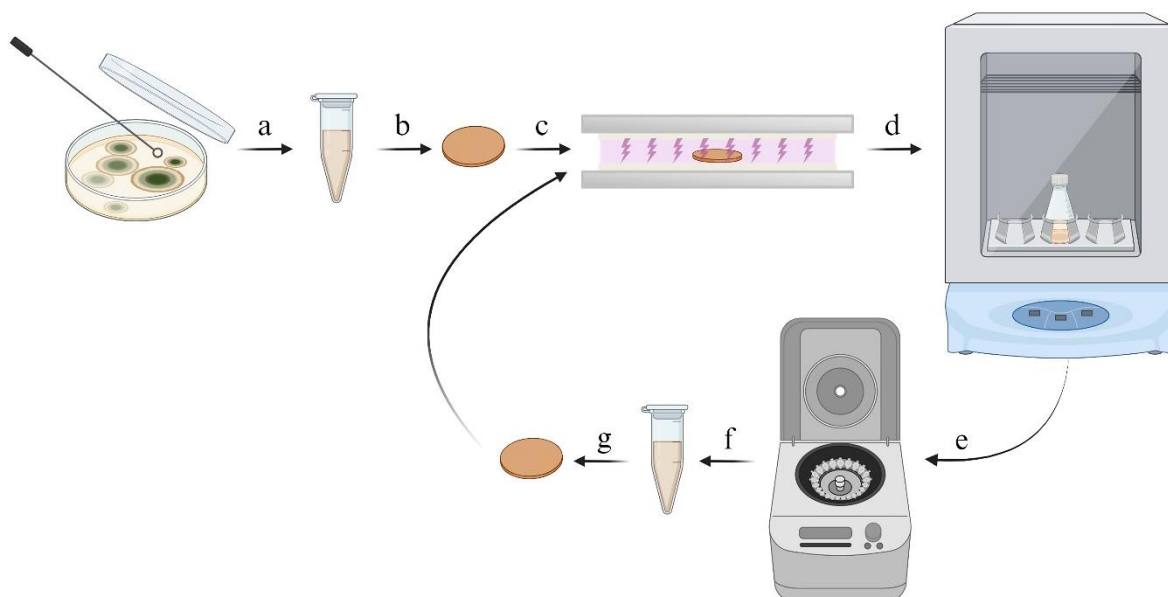
0,5 ml HNO₃ (Suprapur) o stężeniu 65% (Merck Life Science Sp. z o. o., Polska). Przygotowane próbki analizowano za pomocą spektrometru Agilent 5800 ICP-OES. Otrzymane wyniki (ppm) skorygowano o współczynnik rozcieńczenia oraz gęstość analizowanego roztworu, otrzymując stężenie pierwiastka w jednostkach mg na 1 l próbki (supernatantu). Analizę wykonano w dwóch powtórzeniach.

3.11 Badanie wpływu wielokrotnej ekspozycji grzybów fitopatogennych na subletalną dawkę atmosferycznej plazmy niskotemperaturowej

3.11.1 Przygotowanie zawiesin grzybów fitopatogennych po wielokrotnym traktowaniu subletalną dawką atmosferycznej plazmy niskotemperaturowej

Procedurę wielokrotnego traktowania grzybów fitopatogennych plazmą niskotemperaturową przeprowadzono stosując dawkę subletalną, odpowiadającą wartości δ dla grzybów fitopatogennych inaktywowanych na powierzchni drewna (termin „dawki subletalnej” zostanie wyjaśniony w podrozdziale 4.3, wartości dawek subletalnych dla każdego szczepu podano w tabeli nr 5).

Procedurę wykonania eksperymentu przedstawiono na rysunku nr 13. Przygotowano zawiesinę grzybów o stężeniu komórek 10^5 - 10^6 jtk ml⁻¹ (a), a następnie sztucznie zanieczyszczono powierzchnię drewnianego krążka, zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.9.1 (b). Zanieczyszczony zawiesiną grzybów krążek poddawano działaniu subletalnej dawki plazmy nietermicznej (c). Krążek przeniesiono do kolby Erlenmeyera o pojemności 250 ml zawierającej 50 ml podłoża płynnego BDP i inkubowano na wytrząsarce laboratoryjnej w temperaturze 25°C przy 120 obr min⁻¹ (d). Po 48 h inkubacji pobrano 2 ml hodowli i wirowano przy 7500 obr min⁻¹ przez 5 min (e). Supernatant usunięto a pozostałą grzybnię zawieszono w sterylnej wodzie dejonizowanej do końcowego stężenia komórek 10^5 - 10^6 jtk ml⁻¹ stosując komorę do zliczania Howarda (f). Tak przygotowaną zawiesinę wykorzystywano do inokulacji kolejnego krążka, który pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej przez 24 h (g). Zanieczyszczony krążek poddawano działaniu kolejnej subletalnej dawki plazmy (h). Procedurę tę powtórzono do uzyskania łącznie 15 cykli. Grzybnię nietraktowaną plazmą niskotemperaturową przygotowano w ten sam sposób, z pominięciem etapu zaznaczonego jako (c).



Rysunek 13. Schemat procedury wielokrotnego traktowania komórek grzybów fitopatogennych subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej (zaczepnięto z Nowinski i in., 2024, publikacja w otwartym systemie dostępu). Opis poszczególnych etapów umieszczono w tekście.

Płynne hodowle badanych grzybów fitopatogennych przygotowano poprzez zaszczerpienie 100 ml pożywki BDP krążkami sztucznie zanieczyszczonymi zawiesziną grzybów (10^5 - 10^6 jtk ml^{-1}) nietraktowanych plazmą (P0) oraz po pierwszym (P1), piątym (P5), dziesiątym (P10) oraz piętnastym (P15) traktowaniu plazmą. Hodowle inkubowano na wstrząsarce laboratoryjnej w temperaturze $25^{\circ}C$ przy 120 obr min^{-1} przez 7 dni.

Do dalszych badań wykorzystano zawiesiny grzybów o ustalonym stężeniu komórek, które przygotowano poprzez odwirowanie płynnych hodowli przy 7500 obr min^{-1} za pomocą wirówki laboratoryjnej (Rotina 420R, Hettich, Niemcy), zawieszenie w sterylnej wodzie dejonizowanej i ponowne odwirowanie w celu usunięcia pozostałości pożywki hodowlanej. Komórki grzybów następnie zawieszono w sterylnej wodzie dejonizowanej do uzyskania końcowego stężenia komórek 10^5 - 10^6 jtk ml^{-1} . Przygotowane zawiesiny przechowywano w temperaturze $4^{\circ}C$ do kolejnych badań, nie dłużej niż 7 dni.

3.11.2 Ocena szybkości wzrostu grzybów fitopatogennych poddawanych wielokrotnej ekspozycji na plazmę niskotemperaturową

Na środek płytki ze stałym podłożem DPA naniesiono $10\ \mu l$ zawiesiny grzybów (10^5 - 10^6 jtk ml^{-1}) nietraktowanych plazmą nietermiczną (P0) oraz po piątym (P5), dziesiątym (P10) i piętnastym (P15) traktowaniu otrzymanych zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.11.1. Płytki inkubowano w temperaturze $25^{\circ}C$ w ciemności. Średnice kolonii grzybów mierzono metodą krzyżową po 3, 5, 7 i 14 dniach inkubacji. Badanie

przeprowadzono dwukrotnie z dwoma powtórzeniami dla każdej próbki (Wang i in., 2022).

3.11.3 Mikroskopia optyczna i skaningowa mikroskopia elektronowa

Do wizualizacji zmian strukturalnych zachodzących w komórkach grzybów w wyniku wielokrotnej ekspozycji na zimną plazmę (P5, P10, P15) zastosowano technikę mikroskopii optycznej. Kontrolę stanowiła grzybnia nietraktowana plazmą (P0). Na szkiełka podstawowe naniesiono 10 µl zawiesiny grzybów (10^5 - 10^6 jtk ml⁻¹) otrzymanych zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 3.11.1 i przykryto szkiełkiem nakrywkowym. Komórki grzybów obserwowano przy użyciu mikroskopu optycznego Axio Imager M1m (Zeiss, Niemcy) pod obiektywem ×20 i ×40 (całkowite powiększenie ×200 i ×400).

Wpływ wielokrotnego traktowania grzybów subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej na ścianę komórkową zbadano również za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (ang. scanning electron microscope, SEM) zgodnie z metodą opisaną przez Zhou i in. (2019). Komórki grzybów nietraktowane plazmą (P0) oraz po wielokrotnej ekspozycji na plazmę (P5, P10, P15) utrwalano przy użyciu 2,5% aldehydu glutarowego w temperaturze 4°C przez 24 godziny. Grzybnię odwirowano, utwalacz usunięto, a komórki trzykrotnie przepłukano 0,1 M buforem PBS o pH 7,4. Następnie materiał odwadniano w rosnących stężeniach etanolu (25, 50, 70 i 95%) kolejno przez 15 minut. Po odwodnieniu usunięto nadmiar płynu, próbkę wysuszono na powietrzu i pokryto złotem (25 nm) za pomocą napyłarki próżniowej Leica EM ACE200 Vacuum Coater (Leica Microsystems, Niemcy). Obrazowanie grzybni za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego JSM-6610LV (JEOL Ltd., Japonia) zostało wykonane przez dr hab. Andrzeja Żaka (Politechnika Wrocławska).

3.11.4 Oznaczanie żywotności komórek grzybów fitopatogennych po wielokrotnej ekspozycji plazmę niskotemperaturową

Do kolb o pojemności 250 ml zawierających 100 ml BDP zaszczerpiono po 100 µl zawiesiny grzybów (10^5 - 10^6 jtk ml⁻¹) nietraktowanych plazmą nietermiczną (P0) oraz po piątym (P5), dziesiątym (P10) lub piętnastym (P15) traktowaniu, które przygotowano zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 3.11.1. Kolby inkubowano na wytrząsarce obrotowej (120 obr min⁻¹) w temperaturze 25°C przez 7 dni. Biomase grzybów zebrano na uprzednio zważonym filtrze Whatmana nr 1 (Whatman, Wielka Brytania) z użyciem lejka Büchnera i pompy próżniowej, a następnie przemyto 50 ml wody destylowanej i suszono

w suszarce laboratoryjnej w temperaturze 80°C przez 24 h do uzyskania stałej masy. Po tym czasie próbki pozostawiono do wystudzenia w temperaturze pokojowej. Biomasa zważono wraz z sączkiem na wadze analitycznej, aby uniknąć strat podczas przenoszenia biomasy. Badanie wykonano w dwóch powtórzeniach (Šimončicová i in., 2018). Suchą masę grzybni (m_s) obliczono korzystając ze wzoru nr 3 (Kumar i in., 2012):

$$m_s [\text{mg ml}^{-1}] = \frac{m_{\text{całkowita}} - m_{\text{sączka}}}{V} \quad (3)$$

gdzie: $m_{\text{całkowita}}$ – sucha masa grzybni z sączkiem [mg];

$m_{\text{sączka}}$ – masa sączka przed filtracją [mg];

V – objętość pożywki hodowlanej [ml].

3.11.5 Oznaczenie poziomu stresu oksydacyjnego w komórkach grzybów fitopatogennych po wielokrotnej ekspozycji na plazmę niskotemperaturową

Generowanie i gromadzenie wewnątrzkomórkowych RFT w grzybni wielokrotnie poddawanej działaniu plazmy nietermicznej (P5, P10, P15) zbadano przy użyciu sondy fluorescencyjnej dioctanu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (DCFH-DA; Sigma, Niemcy) zgodnie z protokołem/instrukcją producenta (Šimončicová i in., 2018).

Do eksperymentów przygotowano roztwór podstawowy 2 mM DCFH-DA w DMSO i przechowywano w temperaturze -20°C w ciemności do dalszego użycia. Zawiesinę grzybni nietraktowanej plazmą (P0) oraz po piątym (P5), dziesiątym (P10) i piętnastym (P15) traktowaniu plazmą nietermiczną o stężeniu 10^5 - 10^6 jtk ml^{-1} przygotowano zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 3.11.1, a następnie inkubowano z DCFH-DA w końcowym stężeniu 10 μM przez 60 minut w ciemności w temperaturze 25°C. Z każdej próbki pobrano po 100 μl i przeniesiono na płytkę 96-dołkową, po czym mierzono intensywność fluorescencji na wielomodowym czytniku mikropłytek Gemini XPS (Molecular Devices, USA) przy długości fali wzbudzenia i emisji odpowiednio 485 nm i 525 nm. Wygenerowane dane, wyrażone jako umowne jednostki fluorescencji (ang. arbitrary fluorescence units, AFU), reprezentują stężenia RFT po potraktowaniu komórek grzybów zimną plazmą (Patange i in., 2019; Rhee i in., 2010). Grzybnia nietraktowana plazmą (P0) została wykorzystana do określenia pierwotnego poziomu wewnątrzkomórkowych RFT.

3.11.6 Wrażliwość grzybów fitopatogennych wielokrotnie traktowanych plazmą niskotemperaturową na nadtlenek wodoru

Minimalne stężenia hamujące (MIC) nadtlenu wodoru (H_2O_2) określono techniką mikrorozcieńczeń w pożywce hodowlanej opisaną przez Cobrado i in. (2023), z niewielkimi modyfikacjami. Zawiesiny grzybów nietraktowanych plazmą (P0) oraz po wielokrotnym traktowaniu plazmą (P5, P10, P15) o końcowym stężeniu 10^5 - 10^6 jtk ml^{-1} przygotowano zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 3.11.1, a następnie odwirowano i ponownie zawieszono w tej samej objętości świeżej pożywki hodowlanej. Sporządzono wyjściowy roztwór nadtlenu wodoru o stężeniu 6540 mM w pożywce hodowlanej. Do dołków w płytce 96-dołkowej (F.L. Medical, Włochy) wprowadzono po 100 μl pożywki hodowlanej (z wyjątkiem kolumny numer 1). Do kolumny oznaczonej jako 1 i 2 wprowadzono po 100 μl roztworu nadtlenu wodoru o stężeniu 6540 mM, a następnie wykonano szereg dwukrotnych rozcieńczeń nadtlenu wodoru w kolumnach od 2 do 11. Z kolumny 11 usunięto 100 μl roztworu (objętość końcowa we wszystkich dołkach wyniosła 100 μl). Kolumna numer 12 stanowiła kontrolę, w której znajdowała się wyłącznie pożywka. Następnie do wszystkich dołków zaszczerpiono po 100 μl odpowiedniej zawiesiny grzybów, uzyskując końcową objętość 200 μl , w zakresie stężeń nadtlenu wodoru od 3270 do 3,19 mM. Płytki inkubowano w temperaturze $25^\circ C$ przez 48-72 h. MIC zdefiniowano jako najniższe stężenie nadtlenu wodoru, które powodowało brak widocznego wzrostu grzybów w dołku. Każde doświadczenie przeprowadzono dwukrotnie.

Minimalne stężenia grzybobójcze (MFC) nadtlenu wodoru określono dla grzybów nietraktowanych (P0) i wielokrotnie traktowanych plazmą nietermiczną (P5, P10, P15). Po 24 h inkubacji pobrano po 10 μl zawiesiny grzybów z każdego dołka płytki 96-dołkowej i wysiano na stałe podłoże DPA, a następnie inkubowano w temperaturze $25^\circ C$ aż do zaobserwowania wzrostu grzybnii w grupie kontrolnej (zwykle 24-48 godzin). MFC oznaczało najniższe stężenie nadtlenu wodoru, które powodowało całkowite zahamowanie wzrostu grzybów na podłożu stałym. Każde doświadczenie przeprowadzono w dwóch powtórzeniach.

3.11.7 Badanie rozwoju tolerancji grzybów fitopatogennych wielokrotnie traktowanych plazmą niskotemperaturową na środki grzybobójcze

Oznaczono minimalne stężenia hamujące (MIC) dostępnych w handlu środków grzybobójczych przeciwko grzybom fitopatogennym nietraktowanych plazmą (P0) oraz po piątym (P5), dziesiątym (P10) lub piętnastym (P15) traktowaniu plazmą. Przygotowano zawiesiny grzybów o stężeniu 10^5 - 10^6 jtk ml⁻¹ w pożywce hodowlanej, zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 3.11.1.

Minimalne stężenia hamujące (MIC) dostępnych na rynku środków grzybobójczych określono metodą mikrorozcieńczeń na płytce 96-dołkowej. Do dołków w płytce 96-dołkowej (F.L. Medical, Włochy) wprowadzono po 100 µl pożywni hodowlanej (z wyjątkiem kolumny H). Do kolumny zaznaczonej jako H i G wprowadzono po 100 µl roztworu wyjściowego fungicydu, a następnie wykonano szereg dwukrotnych rozcieńczeń od kolumny G do B. Kolumna S stanowiła kontrolę (bez środka grzybobójczego). Z kolumny B usunięto 100 µl cieczy/zawiesiny, tak, aby objętość we wszystkich dołkach wynosiła 100 µl. Następnie do wszystkich dołków zaszczepiono po 100 µl odpowiedniej zawiesiny grzybów, otrzymując końcową objętość 200 µl. Płytki inkubowano w temperaturze 25°C przez 48-72 h. MIC zdefiniowano jako najniższe stężenie fungicydu, które powodowało całkowite zahamowanie wzrostu grzybów w dołku.

Zakres badanych stężeń ustalono na podstawie maksymalnych dawek preparatu podanych na etykiecie przez producenta oraz zaleceń dla danej choroby roślin.

Fungicydy (F) oznaczone jako F1-F3 stanowiły płynne koncentraty substancji aktywnych. Roztwory wyjściowe tych środków przygotowano poprzez rozcieńczenie w sterylnej wodzie dejonizowanej. Natomiast fungicydy opisane jako F4-F6 miały postać proszków. Roztwory wyjściowe tych środków sporządzono poprzez zważenie odpowiedniej ilości proszku i rozpuszczenie w sterylnej wodzie dejonizowanej lub zawieszenie w sterylnej wodzie dejonizowanej z dodatkiem 1% agar-agaru, w celu utrzymania równomiernego stężenia substancji aktywnych w całej objętości poprzez zapobieganie opadania na dno studzienki. Każde doświadczenie przeprowadzono w dwóch powtórzeniach.

Zawartość substancji aktywnych (podana przez producenta) oraz testowany zakres stężeń środków przeciwgrzybiczych podano w tabeli nr 3.

Tabela 3. Badany zakres stężeń środków grzybobójczych względem grzybów fitopatogennych.

Nazwa i producent środka	Magnicur Energy (Protect Garden)	Tobias-Pro 250 EW (Procam)	SCORPION 325 S.C. (Agrecol)	MIEDZIAN 50 WP (Target)	SWITCH 62,5 WG (Agrecol)	SYLLIT 65 WP (Agrecol)
Substancje czynne	fosetyl glinowy 310 g/l, chlorowodorek propamokarbu 530 g/l	tebukonazol 250g/l (27,0%)	azoksystrobina 200 g/l (18,2%), difenokonazol 125 g/l (11,4)	Trihydroksy- chlorek dimiedzi 87,5%	cyprodynil 37,5%, fludioksonil 25%	dodyna 65%
Oznaczenie fungicydu	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Szczep	Badany zakres stężeń (% v/v)			Badany zakres stężeń (% m/v)		
<i>F. oxysporum</i> DSM 12646	$4,0 \cdot 10^1 -$	$3,13 \cdot 10^{-1} -$	$4,0 \cdot 10^1 -$	$4,0 \cdot 10^1 -$	$4,0 \cdot 10^1 -$	$3,13 \cdot 10^{-1} -$
<i>F. culmorum</i> DSM 1094	$6,25 \cdot 10^{-1}$	$4,88 \cdot 10^{-3}$	$6,25 \cdot 10^{-1}$	$6,25 \cdot 10^{-1}$	$6,25 \cdot 10^{-1}$	$4,88 \cdot 10^{-3}$
<i>F. tricinctum</i> Ft11S-23						
<i>A. alternata</i> DSM 62010	$4,0 \cdot 10^1 -$	$3,13 \cdot 10^{-1} -$	$3,13 \cdot 10^{-1} -$	$4,0 \cdot 10^1 -$	$3,13 \cdot 10^{-1} -$	$3,13 \cdot 10^{-1} -$
<i>B. cinerea</i> DSM 877	$6,25 \cdot 10^{-1}$	$4,88 \cdot 10^{-3}$	$4,88 \cdot 10^{-3}$	$6,25 \cdot 10^{-1}$	$4,88 \cdot 10^{-3}$	$4,88 \cdot 10^{-3}$
<i>A. alternata</i> Aa10S-23						

3.11.8 Badanie rozwoju tolerancji na działanie plazmy niskotemperaturowej u grzybów fitopatogennych

Wykonano posiew 100 μl zawiesiny grzybów fitopatogennych wielokrotnie traktowanych plazmą (P5, P10, P15) oraz nietraktowanych plazmą (P0) o stężeniu 10^5 - 10^6 jtk ml^{-1} (przygotowanych zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 3.11.1) na stałe podłoże DPA za pomocą jałowej głaszczki. Płytki inkubowano w temperaturze 25°C przez 7 dni.

Tolerancję grzybów fitopatogennych na działanie plazmy nietermicznej oceniono analogicznie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.9. W tym celu siedmiodniowe hodowle grzybów fitopatogennych zalano 10 ml sterylnej wody dejonizowanej z dodatkiem Tween 80 i sporządzono zawiesiny komórek grzybów o stężeniu 10^5 - 10^6 jtk ml^{-1} . Drewniane krążki sztucznie inokulowano 20 μl zawiesiny grzybów i pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej przez 24 h. Krążki umieszczono w reaktorze DBD a następnie traktowano plazmą przez odpowiedni czas.

Rozwój tolerancji komórek grzybów fitopatogennych na działanie zimnej plazmy określono na podstawie porównania wartości δ (wzór nr 1) otrzymanych dla grzybni nietraktowanych uprzednio plazmą oraz grzybni po wielokrotnej ekspozycji na plazmę (P5, P10, P15). Wszystkie testy wykonano w trzech powtórzeniach.

3.12 Ocena zmian patogenności grzybów po wielokrotnej ekspozycji na plazmę niskotemperaturową

3.12.1 Ocena zdolności zarodników grzybów do adhezji i formowania biofilmu

Zmiany zdolności do tworzenia biofilmu przez zarodniki grzybów fitopatogennych poddawanych wielokrotnemu działaniu plazmy nietermicznej oceniono w odniesieniu do grzybów nietraktowanych plazmą (P0), zgodnie z procedurą opisaną przez Siqueira i Lima (2013). Na szalkę Petriego ze stałym podłożem DPA posiano po 100 μl zawiesiny grzybów wielokrotnie traktowanych plazmą (P5, P10, P15) lub nietraktowanych plazmą (P0), otrzymanych zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 3.11.1. Zarodniki każdego szczepu zebrano poprzez zalanie płytki 10 ml soli fizjologicznej z dodatkiem 0,1% Tween i zeszkobanie zarodników z powierzchni podłoża za pomocą sterylnej ezy. Zawiesinę wyjściową dokładnie wymieszano na wytrząsarce laboratoryjnej, a następnie przefiltrowano przez podwójną warstwę sterylnej gazy w celu usunięcia fragmentów grzybni. Zawiesinę komórek odwirowano przy $7500 \text{ obr min}^{-1}$ przez 5 min i rozcieńczono

płynną pożywką BDP do stężenia 10^5 - 10^6 jtk ml⁻¹ stosując komorę do zliczania Howarda. Stężenie każdej zawiesiny potwierdzano metodą szeregu dziesięciokrotnych rozcieńczeń i posiewu na podłoże stałe.

Formowanie biofilmu

Do studzienek w płytach 24-dołkowych (Biologix, Niemcy) z płaskim dnem wprowadzono 250 µl zawiesiny grzybów oraz 250 µl płynnej pożywki BDP. Płytki pozostawiono do inkubacji w temperaturze 25°C przez 24 h do utworzenia biofilmu. Po tym czasie usunięto pożywkę hodowlaną wraz z komórkami nieprzytwierdzonymi do dna studzienek za pomocą pipety automatycznej. Komórki przytwierdzone do dna/ścianek studzienki przemyto trzykrotnie sterylną wodą dejonizowaną i pozostawiono do wyschnięcia w komorze laminarnej przez 5 h w temperaturze pokojowej.

Zdolność szczepów do tworzenia biofilmów (na powierzchni polistyrenu) została określona za pomocą metody barwienia fioletem krystalicznym, natomiast aktywność metaboliczną utworzonych biofilmów zbadano testem MTT zgodnie z procedurą opisaną przez Siqueira i Lima (2013), z niewielkimi modyfikacjami.

Barwienie fioletem krystalicznym

Do studzienek z uformowanym i przemytym biofilmem wprowadzono po 500 µl wodnego roztworu fioletu krystalicznego o stężeniu 0,05% (w/v) i inkubowano przez 30 min w temperaturze 25°C. Po tym czasie usunięto barwnik i przemyto biofilm sterylną wodą dejonizowaną. Do każdej studzienki wprowadzono po 500 µl etanolu (96%) a następnie zmierzono wartość absorbancji rozpuszczonego fioletu krystalicznego przy długości fali $\lambda=570$ nm za pomocą spektrofotometru Cary UV-Vis (Agilent Technologies, USA), wobec próby ślepej (roztwór etanolu bez komórek). Wartość absorbancji jest proporcjonalna do biomasy biofilmu, składającego się ze strzępek i pozakomórkowego materiału polimerowego. Wyniki skorygowano o współczynnik rozcieńczenia.

Oznaczanie aktywności metabolicznej za pomocą testu MTT

MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy) to żółta rozpuszczalna sól tetrazoliowa, która jest łatwo pobierana przez żywe komórki i redukowana w wyniku aktywności enzymów mitochondrialnych (głównie dehydrogenazy bursztynianowej) do nierozpuszczalnego w wodzie fioletowego formazanu. Kryształ formazanu należy rozpuścić w celu pomiaru kolorymetrycznego, a intensywność zabarwienia roztworu (wartość absorbancji) świadczy o liczbie żywych, aktywnych metabolicznie komórek.

Roztwór MTT o stężeniu 0,5 mg ml⁻¹ przygotowano zgodnie z zaleceniami producenta, poprzez rozpuszczenie proszku w sterylnym buforze PBS o pH 7,4. Odczynnik przechowywano w temperaturze 4°C w butelce z ciemnego szkła.

Do studzienek z uformowanym i przemytym biofilmem dodano 500 µl roztworu MTT. Płytki inkubowano w cieplarni laboratoryjnej w temperaturze 25°C przez 24 h. Po tym czasie do każdej studzienki dodano 500 µl zakwaszonego izopropanolu (0,04 M kwasu solnego 36% w propan-2-olu) w celu rozpuszczenia kryształów formazanu (D. M. Morgan, 1998). Aktywność metaboliczna grzybów tworzących biofilm została oceniona na podstawie pomiaru absorbancji roztworu formazanu przy długości fali $\lambda=570$ nm za pomocą spektrofotometru Cary UV-Vis (Agilent Technologies, USA), wobec próby ślepej (roztwór MTT bez komórek). Wszystkie testy wykonano dwukrotnie. Pomiar absorbancji wykonano w dwóch powtórzeniach dla każdej próbki. Wyniki skorygowano o współczynnik rozcieńczenia.

3.12.2 Oznaczenie aktywności enzymów rozkładających ścianę komórkową roślin

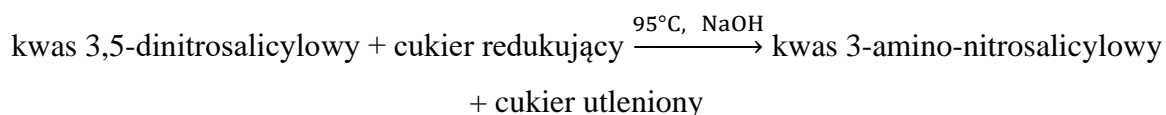
Produkcja enzymów rozkładających ścianę komórkową roślin (CWDE) umożliwia patogenowi penetrację i zakażenie tkanek żywiciela, prowadząc do martwicy i postępu choroby (Kikot i in., 2009). Aktywność CWDE oznaczono zgodnie z metodami opisanymi przez Chang i in. (2020) oraz King i in. (2009), z niewielkimi modyfikacjami.

Do kolb o pojemności 250 ml zawierających 100 ml pożywki BBJ z dodatkiem 0,15% jednego z trzech polisacharydów: karboksymetylocelulozy, ksylanu lub pektyny, zaszczerpiono po 100 µl zawiesiny grzybów (10^5 - 10^6 jtk ml⁻¹) nietraktowanych plazmą (P0) oraz po pierwszym (P1), piątym (P5), dziesiątym (P10) lub piętnastym (P15) traktowaniu plazmą (przygotowanych zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.11.1). Hodowle prowadzono na wytrząsarce laboratoryjnej w temperaturze 25°C przez 10 dni przy 120 obr min⁻¹. Po tym czasie biomasę grzybów oddzielono od podłoża hodowlanego na filtrze Whatmana nr 1 (Whatman, Wielka Brytania) z użyciem pompy próżniowej i lejka Büchnera. Suchą masę grzybni oznaczono zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.11.4. Filtrat pochodzący przeznaczono jako surowy roztwór enzymatyczny do analizy aktywności odpowiednio karboksymetylocelulaz, ksylanaz i pektynaz. Wszystkie hodowle prowadzono w dwóch powtórzeniach.

Aktywność CWDE określono na podstawie oznaczenia cukrów redukujących uwolnionych w wyniku reakcji enzymatycznej z odpowiednim substratem. Stężenie cukrów redukujących oznaczono za pomocą metody Bernfelda (1955) opartej na teście

kolorymetrycznym z wykorzystaniem kwasu 3,5-dinitrosalicylowego (ang. dinitro salicylic acid, DNS). Reakcja z DNS nie jest specyficzna względem cukrów redukujących, w związku z czym nie pozwala na rozróżnienie poszczególnych węglowodanów. Jednak ze względu na możliwość wykrywania ogólnej hydrolizy polisacharydów, test ten wykorzystywany jest w badaniach aktywności enzymatycznej związanej z degradacją różnych rodzajów substratów polisacharydowych (King i in., 2009).

Metoda polega na redukcji grupy nitrowej soli sodowej kwasu 3,5-dinitrosalicylowego w środowisku zasadowym przez cukry redukujące uwolnione w wyniku hydrolizy enzymatycznej, zgodnie z schematem przedstawionym poniżej. Podgrzanie służy katalizie reakcji, a powstający barwny związek (kwas 3-amino-5-nitrosalicylowy) silnie absorbuje światło przy długości fali w zakresie od 450-540 nm (Wood i in., 2012).



DNS przygotowano poprzez rozpuszczenie 30 g tetrahydratu winianu sodowo-potasowego i 1 g kwasu 3,5-dinitrosalicylowego w 50 ml wody destylowanej na mieszadle magnetycznym z płytą grzejącą w temperaturze 90-95°C. Następnie dodano 20 ml 2 N NaOH. Po wystygnięciu do temperatury pokojowej uzupełniono końcową objętość wodą destylowaną do 100 ml. Roztwór przeniesiono do butelki z ciemnego szkła i przechowywano w temperaturze pokojowej (Dhiman i in., 2022).

Do pomiaru aktywności karboksymetylocelulaz, ksylanaz i pektynaz wykorzystano 1% (w/v) roztwór substratu odpowiednio karboksymetylocelulozy, ksylanu oraz pektyny w 0,1 M buforze octanowym (pH 5,0) (Chang i in., 2020).

Do 0,25 ml surowego roztworu enzymu dodano 0,25 ml 1% (w/v) roztworu substratu. Reakcję prowadzono przez 60 min w łaźni wodnej w temperaturze 40°C. Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej dodano 1 ml DNS i inkubowano w łaźni wodnej przez 15 min w temperaturze 95°C. Próbkę schładzano w kąpeli lodowej przez 5 minut a następnie pozostawiono do uzyskania temperatury pokojowej. Wykonano również kontrole negatywne aktywności każdego enzymu (bez substratu) i substratu w buforze (bez enzymu), zastępując odpowiednio substrat lub enzym tą samą objętością buforu octanowego (pH 5,5), postępując dalej zgodnie z procedurą opisaną dla prób badawczych. Absorbancję prób badawczych oraz kontrolnych zmierzono przy długości fali $\lambda=540$ nm wobec próby ślepej (0,5 ml buforu + 1 ml DNS) za pomocą spektrofotometru Cary UV-Vis

(Agilent Technologies, USA). Pomiar absorbancji wykonano w dwóch powtórzeniach dla każdej próbki. Jeśli początkowa analiza wykazała wyższe stężenie cukrów redukujących w badanej próbce niż zakres liniowy krzywej standardowej, próbkę tą ponownie zbadano poprzez odpowiednie rozcieńczenie buforem octanowym (pH 5,0) przed dodaniem odczynnika DNS, postępując dalej zgodnie z opisaną procedurą. Przyrost absorbancji prób badawczych skorygowano o wartość absorbancji odpowiednich prób kontrolnych (Dhiman i in., 2022; Miller, 1959).

Stężenie cukrów redukujących powstających w wyniku reakcji enzymów celulolitycznych oraz ksylanolitycznych oszacowano odnosząc się do krzywej standardowej glukozy, natomiast aktywność pektynaz oszacowano na podstawie krzywej standardowej dla kwasu D-galakturonowego. Krzywą standardową dla różnych stężeń (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0 oraz 3,0 mg/ml) glukozy oraz kwasu D-galakturonowego przygotowano w 0,1 M buforze octanowym o pH 5,0 w dwóch powtórzeniach, postępując analogicznie do prób badawczych (Bernfeld, 1955).

Jedną jednostkę enzymatyczną (U) zdefiniowano jako ilość enzymu, która uwalnia 1 μ mol reszt redukujących na minutę w ustalonych warunkach reakcji. Aktywność całkowitą enzymu obliczono korzystając ze wzoru nr 4 (Dhiman i in., 2022):

$$\text{Aktywność całkowita enzymu [U ml}^{-1}] = \frac{\bar{C}_g \cdot V_r \cdot 1000}{t \cdot V_e \cdot M_{cr}} \quad (4)$$

gdzie: \bar{C}_g – średnie stężenie cukrów redukujących uwolnionych w reakcji enzymatycznej z dwóch powtórzeń [mg ml^{-1}];

V_r – objętość mieszaniny reakcyjnej [ml];

1000 – współczynnik konwersji miliekwiwalentu na mikroekwiwalent;

t – czas reakcji [min];

V_e – objętość enzymu [ml];

M_{cr} – masa molowa cukru redukującego (glukozy lub kwasu D-galakturonowego) [g mol^{-1}].

3.12.3 Oznaczenie aktywności proteolitycznej

Oznaczenie aktywności proteolitycznej grzybów poddawanych wielokrotnemu działaniu plazmy niskotemperaturowej przeprowadzono zgodnie z metodyką opisaną przez Ortega i in. (2013) oraz Rodarte i in. (2011), z niewielkimi modyfikacjami.

Do kolb o pojemności 250 ml zawierających 100 ml pożywki BAP przeniesiono po 100 μ l zawiesiny grzybów (10^5 - 10^6 jtk ml^{-1}) nietraktowanych plazmą (P0) oraz po

pierwszym (P1), piątym (P5), dziesiątym (P10) lub piętnastym (P15) traktowaniu plazmą, przygotowanych zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.11.1. Inkubację prowadzono na wytrząsarce przy 120 obr min⁻¹ w temperaturze 25°C przez 7 dni. Po tym czasie zawartości każdej kolby przesączono, oznaczono suchą masę grzybni (zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.11.4), a filtrat pohodowlany przeznaczono do badań zewnątrzkomórkowej aktywności proteolitycznej. Każde doświadczenie przeprowadzono w dwóch powtórzeniach.

Aktywność proteolityczną określano poprzez inkubację 0,25 ml filtratu pohodowlanego z 0,5 ml substratu przez 2 h na wytrząsarce laboratoryjnej przy 120 obr min⁻¹ w temperaturze 30°C. Substrat stanowił roztwór kazeiny o stężeniu 1% (w/v) w buforze PBS o pH 7,4. Reakcję zatrzymano przez dodanie 0,4 ml 20% (w/v) kwasu trichlorooctowego (TCA). Próbkę umieszczono w łaźni lodowej na 30 minut. Niezhydrolizowane białka, które uległy wytrąceniu usunięto poprzez wirowanie przy 7500 obr min⁻¹ przez 15 min w 4°C. Supernatant przeniesiono do kuwety kwarcowej i zmierzono absorbancję przy długości fali $\lambda=280$ nm za pomocą spektrofotometru Cary UV-Vis (Agilent Technologies, USA). Aktywność proteolityczną określano na podstawie odczytu wartości absorbancji prób badawczych przy długości fali $\lambda=280$ nm w stosunku do odpowiedniej próby kontrolnej. Próbkę kontrolną przygotowano poprzez dodanie 0,4 ml 20% (w/v) TCA do 0,25 ml odpowiedniego filtratu pohodowlanego w celu zdenaturowania białek enzymatycznych, po czym dodano roztwór kazeiny. Próby kontrolne inkubowano w tych samych warunkach jak próby badawcze. Pomiar absorbancji wykonano w dwóch powtórzeniach.

Jedną jednostkę aktywności enzymu (U) zdefiniowano jako ilość enzymu, która w warunkach eksperymentu powoduje wzrost absorbancji ($\lambda=280$ nm) o 0,1 jednostki w ciągu 60 min. Aktywność całkowitą enzymów proteolitycznych obliczono korzystając ze wzoru nr 5 (Benmebarek i in., 2020):

$$\text{Aktywność proteolityczna [U ml}^{-1}\text{]} = \frac{(\bar{A} - \bar{A}_0) \cdot V_r}{0,1 \cdot t \cdot V_e} \quad (5)$$

gdzie: \bar{A} – średnia wartość absorbancji z dwóch powtórzeń dla próby badawczej;

\bar{A}_0 – średnia wartość absorbancji z dwóch powtórzeń dla próby kontrolnej;

V_r – objętość mieszaniny reakcyjnej [ml];

V_e – objętość surowego roztworu enzymatycznego [ml];

t – czas trwania reakcji [h].

3.12.4 Oznaczenie aktywności lipolitycznej

Aktywność enzymów lipolitycznych oznaczono zgodnie z procedurą opisaną przez Dhiman i in. (2022), z niewielkimi modyfikacjami. Do kolb o pojemności 250 ml zawierających 100 ml pożywki BAL wprowadzono po 100 μ l zawiesiny grzybów (10^5 - 10^6 jtk ml⁻¹) nietraktowanych plazmą (P0) oraz po pierwszym (P1), piątym (P5), dziesiątym (P10) i piętnastym (P15) traktowaniu plazmą (przygotowanych zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.11.1). Hodowle prowadzono na wytrząsarce laboratoryjnej przez 10 dni w temperaturze 25°C przy 120 obr min⁻¹. Po tym czasie zawartość kolb przesączono, po czym określono suchą masę grzybni (procedura opisana w podrozdziale 3.11.4). Przesącz stanowił surowy roztwór enzymatyczny, który przeznaczono do badań aktywności enzymów lipolitycznych. Wszystkie hodowle prowadzono w dwóch powtórzeniach.

Zewnątrzkomórkową aktywność lipolityczną w uzyskanych filtratach oznaczono względem tych samych substratów, które dodano do pożywki hodowlanej (Nabrdalik i Grata, 2011). Substratem reakcji była 10% emulsja oliwy w buforze Tris-HCl (pH 8,0) z dodatkiem 1% Tween 80, przygotowana w homogenizatorze przez 5 min.

Do 1 ml filtratu pochodzącego dodano 5 ml substratu i 4 ml buforu Tris-HCl (pH 8,0). Mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 2 h na wytrząsarce laboratoryjnej w temperaturze 30°C przy 120 obr min⁻¹. Reakcja hydrolizy została natychmiast zatrzymana po okresie inkubacji przez dodanie 20 ml mieszaniny aceton:etanol (1:1 v/v). Próby kontrolne przygotowano poprzez dodanie 20 ml mieszaniny acetonu i etanolu (1:1) do 1 ml przesączu, w celu denaturacji białek (w tym enzymów lipolitycznych). Następnie do mieszaniny dodano 4 ml buforu Tris-HCl (pH 8,0) oraz 5 ml emulsji oliwy. Próby kontrolne inkubowano w tych samych warunkach jak próby badawcze.

Ilość wolnych kwasów tłuszczowych, powstających w wyniku hydrolizy oliwy katalizowanej przez lipazy, oceniano poprzez miareczkowanie 0,1 N roztworem NaOH w obecności 0,1% fenolftaleiny jako wskaźnika, do momentu uzyskania jasnoróżowej barwy, utrzymującej się przez co najmniej 1 min. Oznaczenie wykonano w dwóch powtórzeniach dla każdej próbki.

Jedną jednostkę (U) aktywności lipazy zdefiniowano jako ilość enzymu, która uwalnia 1 μ mol kwasu tłuszczowego na minutę w danych warunkach analitycznych zakładając, że na miareczkowanie 1 μ mol kwasu tłuszczowego zużywa się 1 μ mol NaOH. Aktywność

lipolityczną filtratów z hodowli grzybów fitopatogennych obliczono ze wzoru nr 6 (Dhiman i in., 2022):

$$\text{Aktywność lipolityczna [U ml}^{-1}\text{]} = \frac{(\bar{V} - \bar{V}_0) \cdot C_{\text{NaOH}} \cdot V_r \cdot 1000}{t \cdot V_e} \quad (6)$$

gdzie: \bar{V} – średnia objętość roztworu wodorotlenku sodu zużyta do zmiareczkowania próby badawczej w dwóch powtórzeniach [ml];

\bar{V}_0 – średnia objętość roztworu wodorotlenku sodu zużyta do zmiareczkowania próby kontrolnej w dwóch powtórzeniach [ml];

C_{NaOH} – stężenie molowe wodorotlenku sodu [g mol^{-1}];

V_r – objętość mieszaniny reakcyjnej [ml];

t – czas reakcji [min];

V_e – objętość enzymu [ml].

3.12.5 Określenie toksyczności filtratów po hodowli grzybów fitopatogennych wielokrotnie traktowanych plazmą niskotemperaturową

Zbadano wpływ wielokrotnego traktowania grzybów fitopatogennych subletalną dawką plazmy niskotemperaturową na syntezę metabolitów zewnątrzkomórkowych w obecności nasion gospodarza oraz wpływ tych metabolitów na wzrost i wczesne stadia rozwoju nasion, zgodnie z metodyką opisaną przez Garuba i in. (2014), z niewielkimi modyfikacjami.

Do kolb o pojemności 250 ml zawierających 100 ml sterylnej pożywki BBJ wprowadzono 1 g ($\pm 0,01$ g) sterylnych nasion ogórka, a następnie zaszczerpiono 100 μl zawiesiny grzybów nietraktowanych plazmą (P0) oraz po piątym (P5), dziesiątym (P10) i piętnastym (P15) traktowaniu plazmą (przygotowanych zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.11.1). Hodowle prowadzono na wytrząsarce laboratoryjnej przy 120 obr min^{-1} w temperaturze 25°C przez 25 dni. Po tym czasie podłoże potencjalnie zawierające toksyczne metabolity zewnątrzkomórkowe oddzielono od biomasy poprzez filtrację na filtrze Whatmanna nr 1 z użyciem lejka Büchnera i pompy próżniowej. Przesącz wysterylizowano poprzez filtrację przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,22 μm (Bionovo, Polska).

W sterylnych probówkach wirówkowych o pojemności 50 ml (Bionovo, Polska) umieszczono 30 sterylnych nasion ogórka gruntowego (*Cucumis sativus*, odmiana Śremski F1), przygotowanych zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.5, a następnie dodano 25 ml nierozcieńzonego (100%) filtratu po hodowli grzybów fitopatogennych. Kontrolę

negatywną (K) stanowiły nasiona inkubowane w sterylnej pożywce BBJ. Inkubację nasion prowadzono na wytrząsarce laboratoryjnej przy 50 obr min⁻¹ w temperaturze 25°C przez 24 h. Na szalkach Petriego (120×120×17 mm) zawierających agar wodny ułożono w równych odstępach po 30 nasion uprzednio inkubowanych w filtratach pochodowlanych (tj. P0, P5, P10, P15) lub w czystej pożywce hodowlanej (K).

Nasiona pozostawiono do wzrostu w ciemności w temperaturze 25°C przez 7 dni. Liczbę wykiełkowanych nasion ogórka oceniono po 3 dniach trwania testu. Nasiona uznawano za wykiełkowane, jeżeli pojawił się korzeń o długości co najmniej 1 mm (Świecimska i in., 2020). Kiełkowanie nasion (G) obliczono według wzoru nr 7 (Hoppanová i Kryštofová, 2022):

$$G [\%] = \frac{n_k}{n_0} \cdot 100 \quad (7)$$

gdzie: n_k – liczba nasion wykiełkowanych;

n_0 – liczba wszystkich nasion.

Po 7 dniach trwania eksperymentu, siewki usunięto z podłoża i zważono pojedynczo na wadze analitycznej w celu wyznaczenia świeżej masy, a następnie pozostawiono do wysuszenia w suszarce laboratoryjnej w temperaturze 80°C przez 24 h do wyznaczenia suchej masy roślin.

3.12.6 Wzrost grzybów fitopatogennych wielokrotnie poddanych działaniu subletalnej dawki plazmy niskotemperaturowej w żywej tkance roślinnej

Dokonano oceny wzrostu badanych grzybów fitopatogennych w żywej tkance roślinnej zgodnie z metodą opisaną przez Brito i in. (2021) oraz Palmieri i in. (2020), z pewnymi modyfikacjami.

Owoce pomidora koktajlowego (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) zdezynfekowano powierzchniowo zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.6, a następnie umieszczono osobno w sterylnych pojemnikach z tworzywa sztucznego z korkiem wykonanym z pianki o wysokiej gęstości, umożliwiającym wymianę gazową z jednoczesną ochroną przed kontaminacją. W skórce owoców pomidora wykonano pojedyncze nakłucie końcówką pipety i wprowadzono 10 µl zawiesiny grzybów (10^5 - 10^6 jtk ml⁻¹) nietraktowanych plazmą (P0) oraz po pierwszym (P1), piątym (P5), dziesiątym (P10) i piętnastym (P15) traktowaniu plazmą, przygotowanych zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.11.1. Kontrolę negatywną (K) stanowiły owoce, do których wprowadzono 10 µl sterylnej wody dejonizowanej. Pojemniki z owocami zamknięto

korciem i umieszczono w plastikowym pojemniku z pokrywą, zapobiegającym utracie wilgotności. Owoce inkubowano w temperaturze 25°C w ciemności, a miejsca infekcji obserwowano przez 7 dni. Eksperymenty przeprowadzono w dwóch powtórzeniach, z trzema owocami w każdym powtórzeniu.

Po 7 dniach trwania eksperymentu oceniono wielkość porażenia powierzchni owoców, a objawy sklasyfikowano w pięciostopniowej skali, według kryteriów opisanych w tabeli nr 4.

Tabela 4. Wizualna ocena (skala) objawów choroby grzybiczej owoców pomidora (*Solanum lycopersicum*) do oceny nasilenia infekcji, na podstawie (Brito i in., 2021).

Stopień porażenia	Objawy	Wniosek
0	brak widocznych objawów	brak infekcji
1	1-25% powierzchni jest pokryte grzybnią	łagodna infekcja
2	26-50% powierzchni jest pokryte nekrotyczną grzybnią	umiarkowana infekcja
3	51-75% powierzchni jest pokryte grzybnią z dużą ilością zarodników	silna infekcja
4	76-100% martwiczej tkanki, która utraciła jędrność rozpada się wraz z masą grzybiczą	bardzo ciężka infekcja

Wskaźnik nasilenia choroby (ang. disease severity index, DSI) obliczono za pomocą równania Townsenda-Heubergera (Brito i in., 2021):

$$DSI [\%] = \frac{\sum (n \cdot v)}{N \cdot X} \cdot 100 \quad (8)$$

gdzie: n – liczba przypadków mieszczących się w danym stopniu porażenia;

v – stopień porażenia według skali (0-4);

N – całkowita liczba badanych przypadków;

X – najwyższy stopień porażenia.

3.12.7 Zdolność grzybów fitopatogennych poddanych wielokrotnemu działaniu plazmy do infekcji nasion ogórka

W badaniu tym sprawdzono wpływ wielokrotnego traktowania grzybów fitopatogennych plazmą niskotemperaturową na ich zdolność do infekcji nasion i wywoływanie objawów choroby w oparciu o metody opisane przez Świecimska i in. (2020).

Sterylna nasiona ogórka (*Cucumis sativus*, odmiana Śremski F1) przeniesiono do sterylnych probówek wirówkowych o pojemności 50 ml, do których dodano po 25 ml zawiesiny grzybów (10^5 - 10^6 jtk ml⁻¹) nietraktowanych plazmą (P0) oraz po pierwszym (P1), piątym (P5), dziesiątym (P10) lub piętnastym (P15) traktowaniu plazmą, przygotowanych zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.11.1. Kontrolę negatywną (K) stanowiły nasiona inkubowane w tej samej objętości sterylnej wody dejonizowanej. Inkubację prowadzono na wytrząsarce laboratoryjnej przy 50 obr min⁻¹ w temperaturze 25°C przez 1 h. Drugą porcję nasion pozostawiono do inkubacji przez 24 h w tych samych warunkach. Po określonym czasie inkubacji (1 h lub 24 h) nasiona oddzielono od zawiesiny grzybów, przepłukano trzykrotnie 10 ml sterylnej wody dejonizowanej w celu usunięcia grzybni nieprzytwierdzonej do powierzchni nasion i pozostawiono do wyschnięcia w sterylnych płytkach Petriego w temperaturze pokojowej przez 1 h pod komorą laminarną.

Trzydzieści nasion inkubowanych z zawiesiną grzybów (tj. P0, P5, P10, P15) lub w wodzie (K) umieszczono aseptycznie w równych odstępach na szalkach Petriego (120×120×17 mm) z zestalonym agarom wodnym. W badaniu tym celowo zastosowano podłoże pozbawione składników odżywczych, tak, aby to nasiona stanowiły jedyne źródło składników odżywczych dla patogenów grzybowych. Takie podejście umożliwiło obserwację zmian chorobowych zachodzących w nasionach podczas ataku patogenów. Eksperyment był prowadzony przez 14 dni w stałych warunkach wzrostu w temperaturze 25°C.

Kiełkowanie nasion ogórka oceniono po 3 dniach trwania testu (wzór nr 7). Nasiona uznawano za wykiełkowane, jeżeli pojawił się korzeń o długości co najmniej 1 mm. Oceniono również liczbę żywotnych siewek, które rozwinęły się po 7 i 14 dniach trwania testu. Żywotność siewek podano w procentach (Zhou i in., 2018). Rośliny ze zmiękczonejmi, pożółkłyimi tkankami uznawano za zdegradowane i nieżywe (martwe) (Li i in., 2019).

3.12.8 Zdolność grzybów fitopatogennych poddanych wielokrotnemu działaniu plazmy do infekcji roślin ogórka

W celu oceny zmian zjadliwości oraz patogeniczności grzybów poddawanych wielokrotnemu traktowaniu subletalną dawką plazmy nietermicznej zastosowano metodę uprawy roślin w podłożu sztucznie inokulowanym zawiesiną badanych grzybów, opisaną przez Chang i in. (2015), z niewielkimi modyfikacjami.

Ziemię ogrodniczą pozyskano z lokalnego sklepu ogrodniczego i wysuszono na powietrzu, a następnie przesiano przez sito laboratoryjne (Retsch, Niemcy) o średnicy oczek $\varnothing=2$ mm w celu usunięcia dużych fragmentów roślinnych oraz kamieni. Piasek wysterylizowano w suszarce laboratoryjnej w temperaturze 180°C przez 1 h i zmieszano z ziemią ogrodniczą w stosunku wagowym 1:2. Porcje tak przygotowanego podłoża zostały następnie sztucznie inokulowane zawiesiną grzybów fitopatogennych niepoddanych działaniu plazmy (P0), oraz po piątym (P5), dziesiątym (P10) i piętnastym (P15) traktowaniu plazmą w końcowym stężeniu komórek $10^3\text{-}10^4$ jtk na 1 g podłoża, poprzez dodanie odpowiedniej objętości zawiesiny (przygotowanej analogicznie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.11.1) i dokładne wymieszanie.

Przygotowane podłoże umieszczono w dołkach na 66-dołkowej palecie dla wzrostu sadzonek. W każdym dołku umieszczono po jednym nasieniu ogórka i delikatnie przykryto warstwą odpowiedniego podłoża. Grupę kontrolną stanowiły nasiona ogórka uprawiane w podłożu nie inokulowanym zawiesiną grzybów (K).

Eksperyment prowadzono przez 14 dni w temperaturze pokojowej ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) w trybie dzień-noc (16h:8h). Rośliny regularnie nawadniano wodą wodociągową. Po dwóch tygodniach wzrostu rośliny zostały zebrane i oczyszczone z pozostałości gleby, poprzez płukanie pod bieżącą wodą i osuszenie na ręczniku papierowym.

Przeanalizowano kiełkowanie nasion (wzór nr 7), długość pędów i korzeni oraz świeżą masę roślin. Rośliny z każdej grupy testowej suszono w temperaturze 80°C przez 24 h do wyznaczenia suchej masy. Obliczono wskaźnik wigoru masy siewek (ang. seedling weight vigour index, SWVI) korzystając ze wzoru nr 9 (Hassani i in., 2019):

$$\text{SWVI} = \text{SM} \cdot \text{G} \quad (9)$$

gdzie: SM – sucha masa roślin z danej grupy [mg];

G – kiełkowanie nasion (wzór nr 7) [%].

3.12.9 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono w programie Statistica wersja 13.3 (StatSoft Inc. Kraków, Polska). W celu określenia istotności różnic pomiędzy grupami badawczymi uzyskane wyniki badań poddano wstępnej analizie statystyk opisowych. Oceniono jednorodność wariancji testem Browna-Forsytha, natomiast normalność rozkładu zmiennych zależnych zbadano za pomocą testu Shapiro-Wilka. Dla zbiorów spełniających warunek normalności rozkładu oraz jednorodności wariancji wykonano analizę istotności różnic przy użyciu testu Tukey'a, natomiast dla danych niespełniających przynajmniej

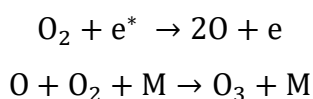
jeden z podanych warunków wykonano test nieparametryczny ANOVA (ang. analysis of variance) Kruskala-Wallisa. Za poziom istotności statystycznej przyjęto $p < 0,05$. W rozkładzie normalnym podstawowymi parametrami są średnia i odchylenie standardowe, natomiast parametrami opisującymi rozkład skośny jest mediana, jako miara wartości przeciętnej oraz kwartyle, jako miara rozrzutu wyników. Wykonano analizę korelacji, gdzie wartość -1 współczynnika korelacji reprezentuje doskonałą korelację ujemną, a wartość $+1$ doskonałą korelację dodatnią, natomiast wartość 0 wyraża brak korelacji.

4. Wyniki i dyskusja

4.1 Charakterystyka plazmy generowane w reaktorze DBD

We wszystkich badaniach opisanych w niniejszej pracy użyto reaktora plazmowego z wyładowaniami dielektrycznymi barierowymi (DBD). Do zbadania głównych wzbudzonych form generowanych w reaktorze DBD wykorzystano metodę spektroskopii OES, która ujawniła generowanie RFT oraz RFA. Wyniki analizy wraz z ich dokładnym opisem zostały opublikowane w artykule naukowym (Maliszewska i in., 2024).

Ujawniono również generowanie ozonu w zastosowanym układzie badawczym. Powstawanie tego gazu w plazmie zachodzi w dwóch etapach. Pierwszym z nich jest dysocjacja cząsteczek tlenu (O_2) w wyniku zderzeń z wysokoenergetycznymi elektronami (e^*) wytwarzanymi podczas mikrowyładowań plazmy. Powstający tlen atomowy (O) reaguje dalej z cząsteczką tlenu oraz trzecim partnerem zderzenia (M), np. O_2 , O_3 lub N_2 , działającym jako katalizator, który uczestniczy w absorpcji energii, ale nie reaguje chemicznie. W efekcie atomowy tlen łączy się z cząsteczkowym tlenem tworząc ozon (O_3) (Malik i in., 2016; Mastanaiah i in., 2013). Schemat opisanej reakcji przedstawiono poniżej.



Podczas 10 minutowego działania reaktora DBD maksymalny zarejestrowany poziom ozonu wyniósł 10 ppm, gdzie 1 ppm ozonu odpowiada 1 mg l^{-1} (Mastanaiah i in., 2013). Jednocześnie zaobserwowano wzrost temperatury elementów reaktora plazmowego z 22°C do 28°C , co również negatywnie wpływa na stabilność i stężenie ozonu w urządzeniu, wykluczając jednocześnie wpływ termiczny na inaktywację grzybów fitopatogennych.

Według Jodzis i Baran (2022) wzrost temperatury gazu w szczelinie wyładowczej utrudnia odprowadzanie ciepła z kanałów mikrowyładowań, w których dochodzi do rozkładu ozonu w wyniku chwilowego wzrostu temperatury (energii), pośrednio wpływając na obniżenie stężenia ozonu.

Ozon ma silne właściwości utleniające (Epelle i in., 2023). Natomiast opinie dotyczące znaczenia ozonu w inaktywacji mikroorganizmów przez plazmę niskotemperaturową są podzielone.

Park i in. (2022) opracowali technologię wytwarzania zimnej plazmy o niskiej zawartości ozonu do zastosowań stomatologicznych (ang. no-ozone cold plasma, NCP),

ograniczającą szkodliwe działanie ozonu na tkanki ludzkie oraz układ oddechowy. Autorzy wykazali wysoką skuteczność plazmy niskotemperaturowej przeciwko czterem patogenom jamy ustnej, pomimo nieznacznych stężeń ozonu (0,011 i 0,002 ppm, w zależności od konfiguracji aparatury). Działanie biobójcze za pośrednictwem NCP w pożywce płynnej przypisano przede wszystkim formowaniu H₂O₂. Z kolei w bezpośrednim działaniu NCP względem bakterii na podłożu stałym uczestniczą naładowane cząstki.

Z kolei Rangel i in. (2022) stwierdzili, że niskie dawki ozonu (5-10 ppm) wprawdzie nie powodują zahamowania wzrostu mikroorganizmów, ale wpływają na obniżenie żywotności komórek poprzez wywoływanie zmian morfologicznych oraz wzrost poziomu reaktywnych form tlenu wewnątrz komórek, bez niszczenia błony komórkowej.

Z drugiej strony niektórzy autorzy twierdzą, że ozon wydaje się być najbardziej destrukcyjnym spośród reaktywnych form generowanych w plazmie atmosferycznej.

Epelle i in. (2022) zaobserwowali wzrost efektywności usuwania *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus fumigatus* i *Candida albicans* wraz ze wzrostem czasu ekspozycji i stężenia ozonu generowanego w komorze sterylizacyjnej. Badania wykazały, że komórki bakterii charakteryzują się znacznie wyższą wrażliwością na ozon w porównaniu do grzybów. Ekspozycja na 2 ppm ozonu przez 16 min doprowadziła do inaktywacji ponad 99% komórek *S. aureus* oraz 94% *E. coli*. Natomiast dla *C. albicans* i *A. fumigatus* redukcja liczby komórek wyniosła odpowiednio 54% oraz 30%. Ekspozycja wszystkich badanych mikroorganizmów na 20 ppm ozonu przez 4 minuty doprowadziła do całkowitej inaktywacji komórek. Przypuszcza się, że przyczyną różnic wrażliwości mikroorganizmów na ozon może być odmienna struktura ściany komórkowej (Epelle i in., 2023; Napp i in., 2016).

4.2 Identyfikacja grzybów izolowanych ze środowiska

Reakcje niespecyficzne wykazały zgodność izolatów *Alternaria* sp. z *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. longipes* i *A. brassicae*, oraz izolatów *Fusarium* sp. z *F. acuminatum*, *F. tricinctum* i *F. avenaceum*. Natomiast reakcje ze starterami specyficznymi wykazały, że izolat *Alternaria* sp. należy do gatunku *A. alternata*, a izolat *Fusarium* sp. do gatunku *F. tricinctum* (rysunek 14). Sekwencje *A. alternata* (GenBank: PP869429.1) i *F. tricinctum* (GenBank: PP869455.1) zostały zdeponowane w GenBank NCBI.



Rysunek 14. Kolonie grzybów wyizolowanych ze środowiska po 11 dniach inkubacji na podłożu PDA.

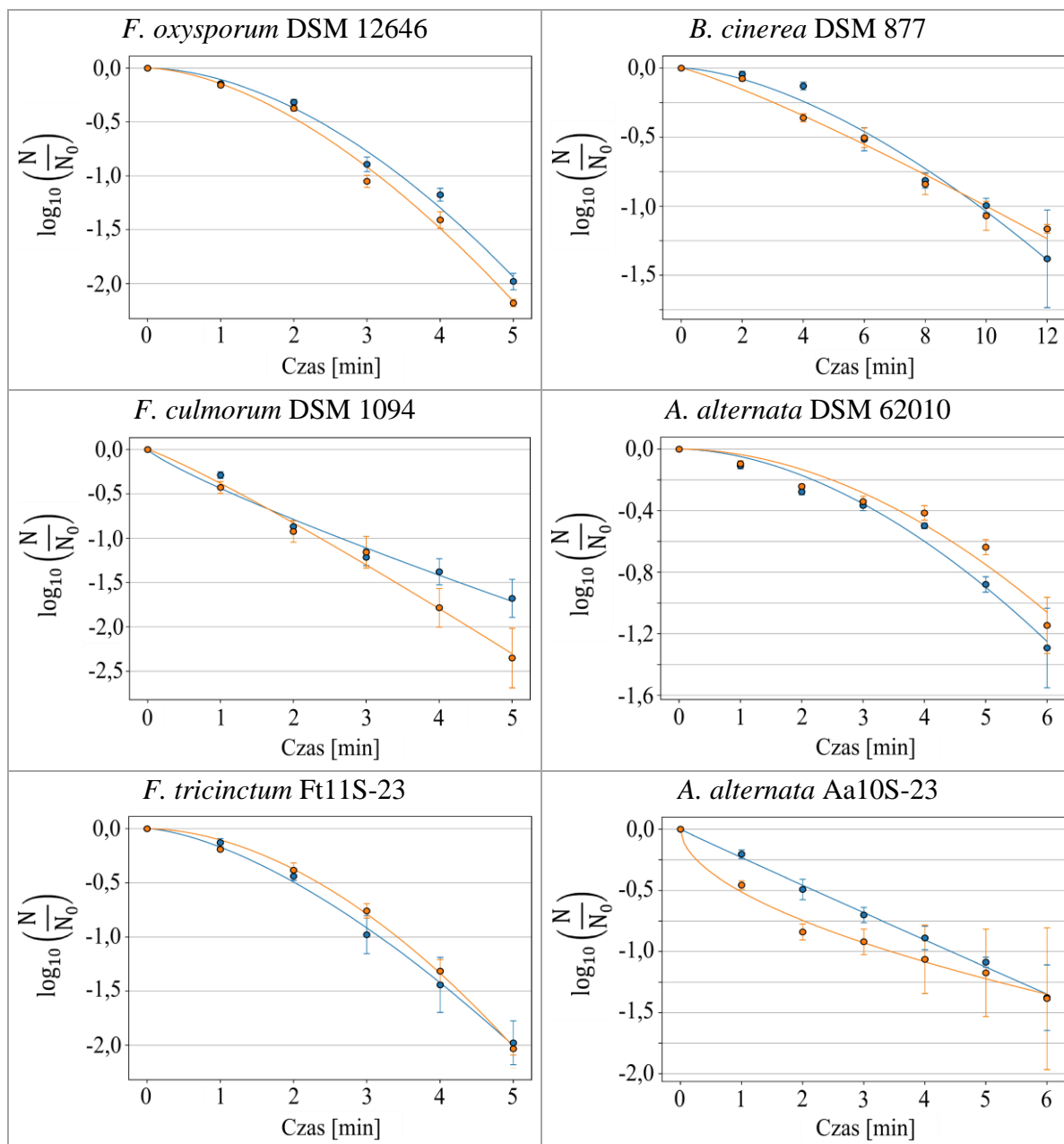
4.3 Kinetyka inaktywacji grzybów fitopatogennych przez plazmę nietermiczną oraz wyznaczenie dawek subletalnych

Kinetykę inaktywacji komórek grzybów fitopatogennych na powierzchni tektury i drewna za pomocą nietermicznej plazmy atmosferycznej przedstawiono na wykresie nr 1.

Efekt inaktywacji komórek grzybów pod wpływem działania plazmy stopniowo wzrastał w sposób zależny od czasu traktowania. Eksperymentalne badanie kinetyki inaktywacji komórek ma ogromne znaczenie dla określenia czasowej miary niszczenia drobnoustrojów oraz jej przebiegu w czasie (Dasan i in., 2017). W tym celu wyznaczono wartości parametrów kinetyki (δ i p) dla grzybów fitopatogennych usuwanych na powierzchni tektury i drewna.

Wartość δ określa minimalny czas wymagany do dziesięciokrotnej redukcji początkowej populacji mikroorganizmów w określonych warunkach, co odpowiada redukcji początkowej liczby drobnoustrojów (obciążenia biologicznego) o jedną jednostkę logarytmiczną, czyli inaktywacji 90% drobnoustrojów (Dasan i in., 2017; Mazzola i in., 2006).

Współczynnik kształtu krzywej przeżycia (p) z kolei opisuje, w jaki sposób przeżywalność populacji zmienia się w czasie. Gdy $p < 1$ krzywa przeżycia jest wklęsła, co świadczy o szybkiej inaktywacji komórek mikroorganizmów na początku procesu, a z czasem tempo inaktywacji maleje. Gdy $p = 1$ krzywa przeżycia jest liniowa, co odpowiada modelowi pierwszorzędowej kinetyki inaktywacji, w której mikroorganizmy giną w stałym tempie niezależnie od czasu traktowania. Natomiast $p > 1$ (wypukła krzywa przeżycia) oznacza, że tempo inaktywacji mikroorganizmów rośnie z czasem.



Wykres 1. Zależność redukcji żywych komórek na powierzchni tektury (pomarańczowy) i drewna (niebieski) od długości czasu obróbki plazmą. Linie ciągłe wskazują na dopasowanie modelu Weibulla. Słupki błędów wskazują odchylenia standardowe dla 3 powtórzeń.

Wartości parametrów kinetyki (δ i p) dla grzybów fitopatogennych usuwanych z powierzchni tektury i drewna przedstawiono w tabeli nr 5.

Tabela 5. Parametry kinetyczne modelu Weibulla wyznaczone dla grzybów fitopatogennych poddawanych działaniu plazmy niskotemperaturowej na powierzchni tektury i drewna. δ - dziesiąty czas redukcji, p - współczynniki kształtu krzywej przeżycia.

Szczep	Tektura		Drewno	
	δ	p	δ	p
<i>F. oxysporum</i> DSM 12646	3 min 10 s	1,68	3 min 27 s	1,80
<i>F. culmorum</i> DSM 1094	2 min 22 s	1,12	2 min 39 s	0,85
<i>F. tricinctum</i> Ft11S-23	3 min 25 s	1,84	3 min 11 s	1,53
<i>B. cinerea</i> DSM 877	10 min 0 s	1,16	9 min 53 s	1,60
<i>A. alternata</i> DSM 62010	5 min 49 s	1,90	5 min 32 s	1,81
<i>A. alternata</i> Aa10S-23	3 min 27 s	0,54	4 min 26 s	0,98

Wyznaczenie wartości δ ujawniło różnice wrażliwości badanych mikroorganizmów na zimną plazmę, zarówno w zależności od szczepu jak i od rodzaju powierzchni. Największą wrażliwość wykazywał *F. culmorum* DSM 1094, następnie *F. oxysporum* DSM 12646, *F. tricinctum* Ft11S-23, *A. alternata* Aa10S-23, *A. alternata* DSM 62010. Najbardziej oporny na działanie plazmy okazał się *B. cinerea* DSM 877, dla którego δ wynosiło około 10 min niezależnie od rodzaju powierzchni.

Do dalszych badań przyjęto dawkę subletalną plazmy nietermicznej, odpowiadającą wartości δ dla grzybów fitopatogennych inaktywowanych na powierzchni drewna.

Wartość p wskazuje na charakter krzywej przeżycia. Dla *F. oxysporum* DSM 12646, *F. tricinctum* Ft11S-23, *B. cinerea* DSM 877 i *A. alternata* DSM 62010 obserwujemy, że zarówno na tekturze, jak i na drewnie $p > 1$, wskazując na wypukły charakter krzywej przeżycia, co oznacza, że inaktywacja jest szybsza na początku traktowania plazmą, a następnie zwalnia.

Z kolei dla *F. culmorum* DSM 1094 na drewnie $p < 1$ wskazując na wklęsły charakter krzywej. Oznacza to, że inaktywacja przyspiesza z czasem. Natomiast na tekturze $p > 1$, co wskazuje na wypukły charakter krzywej.

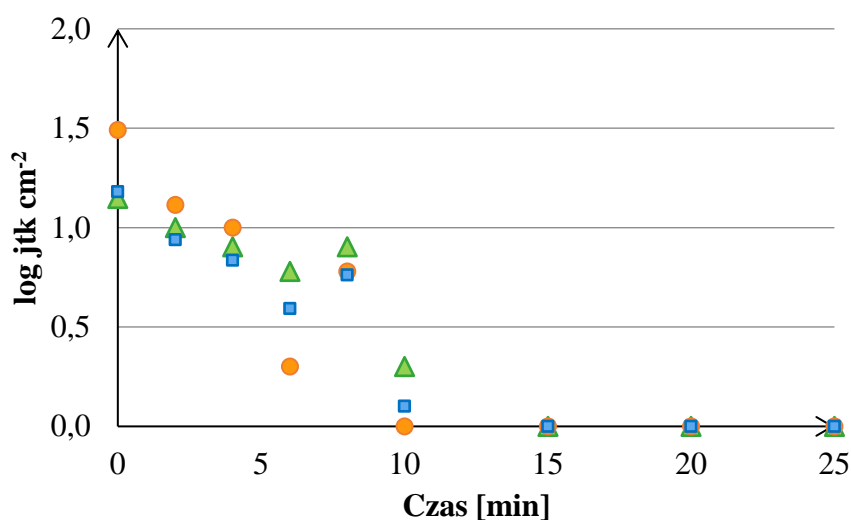
Dla *A. alternata* Aa10S-23 zaobserwowano, że na drewnie współczynnik p jest bliski 1, co sugeruje, że krzywa jest prawie liniowa. Z kolei na tekturze $p < 1$ wskazuje na wklęsły charakter krzywej.

Odejście od liniowości przypisuje się głównie kombinacji różnych składników o działaniu biobójczym w plazmie nietermicznej, rozkładowi odporności na stres generowany przez te czynniki w populacji drobnoustrojów oraz zmieniającemu się stężeniu czynników biobójczych podczas działania plazmy (Corradini, 2020).

4.4 Skuteczność inaktywacji drobnoustrojów z powierzchni drewnianych skrzynek

Zbadano skuteczność atmosferycznej plazmy niskotemperaturowej w inaktywacji drobnoustrojów z powierzchni skrzynek wykorzystywanych do przechowywania ziemniaków, które były naturalnie zasiedlone przez drobnoustroje, w tym komórki grzybów. Drewniane materiały opakowaniowe, takie jak skrzynki, palety i pudła, odgrywają kluczową rolę w globalnym transporcie i przechowywaniu towarów. Ze względu na ich powszechne użycie, obejmujące 85% wszystkich transportowanych towarów, stanowią nieodłączny element w logistyce i handlu międzynarodowym (Giordano i in., 2021).

Skuteczność biobójczą zimnej plazmy przedstawiono jako redukcję liczby żywotnych komórek mikroorganizmów (jtk) zanieczyszczających powierzchnię 1 cm² drewnianej skrzynki (wykres 2).



Wykres 2. Zależność redukcji liczby mikroorganizmów od czasu traktowania plazmą niskotemperaturową dla trzech powtórzeń.

Z wykresu nr 2 wynika, że liczba mikroorganizmów malała wraz z czasem traktowania powierzchni drewnianych skrzynek zimną plazmą atmosferyczną. Traktowanie plazmą przez co najmniej 20 minut zapewniło pełną inaktywację mikroorganizmów w każdym powtórzeniu, co potwierdza wysoką skuteczność tego procesu.

Zachowanie niskiej wilgotności środowiska ma kluczowe znaczenie w zapobieganiu rozwojowi pleśni na opakowaniach oraz ich przenoszeniu na żywność podczas przechowywania (Montibus i in., 2016). Zimna plazma, jako metoda niewymagająca użycia wody i środków chemicznych, może ograniczać zatem dalszy rozwój

i rozprzestrzenianie się patogenów. Poza tym, nie przyczynia się do powstawania płynnych ścieków, a produkty plazmy charakteryzują się krótką żywotnością i nie pozostają w środowisku ani na powierzchniach opakowań, eliminując zagrożenie przeniesienia na przechowywaną żywność (zgodnie z rozporządzeniem nr 1935/2004, Dz.U. L 338 z 13.11.2004).

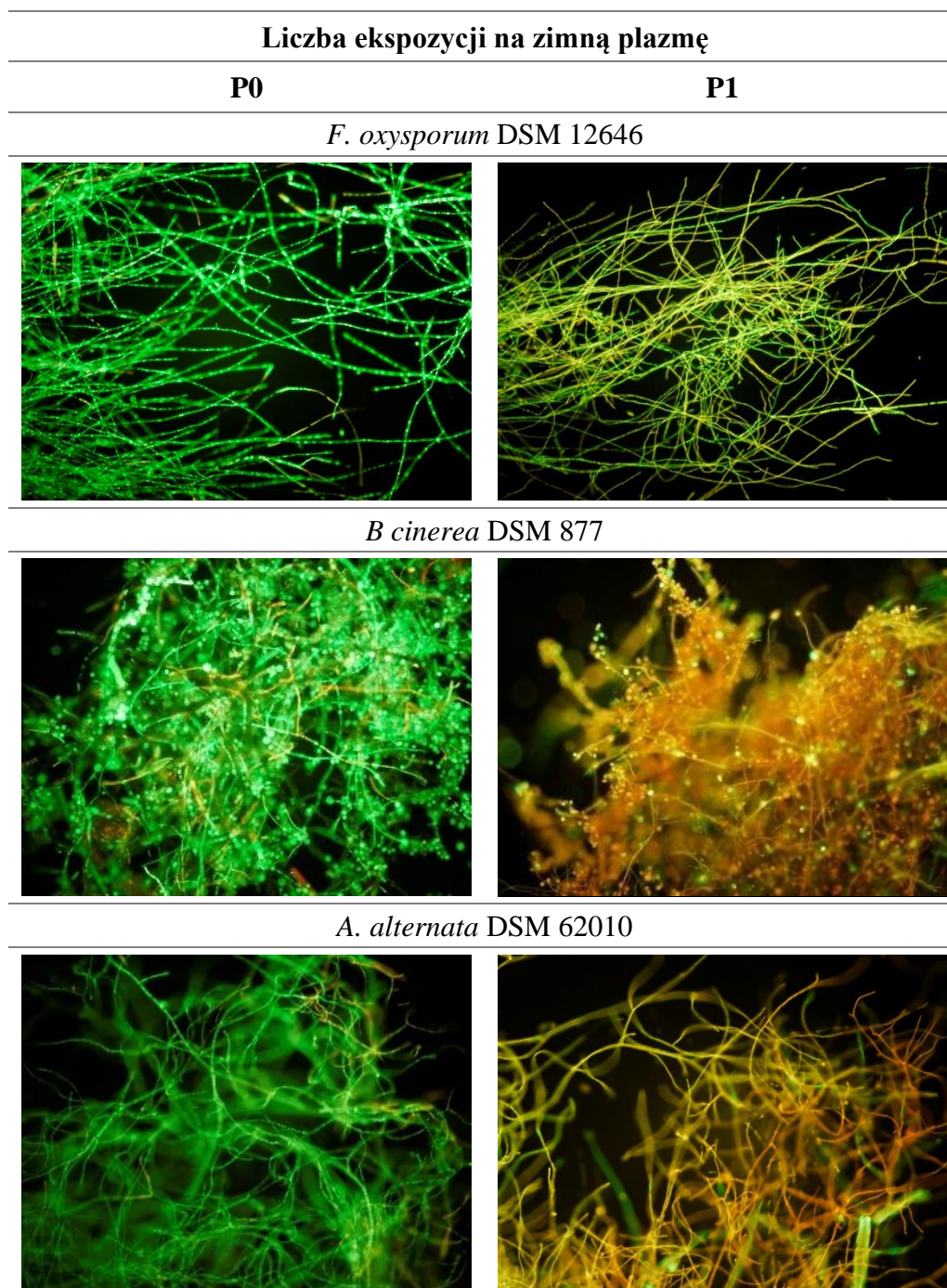
Większość badań nad skutecznością inaktywacji mikroorganizmów za pomocą zimnej plazmy dotyczy powierzchni drewnianych sztucznie inokulowanych zawiesiną bakterii (González-Arenzana i in., 2021; Kim i in., 2021). Niewiele wiadomo natomiast na temat usuwania zanieczyszczeń mikrobiologicznych, w tym grzybów pleśniowych, szczególnie tych naturalnie występujących na powierzchni drewna. Ze względu na brak danych literaturowych, wyniki badań własnych nie mogą być porównane do wyników uzyskanych przez innych autorów.

4.5 Mechanizm działania plazmy niskotemperaturowej na komórki grzybów fitopatogennych

Dla sprawdzenia wpływu niskotemperaturowej plazmy na integralność błon komórkowych badanych grzybów zastosowano obrazowanie fluorescencyjne z użyciem SYTO 9 i jodku propidyny (PI). Uzyskane wyniki umożliwiły jakościową ocenę efektu subletalnej dawki plazmy nietermicznej na żywotność komórek oraz przepuszczalność błon grzybów fitopatogennych. Jodek propidyny, będący kationowym barwnikiem kwasów nukleinowych, nie przenika do żywych komórek o nienaruszonych błonach. Uszkodzenie komórek lub apoptoza zwiększają przepuszczalność błon, umożliwiając PI penetrację i wiązanie się z kwasami nukleinowymi, co skutkuje powstaniem kompleksu PI-DNA emitującego czerwoną fluorescencję. Badanie wykazało podobne obrazy fluorescencji dla wszystkich badanych szczepów grzybów, dlatego na rysunku nr 15 przedstawiono wyniki uzyskane dla trzech szczepów kolekcyjnych (*F. oxysporum* DSM 12646, *B. cinerea* DSM 877 i *A. alternata* DSM 62010).

Grzybnia kontrolna (P0) nietraktowana plazmą wykazywała niewielką fluorescencję PI z powodu naturalnej śmierci części komórek w hodowli. Zgodnie z oczekiwaniami, intensywność czerwonej fluorescencji wzrosła wskutek ekspozycji na plazmę, przy jednoczesnym spadku intensywności zielonej fluorescencji, co wskazuje na wzrost przepuszczalności błony komórkowej. Wyniki obrazowania fluorescencyjnego (rysunek 15) sugerują, że mechanizm działania zimnej plazmy przeciwko patogenom grzybowym (tutaj *F. oxysporum* DSM 12646, *B. cinerea* DSM 877 i *A. alternata* DSM 62010)

prawdopodobnie oparty jest na niszczeniu struktury osłon komórkowych prowadząc do zmniejszenia żywotności komórek grzybów.



Rysunek 15. Barwienie fluorescencyjne grzybni szczepów kolekcyjnych przed (P0) i po (P1) traktowaniu subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej. Powiększenie całkowite 200×.

Podobnych obserwacji dokonali Handorf i in. (2018), którzy badali wpływ plazmy niskotemperaturowej na biofilm utworzony przez *C. albicans* SC5314. Barwienie jodkiem propidyny oraz analiza morfologiczna biofilmów przy użyciu mikroskopii sił atomowych potwierdziły śmierć komórek wskutek rozerwania struktury błon i wycieku zawartości

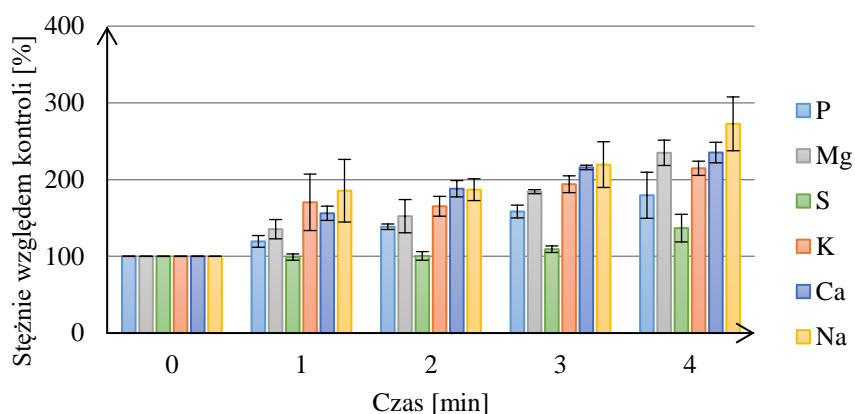
wewnątrzkomórkowej po traktowaniu zimną plazmą, przy czym najbardziej efektywna inaktywacja komórek była obserwowana w głębszych warstwach biofilmów. Autorzy twierdzą, że w miarę przedłużania czasu obróbki plazmą komórki odłączają się od struktury biofilmu, odsłaniając kolejne warstwy żywych komórek.

Zniszczenie struktury błon komórkowych przez plazmę potwierdzono również w oparciu o badania stężenia białek, DNA oraz związków chemicznych wyciekających z komórek.

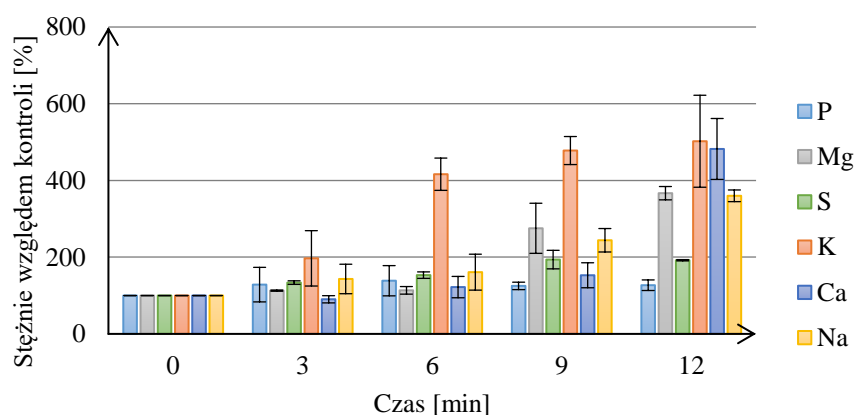
Na wykresie nr 3 przedstawiono wyniki składu pierwiastkowego supernatantów otrzymanych po odwirowaniu grzybni *F. oxysporum* DSM 12646, *A. alternata* DSM 62010 i *B. cinerea* DSM 877 traktowanych plazmą niskotemperaturową. Kontrolę stanowiły supernatanty grzybni nietraktowanych plazmą ($t=0$). Jak widać na poniższym wykresie stężenia większości pierwiastków oznaczanych w supernatantach wzrosły wskutek wydłużania czasu ekspozycji na zimną plazmę.

Stężenie Mg, K, Ca oraz Na po traktowaniu grzybni *F. oxysporum* DSM 12646 zimną plazmą przez 4 min było o 115%-173% wyższe w porównaniu do kontroli nietraktowanej plazmą, natomiast stężenia P i S wzrosły odpowiednio o 80% i 37%. Dla *B. cinerea* DSM 877 również widoczny jest wzrost zawartości pierwiastków w supernatantach w miarę przedłużania czasu traktowania grzybni plazmą, szczególnie w przypadku Mg, K, Ca i Na, których stężenie po 12 min ekspozycji było o 260% do 402% wyższe w porównaniu do kontroli ($t=0$). Natomiast stężenia P i S w tych samych warunkach wzrosły odpowiednio o 27% i 92%. W przypadku *A. alternata* DSM 62010 zaobserwowano stopniowy wzrost stężenia oznaczanych pierwiastków wraz z przedłużaniem czasu traktowania grzybni zimną plazmą do 8 min, przy czym największą różnicę wykryto dla Ca i Na, których stężenia były odpowiednio 97% i 80% wyższe w porównaniu do kontroli nietraktowanej plazmą, natomiast stężenia S i Mg były o 61% i 56% wyższe. Najmniejsze różnice zaobserwowano dla P i Mg, dla których doszło początkowo do spadku stężenia w wyniku działania plazmy, natomiast po 8 min ekspozycji grzybni *A. alternata* DSM 62010 na plazmę stężenia obu pierwiastków wzrosły odpowiednio o 21% oraz 56% w porównaniu do kontroli (P0).

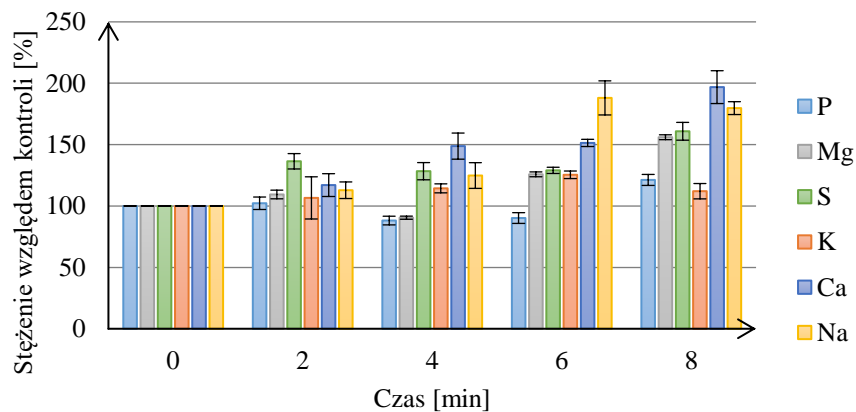
F. oxysporum DSM 12646



B. cinerea DSM 877



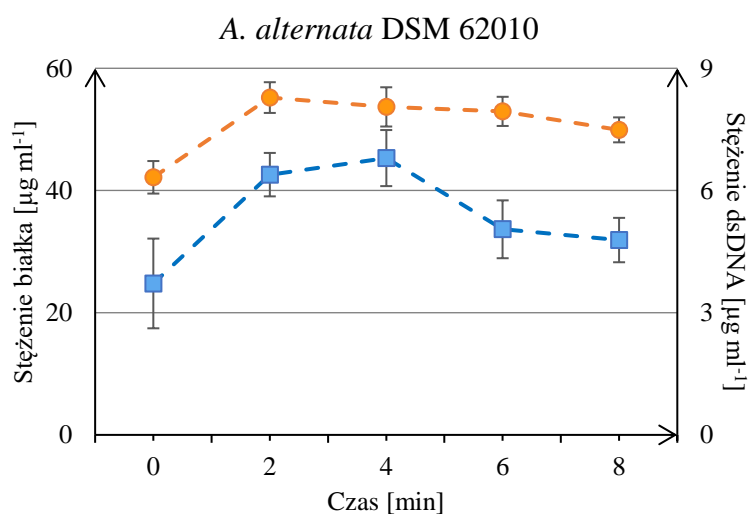
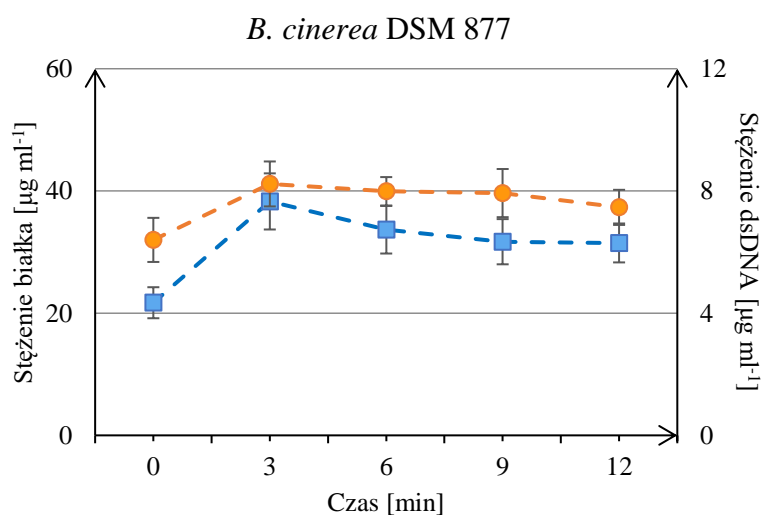
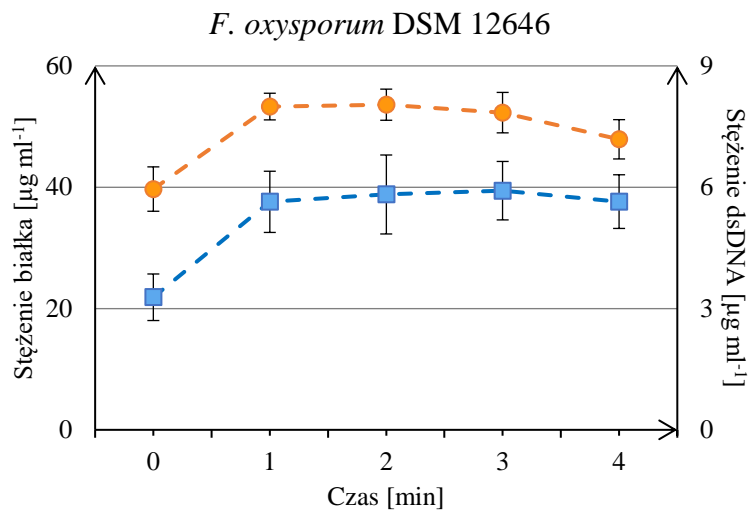
A. alternata DSM 62010



Wykres 3. Stężenia pierwiastków w supernatantach uzyskanych po traktowaniu grzybni plazmą niskotemperaturową, wyrażone jako stosunek względem kontroli. Stężenie pierwiastków w kontroli przyjęto jako 100%.

W celu określenia stężenia białka w supernatantach wykreślono krzywą standardową ($y=0,005x+0,176$; $R^2=0,9941$) wartości absorbancji (y) w funkcji stężenia BSA (x).

Na wykresie nr 4 przedstawiono wyniki zmian stężenia dsDNA i białka w supernatantach otrzymanych po wirowaniu grzybni traktowanej zimną plazmą. Kontrolę stanowiły supernatanty grzybni nietraktowanej plazmą (t=0).



Wykres 4. Stężenia białka (niebieskie znaczniki, lewa oś y) i dsDNA (pomarańczowe znaczniki, prawa oś y) uwolnionych z komórek grzybów w wyniku działania plazmy niskotemperaturowej.

We wszystkich przypadkach traktowanie grzybni zimną plazmą spowodowało wypływ materiału genetycznego i białek z komórek, prowadząc do wzrostu stężenia tych molekuł w supernatantach.

Stężenie białka w supernatantach uzyskanych po traktowaniu grzybni *F. oxysporum* DSM 12646 zimną plazmą było od 72% do 80% wyższe w porównaniu do kontroli ($21,9 \pm 3,84 \mu\text{g ml}^{-1}$), przy czym najwyższą wartość wynoszącą $39,4 \pm 4,8 \mu\text{g ml}^{-1}$ osiągnięto po 3 min traktowania komórek plazmą. Z kolei stężenie DNA w supernatantach wzrosło o 20,7%-35,0% w porównaniu do kontroli, uzyskując najwyższą wartość ($8,04 \pm 0,38 \mu\text{g ml}^{-1}$) po 2 min traktowania plazmą.

Traktowanie grzybni *B. cinerea* DSM 877 zimną plazmą przez 3 min spowodowało największy wzrost stężenia DNA oraz białka w supernatancie (odpowiednio o 28% oraz 76%) w porównaniu do kontroli.

Najwyższe stężenie białka po traktowaniu grzybni *A. alternata* DSM 62010 ($45,3 \pm 4,6 \mu\text{g ml}^{-1}$) było obserwowane po 4 min traktowania plazmą (stężenie białka było ponad 82% wyższe w porównaniu do kontroli). Natomiast traktowanie grzybni plazmą niskotemperaturową przez 2 min spowodowało wzrost stężenia DNA w supernatancie o 31% w porównaniu do kontroli.

Uzyskane wyniki pokazują, że stężenie białka w supernatantach początkowo rosło do osiągnięcia najwyższych wartości po 3 min dla *F. oxysporum* DSM 12646 i *B. cinerea* DSM 877 oraz po 4 min dla *A. alternata* DSM 62010, po czym następował stopniowy spadek stężenia. Podobnie w przypadku dsDNA uwolnionego z komórek, najwyższe stężenia wykryto w supernatantach otrzymanych po 2 min ekspozycji grzybni *F. oxysporum* DSM 12646 oraz *A. alternata* DSM 62010, a w przypadku *B. cinerea* DSM 877 po 3 min.

Podobne zjawisko zaobserwowali Lu i in. (2014), którzy badali mechanizm inaktywacji komórek *Cladosporium fulvum* podczas traktowania plazmą zasilaną mieszaniną gazów O_2/Ar w stosunku objętościowym 1:99. Stężenie białka gwałtownie rosło wraz z czasem ekspozycji zarodników *C. fulvum* na plazmę do 60 s. Według autorów wyciek białka z komórek spowodowany był przerwaniem błony komórkowej. Natomiast po przedłużeniu czasu traktowania plazmą od 120 s do 240 s stężenie białka wyraźnie spadło, co zinterpretowano jako niszczenie uwolnionych cząsteczek przez rodniki generowane w plazmie lub wyciekające z komórek *C. fulvum* podczas stosunkowo długiego czasu traktowania.

Z kolei Los i in. (2020) zbadali wpływ obróbki plazmą na integralność osłon komórkowych u *A. flavus* w postaci wodnej zawiesiny zarodników lub biofilmu. Autorzy doszli do wniosku, iż wpływ obróbki plazmą na biofilmy grzybów był podobny do efektu wodnych zawiesin zarodników i obejmował uwolnienie materiału wewnątrzkomórkowego, co wskazuje na częściowe lub całkowite rozerwanie błony komórkowej prowadzące do wycieku składników. W przypadku zawiesiny zarodników, stężenia zewnątrzkomórkowego DNA i białka zależały od dawki i czasu ekspozycji na plazmę.

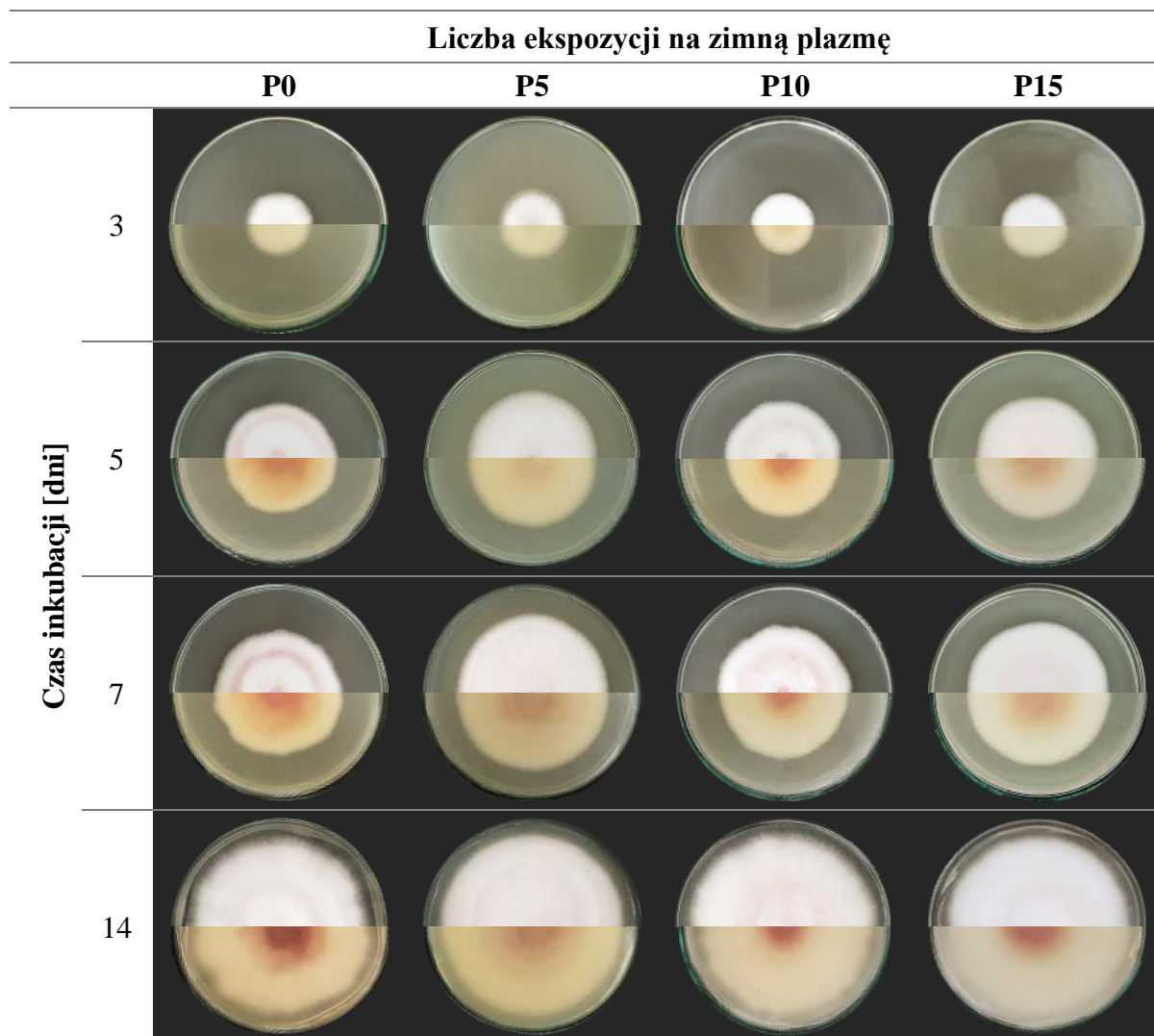
4.6 Wpływ wielokrotnego traktowania grzybów fitopatogennych plazmą niskotemperaturową na zmiany morfologiczne i fizjologiczne

Zastosowanie dawki subletalnej pozwala na przeżycie odpowiednio dużej liczby mikroorganizmów i umożliwia obserwację zmian zachodzących pod wpływem ekspozycji na czynnik biobójczy. Poza tym, stosowanie dawki subletalnej pozwala na zrozumienie procesów rozwoju tolerancji oraz identyfikację sposobów przeciwdziałania temu zjawisku. Zastosowanie dawki śmiertelnej uniemożliwia badanie skutków wielokrotnej ekspozycji organizmów na zimną plazmę, ponieważ wszystkie komórki są zabijane i nie tworzą kolejnych pokoleń.

4.6.1 Ocena zmian morfologii kolonii (makroskopowa) po wielokrotnej ekspozycji grzybni na plazmę niskotemperaturową

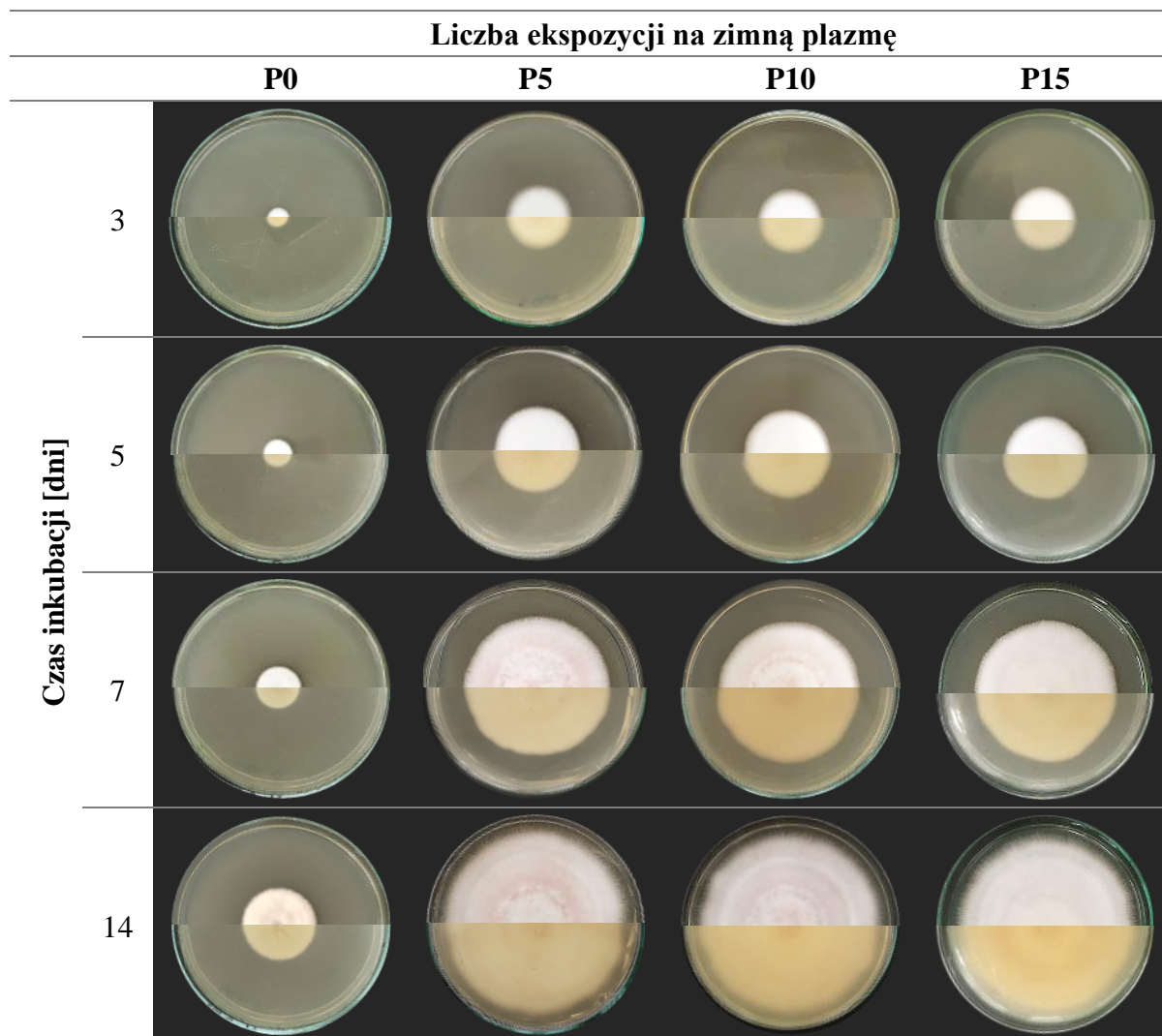
Przeprowadzono ocenę wzrostu grzybów fitopatogennych zarówno niepoddawanych działaniu plazmy (P0), jak i po wielokrotnej ekspozycji na subletalną dawkę plazmy (P5, P10, P15) na podłożu stałym, poprzez pomiar średnicy kolonii oraz obserwacje zmian morfologii kolonii w trakcie czternastodniowej inkubacji. Obraz kolonii dokumentowano za pomocą fotografii (rysunek 16-21).

Kolonie grzybów *F. oxysporum* DSM 12646 (rysunek 16) nietraktowanych plazmą (P0) oraz po wielokrotnym traktowaniu (P5, P10, P15) tworzyły białą grzybnię powietrzną z różowo-żółtym zabarwieniem widocznym od spodu szalki. Kolonie P0 oraz P10 charakteryzowały się falistym brzegiem, w odróżnieniu do gładkich brzegów kolonii P5 i P15.



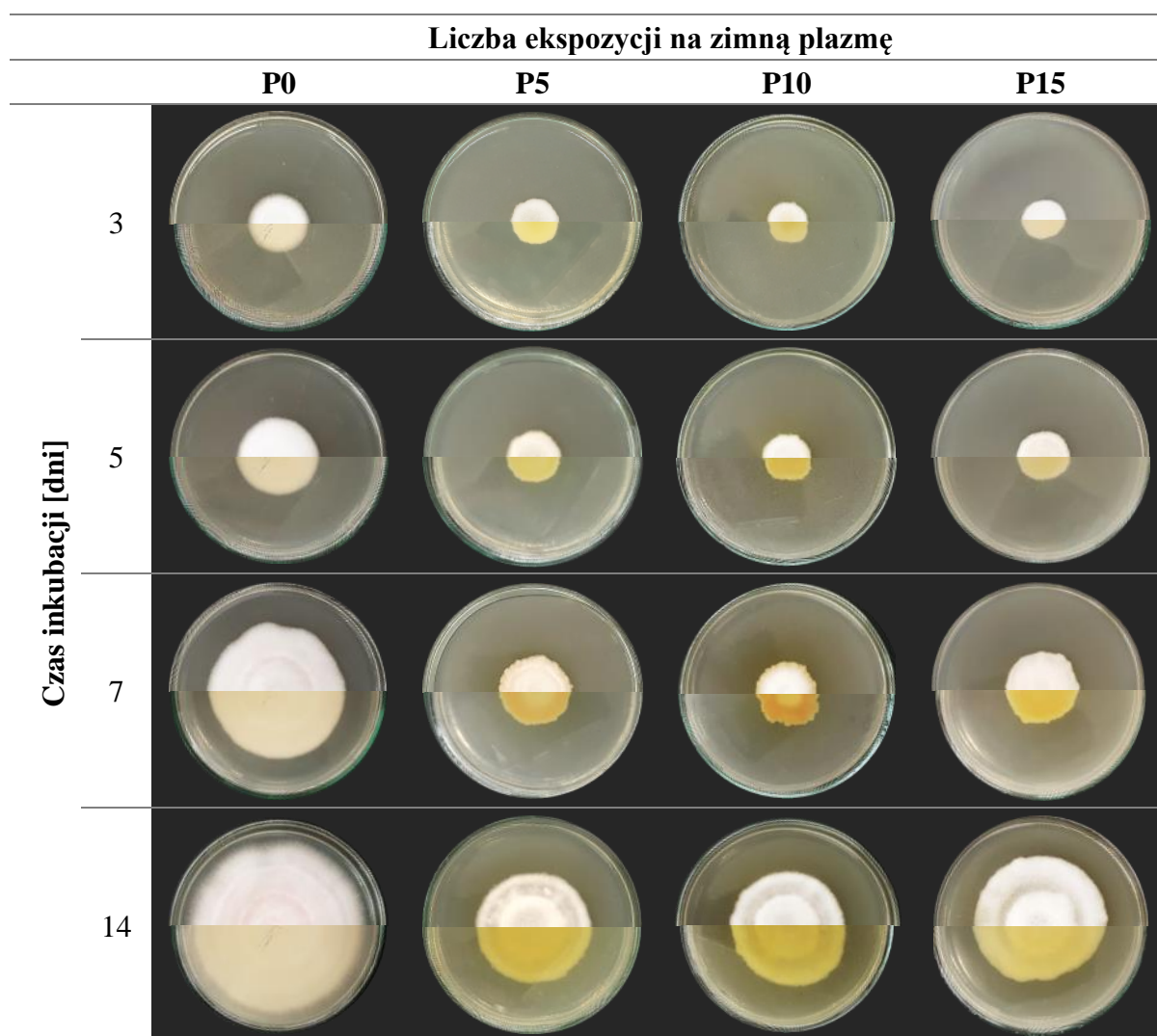
Rysunek 16. Kolonie grzybów *F. oxysporum* DSM 12646 nietraktowanych plazmą (P0) oraz po wielokrotnym traktowaniu plazmą (P5, P10, P15) podczas hodowli na podłożu stałym. Górna połowa szalki- widok z góry (awers), dolna połowa szalki- widok od spodu (rewers). Zdjęcia wykonano po 3, 5, 7 i 14 dniach inkubacji.

Widoczna jest znaczna różnica wielkości kolonii tworzonej przez grzybnie *F. culmorum* DSM 1094 nietraktowaną plazmą niskotemperaturową (P0) oraz po wielokrotnym traktowaniu plazmą (P5, P10, P15). Kolonie tworzone przez *F. culmorum* DSM 1094 charakteryzowały się białą grzybnią, przyjmującą barwę jasnoróżową w miarę wydłużania czasu inkubacji na podłożu stałym (rysunek 17).



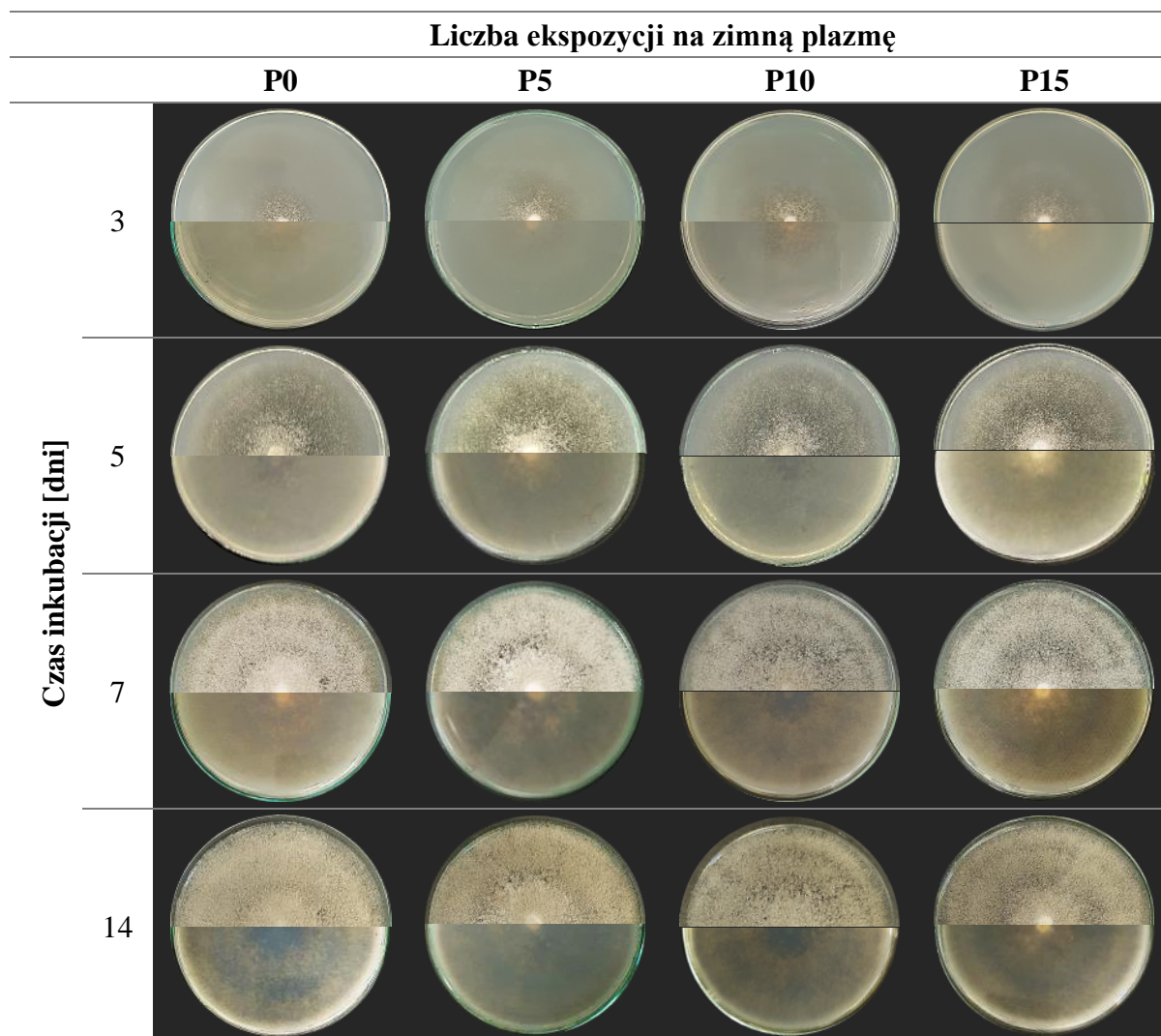
Rysunek 17. Kolonie grzybów *F. culmorum* DSM 1094 nietraktowanych plazmą (P0) oraz po wielokrotnym traktowaniu plazmą (P5, P10, P15) podczas hodowli na podłożu stałym. Górna połowa szalki- widok z góry (awers), dolna połowa szalki- widok od spodu (rewers). Zdjęcia wykonano po 3, 5, 7 i 14 dniach inkubacji.

F. tricinctum Ft11S-23 P0 tworzy początkowo białą grzybnię, przyjmującą jasnoróżowe zabarwienie wraz z czasem inkubacji na podłożu stałym. Kolonie utworzone po wielokrotnym traktowaniu *F. tricinctum* Ft11S-23 zimną plazmą (P5, P10, P15) charakteryzowały się znacznie mniejszymi rozmiarami w porównaniu do kontroli (P0), nieregularnym kształtem i zwartą grzybnią powietrzną. Widoczne jest również żółte zabarwienie od spodu szalki (rysunek 18).



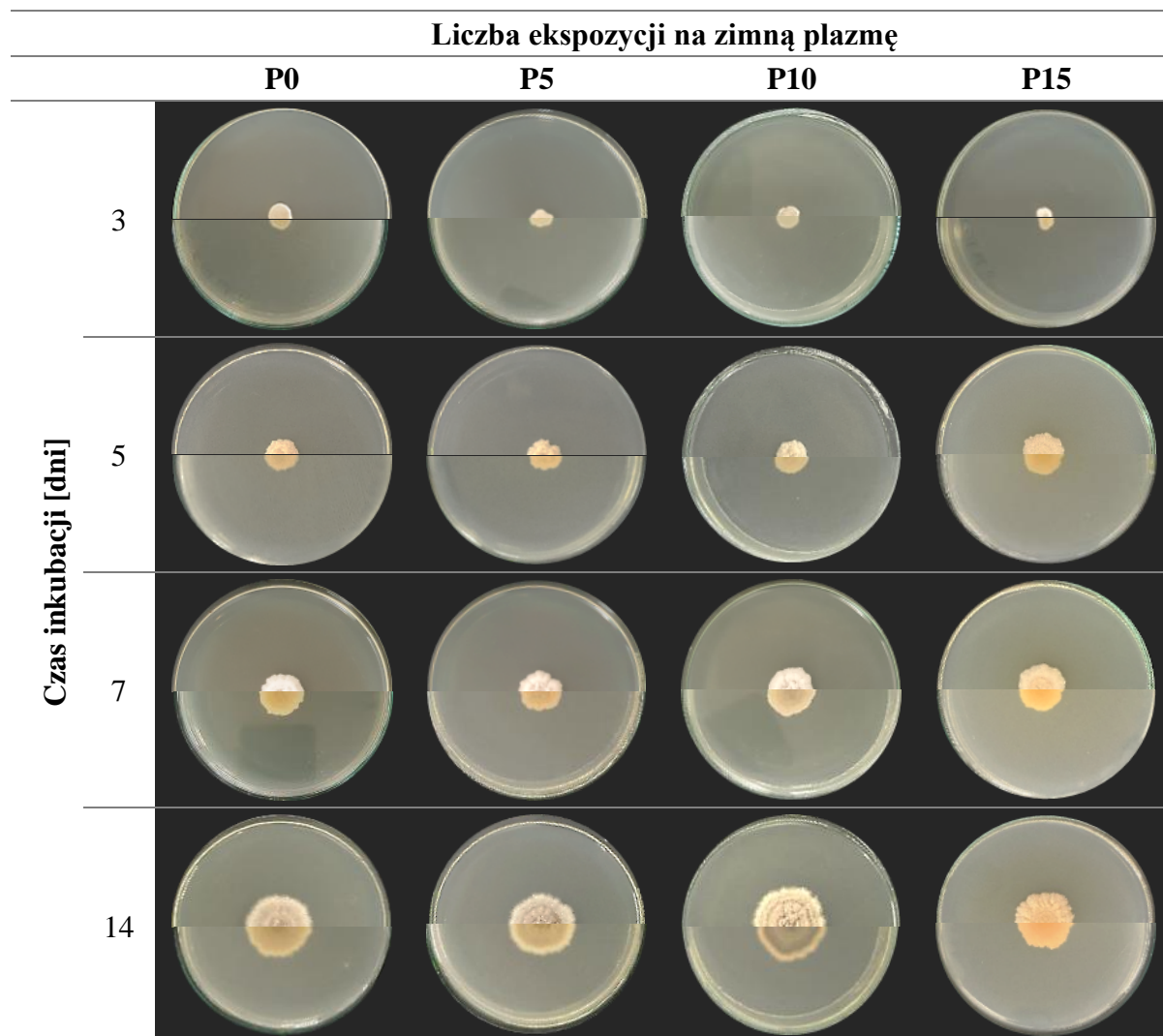
Rysunek 18. Kolonie grzybów *F. tricinctum* Ft11S-23 nietraktowanych plazmą (P0) oraz po wielokrotnym traktowaniu plazmą (P5, P10, P15) podczas hodowli na podłożu stałym. Górna połowa szalki- widok z góry (awers), dolna połowa szalki- widok od spodu (rewers). Zdjęcia wykonano po 3, 5, 7 i 14 dniach inkubacji.

Kolonie *B. cinerea* DSM 877 (rysunek 19) charakteryzowały się szybkim wzrostem (po 7 dniach inkubacji pokrywały całą powierzchnię szalki), szarą lub szarobrazową barwą oraz watawatą strukturą z licznymi zarodnikami.



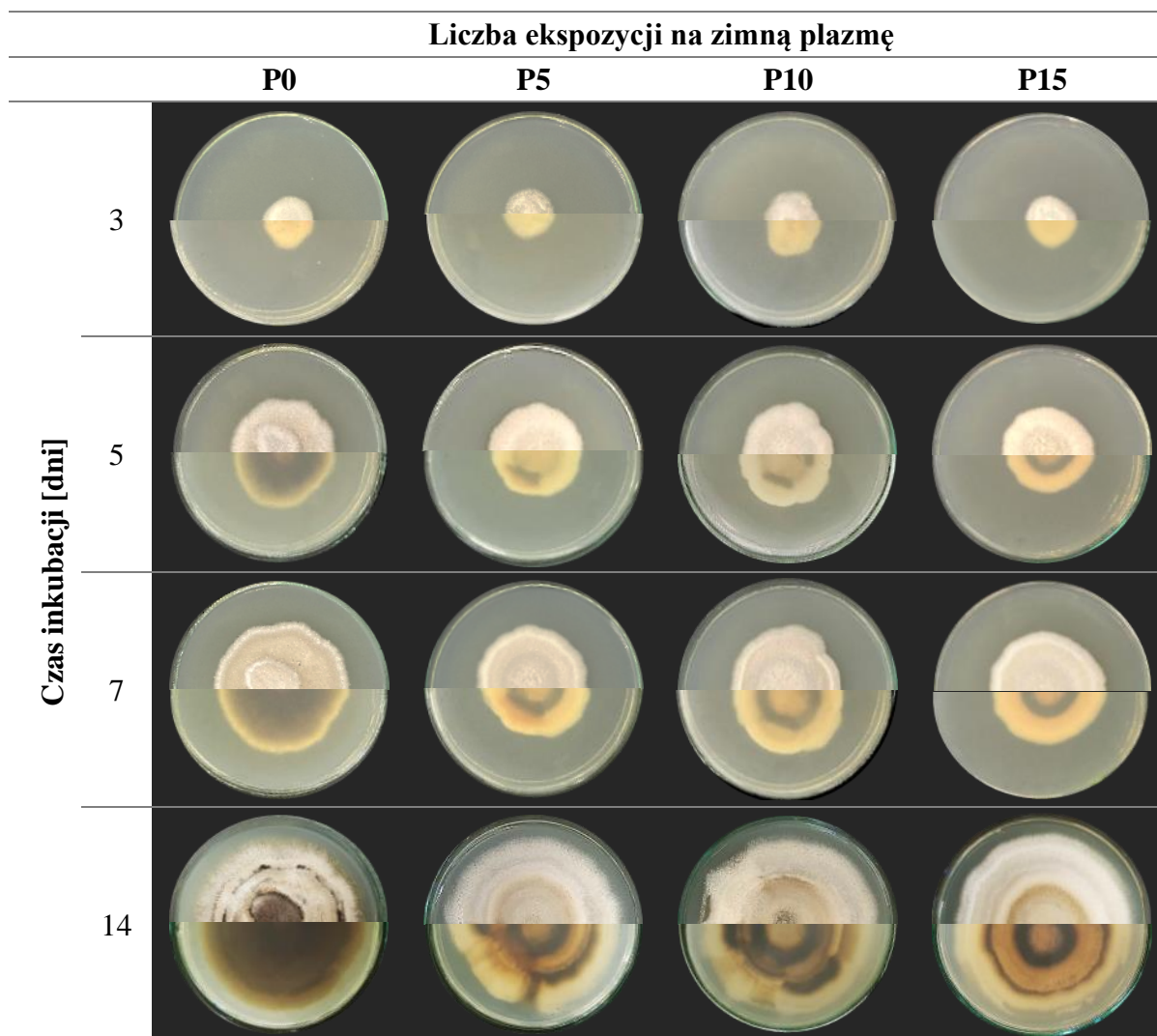
Rysunek 19. Kolonie grzybów *B. cinerea* DSM 877 nietraktowanych plazmą (P0) oraz po wielokrotnym traktowaniu plazmą (P5, P10, P15) podczas hodowli na podłożu stałym. Górna połowa szalki- widok z góry (awers), dolna połowa szalki- widok od spodu (rewers). Zdjęcia wykonano po 3, 5, 7 i 14 dniach inkubacji.

Kolonie *A. alternata* DSM 62010 (rysunek 20) wykazywały słaby wzrost podczas inkubacji na podłożu stałym przez 14 dni. Kształt kolonii był nieregularny ze strzępiastymi brzegami. Widoczna jest różnica pigmentacji kolonii tworzonych przez grzybnie P0, P5 i P10 oraz P15, przy czym kolonie tworzone przez grzybnię P15 miały barwę brązowo-pomarańczową, a pozostałe brunatną.



Rysunek 20. Kolonie grzybów *A. alternata* DSM 62010 nietraktowanych plazmą (P0) oraz po wielokrotnym traktowaniu plazmą (P5, P10, P15) podczas hodowli na podłożu stałym. Górna połowa szalki- widok z góry (awers), dolna połowa szalki- widok od spodu (rewers). Zdjęcia wykonano po 3, 5, 7 i 14 dniach inkubacji.

A. alternata Aa10S-23 (rysunek 21) tworzyły kolonie o falistym brzegu i nierównomiernej pigmentacji. Grzybnia powietrzna miała barwę beżowo-brązową, natomiast od spodu szalki widoczne było brązowe (P0) lub brązowo-pomarańczowe zabarwienie (P5, P10, P15).



Rysunek 21. Kolonie grzybów *A. alternata* Aa10S-23 nietraktowanych plazmą (P0) oraz po wielokrotnym traktowaniu plazmą (P5, P10, P15) w czasie hodowli na podłożu stałym. Górna połowa szalki- widok z góry (awers), dolna połowa szalki- widok od spodu (rewers). Zdjęcia wykonano po 3, 5, 7 i 14 dniach inkubacji.

Zaobserwowane zmiany pigmentacji kolonii mogą służyć jako strategia adaptacyjna w odpowiedzi na stres oksydacyjny oraz promieniowanie UV wywołane działaniem zimnej plazmy (Lin i Xu, 2023).

Donoszono, że światło stymuluje produkcję karotenoidów u *Fusarium* spp., a ze względu na przeciwutleniające właściwości tych związków ich produkcja służy również jako naturalny mechanizm chroniący grzyby strzępkowe przed uszkodzeniami

fotooksydacyjnymi w siedliskach o dużym natężeniu światła (Avalos i Carmen Limón, 2015; Lin i Xu, 2023).

Z kolei melaniny odgrywają ważną rolę w odpowiedzi grzybów *A. alternata* na stres (między innymi stres oksydacyjny wywołany H_2O_2), a także wpływają na stabilność komórek w ekstremalnych temperaturach, prawdopodobnie ze względu na zmniejszanie wielkości porów w ścianie komórkowej. Ponadto udowodniono, że barwniki te są niezbędne dla rozwoju i patogeniczności *A. alternata* (Li i in., 2023).

Yang i in. (2013) stwierdzili, że zwiększenie biosyntezy melaniny przez *B. cinerea* nie wpływa na poprawę tolerancji na stres środowiskowy (w tym stres osmotyczny, promieniowanie UV i środki uszkadzające ścianę komórkową), natomiast powoduje zwiększanie wrażliwości konidiów na H_2O_2 , prowadząc jednocześnie do obniżenia zjadliwości szczepów wobec roślin żywicielskich.

Podczas hodowli grzybów na podłożu stałym wykonano również pomiary średnicy kolonii. Wyniki przedstawiono w tabeli nr 6.

Kolonie tworzone przez grzyby *F. oxysporum* DSM 12646, *A. alternata* DSM 62010 oraz *B. cinerea* DSM 877 poddawane wielokrotnej ekspozycji na zimną plazmę nie wykazywały znacznych różnic wielkości podczas hodowli na podłożu stałym w porównaniu do kontroli (P0).

Z kolei grzybnia *F. tricinctum* Ft11S-23 po wielokrotnej ekspozycji na plazmę niskotemperaturową (P5, P10, P15) wykazywała znacznie wolniejsze tempo wzrostu na podłożu stałym w porównaniu do kontroli (P0). Po 3 dniach inkubacji średnice kolonii tworzonych przez grzybnie oznaczone jako P5, P10 i P15 były o 25,3% mniejsze w porównaniu do P0 (2,7 cm \pm 0,1). Po 5 oraz 7 dniach inkubacji różnica ta wynosiła około 48,0%, natomiast po 14 dniach średnice kolonii P5, P10 i P15 były odpowiednio o 32,9%, 22,4% i 25,2% mniejsze od kontroli (P0).

Odwrotny skutek wielokrotnego traktowania plazmą zaobserwowano w przypadku *F. culmorum* DSM 1094, którego grzybnia po piątym (P5), dziesiątym (P10) i piętnastym (P15) traktowaniu plazmą charakteryzowała się znacznie szybszym wzrostem w porównaniu do grzybni nietraktowanej plazmą (P0). Średnice kolonii P5, P10 i P15 były odpowiednio o 179%, 187% i 205% większe od P0 (1,0 \pm 0,1 cm) po 3 dniach inkubacji, po 5 i 7 dniach inkubacji różnice pomiędzy wielkościami kolonii P5, P10, P15 oraz P0 wyniosły średnio 228%, a pod koniec trwania testu średnice kolonii tworzonych przez *F. culmorum* DSM 1094 po wielokrotnej ekspozycji na plazmę były o 80,9%-85,4% większe od kontroli (P0).

Stymulujący wpływ plazmy na wzrost grzybni na podłożu stałym zaobserwowano również dla *A. alternata* Aa10S-23. Natomiast różnice wielkości kolonii tworzonych przez grzybnie po wielokrotnej ekspozycji na plazmę a kontrolą były znacznie mniejsze w porównaniu do *F. culmorum* DSM 1094 i nie przekraczały 10,0% po 3, 5 i 7 dniach inkubacji. Pod koniec trwania testu średnice kolonii tworzonych przez grzybnie *A. alternata* Aa10S-23 P5, P10 i P15 były odpowiednio o 11,3%, 23,4% i 27,0% większe w porównaniu do P0 (6,2±1,7 cm).

Tabela 6. Średnice kolonii grzybów nietraktowanych (P0) oraz po pięcio- (P5), dziesięcio- (P10) i piętnastokrotnym (P15) traktowaniu subletalną dawką plazmy nietermicznej po 3, 5, 7 i 14 dniach inkubacji na podłożu stałym. Średnie wartości średnic kolonii wraz z błędem standardowym dla czterech powtórzeń (n=4).

Szczep	Czas inkubacji [dni]	Średnica kolonii [cm]			
		P0	P5	P10	P15
<i>F. oxysporum</i> DSM 12646	3	3,0±0,1	3,0±0,1	2,8±0,1	2,9±0,1
	5	4,5±0,2	4,7±0,1	4,5±0,1	4,5±0,1
	7	5,9±0,1	6,5±0,0	5,9±0,2	6,4±0,1
	14	7,9±0,2	7,8±0,1	7,7±0,1	7,8±0,1
<i>F. culmorum</i> DSM 1094	3	1,0±0,1	2,7±0,1	2,7±0,0	2,9±0,1
	5	1,6±0,1	5,1±0,1	5,1±0,1	5,4±0,2
	7	2,2±0,1	7,1±0,1	7,0±0,0	7,2±0,1
	14	4,5±0,1	8,1±0,1	8,3±0,2	8,1±0,1
<i>F. tricinctum</i> Ft11S-23	3	2,7±0,1	2,0±0,1	2,0±0,1	2,0±0,1
	5	6,1±0,1	3,0±0,1	3,3±0,3	3,3±0,1
	7	7,4±0,2	3,6±0,1	4,0±0,3	4,0±0,1
	14	8,1±0,1	5,4±0,2	6,3±0,8	6,0±0,1
<i>B. cinerea</i> DSM 877	3	2,5±0,1	3,0±0,1	2,6±0,2	2,6±0,1
	5	7,1±0,3	7,5±0,1	7,1±0,2	7,3±0,1
	7	8,8±0,1	8,8±0,1	8,8±0,1	8,7±0,1
	14	8,9±0,1	8,9±0,1	8,8±0,0	8,8±0,0
<i>A. alternata</i> DSM 62010	3	1,1±0,1	1,0±0,0	1,0±0,1	1,1±0,1
	5	1,6±0,1	1,6±0,1	1,6±0,1	2,0±0,1
	7	2,0±0,1	1,9±0,2	2,0±0,1	2,4±0,1
	14	3,3±0,1	3,1±0,1	3,3±0,1	3,5±0,1
<i>A. alternata</i> Aa10S-23	3	2,2±0,1	2,2±0,1	2,4±0,1	2,1±0,1
	5	3,9±0,7	3,6±0,2	4,3±0,4	4,1±0,1
	7	5,0±0,8	4,7±0,4	5,1±0,1	5,1±0,1
	14	6,2±1,7	6,9±0,3	7,7±0,2	7,9±0,1

Ze względu na brak danych literaturowych dotyczących wpływu wielokrotnej ekspozycji grzybów strzępkowych na plazmę niskotemperaturową nie ma możliwości odniesienia się lub porównania do wyników innych autorów. Istnieją natomiast badania polegające na ocenie wzrostu grzybów na podłożu stałym bezpośrednio po traktowania plazmą, które mogą być pomocne w interpretacji wyników badań własnych.

Julák i in. (2018) zbadali wzrost *Aspergillus oryzae* i *A. alternata* na podłożu stałym po ekspozycji konidiów na działanie plazmy. Autorzy sugerują, że opóźnienie wzrostu kolonii związane jest z mechanizmem działania zimnej plazmy na komórki i wskazują jednocześnie na uszkodzenie ściany komórkowej jako przyczynę tego zjawiska. Komórki potraktowane subletalną dawką plazmy aktywują zestaw mechanizmów naprawczych, przywracających uszkodzone elementy i funkcje, opóźniając tym samym wzrost i namnażanie uszkodzonych komórek względem nienaruszonych, proporcjonalnie do rodzaju i stopnia szkody.

Zachodzenie procesów naprawczych mogłyby zatem tłumaczyć brak znaczących różnic w szybkości wzrostu grzybów *F. oxysporum* DSM 12646, *B. cinerea* DSM 877, *A. alternata* DSM 62010 oraz *A. alternata* Aa10S-23 po wielokrotnej ekspozycji na plazmę w porównaniu do grzybów nietraktowanych.

Natomiast stymulujący efekt działania plazmy na szybkość wzrostu *F. culmorum* DSM 1094 jest zaskakujący i nie znajduje wyjaśnienia w literaturze naukowej w przypadku komórek grzybów strzępkowych.

Istnieją jednak doniesienia, iż różne skutki działania zimnej plazmy na komórki związane są z poziomem generowanych RFT w zależności od warunków i czasu traktowania. Jak donoszą Kalghatgi i in. (2010) niskie stężenia RFT wytwarzanych podczas obróbki sprzyjają proliferacji komórek, podczas gdy wysokie stężenia RFT wytwarzanych w wyniku obróbki zimną plazmą z dużą intensywnością lub przez długi okres hamują proliferację komórek poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego lub apoptozę (Kalghatgi i in., 2010; Wu i in., 2023). Badania te były jednak prowadzone na komórkach ludzkich, dlatego nie można zakładać takiego samego mechanizmu regulacji aktywności w komórkach grzybów.

4.6.2 Ocena zmian morfologii strzępek (mikroskopowa) grzybów po wielokrotnej ekspozycji na plazmę niskotemperaturową

Zmiany morfologiczne strzępek formowanych przez badane fitopatogeny po piątej (P5), dziesiątej (P10) i piętnastej (P15) subletalnej dawce plazmy, wyznaczonej indywidualnie dla każdego testowanego mikroorganizmu, zostały zbadane za pomocą mikroskopii optycznej oraz skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM).

Obrazy otrzymane z mikroskopu optycznego (rysunek 22) wykazały, że strzępki badanych fitopatogenów niepoddawanych działaniu plazmy (oznaczone jako P0) były regularne i prawidłowo rozwinięte, a powierzchnia gładka bez pęknięć i uszkodzeń. W grzybnii po wielokrotnym traktowaniu subletalną dawką plazmy (P5, P10, P15) zaobserwowano znaczne zmiany morfologiczne, między innymi pofałdowania i wypuklenia oraz liczne pęknięcia w ścianie komórkowej, które prowadziły do spłaszczenia fragmentów strzępek w wyniku wycieku zawartości komórek. Zaobserwowano również znaczne zróżnicowanie grubości strzępek w próbkach.

Liczba ekspozycji na plazmę niskotemperaturową

P0

P5

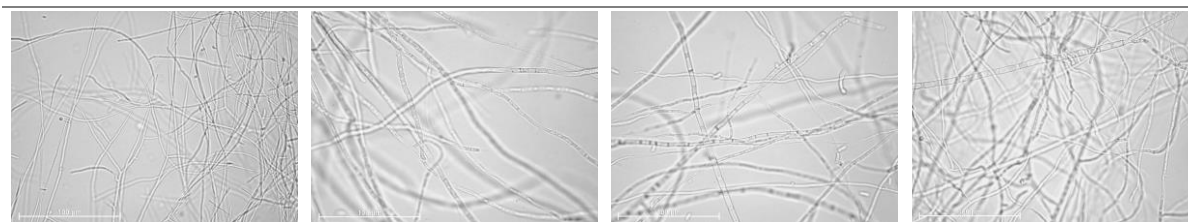
P10

P15

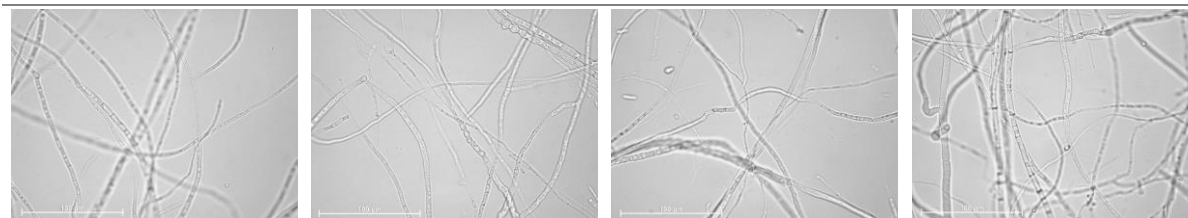
F. oxysporum DSM 12646



F. culmorum DSM 1094



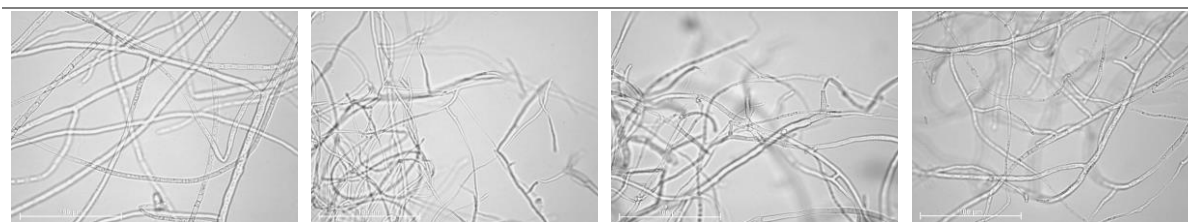
F. tricinctum Ft11S-23



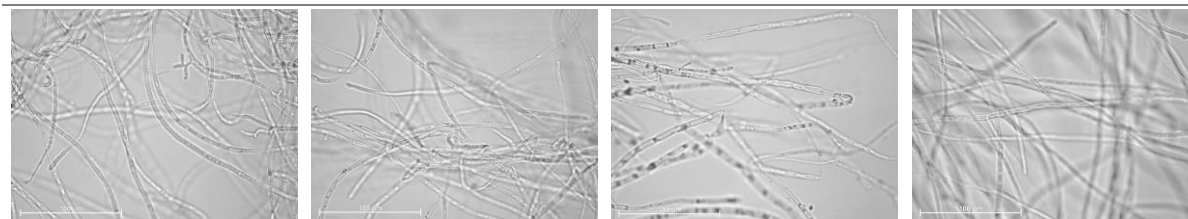
B. cinerea DSM 877



A. alternata DSM 62010

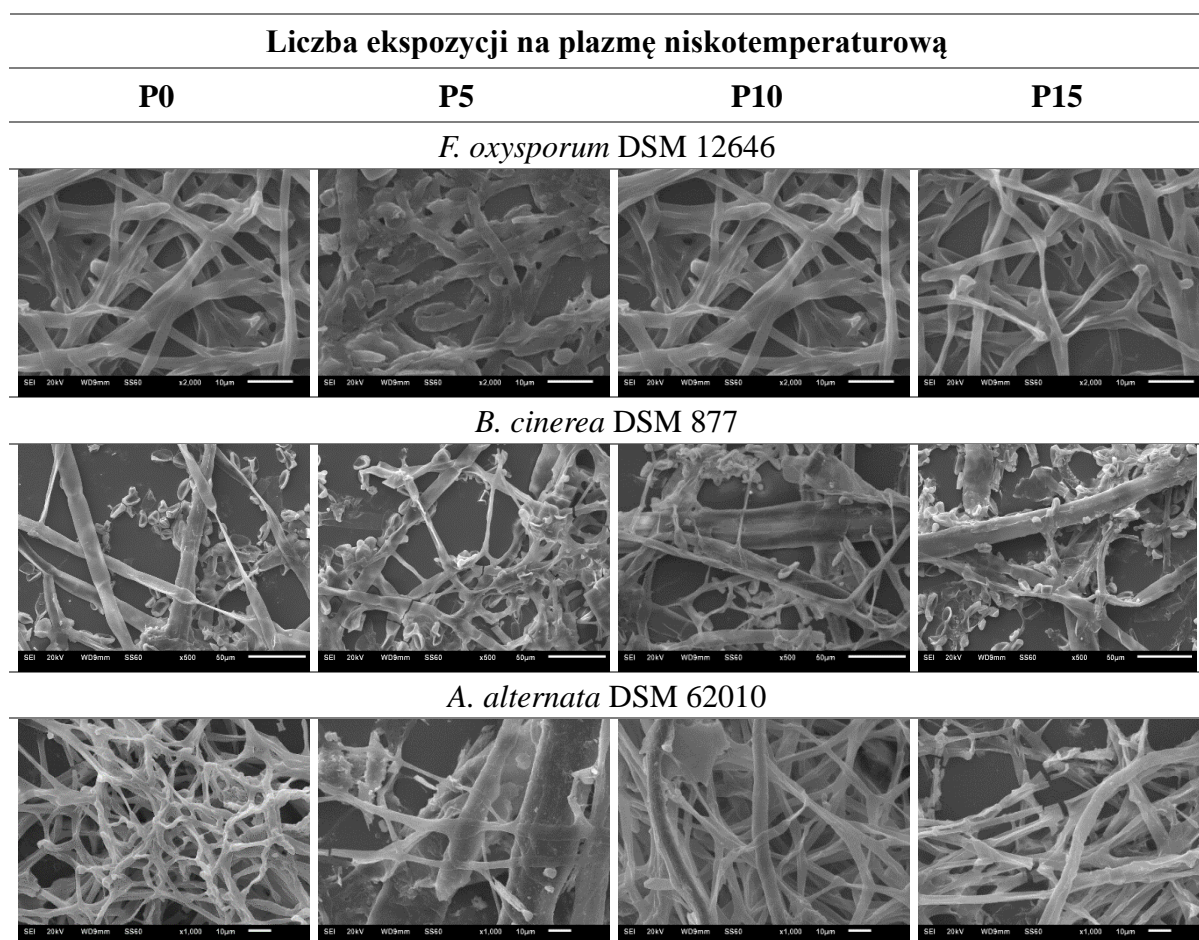


A. alternata Aa10S-23



Rysunek 22. Zdjęcia mikroskopowe grzybni nietraktowanej plazmą niskotemperaturową (P0) oraz po pięcio- (P5), dziesięcio- (P10) i piętnastokrotnym (P15) taktowaniu subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej. Powiększenie całkowite 400×, pasek skali = 100 µm.

Obrazowanie za pomocą mikroskopii SEM dla szczepów *F. oxysporum* DSM 12646, *B. cinerea* DSM 877 i *A. alternata* DSM 62010 potwierdziło obecność zmian w strukturze grzybni po wielokrotnej ekspozycji badanych patogenów na plazmę nietermiczną (rysunek 23). Grzybnia nietraktowana plazmą (P0) miała gładką powierzchnię, bez fałd i pęknięć, co jest zgodne z obserwacjami pod mikroskopem świetlnym. Średnica strzępek grzybni nietraktowanej plazmą wynosiła średnio $2,2\pm 0,5\ \mu\text{m}$, $2,5\pm 0,2\ \mu\text{m}$ i $11,6\pm 2,5\ \mu\text{m}$ odpowiednio dla *F. oxysporum* DSM 12646, *A. alternata* DSM 62010 i *B. cinerea* DSM 877.



Rysunek 23. Obrazowanie SEM grzybni nietraktowanej plazmą niskotemperaturową (P0) oraz po pięciokrotnym (P5), dziesięciokrotnym (P10) i piętnastokrotnym (P15) taktowaniu subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej. Zaczerpnięto z Nowinski i in. (2024), publikacja w otwartym systemie dostępu.

Strzępki grzybni po pięciokrotnym traktowaniu plazmą (P5) były bardzo nieregularne, a ich powierzchnia charakteryzowała się licznymi fałdami i wgłębieniami u wszystkich badanych grzybów. Stwierdzono, że średnice strzępek P5 utworzonych przez *B. cinerea* DSM 877 i *A. alternata* DSM 62010 były zbliżone do P0, w odróżnieniu od *F. oxysporum* DSM 12646, dla którego strzępki P5 były grubsze w porównaniu do P0, a ich średnica wynosiła $3,4\pm 0,4\ \mu\text{m}$.

Grzybnia utworzona przez *F. oxysporum* DSM 12646, *B. cinerea* DSM 877 i *A. alternata* DSM 62010 po dziesiątym traktowaniu plazmą (P10) nie wykazywała tak dużych uszkodzeń, jakie były widoczne w przypadku grzybni po pięciokrotnej ekspozycji na plazmę, niemniej jednak powierzchnia strzępek była szorstka i niejednolita, z wyraźnymi wgłębieniami i pęknięciami.

Obrazowanie SEM wykazało również zmiany w strukturze grzybni poddawanej piętnastokrotnemu traktowaniu plazmą (P15) u wszystkich badanych grzybów. Zaobserwowano znaczne uszkodzenia *B. cinerea* DSM 877 i *A. alternata* DSM 62010. Powierzchnia komórek była niejednorodna i szorstka, z licznymi pęknięciami. Strzępki grzybni P10 i P15 utworzone przez *A. alternata* DSM 62010 były grubsze w porównaniu do kontroli (P0), a ich średnice wynosiły odpowiednio $5,0 \pm 1,3 \mu\text{m}$ i $3,8 \pm 0,8 \mu\text{m}$. Podobne zjawisko zaobserwowano w przypadku grzybni P10 i P15 tworzonych przez *B. cinerea* DSM 877, których średnice strzępek wynosiły odpowiednio $14,3 \pm 3,8 \mu\text{m}$ i $13,5 \pm 2,3 \mu\text{m}$.

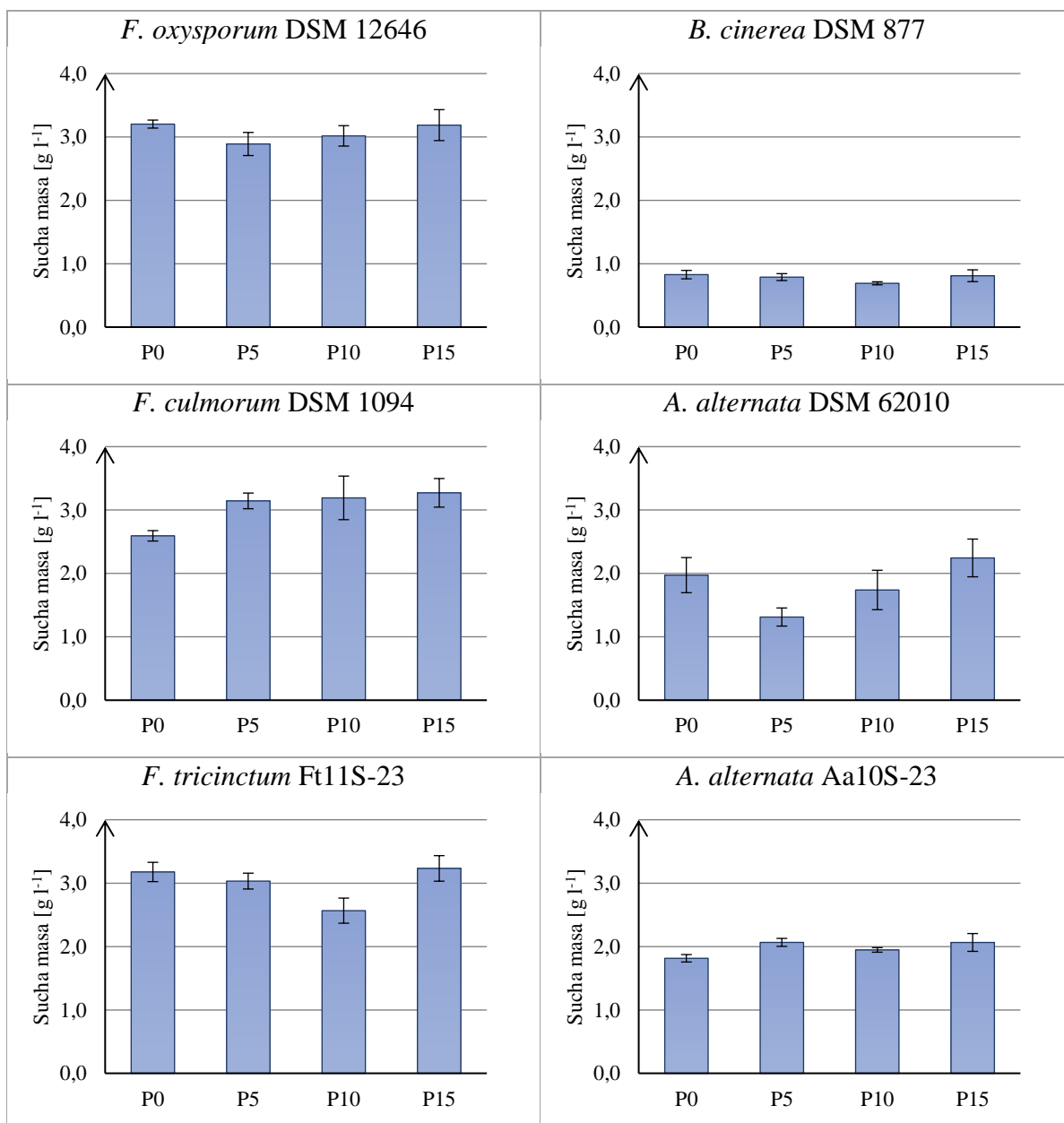
Opisane powyżej obserwacje były zgodne z wynikami uzyskanymi przez Ebrahimi-Shaghghi i in. (2021), którzy zbadali wpływ plazmy na zmiany morfologii i struktury komórek *C. albicans* po 72 h inkubacji. Skaningowa mikroskopia elektronowa oraz transmisyjna mikroskopia elektronowa ujawniły wzrost grubości błony komórkowej po 90 s traktowania plazmą oraz wzrost grubości ściany komórkowej po 150 s. Natomiast komórki poddawane działaniu plazmy przez 180 s i 210 s wykazywały obecność licznych wakuoli, obrzęk, obkurczenie zewnętrznej błony komórkowej, uszkodzenia mitochondriów i deformacje ściany komórkowej.

Liczne badania dowodzą (Avramidis i in., 2010; Dasan i in., 2017; Wu i in., 2022), że ekspozycja strzępek lub zarodników na zimną plazmą atmosferyczną prowadzi do uszkodzenia ściany komórkowej, a nasilenie objawów rośnie wraz z wydłużaniem czasu ekspozycji na plazmę, prowadząc do dezintegracji komórek i wycieku cytoplazmy, a ostatecznie do ich inaktywacji.

4.6.3 Wpływ wielokrotnego traktowania plazmą niskotemperaturową na produkcję biomasy przez grzyby fitopatogenne

Produkcja biomasy jest ważnym wskaźnikiem aktywności grzybów (Guo i in., 2023). Wpływ wielokrotnego traktowania (P5, P10, P15) subletalną dawką plazmy nietermicznej na produkcję biomasy przez grzyby fitopatogenne oceniono po 7 dniach hodowli na podłożu płynnym. Kontrolę stanowiła grzybnia nietraktowana plazmą (P0). Produkcję

biomasy, wyrażonej jako sucha masa grzybnii (g) w jednym litrze płynnej hodowli podsumowano na wykresie nr 5.



Wykres 5. Sucha masa grzybów fitopatogennych przed (P0) oraz po wielokrotnej ekspozycji (P5, P10, P15) na subletalną dawkę plazmy niskotemperaturowej po 7 dniach hodowli na podłożu płynnym. Słupki przedstawiają średnie wartości suchej masy wraz z błędem standardowym dla dwóch powtórzeń (n=2).

Wielokrotne traktowanie grzybnii *F. oxysporum* DSM 12646 oraz *B. cinerea* DSM 877 subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej spowodowało spadek produkcji biomasy po 7 dniach hodowli na podłożu płynnym. Sucha biomasa *F. oxysporum* DSM 12646 po pięcio- (P5), dziesięcio- (P10) i piętnastokrotnym (P15) traktowaniu plazmą była niższa o odpowiednio 9,8%, 5,8% i 0,5% w porównaniu do kontroli (P0). Podobnie w przypadku

B. cinerea DSM 877 zaobserwowano spadek produkcji biomasy grzybni oznaczonej jako P5, P10 i P15 odpowiednio o 4,8%, 16,5% i 2,2% w porównaniu do kontroli (P0).

Z kolei wzrost produkcji biomasy wskutek wielokrotnej ekspozycji na subletalną dawkę plazmy zaobserwowano dla *F. culmorum* DSM 1094 oraz *A. alternata* Aa10S-23. Sucha masa *F. culmorum* DSM 1094 stopniowo rosła wraz z liczbą ekspozycji na zimną plazmę, osiągając wartość $3,27 \pm 0,23 \text{ g l}^{-1}$ po piętnastokrotnym traktowaniu plazmą (sucha masa grzybni P15 była o 26,2% wyższa od masy P0). W przypadku *A. alternata* Aa10S-23 wzrost produkcji biomasy po wielokrotnym traktowaniu plazmą (P5, P10, P15) wyniósł od 7,3% do 13,8%. Z kolei dla *F. tricinctum* Ft11S-23 oraz *A. alternata* DSM 62010 zaobserwowano początkowy spadek produkcji biomasy w wyniku pięcio- (P5) i dziesięciokrotnej (P10) ekspozycji grzybni na zimną plazmę, po czym produkcja biomasy wzrosła w porównaniu do kontroli o 1,8% dla *F. tricinctum* Ft11S-23 i 13,8% dla *A. alternata* DSM 62010 po piętnastokrotnym traktowaniu plazmą, osiągając najwyższą wartość (odpowiednio $3,23 \pm 0,20 \text{ g l}^{-1}$ oraz $2,24 \pm 0,30 \text{ g l}^{-1}$).

Pięciokrotne traktowanie plazmą (P5) grzybni *F. oxysporum* DSM 12646 indukowało wzrost średnicy strzępek o 57,3% (podrozdział 4.6.2) przy spadku suchej masy o 9,8% w porównaniu do kontroli (P0). Podobny efekt zaobserwowano dla grzybni *A. alternata* DSM 62010 po dziesięciokrotnym (P10) traktowaniu plazmą, gdzie średnica strzępek wzrosła o 96,8%, a sucha masa spadła o 11,9%. W przypadku *B. cinerea* DSM 877 dziesięcio- (P10) i piętnastokrotne (P15) traktowanie plazmą zwiększyło średnicę strzępek odpowiednio o 23,4% i 16,8%, przy jednoczesnym spadku produkcji biomasy o 16,5% i 2,2% po 7 dniach hodowli na podłożu płynnym.

Opisane zjawisko zwiększania średnicy strzępek oraz spadku suchej masy może wynikać ze zmian w strukturze osłon komórkowych, prowadzących do zwiększenia akumulacji wody oraz pęcznienia strzępek w środowisku wodnym. Wysokie całkowite stężenie substancji rozpuszczonej wewnątrz komórek grzybów powoduje osmotyczny napływ wody i docisk błony komórkowej do ściany (Wu i in., 2022). Woda jest następnie usuwana z grzybni podczas suszenia, powodując spadek otrzymanej suchej masy.

Wpływ traktowania grzybów strzępkowych plazmą nietermiczną na produkcję biomasy (wyrażonej jako sucha masa) był wcześniej badany przez Šimončicová i in. (2018). Autorzy donoszą, że poddawanie grzybni *A. flavus* działaniu plazmy przez 5 s doprowadziło do redukcji produkcji biomasy o około 45% w porównaniu do próbek nietraktowanych. Po 15 s traktowania plazmą spadek żywotności wyniósł 90%, natomiast przedłużenie czasu traktowania do 30 sekund doprowadziło do całkowitej lub prawie

całkowitej utraty żywotności komórek (produkcji biomasy). Należy jednak wziąć pod uwagę fakt, że badania te były przeprowadzane bezpośrednio po ekspozycji komórek grzybów na plazmę i nie uwzględniały różnic w stężeniu inokulum, wynikających ze śmierci części komórek wraz z przedłużaniem czasu działania plazmy. Spadek produkcji biomasy może zatem wynikać z redukcji liczby żywych komórek (stężenia inokulum) podczas obróbki plazmą.

4.6.4 Poziom stresu oksydacyjnego w grzybni wielokrotnie traktowanej plazmą niskotemperaturową

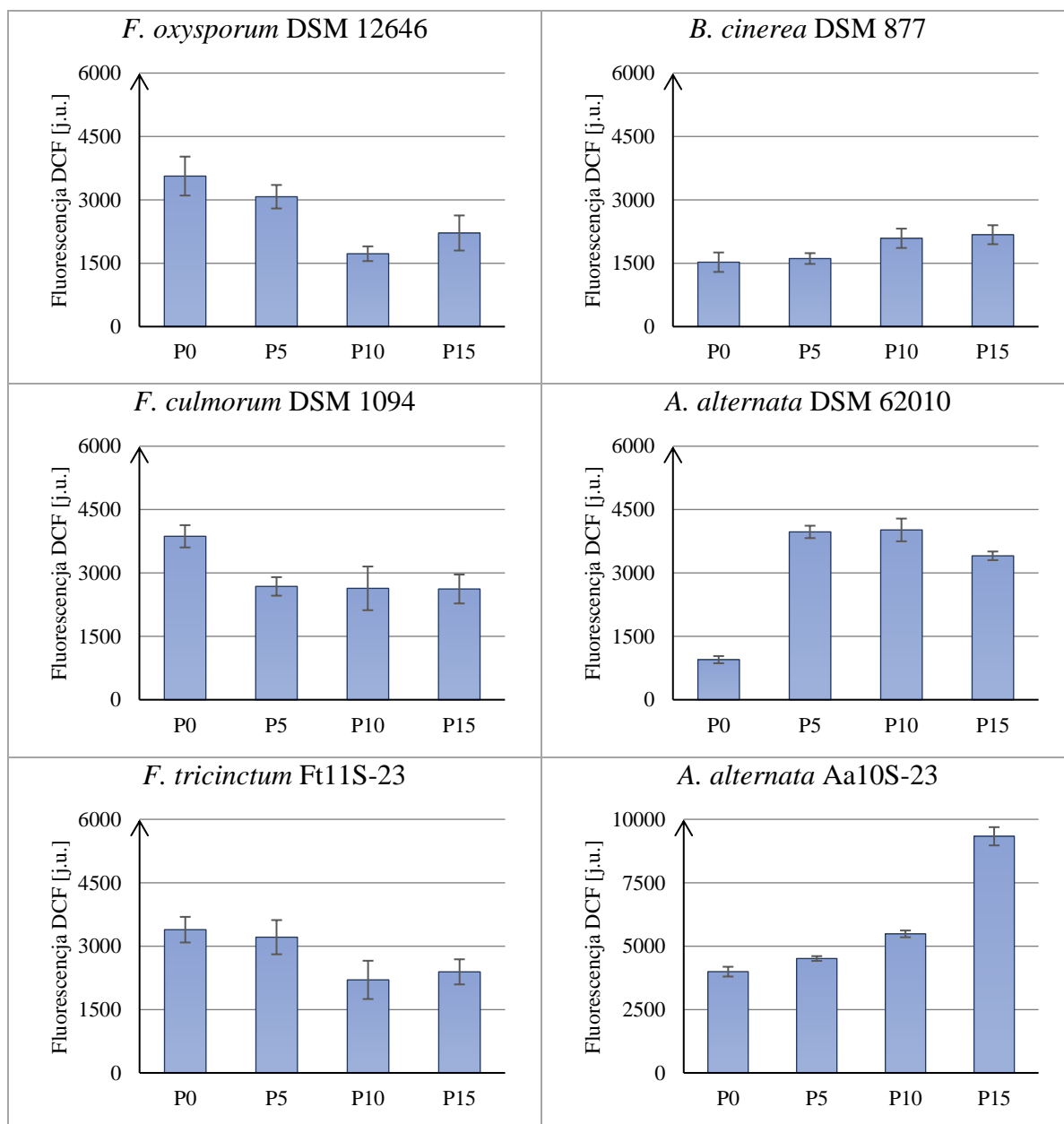
Poziom stresu oksydacyjnego (wynikającego z generowania i akumulacji RFT) w komórkach grzybów wielokrotnie traktowanych subletalną dawką plazmy nietermicznej zbadano na podstawie pomiaru fluorescencji DCF z wykorzystaniem sondy fluorescencyjnej. H₂DCF-DA (dioctan 2'-7'- dichlorodihydrofluoresceiny) jest stabilną cząsteczką dyfundującą do komórek, gdzie ulega deacetylacji przez wewnątrzkomórkowe esterazy, tworząc niefluorescencyjną 2',7'-dichlorodihydrofluoresceinę (H₂DCF). H₂DCF jest następnie utleniana i przekształcana przez wewnątrzkomórkowe RFT w wysoce fluorescencyjny produkt 2',7'-dichlorofluoresceinę (DCF). Uważa się, że fluorescencja DCF jest proporcjonalna do stężenia RFT w komórkach (Rhee i in., 2010).

Wartości intensywności fluorescencji DCF wykryte w grzybni poddawanej wielokrotnej ekspozycji na subletalną dawkę plazmy niskotemperaturowej przedstawiono na wykresie nr 6. Kontrolę stanowiła grzybnia nietraktowana plazmą (P0), która służyła do określenia pierwotnego poziomu stresu oksydacyjnego, związanego z prawidłowym metabolizmem tlenowym i stymulacją oksydacyjną wywołaną przez zewnętrzne operacje doświadczalne (Wu i in., 2022).

Wysoką wartość fluorescencji DCF w komórkach nietraktowanych (P0) plazmą niskotemperaturową wykryto u *A. alternata* Aa10S-23 (3993±193 j. u.), *F. culmorum* DSM 1094 (3868±263 j. u.), *F. oxysporum* DSM 12646 (3562± 460 j. u.) oraz *F. tricinctum* Ft11S-23 (3389±303 j. u.). Z kolei w grzybni *B. cinerea* DSM 877 i *A. alternata* DSM 62010 poziom ten był znacznie niższy i wyniósł odpowiednio 1524±230 j. u. oraz 949±85 j. u.

Fluorescencja DFC w grzybni *F. oxysporum* DSM 12646 wielokrotnie traktowanej plazmą (P5, P10 i P15) była niższa w porównaniu do grzybni nietraktowanej (P0) odpowiednio o 13,7%, 51,6% i 37,8%. W przypadku *F. culmorum* DSM 1094 zaobserwowano spadek poziomu RFT w grzybni po wielokrotnym traktowaniu plazmą

(P5, P10 i P15) średnio o 31,6% w porównaniu do kontroli (P0). Z kolei w komórkach *F. tricinctum* Ft11S-23 po piątym (P5) traktowaniu plazmą poziom RFT był niższy w porównaniu do kontroli o 5,3%, natomiast dla grzybni P10 i P15 różnica ta wyniosła odpowiednio 35,1% i 29,4%.



Wykres 6. Poziom wewnątrzkomórkowego stresu oksydacyjnego u grzybów fitopatogennych po pięcio- (P5), dziesięcio- (P10) i piętnastokrotnej (P15) ekspozycji na subletalną dawkę plazmy niskotemperaturowej. Kontrolę stanowiła grzybnieta traktowana plazmą (P0). Słupki błędów wskazują odchylenia standardowe dla 4 powtórzeń (n=4).

Wzrost poziomu fluorescencji DCF w wyniku wielokrotnej ekspozycji grzybnieta na subletalną dawkę plazmy niskotemperaturowej wykryto dla *A. alternata* DSM 62010, *A. alternata* Aa10S-23 oraz *B. cinerea* DSM 877. Grzybnieta *A. alternata* DSM 62010 po

piątej (P5) i dziesiątej (P10) dawce plazmy wykazały wyższy poziom fluorescencji DCF o około 321% w porównaniu do kontroli (P0), natomiast po piętnastokrotnym traktowaniu plazmą (P15) wartość fluorescencji była o 259% wyższa w porównaniu do kontroli (P0) i wyniosła 3406 ± 102 j. u.

Dla grzybni *A. alternata* Aa10S-23 poziom fluorescencji RFT rósł stopniowo wraz z liczbą ekspozycji na plazmę o 13,0% (P5), 37,3% (P10) oraz 134% (P15) w porównaniu do kontroli (P0). Podobnie w przypadku *B. cinerea* DSM 877, poziom fluorescencji DCF wzrósł o 5,7%-42,7% w wyniku wielokrotnej ekspozycji na zimną plazmę (P5, P10, P15).

Poziom wewnątrzkomórkowych RFT może wzrosnąć w odpowiedzi na stresory zewnętrzne, takie jak środki przeciwgrzybicze lub niekorzystne warunki środowiskowe (Gonzalez-Jimenez i in., 2023). Badania potwierdzają wpływ działania zimnej plazmy na wzrost poziomu RFT w grzybni bezpośrednio po ekspozycji, w sposób zależny od czasu traktowania (Šimončicová i in., 2018; Wu i in., 2022). Yu i in. (2022) odkryli jednak, że podwyższony poziom wewnątrzkomórkowych RFT utrzymuje się do 48 h po ekspozycji strzępek grzybów na plazmę.

Akumulacja wewnątrzkomórkowych RFT może wynikać z kilku zjawisk. Generowane przez zimną plazmę RFT prowadzą do uszkodzenia oksydacyjnego błony komórkowej, umożliwiając przedostawanie się egzogennych RFT do wnętrza komórki przez kanały błonowe, pasywny proces dyfuzji lub pory powstałe w wyniku utleniania lipidów, zwiększając w ten sposób poziom wewnątrzkomórkowych RFT (Ji i in., 2019; Wang i in., 2022; Wu i in., 2023). Dodatkowo, stres oksydacyjny generowany przez zimną plazmę upośledza normalny łańcuch oddechowy w mitochondriach (Wang i in., 2022). Akumulacja RFT powyżej normalnego poziomu może prowadzić do śmierci komórki lub apoptozy (Gonzalez-Jimenez i in., 2023; Zhang i in., 2020).

Co ciekawe, nadmierną akumulację RFT w komórkach powiązano z hamowaniem zjadliwości u patogenów. Przykładem takich czynników są borany, które spowodowały upośledzenie systemu obrony antyoksydacyjnej u *Penicillium expansum*, prowadząc do szybkiej akumulacji RFT i karbonylacji białek (Qin i in., 2007). Podobnie w przypadku *Colletotrichum gloeosporioides* wywołującego antraktozę w owocach mango. Traktowanie boranami doprowadziło do oksydacyjnego uszkodzenia mitochondriów poprzez akumulację RFT w zarodnikach grzybów, hamując w konsekwencji kiełkowanie zarodników (Shi i in., 2012). Niektóre środki przeciwdrobnoustrojowe, takie jak kwas cynamonowy, mogą również obniżać zjadliwość grzybów fitopatogennych poprzez indukcję nadmiernej akumulacji RFT i zaburzenie równowagi redoks (Zhang i in., 2015).

4.6.5 Tolerancja stresu oksydacyjnego przez grzyby fitopatogenne poddawane wielokrotnej ekspozycji na plazmę niskotemperaturową

Zbadano wpływ wielokrotnego traktowania subletalną dawką plazmy nietermicznej na tolerancję stresu oksydacyjnego u grzybów fitopatogennych. Jako induktor stresu oksydacyjnego zastosowano nadtlenek wodoru (H₂O₂). Wartości MIC (minimalne stężenie hamujące) i MFC (minimalne stężenie grzybobójcze) dla nadtlenu wodoru wobec grzybów fitopatogennych podsumowano w tabeli nr 7. Wartości MIC wyznaczono na podstawie wizualnej oceny wzrostu grzybów fitopatogennych na podłożu płynnym w obecności H₂O₂. Natomiast wartości MFC wyznaczono opierając się na ocenie wzrostu kolonii po 24 h inkubacji w obecności H₂O₂ i przesianiu na podłoże stałe bez czynnika stresowego. Badanie wykonano w dwóch powtórzeniach (n =2).

Tabela 7. Minimalne stężenie hamujące (MIC) i minimalne stężenie grzybobójcze (MFC) nadtlenu wodoru wobec grzybów fitopatogennych wielokrotnie traktowanych subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej (P5, P10, P15). Pierwotną wrażliwość na H₂O₂ oceniono dla grzybni nietraktowanej plazmą niskotemperaturową (P0).

H ₂ O ₂ [mM]	Liczba ekspozycji na zimną plazmę			
	P0	P5	P10	P15
<i>F. oxysporum</i> DSM 12646				
MIC	12,8	12,8	12,8	12,8
MFC	51,0	51,0	51,0	25,5
<i>F. culmorum</i> DSM 1094				
MIC	51,0	12,8	12,8	12,8
MFC	100	51,0	51,0	51,0
<i>F. tricinctum</i> Ft11S-23				
MIC	6,38	6,38	6,38	12,8
MFC	25,5	51,0	51,0	102
<i>B. cinerea</i> DSM 877				
MIC	102	102	51,0	51,0
MFC	204	204	204	204
<i>A. alternata</i> DSM 62010				
MIC	25,5	25,5	12,8	12,8
MFC	102	102	51,0	51,0
<i>A. alternata</i> Aa10S-23				
MIC	12,8	12,8	6,38	6,38
MFC	51,0	51,0	51,0	25,5

Wielokrotne traktowanie grzybów fitopatogennych plazmą niskotemperaturową zwiększyło wrażliwość większości badanych grzybów wobec H₂O₂. Wyjątkiem był szczep *F. tricinctum* Ft11S-23, dla którego wartość MIC wzrosła dwukrotnie po piętnastokrotnym traktowaniu plazmą (P15), natomiast MFC rosło stopniowo wraz z zwiększaniem liczby ekspozycji na plazmę z 25,5 mM dla P0 do 102 mM dla P15.

Wartość MIC nadtlenku wodoru wobec *F. oxysporum* DSM 12646 nie zmieniła się pod wpływem wielokrotnej ekspozycji na plazmę (12,8 mM), natomiast wartość MFC zmalała dwukrotnie względem P0 (do 25,5 mM) po piętnastokrotnym traktowaniu plazmą (P15). Zaobserwowano także dwukrotny spadek wartości MIC oraz czterokrotny spadek wartości MFC nadtlenku wodoru wobec *F. culmorum* DSM 1094, jako efekt wielokrotnej ekspozycji na plazmę (P5, P10, P15). Z kolei dla *B. cinerea* DSM 877, *A. alternata* DSM 62010 i *A. alternata* Aa10S-23 doszło do dwukrotnej redukcji MIC po dziesiątej (P10) i piętnastej (P15) dawce plazmy. Wartość MFC dla *B. cinerea* DSM 877 pozostała niezmienną (204 mM). W przypadku grzybni *A. alternata* DSM 62010, zarówno po dziesiątej (P10) jak i piętnastej (P15) dawce plazmy, oraz dla szczepu *A. alternata* Aa10S-23 po piętnastokrotnym traktowaniu plazmą (P15), zaobserwowano dwukrotne zmniejszenie wartości MIC w porównaniu z kontrolą (P0).

W oparciu o przeprowadzone eksperymenty wydaje się, że słusznym jest powiązanie tempa wzrostu grzybów (wyniki podane w tabeli nr 6) z ich wrażliwością na cytotoksyczne działanie nadtlenku wodoru. Potwierdzają to wyniki uzyskane dla grzybów *F. culmorum* DSM 1094, dla których grzybnia nietraktowana zimną plazmą (P0) charakteryzowała się znacznie wolniejszym wzrostem na podłożu stałym (średnica kolonii po 14 dniach inkubacji wynosiła 4,5±0,1 cm) w porównaniu do grzybni wielokrotnie traktowanej (średnica kolonii P5, P10 i P15 wynosiła od 8,1 cm do 8,3 cm), jednocześnie wykazując najmniejszą wrażliwość na H₂O₂. Podobnie w przypadku *F. tricinctum* Ft11S-23 zaobserwowano największą średnicę kolonii (8,1±0,1 cm) oraz najwyższą wrażliwość na stres oksydacyjny dla grzybni nietraktowanej plazmą (P0). Po wielokrotnym traktowaniu grzybni *F. tricinctum* Ft11S-23 plazmą zaobserwowano spadek tempa wzrostu kolonii (średnica kolonii P5, P10 i P15 wynosiła od 5,4 cm do 6,3 cm) oraz wzrost tolerancji względem H₂O₂. Z kolei dla *A. alternata* Aa10S-23 po dziesięcio- (P10) i piętnastokrotnym (P15) traktowaniu plazmą niskotemperaturową zaobserwowano najszybszy wzrost na podłożu stałym (średnice kolonii po 14 dniach inkubacji były odpowiednio o 23,4% i 27,0% wyższe w porównaniu do P0) z jednoczesnym wzrostem wrażliwości względem H₂O₂.

Uzyskane wyniki są zgodne z obserwacjami prowadzonymi przez Zhong i in. (2021). Autorzy udowodnili, że szczepy *Zymoseptoria tritici*, które rosły najszybciej w środowisku kontrolnym (podłoże PDA) były najbardziej wrażliwe na stres oksydacyjny (H_2O_2). Jednocześnie badacze stwierdzili brak wyraźnych dowodów na związek melanizacji ze zwiększoną tolerancją grzybów *Z. tritici* na stres oksydacyjny.

4.6.6 Wrażliwość grzybów fitopatogennych poddawanych wielokrotnej ekspozycji na plazmę niskotemperaturową wobec środków grzybobójczych

Grzyby fitopatogenne poddawane wielokrotnemu traktowaniu plazmą nietemiczną oceniano pod względem wrażliwości na sześć różnych środków grzybobójczych dostępnych w handlu (tabele 8 i 9). Kontrolę stanowiły komórki niepoddawane działaniu plazmy (P0).

Wrażliwość wszystkich badanych grzybów na F1 (Magnicur Energy) oceniono w zakresie od $6,25 \cdot 10^{-1}$ do $40 \mu\text{l ml}^{-1}$, natomiast na F4 (Miedzian 50 WP) od $6,25 \cdot 10^{-1}$ do 40 mg ml^{-1} . Wszystkie badane grzyby charakteryzowały się wysoką wrażliwością na F2 (Tobias-Pro 250 EW) oraz F6 (Syllit 65 WP), wobec których badano stężenia w zakresie od $4,88 \cdot 10^{-3}$ do $3,13 \cdot 10^{-1}$ odpowiednio $\mu\text{l ml}^{-1}$ oraz mg ml^{-1} . Z kolei dla F3 (Scorpion 325 S.C.) i F5 (Switch 62,5 WG) zaobserwowano znaczne różnice wrażliwości pomiędzy szczepami badanych grzybów. Grzyby z rodzaju *Fusarium* charakteryzowały się wyższą tolerancją w porównaniu do pozostałych. Wyznaczone wartości MIC (minimalne stężenie hamujące) i MFC (minimalne stężenie grzybobójcze) środków grzybobójczych względem *F. oxysporum* DSM 12646, *F. culmorum* DSM 1094 i *F. tricinctum* Ft11S-23 podano w tabeli nr 8, natomiast dla grzybów *A. alternata* DSM 62010, *B. cinerea* DSM 877 i *A. alternata* Aa10S-23 dane podsumowano w tabeli nr 9.

Wyniki opierają się na wizualnej ocenie wzrostu grzybni w obecności różnych stężeń środka grzybobójczego na podłożu płynnym (MIC) lub na podłożu stałym (MFC) na podstawie dwóch powtórzeń ($n = 2$).

Tabela 8. Wartości MIC i MFC wybranych środków grzybobójczych względem grzyków fitopatogennych nietraktowanych plazmą (P0) oraz po pięcio- (P5), dziesięcio- (P10) i piętnastokrotnym (P15) traktowaniu subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej. Symbol \geq oznacza stężenie równe podanej wartości lub wyższe od oznaczanego zakresu stężeń, symbol \leq oznacza stężenie równe lub niższe od oznaczanego zakresu stężeń.

Szczep	Krotność traktowania	Minimalne stężenie hamujące (MIC) i minimalne stężenie grzybobójcze (MFC)	Magnicur	Tobias-Pro	SCORPION	MIEDZIAN	SWITCH	SYLLIT
			Energy	250 EW	325 S.C.	50 WP	62,5 WG	65 WP
			F1	F2	F3	F4	F5	F6
			$\mu\text{l ml}^{-1}$			mg ml^{-1}		
<i>F. oxysporum</i> DSM 12646	P0	MIC	$4,0 \cdot 10^1$	$3,13 \cdot 10^{-1}$	$1,0 \cdot 10^1$	$2,5 \cdot 10^0$	$4,0 \cdot 10^1$	$3,91 \cdot 10^{-2}$
		MFC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$\geq 3,13 \cdot 10^{-1}$	$2,0 \cdot 10^1$	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$4,0 \cdot 10^1$	$3,91 \cdot 10^{-2}$
	P5	MIC	$1,0 \cdot 10^1$	$3,13 \cdot 10^{-1}$	$1,0 \cdot 10^1$	$2,5 \cdot 10^0$	$4,0 \cdot 10^1$	$7,81 \cdot 10^{-2}$
		MFC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$\geq 3,13 \cdot 10^{-1}$	$2,0 \cdot 10^1$	$1,0 \cdot 10^1$	$4,0 \cdot 10^1$	$7,81 \cdot 10^{-2}$
	P10	MIC	$1,0 \cdot 10^1$	$3,13 \cdot 10^{-1}$	$1,0 \cdot 10^1$	$2,5 \cdot 10^0$	$4,0 \cdot 10^1$	$7,81 \cdot 10^{-2}$
		MFC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$3,13 \cdot 10^{-1}$	$2,0 \cdot 10^1$	$1,0 \cdot 10^1$	$4,0 \cdot 10^1$	$1,56 \cdot 10^{-1}$
	P15	MIC	$1,0 \cdot 10^1$	$3,13 \cdot 10^{-1}$	$1,0 \cdot 10^1$	$2,5 \cdot 10^0$	$4,0 \cdot 10^1$	$7,81 \cdot 10^{-2}$
		MFC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$3,13 \cdot 10^{-1}$	$2,0 \cdot 10^1$	$1,0 \cdot 10^1$	$4,0 \cdot 10^1$	$3,13 \cdot 10^{-1}$
<i>F. culmorum</i> DSM 1094	P0	MIC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$\leq 6,25 \cdot 10^{-1}$	$\leq 6,25 \cdot 10^{-1}$	$4,0 \cdot 10^1$	$3,13 \cdot 10^{-1}$
		MFC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$1,56 \cdot 10^{-1}$	$\leq 6,25 \cdot 10^{-1}$	$4,0 \cdot 10^1$	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$3,13 \cdot 10^{-1}$
	P5	MIC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$1,56 \cdot 10^{-1}$	$2,0 \cdot 10^1$	$\leq 6,25 \cdot 10^{-1}$	$2,0 \cdot 10^1$	$1,95 \cdot 10^{-2}$
		MFC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$3,13 \cdot 10^{-1}$	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$1,0 \cdot 10^1$	$4,0 \cdot 10^1$	$3,91 \cdot 10^{-2}$
	P10	MIC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$3,13 \cdot 10^{-1}$	$2,0 \cdot 10^1$	$\leq 6,25 \cdot 10^{-1}$	$\leq 6,25 \cdot 10^{-1}$	$3,91 \cdot 10^{-2}$
		MFC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$3,13 \cdot 10^{-1}$	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$1,0 \cdot 10^1$	$5,0 \cdot 10^0$	$3,91 \cdot 10^{-2}$
	P15	MIC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$3,13 \cdot 10^{-1}$	$2,0 \cdot 10^1$	$\leq 6,25 \cdot 10^{-1}$	$\leq 6,25 \cdot 10^{-1}$	$3,91 \cdot 10^{-2}$
		MFC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$3,13 \cdot 10^{-1}$	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$1,0 \cdot 10^1$	$2,5 \cdot 10^0$	$3,91 \cdot 10^{-2}$
<i>F. tricinatum</i> Ft11S-23	P0	MIC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$1,56 \cdot 10^{-1}$	$2,5 \cdot 10^0$	$\leq 6,25 \cdot 10^{-1}$	$2,5 \cdot 10^0$	$3,91 \cdot 10^{-2}$
		MFC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$3,13 \cdot 10^{-1}$	$1,0 \cdot 10^1$	$5,0 \cdot 10^0$	$2,0 \cdot 10^1$	$7,81 \cdot 10^{-2}$
	P5	MIC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$7,81 \cdot 10^{-2}$	$2,5 \cdot 10^0$	$\leq 6,25 \cdot 10^{-1}$	$2,5 \cdot 10^0$	$1,95 \cdot 10^{-2}$
		MFC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$3,13 \cdot 10^{-1}$	$1,0 \cdot 10^1$	$5,0 \cdot 10^0$	$2,0 \cdot 10^1$	$1,95 \cdot 10^{-2}$
	P10	MIC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$7,81 \cdot 10^{-2}$	$2,5 \cdot 10^0$	$\leq 6,25 \cdot 10^{-1}$	$2,5 \cdot 10^0$	$3,91 \cdot 10^{-2}$
		MFC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$1,56 \cdot 10^{-1}$	$1,0 \cdot 10^1$	$5,0 \cdot 10^0$	$1,0 \cdot 10^1$	$3,91 \cdot 10^{-2}$
	P15	MIC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$7,81 \cdot 10^{-2}$	$2,5 \cdot 10^0$	$\leq 6,25 \cdot 10^{-1}$	$2,5 \cdot 10^0$	$3,91 \cdot 10^{-2}$
		MFC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$1,56 \cdot 10^{-1}$	$1,0 \cdot 10^1$	$2,5 \cdot 10^0$	$1,25 \cdot 10^0$	$3,91 \cdot 10^{-2}$

Stwierdzono, że wielokrotne traktowanie *F. oxysporum* DSM 12646 plazmą spowodowało wzrost wrażliwości względem środków oznaczonych jako F1, F2 oraz F4. Wartość MIC wobec F1 zmalała z $40 \mu\text{l ml}^{-1}$ dla grzybni nietraktowanej plazmą (P0) do $10 \mu\text{l ml}^{-1}$ dla grzybni wielokrotnie traktowanej plazmą (P5, P15, P15). Nie wykryto natomiast zmiany wartości MFC ($\geq 40 \mu\text{l ml}^{-1}$). Z kolei dla F4 stwierdzono spadek wartości MFC z $\geq 40 \text{ mg ml}^{-1}$ (P0) do 10 mg ml^{-1} po wielokrotnym traktowaniu plazmą, bez zmiany wartości MIC ($2,5 \text{ mg ml}^{-1}$). Stwierdzono także wzrost wrażliwości grzybni P10 i P15 względem F2. Z kolei zwiększenie tolerancji wystąpiło względem środka F6, dla którego wartości MIC i MFC grzybni nietraktowanej plazmą wyniosły $3,91 \cdot 10^{-2} \text{ mg ml}^{-1}$, natomiast po wielokrotnym traktowaniu plazmą wartości te stopniowo rosły do $7,81 \cdot 10^{-2} \text{ mg ml}^{-1}$ (MIC) i $3,13 \cdot 10^{-1} \text{ mg ml}^{-1}$ (MFC) dla P15. Natomiast względem F3 i F5 nie zaobserwowano zmian wrażliwości *F. oxysporum* DSM 12646.

Wielokrotne traktowanie grzybni *F. culmorum* DSM 1094 subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej wpłynęło na wrażliwość względem większości badanych fungicydów z wyjątkiem F1, przy czym dla F2 i F3 doszło do wzrostu tolerancji, natomiast spadek tolerancji wystąpił wobec F4, F5 i F6. Wartości MIC i MFC dla F2 stopniowo rosły odpowiednio z $\leq 4,88 \cdot 10^{-3} \mu\text{l ml}^{-1}$ i $1,56 \cdot 10^{-1} \mu\text{l ml}^{-1}$ dla grzybni nietraktowanej plazmą (P0) do $3,13 \cdot 10^{-1} \mu\text{l ml}^{-1}$ (MIC i MFC) dla grzybni po piętnastokrotnym (P15) traktowaniu. W przypadku F3 zaobserwowano znaczne zmiany wrażliwości. Grzybnia P0 charakteryzowała się wysoką wrażliwością na badany środek grzybobójczy (MIC i MFC wynosiły $\leq 6,25 \cdot 10^{-1} \mu\text{l ml}^{-1}$), natomiast dla grzybni wielokrotnie traktowanej plazmą (P5, P10, P15) wartości MIC i MFC wzrosły odpowiednio do $20 \mu\text{l ml}^{-1}$ i $\geq 40 \mu\text{l ml}^{-1}$.

Z kolei wielokrotne traktowanie grzybni *F. culmorum* DSM 1094 spowodowało spadek wartości MIC i MFC względem F4, F5 i F6, co świadczy o wzroście wrażliwości grzybni po wielokrotnym traktowaniu plazmą (P5, P10 i P15) w porównaniu do kontroli (P0). Dla F4 wartości MIC znajdowały się poniżej oznaczanego zakresu ($\leq 6,25 \cdot 10^{-1} \text{ mg ml}^{-1}$) natomiast wartości MFC zmalały czterokrotnie w wyniku ekspozycji grzybni na subletalną dawkę plazmy niskotemperaturowej. W przypadku F5 wartości MIC i MFC stopniowo malały wraz z liczbą ekspozycji grzybni *F. culmorum* DSM 1094 na plazmę z 40 mg ml^{-1} oraz $\geq 40 \text{ mg ml}^{-1}$ dla P0, do $\leq 6,25 \cdot 10^{-1} \text{ mg ml}^{-1}$ oraz $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$ dla P15. Podobnie w przypadku F6, względem którego zaobserwowano początkowo znaczny spadek wartości MIC i MFC po pięciokrotnym traktowaniu plazmą z następującą stabilizacją wartości MIC i MFC po dziesięcio- (P10) i piętnastokrotnym (P15) traktowaniu grzybni plazmą ($3,91 \cdot 10^{-2} \text{ mg ml}^{-1}$).

W przypadku *F. tricinctum* Ft11S-23 zaobserwowano wzrost wrażliwości względem F2, F4, F5 i F6. Wartości MIC i MFC wobec F2 dla grzybni po piętnastokrotnym traktowaniu plazmą (P15) były dwukrotnie niższe w porównaniu do kontroli. W przypadku F4 zmianę wrażliwości wykryto jedynie po piętnastokrotnym traktowaniu plazmą (wartość MFC zmalała z 5,0 mg ml⁻¹ dla P0 do 2,5 mg ml⁻¹ dla P15). W przypadku fungicydu oznaczonego jako F5 nie zaobserwowano zmiany wartości MIC (2,5 mg ml⁻¹), natomiast wartości MFC stopniowo malały z 20 mg ml⁻¹ (P0 i P5) do 10 mg ml⁻¹ (P10) i 1,25 mg ml⁻¹ (P15). Z kolei najwyższą wrażliwość względem F6 wykazała grzybnia *F. tricinctum* Ft11S-23 po pięciokrotnej ekspozycji na plazmę (P5), dla której wartości MIC i MFC wyniosły 1,95·10⁻² mg ml⁻¹. Dla grzybni P10 i P15 wartości MIC wobec F6 nie różniły się od kontroli (3,91·10⁻² mg ml⁻¹), natomiast MFC było dwukrotnie niższe.

Tabela nr 9 przedstawia wartości MIC i MFC wyznaczone dla *A. alternata* DSM 62010, *B. cinerea* DSM 877 i *A. alternata* Aa10S-23 wobec badanych środków przeciwgrzybiczych.

Badania ujawniły wpływ wielokrotnego traktowania grzybni *B. cinerea* DSM 877 na zmiany tolerancji względem wszystkich badanych środków przeciwgrzybiczych. W przypadku F1 zmianie uległa jedynie wartość MIC po piętnastokrotnym traktowaniu plazmą, która wyniosła 2,5 μl ml⁻¹, natomiast wartości MIC i MFC dla pozostałych wyniosły co najmniej 40 μl ml⁻¹. Grzybnia *B. cinerea* DSM 877 wykazywała wysoką wrażliwość wobec F2 (MIC wyniosło ≤4,88·10⁻³ μl ml⁻¹). Natomiast wartości MFC wobec F2 zmalały do 3,13·10⁻¹ μl ml⁻¹ po wielokrotnym traktowaniu grzybni plazmą w porównaniu do P0 (≥3,13·10⁻¹ μl ml⁻¹). Wzrost wrażliwości wobec F3 nastąpił po dziesięcio- (P10) i piętnastokrotnym (P15) traktowaniu plazmą (wartości MFC zmalały dwukrotnie w porównaniu do kontroli). Podobnie w przypadku F4, wobec którego MFC dla grzybni P0 wyniosło ≥40 mg ml⁻¹, a dla P10 i P15 odpowiednio 20 mg ml⁻¹ oraz 5,0 mg ml⁻¹. Z kolei wartości MFC względem F5 zmalały po wielokrotnym traktowaniu grzybni *B. cinerea* DSM 877 plazmą z 1,56·10⁻¹ mg ml⁻¹ do 7,81·10⁻² mg ml⁻¹, bez wpływu na MIC (≤4,88·10⁻³ mg ml⁻¹). Podobnie w przypadku F6, dla którego wartości MFC dla grzybni po traktowaniu plazmą były niższe w porównaniu do kontroli, przy czym największą wrażliwość wykazywała grzybnia P5.

Tabela 9. Wartości MIC i MFC wybranych środków grzybobójczych względem grzybów fitopatogennych nietraktowanych plazmą (P0) oraz po pięcio- (P5), dziesięcio- (P10) i piętnastokrotnym (P15) traktowaniu subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej. Symbol \geq oznacza stężenie równe podanej wartości lub wyższe od oznaczanego zakresu stężeń, symbol \leq oznacza stężenie równe lub niższe od oznaczanego zakresu stężeń.

Szczep	Krotność traktowania	Minimalne stężenie hamujące (MIC) i minimalne stężenie grzybobójcze (MFC)	Magnicur	Tobias-Pro	SCORPION	MIEDZIAN	SWITCH	SYLLIT
			Energy	250 EW	325 S.C.	50 WP	62,5 WG	65 WP
			F1	F2	F3	F4	F5	F6
			$\mu\text{l ml}^{-1}$			mg ml^{-1}		
<i>A. alternata</i> DSM 62010	P0	MIC	$4,0 \cdot 10^1$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^0$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$
		MFC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$1,56 \cdot 10^{-1}$	$1,95 \cdot 10^{-2}$	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$3,91 \cdot 10^{-2}$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$
	P5	MIC	$1,0 \cdot 10^1$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^0$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$
		MFC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$1,56 \cdot 10^{-1}$	$1,95 \cdot 10^{-2}$	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$1,95 \cdot 10^{-2}$	$9,77 \cdot 10^{-3}$
	P10	MIC	$5,0 \cdot 10^0$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^0$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$
		MFC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$1,56 \cdot 10^{-1}$	$1,95 \cdot 10^{-2}$	$5,0 \cdot 10^0$	$1,95 \cdot 10^{-2}$	$9,77 \cdot 10^{-3}$
	P15	MIC	$2,5 \cdot 10^0$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^0$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$
		MFC	$2,0 \cdot 10^1$	$7,81 \cdot 10^{-2}$	$1,95 \cdot 10^{-2}$	$2,5 \cdot 10^0$	$1,95 \cdot 10^{-2}$	$9,77 \cdot 10^{-3}$
<i>B. cinerea</i> DSM 877	P0	MIC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$3,91 \cdot 10^{-2}$	$5,0 \cdot 10^0$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$
		MFC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$\geq 3,13 \cdot 10^{-1}$	$1,56 \cdot 10^{-1}$	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$1,56 \cdot 10^{-1}$	$1,95 \cdot 10^{-2}$
	P5	MIC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$3,91 \cdot 10^{-2}$	$5,0 \cdot 10^0$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$
		MFC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$3,13 \cdot 10^{-1}$	$1,56 \cdot 10^{-1}$	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$7,81 \cdot 10^{-2}$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$
	P10	MIC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$3,91 \cdot 10^{-2}$	$5,0 \cdot 10^0$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$
		MFC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$3,13 \cdot 10^{-1}$	$7,81 \cdot 10^{-2}$	$2,0 \cdot 10^1$	$7,81 \cdot 10^{-2}$	$9,77 \cdot 10^{-3}$
	P15	MIC	$2,5 \cdot 10^0$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$3,91 \cdot 10^{-2}$	$5,0 \cdot 10^0$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$
		MFC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$3,13 \cdot 10^{-1}$	$7,81 \cdot 10^{-2}$	$5,0 \cdot 10^0$	$7,81 \cdot 10^{-2}$	$9,77 \cdot 10^{-3}$
<i>A. alternata</i> Aa10S-23	P0	MIC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^0$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$
		MFC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$3,13 \cdot 10^{-1}$	$3,91 \cdot 10^{-2}$	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$9,77 \cdot 10^{-3}$	$1,95 \cdot 10^{-2}$
	P5	MIC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^0$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$
		MFC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$3,13 \cdot 10^{-1}$	$3,91 \cdot 10^{-2}$	$4,0 \cdot 10^1$	$9,77 \cdot 10^{-3}$	$9,77 \cdot 10^{-3}$
	P10	MIC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^0$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$
		MFC	$\geq 4,0 \cdot 10^1$	$3,13 \cdot 10^{-1}$	$3,91 \cdot 10^{-2}$	$4,0 \cdot 10^1$	$9,77 \cdot 10^{-3}$	$9,77 \cdot 10^{-3}$
	P15	MIC	$2,0 \cdot 10^1$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$1,25 \cdot 10^0$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$
		MFC	$2,0 \cdot 10^1$	$3,13 \cdot 10^{-1}$	$3,91 \cdot 10^{-2}$	$5,0 \cdot 10^0$	$9,77 \cdot 10^{-3}$	$\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$

W przypadku *A. alternata* DSM 62010 wykryto zmiany tolerancji względem większości badanych środków przeciugrzybiczych w wyniku wielokrotnej ekspozycji na plazmę, z wyjątkiem F3. Wzrost tolerancji nastąpił jedynie wobec F6, dla którego wartości MIC i MFC dla grzybni nietraktowanej plazmą (P0) znajdowały się poniżej oznaczanego zakresu ($\leq 4,88 \cdot 10^{-3}$ mg ml⁻¹), a wartość MFC wzrosła co najmniej dwukrotnie (do $9,77 \cdot 10^{-3}$ mg ml⁻¹) po traktowaniu grzybni plazmą (P5, P10, P15). Wartości MIC i MFC wobec F1 stopniowo malały z odpowiednio 40 μ l ml⁻¹ i ≥ 40 μ l ml⁻¹ (P0) do 2,5 μ l ml⁻¹ i 20 μ l ml⁻¹ (P15). W przypadku F2 wzrost wrażliwości nastąpił jedynie po piętnastokrotnym traktowaniu plazmą (P15). Stwierdzono również spadek wartości MFC wobec F4 dla grzybni P10 (5,0 mg ml⁻¹) oraz P15 (2,5 mg ml⁻¹) w porównaniu do grzybni P0 (≥ 40 mg ml⁻¹), bez zmiany MIC (2,5 mg ml⁻¹).

W przypadku *A. alternata* Aa10S-23 nie stwierdzono rozwoju tolerancji na badane fungicydy. Brak zmian wrażliwości zaobserwowano wobec F2, F3 i F5. Wzrost wrażliwości na F1 pojawił się po piętnastokrotnym traktowaniu plazmą. Z kolei dla F4 i F6 zaobserwowano stopniowy wzrost wrażliwości wraz z zwiększaniem liczby traktowań plazmą nietermiczną.

Z dostępnych źródeł literaturowych wynika, iż wzrost wrażliwości komórek na środki przeciwdrobnoustrojowe może być związany ze zwiększeniem przepuszczalności błony po ekspozycji na zimną plazmę (Maybin i in., 2023). Jednakże problem ten jest nadal dyskutowany, a prezentowane w literaturze wyniki są niejednoznaczne. Przykładowo, badania przeprowadzone przez Sun i in. (2011) wykazały skuteczność mikrojetu plazmowego zasilanego prądem stałym pod ciśnieniem atmosferycznym z 2% He/O₂ jako gazem zasilającym w inaktywacji opornych na środki przeciugrzybicze szczepów *Candida albicans*, *C. krusei* i *C. glabrata*. Wyniki testów ujawniły drastyczny spadek MIC flukonazolu wobec komórek potraktowanych plazmą.

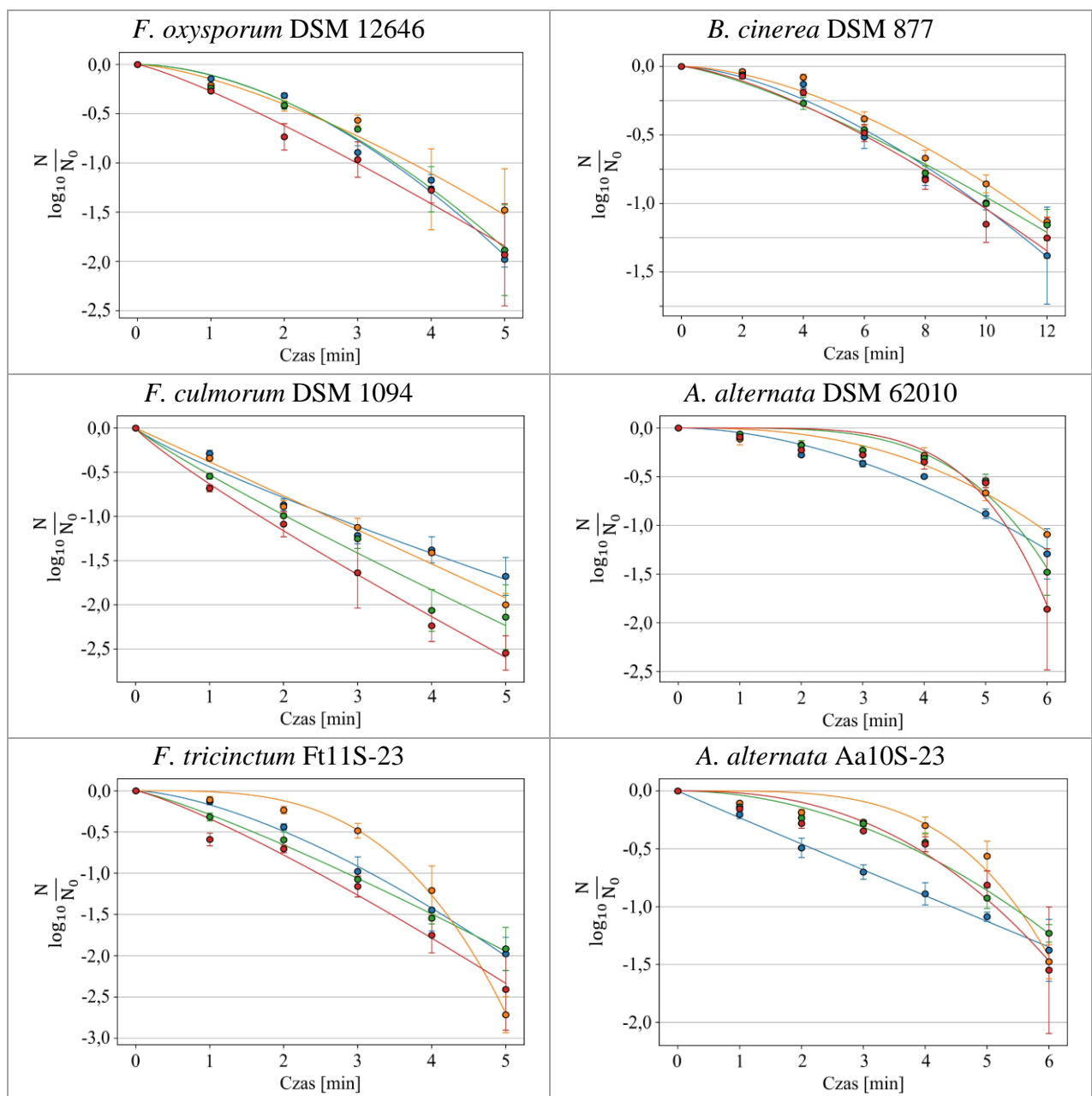
Tyczkowska-Sieroń i in. (2020) z kolei zbadali wpływ wielokrotnego traktowania plazmą na wrażliwość *C. albicans* ATCC 10231 wobec 6 leków przeciugrzybiczych. Komórki nie wykazały różnic wartości MIC po 12 cyklach traktowania plazmą w porównaniu z kulturą nietraktowaną. Na podstawie tych wyników badacze doszli do wniosku, że wielokrotna ekspozycja na plazmę nietermiczną nie stwarza znaczącego zagrożenia, szczególnie w zakresie nabywania lekooporności przez mikroorganizmy.

Uzyskane wyniki badań własnych wykazały, że wielokrotne traktowanie grzybów fitopatogennych plazmą niskotemperaturową wpłynęło na spadek tolerancji wobec co najmniej jednego środka przeciugrzybowego, przy czym u wszystkich szczepów zaobserwowano spadek tolerancji na F4. Wzrost tolerancji nastąpił jedynie w czterech przypadkach, tj. dla *F. culmorum*

DSM 1094 wobec Tobias-Pro 250 EW (F2) i Scorpion 325 S. C. (F3) oraz *F. oxysporum* DSM 12646 i *A. alternata* DSM 62010 wobec Syllit 65 WP (F6).

4.6.7 Ocena ryzyka rozwoju tolerancji na plazmę niskotemperaturową u grzybów fitopatogennych po wielokrotnej ekspozycji

Oceniono zmiany tolerancji wobec plazmy niskotemperaturowej u grzybów poddawanych wielokrotnej ekspozycji na plazmę (P5, P10, P15) na podstawie wyznaczonej wartości δ . Kontrolę stanowiła grzybnia nietraktowana plazmą (rozdział 4.3).



Wykres 7. Zależność redukcji żywych komórek na powierzchni drewna od długości czasu obróbki plazmą dla grzybnia P0 (niebieski), P5 (pomarańczowy), P10 (zielony) i P15 (czerwony). Linie ciągłe wskazują na dopasowanie modelu Weibulla. Słupki błędów wskazują odchylenia standardowe dla 3 powtórzeń.

Na wykresie nr 7 przedstawiono kinetykę inaktywacji komórek grzybów fitopatogennych, natomiast parametry wyznaczone dla modelu Weibulla zebrano w tabeli nr 10.

Dziesiąty czas redukcji (δ) dla większości badanych szczepów ulega niewielkim zmianom w zależności od liczby ekspozycji grzybni na plazmę, co świadczy o stałej ogólnej efektywności inaktywacji plazmą. Po pięciokrotnej ekspozycji na zimną plazmę (P5) wartości δ dla większości szczepów wzrosły w porównaniu do P0, co może sugerować pewną adaptację. Po zwiększeniu liczby ekspozycji (P10 i P15) wartości δ zazwyczaj spadają. Jedynie w przypadku *A. alternata* DSM 62010 oraz *A. alternata* Aa10S-23 zaobserwowano wzrost tolerancji grzybni P5, P10 i P15 względem plazmy w porównaniu do kontroli (P0). Zmiany dziesiątego czasu redukcji pod wpływem wielokrotnej ekspozycji grzybów *F. oxysporum* DSM 12646, *B. cinerea* DSM 877 i *A. alternata* DSM 62010 na zimną plazmę zostały opublikowane w artykule naukowym (Nowinski i in., 2024).

Tabela 10. Wpływ liczby ekspozycji fitopatogennych grzybów na plazmę na zmiany dziesiątego czasu redukcji (δ) oraz współczynnika kształtu (p).

	Liczba ekspozycji na zimną plazmę			
	P0	P5	P10	P15
<i>F. oxysporum</i> DSM 12646				
δ	3 min 27 s	3 min 47 s	3 min 48 s	3 min 3 s
p	1,80	1,45	1,76	1,19
<i>F. culmorum</i> DSM 1094				
δ	2 min 39 s	2 min 37s	2 min 2 s	1 min 41 s
p	0,85	1,00	0,90	0,88
<i>F. tricinctum</i> Ft11S-23				
δ	3 min 11 s	3 min 44 s	2 min 51 s	2 min 28 s
p	1,53	3,39	1,19	1,20
<i>B. cinerea</i> DSM 877				
δ	9 min 53 s	11 min 10 s	10 min 28 s	9 min 11 s
p	1,60	1,67	1,31	1,42
<i>A. alternata</i> DSM 62010				
δ	5 min 32 s	6 min 16 s	5 min 55 s	5 min 45 s
p	1,81	2,55	4,18	5,07
<i>A. alternata</i> Aa10S-23				
δ	4 min 26 s	5 min 29 s	5 min 24 s	5 min 8 s
p	0,98	3,97	1,97	2,46

Wielokrotne traktowanie grzybni plazmą wpłynęło również na zmiany parametru p wyznaczonego dla modelu Weibulla. Dla szczepu *F. oxysporum* DSM 12646 parametr kształtu maleje dla grzybni wielokrotnie traktowanej zimną plazmą (P5, P10, P15) w porównaniu do kontroli (P0). W przypadku *F. tricinctum* Ft11S-23 wartość p najpierw wzrosła dla grzybni po pięciokrotnej ekspozycji na plazmę, a potem spadła, co może wskazywać na zmiany w mechanizmach przetrwania grzybów w zależności od liczby ekspozycji na plazmę. Dla szczepów *F. culmorum* DSM 1094 i *B. cinerea* DSM 877 wartości parametru p pozostały stosunkowo stabilne, natomiast dla *A. alternata* DSM 62010 rosły wraz z liczbą ekspozycji na plazmę. Można zatem przypuszczać, iż zmiany parametru p są efektem odmiennych mechanizmów przetrwania i adaptacji grzybów w odpowiedzi na kolejne ekspozycje na plazmę.

Z dostępnej literatury naukowej wynika, że nie przeprowadzono dotychczas badań oceniających zmiany tolerancji komórek mikroorganizmów na zimną plazmę po wielokrotnej ekspozycji na ten czynnik stresowy, zatem wyniki badań własnych nie mogą być porównane z wynikami uzyskanymi przez innych autorów.

4.7 Wpływ wielokrotnego traktowania grzybów fitopatogennych plazmą niskotemperaturową na zmiany wybranych czynników patogenności

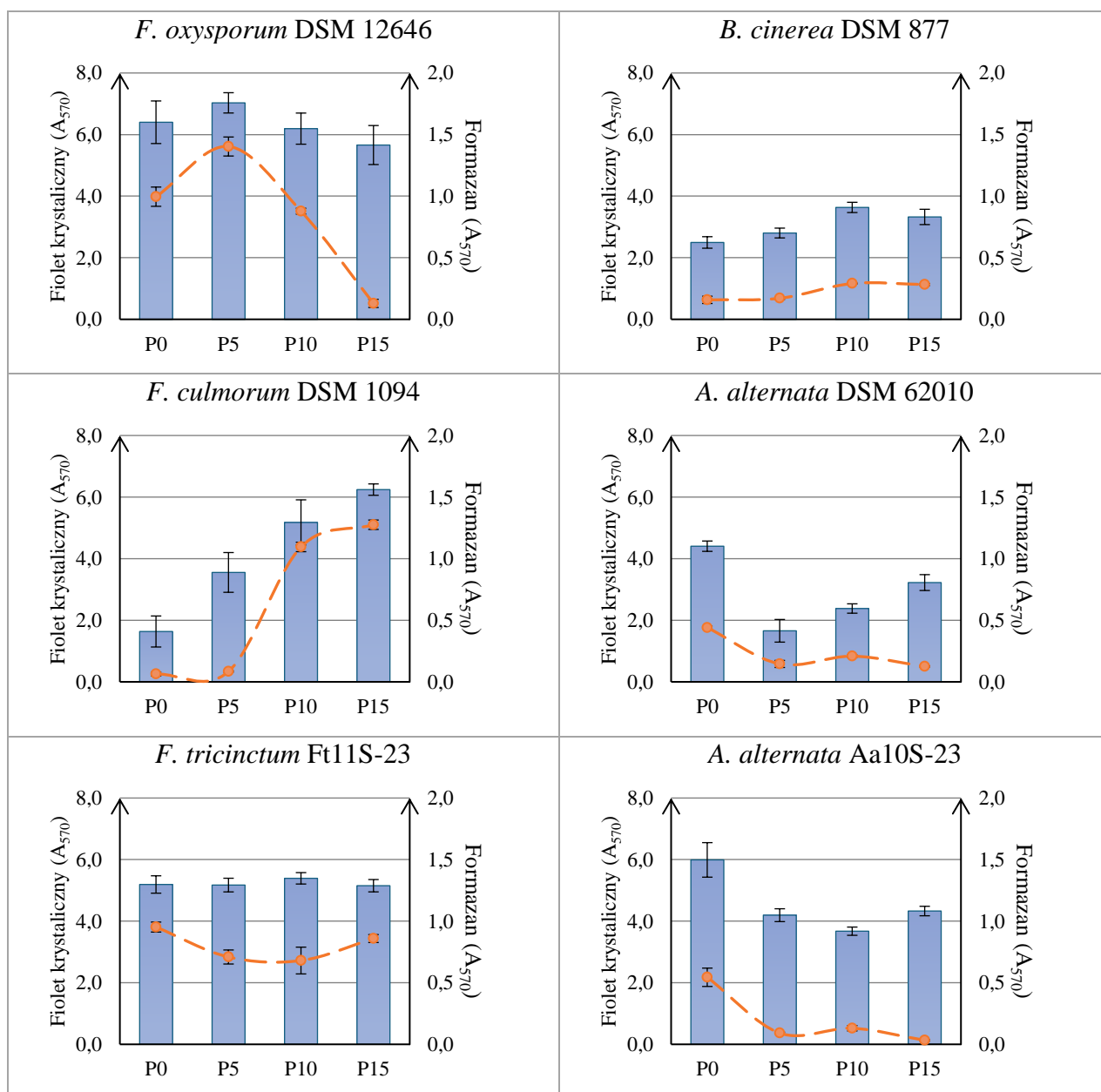
4.7.1 Wpływ plazmy niskotemperaturowej na zdolności zarodników grzybów fitopatogennych do formowania biofilmów

W celu oceny zdolności zarodników grzybów fitopatogennych do tworzenia biofilmu wykorzystano barwienie fioletem krystalicznym. Aktywność metaboliczną biofilmów określono za pomocą testu MTT. Otrzymane wyniki przedstawiono na wykresie nr 8.

Badania ujawniły, że szczep *F. oxysporum* DSM 12646 wykazywał największą zdolność do tworzenia biofilmu, o czym świadczy wysoka wartość absorbancji fioletu krystalicznego ($A_{570}=6,40\pm 0,69$) oraz wysoka aktywność metaboliczna komórek biofilmu ($A_{570}=0,996\pm 0,078$) w przypadku zarodników nietraktowanych plazmą niskotemperaturową (P0). Pięciokrotne traktowanie *F. oxysporum* DSM 12646 plazmą spowodowało wzrost wartości absorbancji fioletu krystalicznego ($A_{570}=7,03\pm 0,33$) i formazanu ($A_{570}=1,40\pm 0,08$) w porównaniu do kontroli (P0), po czym wartości te stopniowo malały po dziesięciokrotnym (P10) i piętnastokrotnym (P15) traktowaniu plazmą (odpowiednio do $6,19\pm 0,051$ i $0,878\pm 0,024$ dla P10 oraz $5,66\pm 0,63$ i $0,129\pm 0,033$ dla P15).

F. culmorum DSM 1094 wykazywał najmniejszą zdolność tworzenia biofilmu spośród badanych szczepów, natomiast wraz ze wzrostem liczby ekspozycji na plazmę

niskotemperaturową zdolności te znacząco wzrosły. Wartości absorpcji fioletu krystalicznego stopniowo rosły w porównaniu do kontroli ($A_{570}=1,64\pm 0,50$) o 117% (P5), 217% (P10) i 282% (P15). Podobnie w przypadku aktywności metabolicznej utworzonego biofilmu, która także znacznie wzrosła w stosunku do kontroli ($A_{570}=0,0633\pm 0,0158$), początkowo o 32,8% po pięciokrotnym (P5) traktowaniu plazmą, a następnie o ponad 1600% po dziesięciokrotnym (P10) i ponad 1900% po piętnastokrotnym traktowaniu plazmą (P15).



Wykres 8. Zdolności grzybów fitopatogennych poddawanych wielokrotnej ekspozycji na subletalną dawkę plazmy niskotemperaturowej do formowania biofilmu podczas 24 godzinnej inkubacji. Niebieskie słupki przedstawiają biomasa biofilmów (lewa oś y) na podstawie odczytu wartości absorpcji fioletu krystalicznego (A_{570}), natomiast pomarańczowe punkty (prawa oś y) przedstawiają aktywność metaboliczną biofilmów określoną za pomocą testu MTT. Wyniki stanowią średnią z 4 powtórzeń wraz z odchyleniem standardowym ($n=4$).

Wielokrotne traktowanie grzybni *B. cinerea* DSM 877 plazmą niskotemperaturową również wpłynęło na poprawę zdolności komórek do formowania biofilmów, ale różnice nie są tak znaczące jak w przypadku *F. culmorum* DSM 1094. Wartości absorbancji roztworu fioletu krystalicznego oraz formazanu dla kontroli (P0) wyniosły odpowiednio $2,50 \pm 0,19$ oraz $0,158 \pm 0,029$, a następnie rosły wraz z liczbą ekspozycji na plazmę, osiągając wartości odpowiednio $3,33 \pm 0,25$ oraz $0,282 \pm 0,008$ po piętnastokrotnym traktowaniu plazmą (P15).

Spadek zdolności do tworzenia biofilmów w wyniku wielokrotnej ekspozycji na plazmę niskotemperaturową zaobserwowano dla *A. alternata* DSM 62010 oraz *A. alternata* Aa10S-23. W przypadku *A. alternata* DSM 62010 najmniejszą zdolność do tworzenia biofilmu wykazywały zarodniki opisane jako P5, dla którego zaobserwowano najmniejszą produkcję biomasy (wartość absorbancji fioletu krystalicznego wyniosła $1,66 \pm 0,37$) oraz aktywności metabolicznej (wartość absorbancji formazanu wyniosła $0,145 \pm 0,029$). Po dziesięcio- (P10) i piętnastokrotnym (P15) traktowaniu komórek plazmą wartości te wzrosły względem P5, ale nadal były niższe w porównaniu do kontroli (P0) odpowiednio o 45,9% i 52,6% dla P10 oraz 26,8% i 71,6% dla P15.

Wyizolowany ze środowiska naturalnego szczep *A. alternata* Aa10S-23 nietraktowany plazmą charakteryzował się wysoką zdolnością do tworzenia biofilmu. Wartość absorbancji roztworu fioletu krystalicznego wyniosła $5,99 \pm 0,56$, natomiast formazanu $0,545 \pm 0,074$, uzyskując drugi najwyższy wynik (po *F. oxysporum* DSM 12646) spośród badanych grzybów nietraktowanych plazmą niskotemperaturową. Zdolność do tworzenia biofilmów po wielokrotnym traktowaniu plazmą była słabsza w porównaniu do próby kontrolnej (P0) (wartości absorbancji roztworu fioletu krystalicznego oraz formazanu spadły odpowiednio o 27,7%-38,7% oraz 76,0%-93,9%).

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów można wnioskować, że wielokrotne traktowanie grzybów plazmą może obniżać, ale i podwyższać zdolność zarodników do tworzenia biofilmów. Problem ten powinien być rozpatrywany indywidualnie w odniesieniu nie tylko do gatunku mikroorganizmu, ale również szczepu.

Zdolność do tworzenia biofilmów przez komórki poddawane działaniu zimnej plazmy została zbadana przez Shaghaghi i in. (2021). Autorzy zaobserwowali hamujące działanie zimnej plazmy generowanej w mieszaninie 98% helu i 2% tlenu na tworzenie biofilmu przez *C. albicans* ATCC 10231 w sposób zależny od czasu traktowania. Komórki poddane działaniu plazmy przez 210 s charakteryzowały się znacznym (65,9%) zahamowaniem zdolności do formowania biofilmu w porównaniu z kontrolą nietraktowaną plazmą nietermiczną. W badaniu

tym nie wzięto jednak pod uwagę redukcji liczby żywych komórek w wyniku działania plazmy, co mogło mieć istotny wpływ na obniżenie zdolności do tworzenia biofilmu.

4.7.2 Zmiany aktywności wybranych enzymów hydrolitycznych po wielokrotnym traktowaniu grzybów fitopatogennych plazmą niskotemperaturową

W tej części badań poddano ocenie wpływ traktowania grzybów subletalną dawką plazmy nietermicznej na zmiany aktywności enzymów rozkładających ścianę komórkową roślin (CWDE), a także enzymów proteolitycznych oraz lipolitycznych. Liczne badania wykazały związek pomiędzy aktywnością tych enzymów, objawami chorobowymi oraz zjadliwością grzybów fitopatogennych (Chandrasekaran i in., 2016; Khaledi i in., 2017; Khaledi i Hassani, 2021; Kikot i in., 2009; Xue i in., 2018).

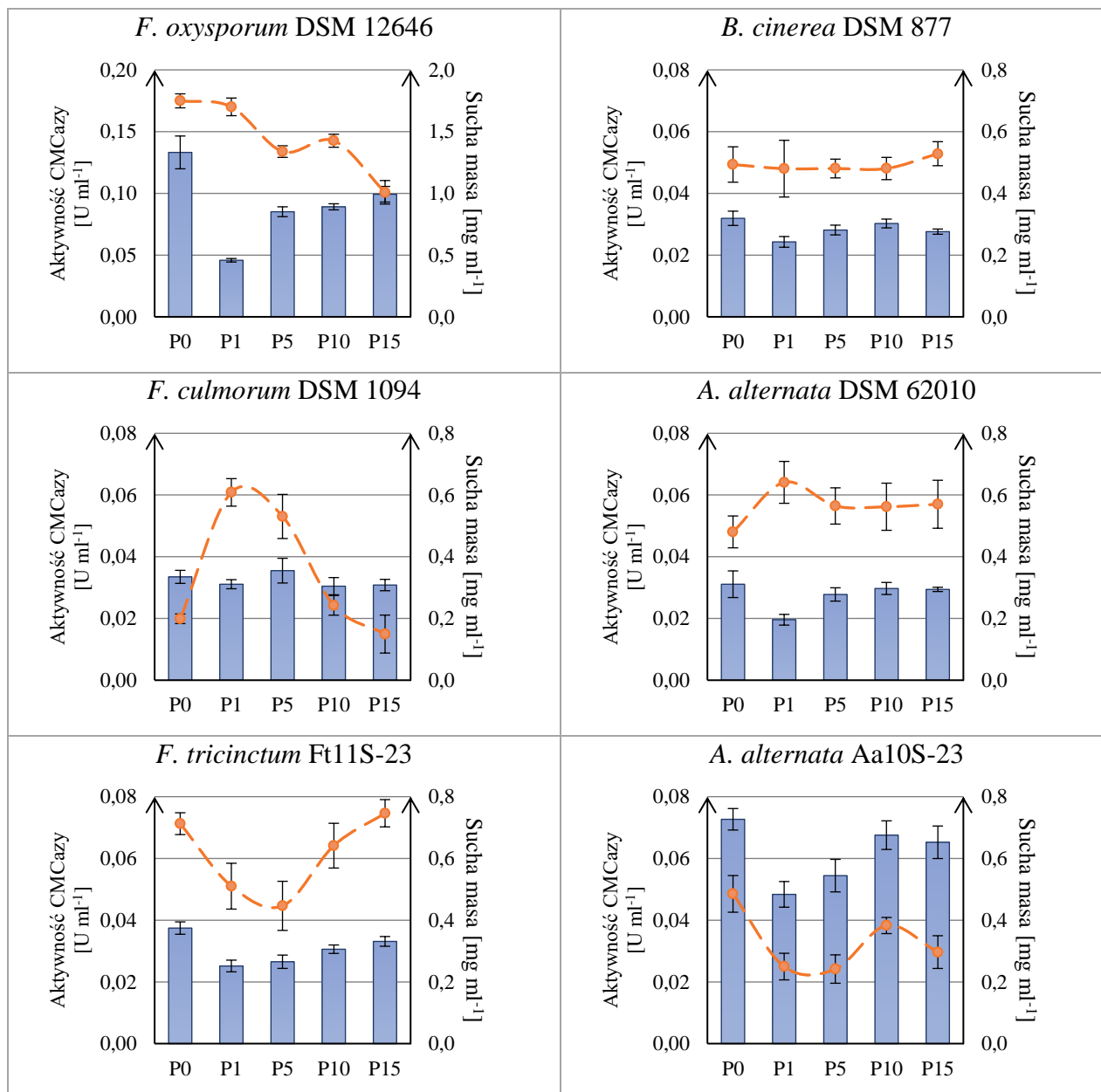
W celu określenia aktywności enzymów rozkładających karboksymetylocelulozę oraz ksylan wykreślono krzywą standardową ($y=1,2417x-0,0587$; $R^2=0,9931$) wartości absorbancji (y) w funkcji stężenia glukozy (x) jako cukru redukującego (mg ml^{-1}). Natomiast aktywność enzymów pektynolitycznych określono na podstawie krzywej standardowej ($y=0,824x-0,0059$; $R^2=0,9976$) zależności wartości absorbancji (y) w funkcji stężenia kwasu D-galakturonowego (x) jako cukru redukującego (mg ml^{-1}).

Zmiany aktywności enzymów rozkładających karboksymetylocelulozę po traktowaniu grzybów fitopatogennych plazmą niskotemperaturową

Wykres nr 9 przedstawia aktywności enzymów rozkładających karboksymetylocelulozę (CMCazy) oznaczonych w filtratach pochodzących (niebieskie słupki, lewa oś y) wraz z suchą biomasa (pomarańczowe punkty, prawa oś y) grzybów fitopatogennych traktowanych plazmą nietermiczną (P1, P5, P10, P15) po 10 dniach inkubacji na podłożu płynnym, zawierającym karboksymetylocelulozę (CMC) jako źródło węgla. Kontrolę stanowiły hodowle grzybów niepoddawanych działaniu zimnej plazmy (P0).

Należy zauważyć, że zarówno aktywności CMCazy wykryte w filtratach po hodowli patogennych grzybów ($\leq 0,0727 \text{ U ml}^{-1}$) oraz produkcja biomasy ($\leq 1,10 \text{ mg ml}^{-1}$) były niskie, z wyjątkiem *F. oxysporum* DSM 12646, dla którego aktywność CMCazy grzybni nietraktowanej plazmą (P0) wyniosła $0,133 \pm 0,013 \text{ U ml}^{-1}$. Po ekspozycji na subletalną dawkę plazmy nietermicznej (P1) aktywność CMCazy spadła o 65,6% w porównaniu do kontroli ($0,046 \pm 0,001 \text{ U ml}^{-1}$), a następnie stopniowo rosła wraz z liczbą ekspozycji na plazmę, uzyskując wartość $0,099 \pm 0,059 \text{ U ml}^{-1}$ po piętnastokrotnym traktowaniu plazmą (P15). Z kolei produkcja biomasy

spadła w wyniku ekspozycji grzybni na zimną plazmę z $1,75 \pm 0,6 \text{ mg ml}^{-1}$ (P0) do $1,01 \pm 0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ (P15).



Wykres 9. Aktywność całkowita karboksymetylocelulazy (niebieskie słupki, lewa oś y) w filtratach po hodowli grzybów fitopatogennych traktowanych zimną plazmą wraz z suchą masą grzybni (pomarańczowe punkty, prawa oś y) po 10 dniach inkubacji na podłożu płynnym. Kontrolę stanowiła hodowla grzybów niepoddawanych działaniu plazmy (P0). Wyniki aktywności enzymatycznej stanowią średnią wraz z odchyleniem standardowym dla dwóch powtórzeń z dwoma pomiarami dla każdego (n=4). Wyniki suchej masy stanowią średnią wraz z odchyleniem standardowym dla dwóch powtórzeń (n=2).

Dla większości grzybów fitopatogennych zaobserwowano podobną tendencję zmian aktywności enzymatycznej, mianowicie aktywność CMCazy wykryta w filtratach pochodzących z hodowli grzybów nietraktowanych plazmą (P0) była najwyższa, po czym spadała po

traktowaniu subletalną dawką plazmy (P1), a następnie nieznacznie rosła w stosunku do P1 po wielokrotnym traktowaniu plazmą (P5, P10, P15), nie przekraczając jednak aktywności oznaczonej dla grzybni P0.

Aktywności wykryte w filtratach *F. culmorum* DSM 1094 oznaczonych jako P0, P1, P5, P10 i P15 były zbliżone ($0,0323 \pm 0,0022$ U ml⁻¹), przy czym najwyższą aktywność CMCase wykryto w filtracie P5 ($0,0355 \pm 0,0040$ U ml⁻¹). Z kolei najwyższą produkcją biomasy ($0,609 \pm 0,045$ mg ml⁻¹) charakteryzowała się grzybnia *F. culmorum* DSM 1094 po pierwszej dawce plazmy (P1).

Zmiany aktywności enzymów rozkładających ksylian po traktowaniu grzybów fitopatogennych plazmą niskotemperaturową

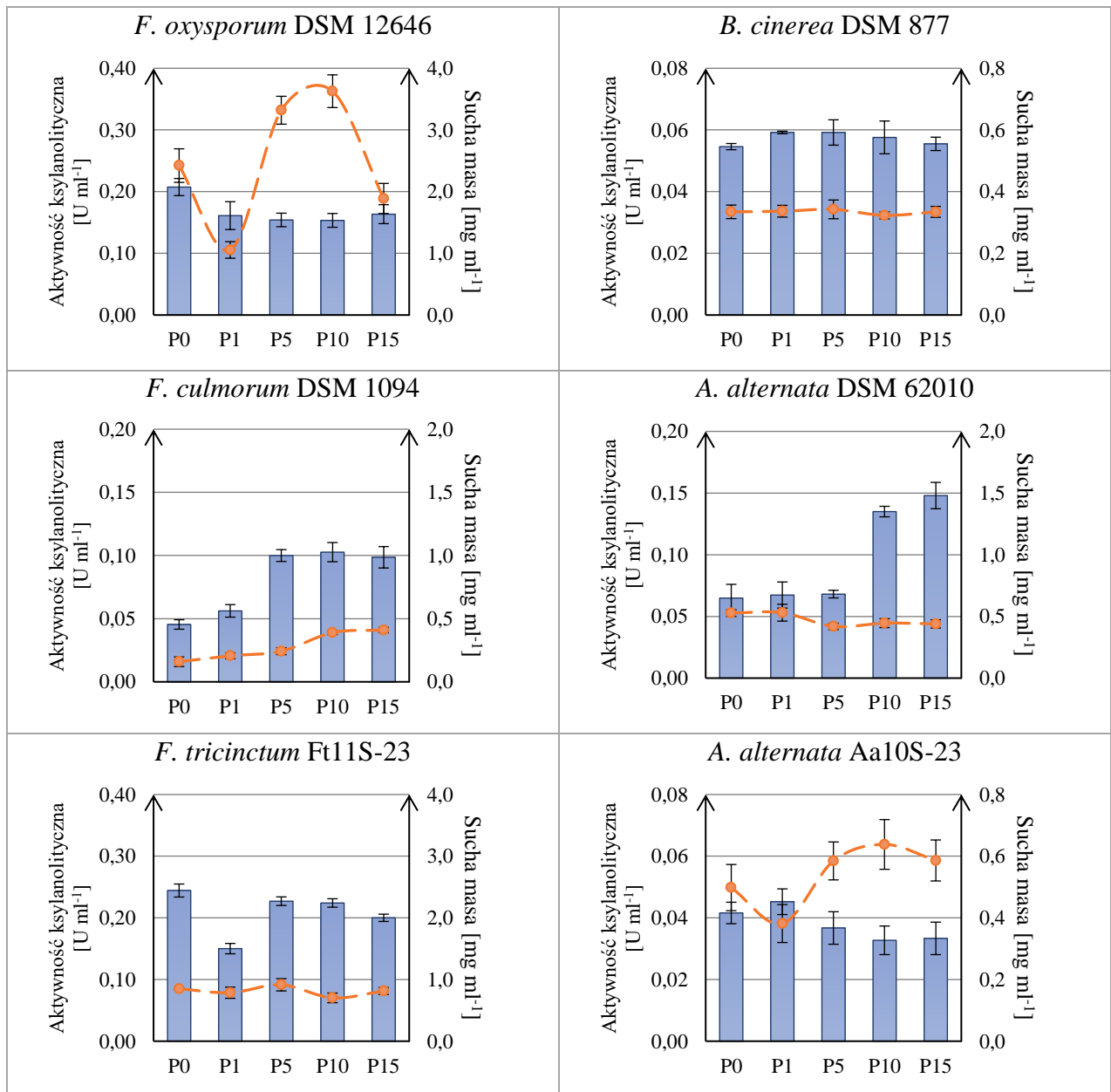
Na wykresie nr 10 przedstawiono zmiany aktywności enzymów rozkładających ksylian wraz z suchą biomasą grzybów fitopatogennych traktowanych zimną plazmą (P1, P5, P10, P15) po 10 dniach hodowli na podłożu płynnym zawierającym ksylian jako źródło węgla. Kontrolę stanowiły hodowle grzybów nietraktowanych zimną plazmą (P0).

Najwyższą aktywność enzymów rozkładających ksylian oznaczono w filtratach hodowli wyjściowych (P0) *F. tricinctum* Ft11S-23 ($0,244 \pm 0,011$ U ml⁻¹) oraz *F. oxysporum* DSM 12646 ($0,207 \pm 0,014$ U ml⁻¹). W przypadku pozostałych grzybów fitopatogennych nietraktowanych plazmą niskotemperaturową aktywność ksylianaz była znacznie niższa i wyniosła odpowiednio $0,0649 \pm 0,0111$ U ml⁻¹ dla *A. alternata* DSM 62010; $0,0546 \pm 0,0010$ U ml⁻¹ dla *B. cinerea* DSM 877; $0,0454 \pm 0,0038$ U ml⁻¹ dla *F. culmorum* DSM 1094 oraz $0,0416 \pm 0,0008$ U ml⁻¹ dla *A. alternata* Aa10S-23.

Obróbka plazmą niskotemperaturową doprowadziła do spadku aktywności ksylianaz u *F. oxysporum* DSM 12646 o ponad 20%. Natomiast produkcja biomasy po pięciokrotnym (P5) i dziesięciokrotnym (P10) traktowaniu plazmą znacznie wzrosła w porównaniu do kontroli (P0) (odpowiednio o 37,0% i 49,8%). W przypadku *F. tricinctum* Ft11S-23 również zaobserwowano spadek aktywności enzymatycznej, przy czym najniższą wartość aktywności ($0,150 \pm 0,008$ U ml⁻¹) uzyskano po pierwszej ekspozycji (P1) na subletalną dawkę plazmy nietermicznej. Natomiast produkcja biomasy mieściła się w zakresie od $0,703 \pm 0,078$ mg ml⁻¹ (P10) do $0,914 \pm 0,100$ mg ml⁻¹ (P5).

Aktywność ksylianaz dla *A. alternata* Aa10S-23 po traktowaniu subletalną dawką plazmy (P1) początkowo wzrosła w porównaniu do kontroli (P0) o 8,8%, natomiast zwiększanie liczby ekspozycji na plazmę spowodowało spadek aktywności o 11,7% (P5), 21,3% (P10) i 19,8% (P15). Traktowanie subletalną dawką plazmy (P1) spowodowało początkowy spadek suchej

masy o 23,4%, natomiast po wielokrotnym traktowaniu grzybni plazmą zaobserwowano wzrost produkcji biomasy względem kontroli o 17,4%-28,1%. Produkcji biomasy jest ujemnie skorelowana z aktywnością ksylanolityczną ($r=-0,8347$, $p<0,05$).



Wykres 10. Aktywność całkowita ksylanaz (niebieskie słupki, lewa oś y) w filtratach po hodowli grzybów fitopatogennych traktowanych plazmą niskotemperaturową wraz z suchą masą grzybni (pomarańczowe punkty, prawa oś y) po 10 dniach inkubacji na podłożu płynnym. Kontrolę stanowiła hodowla grzybów nietraktowanych plazmą (P0). Wyniki aktywności enzymatycznej stanowią średnią wraz z odchyleniem standardowym dla dwóch powtórzeń z dwoma pomiarami dla każdego ($n=4$). Wyniki suchej masy stanowią średnią wraz z odchyleniem standardowym dla dwóch powtórzeń ($n=2$).

Aktywność ksylanaz oznaczonych dla *B. cinerea* DSM 877 nie zmieniała się znacząco pod wpływem działania plazmy niskotemperaturowej i mieściła się w zakresie 0,0546-0,0592 U ml⁻¹. Podobnie w przypadku produkcji biomasy.

Z kolei stymulujący wpływ na produkcję enzymów ksylanolitycznych odnotowano dla *F. culmorum* DSM 1094 i *A. alternata* DSM 62010. Aktywność enzymatyczna *F. culmorum* DSM 1094 wzrosła w porównaniu od kontroli (P0) odpowiednio o 23,7% (P1), 120% (P5), 126% (P10) i 117% (P15). Natomiast u *A. alternata* DSM 62010 różnice te wyniosły kolejno 3,8%, 4,9%, 108% i 128%. W przypadku *F. culmorum* DSM 1094 zaobserwowano dodatnią korelację aktywności ksylanolitycznej i produkcji biomasy ($r=0,7881$, $p<0,05$), natomiast dla *A. alternata* DSM 62010 zaobserwowano spadek produkcji biomasy po wielokrotnym traktowaniu grzybni subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej.

Zmiany aktywności enzymów rozkładających pektyny po traktowaniu grzybów fitopatogennych plazmą niskotemperaturową

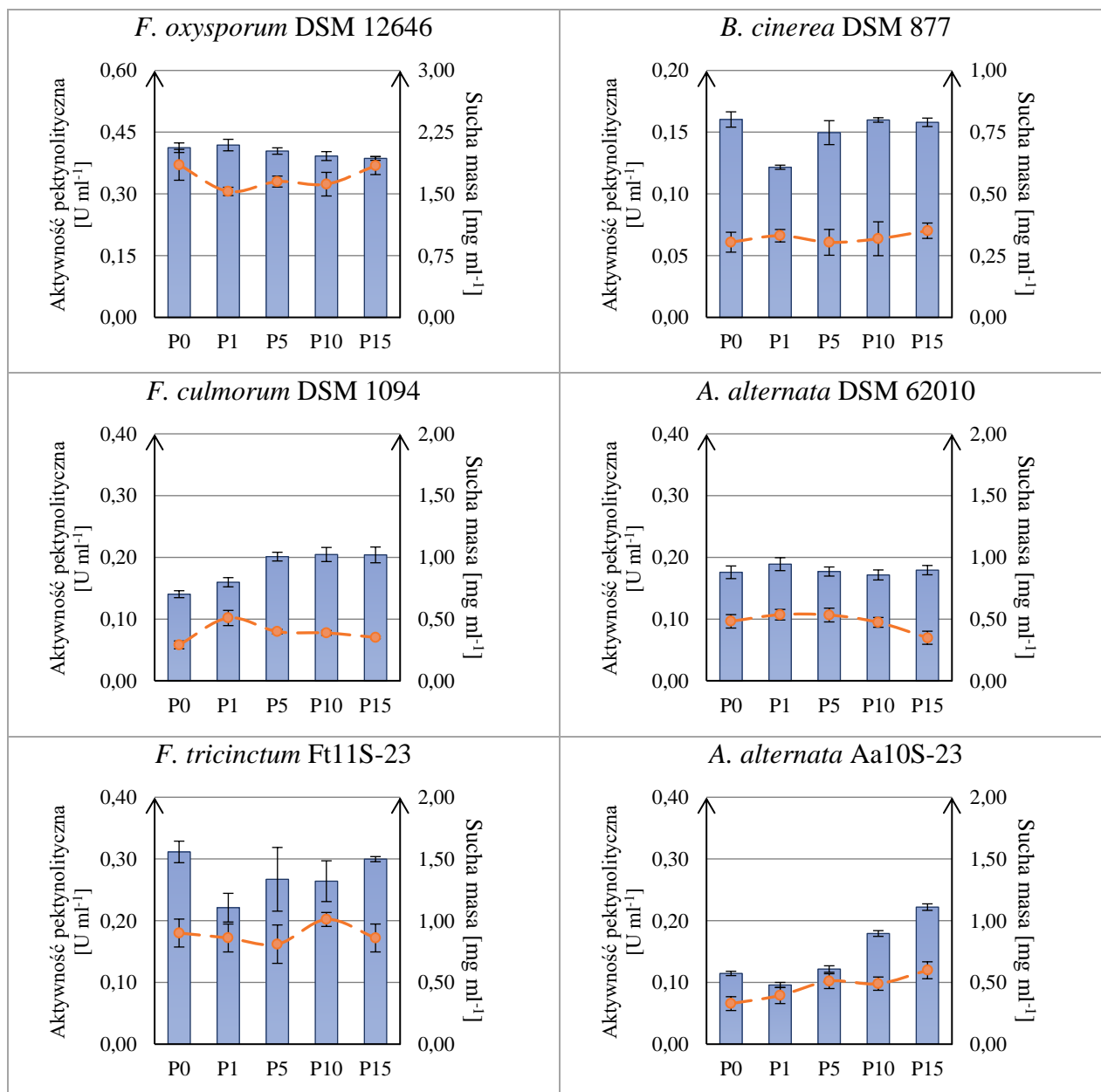
Wykres nr 11 przedstawia zmiany aktywności enzymów rozkładających pektyny wraz z suchą biomasą grzybów fitopatogennych traktowanych subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej (P1, P5, P10, P15) po 10 dniach hodowli na podłożu płynnym, zawierającym pektyny jako źródło węgla. Kontrolę stanowiła hodowla grzybów nietraktowanych plazmą (P0).

Najwyższą wyjściową (P0) aktywność pektynolityczną wykryto u *F. oxysporum* DSM 12646 ($0,412\pm 0,012$ U ml⁻¹), a następnie *F. tricinctum* Ft11S-23 ($0,311\pm 0,017$ U ml⁻¹), *A. alternata* DSM 62010 ($0,176\pm 0,010$ U ml⁻¹), *B. cinerea* DSM 877 ($0,160\pm 0,006$ U ml⁻¹), *F. culmorum* DSM 1094 ($0,140\pm 0,006$ U ml⁻¹) oraz *A. alternata* Aa10S-23 ($0,115\pm 0,004$ U ml⁻¹).

Aktywność pektynaz wykryta w filtratach otrzymanych po hodowli *F. oxysporum* DSM 12646 ($0,386$ U ml⁻¹ - $0,419$ U ml⁻¹) oraz *A. alternata* DSM 62010 ($0,171$ - $0,189$ U ml⁻¹) nie zmieniała się znacząco w wyniku kolejnych ekspozycji grzybni na zimną plazmę. Z kolei produkcja biomasy *F. oxysporum* DSM 12646 spadła względem kontroli ($1,85\pm 0,19$ mg ml⁻¹) o 0,5%-17,4% w wyniku traktowania plazmą. Dla *A. alternata* DSM 62010 zaobserwowano początkowy wzrost produkcji biomasy o 11,2% (P1) i 10,6% (P5) w porównaniu do kontroli ($0,482\pm 0,054$ mg ml⁻¹), z następującym spadkiem produkcji biomasy w wyniku zwiększania liczby ekspozycji na zimną plazmę o 1,8% (P10) i 27,6% (P15).

W przypadku *F. culmorum* DSM 1094 widoczny jest stopniowy wzrost aktywności enzymów rozkładających pektynę w wyniku traktowania plazmą z $0,140\pm 0,006$ U ml⁻¹ (P0) do $0,204\pm 0,013$ U ml⁻¹ (P15). Produkcja biomasy wzrosła od 21,0% do 75,0% po traktowaniu zimną

plazmą. Podobnie w przypadku *A. alternata* Aa10S-23, przy czym aktywność pektynaz początkowo spadła o 16,4% po pierwszej dawce plazmy (P1), a następnie stopniowo rosła w porównaniu do kontroli (P0) odpowiednio o 6,2%, 56,4%, 93,8% po piątym (P5), dziesiątym (P10) i piętnastym (P15) traktowaniu plazmą. Produkcja biomasy była dodatnio skorelowana z aktywnością enzymatyczną ($r=0,6777$, $p<0,05$) i mieściła się w zakresie 0,329-0,599 mg ml⁻¹.



Wykres 11. Aktywność całkowita enzymów pektynolitycznych (niebieskie słupki, lewa oś y) w filtratach po hodowli grzybów fitopatogennych traktowanych subletalną dawką plazmy nietermicznej wraz z suchą masą grzybnicy (pomarańczowe punkty, prawa oś y) po 10 dniach inkubacji na podłożu płynnym. Kontrolę stanowiła hodowla grzybów niepoddawanych działaniu plazmy (P0). Wyniki aktywności enzymatycznej stanowią średnią wraz z odchyleniem standardowym dla dwóch powtórzeń z dwoma pomiarami dla każdego ($n=4$). Wyniki suchej masy stanowią średnią wraz z odchyleniem standardowym dla dwóch powtórzeń ($n=2$).

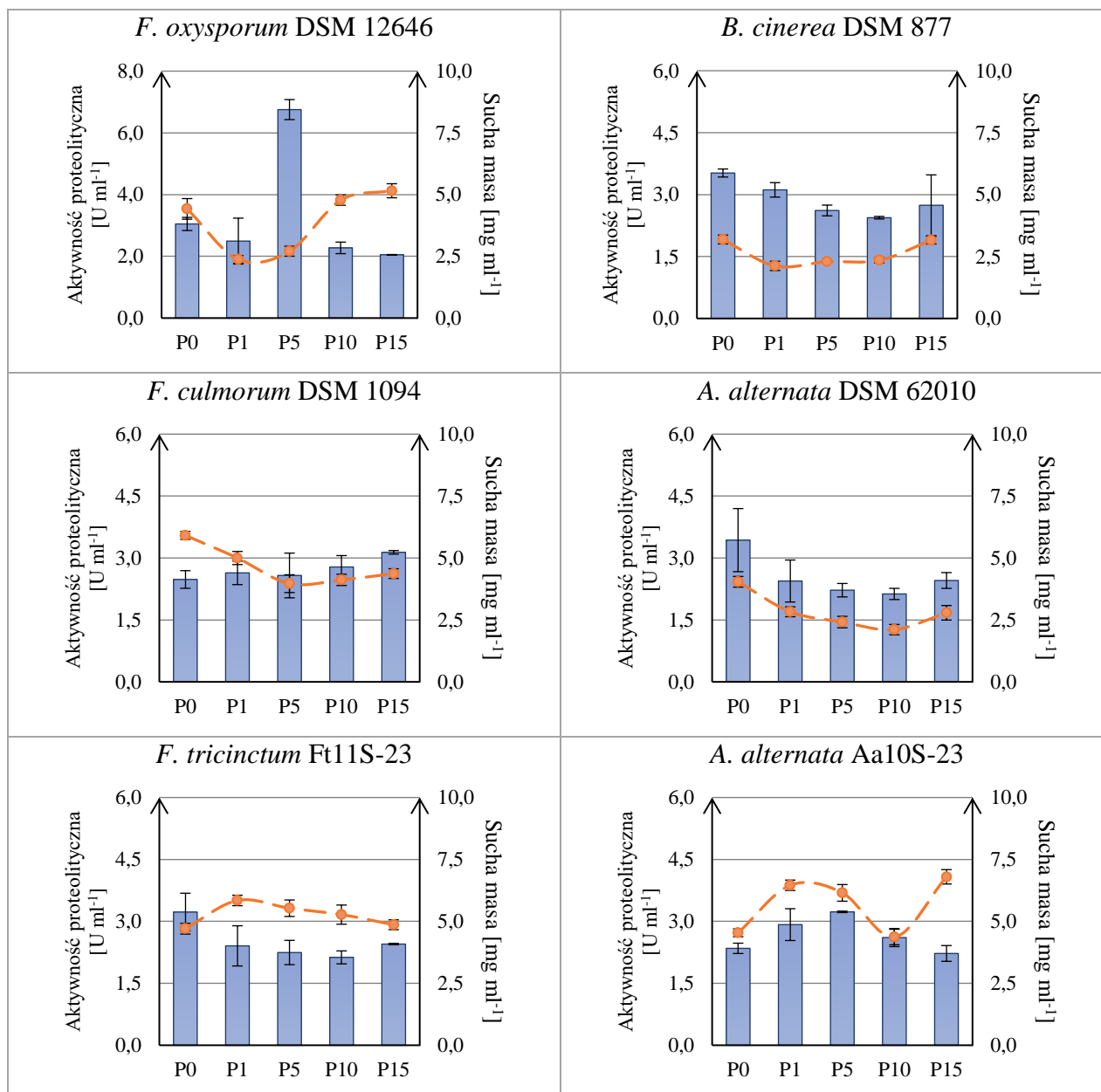
Traktowanie grzybów *F. tricinctum* Ft11S-23 oraz *B. cinerea* DSM 877 subletalną dawką plazmy nietermicznej (P1) spowodowało początkowy spadek aktywności enzymatycznej względem kontroli (P0) odpowiednio o 29,0% i 24,1%, po czym aktywność oznaczona w filtratach po hodowli grzybni wielokrotnie traktowanej plazmą wzrosła do poziomu około 0,277 U ml⁻¹ dla *F. tricinctum* Ft11S-23 oraz 0,156 U ml⁻¹ dla *B. cinerea* DSM 877. Najwyższą produkcję biomasy dla *F. tricinctum* Ft11S-23 wykryto po dziesięciokrotnym traktowaniu plazmą (1,10±0,06 mg ml⁻¹), natomiast dla *B. cinerea* DSM 877 po piętnastokrotnym traktowaniu plazmą (0,351±0,031 mg ml⁻¹). Omówione wyniki badań własnych dotyczących zmian aktywności CWDE pod wpływem wielokrotnej ekspozycji szczepów *F. oxysporum* DSM 12646, *B. cinerea* DSM 877 i *A. alternata* DSM 62010 na zimną plazmę zostały opublikowane w artykule naukowym (Nowinski i in., 2024).

Zmiany aktywności enzymów proteolitycznych po traktowaniu grzybów fitopatogennych plazmą niskotemperaturową

Fosfolipidy i białka stanowią główne składniki błony komórkowej gospodarza. Enzymy katalizujące hydrolizę tych składników, takie jak lipazy i proteazy uznawane są za czynniki patogeniczności. Proteazy (razem z CWDE) działają na wczesnym etapie infekcji, degradując białka strukturalne ścian komórkowych w celu inwazji gospodarza. W późniejszych etapach infekcji enzymy te odpowiadają za degradację białek zapasowych, zmieniając również parametry jakościowe surowca roślinnego (Ortega i in., 2013). Zmiany aktywności enzymów proteolitycznych wykrywanych w filtratach uzyskanych po hodowli grzybów fitopatogennych poddawanych działaniu plazmy nietermicznej przedstawiono na wykresie nr 12. Kontrolę stanowiły filtry po hodowli grzybni nietraktowanej plazmą niskotemperaturową (P0).

Jak widać na poniższych wykresach aktywność proteolityczna wykrywana w filtratach bezkomórkowych uzyskiwanych z hodowli badanych fitopatogenów zależała od szczepu oraz liczby ekspozycji na plazmę nietermiczną.

Aktywności enzymów proteolitycznych oznaczone w filtratach po hodowli *F. oxysporum* DSM 12646 po pierwszej (P1), dziesiątej (P10) i piętnastej (P15) ekspozycji na subletalną dawkę plazmy niskotemperaturowej były niższe w porównaniu do kontroli P0 odpowiednio o 18,2 %, 25,4% oraz 32,7%, w odróżnieniu od filtratu P5, dla którego nastąpił wzrost aktywności enzymatycznej do 6,75±0,32 U ml⁻¹. Produkcja biomasy *F. oxysporum* DSM 12646 początkowo spadła w porównaniu do kontroli (4,42±0,42 mg ml⁻¹) odpowiednio o 46,3% (P1) i 38,8% (P5), a następnie wzrosła o 8,1% i 16,6% po dziesiątym (P10) i piętnastym traktowaniu plazmą (P15).



Wykres 12. Aktywność proteolityczna (niebieskie słupki, lewa oś y) filtratów po hodowli grzybów fitopatogennych poddawanych działaniu plazmy nietermicznej wraz z suchą masą grzybni (pomarańczowe punkty, prawa oś y) po 7 dniach hodowli na podłożu płynnym. Kontrolę stanowiła hodowla grzybów nietraktowanych plazmą (P0). Wyniki aktywności enzymatycznej stanowią średnią wraz z odchyleniem standardowym dla dwóch powtórzeń z dwoma pomiarami dla każdego (n=4). Wyniki suchej masy stanowią średnią wraz z odchyleniem standardowym dla dwóch powtórzeń (n=2).

W przypadku *F. culmorum* DSM 1094 zaobserwowano wzrost aktywności proteolitycznej od 3,9% do 26,5% w wyniku ekspozycji grzybni na zimną plazmę, przy jednoczesnym spadku produkcji biomasy.

Z kolei działanie plazmy niskotemperaturowej wpłynęło na spadek aktywności proteolitycznej u *F. tricinctum* Ft11S-23 (o 24,0%-34,0%), *B. cinerea* DSM 877 (o 11,6%-30,7%) oraz *A. alternata* DSM 62010 (o 28,5%-38,0%) w porównaniu do grzybni

nietraktowanej plazmą (P0). W przypadku *F. tricinctum* Ft11S-23 zaobserwowano stymulujące działanie plazmy na produkcję biomasy (wzrost o 3,4%-24,2% w porównaniu do kontroli), w odróżnieniu do *B. cinerea* DSM 877 i *A. alternata* DSM 62010, dla których zaobserwowano spadek produkcji biomasy (odpowiednio o 0,9%-33,4% oraz 29,9%-47,8%). W przypadku *A. alternata* DSM 62010 aktywność enzymatyczna i produkcja biomasy były dodatnio skorelowane ($r=0,7350$, $p<0,05$).

W filtratach po hodowli grzybni *A. alternata* Aa10S-23, aktywność proteolityczna początkowo rosła do uzyskania maksymalnej wartości ($3,23\pm 0,02$ U ml⁻¹) po pięciokrotnym traktowaniu plazmą (P5). Natomiast zwiększenie liczby ekspozycji grzybni na zimną plazmę do piętnastu (P15) spowodowało spadek aktywności enzymatycznej o 5,3% w porównaniu do kontroli (P0). Działanie plazmy niskotemperaturowej wpłynęło na wzrost produkcji biomasy (35,5%-49,8%) z wyjątkiem grzybni P10, której sucha masa po 7 dniach inkubacji na podłożu płynnym była niższa o 3,8% od kontroli ($4,54\pm 0,16$ mg ml⁻¹).

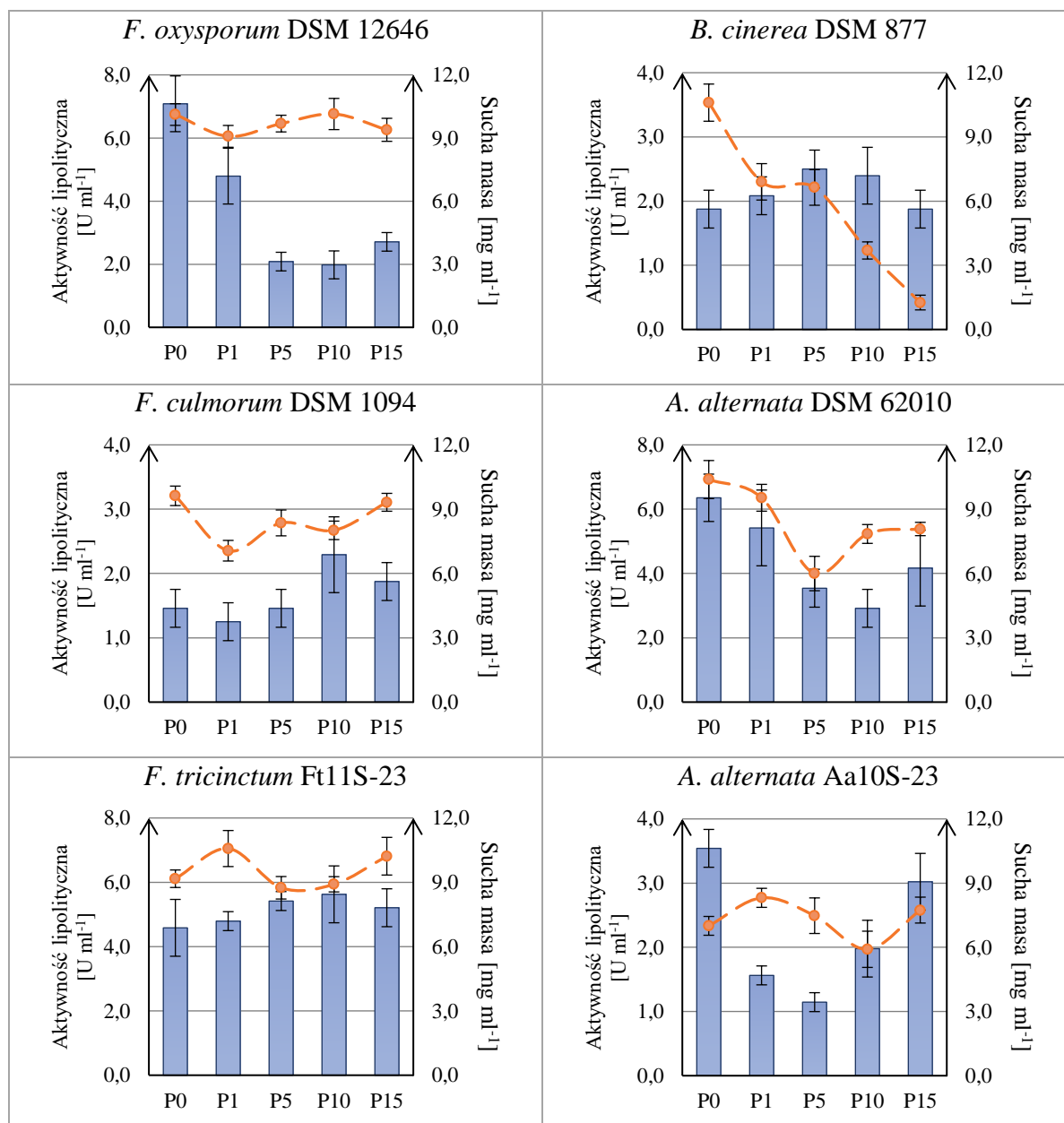
Zmiany aktywność enzymów lipolitycznych po traktowaniu grzybów fitopatogennych plazmą niskotemperaturową

Lipazy biorą udział w penetracji bariery komórek roślinnych (wosków i skórek) przez grzyby fitopatogenne, a następnie degradują zmagazynowane wewnątrzkomórkowe lipidy. Przypuszcza się, że zjadliwość niektórych patogennych grzybów może być powiązana z aktywnością lipaz, przy czym rola tych enzymów w procesie infekcji różni się w zależności od gatunku grzybów oraz strategii infekcji. Enzymy rozkładające kutykulę są niezbędne do penetracji najbardziej zewnętrznej bariery naskórka żywiciela w przypadku patogenów infekujących części nadziemne roślin (Dhiman i in., 2022; Feng i in., 2005; Taheri, 2019).

Wpływ traktowania grzybów fitopatogennych na aktywność enzymów lipolitycznych oznaczanych w przesączach pohodowlanych przedstawiono na wykresie nr 13.

W przypadku tej grupy hydrolaz zmiany aktywności enzymatycznej również zależały od szczepu oraz liczby ekspozycji grzybni na działanie plazmy temperaturowej. Dla szczepów *F. oxysporum* DSM 12646, *A. alternata* DSM 62010 i *A. alternata* Aa10S-23 zaobserwowano spadek aktywności lipolitycznej (w porównaniu do kontroli) pod wpływem działania plazmy niskotemperaturowej. Najniższą aktywność lipolityczną w przesączach uzyskanych z hodowli *F. oxysporum* DSM 12646 ($1,98\pm 0,44$ U ml⁻¹) oraz *A. alternata* DSM 62010 ($2,92\pm 0,59$ U ml⁻¹) wykryto po dziesięciokrotnym traktowaniu plazmą (P10). Z kolei w filtratach po hodowli

A. alternata Aa10S-23 najniższą aktywność enzymatyczną ($1,15 \pm 0,15$ U ml⁻¹) wykryto po pięciokrotnym traktowaniu plazmą (P5).



Wykres 13. Aktywność lipolityczna (niebieskie słupki, lewa oś y) w filtratach po hodowli grzybi fitopatogennych poddawanych działaniu plazmy niskotemperaturowej (P1, P5, P10, P15) wraz z suchą masą grzybnicy (pomarańczowe punkty, prawa oś y) po 10 dniach hodowli na podłożu płynnym. Kontrolę stanowiła hodowla grzybi nietraktowanych plazmą (P0). Wyniki aktywności enzymatycznej stanowią średnią wraz z odchyleniem standardowym dla dwóch powtórzeń z dwoma pomiarami dla każdego (n=4). Wyniki suchej masy stanowią średnią wraz z odchyleniem standardowym dla dwóch powtórzeń (n=2).

W przypadku *F. culmorum* DSM 1094, *F. tricinctum* Ft11S-23 oraz *B. cinerea* DSM 877 wielokrotne traktowanie plazmą tych patogenów wpłynęło na podwyższenie aktywności enzymów lipolitycznych obecnych w przesączach pochodzących (w porównaniu do P0).

Aktywność lipolityczna *F. culmorum* DSM 1094 była najniższa spośród badanych grzybów fitopatogennych i mieściła się w zakresie $1,25 \pm 0,29$ U ml⁻¹ (P1) do $2,29 \pm 0,59$ U ml⁻¹ (P10). Natomiast produkcja biomasy grzybów traktowanych zimną plazmą spadła o 3,14%-26,6% względem kontroli ($9,62 \pm 0,45$ mg ml⁻¹).

Aktywność enzymatyczna filtratów po hodowli grzybni *F. tricinctum* Ft11S-23 wzrosła w porównaniu do kontroli (P0) po ekspozycji na zimną plazmę o 4,6%-22,7%, a najwyższą aktywność ($5,63 \pm 0,88$ U ml⁻¹) uzyskano w filtracie P10. Produkcja biomasy początkowo wzrosła w porównaniu do kontroli ($9,17 \pm 0,41$ mg ml⁻¹) o 15,4% po traktowaniu subletalną dawką plazmy (P1), następnie spadła po pięcio- (P5) i dziesięciokrotnym traktowaniu (P10) odpowiednio o 4,6% i 2,8%, po czym znowu wzrosła o 11,5% dla P15.

Dla *B. cinerea* DSM 877 zaobserwowano wzrost aktywności lipolitycznej względem kontroli (P0) o 11,1%-33,3% do dziesięciokrotnej (P10) ekspozycji na plazmę, natomiast aktywność filtratu uzyskanego po piętnastokrotnym traktowaniu grzybni plazmą (P15) nie różniła się od kontroli ($1,88 \pm 0,29$ U ml⁻¹). Z kolei produkcja biomasy gwałtownie spadała w wyniku kolejnych ekspozycji grzybni na plazmę niskotemperaturową z $10,6 \pm 0,9$ mg ml⁻¹ (P0) do $1,26 \pm 0,34$ mg ml⁻¹ (P15).

Wyniki badań własnych wskazują na zdolność grzybów fitopatogennych do wzrostu w pożywkach z CMC, ksylanem lub pektyną jako źródłem węgla. Aktywność enzymów celulolitycznych i ksylanolitycznych była znacznie niższa niż pektynaz. Podobnych obserwacji dokonali Ramos i in. (2016), którzy zbadali zdolność wytwarzania enzymów degradujących ścianę komórkową przez grzyby *Macrophomina phaseolina*. Pierwszymi wykrytymi enzymami zewnątrzkomórkowymi, związanymi z degradacją głównych składników ściany komórkowej roślin były pektynazy, a uzyskana aktywność ($0,15$ - $1,30$ U ml⁻¹) była wyższa niż celulaz ($0,070$ - $0,164$ U ml⁻¹) i ksylanaz ($0,035$ - $0,084$ U ml⁻¹). Według autorów produkcja pektynaz podczas hodowli *in vitro* *M. phaseolina* powiązana jest z ich istotną rolą w patogenezie roślin.

Zaobserwowano także wpływ liczby ekspozycji grzybni na plazmę niskotemperaturową na aktywność oznaczanych enzymów hydrolitycznych. Istnieje jednak niewiele badań dotyczących oceny zmian aktywności enzymów związanych z patogennością po wielokrotnej ekspozycji grzybów na plazmę niskotemperaturową.

Yu i in. (2022) zaobserwowali, że traktowanie grzybni plazmą przez 2 lub 5 minut zwiększa aktywność enzymów celulolitycznych u *Neurospora crassa*, natomiast zastosowanie kolejnej dawki (2 min) plazmy po 24 h inkubacji spowodowało dodatkowy wzrost aktywności enzymów celulolitycznych. Wydłużenie czasu traktowania do 10 minut doprowadziło z kolei do spadku

aktywności enzymu. Wyniki te sugerują, że może istnieć pewien próg dawki plazmy (czasu traktowania), powodujący wzmocnienie bądź zahamowanie procesu wytwarzania enzymów, a wydzielanie enzymów związane jest z podwyższonym poziomem wewnątrzkomórkowego tlenu azotu II (NO), indukowanym przez działanie plazmy nietermicznej.

Tyczkowska-Sieroń i in. (2020) z kolei przebadali wpływ wielokrotnego traktowania na zmiany genotypowe i fenotypowe u *C. albicans*. Autorzy wykazali, że komórki *C. albicans* wielokrotnie traktowane subletalną dawką plazmy nietermicznej nie wykazują znaczących zmian w zjadliwości, mimo występowania mutacji genetycznych. Spośród badanych enzymów hydrolitycznych w dziewięciu przypadkach doszło do zmniejszenia aktywności lub całkowitej dezaktywacji w wyniku kolejnych cykli obróbki plazmą. Zmiany aktywności były jednak odwracalne i po przesianiu mikroorganizmów do świeżego podłoża powróciły do stanu pierwotnego (sprzed obróbki plazmą). Z kolei aktywność enzymatyczna jednego z badanych enzymów (fosfohydrolazy naftolowej AS-BI) trwale wzrosła i pozostała niezmienną po hodowli na świeżym podłożu.

4.7.3 Wpływ filtratów po hodowli grzybów fitopatogennych poddawanych wielokrotnej ekspozycji na subletalną dawkę plazmy niskotemperaturowej na kiełkowanie nasion i rozwój roślin w początkowych fazach

Patogeny roślinne syntetyzują substancje wywołujące objawy chorobowe nie tylko w kontakcie z rośliną żywicielską, ale także podczas wzrostu w pożywce hodowlanej. Objawy choroby roślin wywołane przez grzyby nekrotroficzne, takie jak plamistość lub więdnienie liści, chlorozy, nekrozy, gnicie części lub całej rośliny oraz zahamowanie wzrostu, mogą być zatem stwierdzone po potraktowaniu roślin sterylnymi filtratami pochodzonymi tych grzybów (Prell i Day, 2001). W dostępnej dotychczas literaturze naukowej nie podjęto próby wyjaśnienia wpływu plazmy niskotemperaturowej na toksyczność wydzielanych przez grzyby fitopatogenne metabolitów w badaniach *in vivo*.

W tej części pracy sprawdzono wpływ wielokrotnego traktowania grzybów fitopatogennych plazmą nietermiczną na właściwości fitotoksyczne filtratów pochodzących względem nasion ogórka. Przez 7 dni monitorowano rozwój roślin z nasion inkubowanych przez 24 h w filtratach otrzymanym po hodowli grzybów fitopatogennych nietraktowanych plazmą niskotemperaturową (P0) oraz po pięcio- (P5), dziesięcio- (P10) i piętnastokrotnym (P15) traktowaniu subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej. Kontrolę (K) stanowiły nasiona inkubowane w sterylnej pożywce hodowlanej w tych samych warunkach.

Filtrat	Liczba ekspozycji na zimną plazmę			
	P0	P5	P10	P15
<i>F. oxysporum</i> DSM 12646				
<i>F. culmorum</i> DSM 1094				
<i>F. tricinctum</i> Ft11S-23				
<i>B. cinerea</i> DSM 877				
<i>A. alternata</i> DSM 62010				
<i>A. alternata</i> Aa10S-23				
Kontrola K				

Rysunek 24. Siewki ogórka po 7 dniach trwania testu toksyczności filtratów po hodowli grzybów fitopatogennych nietraktowanych plazmą (P0) oraz wielokrotnie traktowanych plazmą niskotemperaturową (P5, P10, P15). Kontrolę (K) stanowiły siewki po inkubacji nasion w sterylnej pożywce hodowlanej.

Rysunek nr 24 przedstawia obraz siewek ogórka po 7 dniach trwania testu, służące do wstępnej oceny wpływu filtratów pochodzących na wczesne etapy rozwoju roślin.

Widoczne są wyraźne różnice w wyglądzie roślin należących do grupy kontrolnej (K) w porównaniu do pozostałych grup. Rośliny kontrolne charakteryzowały się rozbudowanym systemem korzeniowym, wrastającym w głąb podłoża, długimi i grubymi łodygami oraz jasnozielonymi liśćmi. Natomiast rośliny traktowane przesączami pochodzącymi miały krótkie i skąpo rozgałęzione korzenie, krótką lub całkowity brak łodygi oraz brak lub nieliczne liście o barwie jasnozielonej lub zielonożółtej. Pojawienie się objawów chorobowych może świadczyć o obecności fitotoksycznych metabolitów w przesączach pochodzących.

Dokładniejszych informacji dotyczących wpływu filtratów pochodzących na wczesne etapy rozwoju roślin dostarczyły analizy kiełkowania nasion po 3 dniach trwania testu, które zabrano w tabeli nr 11.

Tabela 11. Kiełkowanie nasion inkubowanych w filtratach po hodowli grzybów fitopatogennych wielokrotnie traktowanych plazmą (P5, P10, P15) lub nietraktowanych plazmą (P0) po 3 dniach trwania testu. Kontrolę stanowiły nasiona inkubowane w sterylnej pożywce hodowlanej.

Filtrat	Kiełkowanie nasion (%)			
	P0	P5	P10	P15
<i>F. oxysporum</i> DSM 12646	80,0	86,7	86,7	90,0
<i>F. culmorum</i> DSM 1094	76,7	93,3	93,3	86,7
<i>F. tricinctum</i> Ft11S-23	86,7	86,7	83,3	96,7
<i>B. cinerea</i> DSM 877	90,0	96,7	93,3	96,7
<i>A. alternata</i> DSM 62010	90,0	93,3	93,3	96,7
<i>A. alternata</i> Aa10S-23	86,7	100	100	93,3
Kontrola	100			

Wszystkie nasiona (n=30) inkubowane w sterylnej pożywce hodowlanej (K) wykiełkowały po 3 dniach trwania testu. Inkubacja nasion w przesączach pochodzących w większości przypadków wpłynęła na spadek liczby wykiełkowanych nasion względem kontroli (K), z wyjątkiem nasion inkubowanych w filtratach *A. alternata* Aa10S-23 po pięcio- (P5) i dziesięciokrotnym (P10) traktowaniu plazmą, dla których kiełkowanie wyniosło 100%.

Najbardziej niekorzystny wpływ na kiełkowanie zaobserwowano po inkubacji nasion w filtracie pochodzącym *F. culmorum* DSM 1094 P0, natomiast poddawanie grzybni działaniu plazmy spowodowało stopniową poprawę tego parametru w poszczególnych grupach badawczych.

Podobne zmiany zanotowano w przypadku inkubacji nasion w filtratach uzyskanych po hodowli *F. oxysporum* DSM 12646, *B. cinerea* DSM 877, *A. alternata* DSM 62010 oraz

A. alternata Aa10S-23, których toksyczność względem nasion malała w wyniku ekspozycji grzybni na zimną plazmę.

Niejednoznaczny wpływ na kiełkowanie nasion był obserwowany dla filtratów otrzymanych po hodowli *F. tricinctum* Ft11S-23. Okazało się, że dziesięciokrotna ekspozycja grzybni na plazmę skutkowała zwiększoną toksycznością uzyskanego filtratu w porównaniu do P0, natomiast piętnastokrotne (P15) traktowanie grzybni *F. tricinctum* Ft11S-23 plazmą nietermiczną spowodowało poprawę kiełkowania nasion o 10,0% w porównaniu do P0.

W oparciu o wyniki analizy kiełkowania nasion (po 3 dniach trwania testu) oraz suchej masy roślin (wyznaczonej po 7 dniach trwania testu) określono wskaźnik wigoru masy siewek (SWVI) dla poszczególnych grup badawczych, co pozwoliło na ocenę ogólnej kondycji roślin w fazie wczesnego rozwoju. Wartości SWVI przedstawiono w tabeli nr 12.

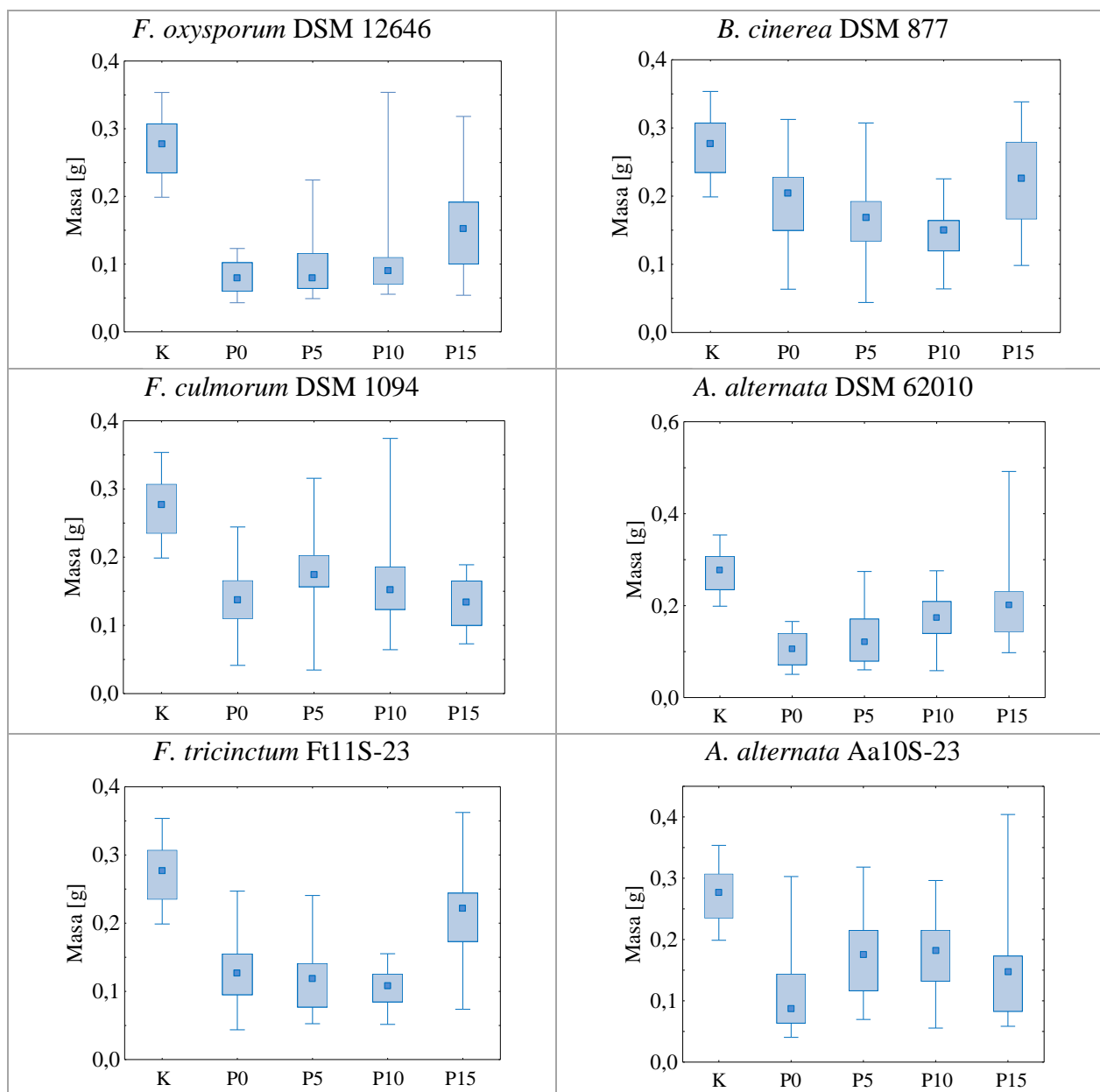
Tabela 12. Wskaźnik wigoru masy siewek ogórka dla poszczególnych grup badawczych po 7 dniach trwania testu toksyczności filtratów otrzymanych z hodowli grzybów fitopatogennych nietraktowanych plazmą (P0) oraz wielokrotnie traktowanych plazmą nietermiczną (P5, P10, P15). Kontrolę (K) stanowiły siewki po inkubacji nasion w sterylnej pożywce hodowlanej.

Filtrat	SWVI			
	P0	P5	P10	P15
<i>F. oxysporum</i> DSM 12646	36234	39896	40992	49558
<i>F. culmorum</i> DSM 1094	36371	44548	47777	40690
<i>F. tricinctum</i> Ft11S-23	45543	42571	37775	48343
<i>B. cinerea</i> DSM 877	52173	50274	50717	53302
<i>A. alternata</i> DSM 62010	44208	51968	56821	52480
<i>A. alternata</i> Aa10S-23	38107	48850	46850	43223
Kontrola	68860			

Najniższe wartości SWVI uzyskano po inkubacji nasion w przesączach pochodzących z hodowli *F. oxysporum* DSM 12646 oraz *F. culmorum* DSM 1094. Wskaźnik wigoru masy siewek stopniowo rósł wraz z liczbą ekspozycji grzybni *F. oxysporum* DSM 12646 na zimną plazmę z 36234 (P0) do 49558 (P15). Zarówno w przypadku *F. culmorum* DSM 1094, jak i *A. alternata* DSM 62010 najwyższą wartość SWVI (odpowiednio 47777 oraz 56821) uzyskały rośliny rozwijające się z nasion inkubowanych w filtracie otrzymanym po hodowli grzybni dziesięciokrotnie (P10) traktowanej plazmą niskotemperaturową. Z kolei dla *A. alternata* Aa10S-23 najwyższą wartość SWVI (48850) uzyskano po inkubacji nasion w filtracie P5.

W przypadku roślin traktowanych filtratami P5 i P10 pochodzących z hodowli grzybni *B. cinerea* DSM 877 oraz *F. tricinctum* Ft11S-23 zaobserwowano początkowy spadek wartości SWVI względem P0, natomiast zwiększanie liczby ekspozycji grzybni na plazmę do P15 wpłynęło na poprawę tego parametru.

Kolejnym oznaczanym parametrem była masa (świeża) roślin zebranych po 7 dniach trwania testu. Na wykresie nr 14 przedstawiono wpływ filtratów pochodzących na masę roślin w poszczególnych grupach badawczych.



Wykres 14. Świeża masa siewek ogórka po 7 dniach trwania testu toksyczności filtratów otrzymanych po hodowli grzybów fitopatogennych wielokrotnie traktowanych plazmą niskotemperaturową (P5, P10, P15) oraz nietraktowanych plazmą (P0). Kontrolę (K) stanowiły siewki po inkubacji nasion w sterylnej pożywce hodowlanej. Wewnętrzny kwadrat (ciemnoniebieski) przedstawia medianę, niebieski prostokąt- kwartył dolny i górny (25%-75%), linie poziome na zewnątrz prostokątów- najwyższy i najniższy wynik pomiaru (Min-Maks).

Na podstawie przeprowadzonej analizy opisowej stwierdzono, że zbiory danych odbiegały od rozkładu normalnego i/lub nie spełniały warunku jednorodności wariancji, dlatego jako miarę przeciętną wybrano medianę. Wyniki przedstawione na wykresie nr 14 stanowią medianę wraz

z dolnym (25%) i górnym (75%) kwartylem oraz najwyższym i najniższym wynikiem pomiaru świeżej masy roślin ogórka w poszczególnych grupach badawczych.

Istotność różnic oceniono za pomocą testu nieparametrycznego Kruskala-Wallisa a uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli nr 13.

Tabela 13. Masa roślin ogórka (mediana) w poszczególnych grupach badawczych po 7 dniach trwania testu toksyczności filtratów pochodowlanych. Liczba n odpowiada liczbie wykiełkowanych nasion. Te same litery przy dwóch wartościach oznaczają brak różnicy statystycznie istotnej pomiędzy porównywanymi grupami ($p < 0,05$).

Filtrat	Masa siewek ogórka [g]				
	K	P0	P5	P10	P15
<i>F. oxysporum</i> DSM 12646	0,277 ^a (n=30)	0,0790 ^b (n=24)	0,0795 ^b (n=26)	0,0898 ^{b, c} (n=26)	0,152 ^c (n=27)
<i>F. culmorum</i> DSM 1094	0,277 ^a (n=30)	0,138 ^b (n=23)	0,174 ^b (n=28)	0,152 ^b (n=28)	0,134 ^b (n=26)
<i>F. tricinctum</i> Ft11S-23	0,277 ^a (n=30)	0,127 ^b (n=26)	0,119 ^b (n=26)	0,108 ^b (n=25)	0,222 ^a (n=29)
<i>B. cinerea</i> DSM 877	0,277 ^a (n=30)	0,204 ^{b, c} (n=27)	0,169 ^{b, c} (n=29)	0,150 ^b (n=28)	0,226 ^{a, c} (n=29)
<i>A. alternata</i> DSM 62010	0,277 ^a (n=30)	0,106 ^b (n=27)	0,121 ^{b, c} (n=28)	0,174 ^{c, d} (n=28)	0,201 ^d (n=29)
<i>A. alternata</i> Aa10S-23	0,277 ^a (n=30)	0,0874 ^b (n=26)	0,176 ^c (n=30)	0,182 ^c (n=30)	0,148 ^{b, c} (n=28)

We wszystkich przypadkach inkubacja nasion w filtratach pochodowlanych obniżyła masę świeżych roślin ogórka po 7 dniach trwania testu w porównaniu do grupy kontrolnej (K).

Świeża masa siewek ogórka po inkubacji nasion w przesączach pochodowlanych *F. oxysporum* DSM 12646 oraz *A. alternata* DSM 62010 rosła wraz z zwiększaniem liczby ekspozycji grzybni na plazmę niskotemperaturową, uzyskując znacznie wyższą wartość po inkubacji w filtratach uzyskanych po hodowli grzybni P15 w porównaniu do P0.

Analiza statystyczna nie ujawniła znaczącego wpływu wielokrotnego traktowania (P5, P10 P15) grzybni *F. culmorum* DSM 1094 plazmą niskotemperaturową na toksyczność filtratów pochodowlanych względem roślin ogórka w porównaniu do przesączu P0.

Zaobserwowano negatywny wpływ na masę roślin po inkubacji w filtratach po pięciokrotnym (P5) i dziesięciokrotnym (P10) traktowaniu grzybni *F. tricinctum* Ft11S-23 i *B. cinerea* DSM 877 plazmą, natomiast po inkubacji nasion w filtratach po piętnastokrotnym (P15) traktowaniu plazmą nie zaobserwowano znaczących różnic w porównaniu do kontroli (K). Z kolei dla filtratów pochodowlanych *A. alternata* Aa10S-23 najmniej toksyczny wpływ na masę roślin wykazywał filtrat P10.

Moje obserwacje były częściowo zgodne z wynikami otrzymanymi przez Javaid i Adrees (2009), którzy zbadali użyteczność filtratów otrzymanych po hodowli grzybów fitopatogennych, jako naturalnych środków chwastobójczych przeciwko *Parthenium hysterophorus* L. Uzyskane przez tych autorów wyniki wykazały, że filtry pohodowlane *F. oxysporum* nie wpływały na kiełkowanie nasion, natomiast prowadziły do znacznej redukcji długości korzeni i pędów oraz do spadku biomasy siewek. Z kolei filtry pohodowlane *A. alternata* DSM 62010 doprowadziły do zahamowania kiełkowania nasion chwastu o 90% oraz redukcji długości korzeni i pędów siewek, przy czym korzenie były bardziej wrażliwe na działanie filtratów grzybowych niż pędy. Biomasa siewek również uległa znacznej redukcji pod wpływem różnych stężeń filtratów.

Badania przeprowadzone przez Mohammed i Badawy (2020) potwierdzają chwastobójcze działanie filtratów otrzymanych po hodowli grzybów fitopatogennych wyizolowanych ze środowiska. Wyniki otrzymane przez tych autorów wskazują, iż filtry *A. alternata* wykazują zdolność do hamowania kiełkowania nasion oraz wzrostu różnych chwastów.

Parveen i in. (2019) udowodnili, że spośród badanych grzybów wywołujących zgniliznę owoców największą toksyczność wykazywały filtry po hodowli *Trichothecium roseum*, *A. alternata* i *P. expansum*. Według autorów negatywny wpływ filtratów na kiełkowanie nasion może wynikać z działania wytwarzanych przez grzyby metabolitów, takich jak mikotoksyny oraz enzymy hydrolityczne. Badacze stwierdzili również, że filtry pohodowlane *Fusarium solani* przyspieszają kiełkowanie nasion u wszystkich badanych roślin uprawnych. W moich badaniach nie stwierdzono natomiast takiego działania dla żadnego z filtratów po hodowli grzybów fitopatogennych.

Ze względu na brak danych literaturowych odnoszących się do wpływu wielokrotnego traktowania grzybni plazmą niskotemperaturową na zmiany fitotoksycznych właściwości filtratów pohodowlanych nie jest możliwe porównanie otrzymanych wyników z danymi uzyskanymi przez innych autorów.

4.7.4 Wpływ wielokrotnego traktowania grzybów fitopatogennych subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej na zdolność do infekowania nasion

Właściwości przeciwgrzybicze zimnej plazmy oceniono również w kontekście zmian patogeniczności grzybów względem sztucznie inokulowanych nasion. Nasiona ogórka inkubowano przez 1 h lub 24 h w zawiesinie grzybów poddanym wielokrotnej ekspozycji na plazmę (P5, P10, P15) lub grzybów nietraktowanych plazmą (P0). Kontrolę negatywną (K)

stanowiły nasiona inkubowane w sterylnej wodzie destylowanej w tych samych warunkach. Nasiona następnie umieszczono na podłożu z agarom wodnym i obserwowano rozwój objawów chorobowych przez okres 14 dni. Po 3 dniach trwania testu oceniono zdolność nasion do kiełkowania. Po 7 i 14 dniach trwania testu oceniono żywotność siewek. Rośliny ze zmiękczoneymi, pożółkłymi tkankami uznawano za zdegradowane i nieżywe (martwe) (Li i in., 2019). Uzyskane wyniki przedstawiono w tabelach nr 14 i 15.

Tabela 14. Wskaźniki kiełkowania nasion (po 3 dniach trwania testu) i żywotności siewek (po 7 i 14 dniach trwania testu) otrzymane po inkubacji nasion ogórka w zawieszynie grzybów fitopatogennych przez 1 h. Wyniki stanowią średnią wraz z odchyleniem standardowym dla dwóch powtórzeń (n=2) z trzydziestoma nasionami w każdym eksperymencie.

Szczep	Czas trwania testu [dni]	Kiełkowanie nasion (%) i żywotność siewek (%)			
		P0	P5	P10	P15
<i>F. oxysporum</i> DSM 12646	3	90,0±0,0	95,0±2,4	95,0±7,1	96,7±0,0
	7	73,3±4,7	33,3±4,7	50,0±9,4	63,3±4,7
	14	31,7±2,4	35,0±2,4	46,7±4,7	56,7±9,4
<i>F. culmorum</i> DSM 1094	3	93,3±4,7	85,0±2,4	85,0±2,4	76,7±0,0
	7	80,0±4,7	71,7±7,1	66,7±9,4	16,7±9,4
	14	91,7±7,1	65,0±2,4	61,7±7,1	36,7±14
<i>F. tricinctum</i> Ft11S-23	3	93,3±4,7	98,3±2,4	95,0±2,4	96,7±0,0
	7	75,0±2,4	73,3±4,7	81,7±2,4	85,0±2,4
	14	76,7±0,0	78,3±2,4	95,0±2,4	91,7±2,4
<i>B. cinerea</i> DSM 877	3	90,0±4,7	93,3±0,0	95,0±2,4	96,7±4,7
	7	56,7±9,4	76,7±9,4	76,7±9,4	86,7±4,7
	14	11,7±2,4	13,3±9,4	26,7±9,4	36,7±9,4
<i>A. alternata</i> DSM 62010	3	86,7±0,0	95,0±2,4	96,7±0,0	98,3±2,4
	7	85,0±2,4	93,3±4,7	93,3±4,7	96,7±4,7
	14	80,0±4,7	90,0±4,7	91,7±2,4	96,7±0,0
<i>A. alternata</i> Aa10S-23	3	91,7±2,4	90,0±4,7	96,7±4,7	93,3±4,7
	7	90,0±4,7	80,0±4,7	80,0±4,7	81,7±7,1
	14	51,7±2,4	31,7±7,1	61,7±7,1	71,7±7,1
Kontrola	3	98,3±2,4			
	7	100±0,0			
	14	100±0,0			

Należy zauważyć, że we wszystkich przypadkach inokulacja nasion zawiesziną grzybów fitopatogennych przez 1 h spowodowała spadek liczby kiełkujących nasion po 3 dniach trwania testu w porównaniu do nasion kontrolnych (K), inkubowanych w sterylnej wodzie dejonizowanej w tych samych warunkach doświadczalnych. Jednocześnie, w większości

przypadków odsetek wykiełkowanych nasion zakażonych grzybami fitopatogennymi wzrastał wraz z liczbą ekspozycji tych grzybów na plazmę nietermiczną. Wyjątek stanowią nasiona zainfekowane zawiesiną grzybów *F. culmorum* DSM 1094 po wielokrotnym traktowaniu plazmą (P5, P10, P15) oraz *A. alternata* Aa10S-23 po pięciokrotnym traktowaniu plazmą (P5), dla których procent kiełkowania był niższy w porównaniu do nasion inokulowanych zawiesiną grzybów nietraktowanych plazmą (P0).

Przedstawione w tabeli nr 14 wyniki wskazują, iż żywotność siewek (wyrażona w procentach) rozwijających się z zainfekowanych nasion zmniejszyła się w porównaniu do niezainfekowanych nasion kontroli, a żywotność siewek zależała od rodzaju infekującego grzyba oraz liczby ekspozycji grzybni na plazmę niskotemperaturową. Jednocześnie należy zauważyć, że w zdecydowanej większości przypadków wskaźnik przeżywalności siewek rozwijających się z zakażonych nasion rósł wraz ze wzrostem liczby ekspozycji patogenów na plazmę nietermiczną.

W przypadku nasion inokulowanych zawiesiną *F. oxysporum* DSM 12646 przez 1 h widoczne jest stopniowe nasilenie objawów chorobowych roślin ogórka. Po 7 dniach trwania testu żywotność siewek zakażonych grzybnią po piątym (P5), dziesiątym (P10) i piętnastym (P15) traktowaniu plazmą była niższa w porównaniu do siewek zainfekowanych grzybnią nietraktowaną plazmą (P0) o odpowiednio 40,0%, 23,3% i 10,0%, natomiast przedłużenie czasu trwania testu o kolejne 7 dni spowodowało znaczny spadek żywotności siewek w grupie P0, w odróżnieniu do pozostałych, dla których żywotność stopniowo rosła wraz z liczbą traktowań plazmą.

Zaskakujące rezultaty doświadczenia otrzymano po inkubacji nasion w zawieszynie *F. culmorum* DSM 1094, dla których zarówno kiełkowanie jak i żywotność siewek malała wraz z liczbą ekspozycji grzybni na subletalną dawkę plazmy nietermicznej. Nasiona inokulowane grzybnią nietraktowaną plazmą (P0) charakteryzowały się najwyższym odsetkiem wykiełkowanych nasion, wynoszącym 93,3%. W siódmym dniu trwania testu liczba żywych siewek w tej grupie badawczej spadła o 13,3%, po czym wzrosła w ciągu kolejnych dni do 91,7%. Z kolei najniższy odsetek wykiełkowanych nasion wyniósł 76,6% w przypadku nasion inkubowanych w zawieszynie P15. Po 7 dniach prowadzenia testu liczba żywych roślin otrzymanych z tych nasion drastycznie spadła o kolejne 60,0%, a pod koniec trwania testu wyniosła 36,7%. Obserwowane początkowe negatywne działania grzybów patogennych wobec roślin oraz ustępowanie objawów wraz z przedłużaniem z czasu trwania testu mogą wynikać ze zmniejszenia aktywności patogenu lub działania mechanizmów obronnych roślin, które stają

się skuteczniejsze w przeciwdziałaniu infekcji. W przypadku nasion, które zostały zainfekowane grzybnią P5 i P10 zachodził stopniowy spadek żywotności roślin do odpowiednio 65,0% i 61,7% po 14 dniach trwania.

W przypadku *F. tricinctum* Ft11S-23 liczba żywotnych siewek otrzymanych z zakażonych nasion po 7 dniach trwania testu spada w stosunku do liczby wykiełkowanych nasion w danej grupie, co świadczy o postępującej chorobie spowodowanej infekcją grzybiczą. W kolejnych dniach trwania testu żywotność siewek stopniowo rosła we wszystkich grupach badawczych. Po 14 dniach żywotność siewek otrzymanych z nasion zakażonych grzybnią po dziesiątym i piętnastym traktowaniu plazmą wyniosła ponad 90,0% i była znacznie wyższa od żywotności uzyskanej przez nasiona inokulowane grzybnią P0 (76,7%) oraz P5 (78,3%).

W przypadku nasion inokulowanych zawiesiną *B. cinerea* DSM 877 widoczny jest znaczny spadek odsetka żywotnych siewek we wszystkich grupach w trakcie trwania testu, co świadczy o szybkim postępie choroby. Najniższą żywotność wykazywały siewki rozwijające się z nasion inokulowanych grzybnią nietraktowaną plazmą (P0). Z kolei wielokrotne traktowanie grzybni spowodowało poprawę wyznaczanych właściwości roślin.

Wielokrotne traktowanie grzybni *A. alternata* DSM 62010 plazmą nietermiczną spowodowało wzrost wartości parametrów kiełkowania nasion i żywotności roślin w porównaniu do grupy zainfekowanej grzybnią nietraktowaną plazmą (P0).

Żywotność roślin zainfekowanych grzybnią *A. alternata* Aa10S-23 stopniowo malała w trakcie trwania testu. Największy spadek żywotności odnotowano dla nasion zainfekowanych grzybnią po pięciokrotnym traktowaniu plazmą (P5), z których po wykiełkowaniu zaobserwowano rozwój jedynie 35,2% roślin po 14 dniach trwania testu. Omówione wyniki badań własnych dotyczących zdolności grzybów *F. oxysporum* DSM 12646, *B. cinerea* DSM 877 i *A. alternata* DSM 62010 do infekowania nasion po inkubacji przez 1 h zostały opublikowane w artykule naukowym (Nowinski i in., 2024).

Zmiany zdolności kiełkowania nasion oraz żywotności siewek po przedłużeniu czasu inkubacji w zawiesinie grzybów fitopatogennych do 24 h przedstawiono w tabeli nr 15.

Tabela 15. Wskaźniki kiełkowania nasion (po 3 dniach trwania testu) i żywotności siewek (po 7 i 14 dniach trwania testu) otrzymane po inkubacji nasion ogórka w zawiesinie grzybów fitopatogennych przez 24 h. Wyniki stanowią średnią wraz z odchyleniem standardowym dla dwóch powtórzeń (n=2) z trzydziestoma nasionami w każdym eksperymencie.

Szczep	Czas trwania testu [dni]	Kiełkowanie nasion (%) i żywotność siewek (%)			
		P0	P5	P10	P15
<i>F. oxysporum</i> DSM 12646	3	85,0±7,1	75,0±12	86,7±4,7	76,7±14
	7	81,7±2,4	73,3±4,7	73,3±9,4	70,0±14
	14	31,7±12	35,0±7,1	66,7±4,7	53,3±4,7
<i>F. culmorum</i> DSM 1094	3	73,3±4,7	95,0±2,4	95,0±2,4	95,0±2,4
	7	68,3±7,1	65,0±7,1	68,3±2,4	70,0±4,7
	14	58,3±12	51,7±2,4	55,0±2,4	56,7±4,7
<i>F. tricinctum</i> Ft11S-23	3	75,0±2,4	66,7±4,7	73,3±7,1	65,0±7,1
	7	40,0±4,7	51,7±2,4	71,7±2,4	68,3±2,4
	14	20,0±4,7	58,3±7,1	61,7±9,4	70,0±9,4
<i>B. cinerea</i> DSM 877	3	85,0±7,1	88,3±7,1	83,3±4,7	88,3±2,4
	7	50,0±4,7	36,7±4,7	38,3±7,1	38,3±7,1
	14	11,7±7,1	11,7±7,1	11,7±2,4	13,3±4,7
<i>A. alternata</i> DSM 62010	3	90,0±4,7	93,3±4,7	93,3±4,7	96,7±4,7
	7	81,7±7,1	85,0±7,1	80,0±4,7	78,3±2,4
	14	86,7±4,7	95,0±2,4	80,0±0,0	95,0±2,4
<i>A. alternata</i> Aa10S-23	3	86,7±4,7	85,0±7,1	90,0±4,7	91,7±2,4
	7	45,0±2,4	51,7±2,4	60,0±4,7	65,0±2,4
	14	13,3±4,7	15,0±2,4	16,7±0,0	21,7±7,1
Kontrola	3	100±0,0			
	7	100±0,0			
	14	100±0,0			

Wyniki przedstawione w powyższej tabeli wskazują, iż inkubacja nasion w zawiesinie grzybów przez 24 h spowodowała redukcję kiełkowania nasion w porównaniu do kontroli niezainfekowanej grzybnią (K) oraz doprowadziła do spadku żywotności siewek w trakcie trwania testu.

Inokulacja nasion grzybnią *F. oxysporum* DSM 12646 zarówno po wielokrotnym traktowaniu plazmą jak i nietraktowaną plazmą doprowadziła do stopniowego spadku żywotności siewek w trakcie trwania testu. Żywotność siewek rozwijających się z wykiełkowanych nasion inokulowanych zawiesiną grzybów P0 oraz grzybnią P5, P10 i P15 stopniowo malała w trakcie trwania testu i wyniosła odpowiednio 31,7%, 35,0%, 66,7%, 53,3% po 14 dniach. Zwiększenie czasu inkubacji nasion w zawiesinach grzybów *F. oxysporum* DSM

12646 oznaczonych kolejno jako P0, P5, P10 i P15 do 24 h spowodowało spadek kiełkowania odpowiednio o 5,0%, 20,0%, 8,3% i 20,0% w porównaniu do nasion inkubowanych przez 1 h. Przeżywalność siewek po 14 dniach trwania testu nie zależała od czasu inkubacji w zawieszynie P0 i P5, natomiast w przypadku zawiesziny P10 zaobserwowano nasilenie objawów po przedłużeniu czasu inkubacji nasion do 24 h.

Nasiona inkubowane przez 24 h w zawieszynie grzybów *F. culmorum* DSM 1094 wielokrotnie traktowanych plazmą nietermiczną (P5, P10, P15) wykazywały jednakowy odsetek kiełkowania (95,0%), natomiast inkubacja w zawieszynie grzybów nietraktowanych plazmą (P0) wpłynęła na spadek zdolności nasion do kiełkowania (73,3%). Żywotność siewek stopniowo malała po 7 i 14 dniach we wszystkich grupach badawczych. Przedłużenie czasu inkubacji nasion w zawieszinach *F. culmorum* DSM 1094 do 24 h wpłynęło negatywnie na żywotność roślin inokulowanych zawiesziną P0, P5 i P10, natomiast dla roślin inokulowanych zawiesziną P15 zaobserwowano poprawę żywotności po 14 dniach trwania testu.

Zaobserwowano także znaczną redukcję zdolności nasion do kiełkowania po przedłużeniu czasu inkubacji w zawieszynie *F. tricinctum* Ft11S-23 do 24 h, w porównaniu do nasion inkubowanych przez 1 h. Najniższy odsetek kiełkowania wyniósł 65,0% po inkubacji nasion z grzybnią P15. W następnych dniach trwania testu widoczny był znaczny spadek żywotności siewek zainfekowanych grzybnią nietraktowaną plazmą (P0), w odróżnieniu do roślin zainfekowanych grzybnią po piętnastokrotnym traktowaniu plazmą (P15), dla których obserwowany był stopniowy wzrost żywotności podczas trwania testu. Po 14 dniach najwyższą żywotność wykazywały rośliny zainfekowane grzybnią P15 (70,0%), a następnie P10 (61,7%) oraz P5 (58,3%). Najniższą żywotność (20,0%) wykazywały siewki zainfekowane grzybnią P0. Przedłużenie czasu inkubacji nasion w zawieszynie grzybów *F. tricinctum* Ft11S-23 do 24 h spowodowało obniżenie zarówno kiełkowania nasion, jak i żywotności siewek po 7 i 14 dniach trwania testu we wszystkich grupach badawczych względem nasion inkubowanych z tymi samymi zawieszinami przez 1 h.

Inkubacja nasion w zawieszynie grzybów *A. alternata* DSM 62010 wpłynęła na spadek zdolności nasion do kiełkowania. Żywotność siewek po 7 dniach trwania testu wynosiła około 81,3%, po czym wzrosła w czternastym dniu trwania testu odpowiednio do 86,7%, 95,0%, 80,0% oraz 95,0% dla roślin inokulowanych grzybnią P0, P5, P10 i P15.

Inokulacja nasion zawiesziną grzybni *B. cinerea* DSM 877 oraz *A. alternata* Aa10S-23 spowodowało znaczny spadek liczby żywotnych siewek w trakcie trwania testu, co świadczy o wysokiej zjadliwości obu szczepów grzybów. Pod koniec trwania testu żywotność siewek

zainfekowanych grzybnia *B. cinerea* DSM 877 wyniosła średnio 12,1%, natomiast żywotność siewek zainfekowanych *A. alternata* Aa10S-23 około 16,7%. Przedłużenie czasu inkubacji nasion w przypadku zawiesin obu grzybów do 24 h wpłynęło na redukcję kiełkowania oraz żywotności siewek w porównaniu do nasion inkubowanych przez 1 godzinę.

Ze względu na brak danych literaturowych dotyczących wpływu wielokrotnego traktowania grzybów fitopatogennych plazmą niskotemperaturową na zdolności do infekowania roślin nie jest możliwe porównanie otrzymanych wyników z danymi uzyskanymi przez innych autorów.

4.7.5 Wzrost grzybów fitopatogennych w żywej tkance roślinnej

Wpływ wielokrotnego traktowania grzybów fitopatogennych subletalną dawką plazmy nietermicznej na zdolność do wywoływania choroby w żywej tkance roślinnej przedstawiono na rysunku nr 25. Nasilenie objawów chorobowych określono na podstawie średnicy porażenia powierzchni owoców pomidora po 7 dniach od inokulacji zawiesiną grzybów fitopatogennych nietraktowanych plazmą (P0) oraz po pięcio- (P5), dziesięcio- (P10) i piętnastokrotnym (P15) traktowaniu subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej.

Wszystkie owoce inokulowane zawiesiną grzybów wykazywały objawy choroby w postaci mięknięcia i zmiany barwy wokół rany oraz formowania widocznej grzybni w miejscu inokulacji. Zgodnie z oczekiwaniami w grupie kontrolnej nie zaobserwowano objawów chorobowych w trakcie trwania testu.

Szczep	Liczba ekspozycji na zimną plazmę			
	P0	P5	P10	P15
<i>F. oxysporum</i> DSM 12646				
<i>F. culmorum</i> DSM 1094				
<i>F. tricinatum</i> Ft11S-23				
<i>B. cinerea</i> DSM 877				
<i>A. alternata</i> DSM 62010				
<i>A. alternata</i> Aa10S-23				
Kontrola K				

Rysunek 25. Owoce pomidora po 7 dniach po inokulacji zawiesiną grzybów fitopatogennych nietraktowanych plazmą (P0) oraz po wielokrotnym traktowaniu plazmą (P5, P10, P15). Kontrolę (K) stanowiły owoce nie inokulowane zawiesiną grzybów.

Klasyfikacji objawów dokonano na podstawie skali empirycznej (kryteria podano w tabeli nr 4), a stopień uszkodzenia owoców pomidora obliczono korzystając ze wzoru Towsenda-Heubergera (wzór nr 8). Wyniki przedstawiono w tabeli nr 16.

Tabela 16. Wskaźnik nasilenia choroby owoców pomidora (DSI) po 7 dniach od inokulacji zawiesiną grzybów wielokrotnie traktowanych plazmą niskotemperaturową (P5, P10, P15) lub nietraktowanych plazmą (P0). Kontrolę stanowiły owoce nie inokulowane zawiesiną grzybni. Wyniki przedstawiają średnią z dwóch powtórzeń (n=2) dla trzech owoców w każdym powtórzeniu, wraz z odchyleniem standardowym.

Szczep	DSI (%)			
	P0	P5	P10	P15
<i>F. oxysporum</i> DSM 12646	45,8±5,9	33,3±11,8	33,3±0,0	29,2±5,9
<i>F. culmorum</i> DSM 1094	29,2±5,9	29,2±5,9	33,3±11,8	37,5±5,9
<i>F. tricinctum</i> Ft11S-23	45,8±5,9	37,5±5,9	33,3±11,8	33,3±0,0
<i>B. cinerea</i> DSM 877	45,8±5,9	45,8±5,9	33,3±11,8	29,2±5,9
<i>A. alternata</i> DSM 62010	41,7±11,8	33,3±0,0	25,0±0,0	25,0±0,0
<i>A. alternata</i> Aa10S-23	41,7±0,0	26,7±0,0	29,2±5,9	20,0±0,0
Kontrola	0,0±0,0			

Na podstawie skali oceny objawów oszacowano, że zakażenie owoców pomidora grzybnią P0 spowodowało pokrycie średnio 15,2%-35,0% powierzchni zmianami chorobowymi (infekcja łagodna do umiarkowana), co odpowiadało wartości DSI 29,2%-45,8%. W większości przypadków wzrost liczby ekspozycji grzybni na plazmę spowodował spadek stopnia pokrycia powierzchni pomidora grzybnią, a co za tym idzie wartości parametru DSI. Największą redukcję nasilenia choroby zaobserwowano dla owoców pomidora inokulowanych grzybnią *A. alternata* Aa10S-23 po piętnastokrotnym traktowaniu plazmą (wartość DSI zmalała o 21,7% w porównaniu P0).

Wyjątek stanowią owoce inokulowane zawiesiną *F. culmorum* DSM 1094, dla których początkowo wartość DSI nie uległy zmianie po inokulacji owoców grzybnią P5, natomiast inokulacja zawiesiną P10 i P15 spowodowała wzrost wartości DSI o odpowiednio 4,2% oraz 8,3% w porównaniu do P0 (29,2 ±5,9%).

Wyniki nasilenia choroby owoców pomidora inokulowanych zawiesiną grzybni *F. oxysporum* DSM 12646, *B. cinerea* DSM 877 i *A. alternata* DSM 62010 po 10 dniach trwania testu zostały opublikowane w artykule naukowym (Nowinski i in., 2024).

4.7.6 Wpływ plazmy niskotemperaturowej na patogeniczność grzybów względem roślin

Wpływ wielokrotnego traktowania subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej na patogeniczność wybranych grzybów strzępkowych zbadano również względem roślin uprawianych w sztucznie inokulowanej glebie.

Zbadano długości korzeni i części nadziemnej (łodygi), żywą masę roślin ogórka oraz wskaźnik wigoru masy siewek (SWVI) w poszczególnych grupach badawczych po 14 dniach trwania testu. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej w celu oceny istotności zmian patogenności grzybów po wielokrotnej ekspozycji na plazmę niskotemperaturową. Kontrolę stanowiły rośliny uprawiane w podłożu nie inokulowanym zawiesiną grzybów (K).

W tabeli nr 17 przedstawiono wyniki wskaźnika wigoru masy siewek (SWVI).

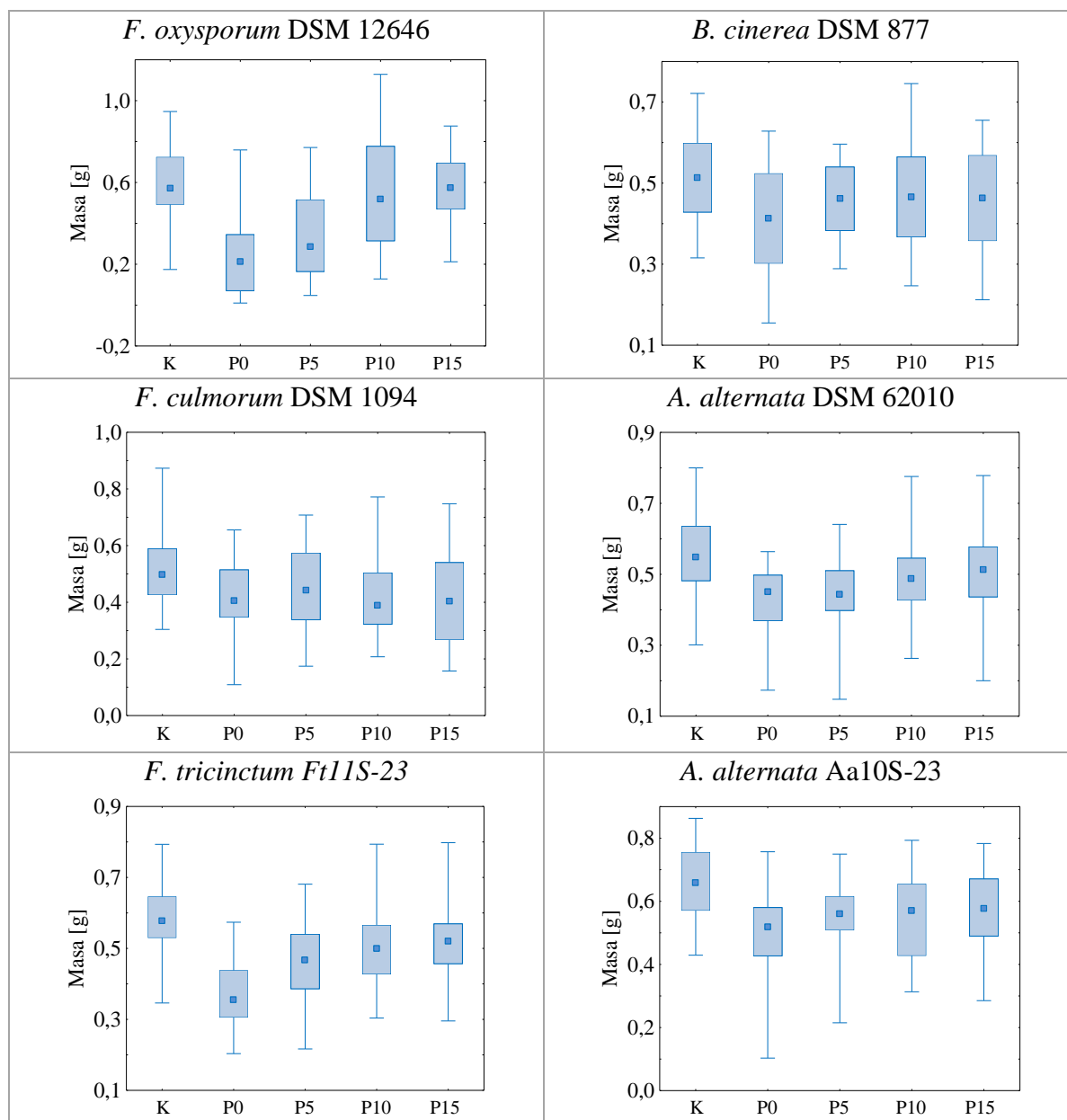
Tabela 17. Wskaźnik wigoru masy siewek (SWVI) roślin uprawianych w glebie inokulowanej zawiesiną grzybów traktowanych plazmą niskotemperaturową (P5, P10, P15) oraz nietraktowanych plazmą (P0). Kontrolę (K) stanowiły rośliny uprawiane w glebie nie inokulowanej grzybnia.

Szczep	SWVI				
	K	P0	P5	P10	P15
<i>F. oxysporum</i> DSM 12646	243	51,4	112	158	176
<i>F. culmorum</i> DSM 1094	263	183	300	188	206
<i>F. tricinctum</i> Ft11S-23	242	91,0	107	141	154
<i>B. cinerea</i> DSM 877	242	129	148	173	178
<i>A. alternata</i> DSM 62010	220	127	158	166	184
<i>A. alternata</i> Aa10S-23	233	108	139	172	193

Uzyskane wyniki wskazują, że wielokrotna ekspozycja grzybów fitopatogennych na plazmę niskotemperaturową prowadzi do wzrostu wskaźnika wigoru masy siewek (SWVI) rozwijających się w inokulowanej glebie, co może sugerować zmniejszenie patogenności grzybów. Największą poprawę tego parametru zaobserwowano w przypadku inokulacji gleby zawiesiną *F. oxysporum* DSM 12646 po piętnastokrotnym traktowaniu plazmą (wartość SWVI dla P15 wzrosła o około 125 w porównaniu do roślin uprawianych w glebie zanieczyszczonej zawiesiną P0).

Wyniki świeżej masy siewek ogórka po 14 dniach uprawy w glebie inokulowanej zawiesiną grzybów przedstawione na wykresie nr 15. Wykresy dla *F. oxysporum* DSM 12646, *F. culmorum* DSM 1094, *F. tricinctum* Ft11S-23, *A. alternata* DSM 62010 oraz *A. alternata* Aa10S-23 przedstawiają medianę (znacznik) wraz z dolnym (25%) i górnym (75%) kwartylem (ramka) oraz najwyższą i najniższą wartością świeżej masy roślin ogórka (wąsy) w poszczególnych grupach badawczych. Wyniki dla *B. cinerea* DSM 877 stanowią średnią

(znacznik) wraz z odchyleniem standardowym (ramka) oraz najwyższą i najniższą wartością świeżej masy roślin ogórka (wąsy).



Wykres 15. Świeża masa siewek ogórka po 14 dniach uprawy w glebie inokulowanej zawiesiną grzybów fitopatogennych wielokrotnie traktowanych plazmą niskotemperaturową (P5, P10, P15) oraz nietraktowanych plazmą (P0). Kontrolę (K) stanowiły siewki uprawiane w podłożu niezanieczyszczonym grzybnia. Wewnętrzne kwadraty dla *F. oxysporum* DSM 12646, *F. culmorum* DSM 1094, *F. tricinctum* Ft11S-23, *A. alternata* DSM 62010, *A. alternata* Aa10S-23 przedstawiają medianę, niebieskie prostokąty- kwartył dolny i górny (25%-75%), linie poziome na zewnątrz prostokątów- najwyższy i najniższy wynik pomiaru (Min-Maks). Dla *B. cinerea* DSM 877 wewnętrzne kwadraty przedstawiają średnią świeżą masę roślin ogórka, niebieskie prostokąty- odchylenie standardowe, linie poziome na zewnątrz prostokątów- najwyższy i najniższy wynik pomiaru (Min-Maks).

Istotność różnic świeżej masy roślin uprawianych w glebie inokulowanej zawiesiną grzybów *F. oxysporum* DSM 12646, *F. culmorum* DSM 1094, *F. tricinctum* Ft11S-23,

A. alternata DSM 62010 lub *A. alternata* Aa10S-23 nietraktowanych plazmą (P0), wielokrotnie traktowanych plazmą (P5, P10, P15) oraz kontrolą (K) oceniono za pomocą testu nieparametrycznego Kruskala-Wallisa, natomiast dla roślin uprawianych w glebie inokulowanej zawiesiną *B. cinerea* DSM 877 wykorzystano test RIR Tukeya. Uzyskane wyniki podsumowano w tabeli nr 18.

Tabela 18. Świeża masa roślin ogórka (mediana) w poszczególnych grupach badawczych po 14 dniach uprawy w podłożu zanieczyszczonym zawiesiną grzybów fitopatogennych. Liczba n odpowiada liczbie wykiełkowanych nasion. Te same litery przy dwóch wartościach oznaczają brak statystycznie istotnej różnicy pomiędzy porównywanymi grupami ($p < 0,05$).

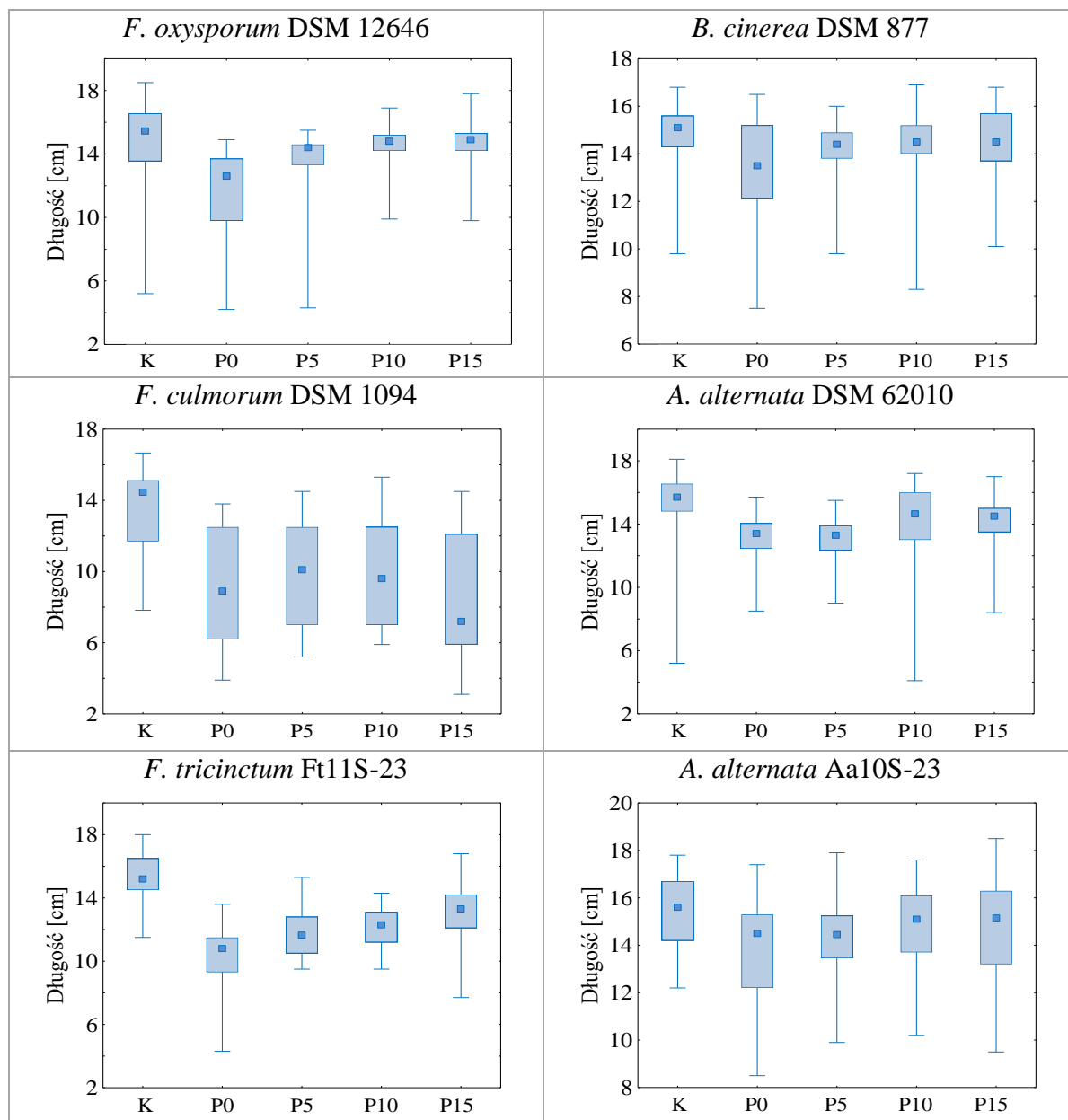
Szczep	Masa siewek ogórka [g]				
	K	P0	P5	P10	P15
<i>F. oxysporum</i> DSM 12646	0,571 ^a (n=60)	0,212 ^b (n=34)	0,285 ^b (n=47)	0,517 ^a (n=55)	0,574 ^a (n=57)
<i>F. culmorum</i> DSM 1094	0,498 ^a (n=61)	0,406 ^b (n=47)	0,441 ^{a, b} (n=57)	0,388 ^b (n=58)	0,403 ^b (n=59)
<i>F. tricinctum</i> Ft11S-23	0,578 ^a (n=61)	0,355 ^b (n=47)	0,468 ^c (n=48)	0,499 ^c (n=51)	0,520 ^c (n=53)
<i>B. cinerea</i> DSM 877	0,514 ±0,085 ^a (n=61)	0,413 ±0,111 ^b (n=46)	0,461 ±0,079 ^{a, b} (n=49)	0,466 ±0,099 ^{a, b} (n=53)	0,463 ±0,106 ^{a, b} (n=52)
<i>A. alternata</i> DSM 62010	0,548 ^a (n=60)	0,450 ^b (n=48)	0,442 ^b (n=52)	0,487 ^{a, b} (n=52)	0,512 ^a (n=55)
<i>A. alternata</i> Aa10S-23	0,659 ^a (n=59)	0,518 ^b (n=49)	0,560 ^b (n=52)	0,569 ^b (n=51)	0,577 ^b (n=54)

We wszystkich badanych przypadkach inokulacja podłoża zawiesiną grzybów fitopatogennych spowodowała spadek masy roślin ogórka względem kontroli (K). Jednocześnie należy zauważyć, że świeża masa roślin w większości przypadków rosła wraz ze zwiększaniem liczby ekspozycji grzybów fitopatogennych na plazmę. Wyjątek stanowią rośliny uprawiane w glebie inokulowanej zawiesiną *F. culmorum* DSM 1094, dla których zaobserwowano spadek świeżej masy roślin uprawianych w glebie po inokulacji grzybnia P10 i P15.

W przypadku *F. oxysporum* DSM 12646, *B. cinerea* DSM 877 oraz *A. alternata* DSM 62010 po dziesięciokrotnej (P10) i piętnastokrotnej (P15) ekspozycji na plazmę zaobserwowano wzrost świeżej masy roślin do wartości zbliżonych do kontroli (K), jednocześnie dla *F. oxysporum* DSM 12646 i *A. alternata* DSM 62010 wartości te były istotnie wyższe od świeżej masy roślin uprawianych w glebie inokulowanej zawiesiną P0. Z kolei dla roślin uprawianych w glebie inokulowanej zawiesiną *F. tricinctum* Ft11S-23 i *A. alternata* Aa10S-23 zaobserwowano stopniowy wzrost świeżej masy roślin wraz z zwiększaniem liczby ekspozycji

grzybni na zimną plazmę, natomiast różnice nie są statystycznie istotne w porównaniu do roślin uprawianych w glebie inokulowanej zawiesiną P0.

Zbadano również wpływ traktowania grzybni plazmą niskotemperaturową na długości łodyg oraz korzeni roślin ogórka uprawianych w inokulowanej glebie po 14 dniach trwania testu. Wykres nr 16 przedstawia wyniki pomiaru długości części nadziemnej (łodygi) roślin.



Wykres 16. Długości łodygi siewek ogórka po 14 dniach uprawy w glebie inokulowanej zawiesiną grzybów fitopatogennych wielokrotnie traktowanych plazmą niskotemperaturową (P5, P10, P15) oraz nietraktowanych plazmą (P0). Kontrolę (K) stanowiły siewki uprawiane w podłożu niezanieczyszczonym grzybnią. Wewnętrzne kwadraty przedstawiają medianę, niebieskie prostokąty- kwartył dolny i górny (25%-75%), linie poziome na zewnątrz prostokątów- najwyższy i najniższy wynik pomiaru (Min-Maks).

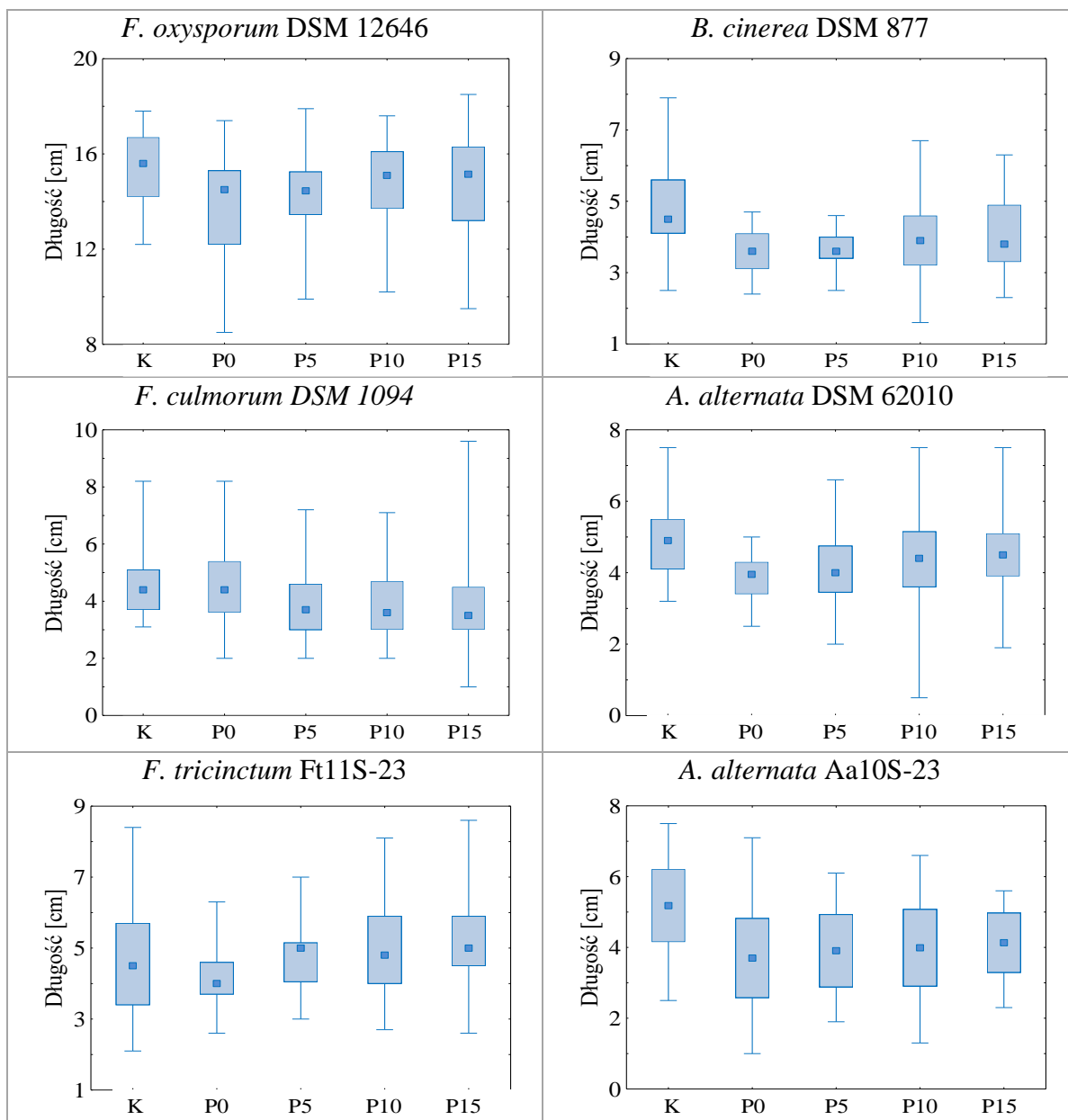
Wartości mediany długości łodyg roślin ogórka po 14 dniach trwania testu wraz z analizą statystyczną umieszczono w tabeli nr 19. Istotność różnic długości łodyg roślin ogórka w poszczególnych grupach zbadano za pomocą testu nieparametrycznego Kruskala-Wallisa.

Tabela 19. Długości łodyg roślin ogórka (mediana) w poszczególnych grupach badawczych po 14 dniach uprawy w podłożu zanieczyszczonym zawiesiną grzybów fitopatogennych. Liczba n odpowiada liczbie wykiełkowanych nasion. Te same litery przy dwóch wartościach oznaczają brak statystycznie istotnej różnicy pomiędzy porównywanymi grupami ($p < 0,05$).

Szczep	Długość łodygi [cm]				
	K	P0	P5	P10	P15
<i>F. oxysporum</i> DSM 12646	15,5 ^a (n=60)	12,6 ^b (n=34)	14,4 ^b (n=47)	14,8 ^a (n=55)	14,9 ^a (n=57)
<i>F. culmorum</i> DSM 1094	14,5 ^a (n=61)	8,90 ^b (n=47)	10,1 ^b (n=57)	9,60 ^b (n=58)	7,20 ^b (n=59)
<i>F. tricinctum</i> Ft11S-23	15,2 ^a (n=61)	10,8 ^b (n=47)	11,7 ^{b,c} (n=48)	12,3 ^c (n=51)	13,3 ^d (n=53)
<i>B. cinerea</i> DSM 877	15,1 ^a (n=61)	13,5 ^b (n=46)	14,4 ^b (n=49)	14,5 ^{a,b} (n=53)	14,5 ^{a,b} (n=52)
<i>A. alternata</i> DSM 62010	15,7 ^a (n=60)	13,4 ^b (n=48)	13,3 ^b (n=52)	14,7 ^c (n=52)	14,5 ^c (n=55)
<i>A. alternata</i> Aa10S-23	15,6 ^a (n=59)	14,5 ^b (n=49)	14,5 ^b (n=52)	15,1 ^{a,b} (n=51)	15,2 ^{a,b} (n=54)

Inokulacja gleby zawiesiną grzybów fitopatogennych miała negatywny wpływ na wzrost łodyg roślin ogórka. W większości badanych przypadków wielokrotne traktowanie grzybni plazmą niskotemperaturową wpłynęło pozytywnie na wzrost części nadziemnej w porównaniu do roślin uprawianych w glebie inokulowanej grzybnią P0. Wyjątek stanowią grzyby *F. culmorum* DSM 1094, dla których długości łodyg roślin uprawianych w glebie inokulowanej zawiesiną P15 były niższe w porównaniu do P0, jednak różnice te nie były istotne statystycznie. Podobnie w przypadku roślin uprawianych w podłożu inokulowanym zawiesiną *A. alternata* DSM 62010 po pięciokrotnym traktowaniu plazmą (P5) zaobserwowano nieznaczną redukcję długości łodyg w porównaniu do P0. Z kolei wielokrotne traktowanie plazmą grzybni *F. oxysporum* DSM 12646, *F. tricinctum* Ft11S-23, *B. cinerea* DSM 877 oraz *A. alternata* Aa10S-23 wpłynęło na stopniową poprawę wzrostu łodyg. Jednocześnie wartości tego parametru dla roślin uprawianych w glebie inokulowanej zawiesiną grzybów *F. oxysporum* DSM 12646, *B. cinerea* DSM 877 i *A. alternata* Aa10S-23 po dziesięciokrotnym (P10) i piętnastokrotnym (P15) traktowaniu plazmą były zbliżone do kontroli (K).

Na wykresie nr 17 przedstawiono wyniki pomiarów długości korzeni siewek ogórka po 14 dniach uprawy w glebie inokulowanej zawiesiną grzybów fitopatogennych.



Wykres 17. Długości korzeni siewek ogórka po 14 dniach uprawy w glebie inokulowanej zawiesiną grzybów fitopatogennych wielokrotnie traktowanych plazmą niskotemperaturową (P5, P10, P15) oraz nietraktowanych plazmą (P0). Kontrolę (K) stanowiły siewki uprawiane w podłożu niezanieczyszczonym grzybnia. Wewnętrzne kwadraty przedstawiają medianę, niebieskie prostokąty- kwartył dolny i górny (25%-75%), linie poziome na zewnątrz prostokątów- najwyższy i najniższy wynik pomiaru (Min-Maks). Wyniki dla *A. alternata* Aa10S-23 stanowią średnią (znacznik) wraz z odchyleniem standardowym (ramka) oraz najwyższą i najniższą wartością świeżej masy roślin ogórka (wąsy).

W celu oceny istotności różnic długości korzeni pomiędzy poszczególnymi grupami badawczymi zastosowano test Kruskala-Wallisa lub RIR Tukeya. Uzyskane wyniki zebrano w tabeli nr 20.

Tabela 20. Długości korzenia roślin ogórka w poszczególnych grupach badawczych po 14 dniach uprawy w podłożu zanieczyszczonym zawiesiną grzybów fitopatogennych. Liczba n odpowiada liczbie wykiełkowanych nasion. Te same litery przy dwóch wartościach oznaczają brak statystycznie istotnej różnicy pomiędzy porównywanymi grupami ($p < 0,05$).

Szczep	Długość korzenia [cm]				
	K	P0	P5	P10	P15
<i>F. oxysporum</i> DSM 12646	4,5 ^a (n=60)	4,0 ^a (n=34)	3,9 ^a (n=47)	4,3 ^a (n=55)	4,5 ^a (n=57)
<i>F. culmorum</i> DSM 1094	4,4 ^a (n=61)	4,4 ^{a, b} (n=47)	3,7 ^b (n=57)	3,6 ^b (n=58)	3,5 ^b (n=59)
<i>F. tricinctum</i> Ft11S-23	4,7 ^a (n=61)	3,6 ^b (n=47)	4,6 ^a (n=48)	4,2 ^a (n=51)	4,5 ^a (n=53)
<i>B. cinerea</i> DSM 877	4,5 ^a (n=61)	3,6 ^b (n=46)	3,6 ^b (n=49)	3,9 ^b (n=53)	3,8 ^b (n=52)
<i>A. alternata</i> DSM 62010	4,9 ^a (n=60)	4,0 ^b (n=48)	4,0 ^{b, c} (n=52)	4,4 ^{b, c} (n=52)	4,5 ^{a, c} (n=55)
<i>A. alternata</i> Aa10S-23	5,2±1,0 ^a (n=59)	3,7±1,1 ^b (n=49)	3,9±1,0 ^b (n=52)	4,0±1,1 ^b (n=51)	4,1±0,8 ^b (n=54)

Analiza statystyczna ujawniła brak znaczącego wpływu *F. oxysporum* DSM 12646 na długość korzeni roślin rozwijających się w zanieczyszczonym podłożu w porównaniu do kontroli (K). Podobnie jak w przypadku roślin rozwijających się w glebie inokulowanej grzybnią *F. culmorum* DSM 1094 nietraktowaną zimną plazmą (P0). Natomiast wielokrotne traktowanie grzybni *F. culmorum* DSM 1094 plazmą wpłynęło negatywnie na ten parametr (wartości mediany dla roślin uprawianych w obecności grzybni P5, P10 i P15 były o 15,9%-20,5% niższe w porównaniu do kontroli).

Znaczącą poprawę wzrostu korzeni roślin w wyniku ekspozycji grzybni na plazmę zaobserwowano w przypadku zawiesin *F. tricinctum* Ft11S-23 P5, P10 i P15 oraz *A. alternata* P10 i P15, dla których wartości mediany długości korzeni były znacząco wyższe od P0 i jednocześnie zbliżone do kontroli (K) (z wyjątkiem roślin uprawianych w podłożu inokulowanym zawiesiną *A. alternata* DSM 62010 po dziesięciokrotnym traktowaniu plazmą). Z kolei dla *B. cinerea* DSM 877 oraz *A. alternata* Aa10S-23 nie zaobserwowano znaczącego wpływu traktowania grzybni plazmą niskotemperaturową na długości korzeni roślin uprawianych w zanieczyszczonej glebie.

Wyniki wpływu wielokrotnego traktowania grzybni *F. oxysporum* DSM 12646, *B. cinerea* DSM 877 i *A. alternata* DSM 62010 plazmą niskotemperaturową na wzrost roślin uprawianych w inokulowanej glebie po 14 dniach trwania testu zostały opublikowane w artykule naukowym (Nowinski i in., 2024).

5. Podsumowanie i wnioski

Utrata i marnotrawstwo żywności stanowią poważny problem zarówno z punktu widzenia społecznego, gospodarczego, jak i środowiskowego.

Strategie zapobiegania lub ograniczania strat żywności, wynikających z aktywności mikroorganizmów chorobotwórczych, powinny obejmować różne działania na każdym etapie produkcji, w tym ograniczenie przenoszenia mikroorganizmów ze źródeł środowiskowych w gospodarstwie i zakładu przetwórczego do produktów spożywczych. Zanieczyszczenia krzyżowe grzybami pleśniowymi oprócz utraty żywności, ale także prowadzą do zanieczyszczenia mikotoksynami, które mają szkodliwe działanie dla zdrowia ludzi. Dezynfekcja środowiska produkcyjnego może zatem przyczynić się do zapobiegania chorobom poźniwym przypisywanym źródłom mikrobiologicznym podczas długotrwałego przechowywania, przyczyniając się tym samym do poprawy bezpieczeństwa żywnościowego.

Metody takie jak suche ciepło, para wodna, promieniowanie UV i substancje chemiczne (tlenek etylenu i nadtlenu wodoru), są powszechnie stosowane do dezynfekcji i sterylizacji materiałów opakowaniowych w przemyśle spożywczym, ale pewne ograniczenia tych metod zmotywowały do poszukiwania nowych rozwiązań.

Zastosowanie plazmy niskotemperaturowej stanowi alternatywę dla konwencjonalnej dezynfekcji ze względu na unikatowe właściwości tego medium. Metoda ta polega na wystawieniu mikroorganizmów na działanie reaktywnych form tlenu i azotu, naładowanych cząsteczek oraz fotonów UV generowanych podczas wyładowania elektrycznego w gazie.

Większość badań prowadzonych w różnych ośrodkach naukowych, dotyczących interakcji plazmy z mikroorganizmami skupiała się na bakteriach, formach przetrwalnych bakterii lub zarodnikach grzybów. Niewiele uwagi poświęcono obróbce plazmą grzybów strzępkowych w stanie wegetatywnym.

W niniejszej pracy poddano ocenie skuteczność inaktywacji istotnych dla rolnictwa grzybów z rodzajów *Fusarium*, *Alternaria* oraz *Botrytis* z powierzchni materiałów powszechnie stosowanych w przemyśle rolno-spożywczym za pomocą plazmy powietrznej pod ciśnieniem atmosferycznym.

Wyniki badań własnych pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków i spostrzeżeń (rozdział 4.3):

- Efekt inaktywacji komórek grzybów pod wpływem działania plazmy stopniowo wzrastał w sposób zależny od czasu traktowania.

- Badania kinetyki inaktywacji ujawniły zmienność parametrów p i δ , co sugeruje różne mechanizmy inaktywacji komórek mikroorganizmów oraz ich interakcji z powierzchnią. Wartości $p > 1$ są częstsze, co oznacza, że inaktywacja jest bardziej intensywna na początku procesu, a następnie zwalnia.
- Zaobserwowano różną wrażliwość na działanie plazmy wśród badanych szczepów grzybów, przy czym uznano, że najbardziej wrażliwy jest *F. culmorum* DSM 1094, który został znacząco inaktywowany (śmiertelność na poziomie 90%) po 2 min 22 s ekspozycji na powierzchni tektury oraz 2 min 39 s na powierzchni drewna. W przypadku *B. cinerea* DSM 877 odnotowano znacznie niższą wrażliwość, a 90% inaktywacji uzyskano po 10 min oraz 9 min 53 s odpowiednio na powierzchni tektury i drewna.

Badania inaktywacji mikroorganizmów z drewnianej skrzynki pochodzącej z magazynu za pomocą plazmy niskotemperaturowej generowanej w reaktorze DBD potwierdziły skuteczność tej metody (całkowitą inaktywację mikroorganizmów osiągnięto po 20 min traktowania) (rozdział 4.4).

Zbadano również mechanizm biobójczego działania plazmy na komórki grzybów strzępkowych, analizując zmiany integralności błony komórkowej po traktowaniu grzybni plazmą. Wyniki badań własnych umożliwiły sformułowanie następujących wniosków i spostrzeżeń (rozdział 4.5):

- Fluorescencyjne obrazowanie grzybów za pomocą SYTO 9 i jodku propidyny (PI) oraz testy integralności błony oparte na wypływie składników wewnątrzkomórkowych wykazały, że zastosowana plazma niskotemperaturowa uszkadza błony komórkowe grzybów, zwiększając ich przepuszczalność w miarę wydłużania czasu traktowania, w konsekwencji prowadząc do zmniejszenia aktywności metabolicznej oraz śmierci komórek.

Uzyskane wyniki sugerują, że mechanizm działania zimnej plazmy przeciwko patogenom grzybowym oparty jest na niszczeniu struktur ściany i błony komórkowej grzyba, prowadzącym ostatecznie do śmierci komórek.

Z przeglądu dostępnej literatury naukowej wynika, iż nadal istnieje niewiele badań dotyczących wpływu zimnej plazmy atmosferycznej na zmiany patogenności u grzybów. Stres związany z działaniem zimnej plazmy może bowiem wpływać na zwiększenie tolerancji lub nabycie oporności grzybów strzępkowych wobec danego czynnika stresowego. Strategie adaptacyjne grzybów fitopatogennych związane są ze zmianami w morfologii i fizjologii komórek, umożliwiającymi im utrzymanie żywotności w niesprzyjających warunkach.

Zrozumienie tych mechanizmów jest konieczne dla projektowania skutecznych procedur plazmy nietermicznej, w celu zwalczania mikroorganizmów patogennych, z jednoczesnym ograniczeniem ryzyka rozwoju tolerancji oraz wzrostu patogenności.

W kolejnym etapie moich badań poddano ocenie wpływ atmosferycznej plazmy niskotemperaturowej na zmiany cech mikro- i makroskopowych oraz fizjologicznych grzybów fitopatogennych, w tym szybkości wzrostu i produkcji biomasy oraz zmiany wrażliwości na fungicydy i nadtlenek wodoru po wielokrotnej ekspozycji komórek na plazmę niskotemperaturową (rozdział 4.6). Wyniki badań własnych pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków i spostrzeżeń:

- Ocena zmian morfologicznych strzępek grzybów po wielokrotnym traktowaniu plazmą niskotemperaturową wykazała różnorodne efekty w zależności od rodzaju grzyba. Zaobserwowano m.in. deformacje struktury ścian komórkowych, zwiększenie grubości strzępek (pęcznienie) oraz ich pękanie. Wyniki te sugerują, że zmiany w strukturze ściany komórkowej grzybów strzępkowych mogą mieć istotne konsekwencje biologiczne, takie jak osłabienie komórek grzyba.
- Przeprowadzone pomiary wzrostu promieniowego grzybni poddanej wielokrotnej obróbce plazmowej ujawniły zahamowanie wzrostu wegetatywnego u grzybów *F. tricinctum* Ft11S-23, brak wpływu na szybkość wzrostu kolonii tworzonych przez *F. oxysporum* DSM 12646, *B. cinerea* DSM 877 i *A. alternata* DSM 62010 oraz stymulację wzrostu kolonii *F. culmorum* DSM 1094. Brak znaczących różnic średnicy kolonii lub stymulujący efekt wielokrotnej ekspozycji na plazmę może być związana z zachodzącymi w komórkach grzybów procesami naprawczymi.
- Wielokrotne traktowanie plazmą wpłynęło również na produkcję biomasy grzybni, ale efekt zależał od rodzaju grzyba oraz liczby ekspozycji na plazmę. Dla niektórych gatunków, takich jak *F. oxysporum* DSM 12646 i *B. cinerea* DSM 877 zaobserwowano spadek produkcji biomasy w wyniku wielokrotnej ekspozycji na plazmę, natomiast dla *F. culmorum* DSM 1094 i *A. alternata* Aa10S-23 wzrost masy grzybni.
- Na podstawie pomiaru fluorescencji DCF stwierdzono spadek poziomu stresu oksydacyjnego w grzybni *F. oxysporum* DSM 12646, *F. culmorum* DSM 1094 oraz *F. tricinctum* Ft11S-23 poddawanej wielokrotnej ekspozycji na plazmę. Wzrost wartości fluorescencji DCF wykryto natomiast dla *A. alternata* DSM 62010, *A. alternata* Aa10S-23 oraz *B. cinerea* DSM 877. Nadmierna akumulacja wewnątrzkomórkowych RFT może prowadzić do uszkodzenia oksydacyjnego komórek i wpływać na ich

wrażliwość względem środków grzybobójczych oraz nadtlenu wodoru, a także skutkować obniżeniem zjadliwości.

- Wartości MIC i MFC nadtlenu wodoru wobec grzybów fitopatogennych zależały od szczepu i liczby ekspozycji na plazmę, wskazując na zmiany w tolerancji na stres oksydacyjny. Spadek wartości tych parametrów w wyniku wielokrotnej ekspozycji na zimną plazmę zaobserwowano dla *F. oxysporum* DSM 12646, *F. culmorum* DSM 1094, *B. cinerea* DSM 877, *A. alternata* DSM 62010 i *A. alternata* Aa10S-23, co świadczy o zmniejszonej tolerancji na stres oksydacyjny.
- Wielokrotne traktowanie plazmą niskotemperaturową wpłynęło także na zmiany tolerancji grzybów fitopatogennych wobec fungicydów. U wszystkich szczepów wystąpił spadek tolerancji na co najmniej jeden środek grzybobójczy, przy czym u wszystkich szczepów zaobserwowano spadek tolerancji na Miedzian 50 WP. Wzrost tolerancji nastąpił jedynie w czterech przypadkach, tj. dla *F. culmorum* DSM 1094 wobec Tobias-Pro EW i Scorpion 325 S. C., oraz *F. oxysporum* DSM 12646 i *A. alternata* DSM 62010 wobec Syllit 65 WP.

W niniejszej pracy poddano również ocenie wpływ wielokrotnego traktowania grzybów subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej na zmiany niektórych czynników patogeniczności zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Grzyby fitopatogenne wykorzystują wiele strategii i mechanizmów molekularnych, strukturalnych i biochemicznych, które umożliwiają skuteczną infekcję i wywoływanie choroby u roślin gospodarza. Adhezja zarodników jest jednym z pierwszych etapów w interakcji między patogenem a rośliną żywiciela. Zdolność do adhezji zarodników i formowania biofilmów oceniono na podstawie pomiaru biomasy biofilmu oraz aktywności metabolicznej. Wyniki badań własnych (podrozdział 4.7.1) pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków i spostrzeżeń:

- Zarodniki *F. oxysporum* DSM 12646 charakteryzowały się największą zdolnością do tworzenia biofilmów spośród badanych szczepów, jednak po dziesięcio- i piętnastokrotnej ekspozycji na plazmę zdolność ta zmalała. Podobnie dla *A. alternata* DSM 62010 i *A. alternata* Aa10S-23 wykazano redukcję zdolności do tworzenia biofilmów po wielokrotnej ekspozycji na plazmę. Zarodniki *F. culmorum* DSM 1094 początkowo wykazywały niską zdolność tworzenia biofilmów, natomiast wielokrotna ekspozycja na plazmę znacząco poprawiła tę właściwość. Wzrost zdolności do tworzenia biofilmów w wyniku wielokrotnej ekspozycji na plazmę zaobserwowano również dla

B. cinerea DSM 877, zmiany te nie były jednak tak znaczące jak w przypadku *F. culmorum* DSM 1094.

Wyniki te sugerują, iż plazma wpływa na zdolność komórek do adhezji i tworzenia biofilmów, natomiast kierunek zmian zależy od szczepu oraz liczby ekspozycji na zimną plazmę.

Enzymy wydzielane przez grzyby fitopatogenne również odgrywają znaczącą rolę w procesie infekcji, umożliwiając grzybom efektywne przezwyciężanie bariery roślinnej ściany komórkowej, a także uwolnienie składników odżywczych zawartych w komórkach. W niniejszej pracy poddano ocenie wpływ plazmy niskotemperaturowej na aktywność enzymów produkowanych przez wybrane grzyby fitopatogenne. Otrzymane wyniki badań własnych (podrozdział 4.7.2) pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków i spostrzeżeń:

- Badane grzyby fitopatogenne charakteryzowały się niską aktywnością enzymów rozkładających celulozę (CMCazy).
- Plazma niskotemperaturowa wpłynęła na spadek aktywności CMCazy u wszystkich badanych szczepów, przy czym najniższą aktywność tego enzymu uzyskano po pierwszej dawce plazmy niskotemperaturowej. Produkcja biomasy podczas hodowli *F. oxysporum* DSM 12646 i *A. alternata* Aa10S-23 na podłożu z CMC jako źródłem węgla zmniejszała się w wyniku traktowania plazmą, w przypadku *A. alternata* DSM 62010 wzrosła, natomiast dla *F. culmorum* DSM 1094, *F. tricinctum* Ft11S-23 wahała się w zależności od liczby ekspozycji na zimną plazmę. Plazma niskotemperaturowa nie wpłynęła na produkcję biomasy przez *B. cinerea* DSM 877 podczas hodowli na podłożu z CMC.
- Traktowanie grzybni plazmą niskotemperaturową wpłynęło na zmiany aktywności enzymów rozkładających ksylan. W przypadku *F. oxysporum* DSM 12646 oraz *F. tricinctum* Ft11S-23 zaobserwowano spadek aktywności w wyniku traktowania grzybni plazmą niskotemperaturową. Stymulujący efekt działania plazmy zaobserwowano dla *F. culmorum* DSM 1094 oraz *A. alternata* DSM 62010. W przypadku *A. alternata* Aa10S-23 aktywność ksylanazy różniła się w zależności od liczby ekspozycji na zimną plazmę, natomiast dla *B. cinerea* DSM 877 nie zaobserwowano znaczących zmian. Traktowanie grzybni plazmą niskotemperaturową wpłynęło na produkcję biomasy grzybni *F. oxysporum* DSM 12646, *F. culmorum* DSM 1094 i *A. alternata* Aa10S-23 podczas hodowli na podłożu płynnym, z ksylanem jako źródłem węgla.
- Plazma niskotemperaturowa wpłynęła na wzrost aktywności enzymów rozkładających pektyny u grzybów *F. culmorum* DSM 1094, *F. tricinctum* Ft11S-23, *B. cinerea* DSM

877 oraz *A. alternata* Aa10S-23 Dla pozostałych szczepów nie zaobserwowano znaczących zmian aktywności tych enzymów. Produkcja biomasy *F. culmorum* DSM 1094 i *A. alternata* Aa10S-23 wzrosła w wyniku traktowania grzybni plazmą.

- Aktywność proteolityczna zmieniała się w zależności od szczepu grzyba i liczby ekspozycji na plazmę. W przypadku *F. tricinctum* Ft11S-23, *B. cinerea* DSM 877 i *A. alternata* DSM 62010 zaobserwowano stopniowy spadek aktywności proteolitycznej w wyniku wielokrotnej ekspozycji grzybni na zimną plazmę. Dla *F. culmorum* DSM 1094 aktywność proteolityczna nieznacznie wzrosła w porównaniu do kontroli, natomiast w przypadku *F. oxysporum* DSM 12646 i *A. alternata* Aa10S-23 zmieniała się w zależności od liczby ekspozycji na zimną plazmę. Traktowanie plazmą wpłynęło również na produkcję biomasy podczas hodowli na podłożu płynnym. W przypadku *F. culmorum* DSM 1094, *B. cinerea* DSM 877 i *A. alternata* DSM 62010 nastąpił spadek produkcji biomasy, natomiast dla *F. tricinctum* Ft11S-23 wzrost. Dla *F. oxysporum* DSM 12646 i *A. alternata* Aa10S-23 zmiany produkcji biomasy były zależne od liczby ekspozycji na zimną plazmę.
- Traktowanie grzybów fitopatogennych plazmą niskotemperaturową wpłynęło na aktywność enzymów rozkładających tłuszcze (lipaz). W przypadku *F. oxysporum* DSM 12646, *A. alternata* DSM 62010 i *A. alternata* Aa10S-23 nastąpił spadek aktywności po ekspozycji na plazmę, natomiast dla *F. culmorum* DSM 1094, *F. tricinctum* Ft11S-23 i *B. cinerea* DSM 877 zaobserwowano wzrost aktywności lipolitycznej w porównaniu do kontroli. Produkcja biomasy grzybów również uległa zmianie w wyniku traktowania plazmą. Dla *B. cinerea* DSM 877 i *A. alternata* DSM 62010 nastąpił wyraźny spadek suchej masy.

Do czynników patogeniczności należą również toksyczne metabolity wydzielane przez grzyby patogenne podczas infekcji, które wpływają negatywnie na komórki roślin, prowadząc do ich śmierci, zahamowania wzrostu zainfekowanej rośliny, chlorozy, zaburzenia mitozy i zmian w metabolizmie białek. W niniejszej pracy zbadano toksyczność filtratów otrzymanych po hodowli grzybów fitopatogennych poddawanych wielokrotnej ekspozycji na plazmę. Toksyczność filtratów oceniono na podstawie analizy kiełkowania nasion oraz rozwoju roślin ogórka (wyrażonym w masie roślin). Wyniki badań własnych (podrozdział 4.7.3) pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków i spostrzeżeń:

- Negatywny wpływ filtratów pochodzących na nasiona wskazuje na zawartość toksycznych metabolitów wydzielanych przez grzyby fitopatogenne.

- Filtrat otrzymany po hodowli grzybów *F. culmorum* DSM 1094 nietraktowanych zimną plazmą wykazywał najbardziej negatywny wpływ na kiełkowanie nasion.
- W większości przypadków wielokrotne traktowanie grzybni plazmą wpłynęło na poprawę kiełkowania nasion inkubowanych w filtratach pochodzących. Niewielki spadek kiełkowania wystąpił jedynie w przypadku nasion inkubowanych w filtracie po hodowli *F. tricinctum* Ft11S-23 P10.
- Wielokrotne traktowanie grzybów fitopatogennych plazmą niskotemperaturową zmniejszyło negatywny wpływ filtratów pochodzących na rozwój siewek ogórka (wyrażony jako masa siewek) w porównaniu do filtratów otrzymanych po hodowli grzybni nietraktowanej plazmą. Szczególnie znaczący wzrost masy siewek uzyskano dla nasion inkubowanych w filtratach po hodowli *F. oxysporum* DSM 12646 i *F. tricinctum* Ft11S-23 po piętnastokrotnej ekspozycji na plazmę, *A. alternata* DSM 62010 po dziesięcio- i piętnastokrotnej ekspozycji oraz *A. alternata* Aa10S-23 po piątej i dziesiątej ekspozycji na plazmę.

Opisana poprawa parametrów kiełkowania i wzrostu roślin może świadczyć o zmniejszonej produkcji toksycznych metabolitów przez grzyby fitopatogenne poddawane działaniu plazmy niskotemperaturowej.

Ważną część niniejszej pracy stanowiła ocena wpływu plazmy niskotemperaturowej na zmiany patogenności grzybów wobec roślin w badaniach *in vivo*. Zbadano zdolność grzybów do kolonizacji i infekcji nasion (na przykładzie nasion ogórka) oraz rozwoju w żywych tkankach roślinnych (na przykładzie owoców pomidora). Dodatkowo przeprowadzono badania infekcji roślin uprawianych w sztucznie inokulowanej glebie. Badania te dają obraz całości mechanizmów wykorzystywanych przez grzyby patogenne w celu skutecznej infekcji i wywoływania choroby u roślin, na które składają się: zdolność adhezji zarodników do tkanek roślinnych, aktywność enzymów rozkładających ścianę komórkową roślin oraz wydzielanie toksycznych metabolitów.

Wyniki badań własnych (podrozdział 4.7.4) wpływu wielokrotnego traktowania grzybów fitopatogennych plazmą niskotemperaturową na zdolność do kolonizacji i infekcji nasion pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków i spostrzeżeń:

- Inkubacja w zawiesinie grzybów fitopatogennych przez 1 godzinę spowodowała spadek kiełkowania nasion oraz żywotności siewek w porównaniu do nasion kontrolnych, inkubowanych w sterylnej wodzie dejonizowanej, co świadczy o wystąpieniu infekcji grzybiczej.

- Odsetek wykiełkowanych nasion zakażonych grzybami fitopatogennymi wzrastał wraz z liczbą ekspozycji na plazmę nietermiczną, z wyjątkiem grzybów *F. culmorum* DSM 1094 po wielokrotnej ekspozycji na plazmę oraz *A. alternata* Aa10S-23 po pięciokrotnej ekspozycji.
- Nasilenie objawów choroby zależało od szczepu grzyba, choć w większości przypadków żywotność roślin rosła wraz z liczbą ekspozycji patogenów na plazmę nietermiczną.
- Dla nasion inkubowanych w zawiesinie *F. culmorum* DSM 1094 przez 1 godzinę zaobserwowano nasilenie objawów chorobowych, z niższą żywotnością siewek po wielokrotnym traktowaniu grzybni plazmą.
- Przedłużenie czasu inkubacji nasion w zawiesinie grzybów do 24 godzin generalnie obniżyło procent kiełkowania nasion i żywotności siewek w porównaniu do inkubacji przez 1 godzinę, jednakże w niektórych przypadkach, takich jak dla *F. oxysporum* DSM 12646, przeżywalność siewek po 7 dniach trwania testu była wyższa w porównaniu do krótszej inkubacji.

Przyczyny obserwowanych różnic pomiędzy skutkami inkubacji nasion przez 1 godzinę i 24 godziny mogą być złożone. Wydłużenie czasu inkubacji zwiększa skuteczność adhezji i umożliwia grzybom głębsze wniknięcie do nasion, co może prowadzić do ich większego uszkodzenia, a w konsekwencji do niższego procentu kiełkowania i żywotności. Wydłużenie czasu inkubacji może także prowadzić do nagromadzenia toksycznych metabolitów grzybowych. Poza tym, dłuższy czas ekspozycji na stres może wyczerpać zasoby energetyczne nasion, osłabiając ich zdolność do kiełkowania i rozwijania zdrowych siewek.

Kolejne przeprowadzone badania skupiały się na ocenie wpływu wielokrotnego traktowania grzybów fitopatogennych subletalną dawką plazmy nietermicznej na zdolność infekcji i rozwój objawów choroby w żywej tkance roślinnej. Wyniki (podrozdział 4.7.5) badań własnych pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków i spostrzeżeń:

- Wszystkie owoce pomidora inokulowane zawiesiną grzybów wykazywały objawy choroby po 7 dniach trwania testu, takie jak mięknięcie, zmianę barwy oraz formowanie widocznej grzybni w miejscu inokulacji, podczas gdy kontrola nie wykazywała objawów.
- Analiza objawów chorobowych wykazała, że ekspozycja grzybów na plazmę generalnie zmniejszała nasilenie choroby. Największy spadek stopnia infekcji (o 21,7%) w porównaniu do grzybni nietraktowanej plazmą zaobserwowano po piętnastokrotnym traktowaniu *A. alternata* Aa10S-23 plazmą. Wyjątkiem było *F. culmorum* DSM 1094, dla którego DSI wzrastało po dziesięcio- i piętnastokrotnej ekspozycji na plazmę.

Zbadano również wpływ wielokrotnego traktowania subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej na patogeniczność wybranych grzybów strzępkowych względem roślin uprawianych w sztucznie inokulowanej glebie. Po 14 dniach testu analizowano długości korzeni i części nadziemnej roślin ogórka oraz żywą i suchą masę roślin, oceniając wskaźnik wigoru masy siewek (SWVI). Wyniki badań własnych (podrozdział 4.7.6) pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków i spostrzeżeń:

- Inokulacja gleby grzybami fitopatogennymi miała negatywny wpływ na wzrost roślin.
- Świeża masa roślin uprawianych w glebie inokulowanej zawiesiną grzybów rosła wraz ze zwiększeniem liczby ekspozycji na plazmę. Masa roślin uprawianych w glebie inokulowanej zawiesiną *F. oxysporum* DSM 12646, *B. cinerea* DSM 877 oraz *A. alternata* DSM 62010 po dziesięcio- i piętnastokrotnej ekspozycji na plazmę była zbliżona do masy roślin w grupie kontrolnej, jednocześnie w przypadku *F. oxysporum* DSM 12646 i *A. alternata* DSM 62010 traktowanie plazmą skutkowało znaczną poprawą tego parametru w porównaniu do roślin inokulowanych zawiesiną P0. Z kolei dla roślin inokulowanych *F. tricinctum* Ft11S-23 i *A. alternata* Aa10S-23 zaobserwowano wzrost masy wraz z zwiększaniem liczby ekspozycji grzybów na plazmę, jednak różnice nie były istotne statystycznie w porównaniu z roślinami inokulowanymi P0.
- Długości łodyg roślin uprawianych w glebie inokulowanej zawiesiną *F. oxysporum* DSM 12646, *F. tricinctum* Ft11S-23 i *A. alternata* DSM 62010 po dziesięcio- i piętnastokrotnej ekspozycji na plazmę były znacznie większe w porównaniu do roślin uprawianych w glebie inokulowanej grzybnią P0. Z kolei wielokrotne traktowanie grzybni *F. tricinctum* Ft11S-23 oraz *A. alternata* DSM 62010 spowodowało znaczącą poprawę wzrostu korzeni roślin uprawianych w inokulowanej glebie. Natomiast dla roślin uprawianych w obecności grzybni *F. culmorum* DSM 1094 wielokrotnie traktowanej plazmą zaobserwowano negatywny wpływ na wzrost korzeni.

Plazma niskotemperaturowa może zmniejszać patogenność grzybów, co wpływa pozytywnie na kiełkowanie nasion i wzrost roślin. Efekt działania plazmy na patogenność grzybów zależy od szczepu, co podkreśla konieczność specyficznego podejścia do różnych patogenów. Dla *F. culmorum* DSM 1094 zaobserwowano negatywny wpływ wielokrotnego traktowania plazmą na patogenność względem roślin.

Praca doktorska demonstrowa potencjał atmosferycznej plazmy niskotemperaturowej jako skutecznej metody inaktywacji patogenów grzybowych na materiałach opakowaniowych (drewno, tektura) oraz w środowisku magazynowania żywności (drewniane skrzynie). Wyniki

przedstawione w niniejszej pracy ujawniły, że wielokrotne traktowanie grzybów fitopatogennych plazmą nietermiczną powoduje nie tylko poważne zmiany morfologiczne w strukturze strzępek, ale także zaburzenia fizjologiczne (np. zmiany w specyficznej aktywności enzymów hydrolitycznych). Poza tym, wielokrotna ekspozycja na zimną plazmę może przynosić pozytywny efekt w postaci zwiększenia wrażliwości względem środków grzybobójczych oraz nadtlenku wodoru (stresu oksydacyjnego). Zjawisko uwrażliwiania (ang. *sensitization*) jest warte uwagi ze względu na potencjalną przydatność w zwalczaniu szczepów opornych.

Zastosowanie plazmy w zwalczaniu chorób powodowanych przez patogenne grzyby wydaje się być bardzo obiecującą metodą, zwłaszcza że podczas piętnastokrotnej ekspozycji komórek nie zaobserwowano rozwinięcia tolerancji na plazmę nietermiczną. Nie wyklucza to jednak możliwości pojawienia się dalszych zmian wskutek zwiększania liczby ekspozycji na plazmę.

Eksperymenty *in vivo* z wykorzystaniem materiałów roślinnych wykazały, że wielokrotne traktowanie grzybni subletalną dawką plazmy prowadzi do zmniejszenia patogenności badanych szczepów grzybów, z wyjątkiem *F. culmorum* DSM 1094, zatem zalecane jest dostosowanie warunków inaktywacji indywidualnie dla każdego zastosowania.

Podsumowując, otrzymane wyniki badań sugerują, że technologia zimnej plazmy może być wykorzystywana w celach poprawy bezpieczeństwa żywnościowego poprzez redukcję strat żywności, wynikających z zanieczyszczeń krzyżowych.

6. Bibliografia

- Abdullahi, N. (2014). Hazard chemicals in some food packaging materials (a review). *Annals. Food Science and Technology*, *15*(1), 115–120.
- Ahmad, R. Z., Gholib, D. (2016). An important mycotic disease in animal livestock caused by some agriculture fungi in Indonesia. *The International Journal of Tropical Veterinary and Biomedical Research*, *1*(1), 38–44. <https://doi.org/10.21157/ijtvbr.v1i1.5079>
- Alegbeleye, O., Odeyemi, O. A., Strateva, M., Stratev, D. (2022). Microbial spoilage of vegetables, fruits and cereals. *Applied Food Research*, *2*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100122>
- Ambrico, P. F., Šimek, M., Rotolo, C., Morano, M., Minafra, A., Ambrico, M., Pollastro, S., Gerin, D., Faretra, F., De Miccolis Angelini, R. M. (2020). Surface dielectric barrier discharge plasma: a suitable measure against fungal plant pathogens. *Scientific Reports*, *10*(3673), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60461-0>
- Anjorin, T. S., Inje, T. V. (2014). Effect of total aflatoxin on the growth characteristics and chlorophyll level of sesame (*Sesamum indicum* L.). *New York Science Journal 2014*, *7*(4), 8–13.
- Apoga, D., Jansson, H. B., Tunlid, A. (2001). Adhesion of conidia and germlings of the plant pathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana* to solid surfaces. *Mycological Research*, *105*(10), 1251–1260. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(08\)61997-8](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(08)61997-8)
- Ardra, S., Barua, M. K. (2022). Halving food waste generation by 2030: The challenges and strategies of monitoring UN sustainable development goal target 12.3. *Journal of Cleaner Production*, *380*(135042), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135042>
- Arie, T. (2019). Fusarium diseases of cultivated plants, control, diagnosis, and molecular and genetic studies. *Journal of Pesticide Science*, *44*(4), 275–281. <https://doi.org/10.1584/JPESTICS.J19-03>
- Avalos, J., Carmen Limón, M. (2015). Biological roles of fungal carotenoids. *Current Genetics*, *61*(3), 309–324. <https://doi.org/10.1007/s00294-014-0454-x>
- Avelino, J., Cristancho, M., Georgiou, S., Imbach, P., Aguilar, L., Bornemann, G., Läderach, P., Anzueto, F., Hruska, A. J., Morales, C. (2015). The coffee rust crises in Colombia and

- Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security*, 7(2), 303–321. <https://doi.org/10.1007/s12571-015-0446-9>
- Avery, S. V., Singleton, I., Magan, N., Goldman, G. H. (2019). The fungal threat to global food security. *Fungal Biology*, 123(8), 555–557. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.03.006>
- Avramidis, G., Stüwe, B., Wascher, R., Bellmann, M., Wieneke, S., von Tiedemann, A., Viöl, W. (2010). Fungicidal effects of an atmospheric pressure gas discharge and degradation mechanisms. *Surface and Coatings Technology*, 205(1), S405–S408. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2010.08.141>
- Bano, A., Gupta, A., Prusty, M. R., Kumar, M. (2023). Elicitation of Fruit Fungi Infection and Its Protective Response to Improve the Postharvest Quality of Fruits. *Stresses*, 3(1), 231–255. <https://doi.org/10.3390/stresses3010018>
- Benmebarek, H., Escuder-Rodríguez, J.-J., González-Siso, M.-I., Karroub, K. (2020). Test for the production and assay of the proteolytic activities of halophilic bacteria and archaea isolated from algerian hypersaline environments. *Proceedings*, 66(1), 1–7. <https://doi.org/10.3390/proceedings2020066012>
- Bennett, J. W., Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497–516. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>
- Bernardi, A. O., Garcia, M. V., Copetti, M. V. (2019). Food industry spoilage fungi control through facility sanitization. *Current Opinion in Food Science*, 29, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.006>
- Bernfeld, P. (1955). Amylases, α and β . W *Methods in enzymology* (T. 1, s. 149–158). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(55\)01021-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(55)01021-5)
- Berto, P., Comménil, P., Belingheri, L., Dehorter, B. (1999). Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in the infection of cauliflower leaves. *FEMS Microbiology Letters*, 180(2), 183–189. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00484-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00484-X)
- Bottalico, A. (1998). Fusarium diseases of cereals: Species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *Journal of Plant Pathology*, 80(2), 85–103.
- Bourke, P., Ziuzina, D., Boehm, D., Cullen, P. J., Keener, K. (2018). The potential of cold plasma for safe and sustainable food production. *Trends in Biotechnology*, 36(6), 615–626. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.11.001>

- Bourke, P., Ziuzina, D., Han, L., Cullen, P. J., Gilmore, B. F. (2017). Microbiological interactions with cold plasma. W *Journal of Applied Microbiology* (T. 123, Numer 2, s. 308–324). <https://doi.org/10.1111/jam.13429>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Branco, S., Schauster, A., Liao, H. L., Ruytinx, J. (2022). Mechanisms of stress tolerance and their effects on the ecology and evolution of mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 235(6), 2158–2175. <https://doi.org/10.1111/nph.18308>
- Brito, C., Hansen, H., Espinoza, L., Faúndez, M., Olea, A. F., Pino, S., Díaz, K. (2021). Assessing the control of postharvest gray mold disease on tomato fruit using mixtures of essential oils and their respective hydrolates. *Plants*, 10(8), 1–13. <https://doi.org/10.3390/plants10081719>
- Buzrul, S. (2022). The Weibull model for microbial inactivation. *Food Engineering Reviews*, 14(1), 45–61. <https://doi.org/10.1007/s12393-021-09291-y>
- Byerlee, D., Fanzo, J. (2019). The SDG of zero hunger 75 years on: Turning full circle on agriculture and nutrition. W *Global Food Security* (T. 21, s. 52–59). <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2019.06.002>
- Cai, H., Yu, N., Liu, Y., Wei, X., Guo, C. (2022). Meta-analysis of fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum* infection-related gene profiles using transcriptome datasets. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.970477>
- Cairns, T. C., Zheng, X., Zheng, P., Sun, J., Meyer, V. (2021). Turning inside out: Filamentous fungal secretion and its applications in biotechnology, agriculture, and the clinic. *Journal of Fungi*, 7(7), 1–36. <https://doi.org/10.3390/jof7070535>
- Cattaneo, A., Sánchez, M. V., Torero, M., Vos, R. (2021). Reducing food loss and waste: Five challenges for policy and research. *Food Policy*, 98, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2020.101974>
- Chanclud, E., Morel, J. B. (2016). Plant hormones: a fungal point of view. *Molecular plant pathology*, 17(8), 1289–1297. <https://doi.org/10.1111/mpp.12393>

- Chandrasekaran, M., Thangavelu, B., Chun, S. C., Sathiyabama, M. (2016). Proteases from phytopathogenic fungi and their importance in phytopathogenicity. *Journal of General Plant Pathology*, 82(5), 233–239. <https://doi.org/10.1007/s10327-016-0672-9>
- Chang, T. H., Lin, Y. H., Chen, K. S., Huang, J. W., Hsiao, S. C., Chang, P. F. L. (2015). Cell wall reinforcement in watermelon shoot base related to its resistance to Fusarium wilt caused by Fusarium oxysporum f. sp. niveum. *Journal of Agricultural Science*, 153(2), 1–10. <https://doi.org/10.1017/S0021859614000057>
- Chang, T. H., Lin, Y. H., Wan, Y. L., Chen, K. S., Huang, J. W., Chang, P. F. L. (2020). Degenerated virulence and irregular development of Fusarium oxysporum f. sp. niveum induced by successive subculture. *Journal of Fungi*, 6(4), 1–14. <https://doi.org/10.3390/jof6040382>
- Chang, X., Dai, H., Wang, D., Zhou, H., He, W., Fu, Y., Ibrahim, F., Zhou, Y., Gong, G., Shang, J., Yang, J., Wu, X., Yong, T., Song, C., Yang, W. (2018). Identification of fusarium species associated with soybean root rot in Sichuan Province, China. *European Journal of Plant Pathology*, 151(3), 563–577. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1410-7>
- Chang, Y. T., Chen, G. (2016). Oral bacterial inactivation using a novel low-temperature atmospheric-pressure plasma device. *Journal of Dental Sciences*, 11(1), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2014.03.007>
- Chen, X. (2020). Pathogens which threaten food security: Puccinia striiformis, the wheat stripe rust pathogen. *W Food Security* (T. 12, Numer 2, s. 239–251). <https://doi.org/10.1007/s12571-020-01016-z>
- Chen, Z., Chen, G., Obenchain, R., Zhang, R., Bai, F., Fang, T., Wang, H., Lu, Y., Wirz, R. E., Gu, Z. (2022). Cold atmospheric plasma delivery for biomedical applications. *Materials Today*, 54, 153–188. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2022.03.001>
- Chiozzi, V., Agriopoulou, S., Varzakas, T. (2022). Advances, applications, and comparison of thermal (pasteurization, sterilization, and aseptic packaging) against non-thermal (ultrasounds, UV radiation, ozonation, high hydrostatic pressure) technologies in food processing. *Applied Sciences*, 12(4), 1–40. <https://doi.org/10.3390/app12042202>
- Cobrado, L., Ricardo, E., Ramalho, P., Fernandes, A. R., Rodrigues, A. G. (2023). Does repeated exposure to hydrogen peroxide induce Candida auris resistance? *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 12(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13756-023-01281-5>

- Cole, M. B., Augustin, M. A., Robertson, M. J., Manners, J. M. (2018). The science of food security. *npj Science of Food*, 2(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41538-018-0021-9>
- Corradini, M. G. (2020). Modeling microbial inactivation during cold atmospheric-pressure plasma (CAPP) processing. W D. Bermudez-Aguirre (Red.), *Advances in Cold Plasma Applications for Food Safety and Preservation* (s. 93–108). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814921-8.00003-7>
- Covo, S. (2020). Genomic instability in fungal plant pathogens. *Genes*, 11(4), 1–14. <https://doi.org/10.3390/genes11040421>
- Dallagi, H., Jha, P. K., Faille, C., Le-Bail, A., Rawson, A., Benezech, T. (2023). Removal of biocontamination in the food industry using physical methods; an overview. *Food Control*, 148, 1–68. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109645>
- Dasan, B. G., Boyaci, I. H., Mutlu, M. (2017). Nonthermal plasma treatment of *Aspergillus* spp. spores on hazelnuts in an atmospheric pressure fluidized bed plasma system: Impact of process parameters and surveillance of the residual viability of spores. *Journal of Food Engineering*, 196, 139–149. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.09.028>
- Davies, C. R., Wohlgemuth, F., Young, T., Violet, J., Dickinson, M., Sanders, J. W., Vallieres, C., Avery, S. V. (2021). Evolving challenges and strategies for fungal control in the food supply chain. *Fungal Biology Reviews*, 36, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.01.003>
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Deising, H. B., Reimann, S., Pascholati, S. F. (2008). Mechanisms and significance of fungicide resistance. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(2), 286–295. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000200017>
- Delgado-Ospina, J., Molina-Hernández, J. B., Chaves-López, C., Romanazzi, G., Paparella, A. (2021). The role of fungi in the cocoa production chain and the challenge of climate change. *W Journal of Fungi* (T. 7, Numer 3, s. 1–25). <https://doi.org/10.3390/jof7030202>

- Deshi, S. N., Wonang, D. L., Dafur, B. S. (2014). Control of rots and spoilage of agricultural products: A review. *International Letters of Natural Sciences*, 18, 63–72.
<https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ilns.18.63>
- Dhiman, S., Varma, A., Prasad, R., Goel, A. (2022). Mechanistic insight of the antifungal potential of green synthesized zinc oxide nanoparticles against *Alternaria brassicae*. *Journal of Nanomaterials*, 2022, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2022/7138843>
- Dias, T. A. da C., Lora, E. E. S., Maya, D. M. Y., Olmo, O. A. del. (2021). Global potential assessment of available land for bioenergy projects in 2050 within food security limits. *Land Use Policy*, 105, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2021.105346>
- Dita, M., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E. S. G., Staver, C. P. (2018). Fusarium wilt of banana: current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1–21. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01468>
- Djamei, A., Kahmann, R. (2012). *Ustilago maydis*: Dissecting the molecular interface between pathogen and plant. *PLoS Pathogens*, 8(11), 1–4.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002955>
- Dora, M., Biswas, S., Choudhary, S., Nayak, R., Irani, Z. (2021). A system-wide interdisciplinary conceptual framework for food loss and waste mitigation strategies in the supply chain. *Industrial Marketing Management*, 93, 492–508.
<https://doi.org/10.1016/j.indmarman.2020.10.013>
- Doyle, J. J., Doyle, J. L. (1991). DNA isolation from small amount of plant tissue. *Phytochemical Bulletin*, 57, 11–15.
- Dudeja, P., Singh, A. (2017). Food safety from farm-to-fork-food-safety issues related to processing. W R. K. Gupta, Dudeja, Minthas Singh (Red.), *Food Safety in the 21st Century: Public Health Perspective* (s. 203–216). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801773-9.00015-7>
- Dutta, S. deb, Tarafder, M., Islam, R., Datta, B. (2018). Characterization of cellulolytic enzymes of *Fusarium* soil Isolates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 279–285.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.03.011>
- Ebrahimi-Shaghghi, F., Noormohammadi, Z., Atyabi, S. M., Razzaghi-Abyaneh, M. (2021). Inhibitory effects of cold atmospheric plasma on the growth, virulence factors and HSP90

- gene expression in *Candida albicans*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 700, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108772>
- Edel-Hermann, V., Lecomte, C. (2019). Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. *W Phytopathology* (T. 109, Numer 4, s. 512–530). <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0320-RVW>
- Ehlbeck, J., Schnabel, U., Polak, M., Winter, J., Von Woedtke, T., Brandenburg, R., Von Dem Hagen, T., Weltmann, K.-D. (2011). Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 44(1), 1–18. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/44/1/013002>
- Ekwoyadu, T. I., Akinola, S. A., Mwanza, M. (2021). *Fusarium* mycotoxins, their metabolites (Free, emerging, and masked), food safety concerns, and health impacts. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(22), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijerph182211741>
- El Bilali, H., Callenius, C., Strassner, C., Probst, L. (2019). Food and nutrition security and sustainability transitions in food systems. *Food and Energy Security*, 8(2), 1–20. <https://doi.org/10.1002/fes3.154>
- El-Sayed, R. A., Jebur, A. B., Kang, W., El-Demerdash, F. M. (2022). An overview on the major mycotoxins in food products: characteristics, toxicity, and analysis. *Journal of Future Foods*, 2(2), 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2022.03.002>
- Epelle, E. I., Macfarlane, A., Cusack, M., Burns, A., Okolie, J. A., Mackay, W., Rateb, M., Yaseen, M. (2023). Ozone application in different industries: A review of recent developments. *Chemical Engineering Journal*, 454, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.140188>
- Epelle, E. I., Macfarlane, A., Cusack, M., Burns, A., Thissera, B., Mackay, W., Rateb, M. E., Yaseen, M. (2022). Bacterial and fungal disinfection via ozonation in air. *Journal of Microbiological Methods*, 194, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106431>
- Erokhin, V., Gao, T. (2020). Impacts of COVID-19 on trade and economic aspects of food security: Evidence from 45 developing countries. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(16), 1–28. <https://doi.org/10.3390/ijerph17165775>

- Escrivá, L., Oueslati, S., Font, G., Manyes, L. (2017). *Alternaria* mycotoxins in food and feed: an overview. *Journal of Food Quality*, 2017, 1–20. <https://doi.org/10.1155/2017/1569748>
- Falanga, A., Maione, A., La Pietra, A., de Alteriis, E., Vitale, S., Bellavita, R., Carotenuto, R., Turrà, D., Galdiero, S., Galdiero, E., Guida, M. (2022). Competitiveness during dual-species biofilm formation of *Fusarium oxysporum* and *Candida albicans* and a novel treatment strategy. *Pharmaceutics*, 14(6), 1–15. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061167>
- FAO. (1996). Rome Declaration on World Food Security and Plan of Action. W *Food and Agriculture Organisation*.
- FAO. (2009). Global agriculture towards 2050. W *High Level Expert Forum-How to feed the world 2050*.
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP, WHO. (2021). The State of Food Security and Nutrition in the World 2021. Transforming food systems for food security, improved nutrition and affordable healthy diets for all. W *The State of Food Security and Nutrition in the World 2021*. <https://doi.org/10.4060/cb4474en>
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP, WHO. (2022). *The State of Food Security and Nutrition in the World 2022. Repurposing food and agricultural policies to make healthy diets more affordable*. <https://doi.org/10.4060/cc0639en>
- FAO, UNEP. (2022, wrzesień 29). *Tackling food loss and waste: A triple win opportunity*. <https://www.fao.org/newsroom/detail/FAO-UNEP-agriculture-environment-food-loss-waste-day-2022/en>
- FAO, WFP, IFAD. (2012). The state of food insecurity in the world 2012. Economic growth is necessary but not sufficient to accelerate reduction of hunger and malnutrition. W *FAO*. FAO, WFP, IFAD. [https://doi.org/ISBN 978-92-5-107316-2](https://doi.org/ISBN%20978-92-5-107316-2)
- Fausto, A., Rodrigues, M. L., Coelho, C. (2019). The still underestimated problem of fungal diseases worldwide. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00214>
- Feng, J., Liu, G., Selvaraj, G., Hughes, G. R., Wei, Y. (2005). A secreted lipase encoded by LIP1 is necessary for efficient use of saturated triglyceride lipids in *Fusarium graminearum*. *Microbiology*, 151(12), 3911–3921. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28261-0>

- Fernández, A., Shearer, N., Wilson, D. R., Thompson, A. (2012). Effect of microbial loading on the efficiency of cold atmospheric gas plasma inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *International Journal of Food Microbiology*, 152(3), 175–180.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.038>
- Fernandez-San Millan, A., Larraya, L., Farran, I., Ancin, M., Veramendi, J. (2021). Successful biocontrol of major postharvest and soil-borne plant pathogenic fungi by antagonistic yeasts. *Biological Control*, 160, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104683>
- Fisher, A., DeGrandi-Hoffman, G., Smith, B. H., Johnson, M., Kaftanoglu, O., Cogley, T., Fewell, J. H., Harrison, J. F. (2021). Colony field test reveals dramatically higher toxicity of a widely-used mito-toxic fungicide on honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Pollution*, 269, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115964>
- Fisher, M. C., Hawkins, N. J., Sanglard, D., Gurr, S. J. (2018). Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*, 360(6390), 739–742. <http://science.sciencemag.org/>
- Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L., Gurr, S. J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* (T. 484, Numer 7393, s. 186–194). <https://doi.org/10.1038/nature10947>
- Fones, H., Gurr, S. (2015). The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genetics and Biology*, 79, 3–9.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.004>
- Fones, H. N., Bebbler, D. P., Chaloner, T. M., Kay, W. T., Steinberg, G., Gurr, S. J. (2020). Threats to global food security from emerging fungal and oomycete crop pathogens. *Nature Food*, 1(7), 332–342. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-01111-0>
- Fonseca-Guerra, I. R., Chiquillo-Pompeyo, J. C., Benavides Roza, M. E., Díaz Ovalle, J. F. (2022). *Fusarium* spp. associated with *Chenopodium quinoa* crops in Colombia. *Scientific Reports*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24908-w>
- Galhano, R., Talbot, N. J. (2011). The biology of blast: Understanding how *Magnaporthe oryzae* invades rice plants. *Fungal Biology Reviews*, 25(1), 61–67.
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2011.01.006>

- Gammoudi, N., Nagaz, K., Ferchichi, A. (2022). Establishment of optimized in vitro disinfection protocol of *Pistacia vera* L. explants mediated a computational approach: multilayer perceptron–multi–objective genetic algorithm. *BMC Plant Biology*, 22(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1186/s12870-022-03674-x>
- Garuba, T., Abdulrahman, A.-A., Olan, G., Abdulkareem, K., Amadi, J. E. (2014). Effects of Fungal Filtrates on Seed Germination and Leaf Anatomy of Maize Seedlings (*Zea mays* L., Poaceae). *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 18(4), 662–667.
<https://doi.org/10.4314/jasem.v18i4.15>
- Gebremariam, E. S., Karakaya, A., Erginbas-Orakci, G., Dababat, A. A., Paulitz, T. C. (2020). Assessment of the seedling resistance of spring wheat lines to *Fusarium culmorum*. *Journal of Agricultural Sciences*, 26(1), 87–93. <https://doi.org/10.15832/ankutbd.466442>
- GenBank: PP869429.1*. (b.d.-a). Pobrano 19.06.2024, z
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/PP869429>
- GenBank: PP869429.1*. (b.d.-b). Pobrano 19.06.2024, z
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/PP869455>
- Giordano, L., Gonthier, P., Negro, F., Zanuttini, R., Cremonini, C. (2021). Effectiveness of new molecules against widespread moulds for food-safe hardwood and softwood packaging. *European Journal of Wood and Wood Products*, 79(1), 227–236.
<https://doi.org/10.1007/s00107-020-01626-6>
- Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M., Toulmin, C. (2010). Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *W Science* (T. 327, Numer 5967, s. 812–818).
<https://doi.org/10.1126/science.1185383>
- Godfray, H. C. J., Mason-D’croz, D., Robinson, S. (2016). Food system consequences of a fungal disease epidemic in a major crop. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1709), 1–10. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0467>
- González-Arenzana, L., Sainz-García, A., González-Marcos, A., Múgica-Vidal, R., Muro-Fraguas, I., Escribano-Viana, R., López-Alfaro, I., Alba-Elías, F., Sainz-García, E. (2021). Cold plasma at atmospheric pressure for eliminating *Brettanomyces* from oak wood. *Enoforum Web Conference*, 3(2), 1–9.

- González-Fernández, R., Prats, E., Jorrín-Novo, J. V. (2010). Proteomics of plant pathogenic fungi. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 1–37.
<https://doi.org/10.1155/2010/932527>
- Gonzalez-Jimenez, I., Perlin, D. S., Shor, E. (2023). Reactive oxidant species induced by antifungal drugs: identity, origins, functions, and connection to stress-induced cell death. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1–8.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1276406>
- Goodwin, L. (2023, kwiecień 20). *The global benefits of reducing food loss and waste, and how to do it*. World Resources Institute. <https://www.wri.org/insights/reducing-food-loss-and-food-waste>
- Gorbanev, Y., Privat-Maldonado, A., Bogaerts, A. (2018). Analysis of short-lived reactive species in plasma-air-water systems: the dos and the do nots. *Analytical Chemistry*, 90(22), 13151–13158. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03336>
- Guenther, J. F., Michael, K. C., Nolte, P. (2001). The economic impact of potato late blight on US growers. *Potato Research*, 44(2), 121–125. <https://doi.org/10.1007/BF02410098>
- Guo, J., He, Z., Ma, C., Li, W., Wang, J., Lin, F., Liu, X., Li, L. (2023). Evaluation of cold plasma for decontamination of molds and mycotoxins in rice grain. *Food Chemistry*, 402, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134159>
- Gupta, A. K., Solanki, I. S., Bashyal, B. M., Singh, Y., Srivastava, K. (2015). Bakanae of rice - An emerging disease in Asia. *W Journal of Animal and Plant Sciences* (T. 25, Numer 6, s. 1499–1514).
- Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., van Otterdijk, R., Meybeck, A. (2011). *The methodology of the FAO study: Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Haelewaters, D., Gafforov, Y., Zhou, L. W. (2022). Biodiversity and conservation of fungi and fungus-like organisms. *Frontiers in Fungal Biology*, 3, 1–3.
<https://doi.org/10.3389/ffunb.2022.973249>
- Han, J. W., Zuo, M., Zhu, W. Y., Zuo, J. H., Lü, E. L., Yang, X. T. (2021). A comprehensive review of cold chain logistics for fresh agricultural products: Current status, challenges, and

- future trends. *Trends in Food Science and Technology*, *109*, 536–551.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.066>
- Handorf, O., Weihe, T., Bekeschus, S., Graf, A. C., Schnabel, U., Riedel, K., Ehlbeck, J. (2018). Nonthermal plasma jet treatment negatively affects the viability and structure of *Candida albicans* SC5314 biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(21), 1–15.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01163-18>
- Harding, M. W., Marques, L. L. R., Howard, R. J., Olson, M. E. (2009). Can filamentous fungi form biofilms? *Trends in Microbiology*, *17*(11), 475–480.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.08.007>
- Harding, M. W., Marques, L. L. R., Howard, R. J., Olson, M. E. (2010). Biofilm morphologies of plant pathogenic fungi. *The Americas Journal of Plant Science and Biotechnology*, *4*(Special Issue 2), 43–47.
- Hassani, F., Zare, L., Khaledi, N. (2019). Evaluation of germination and vigor indices associated with *Fusarium*-infected seeds in pre-basic seeds wheat fields. *Journal of Plant Protection Research*, *59*(1), 69–85. <https://doi.org/10.24425/jppr.2019.126037>
- Hojnik, N., Modic, M., Ni, Y., Filipič, G., Cvelbar, U., Walsh, J. L. (2019). Effective fungal spore inactivation with an environmentally friendly approach based on atmospheric pressure air plasma. *Environmental Science and Technology*, *53*(4), 1893–1904.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05386>
- Hoppanová, L., Kryštofová, S. (2022). Nonthermal plasma effects on fungi: Applications, fungal responses, and future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(19), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms231911592>
- Horbach, R., Navarro-Quesada, A. R., Knogge, W., Deising, H. B. (2011). When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology*, *168*(1), 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.06.014>
- Houston, K., Tucker, M. R., Chowdhury, J., Shirley, N., Little, A. (2016). The plant cell wall: A complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00984>
- Huang, L., Yong, K. W. L., Fernando, W. C., Carpinelli de Jesus, M., De Voss, J. J., Sultanbawa, Y., Fletcher, M. T. (2021). The Inactivation by Curcumin-Mediated Photosensitization of

Botrytis cinerea Spores Isolated from Strawberry Fruits. *Toxins*, 13(3), 1–17.

<https://doi.org/10.3390/TOXINS13030196>

Index Fungorum. (b.d.). Pobrano 7.02.2024, z <https://www.indexfungorum.org/>

Ishangulyyev, R., Kim, S., Lee, S. H. (2019). Understanding food loss and waste-why are we losing and wasting food? *Foods*, 8(8), 1–23. <https://doi.org/10.3390/foods8080297>

Jain, A., Sarsaiya, S., Wu, Q., Lu, Y., Shi, J. (2019). A review of plant leaf fungal diseases and its environment speciation. *Bioengineered*, 10(1), 409–424.

<https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1649520>

Jankowska, M., Kaczynski, P., Hrynko, I., Lozowicka, B. (2016). Dissipation of six fungicides in greenhouse-grown tomatoes with processing and health risk. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(12), 11885–11900. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6260-x>

Jarrige, J., Vervisch, P. (2006). Decomposition of three volatile organic compounds by nanosecond pulsed corona discharge: Study of by-product formation and influence of high voltage pulse parameters. *Journal of Applied Physics*, 99(11), 1–10.

<https://doi.org/10.1063/1.2202700>

Javaid, A., Adrees, H. (2009). Parthenium management by cultural filtrates of phytopathogenic fungi. *Natural Product Research*, 23(16), 1541–1551.

<https://doi.org/10.1080/14786410902726167>

Jeewon, R., Pudaruth, S. B., Bhoyroo, V., Aullybux, A. A., Rajeshkumar, K. C., Alrefaei, A. F. (2024). Antioxidant and Antifungal Properties of Cinnamon, Cloves, Melia azedarach L. and Ocimum gratissimum L. Extracts against Fusarium oxysporum Isolated from Infected Vegetables in Mauritius. *Pathogens*, 13(6), 1–17.

<https://doi.org/10.3390/pathogens13060436>

Jędryczka, M., Kaczmarek, J. (2012). Porażenie nasion łubinu wąskolistnego znajdujących się w obrocie komercyjnym przez grzyby chorobotwórcze i saprotroficzne. *Fragmenta Agronomica*, 29(4), 63–69.

Ji, W. O., Lee, M. H., Kim, G. H., Kim, E. H. (2019). Quantitation of the ROS production in plasma and radiation treatments of biotargets. *Scientific Reports*, 9(19837), 1–11.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-56160-0>

- Jildeh, Z. B., Wagner, P. H., Schöning, M. J. (2021). Sterilization of objects, products, and packaging surfaces and their characterization in different fields of industry: The Status in 2020. *Physica Status Solidi (A) Applications and Materials Science*, 218(13), 1–27. <https://doi.org/10.1002/pssa.202000732>
- Jodzis, S., Baran, K. (2022). The influence of gas temperature on ozone generation and decomposition in ozone generator. How is ozone decomposed? *Vacuum*, 195, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2021.110647>
- Joshi, R. (2018). A review of *Fusarium oxysporum* on its plant interaction and industrial use. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 6(3b), 112–115. <https://doi.org/10.22271/plants.2018.v6.i3b.07>
- Juan, C., Oueslati, S., Mañes, J. (2016). Evaluation of *Alternaria* mycotoxins in strawberries: quantification and storage condition. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 33(5), 861–868. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1177375>
- Julák, J., Soušková, H., Scholtz, V., Kvasničková, E., Savická, D., Kříha, V. (2018). Comparison of fungicidal properties of non-thermal plasma produced by corona discharge and dielectric barrier discharge. *Folia Microbiologica*, 63(1), 63–68. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0535-6>
- Kabak, B. (2009). The fate of mycotoxins during thermal food processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(4), 549–554. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3491>
- Kalghatgi, S., Friedman, G., Fridman, A., Clyne, A. M. (2010). Endothelial cell proliferation is enhanced by low dose non-thermal plasma through fibroblast growth factor-2 release. *Annals of Biomedical Engineering*, 38(3), 748–757. <https://doi.org/10.1007/s10439-009-9868-x>
- Karacan, M. A., Yilmaz, I. C., Yilmaz, D. (2023). Key implications on food storage in cold chain by energy management perspectives. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 7, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1250646>
- Karuna, R., Sashidhar, R. B. (2008). The mycotoxin fumonisin B1 inhibits eukaryotic protein synthesis: In vitro and in vivo studies. *Mycopathologia*, 165(1), 37–49. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9075-y>

- Katsigiannis, A. S., Bayliss, D. L., Walsh, J. L. (2022). Cold plasma for the disinfection of industrial food-contact surfaces: An overview of current status and opportunities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(2), 1086–1124. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12885>
- Keating, B. A., Herrero, M., Carberry, P. S., Gardner, J., Cole, M. B. (2014). Food wedges: Framing the global food demand and supply challenge towards 2050. *Global Food Security*, 3(3–4), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2014.08.004>
- Kelly, H. Y., Dufault, N. S., Walker, D. R., Isard, S. A., Schneider, R. W., Giesler, L. J., Wright, D. L., Marois, J. J., Hartman, G. L. (2015). From select agent to an established pathogen: The response to *Phakopsora pachyrhizi* (soybean rust) in North America. *Phytopathology*, 105(7), 905–916. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-15-0054-FI>
- Khaledi, N., Hassani, F. (2021). Effect of seed-borne *Fusarium* species on constituents of essential oils from seeds of black cumin populations. *Journal of Plant Protection Research*, 61(3), 229–242. <https://doi.org/10.24425/jppr.2021.137945>
- Khaledi, N., Taheri, P., Falahati Rastegar, M. (2017). Identification, virulence factors characterization, pathogenicity and aggressiveness analysis of *Fusarium* spp., causing wheat head blight in Iran. *European Journal of Plant Pathology*, 147(4), 897–918. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1059-7>
- Kikot, G. E., Hours, R. A., Alconada, T. M. (2009). Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: A review. *Journal of Basic Microbiology*, 49(3), 231–241. <https://doi.org/10.1002/jobm.200800231>
- Kim, J. Y., Song, M. G., Jeon, E. B., Kim, J. S., Lee, J. S., Choi, E. H., Lim, J. S., Choi, J. S., Park, S. Y. (2021). Antibacterial effects of non-thermal dielectric barrier discharge plasma against *Escherichia coli* and *Vibrio parahaemolyticus* on the surface of wooden chopping board. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 73, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102784>
- King, B. C., Donnelly, M. K., Bergstrom, G. C., Walker, L. P., Gibson, D. M. (2009). An optimized microplate assay system for quantitative evaluation of plant cell wall-degrading enzyme activity of fungal culture extracts. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(4), 1033–1044. <https://doi.org/10.1002/bit.22151>

- Klämpfl, T. G., Isbary, G., Shimizu, T., Li, Y. F., Zimmermann, J. L., Stolz, W., Schlegel, J., Morfill, G. E., Schmidt, H. U. (2012). Cold atmospheric air plasma sterilization against spores and other microorganisms of clinical interest. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5077–5077. <https://doi.org/10.1128/AEM.00583-12>
- Köhl, J., Kolnaar, R., Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *W Frontiers in Plant Science* (T. 10, Numer 845, s. 1–19). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
- Komárek, M., Čadková, E., Chrastný, V., Bordas, F., Bollinger, J. C. (2010). Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environment International*, 36(1), 138–151. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.10.005>
- Kora, C., McDonald, M. R., Boland, G. J. (2005). Occurrence of fungal pathogens of carrots on wooden boxes used for storage. *Plant Pathology*, 54(5), 665–670. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01189.x>
- Krasnow, C., Ziv, C. (2022). Non-Chemical Approaches to Control Postharvest Gray Mold Disease in Bell Peppers. *Agronomy*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010216>
- Kruger, N. J. (2009). The Bradford method for protein quantitation. W Walker J.M (Red.), *The Protein Protocols Handbook* (s. 17–24). Springer Protocols Handbooks. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_4
- Kubicek, C. P., Starr, T. L., Glass, N. L. (2014). Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 427–451. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045831>
- Kumar, A., Škoro, N., Gernjak, W., Puač, N. (2021). Cold atmospheric plasma technology for removal of organic micropollutants from wastewater—a review. *European Physical Journal D*, 75(283), 1–26. <https://doi.org/10.1140/epjd/s10053-021-00283-5>
- Kumar, D., Kalita, P. (2017). Reducing postharvest losses during storage of grain crops to strengthen food security in developing countries. *Foods*, 6(1), 1–22. <https://doi.org/10.3390/foods6010008>
- Kumar, P. S., Nattudurai, G., Islam, V. I. H., Ignacimuthu, S. (2022). The effects of some essential oils on *Alternaria alternata*, a post-harvest phyto-pathogenic fungus in wheat by

disrupting ergosterol biosynthesis. *Phytoparasitica*, 50(2), 513–525.

<https://doi.org/10.1007/s12600-021-00970-4>

Kumar, S., Jain, N. K., Sharma, K. C., Mishra, B. K., Srinivasan, R., Paswan, R. (2012).

Pectinolytic profile of some fungal strains. *Journal of mycology and plant pathology*, 42(2), 213–217. <https://www.researchgate.net/publication/319256848>

Kurzawińska, H., Machura, M. (2017). Oddziaływanie naturalnych olejków eterycznych na wzrost *Phytophthora* spp. - patogenów wyizolowanych z sadzonek pelargonii. *Inżynieria Ekologiczna*, 18(5), 84–91. <https://doi.org/10.12912/23920629/74967>

Kustrzeba-Wójcicka, I., Siwak, E., Terlecki, G., Wolańczyk-Mędrała, A., Mędrała, W. (2014). *Alternaria alternata* and its allergens: A comprehensive review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 47(3), 354–365. <https://doi.org/10.1007/s12016-014-8447-6>

Laluk, K., Mengiste, T. (2010). Necrotroph attacks on plants: Wanton destruction or covert extortion? *The Arabidopsis Book*, 8, 1–34. <https://doi.org/10.1199/tab.0136>

Laskoś, K., Czyczyło-Mysza, I. M. (2023). Wosk epikutylarny liści jako cecha warunkująca odporność na suszę u zbóż. *Postępy Biochemii*, 69(2), 104–112. https://doi.org/10.18388/pb.2021_483

Leadbeater, A. J. (2014). Plant health management: Fungicides and antibiotics. W N. K. Van Alfen (Red.), *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems* (s. 408–424). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00179-0>

Lee, H. B., Patriarca, A., Magan, N. (2015). *Alternaria* in food: Ecophysiology, mycotoxin production and toxicology. *Mycobiology*, 43(2), 93–106. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.2.93>

Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., Coton, E. (2017). Antifungal microbial agents for food biopreservation—a review. W *Microorganisms* (T. 5, Numer 3, s. 1–35). <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030037>

Li, R., Li, Y., Xu, W., Liu, W., Xu, X., Bi, Y., Prusky, D. (2023). Aabrm1-mediated melanin synthesis is essential to growth and development, stress adaption, and pathogenicity in *Alternaria alternata*. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1327765>

- Li, Y. M., Shaffer, J. P., Hall, B., Ko, H. (2019). Soil-borne fungi influence seed germination and mortality, with implications for coexistence of desert winter annual plants. *PLoS ONE*, *14*(10), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224417>
- Li, Z., Chen, S., Wang, Y., Liu, Z., Xia, Z., Zhang, M., Luo, X., Song, Y., Zhao, J., Zhang, T. (2020). Biochemical characterization of a novel halo/organic-solvents/final-products tolerant GH39 xylosidase from saline soil and its synergic action with xylanase. *International Journal of Biological Macromolecules*, *164*, 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.079>
- Lin, L., Xu, J. (2023). Production of fungal pigments: Molecular processes and their applications. *Journal of Fungi*, *9*(1), 1–25. <https://doi.org/10.3390/jof9010044>
- Lindgren, E., Harris, F., Dangour, A. D., Gasparatos, A., Hiramatsu, M., Javadi, F., Loken, B., Murakami, T., Scheelbeek, P., Haines, A. (2018). Sustainable food systems—a health perspective. *Sustainability Science*, *13*(6), 1505–1517. <https://doi.org/10.1007/s11625-018-0586-x>
- Lipinski, B., Hanson, C., Lomax, J., Kitinoja, L., Waite, R., Searchinger, T. (2013). Creating a sustainable food future: Reducing food loss and waste. *World Resource Institute*, *2*, 1–40.
- Liu, S., Le Mauff, F., Sheppard, D. C., Zhang, S. (2022). Filamentous fungal biofilms: Conserved and unique aspects of extracellular matrix composition, mechanisms of drug resistance and regulatory networks in *Aspergillus fumigatus*. *npj Biofilms and Microbiomes*, *8*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41522-022-00347-3>
- Liu, Y., Li, Y., Bi, Y., Jiang, Q., Mao, R., Liu, Z., Huang, Y., Zhang, M., Prusky, D. B. (2021). Induction of defense response against *Alternaria* rot in Zaosu pear fruit by exogenous L-lysine through regulating ROS metabolism and activating defense-related proteins. *Postharvest Biology and Technology*, *179*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111567>
- Lorrai, R., Ferrari, S. (2021). Host cell wall damage during pathogen infection: Mechanisms of perception and role in plant-pathogen interactions. *W Plants* (T. 10, Numer 2, s. 1–20). <https://doi.org/10.3390/plants10020399>
- Los, A., Ziuzina, D., Boehm, D., Bourke, P. (2020). Effects of cold plasma on wheat grain microbiome and antimicrobial efficacy against challenge pathogens and their resistance.

International Journal of Food Microbiology, 335, 1–13.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108889>

Los, A., Ziuzina, D., Boehm, D., Cullen, P. J., Bourkea, P. (2020). Inactivation efficacies and mechanisms of gas plasma and plasma-activated water against *Aspergillus flavus* spores and biofilms: A comparative study. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(9), 1–17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02619-19>

Lu, Q., Liu, D., Song, Y., Zhou, R., Niu, J. (2014). Inactivation of the tomato pathogen cladosporium fulvum by an atmospheric-pressure cold plasma jet. *Plasma Processes and Polymers*, 11(11), 1028–1036. <https://doi.org/10.1002/ppap.201400070>

Lucas, J. A. (2017). Fungi, food crops, and biosecurity: advances and challenges. W D. Barling (Red.), *Advances in Food Security and Sustainability* (T. 2, s. 1–40). Elsevier . <https://doi.org/10.1016/bs.af2s.2017.09.007>

Ma, H., Zhang, B., Gai, Y., Sun, X., Chung, K. R., Li, H. (2019). Cell-wall-degrading enzymes required for virulence in the host selective toxin-producing necrotroph *Alternaria alternata* of citrus. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02514>

Ma, Y., Yin, X., Bi, X., Su, F., Liang, Z., Luo, M., Fu, D., Xing, Y., Che, Z. (2019). Physicochemical properties and bioactive compounds of fermented pomegranate juice as affected by high-pressure processing and thermal treatment. *International Journal of Food Properties*, 22(1), 1250–1269. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1640737>

Ma, Y., Zhang, G. J., Shi, X. M., Xu, G. M., Yang, Y. (2008). Chemical mechanisms of bacterial inactivation using dielectric barrier discharge plasma in atmospheric air. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 36(4), 1615–1620. <https://doi.org/10.1109/TPS.2008.917165>

Malik, M. A., Jiang, C., Heller, R., Lane, J., Hughes, D., Schoenbach, K. H. (2016). Ozone-free nitric oxide production using an atmospheric pressure surface discharge - A way to minimize nitrogen dioxide co-production. *Chemical Engineering Journal*, 283, 631–638. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.07.092>

Malinovsky, F. G., Fangel, J. U., Willats, W. G. T. (2014). The role of the cell wall in plant immunity. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00178>

- Maliszewska, I., Nowinski, D. K., Fujera, J., Arora, G., Šimek, M., Czapka, T. (2024). The efficacy of non-equilibrium dielectric barrier discharge in air on the elimination of phytopathogenic fungi from wooden surface. *Food Control*, *162*, 1–13.
- Marinho, M. da C., Diogo, B. S., Lage, O. M., Antunes, S. C. (2020). Ecotoxicological evaluation of fungicides used in viticulture in non-target organisms. *Environmental Science and Pollution Research*, *27*(35), 43958–43969. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10245-w>
- Mastanaiah, N., Banerjee, P., Johnson, J. A., Roy, S. (2013). Examining the role of ozone in surface plasma sterilization using dielectric barrier discharge (DBD) plasma. *Plasma Processes and Polymers*, *10*(12), 1120–1133. <https://doi.org/10.1002/ppap.201300108>
- Maybin, J. A., Thompson, T. P., Flynn, P. B., Skvortsov, T., Hickok, N. J., Freeman, T. A., Gilmore, B. F. (2023). Cold atmospheric pressure plasma-antibiotic synergy in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is mediated via oxidative stress response. *Biofilm*, *5*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2023.100122>
- Mazzola, P. G., Martins, A. M. S., Penna, T. C. V. (2006). Chemical resistance of the gram-negative bacteria to different sanitizers in a water purification system. *BMC Infectious Diseases*, *6*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-131>
- Mecha, A. C., Onyango, M. S., Ochieng, A., Momba, M. N. B. (2020). Modelling inactivation kinetics of waterborne pathogens in municipal wastewater using ozone. *Environmental Engineering Research*, *25*(6), 890–897. <https://doi.org/10.4491/eer.2019.432>
- Meena, M., Gupta, S. K., Swapnil, P., Zehra, A., Dubey, M. K., Upadhyay, R. S. (2017). *Alternaria* toxins: Potential virulence factors and genes related to pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01451>
- Mesterházy, Á., Oláh, J., Popp, J. (2020). Losses in the grain supply chain: Causes and solutions. *Sustainability*, *12*(6), 1–18. <https://doi.org/10.3390/su12062342>
- Michael, P. S., Peter, T. M. (2023). Sweet potato is a strategic root crop in Oceania: A synthesis of the past research and future direction. *SAINS TANAH - Journal of Soil Science and Agroclimatology*, *20*(1), 51–65. <https://doi.org/10.20961/stjssa.v20i1.66319>
- Michielse, C. B., Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, *10*(3), 311–324. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x>

- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.
- Mirza Alizadeh, A., Hashempour-Baltork, F., Mousavi Khaneghah, A., Hosseini, H. (2021). New perspective approaches in controlling fungi and mycotoxins in food using emerging and green technologies. *Current Opinion in Food Science*, 39, 7–15.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.12.006>
- Misra, N. N., Patil, S., Moiseev, T., Bourke, P., Mosnier, J. P., Keener, K. M., Cullen, P. J. (2014). In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of strawberries. *Journal of Food Engineering*, 125, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.10.023>
- Möbius, N., Hertweck, C. (2009). Fungal phytotoxins as mediators of virulence. W *Current Opinion in Plant Biology* (T. 12, Numer 4, s. 390–398).
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.06.004>
- Mohammed, Y. M. M., Badawy, M. E. I. (2020). Potential of phytopathogenic fungal isolates as a biocontrol agent against some weeds. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00295-0>
- Mohapatra, D., Kumar, S., Kotwaliwale, N., Singh, K. K. (2017). Critical factors responsible for fungi growth in stored food grains and non-chemical approaches for their control. *Industrial Crops and Products*, 108, 162–182. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.039>
- Moisan, M., Barbeau, J., Moreau, S., Pelletier, J., Tabrizian, M., Yahia, L. (2001). Low-temperature sterilization using gas plasmas: A review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. W *International Journal of Pharmaceutics* (T. 226, Numery 1–2, s. 1–21). [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00752-9](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00752-9)
- Molina-Hernandez, J. B., Capelli, F., Laurita, R., Tappi, S., Laika, J., Gioia, L., Valbonetti, L., Chaves-López, C. (2022). A comparative study on the antifungal efficacy of cold atmospheric plasma at low and high surface density on *Aspergillus chevalieri* and mechanisms of action. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 82, 1–14.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103194>
- Monteiro, F., Romeiras, M. M., Figueiredo, A., Sebastiana, M., Baldé, A., Catarino, L., Batista, D. (2015). Tracking cashew economically important diseases in the West African region using metagenomics. *Frontiers in Plant Science*, 6(JUNE), 1–6.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00482>

- Montibus, M., Ismail, R., Michel, V., Federighi, M., Aviat, F., Le Bayon, I. (2016). Assessment of *Penicillium expansum* and *Escherichia coli* transfer from poplar crates to apples. *Food Control*, 60, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.025>
- Moonjely, S., Ebert, M., Paton-Glassbrook, D., Noel, Z. A., Roze, L., Shay, R., Watkins, T., Trail, F. (2023). Update on the state of research to manage *Fusarium* head blight. *Fungal Genetics and Biology*, 169, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2023.103829>
- Morgan, D. M. (1998). Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. W D. M. L. Morgan (Red.), *Polyamine Protocols. Methods in Molecular Biology* (T. 79, s. 179–184). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-448-8:179>
- Mravlje, J., Regvar, M., Vogel-Mikuš, K. (2021). Development of cold plasma technologies for surface decontamination of seed fungal pathogens: Present status and perspectives. *Journal of Fungi*, 7(8), 1–18. <https://doi.org/10.3390/jof7080650>
- Nabrdalik, M., Grata, K. (2011). Influence of the culture conditions on lipolytic activity of *Bacillus cereus* and *Bacillus mycoides*. *Ecological Chemistry and Engineering*, 18(12), 1727–1736.
- Nakajima, M., Akutsu, K. (2014). Virulence factors of *Botrytis cinerea*. W *Journal of General Plant Pathology* (T. 80, Numer 1, s. 15–23). <https://doi.org/10.1007/s10327-013-0492-0>
- Nan, M., Xue, H., Bi, Y. (2022). Contamination, detection and control of mycotoxins in fruits and vegetables. *Toxins*, 14(5), 1–30. <https://doi.org/10.3390/toxins14050309>
- Napp, M., Daeschlein, G., von Podewils, S., Hinz, P., Emmert, S., Haase, H., Spitzmueller, R., Gümbel, D., Kasch, R., Jünger, M. (2016). In vitro susceptibility of methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains of *Staphylococcus aureus* to two different cold atmospheric plasma sources. *Infection*, 44(4), 531–537. <https://doi.org/10.1007/s15010-016-0888-9>
- Nicastro, R., Carillo, P. (2021). Food loss and waste prevention strategies from farm to fork. W *Sustainability (Switzerland)* (T. 13, Numer 10, s. 1–23). <https://doi.org/10.3390/su13105443>
- Niedźwiedź, I., Waśko, A., Pawłat, J., Polak-Berecka, M. (2019). The state of research on antimicrobial activity of cold plasma. *Polish Journal of Microbiology*, 68(2), 153–164. <https://doi.org/10.33073/PJM-2019-028>

- Niemira, B. A., Boyd, G., Sites, J. (2014). Cold plasma rapid decontamination of food contact surfaces contaminated with Salmonella biofilms. *Journal of Food Science*, 79(5), 917–922. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12379>
- Nowinski, D., Czapka, T., Maliszewska, I. (2024). Effect of multiple nonthermal plasma treatments of filamentous fungi on cellular phenotypic changes and phytopathogenicity. *International Journal of Food Microbiology*, 408, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110428>
- Oerke, E. C., Dehne, H. W. (2004). Safeguarding production - Losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection*, 23(4), 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.10.001>
- Oliveira, F. A., Reis, L. P. G., Soto-Blanco, B., Melo, M. M. (2015). Pesticides residues in the *Prochilodus costatus* (Valenciennes, 1850) fish caught in the São Francisco River, Brazil. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 50(6), 398–405. <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1011946>
- Oliver, R. P., Hewitt, H. G. (2014). *Fungicides in crop protection* (2. wyd.). CABI.
- Ortega, L. M., Kikot, G. E., Astoreca, A. L., Alconada, T. M. (2013). Screening of *Fusarium graminearum* isolates for enzymes extracellular and deoxynivalenol production. *Journal of Mycology*, 2013, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/358140>
- Ott, L. C., Appleton, H. J., Shi, H., Keener, K., Mellata, M. (2021). High voltage atmospheric cold plasma treatment inactivates *Aspergillus flavus* spores and deoxynivalenol toxin. *Food Microbiology*, 95, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103669>
- Paccanaro, M. C., Sella, L., Castiglioni, C., Giacomello, F., Martínez-Rocha, A. L., D’Ovidio, R., Schäfer, W., Favaron, F. (2017). Synergistic effect of different plant cell wall-degrading enzymes is important for virulence of *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(11), 886–895. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-17-0179-R>
- Palmieri, D., Vitale, S., Lima, G., Di Pietro, A., Turrà, D. (2020). A bacterial endophyte exploits chemotropism of a fungal pathogen for plant colonization. *Nature Communications*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18994-5>
- Pankaj, S. K., Bueno-Ferrer, C., Misra, N. N., Milosavljević, V., O’Donnell, C. P., Bourke, P., Keener, K. M., Cullen, P. J. (2014). Applications of cold plasma technology in food

- packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 35(1), 5–17.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.10.009>
- Pankaj, S. K., Keener, K. M. (2017). Cold plasma: background, applications and current trends. *Current Opinion in Food Science*, 16, 49–52. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.07.008>
- Park, J., Kim, S., Jo, M., An, S., Kim, Y., Yoon, J., Jeong, M. H., Kim, E. Y., Choi, J., Kim, Y., Park, S. Y. (2024). Isolation and Identification of *Alternaria alternata* from Potato Plants Affected by Leaf Spot Disease in Korea: Selection of Effective Fungicides. *Journal of Fungi*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/jof10010053>
- Park, N. S., Yun, S. E., Lee, H. Y., Lee, H. J., Choi, J. H., Kim, G. C. (2022). No-ozone cold plasma can kill oral pathogenic microbes in H₂O₂-dependent and independent manner. *Scientific Reports*, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11665-z>
- Parveen, S., Wani, A. H., Bhat, M. Y. (2019). Effect of culture filtrates of pathogenic and antagonistic fungi on seed germination of some economically important vegetables. *Brazilian Journal of Biological Sciences*, 6(12), 133–139.
<https://doi.org/10.21472/bjbs.061212>
- Patange, A., O'Byrne, C., Boehm, D., Cullen, P. J., Keener, K., Bourke, P. (2019). The effect of atmospheric cold plasma on bacterial stress responses and virulence using *Listeria monocytogenes* knockout mutants. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02841>
- Pautasso, M., Döring, T. F., Garbelotto, M., Pellis, L., Jeger, M. J. (2012). Impacts of climate change on plant diseases-opinions and trends. *European Journal of Plant Pathology*, 133(1), 295–313. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-9936-1>
- Peiqian, L., Xiaoming, P., Huifang, S., Jingxin, Z., Ning, H., Birun, L. (2014). Biofilm formation by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and susceptibility to environmental stress. *FEMS Microbiology Letters*, 350(2), 138–145. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12310>
- Peng, Y., Li, S. J., Yan, J., Tang, Y., Cheng, J. P., Gao, A. J., Yao, X., Ruan, J. J., Xu, B. L. (2021). Research Progress on Phytopathogenic Fungi and Their Role as Biocontrol Agents. *W Frontiers in Microbiology* (T. 12). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.670135>
- Perincherry, L., Lalak-Kączugowska, J., Stepién, L. (2019). *Fusarium*-produced mycotoxins in plant-pathogen interactions. *Toxins*, 11(11), 1–22. <https://doi.org/10.3390/toxins11110664>

- Perincherry, L., Urbaniak, M., Pawłowicz, I., Kotowska, K., Waśkiewicz, A., Stępień, Ł. (2021). Dynamics of Fusarium mycotoxins and lytic enzymes during pea plants' infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 1–19.
<https://doi.org/10.3390/ijms22189888>
- Petrasch, S., Knapp, S. J., van Kan, J. A. L., Blanco-Ulate, B. (2019). Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 20(6), 877–892. <https://doi.org/10.1111/mpp.12794>
- Petrasch, S., Silva, C. J., Mesquida-Pesci, S. D., Gallegos, K., van den Abeele, C., Papin, V., Fernandez-Acero, F. J., Knapp, S. J., Blanco-Ulate, B. (2019). Infection strategies deployed by *Botrytis cinerea*, *Fusarium acuminatum*, and *Rhizopus stolonifer* as a function of tomato fruit ripening stage. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1–17.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00223>
- Pradhan, A., Ghosh, S., Sahoo, D., Jha, G. (2021). Fungal effectors, the double edge sword of phytopathogens. *Current Genetics*, 67(1), 27–40. <https://doi.org/10.1007/s00294-020-01118-3>
- Prell, H., Day R. (2001). Phytotoxins: The Weapons of Necrotrophic Phytopathogenic Fungi. W *Plant-Fungal Pathogen Interaction* (s. 57–69). Springer Berlin Heidelberg.
- Pretty, J. (2008). Agricultural sustainability: Concepts, principles and evidence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1491), 447–465.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2163>
- Prusky, D. (2011). Reduction of the incidence of postharvest quality losses, and future prospects. *Food Security*, 3(4), 463–474. <https://doi.org/10.1007/s12571-011-0147-y>
- Przystaś, W., Zabłocka-Godlewska, E., Grabińska-Sota, E. (2012). Biological removal of azo and triphenylmethane dyes and toxicity of process by-products. *Water, Air, and Soil Pollution*, 223(4), 1581–1592. <https://doi.org/10.1007/s11270-011-0966-7>
- Qin, G., Tian, S., Chan, Z., Li, B. (2007). Crucial role of antioxidant proteins and hydrolytic enzymes in pathogenicity of *Penicillium expansum*: Analysis based on proteomics approach. *Molecular and Cellular Proteomics*, 6(3), 425–438.
<https://doi.org/10.1074/mcp.M600179-MCP200>

- Raihan, A., Muhtasim, D. A., Farhana, S., Hasan, M. A. U., Pavel, M. I., Faruk, O., Rahman, M., Mahmood, A. (2023). An econometric analysis of Greenhouse gas emissions from different agricultural factors in Bangladesh. *Energy Nexus*, 9, 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.nexus.2023.100179>
- Ramos, A. M., Gally, M., Szapiro, G., Itzcovich, T., Carabajal, M., Levin, L. (2016). In vitro growth and cell wall degrading enzyme production by Argentinean isolates of *Macrophomina phaseolina*, the causative agent of charcoal rot in corn. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(4), 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.06.002>
- Rampersad, S. N. (2020). Pathogenomics and management of fusarium diseases in plants. *Pathogens*, 9(5), 1–21. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050340>
- Rangel, K., Cabral, F. O., Lechuga, G. C., Carvalh, J. P. R. S., Villas-Bôas, M. H. S., Midlej, V., De-Simone, S. G. (2022). Detrimental effect of ozone on pathogenic bacteria. *Microorganisms*, 10(1), 1–17. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010040>
- Remlein-Starosta, D., Krzywińska, J., Nijak, K., Drożdżyński, D., Walorczyk, S., Dopierała, U., Jaworski, R., Szłykiewicz, M. (2012). Organizmy szkodliwe i entomofauna pożyteczna jako wskaźniki bioróżnorodności i stanu fitosanitarnego produkcji rolnej. *Zagadnienia Doradztwa Rolniczego*, 3, 1–11.
- Rhee, S. G., Chang, T. S., Jeong, W., Kang, D. (2010). Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. *Molecules and Cells*, 29(6), 539–549.
<https://doi.org/10.1007/s10059-010-0082-3>
- Riquelme, M., Aguirre, J., Bartnicki-García, S., Braus, G. H., Feldbrügge, M., Fleig, U., Hansberg, W., Herrera-Estrella, A., Kämper, J., Kück, U., Mouriño-Pérez, R. R., Takeshita, N., Fischer, R. (2018). Fungal Morphogenesis, from the Polarized Growth of Hyphae to Complex Reproduction and Infection Structures. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 82(2), 1–47. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00068-17>
- Ritz, K. (2005). Fungi. W D. Hillel (Red.), *Encyclopedia of Soils in the Environment* (T. 2, s. 110–119). Oxford, Elsevier.
- Rizzo, D. M., Lichtveld, M., Mazet, J. A. K., Togami, E., Miller, S. A. (2021). Plant health and its effects on food safety and security in a One Health framework: four case studies. *One Health Outlook*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s42522-021-00038-7>

- Rodarte, M. P., Dias, D. R., Vilela, D. M., Schwan, R. F. (2011). Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). *Acta Scientiarum. Agronomy*, 33(3), 457–464. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v33i3.6734>
- Roser, M., Ritchie, H., Rosado, P. (2013). *Food Supply*. Our World in Data. <https://ourworldindata.org/food-supply#caloric-energy-supply>
- Royal Society of London. (2009). Reaping the benefits: Science and the sustainable intensification of global agriculture. W *Chemical Engineer*.
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1935/2004 z dnia 27 października 2004 r. w sprawie materiałów i wyrobów przeznaczonych do kontaktu z żywnością oraz uchylające dyrektywy 80/590/EWG i 89/109/EWG (Dz.U. L 338 z 13.11.2004, s. 4). Pobrano 9.04.2024, z <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2004/1935/oj/pol>
- Różewicz, M., Wyzińska, M., Grabiński, J. (2021). The most important fungal diseases of cereals—problems and possible solutions. *Agronomy*, 11(4), 1–12. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040714>
- Sadowska, K., Stępniewska-Jarosz, S., Łukaszewska-Skrzypniak, N., Zenelt, W., Borodynko-Filas, N. (2021). Phytopathogenic species of fungi and fungal-like organisms identified in plant samples delivered to the plant disease clinic in 2018–2020. *Progress in Plant Protection*, 61(3), 177–183. <https://doi.org/10.14199/PPP-2021-019>
- Saha, D., Fetzner, R., Burkhardt, B., Podlech, J., Metzler, M., Dang, H., Lawrence, C., Fischer, R. (2012). Identification of a Polyketide synthase required for alternariol (AOH) and alternariol-9-methyl ether (AME) formation in *alternaria alternata*. *PLoS ONE*, 7(7), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040564>
- Sakudo, A., Yagyu, Y., Onodera, T. (2019). Disinfection and sterilization using plasma technology: Fundamentals and future perspectives for biological applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms20205216>
- Saleh, I., Al-Thani, R. (2019). Fungal food spoilage of supermarkets' displayed fruits. *Veterinary World*, 12(11). <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1877-1883>
- Sanginga N., Mbabu A. (2015). *Root and tuber crops (Cassava, Yam, Potato and Sweet Potato)*. 1–26.

- Sanzani, S. M., Reverberi, M., Geisen, R. (2016). Mycotoxins in harvested fruits and vegetables: Insights in producing fungi, biological role, conducive conditions, and tools to manage postharvest contamination. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.07.003>
- Savary, S., Teng, P. S., Willocquet, L., Nutter, F. W. (2006). Quantification and modeling of crop losses: A review of purposes. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 89–112. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143342>
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology and Evolution*, 3(3), 430–439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>
- Scarlett, S. S., White, J. A., Blackmore, P. F., Schoenbach, K. H., Kolb, J. F. (2009). Regulation of intracellular calcium concentration by nanosecond pulsed electric fields. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(5), 1168–1175. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.02.006>
- Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, M., Migheli, Q. (2013). *Fusarium culmorum*: Causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Molecular Plant Pathology*, 14(4), 323–341. <https://doi.org/10.1111/mpp.12011>
- Schiwek, S., Alhussein, M., Rodemann, C., Budragchaa, T., Beule, L., von Tiedemann, A., Karlovsky, P. (2022). *Fusarium culmorum* produces NX-2 toxin simultaneously with deoxynivalenol and 3-Acetyl-deoxynivalenol or nivalenol. *Toxins*, 14(7), 1–16. <https://doi.org/10.3390/toxins14070456>
- Schmitz, K., Protzko, R., Zhang, L., Benz, J. P. (2019). Spotlight on fungal pectin utilization—from phytopathogenicity to molecular recognition and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(6), 2507–2524. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09622-4>
- Schnabel, U., Andrasch, M., Weltmann, K. D., Ehlbeck, J. (2014). Inactivation of vegetative microorganisms and bacillus atrophaeus endospores by reactive nitrogen species (RNS). *Plasma Processes and Polymers*, 11(2), 110–116. <https://doi.org/10.1002/ppap.201300072>
- Schumacher, J. (2017). How light affects the life of Botrytis. *Fungal Genetics and Biology*, 106, 26–41. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.06.002>

- Scialabba, N. E.-H. (2015). Food wastage footprint Climate Change. *UNFCCC COP*, 1–5.
https://www.researchgate.net/publication/337199031_Food_Wastage_Footprint_Climate_Change/citations
- Shao, D., Smith, D. L., Kabbage, M., Roth, M. G. (2021). Effectors of Plant Necrotrophic Fungi. *Frontiers in Plant Science*, 12, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.687713>
- Shaw, D. J. (2007). World food security: A history since 1945. W J. D. Shaw (Red.), *World Food Security: A History since 1945*. Palgrave Macmillan London.
<https://doi.org/10.1057/9780230589780>
- Shaw, M. W., Emmanuel, C. J., Emilda, D., Terhem, R. B., Shafia, A., Tsamaidi, D., Emblow, M., van Kan, J. A. L. (2016). Analysis of cryptic, systemic Botrytis infections in symptomless hosts. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–14.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00625>
- Shi, J., Jiang, M., Wang, H., Luo, Z., Guo, Y., Chen, Y., Zhao, X., Qiang, S., Strasser, R. J., Kalaji, H. M., Chen, S. (2023). Effects of mycotoxin fumagillin, mevastatin, radicicol, and wortmannin on photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plants*, 12(3), 1–18.
<https://doi.org/10.3390/plants12030665>
- Shi, X., Li, B., Qin, G., Tian, S. (2012). Mechanism of antifungal action of borate against *Colletotrichum gloeosporioides* related to mitochondrial degradation in spores. *Postharvest Biology and Technology*, 67, 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.01.003>
- Shuping, D. S. S., Eloff, J. N. (2017). The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: A review. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM*, 14(4), 120–127. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i4.14>
- Siddique, S. S., Hardy, G. E. S. J., Bayliss, K. L. (2018). Cold plasma: a potential new method to manage postharvest diseases caused by fungal plant pathogens. *Plant Pathology*, 67(5), 1011–1021. <https://doi.org/10.1111/ppa.12825>
- Šimončicová, J., Kaliňáková, B., Kováčik, D., Medvecká, V., Lakatoš, B., Kryštofová, S., Hoppanová, L., Palušková, V., Hudecová, D., Ďurina, P., Zahoranová, A. (2018). Cold plasma treatment triggers antioxidative defense system and induces changes in hyphal surface and subcellular structures of *Aspergillus flavus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(15), 6647–6658. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9118-y>

- Singh, Y., Nair, A. M., Verma, P. K. (2021). Surviving the odds: From perception to survival of fungal phytopathogens under host-generated oxidative burst. *Plant Communications*, 2(3), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100142>
- Siqueira, V. M., Lima, N. (2013). Biofilm formation by filamentous fungi recovered from a water system. *Journal of Mycology*, 2013, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/152941>
- Skryplonek, K. (2016). Zimna plazma, jako niekonwencjonalna metoda utrwalania żywności. *Inżynieria Przetwórstwa Spożywczego*, 4(20), 28–33. <https://doi.org/bwmeta1.element.ekon-element-000171462300>
- Sohail, M., Ahmad, A., Ahmed Khan, S. (2011). Production of cellulases from *Alternaria* sp. MS28 and their partial characterization. *Pakistan Journal of Botany*, 43(6), 3001–3006.
- Sreedevi, P. R., Suresh, K. (2023). Cold atmospheric plasma mediated cell membrane permeation and gene delivery-empirical interventions and pertinence. *Advances in Colloid and Interface Science*, 320, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.102989>
- Steel, C. C., Blackman, J. W., Schmidtke, L. M. (2013). Grapevine bunch rots: Impacts on wine composition, quality, and potential procedures for the removal of wine faults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(22), 5189–5206. <https://doi.org/10.1021/jf400641r>
- Steinberg, G., Gurr, S. J. (2020). Fungi, fungicide discovery and global food security. *Fungal Genetics and Biology*, 144, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103476>
- Stevanović, M., Popp, A., Bodirsky, B. L., Humpenöder, F., Müller, C., Weindl, I., Dietrich, J. P., Lotze-Campen, H., Kreidenweis, U., Rolinski, S., Biewald, A., Wang, X. (2017). Mitigation strategies for greenhouse gas emissions from agriculture and land-use change: Consequences for food prices. *Environmental Science and Technology*, 51(1), 365–374. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04291>
- Stępniewska-Jarosz, S., Kierzek, R., Wojczyńska, J., Sadowska, K., Tyrakowska, M., Łukaszewska-Skrzypniak, N., Rataj-Guranowska, M. (2017). Grzyby zasiedlające rośliny facelii błękitnej (*Phacelia tanacetifolia* Benth.) traktowane fungicydami. *Progress in Plant Protection*, 57(4), 239–244. <https://doi.org/10.14199/ppp-2017-036>
- Strom, N., Hu, W., Haarith, D., Chen, S., Bushley, K. (2020). Interactions between soil properties, fungal communities, the soybean cyst nematode, and crop yield under

continuous corn and soybean monoculture. *Applied Soil Ecology*, 147, 1–14.

<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103388>

Stryczewska, H. D. (2009). *Technologie plazmowe w energetyce i inżynierii środowiska*.

Wydawnictwo Politechniki Lubelskiej.

Subramoni, S., Suárez-Moreno, Z. R., Venturi, V. (2010). Lipases as pathogenicity factors of plant pathogens. W K. N. Timmis (Red.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid*

Microbiology (s. 3269–3277). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_248

Suchorzyńska, M., Misiewicz, A. (2009). Mikotoksynotwórcze grzyby fitopatogeniczne z rodzaju *Fusarium* i ich wykrywanie technikami PCR. *Postępy mikrobiologii*, 48(3), 221–230.

Šudoma, M., Pešťalová, N., Bílková, Z., Sedláček, P., Hofman, J. (2021). Ageing effect on conazole fungicide bioaccumulation in arable soils. *Chemosphere*, 262, 1–8.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127612>

Sun, P. P., Sun, Y., Wu, H., Zhu, W., Lopez, J. L., Liu, W., Zhang, J., Li, R., Fang, J. (2011).

Atmospheric pressure cold plasma as an antifungal therapy. *Applied Physics Letters*, 98(2),

1–3. <https://doi.org/10.1063/1.3530434>

Sun, Y., Wang, M., Li, Y., Gu, Z., Ling, N., Shen, Q., Guo, S. (2017). Wilted cucumber plants infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* do not suffer from water shortage.

Annals of Botany, 120(3), 427–436. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx065>

Szczawińska, M., Ignatowicz, S. (1998). Zastosowanie techniki radiacyjnej do poprawy jakości żywności i pasz. *Postępy Nauk Rolniczych*, 45(5), 67–86.

Świecimska, M., Tulik, M., Šerá, B., Golińska, P., Tomeková, J., Medvecká, V., Bujdáková, H.,

Oszako, T., Zahoranová, A., Šerý, M. (2020). Non-thermal plasma can be used in disinfection of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seeds infected with *Fusarium oxysporum*.

Forests, 11(8), 1–11. <https://doi.org/10.3390/f11080837>

Taheri, P. (2019). Disease resistance and virulence screen in *Solanum tuberosum*–*Alternaria tenuissima* interaction: the role of pathogenicity factors. *Euphytica*, 215(2), 1–10.

<https://doi.org/10.1007/s10681-019-2337-1>

- Tarazi, R., Jimenez, J. L. S., Vaslin, M. F. S. (2019). Biotechnological solutions for major cotton (*Gossypium hirsutum*) pathogens and pests. *Biotechnology Research and Innovation*, 3, 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2020.01.001>
- Ten Bosch, L., Pfohl, K., Avramidis, G., Wieneke, S., Viöl, W., Karlovsky, P. (2017). Plasma-based degradation of mycotoxins produced by *Fusarium*, *Aspergillus* and *Alternaria* species. *Toxins*, 9(3), 1–12. <https://doi.org/10.3390/toxins9030097>
- Thomma, B. P. H. J. (2003). *Alternaria* spp.: From general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4(4), 225–236. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00173.x>
- Thompson, R. J. (1943). The United Nations Conference on Food and Agriculture. *Journal of the Royal Statistical Society*, 106(3), 273–276. <https://doi.org/10.2307/2979969>
- Todorović, I., Moëgne-Loccoz, Y., Raičević, V., Jovičić-Petrović, J., Muller, D. (2023). Microbial diversity in soils suppressive to *Fusarium* diseases. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1–24. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1228749>
- Tyczkowska-Sieroń, E., Kałużewski, T., Grabiec, M., Kałużewski, B., Tyczkowski, J. (2020). Genotypic and phenotypic changes in *Candida albicans* as a result of cold plasma treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms21218100>
- United Nations. (2014). The Millennium Development Goals Report 2014. W *Un.Org*. <https://doi.org/https://doi.org/10.18356/bb4c0cc6-en>
- Ustawa z dnia 18 grudnia 2003 r. o ochronie roślin (Dz.U. z 2004 r. Nr 11, poz. 94, z późn. zm.).
- Valero-Jiménez, C. A., Veloso, J., Staats, M., Van Kan, J. A. L. (2019). Comparative genomics of plant pathogenic *Botrytis* species with distinct host specificity. *BMC Genomics*, 20(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5580-x>
- Vidal-Diez de Ulzurrun, G., Baetens, J. M., Van den Bulcke, J., De Baets, B. (2017). Modelling three-dimensional fungal growth in response to environmental stimuli. *Journal of Theoretical Biology*, 414, 35–49. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.11.020>
- Villa, F., Cappitelli, F., Cortesi, P., Kunova, A. (2017). Fungal biofilms: Targets for the development of novel strategies in plant disease management. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00654>

- Von Grebmer, K., Bernstein, J., Wiemers, M., Reiner, L., Bachmeier, M., Hanano, A., Towey, O., Chéilleachair, R. N., Foley, C., Gitter, S., Larocque, G., Fritschel, H. (2022). *Global hunger index: Food systems transformation and local governance*.
<https://www.globalhungerindex.org/pdf/en/2022.pdf>
- Wagacha, J. M., Muthomi, J. W. (2007). Fusarium culmorum: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protection*, 26(7), 877–885. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.09.003>
- Wang, Y., Li, B., Shang, H., Ma, R., Zhu, Y., Yang, X., Ju, S., Zhao, W., Sun, H., Zhuang, J., Jiao, Z. (2022). Effective inhibition of fungal growth, deoxynivalenol biosynthesis and pathogenicity in cereal pathogen Fusarium spp. by cold atmospheric plasma. *Chemical Engineering Journal*, 437, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.135307>
- Wenderoth, M., Garganese, F., Schmidt-Heydt, M., Soukup, S. T., Ippolito, A., Sanzani, S. M., Fischer, R. (2019). Alternariol as virulence and colonization factor of Alternaria alternata during plant infection. *Molecular Microbiology*, 112(1), 131–146.
<https://doi.org/10.1111/mmi.14258>
- Wesołowska-Trojanowska, M., Targoński, Z. (2015). Hemicelulazy – właściwości, otrzymywanie i zastosowanie. *Nauki Inżynierskie i Technologie*, 2(17), 79–94.
<https://doi.org/10.15611/nit.2015.2.07>
- Whitehead, K. A., Liauw, C. M., Lynch, S., El Mohtadi, M., Amin, M., Preuss, A., Deisenroth, T., Verran, J. (2021). Diverse surface properties reveal that substratum roughness affects fungal spore binding. *iScience*, 24(4), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102333>
- Willett, W., Rockström, J., Loken, B., Springmann, M., Lang, T., Vermeulen, S., Garnett, T., Tilman, D., DeClerck, F., Wood, A., Jonell, M., Clark, M., Gordon, L. J., Fanzo, J., Hawkes, C., Zurayk, R., Rivera, J. A., De Vries, W., Majele Sibanda, L., ... Murray, C. J. L. (2019). Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. *The Lancet*, 393(10170), 477–492. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31788-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31788-4)
- Williams, L. D., Glenn, A. E., Zimeri, A. M., Bacon, C. W., Smith, M. A., Riley, R. T. (2007). Fumonisin disruption of ceramide biosynthesis in maize roots and the effects on plant development and Fusarium verticillioides-induced seedling disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8), 2937–2946. <https://doi.org/10.1021/jf0635614>

- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Van Kan, J. A. L. (2007). Botrytis cinerea: The cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 561–580.
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>
- Wood, I. P., Elliston, A., Ryden, P., Bancroft, I., Roberts, I. N., Waldron, K. W. (2012). Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. *Biomass and Bioenergy*, 44, 117–121.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.05.003>
- Woudenberg, J. H. C., van der Merwe, N. A., Jurjević, T., Groenewald, J. Z., Crous, P. W. (2015). Diversity and movement of indoor *Alternaria alternata* across the mainland USA. *Fungal Genetics and Biology*, 81, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.05.003>
- Wu, F., Bhatnagar, D., Bui-Klimke, T., Carbone, I., Hellmich, R., Munkvold, G., Paul, P., Payne, G., Takle, E. (2010). Climate change impacts on mycotoxin risks in US maize. *World Mycotoxin Journal*, 4(1), 79–93. <https://doi.org/10.3920/WMJ2010.1246>
- Wu, Q., Wang, X., Nepovimova, E., Wang, Y., Yang, H., Li, L., Zhang, X., Kuca, K. (2017). Antioxidant agents against trichothecenes: New hints for oxidative stress treatment. *Oncotarget*, 8(66), 110708–110726. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22800>
- Wu, Y., Cheng, J. H., Sun, D. W. (2022). Subcellular damages of *Colletotrichum asianum* and inhibition of mango anthracnose by dielectric barrier discharge plasma. *Food Chemistry*, 381(132197), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132197>
- Wu, Y., Yu, S., Zhang, X., Wang, X., Zhang, J. (2023). The regulatory mechanism of cold plasma in relation to cell activity and its application in biomedical and animal husbandry practices. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 1–14.
<https://doi.org/10.3390/ijms24087160>
- Wunderlich, S. M., Martinez, N. M. (2018). Conserving natural resources through food loss reduction: Production and consumption stages of the food supply chain. *International Soil and Water Conservation Research*, 6(4), 331–339.
<https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2018.06.002>
- Xie, M., Koch, E. H. W., van Walree, C. A., Sobota, A., Sonnen, A. F. P., Breukink, E., Killian, J. A., Lorent, J. H. (2023). Two separate mechanisms are involved in membrane permeabilization during lipid oxidation. *Biophysical Journal*, 122(23), 4503–4517.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2023.10.028>

- Xu, D., Xue, M., Shen, Z., Jia, X., Hou, X., Lai, D., Zhou, L. (2021). Phytotoxic secondary metabolites from fungi. *Toxins*, 13(4), 1–65. <https://doi.org/10.3390/toxins13040261>
- Xue, C. Y., Zhou, R. J., Li, Y. J., Xiao, D., Fu, J. F. (2018). Cell-wall-degrading enzymes produced in vitro and in vivo by *Rhizoctonia solani*, the causative fungus of peanut sheath blight. *PeerJ*, 2018(9), 1–22. <https://doi.org/10.7717/peerj.5580>
- Yang, L. N., He, M. H., Ouyang, H. B., Zhu, W., Pan, Z. C., Sui, Q. J., Shang, L. P., Zhan, J. (2019). Cross-resistance of the pathogenic fungus *Alternaria alternata* to fungicides with different modes of action. *BMC Microbiology*, 19(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1574-8>
- Yang, L. N., Nkurikiyimfura, O., Pan, Z. C., Wang, Y. P., Waheed, A., Chen, R. S., Burdon, J. J., Sui, Q. J., Zhan, J. (2021). Plant diversity ameliorates the evolutionary development of fungicide resistance in an agricultural ecosystem. *Journal of Applied Ecology*, 58(11), 2566–2578. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13978>
- Yang, Q., Chen, Y., Ma, Z. (2013). Involvement of BcVeA and BcVelB in regulating conidiation, pigmentation and virulence in *Botrytis cinerea*. *Fungal Genetics and Biology*, 50(1), 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.10.003>
- Ye, S. ying, Song, X. liang, Liang, J. L., Zheng, S. hong, Lin, Y. (2012). Disinfection of airborne spores of *Penicillium expansum* in cold storage using continuous direct current corona discharge. *Biosystems Engineering*, 113(2), 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2012.06.013>
- Yu, N. N., Ketya, W., Choi, E. H., Park, G. (2022). Plasma promotes fungal cellulase production by regulating the levels of intracellular NO and Ca²⁺. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms23126668>
- Zhang, Z., Chen, Y., Li, B., Chen, T., Tian, S. (2020). Reactive oxygen species: A generalist in regulating development and pathogenicity of phytopathogenic fungi. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 3344–3349. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.10.024>
- Zhang, Z., Qin, G., Li, B., Tian, S. (2015). Effect of cinnamic acid for controlling gray mold on table grape and its possible mechanisms of action. *Current Microbiology*, 71(3), 396–402. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0863-1>

- Zhao, J., Kang, Z. (2023). Fighting wheat rusts in China: a look back and into the future. *Phytopathology Research*, 5(1), 1–30. <https://doi.org/10.1186/s42483-023-00159-z>
- Zhong, Z., McDonald, B. A., Palma-Guerrero, J. (2021). Tolerance to oxidative stress is associated with both oxidative stress response and inherent growth in a fungal wheat pathogen. *Genetics*, 217(2), 1–14. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/IYAA022>
- Zhou, D., Wang, Z., Tu, S., Chen, S., Peng, J., Tu, K. (2019). Effects of cold plasma, UV-C or aqueous ozone treatment on *Botrytis cinerea* and their potential application in preserving blueberry. *Journal of Applied Microbiology*, 127(1), 175–185. <https://doi.org/10.1111/jam.14280>
- Zhou, S., Bae, J. S., Bergstrom, G. C., Jander, G. (2018). *Fusarium graminearum*-induced shoot elongation and root reduction in maize seedlings correlate with later seedling blight severity. *Plant Direct*, 2(7), 1–8. <https://doi.org/10.1002/pld3.75>
- Zhou, X., Liu, J., Wu, F. (2017). Soil microbial communities in cucumber monoculture and rotation systems and their feedback effects on cucumber seedling growth. *Plant and Soil*, 415(1–2), 507–520. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3181-5>
- Ziv, C., Fallik, E. (2021). Postharvest storage techniques and quality evaluation of fruits and vegetables for reducing food loss. *Agronomy*, 11(6), 1–5. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061133>

7. Spis tabel, wykresów i rysunków

Tabele

Tabela 1. Skuteczność inaktywacji mikroorganizmów na powierzchni różnych materiałów za pomocą zimnej plazmy.	56
Tabela 2. Skład podłoży mikrobiologicznych oraz buforów wykorzystywanych w badaniach... 62	
Tabela 3. Badany zakres stężeń środków grzybobójczych względem grzybów fitopatogennych.	79
Tabela 4. Wizualna ocena (skala) objawów choroby grzybiczej owoców pomidora (<i>Solanum lycopersicum</i>) do oceny nasilenia infekcji, na podstawie (Brito i in., 2021).....	89
Tabela 5. Parametry kinetyczne modelu Weibulla wyznaczone dla grzybów fitopatogennych poddawanych działaniu plazmy niskotemperaturowej na powierzchni tektury i drewna. δ - dziesiętny czas redukcji, p - współczynniki kształtu krzywej przeżycia.	97
Tabela 6. Średnice kolonii grzybów nietraktowanych (P0) oraz po pięcio- (P5), dziesięcio- (P10) i piętnastokrotnym (P15) traktowaniu subletalną dawką plazmy nietermicznej po 3, 5, 7 i 14 dniach inkubacji na podłożu stałym. Średnie wartości średnic kolonii wraz z błędem standardowym dla czterech powtórzeń (n=4).	113
Tabela 7. Minimalne stężenie hamujące (MIC) i minimalne stężenie grzybobójcze (MFC) nadtlenu wodoru wobec grzybów fitopatogennych wielokrotnie traktowanych subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej (P5, P10, P15). Pierwotną wrażliwość na H ₂ O ₂ oceniono dla grzybnii nietraktowanej plazmą niskotemperaturową (P0).....	124
Tabela 8. Wartości MIC i MFC wybranych środków grzybobójczych względem grzybów fitopatogennych nietraktowanych plazmą (P0) oraz po pięcio- (P5), dziesięcio- (P10) i piętnastokrotnym (P15) traktowaniu subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej. Symbol \geq oznacza stężenie równe podanej wartości lub wyższe od oznaczanego zakresu stężeń, symbol \leq oznacza stężenie równe lub niższe od oznaczanego zakresu stężeń.	127
Tabela 9. Wartości MIC i MFC wybranych środków grzybobójczych względem grzybów fitopatogennych nietraktowanych plazmą (P0) oraz po pięcio- (P5), dziesięcio- (P10) i piętnastokrotnym (P15) traktowaniu subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej. Symbol \geq oznacza stężenie równe podanej wartości lub wyższe od oznaczanego zakresu stężeń, symbol \leq oznacza stężenie równe lub niższe od oznaczanego zakresu stężeń.	130

Tabela 10. Wpływ liczby ekspozycji fitopatogennych grzybów na plazmę na zmiany dziesiętnego czasu redukcji (δ) oraz współczynnika kształtu (p).	133
Tabela 11. Kiełkowanie nasion inkubowanych w filtratach po hodowli grzybów fitopatogennych wielokrotnie traktowanych plazmą (P5, P10, P15) lub nietraktowanych plazmą (P0) po 3 dniach trwania testu. Kontrolę stanowiły nasiona inkubowane w sterylnej pożywce hodowlanej.	150
Tabela 12. Wskaźnik wigoru masy siewek ogórka dla poszczególnych grup badawczych po 7 dniami trwania testu toksyczności filtratów otrzymanych z hodowli grzybów fitopatogennych nietraktowanych plazmą (P0) oraz wielokrotnie traktowanych plazmą nietermiczną (P5, P10, P15). Kontrolę (K) stanowiły siewki po inkubacji nasion w sterylnej pożywce hodowlanej.	151
Tabela 13. Masa roślin ogórka (mediana) w poszczególnych grupach badawczych po 7 dniach trwania testu toksyczności filtratów pochodzących. Liczba n odpowiada liczbie wykiełkowanych nasion. Te same litery przy dwóch wartościach oznaczają brak różnicy statystycznie istotnej pomiędzy porównywanymi grupami ($p < 0,05$).	153
Tabela 14. Wskaźniki kiełkowania nasion (po 3 dniach trwania testu) i żywotności siewek (po 7 i 14 dniach trwania testu) otrzymane po inkubacji nasion ogórka w zawieszynie grzybów fitopatogennych przez 1 h. Wyniki stanowią średnią wraz z odchyleniem standardowym dla dwóch powtórzeń ($n=2$) z trzydziestoma nasionami w każdym eksperymencie.	155
Tabela 15. Wskaźniki kiełkowania nasion (po 3 dniach trwania testu) i żywotności siewek (po 7 i 14 dniach trwania testu) otrzymane po inkubacji nasion ogórka w zawieszynie grzybów fitopatogennych przez 24 h. Wyniki stanowią średnią wraz z odchyleniem standardowym dla dwóch powtórzeń ($n=2$) z trzydziestoma nasionami w każdym eksperymencie.	158
Tabela 16. Wskaźnik nasilenia choroby owoców pomidora (DSI) po 7 dniach od inokulacji zawieszyną grzybów wielokrotnie traktowanych plazmą niskotemperaturową (P5, P10, P15) lub nietraktowanych plazmą (P0). Kontrolę stanowiły owoce nie inokulowane zawieszyną grzybni. Wyniki przedstawiają średnią z dwóch powtórzeń ($n=2$) dla trzech owoców w każdym powtórzeniu, wraz z odchyleniem standardowym.	162
Tabela 17. Wskaźnik wigoru masy siewek (SWVI) roślin uprawianych w glebie inokulowanej zawieszyną grzybów traktowanych plazmą niskotemperaturową (P5, P10, P15) oraz nietraktowanych plazmą (P0). Kontrolę (K) stanowiły rośliny uprawiane w glebie nie inokulowanej grzybnią.	163

Tabela 18. Świeża masa roślin ogórka (mediana) w poszczególnych grupach badawczych po 14 dniach uprawy w podłożu zanieczyszczonym zawiesiną grzybów fitopatogennych. Liczba n odpowiada liczbie wykiełkowanych nasion. Te same litery przy dwóch wartościach oznaczają brak statystycznie istotnej różnicy pomiędzy porównywanymi grupami ($p < 0,05$). 165

Tabela 19. Długości łodyg roślin ogórka (mediana) w poszczególnych grupach badawczych po 14 dniach uprawy w podłożu zanieczyszczonym zawiesiną grzybów fitopatogennych. Liczba n odpowiada liczbie wykiełkowanych nasion. Te same litery przy dwóch wartościach oznaczają brak statystycznie istotnej różnicy pomiędzy porównywanymi grupami ($p < 0,05$). 167

Tabela 20. Długości korzenia roślin ogórka w poszczególnych grupach badawczych po 14 dniach uprawy w podłożu zanieczyszczonym zawiesiną grzybów fitopatogennych. Liczba n odpowiada liczbie wykiełkowanych nasion. Te same litery przy dwóch wartościach oznaczają brak statystycznie istotnej różnicy pomiędzy porównywanymi grupami ($p < 0,05$). 169

Wykresy

Wykres 1. Zależność redukcji żywotnych komórek na powierzchni tektury (pomarańczowy) i drewna (niebieski) od długości czasu obróbki plazmą. Linie ciągłe wskazują na dopasowanie modelu Weibulla. Słupki błędów wskazują odchylenia standardowe dla 3 powtórzeń. 96

Wykres 2. Zależność redukcji liczby mikroorganizmów od czasu traktowania plazmą niskotemperaturową dla trzech powtórzeń. 98

Wykres 3. Stężenia pierwiastków w supernatantach uzyskanych po traktowaniu grzybni plazmą niskotemperaturową, wyrażone jako stosunek względem kontroli. Stężenie pierwiastków w kontroli przyjęto jako 100%. 102

Wykres 4. Stężenia białka (niebieskie znaczniki, lewa oś y) i dsDNA (pomarańczowe znaczniki, prawa oś y) uwolnionych z komórek grzybów w wyniku działania plazmy niskotemperaturowej. 103

Wykres 5. Sucha masa grzybów fitopatogennych przed (P0) oraz po wielokrotnej ekspozycji (P5, P10, P15) na subletalną dawkę plazmy niskotemperaturowej po 7 dniach hodowli na podłożu płynnym. Słupki przedstawiają średnie wartości suchej masy wraz z błędem standardowym dla dwóch powtórzeń ($n=2$). 119

Wykres 6. Poziom wewnątrzkomórkowego stresu oksydacyjnego u grzybów fitopatogennych po pięcio- (P5), dziesięcio- (P10) i piętnastokrotnej (P15) ekspozycji na subletalną dawkę plazmy niskotemperaturowej. Kontrolę stanowiła grzybnia nietraktowana plazmą (P0). Słupki błędów wskazują odchylenia standardowe dla 4 powtórzeń (n=4).....	122
Wykres 7. Zależność redukcji żywotnych komórek na powierzchni drewna od długości czasu obróbki plazmą dla grzybni P0 (niebieski), P5 (pomarańczowy), P10 (zielony) i P15 (czerwony). Linie ciągłe wskazują na dopasowanie modelu Weibulla. Słupki błędów wskazują odchylenia standardowe dla 3 powtórzeń.....	132
Wykres 8. Zdolności grzybów fitopatogennych poddawanych wielokrotnej ekspozycji na subletalną dawkę plazmy niskotemperaturowej do formowania biofilmu podczas 24 godzinnej inkubacji. Niebieskie słupki przedstawiają biomasę biofilmów (lewa oś y) na podstawie odczytu absorbancji fioletu krystalicznego (A_{570}), natomiast pomarańczowe punkty (prawa oś y) przedstawiają żywotność biofilmów określoną za pomocą testu MTT (A_{570}). Wyniki stanowią średnią z 4 powtórzeń wraz z odchyleniem standardowym (n=4).....	135
Wykres 9. Aktywność całkowita karboksymetylocelulazy (niebieskie słupki, lewa oś y) w filtratach po hodowli grzybów fitopatogennych traktowanych zimną plazmą wraz z suchą masą grzybni (pomarańczowe punkty, prawa oś y) po 10 dniach inkubacji na podłożu płynnym. Kontrolę stanowiła hodowla grzybów niepoddawanych działaniu plazmy (P0). Wyniki aktywności enzymatycznej stanowią średnią wraz z odchyleniem standardowym dla dwóch powtórzeń z dwoma pomiarami dla każdego (n=4). Wyniki suchej masy stanowią średnią wraz z odchyleniem standardowym dla dwóch powtórzeń (n=2).	138
Wykres 10. Aktywność całkowita ksylanaz (niebieskie słupki, lewa oś y) w filtratach po hodowli grzybów fitopatogennych traktowanych plazmą niskotemperaturową wraz z suchą masą grzybni (pomarańczowe punkty, prawa oś y) po 10 dniach inkubacji na podłożu płynnym. Kontrolę stanowiła hodowla grzybów nietraktowanych plazmą (P0). Wyniki aktywności enzymatycznej stanowią średnią wraz z odchyleniem standardowym dla dwóch powtórzeń z dwoma pomiarami dla każdego (n=4). Wyniki suchej masy stanowią średnią wraz z odchyleniem standardowym dla dwóch powtórzeń (n=2).	140
Wykres 11. Aktywność całkowita enzymów pektynolitycznych (niebieskie słupki, lewa oś y) w filtratach po hodowli grzybów fitopatogennych traktowanych subletalną dawką plazmy nietermicznej wraz z suchą masą grzybni (pomarańczowe punkty, prawa oś y) po 10 dniach inkubacji na podłożu płynnym. Kontrolę stanowiła hodowla grzybów niepoddawanych działaniu	

plazmy (P0). Wyniki aktywności enzymatycznej stanowią średnią wraz z odchyleniem standardowym dla dwóch powtórzeń z dwoma pomiarami dla każdego (n=4). Wyniki suchej masy stanowią średnią wraz z odchyleniem standardowym dla dwóch powtórzeń (n=2). 142

Wykres 12. Aktywność proteolityczna (niebieskie słupki, lewa oś y) filtratów po hodowli grzybów fitopatogennych poddawanych działaniu plazmy nietermicznej wraz z suchą masą grzybni (pomarańczowe punkty, prawa oś y) po 7 dniach hodowli na podłożu płynnym. Kontrolę stanowiła hodowla grzybów nietraktowanych plazmą (P0). Wyniki aktywności enzymatycznej stanowią średnią wraz z odchyleniem standardowym dla dwóch powtórzeń z dwoma pomiarami dla każdego (n=4). Wyniki suchej masy stanowią średnią wraz z odchyleniem standardowym dla dwóch powtórzeń (n=2). 144

Wykres 13. Aktywność lipolityczna (niebieskie słupki, lewa oś y) w filtratach po hodowli grzybów fitopatogennych poddawanych działaniu plazmy niskotemperaturowej (P1, P5, P10, P15) wraz z suchą masą grzybni (pomarańczowe punkty, prawa oś y) po 10 dniach hodowli na podłożu płynnym. Kontrolę stanowiła hodowla grzybów nietraktowanych plazmą (P0). Wyniki aktywności enzymatycznej stanowią średnią wraz z odchyleniem standardowym dla dwóch powtórzeń z dwoma pomiarami dla każdego (n=4). Wyniki suchej masy stanowią średnią wraz z odchyleniem standardowym dla dwóch powtórzeń (n=2). 146

Wykres 14. Świeża masa siewek ogórka po 7 dniach trwania testu toksyczności filtratów otrzymanych po hodowli grzybów fitopatogennych wielokrotnie traktowanych plazmą niskotemperaturową (P5, P10, P15) oraz nietraktowanych plazmą (P0). Kontrolę (K) stanowiły siewki po inkubacji nasion w sterylnej pożywce hodowlanej. Wewnętrzny kwadrat (ciemnoniebieski) przedstawia medianę, niebieski prostokąt- kwartył dolny i górny (25%-75%), linie poziome na zewnątrz prostokątów- najwyższy i najniższy wynik pomiaru (Min-Maks). . 152

Wykres 15. Świeża masa siewek ogórka po 14 dniach uprawy w glebie inokulowanej zawiesiną grzybów fitopatogennych wielokrotnie traktowanych plazmą niskotemperaturową (P5, P10, P15) oraz nietraktowanych plazmą (P0). Kontrolę (K) stanowiły siewki uprawiane w podłożu niezanieczyszczonym grzybnią. Wewnętrzne kwadraty dla *F. oxysporum* DSM 12646, *F. culmorum* DSM 1094, *F. tricinctum* Ft11S-23, *A. alternata* DSM 62010, *A. alternata* Aa10S-23 przedstawiają medianę, niebieskie prostokąty- kwartył dolny i górny (25%-75%), linie poziome na zewnątrz prostokątów- najwyższy i najniższy wynik pomiaru (Min-Maks). Dla *B. cinerea* DSM 877 wewnętrzne kwadraty przedstawiają średnią świeżą masę roślin ogórka, niebieskie

prostokąty- odchylenie standardowe, linie poziome na zewnątrz prostokątów- najwyższy i najniższy wynik pomiaru (Min-Maks). 164

Wykres 16. Długości łodygi siewek ogórka po 14 dniach uprawy w glebie inokulowanej zawiesiną grzybów fitopatogennych wielokrotnie traktowanych plazmą niskotemperaturową (P5, P10, P15) oraz nietraktowanych plazmą (P0). Kontrolę (K) stanowiły siewki uprawiane w podłożu niezanieczyszczonym grzybnią. Wewnętrzne kwadraty przedstawiają medianę, niebieskie prostokąty- kwartył dolny i górny (25%-75%), linie poziome na zewnątrz prostokątów- najwyższy i najniższy wynik pomiaru (Min-Maks). 166

Wykres 17. Długości korzeni siewek ogórka po 14 dniach uprawy w glebie inokulowanej zawiesiną grzybów fitopatogennych wielokrotnie traktowanych plazmą niskotemperaturową (P5, P10, P15) oraz nietraktowanych plazmą (P0). Kontrolę (K) stanowiły siewki uprawiane w podłożu niezanieczyszczonym grzybnią. Wewnętrzne kwadraty przedstawiają medianę, niebieskie prostokąty- kwartył dolny i górny (25%-75%), linie poziome na zewnątrz prostokątów- najwyższy i najniższy wynik pomiaru (Min-Maks). Wyniki dla *A. alternata* Aa10S-23 stanowią średnią (znacznik) wraz z odchyleniem standardowym (ramka) oraz najwyższą i najniższą wartością świeżej masy roślin ogórka (wąsy). 168

Rysunki

Rysunek 1. Udział strat żywności (wyrażony jako procent utraconych kalorii) na poszczególnych etapach łańcucha dostaw żywności w krajach rozwiniętych (niebieskie słupki) i rozwijających się (zielone słupki) Opracowanie własne na podstawie (Gustavsson i in., 2011; Nicastro i Carillo, 2021; Prusky, 2011). 21

Rysunek 2. Objawy **a** - zarazy ryżu (zaczepnięto z Galhano i Talbot, 2011, za zgodą Elsevier); **b** - rdzy żdźbłowej pszenicy (zaczepnięto z Zhao i Kang, 2023, publikacja w otwartym systemie dostępu); **c** - głowni guzowatej kukurydzy (zaczepnięto z Djamei i Kahmann, 2012, publikacja w otwartym systemie dostępu); **d** - rdzy soi (zaczepnięto z Kelly i in., 2015; publikacja w otwartym systemie dostępu). 24

Rysunek 3. Objawy szarej pleśni po trzech tygodniach przechowywania w temperaturze 7°C (zaczepnięto z Krasnow i Ziv, 2022, publikacja w otwartym systemie dostępu). 26

Rysunek 4. Struktury chemiczne wybranych mikotoksyn. Opracowanie własne na podstawie (Bano i in., 2023; Ten Bosch i in., 2017). 28

Rysunek 5. Schemat infekcji roślin przez grzyby fitopatogenne na przykładzie <i>Fusarium</i> sp. i pszenicy. Gleba i resztki poźniwne stanowią rezerwuuar inokulum. Zarodniki przenoszone są przez wiatr, wodę lub wektory owadów na powierzchnię rośliny, gdzie następuje kolonizacja, wzrost i reprodukcja patogenu (infekcja pierwotna) lub z wcześniej zainfekowanych części roślinnych (infekcja wtórna). Zarodniki i grzybnia mogą przetrwać w glebie do następnego sezonu, by rozpocząć kolejny cykl życiowy. Opracowanie własne na podstawie (Moonjely i in., 2023; Todorović i in., 2023). Utworzono za pomocą BioRender.com.	29
Rysunek 6. Strategie kolonizacji roślin przez grzyby fitopatogenne. Opracowanie własne na podstawie (Pradhan i in., 2021). Utworzono za pomocą BioRender.com	31
Rysunek 7. a - Objawy fuzariozy w owocu pomidora (zaczepnięto z Jeewon i in., 2024, publikacja w otwartym systemie dostępu); b - Struktura chemiczna deoksyniwalenolu (opracowanie własne na podstawie Wu i in., 2017).	37
Rysunek 8. a - Objawy zakażenia <i>B. cinerea</i> w truskawce (zaczepnięto z Petrasch, Knapp, i in., 2019, publikacja w otwartym systemie dostępu); b - Struktura chemiczna botrydialu (opracowanie własne na podstawie Huang i in., 2021).....	40
Rysunek 9. a - Objawy brązowej plamistości na liściach ziemniaka (zaczepnięto z Park i in., 2024 publikacja w otwartym systemie dostępu); b - struktura chemiczna alternariolu (opracowanie własne na podstawie Saha i in., 2012).	42
Rysunek 10. Opracowanie własne na podstawie (Hojnik i in., 2019). Utworzono za pomocą BioRender.com	51
Rysunek 11. Mechanizm działania składników plazmy niskotemperaturowej na komórki grzybów strzępkowych. a - stres oksydacyjny wywołany przez reaktywne formy tlenu (RFT) i azotu (RFA), b - elektroporacja błony wskutek nagromadzenia jonów, elektronów i rodników, c - uszkodzenia wywołanie promieniowaniem UV. Opracowanie własne na podstawie (Ehlbeck i in., 2011; Hoppanová i Kryštofová, 2022). Utworzono za pomocą BioRender.com	53
Rysunek 12. Schemat reaktora plazmowego DBD, wykorzystywanego w badaniach: a - obudowa izolacyjna, b - szczelina wyładowcza, c - dielektryk, d - elektrody, e - próbka, f - zasilacz. Opracowanie własne.....	65
Rysunek 13. Schemat procedury wielokrotnego traktowania komórek grzybów fitopatogennych subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej (zaczepnięto z Nowinski i in., 2024, publikacja w otwartym systemie dostępu). Opis poszczególnych etapów umieszczono w tekście.	74

Rysunek 14. Kolonie grzybów wyizolowanych ze środowiska po 11 dniach inkubacji na podłożu PDA.....	95
Rysunek 15. Barwienie fluorescencyjne grzybni szczepów kolekcyjnych przed (P0) i po (P1) traktowaniu subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej. Powiększenie całkowite 200×....	100
Rysunek 16. Kolonie grzybów <i>F. oxysporum</i> DSM 12646 nietraktowanych plazmą (P0) oraz po wielokrotnym traktowaniu plazmą (P5, P10, P15) podczas hodowli na podłożu stałym. Górna połowa szalki- widok z góry (awers), dolna połowa szalki- widok od spodu (rewers). Zdjęcia wykonano po 3, 5, 7 i 14 dniach inkubacji.....	106
Rysunek 17. Kolonie grzybów <i>F. culmorum</i> DSM 1094 nietraktowanych plazmą (P0) oraz po wielokrotnym traktowaniu plazmą (P5, P10, P15) podczas hodowli na podłożu stałym. Górna połowa szalki- widok z góry (awers), dolna połowa szalki- widok od spodu (rewers). Zdjęcia wykonano po 3, 5, 7 i 14 dniach inkubacji.....	107
Rysunek 18. Kolonie grzybów <i>F. tricinctum</i> Ft11S-23 nietraktowanych plazmą (P0) oraz po wielokrotnym traktowaniu plazmą (P5, P10, P15) podczas hodowli na podłożu stałym. Górna połowa szalki- widok z góry (awers), dolna połowa szalki- widok od spodu (rewers). Zdjęcia wykonano po 3, 5, 7 i 14 dniach inkubacji.....	108
Rysunek 19. Kolonie grzybów <i>B. cinerea</i> DSM 877 nietraktowanych plazmą (P0) oraz po wielokrotnym traktowaniu plazmą (P5, P10, P15) podczas hodowli na podłożu stałym. Górna połowa szalki- widok z góry (awers), dolna połowa szalki- widok od spodu (rewers). Zdjęcia wykonano po 3, 5, 7 i 14 dniach inkubacji.....	109
Rysunek 20. Kolonie grzybów <i>A. alternata</i> DSM 62010 nietraktowanych plazmą (P0) oraz po wielokrotnym traktowaniu plazmą (P5, P10, P15) podczas hodowli na podłożu stałym. Górna połowa szalki- widok z góry (awers), dolna połowa szalki- widok od spodu (rewers). Zdjęcia wykonano po 3, 5, 7 i 14 dniach inkubacji.....	110
Rysunek 21. Kolonie grzybów <i>A. alternata</i> Aa10S-23 nietraktowanych plazmą (P0) oraz po wielokrotnym traktowaniu plazmą (P5, P10, P15) w czasie hodowli na podłożu stałym. Górna połowa szalki- widok z góry (awers), dolna połowa szalki- widok od spodu (rewers). Zdjęcia wykonano po 3, 5, 7 i 14 dniach inkubacji.....	111
Rysunek 22. Zdjęcia mikroskopowe grzybni nietraktowanej plazmą niskotemperaturową (P0) oraz po pięcio- (P5), dziesięcio- (P10) i piętnastokrotnym (P15) traktowaniu subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej. Powiększenie całkowite 400×, pasek skali = 100 μm.	116

Rysunek 23. Obrazowanie SEM grzybni nietraktowanej plazmą niskotemperaturową (P0) oraz po pięcio- (P5), dziesięcio- (P10) i piętnastokrotnym (P15) taktowaniu subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej. Zaczepnięto z Nowinski i in. (2024), publikacja w otwartym systemie dostępu.	117
Rysunek 24. Siewki ogórka po 7 dniach trwania testu toksyczności filtratów po hodowli grzybów fitopatogennych nietraktowanych plazmą (P0) oraz wielokrotnie traktowanych plazmą niskotemperaturową (P5, P10, P15). Kontrolę (K) stanowiły siewki po inkubacji nasion w sterylnej pożywce hodowlanej.	149
Rysunek 25. Owoce pomidora po 7 dniach po inokulacji zawiesiną grzybów fitopatogennych nietraktowanych plazmą (P0) oraz po wielokrotnym traktowaniu plazmą (P5, P10, P15). Kontrolę (K) stanowiły owoce nie inokulowane zawiesiną grzybów.....	161

8. Dorobek naukowy autora

Publikacje:

1. Grzegorz K. Izydorczyk, Dawid S. Skrzypczak, **Daria Kocek**, Małgorzata M. Mironiuk, Anna Witek-Krowiak, Konstantinos Moustakas, Katarzyna Chojnacka, Valorization of bio-based post-extraction residues of goldenrod and alfalfa as energy pellets. *Energy*. 2020, vol. 194, art. 116898, s. 1-47.
IF 7,147; punktacja MNiSzW 200
2. Grzegorz K. Izydorczyk, Urszula Sienkiewicz-Cholewa, Sylwia B. Baśladyńska, **Daria Kocek**, Małgorzata M. Mironiuk, Katarzyna Chojnacka, New environmentally friendly bio-based micronutrient fertilizer by biosorption: from laboratory studies to the field. *Science of the Total Environment*. 2020, vol. 710, art. 136061, s. 1-50.
IF 7,963; punktacja MNiSzW 200
3. Irena Maliszewska, **Daria Kocek**, Ewelina Wanarska, Microbial synthesis of unique nanoscale minerals - challenges and prospects. *Physicochemical Problems of Mineral Processing*. 2020, vol. 56, nr 6, s. 244-256.
IF 1,213; punktacja MNiSzW 70
4. Grzegorz K. Izydorczyk, Małgorzata M. Mironiuk, Sylwia B. Baśladyńska, **Daria Kocek**, Anna Witek-Krowiak, Katarzyna Chojnacka, Quality of tap water in an urban agglomeration: 2-years' monitoring study in Wrocław, Poland. *Urban Water Journal*. 2022, vol. 19, nr 3, s. 285-298.
IF 2,7; punktacja MNiSzW 100
5. Dawid Kramski, **Daria K. Nowinski**, Kaja Kowalczyk, Piotr Kruszyński, Jagoda Radzimska, Beata Greb-Markiewicz, *Beauveria bassiana* water extracts' effect on the growth of wheat. *Plants*. 2023, vol. 12, nr 2, art. 326, s. 1-14.
IF 4,5; punktacja MNiSzW 70
6. Irena Maliszewska, Małgorzata Gazińska, Maciej Łojkowski, Emilia Choińska, **Daria K. Nowinski**, Tomasz Czapka, Wojciech Świąszkowski, On the effect of non-thermal atmospheric pressure plasma treatment on the properties of PET film. *Polymers*. 2023, vol. 15, nr 21, art. 4289, s. 1-19.
IF 5,0; punktacja MNiSzW 100
7. **Daria K. Nowinski**, Tomasz Czapka, Irena Maliszewska, Effect of multiple nonthermal plasma treatments of filamentous fungi on cellular phenotypic changes and

phytopathogenicity. *International Journal of Food Microbiology*. 2024, vol. 408, art. 110428, s. 1-15.

IF 5,4; punktacja MNiSzW 100

8. Irena Maliszewska, **Daria K. Nowinski**, Jiří Fujera, Garima Arora, Milan Šimek, Tomasz Czapka, The efficacy of non-equilibrium dielectric barrier discharge in air on the elimination of phytopathogenic fungi from wooden surface. *Food Control*. 2024, vol. 162, art. 110438, s.1-13. IF 6,0; punktacja MNiSzW 140

Udział w konferencjach:

1. **Daria Nowinski**, Irena Maliszewska, Tomasz Czapka. Tytuł posteru: The effect of low-temperature plasma on phytopathogenic fungi. *Phobia Annual Nanophotonics International Conference 2021*. Wrocław, 26.05.2021.
2. **Daria Nowinski**, Irena Maliszewska, Tomasz Czapka. Tytuł posteru: The effect of cold plasma on phytopathogenic fungi. *Chemistry & Biotechnology International Conference*. Wrocław, 24-25.06.2021.
3. **Daria Nowinski**, Irena Maliszewska, Tomasz Czapka. Tytuł posteru: Wpływ zimnej plazmy na biofilm bakterii patogennych. *VI Pomorskie Spotkania z Mikrobiologią*. Gdańsk, 24-25.06.2021.
4. **Daria Nowinski**, Irena Maliszewska, Tomasz Czapka. Tytuł posteru: Cold plasma as a potential method to manage the spread of post-harvest diseases caused by fungal plant pathogens. *International Science Conference "agroBiotechnology For BetterFuture – Fungi and Plants"*. Wrocław, 12.03.2022.
5. **Daria Nowinski**, Irena Maliszewska. Effect of repeated non-thermal plasma treatment on virulence characteristics of phytopathogenic fungi. *Interdisciplinary Doctoral Symposium*. Przesieka, 12-14.05.2023.
6. **Daria Nowinski**, Irena Maliszewska. Low-temperature plasma as an alternative to other sterilization methods. *Chemistry & Biotechnology International Conference*. Wrocław, 22-23.06.2023.