Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Nauk Technicznych

Rozprawa doktorska

System techniczny do różnicowania aktywności biologicznej substancji organicznej polem elektromagnetycznym

mgr inż. Ernest Popardowski

Promotor:

dr hab. inż. Paweł Kiełbasa, prof. URK

Olsztyn 2022

Spis treści

Wykaz ważniejszych oznaczeń 3
1. Wstęp 5
1.1. Wprowadzenie 5
1.2. Przegląd literatury 9
1.3. Cel i zakres pracy 21
2. Metodyka 23
2.1. Charakterystyka materiału badawczego i przebieg doświadczeń 23
2.2. Analiza generowanej energii cieplnej 28
2.3. Pomiar emisji fotonowej 29
2.3.1 Niepewność pomiarowa 31
2.4. Badania mikrobiologiczne 32
2.5. Analizy melisopalinologiczne 36
2.6. Analizy statystyczne 37
3. Opis systemu technicznego 39
3.1. Etap I 39
3.2. Etap II 43
3.3. Etap III 53
4. Wyniki badań 63
4.1. Wybór materiału badawczego do dalszych analiz 63
4.2. Stymulacja materiału polem o stałej indukcji magnetycznej i stałym czasie trwania oddziaływania, ze skokowymi zmianami częstotliwości 64
4.3. Stymulacja materiału polem o zmiennej indukcji magnetycznej i zmiennym czasie trwania oddziaływania oraz skokowymi zmianami częstotliwości 70
4.4. Stymulacja materiału ze zmianą częstotliwości w trakcie trwania oddziaływania 79
5. Dyskusja wyników 82
6. Wnioski 84
7. Literatura 86
8. Spis rysunków 102
9. Spis tabel 106
10. Aneks 107

Wykaz ważniejszych oznaczeń

B – indukcja magnetyczna

d – wskaźnik rozcieńczenia odpowiadający pierwszemu liczonemu rozcieńczeniu

D_e – dawka ekspozycyjna

E – emisja fotonowa

f – częstotliwość pola elektromagnetycznego

F – wartość statystyki testowej testu Fishera

I – natężenie prądu elektrycznego

I_{sk} – wartość skuteczna prądu elektrycznego

L – indukcyjność cewki

L_A – liczba impulsów emitowana przez próbkę umieszczona w komorze światłoszczelnej

L_b – ogólna liczba bakterii

L_P – liczba impulsów emitowana przez pustą komorę światłoszczelną

m – liczba wykonanych serii pomiarowych

n_j – wartość kolejnych powtórzeń w serii pomiarowej

n_o – średnia liczność serii pomiarowej

p – wartość prawdopodobieństwa testowego

Q – ilość wydzielonego ciepła

R – opór elektryczny przewodnika

s_l – odchylenie standardowe międzygrupowe

s_r – odchylenie standardowe powtarzalności

$s_{śr}$ – odchylenie standardowe średnich

t – czas stymulacji

t_e – czas ekspozycji

t_p – czas przepływu prądu

$t_{(\alpha,f)}$ – wartość z rozkładu t-Studenta dla liczby stopni swobody f = n-1 i poziomu istotności 95%

T – okres

U – napięcie prądu elektrycznego

U_{sk} – napięcie skuteczne prądu elektrycznego

V – objętość inokulum naniesionego na płytkę Petriego

$x_{śr}$ – wartość średnia uzyskanych wyników

X – opór indukcyjny (reaktancja)

Z – moduł impedancji (zawada)

ω – pulsacja prądu przemiennego

θ – faza ruchu drgającego

$\sum C$ – suma kolonii na dwóch wybranych, liczonych płytkach z dwóch kolejnych rozcieńczeń, z których co najmniej jedna zawiera minimum 10 kolonii

$cos\varphi$ – kąt przesunięcia fazowego pomiędzy napięciem, a prądem

1. Wstęp

1.1. Wprowadzenie

Wpływ pola magnetycznego (a następnie elektromagnetycznego) na struktury biologiczne to zjawisko będące w obrębie zainteresowań badaczy już od drugiej połowy XIX wieku. Pierwsze udokumentowane badania pochodzą z 1876 roku (Reinke 1876). W wyniku przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że pole magnetyczne nie ma wpływu na kiełkowanie nasion czy rozwój rośliny, jednak niespełna 20 lat później, w roku 1893 (Tolomei 1893) uzyskano zupełnie odmienne wyniki, w postaci efektu przyspieszonego kiełkowania materiału roślinnego przebywającego w polu magnetycznym. Tym samym, praca Tolomei stała się pierwszym udokumentowanym aktem występowania magnetotropizmu, tj. ruchu lub wzrostu rośliny w odpowiedzi na bodziec wytwarzany poprzez występowanie pola magnetycznego (Maffei 2014). W Polsce, pierwsze prace dotyczące wpływu pola magnetycznego na organizmy żywe pojawiły się w połowie lat 80 XX wieku (Kopeć 1984; 1985). Dotyczyły oddziaływania polem magnetycznym na nasiona buraka cukrowego. Uzyskane wówczas wyniki były niejednoznaczne. Stwierdzono zarówno dodatni wpływ (szybsze kiełkowanie i niewielki wzrost plonów), jak również brak efektów, w odniesieniu do nasion niestymulowanych przedsiewnie. Prace nad wykorzystaniem pola magnetycznego prowadzone są niezmiennie do dziś (Jin i in. 2019; Tan i in. 2020; Ferrada i in. 2020; Lu i in. 2020), jednak równolegle do nich powstają prace, w których wykorzystuje się pole elektromagnetyczne.

Powiązanie magnetyzmu z elektrycznością nastąpiło już w 1820 roku, za sprawą duńskiego badacza Hansa Christiana Ørsted'a. Odkrył on zjawisko elektromagnetyzmu, formułując następnie prawo, zgodnie z którym wokół przewodnika, przez który przepływa prąd elektryczny, indukowane jest wirowe pole magnetyczne (Ørsted 1820). Odkrycie Duńczyka zostało rozwinięte i uzupełnione dzięki licznym pracom Faradaya (Sanghera 2007). Skonstruował on pierwszy elektromagnes, odkrywając tym samym zjawisko indukcji elektromagnetycznej. Przy użyciu zbudowanego przez siebie urządzenia poddawał on badaniu liczne substancje, takie jak: woda, alkohol, chleb czy mięso. Doświadczenia te pozwoliły na zaobserwowanie w 1845 roku zjawiska nazwanego później diamagnetyzmem, czyli indukowanie w ciele znajdującym się w zewnętrznym polu magnetycznym, pola przeciwnego, osłabiającego działanie zewnętrznego pola (Wróblewski 2006). Precyzując, na elektrony będące w ruchu wokół

jądra zaczyna oddziaływać siła Lorentza, działająca zawsze na poruszające się w polu magnetycznym cząstki obdarzone ładunkiem elektrycznym. Siła ta deformuje orbity elektronów, co jest powodem powstania elementarnego momentu magnetycznego każdego atomu. Momenty atomów sumują się, dając wypadkowy moment magnetyczny dla całego ciała. W ten sposób powstaje pole magnetyczne, odpychające w stosunku do pola wywołującego cały efekt (Ples 2014).

W roku 1901 odnotowano pierwszą pracę dotyczącą oddziaływania polem elektromagnetycznym (a nie jak do tej pory, magnetycznym), która jednak została opublikowana dopiero 70 lat później (Danilewski 1901). Autor (rosyjski fizjolog) przedstawił w niej teoretyczne oraz eksperymentalne badania nad stymulacją polem elektromagnetycznym różnych struktur biologicznych – od komórek, do całych organizmów. W tym miejscu należy zwrócić uwagę na brak systematyzacji nazewnictwa w kolejnych pracach, tworzonych na całym świecie przez dziesiątki lat. Drozd i in. (2018) zaproponowali podział, zgodnie z którym pola magnetyczne można sklasyfikować według dwóch głównych typów: pole magnetyczne prądu stałego (DCMF ang. direct current magnetic field) i pole magnetyczne prądu przemiennego (ACMF ang. alternating current magnetic field). DCMF nie zmienia się z upływem czasu lub zmienia się bardzo powoli. Takie pola nie mają częstotliwości, tj. wektor pola magnetycznego jest stały w czasie i przestrzeni. Przykładem pola magnetycznego prądu stałego jest statyczne pole magnetyczne (SMF ang. static magnetic field). W przeciwieństwie do DCMF, pole magnetyczne prądu przemiennego zmienia się wraz z częstotliwością. Przykładem tego typu pola jest pulsujące pole magnetyczne (PMF ang. pulsed magnetic field) charakteryzujące się zewnętrznym wektorem pola magnetycznego, który zmienia się w czasie jak fala sinusoidalna, w każdym punkcie przestrzeni. Wektor tego typu pola pulsuje z częstotliwością prądu przepływającego przez cewkę. Alternatywnie, superpozycja trzech faz PMF poza fazą 120° przyczynia się do obracania pola magnetycznego (RMF ang. rotating magnetic field). To pole ma stałą intensywność w czasie, podczas gdy zmienia kierunek w sposób ciągły w dowolnym punkcie domeny (RMF jest zmienna w przestrzeni). Takie pole powstaje na przykład w uzwojeniu stojana i wirnika w wyniku zasilania uzwojeń, co umożliwia obrót wirnika silnika.

Początkowo możliwości techniczne wymuszały na badaczach stosowanie magnesów sztabkowych, generujących stałe pole magnetyczne. Wraz z postępem nauki zaczęto podejmować próby stosowania zmiennego pola magnetycznego, którego źródłem były

magnesy sztabkowe celowo wprowadzane w ruch obrotowy (Tessaro, Murugan i Persinger 2015; Hossack, Persinger i Dotta 2019) lub elektromagnesy czy cewki wykorzystujące zmiany częstotliwości przepływającego prądu elektrycznego (Jinapang i in. 2010; Vian i in. 2016; Mildažienė i in. 2019).

Zgodnie z zależnością odkrytą w 1831 roku przez fizyka Michaela Faradaya (Sanghera 2007), zmieniające się pole elektryczne wytwarza pole magnetyczne, a zmieniające się pole magnetyczne wytwarza pole elektryczne. Mimo to jednak, przyjęło się stosowanie nazewnictwa, zgodnie z którym zastosowanie czynnika w postaci prądu przemiennego rozumiane jest jako stosowanie pole elektromagnetycznego, a użycie magnesów – pola magnetycznego (nomenklatura ta została przyjęta w niniejszej pracy). Tym samym wyklucza się niejako składową elektryczną, która występuje jako efekt zmian pola magnetycznego (Roth, Cohen i Hallett 1991). Tymczasem istnieje wiele prac, szczególnie z okresu XX wieku, ale również współczesnych, w których pod pojęciem pola magnetycznego rozumiano zastosowanie zmiennego pola elektromagnetycznego. Chen i in. (2016) opisali budowę stanowiska, w którym (jak określają autorzy) zastosowano silne statyczne pole magnetyczne, wytworzone przez magnes nadprzewodzący. Próbki stymulowane przy użyciu tego urządzenia mają znajdować się na platformie wprowadzanej w ruch obrotowy względem umieszczonego stacjonarnie magnesu. Wyklucza to zatem stateczność pola. Dodatkowo magnes nadprzewodzący to elektromagnes, najczęściej występujący w formie cewki, co z kolei zgodnie z wcześniej opisanym założeniem powoduje generowanie pola elektromagnetycznego, a nie magnetycznego. Podobny brak precyzji w określeniu rodzaju stymulacji występuje w niektórych polskich pracach (Rakoczy, Konopacki i Fijałkowski 2016; Junka i in. 2018). Do dziś można spotkać również publikacje (Asadi Samani, Pourakbar i Azimi 2013) zawierające wyniki badań, dla których co prawda określono parametry pola, ale nie opisano w żaden sposób jak dane pole zostało wygenerowane. Tym samym nie można jednoznacznie stwierdzić, czy autorzy zastosowali pole magnetyczne czy też elektromagnetyczne. Stwarza to trudności w interpretacji uzyskanych w ten sposób wyników, a jak wskazują Pietruszewski i Martínez (2015) o efektach stymulacji magnetycznej decyduje charakter pola magnetycznego.

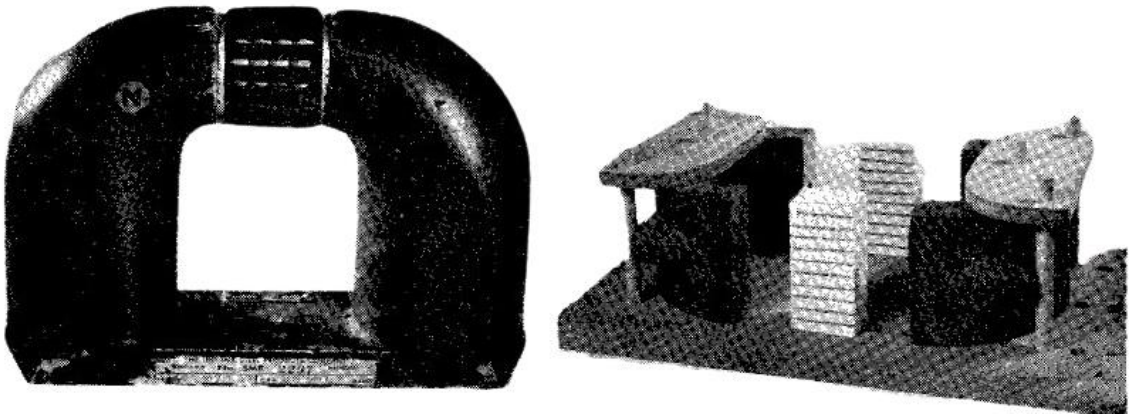
Obok określenia rodzaju stymulacji (magnetyczna lub elektromagnetyczna) równie istotne wydaje się sprecyzowanie parametrów tego procesu. Czas oddziaływania, i generowana indukcja magnetyczna to podstawowe zmienne opisywane przez licznych

autorów publikacji. W przypadku pola elektromagnetycznego równie istotna wydaje się częstotliwość prądu zasilającego, jednak parametr ten podawany jest jedynie w sytuacji, gdy jego wartość odbiega od powszechnie stosowanych w sieciach elektroenergetycznych 50 lub 60 Hz. Jeśli efekt wywołany stymulacją materiału biologicznego przez pole elektromagnetyczne ulega zmianie wraz z płynnymi lub skokowymi zmianami indukcji i czasu, to można domniemywać, że również trzecia zmienna w postaci częstotliwości będzie powodowała modyfikację właściwości badanego materiału. W tym przypadku brak jest badań, które pozwoliły na potwierdzenie lub odrzucenie tej hipotezy. Ponadto, warto zauważyć, że w trakcie stymulacji na materiał działa nie tylko samo pole elektromagnetyczne, ale również szereg innych czynników, których wyeliminowanie może okazać się konieczne do precyzyjnego określenia, jakie zjawisko odpowiada za zmiany generowane w materiale badawczym. Kobayashi i in. (2004) oraz Luo i in. (2019) zwracają uwagę na fakt, że przy stymulacji materiału polem elektromagnetycznym należy wziąć również pod uwagę występowanie pola geomagnetycznego. Aspekt ten można pominąć poprzez zastosowanie próby kontrolnej, tj. próbki poddanej działaniu pola geomagnetycznego, ale nie eksponowanej na działanie dodatkowego czynnika, na przykład w postaci ACMF (ang. alternating current magnetic field). Innym parametrem, szczególnie istotnym w odniesieniu do materiału biologicznego, jest temperatura bezpośredniego otoczenia, a w konsekwencji samej próbki. Pominięcie tej składowej może doprowadzić do błędnego wnioskowania, gdyż zaobserwowane modyfikacje mierzonych parametrów mogą zostać wywołane zmianami temperatury, w tym również denaturacją termiczną białek, a nie działaniem przedmiotowego zjawiska. Również w tym przypadku brak jest publikacji, które uwzględniałyby zmienną temperaturową. Wybrani autorzy (Grehl i in. 2016; Kennedy i in. 2018; Lin i in. 2019) monitorują warunki środowiskowe, jednakże pomiary te odnoszą się do otoczenia, a nie samego materiału. Co więcej, nie próbują tej temperatury ustabilizować, a tym samym wyeliminować potencjalnych zmian właściwości badanego obiektu, które może ona powodować.

Choć jak wskazano powyżej, badania nad wpływem pola magnetycznego i elektromagnetycznego na materiał biologiczny trwają od blisko 150 lat, to jednak wciąż występują istotne braki wiedzy w tym zakresie, które wymagają wyjaśnienia.

1.2. Przegląd literatury

Pierwsze prace badawcze nad wpływem pola magnetycznego i elektromagnetycznego na struktury biologiczne były prowadzone przy użyciu stanowisk bazujących na magnesach trwałych. Stanowisko tego typu przedstawia ilustracja z 1967 roku (rys.1) (Pittman 1967). Zastosowane rozwiązanie polegało na wykorzystaniu (jak zaznacza autor) niejednorodnego pola magnetycznego indukowanego pomiędzy dwoma magnesami podkowiastymi o przeciwnych biegunach, między którymi umieszczano stymulowany materiał.



Rys. 1. Stanowisko do stymulacji materiału biologicznego stałym polem magnetycznym
Źródło: Pittman 1967

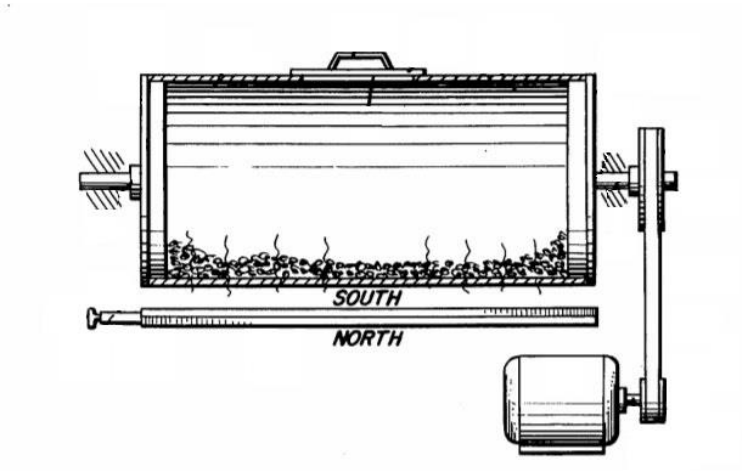
Autor przedstawionego stanowiska posłużył się plastikowymi blokami, w których wykonano porzeczne szczeliny, służące do umieszczania w ich wnętrzu ziaren roślin. Dzięki zastosowaniu regulacji odległości pomiędzy magnesami (w płaszczyźnie horyzontalnej) w swoich pracach (Pittman 1967; Pittman i Ormrod 1970) uzyskiwał odmienne parametry pola magnetycznego z zakresu od 0,5 do 1850 Oe (od 0,05 do 185 mT). Jednocześnie, wykorzystując swoje stanowisko wykazał, że sadzonki pszenicy ozimej stymulowane polem magnetycznym charakteryzują się szybszym tempem wzrostu w porównaniu z sadzonkami niestymulowanymi, szczególnie w zakresie indukcji z przedziału 0,5-100 Oe (0,05-10 mT). Ponadto, zaobserwował, że badane ziarniaki mają odmienny współczynnik oddychania, tj. po stymulacji oddychają wolniej (różnica na poziomie 20% po 20 godzinach przebywania w polu magnetycznym).

Prezentowany rodzaj stanowiska, jak można domniemywać - ze względu na prostotę budowy, był i wciąż jest wykorzystywany przez wielu autorów. Stosując stanowiska tego typu, generujące indukcję pola równą 150 mT i 200 mT, uzyskano efekt szybszego kiełkowania nasion ryżu (Carbonell, Martinez i Amaya 2000). Dla pola magnetycznego

o parametrach 125 mT zanotowano wyższe plony jęczmienia (Martinez, Carbonell i Amaya 2000). Stosując bardzo słabe stałe pole magnetyczne (0,5 mT), uzyskano zwiększenie powierzchni liści oraz przyrost zawartości białka i chlorofilu w sadzonkach cebuli (Novitsky i in. 2001). Zastosowanie pole magnetycznego o parametrach z zakresu od 2,9 do 4,6 mT skutkowało zwiększeniem intensywności rozwoju korzeni oraz zawartości chlorofilu typu *a* i *b* w nasionach soi (Atak i in. 2003). Pole magnetyczne otrzymane za pomocą magnesów stałych (indukcja pola równa odpowiednio 125 mT i 250 mT), spowodowało przyspieszenie tempa kiełkowania nasion pomidora (Martínez i in. 2009). Zaobserwowano efekt w postaci intensyfikacji wzrostu łodyg roślin soczewicy, której nasiona były stymulowane polem o indukcji 150 mT (Aladjadjiyan 2010). W 2015 roku podjęto próbę określenia wpływu stałego pola magnetycznego (B=100 mT) na algi *Scenedesmus obliquus* wykorzystywane do remediacji ścieków (Tu i in. 2015). Wyniki wskazały zwiększenie produkcji biomasy, tlenu oraz chlorofilu, w porównaniu do próbek niestymulowanych. Z kolei słodkowodne algi *Spirulina platensis* poddane działaniu stałego pola magnetycznego nie tylko zwiększyły produktywność biomasy, ale przy odpowiednich parametrach stymulacji zintensyfikowały o ponad 90% zdolności do biosorbcji kadmu (Shao i in. 2018). W badaniach przeprowadzonych przez Luo i in. (2019) wykazano, że eukaliptus właściwy (*Eucalyptus globulus)* podczas stymulacji przedsiewnej polem o indukcji do 150 mT w efekcie zwiększa swój plon, ale dla wartości 400 mT plon ten jest o blisko 20% mniejszy względem próby kontrolnej. Jednocześnie wzrost indukcji powodował równoczesny przyrost zdolności akumulacji metali ciężkich z gleby. Współcześnie coraz częściej zamiast magnesów trwałych stosuje się elektromagnesy zasilane prądem stałym, jednak sama koncepcja stanowiska pozostaje niezmienna.

Kolejnym typem konstrukcji były systemy wykorzystujące magnesy trwałe umieszczone nieruchomo nad elementem roboczym wprowadzanym najczęściej w ruch obrotowy. Na poruszającej się części umieszczano materiał poddawany stymulacji. Stanowiska te występowały również w odwrotnej konfiguracji, tj. magnes poruszał się nad nieruchomą próbką badawczą. Nietypowe rozwiązanie zostało przedstawione przez Edmistona w 1972 roku (Edmiston 1972). Polegało ono na umieszczeniu magnesu trwałego o kształcie pierścienia na pokrywce szalki Petriego, podczas gdy sama szalka była przymocowana do wskazówki zegara ułożonego w poziomie, co zapewniało ruch obrotowy z osią obrotu umieszczoną wertykalnie. Urządzenie to było wykorzystywane

do badania wpływu zmiennego pola magnetycznego na długość sadzonek (mierzoną do podstawy liścienia) uzyskiwanych z nasion gorczycy białej. Wykazano, że rośliny, których nasiona były poddawane oddziaływaniu zmiennego pola magnetycznego, były znacznie dłuższe, w porównaniu z próbami kontrolnymi oraz grupami poddanymi działaniu stałego pola magnetycznego. W latach 70 XX wieku w Stanach Zjednoczonych Ameryki powstało zgłoszenie patentowe nr US4020590A (Davis 1977), które przedstawiało stanowisko do stymulacji nasion (rys. 2), oparte na magnesie sztabkowym i obracającym się bębnie, w którym umieszczano badany materiał.

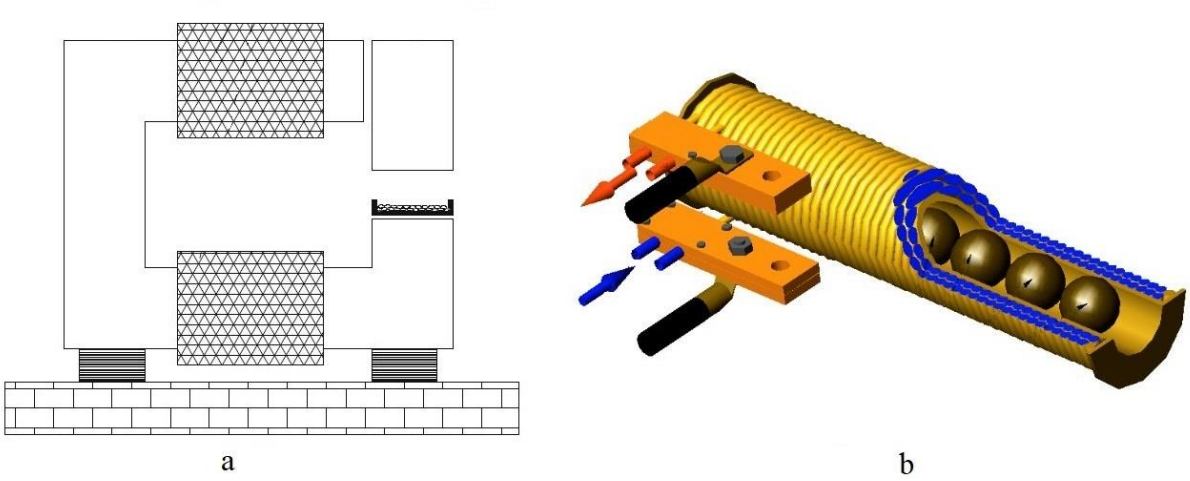


Rys. 2. Stanowisko do stymulacji materiału biologicznego zmiennym polem magnetycznym
Źródło: Davis 1977

W XXI wieku przedstawione rozwiązania zostały zaimplementowane przez inne dziedziny nauki i techniki. Stałe magnesy wprowadzane w ruch obrotowy są wykorzystywane w mieszadłach i separatorach magnetycznych, ale też w urządzeniach medycznych. Choć dla potrzeb stymulacji materiału biologicznego stanowiska te zaczęły tracić na swojej popularności na rzecz elektromagnesów i cewek elektromagnetycznych, to jednak wciąż powstają nieliczne publikacje dotyczące użycia zmiennego pola magnetycznego np. w odniesieniu do przedsiewnego kondycjonowania materiału. Yano i in. (2001) opisali stanowisko, które składało się z platformy obracającej się wokół osi poziomej, do której przytwierdzono rury (równolegle do osi obrotu) z umieszczonym w środku żelem, w którym znajdowały się sadzonki rzodkiewki. Na środku każdej rury przymocowany został magnes sztabkowy o cylindrycznym kształcie. Niektóre magnesy były ustawione północnym biegunem względem osi rury, inne w przeciwnym kierunku. Natężenie pola w centralnym punkcie wynosiło 40 mT, z gradientem 10 $mT \cdot mm^{-1}$. Efektem badań było potwierdzenie hipotezy, że kiełki roślin odchylały się od magnesu,

a efekt ten był najintensywniejszy dla południowego bieguna. Tessaro, Murugan i Persinger (2015) wykorzystali nieskomplikowane technicznie stanowisko składające się z dwóch stałych magnesów „krążkowych" obracających się naprzeciwko siebie z prędkością 30 obr.·min^{-1} w celu stymulacji znajdującego się w przestrzeni pomiędzy nimi materiału, który stanowiły bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne. Choć uzyskane wyniki były statystycznie nieistotne w porównaniu z próbami kontrolnymi, to wykorzystane urządzenie stanowiło pierwowzór dla stanowiska skonstruowanego przez Hossacka, Persingera i Dotta (2019). W tym układzie wykorzystano cylindry, obracające się z prędkością 3000-4000 obr.·min^{-1}, które zostały ułożone w okrąg, a w ich wnętrzu zamontowano magnesy w kształcie pierścieni. Autorzy zaobserwowali zahamowanie szybkości kiełkowania roślin słonecznika poddanych działaniu tak wywołanego pola magnetycznego.

Wraz ze wzrostem zainteresowania badaczy problematyką oddziaływania polem magnetycznym na organizmy żywe oraz rosnącą liczbą wyników badań dających obiecujące rezultaty, zaczęto budować coraz więcej systemów technicznych, których oddziaływanie (zgodnie ze wcześniej opisywaną nomenklaturą) można nazwać oddziaływaniem elektromagnetycznym. Stanowiska tego typu bazowały z reguły na elektromagnesie zasilanym przemiennym prądem elektrycznym (rys. 3a) (Pietruszewski 1998), cewce powietrznej – tzw. solenoidzie (rys. 3b) (Marks i Szecówka 2010; Gliniak i in. 2018; Dróżdż i in. 2019) lub cewce Helmholtza, czyli układzie dwóch bliźniaczych cewek zamontowanych współosiowo i oddalonych od siebie na odległość równą promieniowi każdej z nich (Răcuciu 2012).



a b

Rys. 3. Stanowiska do stymulacji materiału biologicznego zmiennym polem elektromagnetycznym

Źródło: a) Pietruszewski 1998
b) Marks i Szecówka 2010

Badania prowadzone na takich stanowiskach pozwoliły między innymi ustalić, że zmienne pole elektromagnetyczne o częstotliwości 60 Hz i indukcji 100 mT, powoduje u niektórych odmian kukurydzy poprawę szybkości wschodów sadzonek o 123,2% (Aguilar i in. 2009). Do podobnych wniosków doszli Zepeda-Bautista i in. (2010), którzy tę samą roślinę stymulowali polem o parametrach B=480 mT, f=60 Hz. Przyspieszenie kiełkowania roślin, których nasiona były stymulowane przedsiewnie zaobserwowano również dla słonecznika (30 mT, 50 Hz) (Matwijczuk, Kornarzyński i Pietruszewski 2012), grochu (60-180 mT, 50 Hz) (Iqbal i in. 2012), babki średniej (350-2000 mT, 50 Hz) (Shashurin i in. 2014), rzodkiewki (60-500 μT, 50 Hz) (Novitskii, Novitskaya i Serdyukov 2014), pomidorów (20-60 mT, 50 Hz) (Jedlička, Paulen i Ailer 2015), truskawek (5 mT, 16 Hz) (Kutyrev i in. 2017; Izmailov i in. 2018) czy fasoli mung (0,3 mT, 7,83±0,1 Hz) (Huang i in. 2018). Jednakże, dla nasion pszenicy *Triticum aestivum L.* (30 mT, 50 Hz) (Balakhnina i in. 2015) oraz jęczmienia (1-5 mT, 50 Hz) (Răcuciu, Oloşutean i Perju 2017) efekt ten był przeciwny – nastąpiło zahamowanie tempa kiełkowania roślin.

Aspekt zapewnienia regulacji temperatury w trakcie pomiarów (lub utrzymywania jej na stałym poziomie) jest istotny ze względu na konieczność zachowania jednakowych warunków dla każdej z próbek i dla każdego powtórzenia. W przypadku materiału biologicznego taki zabieg ma dodatkowo na celu eliminację wpływu czynnika temperaturowego na uzyskiwane wyniki. O ile w przypadku stanowisk składających się z magnesów trwałych kontrola temperatury nie stanowi wyzwania technologicznego, o tyle w przypadku stosowania cewek elektromagnetycznych jest istotnym zagadnieniem.

Ilość ciepła jaka wydziela się na rezystancji podczas przepływu prądu elektrycznego (generującego pole elektromagnetyczne) jest wyznaczana zgodnie z ogólnym prawem Joule'a-Lenza (wzór 1) (Lenz 1834; Olszewski 2016), gdzie Q to ilość wydzielonego ciepła [J], I–natężenie prądu elektrycznego [A], U–napięcie prądu elektrycznego [V], t_p–czas przepływu prądu [s], a R–opór elektryczny przewodnika [Ω].

$$dQ = IUdt_p = I^2Rdt_p \tag{1}$$

W przypadku cewki (zasilanej prądem przemiennym) rezystancja występuje jako jedna z dwóch składowych impedancji. Określana jest wtedy jako opór czynny i oznaczana jako R [Ω]. Drugą składową stanowi opór indukcyjny, czyli reaktancja,

oznaczana jako X [Ω]. Zatem, w analizowanym przypadku jako opór elektryczny przewodnika występujący we wzorze 1, należy wstawić moduł impedancji zwany również zawadą (Z [Ω]) uwzględniający część rzeczywistą i urojoną, zgodnie z przedstawioną zależnością (wzór 2).

$$|Z| = \sqrt{R^2 + X^2} \tag{2}$$

Reaktancja cewki (wzór 3) to iloczyn indukcyjności własnej cewki L [H] i pulsacji prądu przemiennego ω [rad·s^{-1}]. Z kolei pulsację można zapisać zgodnie ze wzorem 4, gdzie θ to faza ruchu drgającego [-], t_p–czas przepływu prądu [s], T–okres [s], a f–częstotliwość [Hz].

$$X = \omega L \tag{3}$$

$$\omega = \frac{d\theta}{dt} = \frac{2\pi}{T} = 2\pi f \tag{4}$$

Korzystając z przekształcenia prawa Ohma dla prądu przemiennego, można zapisać zależność (wzór 5), zgodnie z którą wartość skuteczna prądu (I_{sk}) jest wprost proporcjonalna do napięcia skutecznego (U_{sk}) i odwrotnie proporcjonalna do zawady.

$$I_{sk} = \frac{U_{sk}}{|Z|} \tag{5}$$

Wprowadzając do wzoru 1 skuteczną wartość prądu elektrycznego oraz moduł impedancji (zawadę), a także mając na uwadze relacje wynikające ze wzorów 2-4, otrzymujemy zależność (wzór 6), zgodnie z którą w stanowiskach do stymulacji polem elektromagnetycznym, bazujących na elemencie elektronicznym jakim jest cewka, strumień ciepła wytwarzany przez części robocze zależy przede wszystkim od parametrów prądu (natężenie i częstotliwość), a w mniejszym stopniu od charakterystyki cewki (opór czynny i indukcyjność) oraz czasu trwania stymulacji. Jednakże, uwzględniając fakt, iż opór czynny cewki jest zależny od jej budowy, a indukcyjność jest wprost proporcjonalna do pulsacji prądu elektrycznego, a tym samym jego częstotliwości, można przyjąć, że dla stanowiska wykorzystującego cewkę

o określonej, stałej budowie, wytwarzane ciepło zależy przede wszystkim od trzech czynników: czasu, natężenia oraz częstotliwości prądu przemiennego.

$$Q = \frac{I^2}{\sqrt{R^2 + 4\pi^2 f^2 L^2}} dt \tag{6}$$

Biorąc pod uwagę powyższe rozważania, wydaje się, że odbiór ciepła z elementów roboczych stanowiska skorelowany w czasie ze stymulacją materiału biologicznego, powinien być istotnym aspektem, zapewniającym poprawność uzyskiwanych wyników. Konieczność uwzględnienia czynnika temperaturowego w prowadzonych badaniach nad wpływem pola elektromagnetycznego na organizmy żywe potwierdzają m.in. Phirke i in. (1996), czy Pietruszewski, Muszyński i Dziwulska (2007). W szczególności dotyczy to stymulacji roślin, gdzie jak pokazują prowadzone badania, kontrola ta odbywa się jedynie na etapie prowadzenia tzw. badań flakonowych. Niektórzy autorzy prac stosują monitoring warunków środowiskowych (Grehl i in. 2016; Kennedy i in. 2018; Lin i in. 2019), jednak z reguły pomiar temperatury dotyczy otoczenia lub elementów roboczych stanowiska, a nie samego materiału. O ile w przypadku oddziaływania polem o stałych parametrach takie postępowanie można uznać za poprawne (choć trudno jednoznacznie stwierdzić, czy efekt został wywołany przez stymulację elektromagnetyczną, czy może przez podgrzewanie materiału), o tyle przy porównywaniu efektów oddziaływania polem o różnych parametrach, kontrola temperatury materiału jest niezbędna. Do nielicznych należy opracowanie autora niniejszej dysertacji (Popardowski i in. 2021), który wskazuje na konieczność kontroli temperatury zarówno samego stanowiska, jak i materiału stymulowanego przy jego udziale, sugerując przy tym wykorzystanie bezinwazyjnego pomiaru przy użyciu kamery termowizyjnej.

Jak wskazują Fischer i in. (2004), w zdecydowanej większości stanowiska do stymulacji zmiennym polem elektromagnetycznym zasilane są prądem elektrycznym o częstotliwości 50 lub 60 Hz. Prawdopodobnie wynika to z faktu, iż prąd o takiej częstotliwości jest przesyłany przez sieci elektroenergetyczne większości krajów świata. Istnieją jednak badania, w których materiał biologiczny został poddany działaniu prądu o innej częstotliwości. Wykorzystując pole elektromagnetyczne o indukcji magnetycznej równej 20 μT i częstotliwości 16,67 Hz, do stymulacji przedsiewnej nasion słonecznika, uzyskano efekt w postaci wzrostu całkowitej świeżej masy, masy pędu oraz korzeni,

a dla nasion pszenicy dodatkowo wzrost szybkości kiełkowania (Fischer i in. 2004). Zastosowanie zmiennego pola elektromagnetycznego o parametrach 750 μT i 7 Hz oraz 500 μT i 14 Hz, sprzyjało szybszemu kiełkowaniu nasion dziurawca zwyczajnego oraz lokalnej japońskiej rośliny zwanej rogatkiem sztywnym (*Cryptotaenia japonica Hassk)* (Kobayashi i in. 2004). Pole o indukcji magnetycznej 0,3 mT i częstotliwości 7,83±0,1 Hz spowodowało wzrost wskaźnika kiełkowania fasoli mung od 8% do 23,3% w stosunku do grup kontrolnych, a ponadto zwiększony przyrost długości łodygi o 14% (w 72 godzinie wzrostu) względem próbek niepoddanych działaniu pola elektromagnetycznego (Huang i in. 2018).

Efekt oddziaływania polem elektromagnetycznym jest widoczny nie tylko w skali makro (stymulacja roślin), ale również w skali mikro, czyli na poziomie komórkowym. Ostafin i in. (2016) poddali stymulacji drożdże *Yarrowia lipolytica,* stosując różnorodną indukcję (20 mT, 40 mT, 70 mT, 90 mT), przy częstotliwości 50 Hz. We wszystkich przypadkach wzrost drożdży był większy niż w próbce kontrolnej, z maksymalną wartością uzyskaną dla idukcji równej 70 mT. Tymczasem prowadzone kilka lat wcześniej eksperymenty, przy zastosowaniu pola o częstotliwości 50 Hz i indukcji magnetycznej 10 mT, nie wykazały żadnych zmian w morfologii drobnoustrojów z gatunku *Escherichia coli* oraz *Paracoccus denitrificans* (Fojt i in. 2009). Porównanie szybkości wzrostu i aktywności metabolicznej komórek Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Streptococcus mutans*) i bakterii Gram-ujemnych (*Escherichia coli, Serratia marcescens, Klebsiella oxytoca*), poddanych działaniu zmiennego pola elektromagentycznego o częstotliwości 50 Hz i indukcji magnetycznej 18 mT w czasie 8 godzin, wykazało stymulację wzrostu i aktywności metabolicznej bakterii Gram-dodatnich (do 25%) oraz zahamowanie namnażania się bakterii Gram-ujemnych (do 17%) (Konopacki i Rakoczy 2019).

Badaniom nad wpływem pola elektromagnetycznego poddawane są również organizmy zwierzęce. W swoich doświadczeniach z zarodkami kurzymi Lis (2019) wskazał zwiększoną śmiertelność zarodków między 1, a 6 dniem inkubacji, na skutek działania pola elektromagnetycznego o następujących parametrach: B=15 μT, f =50 Hz oraz między 18, a 20 dniem inkubacji dla B=5 μT, f =50 Hz. W każdej z analizowanych grup poddanych stymulacji polem elektromagnetycznym główny etap wylęgu został zakończony wcześniej niż w przypadku grupy kontrolnej. Z kolei w badaniach nad wpływem pola elektromagnetycznego (B=30, 100 i 500 μT, f=50 Hz) na płodność

i rozwój u szczurów i myszy, nie stwierdzono żadnego efektu. Wyniki wykazały, że żadna z trzech intensywności nie wpłynęła m.in. na masę ciała, poziom hormonu płciowego w osoczu, wskaźnik ciąż i wszczepionych zarodków, a także rozwój zarodków (Ruan i in. 2019). W badaniach prowadzonych na ikrze pstrąga tęczowego, a następnie narybku hodowanym przez 36 dni w warunkach działania pola elektromagnetycznego o częstotliwości 50 Hz i indukcji 1 mT, nie wykazano wpływu na ich śmiertelność, czy czas wylęgu, ale oddziaływanie to powodowało uzyskiwanie mniejszej wagi wśród osobników dorosłych, w porównaniu z rybami niepoddanymi stymulacji (Fey i in. 2019). Pszczoły eksponowane na PEM (t=17 h; f=50 Hz; B=100 μT i 1000 μT) zmniejszyły swoją wydajność uczenia o ponad 20% i zwiększyły poziom agresji o 60% (Shepherd i in. 2019). Badania nad wpływem pola elektromagentycznego na organizmy zwierzęce często ograniczano do wybranej tkanki. Przebadano w ten sposób fragmenty rybich mózgów (Tavighi i in. 2018); rdzenie kręgowe i stawy kolanowe myszy oraz szczurów (Li i in. 2019; Na i in. 2019) czy żuchwy królików (Yang i Hwang 2019), otrzymując bardzo zróżnicowane wyniki.

Wśród licznych opracowań przeważają te, w których do badań wykorzystywano materiały pochodzenia roślinnego. W drugiej kolejności drobnoustroje, a następnie organizmy i komórki zwierzęce. Pierwsze dwie z wymienionych grup pozwalają na stosunkowo nieskomplikowaną analizę efektów wywołanych kondycjonowaniem polem elektromagnetycznym oraz charakteryzują się, do pewnego stopnia, niewielką zmiennością właściwości w czasie. Trzecia stanowi istotny czynnik związany z badaniami klinicznymi. Wydaje się, że do pełni spektrum materiałów biologicznych stosowanych do przedmiotowych badań brakuje jedynie produktów pochodzenia zwierzęcego. Trudność w ich stosowaniu może polegać na znacznie większej wrażliwości na warunki temperaturowe i zmienności w czasie, w stosunku do powszechnie stosowanego materiału roślinnego (Abrahamsen i in. 2007; Kumar i Desai 2011; Muleta 2016; Sinha i in. 2018). W literaturze można odnaleźć jedynie nieliczne publikacje dotyczące na przykład wpływu pola magnetycznego na surowiec do produkcji sera (Kristinawati i Sudarti 2017), przy czym bliższa analiza uzyskanych wyników badań wskazuje, że stymulacja ta odnosi się jedynie do bakterii znajdujących się w wybranym materiale.

W tym kontekście interesujące wydaje się wykorzystanie miodu, jako produktu zwierzęcego (Grigoryan 2016; Altunatmaz i in. 2019), posiadającego specyficzne

właściwości, w tym: antybakteryjne, przeciwutleniające, przeciwzapalne i antymutagenne (Chang i in. 2011; Mandal i Mandal 2011; Al-Waili i in. 2011; León-Ruiz i in. 2013; J.-R. Liu i in. 2013). W odróżnieniu od większości substancji pochodzenia zwierzęcego, opisane cechy miodu umożliwiają ciągłość prowadzenia wieloetapowych pomiarów przy zachowaniu względnej stabilności parametrów badanego materiału w czasie. Daje to pewność wnioskowania, eliminując zakłócenia występujące w przypadku innych substancji biologicznych.

Głównymi składnikami miodu są fruktoza i glukoza (około 75%), woda (około 17%) oraz niewielkie ilości sacharozy i niektórych cukrów polisacharydowych (Alqarni, Balhareth i Owayss 2014; Khan, Al-Ghamdi i Ansari 2016). O wartości biologicznej miodu decyduje jednak zawartość pozostałych składników (około 3%), takich jak: białka, enzymy, aminokwasy, kwasy fenolowe, witaminy, oraz makro- i mikroelementy (Kędzia i Hołderna-Kędzia 2008). Enzymy występują w miodzie w ilościach minimalnych, ale są jego bardzo ważnymi składnikami. Pochodzą one głównie z wydzielin gruczołów ślinowych pszczół, jednak niewielkie ilości mogą dostawać się do materiału również z ziaren pyłków lub spadzi (Wesołowska i Dżugan 2017; Sak-Bosnar i Sakač 2012). Jeden z enzymów, tzw. oksydaza glukozowa, utlenia glukozę, prowadząc tym samym do powstania nadtlenku wodoru - głównego składnika, który wykazuje działanie przeciwbakteryjne (Ghramh, Ali Khan i Alshehri 2019). Oprócz nadtlenku wodoru, niektóre z pozostałych cząsteczek znajdujących się w miodzie również przyczyniają się do jego działania przeciwbakteryjnego. Substancje te, zwane biologicznie czynnymi komponentami pochodzenia roślinnego stanowią flawonoidy (flawony, flawonole, flawonony i dihydroflawonole) oraz inne związki fenolowe (kwasy cynamonowe i ich estry), metyloglioksal i peptydy pszczele (Israili 2014). Ponadto, kwaśny odczyn środowiska spowodowany obecnością kwasów organicznych (pH na poziomie 3,2-4,5) oraz wysokie ciśnienie osmotyczne, wywołane dużą koncentracją cukrów, przyczyniają się do całkowitego zatrzymania rozwoju drożdży osmofilnych i innych drobnoustrojów (Dżugan i Wesołowska 2016). Dodatkowo, miód ze względu na swą higroskopijność, wywołuje dehydratację komórek bakteryjnych (Nur, Jahan i Akter 2020). Zdolność miodu do hamowania wzrostu bakterii, została wykazana przy użyciu wielu mikroorganizmów, w tym: *Acinetobacter baumannii, Bacillus cereus, B. subtilis, Enterobacter aerogenes, Escherichia coli, Klebsiella pneumonia, Micrococcus luteus, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhi, S. typhimurum,*

Shigella flexneri, Shigella sonnei, Serratia marcescens, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pyogenes (Wijesinghe i in. 2009; AL-Waili i in. 2013; Alqurashi, Masoud i Alamin 2013; Al-Nahari i in. 2015; Wasihun i Kasa 2016; Samarghandian, Farkhondeh i Samini 2017; Rani, Budumuru i Bandaru 2017; Deng i in. 2018). Nie oznacza to jednak, że miód jest zupełnie pozbawiony obecności mikroorganizmów. W składzie mikroflory miodu dominują drobnoustroje środowiskowe, nieszkodliwe dla człowieka (Evans i Schwarz 2011; Mattila i in. 2012), które występują powszechnie w środowisku naturalnym i wraz z glebą mogą przedostawać się na powierzchnię roślin oraz ciała pszczół. W ten sposób migrują do uli, a następnie do miodu. Najpopularniejsze z nich to beztlenowe mikroby zaliczane do rodzaju *Clostridium* i tlenowe z rodzaju *Bacillus* (Nevas i in. 2006; Olaitan, Adeleke i Ola 2007).

W ostatnich latach szczególną uwagę poświęca się materiałom bioaktywnym, a zwłaszcza możliwościom stymulacji tzw. bioaktywności. Aktywność biologiczna jest pojęciem polisemicznym, interpretowanym w odmienny sposób, zależnie od dyscypliny naukowej. Urbaniści wykorzystują omawiane pojęcie do opisu terenów użytkowanych zgodnie z pełnionymi przez system funkcjami ekologicznymi, co odnosi się do takich miejsc jak np. zieleń miejska o charakterze publicznym, lasy, wody otwarte, ogrody działkowe, tereny rekreacji z dużą ilością zieleni, zwłaszcza wysokiej, niecki retencyjne, sztuczne mokradła czy zielone dachy (Mieszkowska 2005; Maciejewska i Krygielska 2011; Wolski 2013). Z punktu widzenia inżynierii materiałowej, bioaktywność materiału to jego zdolność do łatwego tworzenia połączenia z tkanką, na skutek posiadania właściwości przeciwdrobnoustrojowych oraz pobudzających osteointegrację z tkanką gospodarza (Tan i in. 2012; Laska 2017). Dla technologów żywności aktywność biologiczna to możliwość wpływania przez dany produkt żywnościowy lub jego składnik na funkcje fizjologiczne i metaboliczne organizmu człowieka, w tym obniżanie ryzyka występowania procesów patologicznych. Substancje posiadające tę własność mają właściwości przeciwutleniające, detoksykacyjne, buforujące, regulacyjne, immunostymulujące, przeciwzapalne, obniżające poziom cholesterolu we krwi, czy wreszcie przeciwnowotworowe lub redukujące otyłość (Boue i in. 2009; Kasprzak i in. 2016; Kononiuk i Karwowska 2016). Według innej definicji, poprzez składniki bioaktywne rozumie się cząsteczki sygnałowe, udzielające organizmowi informacji ze środowiska zewnętrznego, co w efekcie wpływa na poziom ekspresji genów

w komórce (Fenech 2008) lub posiadające zdolność wywołania specyficznej odpowiedzi biologicznej, np. odpowiedzi wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej (Dziadek, Pawlik i Cholewa-Kowalska 2014). Najbardziej zróżnicowane podejście do aktywności biologicznej wykazują mikrobiologia, biotechnologia i pokrewne gałęzie nauki, dla których pojęcie to oznacza posiadanie przez materiał właściwości antyoksydacyjnych (Leja i in. 2007; Limam i in. 2011), fungistatycznych (Juś 2018), bakteriostatycznych (Limam i in. 2011; Wang, Xue, i Mao 2020) i algobójczych (Zieliński 2017; Piotrowska-Kirschling i in. 2018), określanych przy użyciu bardzo szerokiej gamy metod badawczych. Jak wskazują Dżugan i Wesołowska (2016) aktywność biologiczna miodu przejawia się poprzez obecność w tym produkcie biopierwiastków, witamin, związków białkowych, ale również na skutek posiadanych zdolności antyoksydacyjnych i aktywności antybakteryjnej. Podobnie aktywność biologiczną miodu pojmują Alvarez-Suarez i in. (2010); Chang i in. (2011) oraz Moniruzzaman i in. (2013).

Zgodnie z podanymi wcześniej informacjami, pole elektromagnetyczne w odniesieniu do pewnych grup mikroorganizmów może wpływać na ich pobudzanie lub hamowanie namnażania. Biorąc pod uwagę rozważania dotyczące pojęcia aktywności biologicznej w obrębie mikrobiologii, można stwierdzić, że zmiana ilości bakterii w stymulowanym materiale będzie wpływała na aktywność biologiczną. Hipotetycznie, możliwe jest osiągnięcie poziomu nasycenia materiału bakteriami lub grzybami, przy którym nastąpi utrata lub zahamowanie właściwości odpowiednio bakteriostatycznych i fungistatycznych, Z drugiej strony, wydaje się prawdopodobne, aby na skutek zmniejszenia lub wyhamowania tempa wzrostu mikroorganizmów, materiał pierwotnie posiadający niewielki potencjał bakteriobójczy, okazał się skuteczny w eliminacji bakterii, ale przy ich niskim stężeniu. Zatem, celowa stymulacja materiału polem elektromagnetycznym może w pewnym zakresie modyfikować aktywność biologiczną, a także pomagać w określeniu poziomu drobnoustrojów, przy których dana aktywność występuje.

1.3. Cel i zakres pracy

Problem naukowy dotyczy określenia wpływu wybranych charakterystyk pola elektromagnetycznego, które uzyskano poprzez budowę systemu cewek elektromagnetycznych stanowiących oryginalne rozwiązanie techniczne autora, na zróżnicowanie stopnia aktywności biologicznej substancji organicznych. Konstrukcja ta pozwala generować wymuszenia elektromagnetyczne odpowiadające wymaganiom metodycznym badań, koniecznym do osiągnięcia celu niniejszej pracy.

Dotychczasowe badania jednoznacznie potwierdzają tylko wpływ pola elektromagnetycznego na zmianę cech materiałów biologicznych, ale brak w literaturze opracowań, które ilościowo parametryzują to zjawisko. Ponadto niewiele z nich dotyczy zróżnicowanego zakresu częstotliwości, który obejmowałby jej przedział od 10 Hz do 100 Hz, a nie ma opracowań dotyczących periodycznego oddziaływani zróżnicowanym polem elektromagnetycznym na materię organiczną i identyfikację występujących w takiej kombinacji oddziaływania ewentualnych synergizmów w aktywności biologicznej stymulowanej substancji.

Celem pracy była konstrukcja i walidacja systemu technicznego umożliwiającego stymulację elektromagnetyczną substancji organicznej pozwalający modyfikować ilościowo jej aktywność biologiczną. Ponadto, sporządzenie charakterystyk aktywności biologicznej substancji w zależności od parametrów pola elektromagnetycznego oraz struktury jego oddziaływania.

Utylitarne (1) i poznawcze (2) uzasadnienie celu badań:
(1) System techniczny umożliwiający stymulację elektromagnetyczną substancji organicznej o określonych parametrach pola elektromagnetycznego pozwoli na celowe/kontrolowane modyfikowanie wybranych właściwości materiału biologicznego przekładając się na jego zastosowanie w procesach produkcyjnych/przemysłowych.
(2) System ten umożliwi również określenie rodzaju zmian zachodzących w aktywności biologicznej materiału w zależności od przyjętego zakresu częstotliwości pola elektromagnetycznego, czasu stymulacji oraz naprzemiennej stymulacji substancji polem elektromagnetycznym o różnej częstotliwości.

Na podstawie przedstawionego celu badań sformułowano następujące hipotezy badawcze:

Hipoteza I: Stymulowanie materiału biologicznego polem elektromagnetycznym prowadzi do zmiany aktywności substancji biologicznie czynnej.

Hipoteza II: Stopień aktywności biologicznej jest identyfikowalny wielkością emisji fotonowej stymulowanej substancji.

Udowodnienie postawionych hipotez wymagało zrealizowania następujących etapów badań:

- budowy systemu technicznego;
- analizy widma energii cieplnej generowanej przez skonstruowany układ;
- realizacji serii badań eksperymentalnych w celu wyznaczenia parametrów stymulacji (czas, indukcja magnetyczna);
- wyodrębnienia przedmiotu badań spośród analizowanych materiałów;
- przeprowadzenia doświadczeń na wybranym materiale, z uwzględnieniem określonych kryteriów;
- analizy uzyskanych wyników badań.

2. Metodyka

2.1. Charakterystyka materiału badawczego i przebieg doświadczeń

Materiałem biologicznym stanowiącym podstawę doświadczenia był miód pszczeli, posiadający unikatowe właściwości, które umożliwiają eliminowanie ewentualnych zakłóceń doświadczenia ze względu na stabilność biologiczną (opisaną w podrozdziale 1.2). Miody posiadają właściwości antyoksydacyjne i antybakteryjne oraz w długim interwale czasu utrzymują swoje właściwości biologiczne. Biorąc pod uwagę stopień różnorodności w obrębie wybranej substancji do badań wybrano 30 miodów różnych gatunków, pochodzących od siedemnastu producentów z różnych krajów (tab. 1).

Tab. 1. Charakterystyka materiału badawczego

Oznaczenie	Gatunek	Odmiana	Pochodzenie
1	Nektarowy	Akacjowy	Polska (woj. małopolskie)
2	Nektarowy	Lipowy	Polska (woj. małopolskie)
3	Nektarowy	Lipowy	Polska (woj. lubelskie)
4	Nektarowy	Gryczany	Polska (woj. dolnośląskie)
5	Nektarowy	Gryczany	Polska (woj. świętokrzyskie)
6	Nektarowy	Faceliowy	Polska (woj. warmińsko-mazurskie)
7	Nektarowy	Nawłociowy	Polska (woj. świętokrzyskie)
8	Nektarowy	Nawłociowy	Polska (woj. wielkopolskie)
9	Nektarowy	Nawłociowy	Polska (woj. lubelskie)
10	Nektarowy	Rzepakowy	Polska (woj. zachodniopomorskie)
11	Spadziowy	Spadź iglasta	Polska (woj. małopolskie)
12	Spadziowy	Spadź liściasta	Bułgaria
13	Spadziowy	Spadź iglasta	Grecja
14	Nektarowy	Wierzbowy	Polska (woj. świętokrzyskie)
15	Nektarowo-spadziowy	Leśny	Polska (woj. lubelskie)
16	Nektarowo-spadziowy	Lipowo - leśny	Polska (woj. pomorskie)
17	Nektarowo-spadziowy	Leśny	Włochy
18	Spadziowy	Spadź liściasta	Polska (woj. śląskie)
19	Spadziowy	Spadź iglasta	Polska (woj. śląskie)

Oznaczenie	Gatunek	Odmiana	Pochodzenie
20	Nektarowy	Manuka	Nowa Zelandia
21	Nektarowy	Manuka	Nowa Zelandia
22	Nektarowy	Manuka	Nowa Zelandia
23	Nektarowy	Manuka	Nowa Zelandia
24	Nektarowy	Wielokwiatowy	Polska (woj. małopolskie)
25	Nektarowy	Wielokwiatowy	Polska (woj. podlaskie)
26	Nektarowy	Wielokwiatowy	Chiny
27	Nektarowy	Wielokwiatowy	Polska (woj. śląskie)
28	Nektarowy	Wielokwiatowy	Polska (woj. małopolskie)
29	Nektarowy	Wielokwiatowy	Ukraina
30	Nektarowy	Wielokwiatowy	Polska (woj. warmińsko-mazurskie)

Źródło: opracowanie własne

W celu określenia, który gatunek miodu będzie posiadał cechy istotne z punktu widzenia planowanych badań (tj. będzie odznaczał się homogenicznym składem w całej objętości materiału oraz którego parametry nie będą ulegały zmianie w czasie) wykonano badania emisji fotonowej (procedura badawcza akredytowana przez PCA - *AB 1698*). Wytypowanie materiału badawczego polegało na pobraniu z każdego analizowanego miodu 10 próbek z różnych części opakowania, w których produkt ten został dostarczony. Obowiązujący w Polsce dokument dotyczący metod analiz związanych z dokonywaniem oceny miodu (Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 30 lipca 2015 r.), zastępujący normę *PN-A-77626:1988 Miód pszczeli* (PKN 1988), wycofaną w 2014 roku, nie określa sposobu pobierania próbek. Z tego powodu, posłużono się normą *PN-ISO 11648-1:2009 Statystyczne aspekty pobierania próbek materiałów bezkształtnych*. Zakwalifikowane do dalszych badań miody umieszczono w takich samych szklanych, cylindrycznych opakowaniach, o pojemności około jednego litra (wysokość 13 cm, średnica 9 cm). W ustabilizowanych termicznie i świetlnie próbkach (zgodnie z przedstawioną metodyką przed stymulacją miody umieszczano w światłoszczelnych pojemnikach i przechowywano przez 24 godziny w temperaturze 25°C), wyznaczono pięć stref. Każda z nich charakteryzowała się polem powierzchni równym 1/5 przekroju podłużnego pojemnika. Przy pomocy szpatułki pobierano materiał, przy czym maksymalna głębokość, z której czerpano miód wynosiła 3 cm licząc od powierzchni materiału. Następnie usuwano warstwę miodu

do wysokości 6,5 cm (połowa wysokości pojemnika) i powtarzano procedurę poboru 5 próbek.

Wyselekcjonowany na podstawie wcześniejszych pomiarów materiał, przed poddaniem stymulacji polem elektromagnetycznym, umieszczano w dziesięciomililitrowej probówce ze szkła sodowego o długości 100 mm i średnicy wewnętrznej 16 mm, zamkniętej przy użyciu polietylenowego korka. Masa implementowanego do probówki miodu wynosiła 5±0,1 g. Tak przygotowaną próbkę umieszczano wewnątrz rdzenia cewki, w podłużnej osi symetrii solenoidu. Wymiary zastosowanego szkła laboratoryjnego pozwoliły uzyskać jednorodne natężenia pola elektromagnetycznego w całej objętości próbki.

Dla każdej z serii przygotowanych doświadczeń wyznaczano indywidualnie czas ekspozycji, wartość indukcji magnetycznej zastosowanego pola oraz jego częstotliwość. Dwa pierwsze parametry zostały ze sobą powiązane, zgodnie z zależnością wyrażoną wzorem nr 7 (Pietruszewski 1999; Ostafin i in. 2016) pozwalającym określić tak zwaną dawkę ekspozycyjną, gdzie D_e to dawka [J·m^{-3}], B–indukcja magnetyczna [T], a t_e–czas ekspozycji [s]. Po zakończonej stymulacji w próbkach określano parametr zwany emisją fotonową, a następnie oznaczano właściwości mikrobiologiczne.

$$D_e = \frac{10^7}{4\pi} \cdot B^2 \cdot t_e \tag{7}$$

W ramach badań wykonano następujące doświadczenia:

– w celu wyznaczenia materiału badawczego o najmniejszej zmienności parametrów w czasie oraz najdokładniejszej homogenizacji, który następnie został wykorzystany do kolejnych doświadczeń, przeprowadzono pomiar emisji fotonowej próbek wybranych materiałów;

– wyselekcjonowany materiał badawczy podzielono na trzy części – pierwszą z nich poddano działaniu pola elektromagnetycznego, o następujących parametrach stymulacji: dawka ekspozycyjna równa 807 kJ·m^{-3} (indukcja magnetyczna 32 mT, czas 990s) i częstotliwość pola w zakresie od 10 do 100 Hz, z interwałem co 10 Hz, a następnie określono poziom emisji fotonowej i wyznaczono kluczowe parametry mikrobiologiczne;

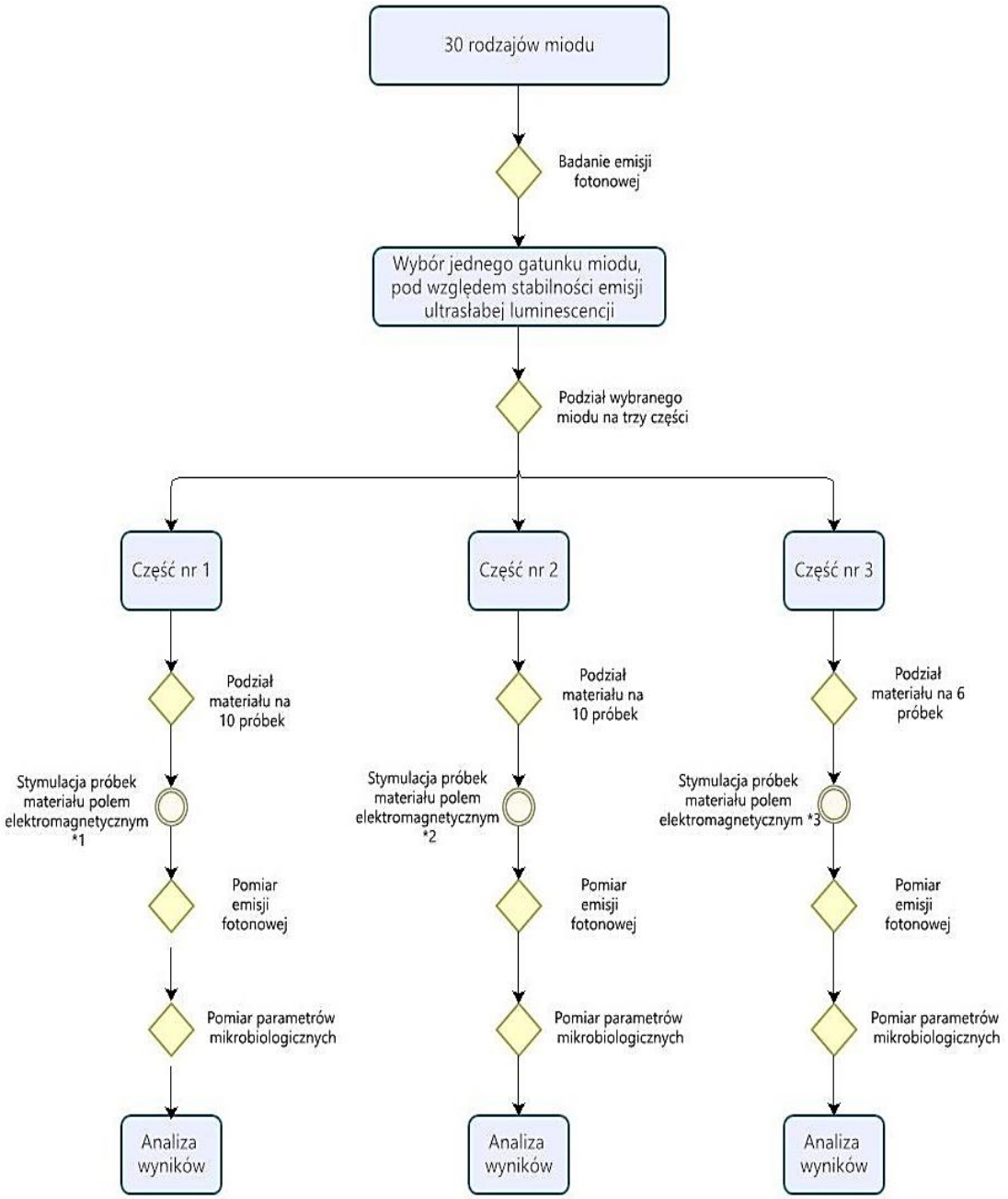
– druga część materiału badawczego została poddana stymulacji polem elektromagnetycznym, o największej możliwej do uzyskania dawce ekspozycyjnej,

warunkowanej parametrami technicznymi stanowiska, tj. indukcję magnetyczną dobrano tak, aby była równa maksymalnej możliwej do uzyskania wartości przy danej częstotliwości, a czas stymulacji odpowiadał okresowi do momentu osiągnięcia przez cewkę temperatury mogącej powodować termiczne uszkodzenie stymulowanego materiału biologicznego. Częstotliwość pola elektromagnetycznego, podobnie jak poprzednio, przyjęto w zakresie 10-100 Hz, z interwałem co 10 Hz. Po przeprowadzonej stymulacji wykonano pomiar emisji fotonowej badanego materiału oraz jego parametrów mikrobiologicznych;

– trzecią część materiału wykorzystano do porównania próbek stymulowanych przez okres 1200 s, z indukcją pola 32 mT (dawka ekspozycyjna równa 978 $kJ \cdot m^{-3}$), przy częstotliwości 50 i 100 Hz, z próbką stymulowaną z tą samą wartością indukcji i częstotliwością 50 Hz przez 600 s, a następnie zmianą częstotliwości na 100 Hz i kontunuowaniem stymulacji przez kolejne 600 s. Porównano w sposób analogiczny trzy próbki przy indukcji równej 32 mT, dla czasu stymulacji 960 s (dawka ekspozycyjna 783 $kJ \cdot m^{-3}$) i częstotliwości 10 oraz 50 Hz, ze zmianą parametrów dla jednej próbki (z wyższej częstotliwości na niższą) w połowie czasu stymulacji.

Zarówno pomiar emisji fotonowej, jak i wszystkie badania określające aktywność mikrobiologiczną badanego materiału były wykonywane każdorazowo (tj. dla każdej próbki) w 10 powtórzeniach.

Sposób postępowania z próbkami oraz schemat koncepcyjny wykonywanych pomiarów zostały przedstawione na rysunku 4, z kolei pod rysunkiem wyszczególniono wszystkie kombinacje zastosowanych parametrów stymulacji polem elektromagnetycznym dla każdej z wcześniej wyselekcjonowanych części materiału badawczego.



*1 Parametry stymulacji kolejnych próbek: 1) B = 32,0mT, t = 990s, f = 10Hz; 2) B = 32,0mT, t = 990s, f = 20Hz; 3) B = 32,0mT, t = 990s, f = 30Hz; 4) B = 32,0mT, t = 990s, f = 40Hz; 5) B = 32,0mT, t = 990s, f = 50Hz; 6) B = 32,0mT, t = 990s, f = 60Hz; 7) B = 32,0mT, t = 990s, f = 70Hz; 8) B = 32,0mT, t = 990s, f = 80Hz; 9) B = 32,0mT, t = 990s, f = 90Hz; 10) B = 32,0mT, t = 990s, f =100Hz.

*2 Parametry stymulacji kolejnych próbek: 1) B = 109,3mT, t = 420s, f = 10Hz; 2) B = 90,2mT, t = 690s, f = 20Hz; 3) B = 74,5mT, t = 930s, f = 30Hz; 4) B = 60,8mT, t = 1110s, f = 40Hz; 5) B = 53,8mT, t = 1710s, f = 50Hz; 6) B = 48,1mT, t = 3300s, f = 60Hz; 7) B = 43,2mT, t = 5400s, f = 70Hz; 8) B = 37,8mT, t = 8790s, f = 80Hz; 9) B = 33,5mT, t = 13500s, f = 90Hz; 10) B = 32,0mT, t = 19800s, f = 100Hz.

*3 Parametry stymulacji kolejnych próbek: 1) B = 32,0mT, t = 1200s, f = 50Hz; 2) B = 32,0mT, t = 1200s, f = 100Hz;
3) B = 32,0mT, t = 600s, f = 50Hz; a następnie zmiana parametrów na: B = 32,0mT, t = 600s, f = 100Hz; 4) B = 32,0mT, t = 960s, f = 10Hz; 5) B = 32,0mT, t = 960s, f = 50Hz; 6) B = 32,0mT, t =480 f = 50Hz; a następnie zmiana parametrów na B = 32,0mT, t = 480s, f = 10Hz.

Rys. 4. Schemat koncepcyjny wykonanych pomiarów

Źródło: Opracowanie własne

2.2. Analiza generowanej energii cieplnej

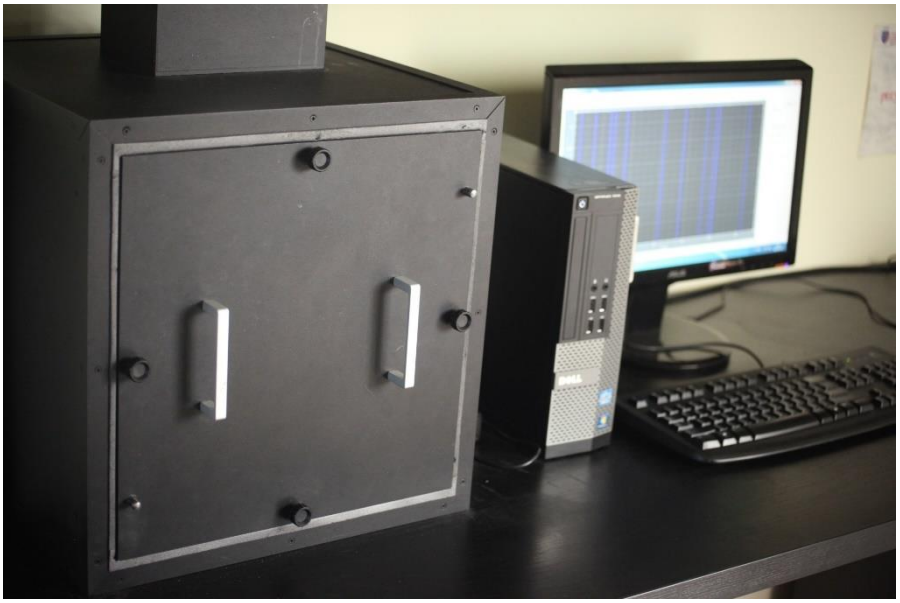
Przed przystąpieniem do właściwych badań, na każdym z etapów konstrukcji stanowiska wykonywano pomiary mające na celu określić ilość energii cieplnej generowanej przez stanowisko. Kontrola temperatury w obszarze roboczym, w którym umieszczano próbówkę z materiałem badawczym była niezbędna ze względu na właściwości termiczne substancji biologicznych. Jako temperaturę graniczną przyjęto nieprzekraczalną wartość 40˚C, co zostało szczegółowo opisane i wyjaśnione w rozdziale 3.2 Etap II.

Omawiane pomiary energii cieplnej przeprowadzono w oparciu o trzy odmienne metody. Pierwsza z nich bazowała na wykorzystaniu kamery termowizyjnej. Posłużono się kamerą marki FLIR (model TG275), posiadającą niechłodzoną matrycę bolometryczną, czyli rezystor o niewielkiej pojemności cieplnej, ale znacznym, ujemnym współczynniku temperaturowym zmian rezystancji. W praktyce oznacza to, że detektor kamery pod wpływem mierzonego promieniowania zmieniał swoją rezystancję. Rozdzielczość danego urządzenia wynosi 160x120 pikseli i charakteryzuje się częstotliwością 8,7 Hz, a także czułością termiczną wynoszącą 70 mK. Kamera była umieszczona na statywie fotograficznym i każdorazowo kierowana prostopadle do mierzonej powierzchni, na wysokości równej położeniu rdzenia powietrznego cewki. W celu weryfikacji wartości temperatury wskazywanej przez kamerę termowizyjną, a także ze względu na konieczność ujednolicenia skali barwowej rejestrowanych zdjęć (co ułatwia późniejszą interpretację wyników), w drugiej metodzie przeprowadzono pomiar temperatury przy wykorzystaniu powszechnie stosowanego pirometru marki Magnusson, o błędzie pomiaru wynoszącym 2%. Podobnie jak w przypadku kamery termowizyjnej, był on umieszczany na statywie i kierowany prostopadle do mierzonej powierzchni.

Trzecią z zastosowanych metod był pomiar mocy generowanej przez cewkę elektromagnetyczną. W tym celu do układu podłączono miernik marki Lutron (model DW-6090), który pozwala na pomiar mocy (do 6000 W z dokładnością równą ±1,5%), napięcia, natężenia prądu przemiennego oraz wartości cosφ, a jednocześnie może pracować w szerokim zakresie częstotliwości prądu wynoszącym od 10 Hz do 1000 Hz.

2.3. Pomiar emisji fotonowej

Pomiar emisji fotonowej został przeprowadzony na prototypowym stanowisku badawczym (rys. 5) zgodnie z akredytowaną procedurą badawczą PB-01 wydanie 1 z dnia 20.09.2018 r. opracowaną w Laboratorium Eksperymentalnych Technik Badawczych Surowców i Produktów Biologicznych (nr akredytacji PCA - AB 1698) Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie.



Rys. 5 Stanowisko do pomiaru emisji fotonowej

Fot. E. Popardowski

Każda próbka przeznaczona do badań była uprzednio umieszczana w opakowaniu światłoszczelnym i przechowywana w temperaturze 25°C przez okres 24 godzin. Zastosowana stabilizacja materiału przed pomiarem jest determinowana przez temperaturę, w której notuje się najwyższą aktywność biologiczną substancji organicznych. Badania przeprowadzane na materiałach roślinnych (Rehman i in. 2019) oraz drobnoustrojach (Wu i in. 2017; Falade i in. 2019; Jang i in. 2019) wskazują, iż optimum temperaturowe (w zależności od stosowanego materiału) jest osiągane dla zakresu od 25°C do 40°C. Badania pilotażowe prowadzone przez autora dysertacji na stanowisku do pomiaru emisji fotonowej wykazały, że miód, niezależnie od gatunku i pochodzenia, emituje najwyższą ilość fotonów w temperaturze 25°C. Poniżej oraz powyżej tej temperatury emisja maleje. Wnioski są zatem zbieżne z wynikami otrzymywanymi przez innych autorów mierzących aktywność biologiczną konwencjonalnymi metodami. W trakcie stymulacji próbek polem elektromagnetycznym, a następnie podczas pomiaru emisji fotonowej materiał znajdował

się w pomieszczeniu pozbawionym dostępu światła dziennego, o ściśle kontrolowanych warunkach środowiskowych (temperatura i wilgotność powietrza). Pomiar polegał na umieszczeniu wcześniej poddanej działaniu pola elektromagnetycznego próbki materiału znajdującej się w probówce zabezpieczonej korkiem polietylenowym, wewnątrz światłoszczelnej komory. W trakcie pomiaru emisji fotonowej próbki znajdują się w osi symetrii szczeliny fotopowielacza. Pomiar zaników fluorescencji metodą skorelowanego w czasie zliczania pojedynczych fotonów był wizualizowany w czasie rzeczywistym na ekranie komputera i archiwizowany w sposób automatyczny w jego pamięci. Sposób działania opisywanego stanowiska polegał na zliczaniu pojedynczych fotonów metodą TCSPC (ang. time-correlated single photon counting), za pomocą fotopowielacza umieszczonego nad komorą pomiarową, której parametry mogą być regulowane przy wykorzystaniu oryginalnego oprogramowania BioLumi. Program ten zapisuje zliczone fotony jako impulsy (imp) przypadające na jednostkę czasu. Interwał czasowy przebywania próbki w komorze pomiarowej został określony w Procedurze Badawczej i wynosił 600 sekund. Wyniki pomiaru emisji fotonowej stanowią bezwzględną różnicę między liczbą impulsów zarejestrowanych przez fotopowielacz w komorze z materiałem, a liczbą impulsów zarejestrowanych przez fotopowielacz w komorze światłoszczelnej bez materiału, według zależności (wzór 8):

$$E = L_A - L_P \tag{8}$$

gdzie: E – emisja fotonowa [imp·600s^{-1}],

L_A - liczba impulsów emitowana przez próbkę umieszczona w komorze światłoszczelnej [imp·600s^{-1}],

L_P - liczba impulsów emitowana przez pustą komorę światłoszczelną [imp·600s^{-1}].

2.3.1 Niepewność pomiarowa

Szacowanie niepewności pomiaru emisji fotonowej przeprowadzono w oparciu o eksperyment wewnątrzlaboratoryjny, polegający na wykonaniu przez dwóch operatorów pomiaru próbek wybranego miodu, przy wykorzystaniu tego samego sprzętu. Każdy z operatorów powtórzył oznaczenie 6 razy. Liczba powtórzeń, jak również rozłożenie badań w czasie zapewnia spełnienie warunków powtarzalności i odtwarzalności metody. Szacowanie niepewności pomiaru zostało przeprowadzone zgodnie z wymaganiami normy (PKN 2018), i wytycznych Europejskiego Centrum Akredytacji (EA 2003). Materiał stanowił miód wyselekcjonowany do badań na podstawie jednorodności składu oraz stałości parametrów w czasie, co zostało szczegółowo opisane w rozdziale 4.1.

Przed przystąpieniem do określenia niepewności pomiarowej metody, za pomocą testu Dixona sprawdzono czy wyniki nie są obarczone tzw. błędami grubymi. W tym celu wyniki uszeregowano w ciąg rosnący ($x_1 \leq x_2 \leq x_3 \ldots x_{n-1} \leq x_n$), obliczono poszczególne parametry charakterystyczne testu tj. Q_1 oraz Q_n (wzór 9 i 10) i porównano je z wartością krytyczną odczytaną z tablic (Konieczka i Namieśnik 2013).

$$Q_1 = \frac{x_2 - x_1}{x_{n-1} - x_1} \tag{9}$$

$$Q_n = \frac{x_n - x_{n-1}}{x_n - x_2} \tag{10}$$

W celu określenia powtarzalności pomiarów wyliczono kolejno: odchylenie standardowe (s_{pow}), granicę powtarzalności (wzór 11) i współczynnik zmienności (wzór 12).

$$r = t_{(\alpha,f)} \cdot \sqrt{2} \cdot s_r \tag{11}$$

$$\%s_r = \frac{s_r}{x_{śr}} \cdot 100\% \tag{12}$$

gdzie: $\sqrt{2}$ oznacza, że różnice między wynikami powtarzanych badań dotyczą dwóch analiz tej samej próbki;
s_r – odchylenie standardowe powtarzalności;
$x_{śr}$ – wartość średnia uzyskanych wyników;
$t_{(\alpha,f)}$ – wartość z rozkładu t-Studenta dla liczby stopni swobody f = n-1 i poziomu istotności 95%.

Jedynym ze źródeł złożonej niepewności standardowej jest niepewność standardowa odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej. Do wyznaczenia odtwarzalności zastosowano następujące wskaźniki: odchylenie standardowe w warunkach odtwarzalności (wzór 13), granicę odtwarzalności (wzór 14), a także współczynnik zmienności odtwarzalności (wzór 15).

$$\left.\begin{aligned} S_R &= \sqrt{s_r^2 + s_l^2} \\ s_l &= \sqrt{\frac{s_{śr}^2 - s_r^2}{n_o}} \\ n_o &= \frac{1}{m-1} \cdot \left(\sum_{j=1}^{m} n_j - \frac{\sum_{j=1}^{m} {n_j}^2}{\sum_{j=1}^{m} n_j}\right) \end{aligned}\right\} \quad (13)$$

gdzie: s_{pow}^2 oznacza, odchylenie standardowe powtarzalności;
s_l – odchylenie standardowe międzygrupowe;
$s_{śr}$ – odchylenie standardowe średnich;
n_o – średnia liczność serii pomiarowej;
m – liczba wykonanych serii pomiarowych;
n_j – wartość kolejnych powtórzeń w serii pomiarowej.

$$R = t_{(\alpha,f)} \cdot \sqrt{2} \cdot s_r \quad (14)$$

$$\%s_R = \frac{s_r}{x_{śr}} \cdot 100\% \quad (15)$$

Niepewność rozszerzona policzona została na poziomie ufności 95% i przy tzw. współczynniku rozszerzenia k=2. Uwzględnia ona również niepewność pomiarową wagi stosowanej do określania masy próbki. Na podstawie wykonanych analiz stwierdzono, że dla badanego rodzaju miodu niepewność rozszerzona pomiaru emisji fotonowej wynosi 3 imp·600s^{-1} (tj. 4,2%).

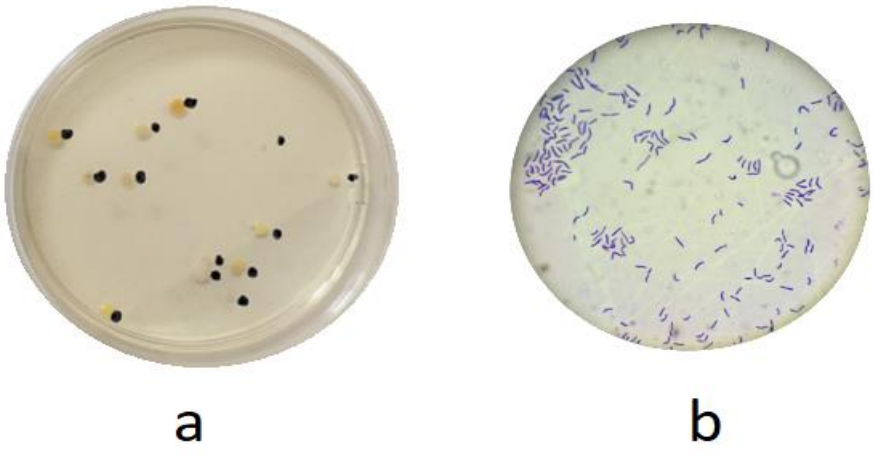
2.4. Badania mikrobiologiczne

Próbki materiału po stymulacji zmiennym polem elektromagnetycznym oraz niepoddane jego działaniu, tj. stanowiące próbę kontrolną, zostały poddane analizom mikrobiologicznym. Pobrany materiał w postaci miodu został seryjnie rozcieńczony zgodnie z normą *PN-EN ISO 6887-1* (PKN 2017). W miodzie określano obecność trzech parametrów: całkowitej liczby drobnoustrojów zdolnych do wzrostu i tworzenia kolonii w pożywce stałej po inkubacji w warunkach tlenowych w temperaturze 30°C, zgodnie z normą PN-EN ISO 4833-1:2013-12 (PKN 2013), liczby żywych osmofilnych drożdży

i kserofilnych pleśni w produktach o aktywności wody niższej lub równej 0,95, zgodnie z normą *PN-ISO 21527-2:2009* (PKN 2019); a także obecności bakterii beztlenowych z rodzaju *Clostridium sp.* w badanym materiale na podłożu laktozowo-siarczynowym, zgodnie z metodyką przedstawioną przez Neut i in. (1985).

Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów metodą posiewu wgłębnego w temperaturze 30°C pozwala określić ilość wszystkich jednostek mikroskopijnej wielkości, obejmujących bakterie, grzyby, pierwotniaki i wirusy, występujących w badanym materiale. Procedura polega na przeniesieniu 1 ml zawiesiny wyjściowej o rozcieńczeniu 10^{-1} do jałowej, polistyrenowej szalki Petriego, a następnie naniesieniu 15 ml pożywki agarowej (PCA), o temperaturze 45±1°C, uprzednio sterylizowanej w autoklawie (warunki sterylizacji: temperatura 121°C, czas 15 minut).

Jako rozcieńczalnik zastosowano wodę peptonową (stężenie masowe 0,1%), będącą wodnym roztworem enzymatycznego hydrolizatu kazeiny (1,0 $g \cdot l^{-1}$) oraz chlorku sodu (8,5 $g \cdot l^{-1}$). Kolejno, przy użyciu wytrząsarki orbitalnej o nastawie obrotów równej na minutę równej 10 min^{-1} i czasie pracy wynoszącym 3 minuty, inokulum zostało równomiernie rozprowadzone w pożywce. Powstałą mieszaninę pozostawiono do zestalenia, po czym zalano powtórnie 4 ml pożywki. Przygotowany w ten sposób materiał do badań inkubowano w cieplarce, w temperaturze 30±1°C przez 72 godziny. Do pomiaru liczebności drobnoustrojów zastosowano metodę ręcznego oznaczania pojedynczych kolonii (rys. 6). Uwzględniano w tym przypadku kolonie punktowe, a tzw. rozlane kolonie potraktowano jako kolonię pojedynczą.



Rys. 6 Przykład wyhodowanych kolonii bakterii a) zliczane bezpośrednio na szalce Petriego b) obserwowane pod mikroskopem (przybliżenie 1000x)

Źródło: opracowanie własne

Cała procedura została powtórzona dla każdej kombinacji parametrów pola elektromagnetycznego - dwukrotnie dla rozcieńczenia 10^{-1} oraz 10^{-2}. Otrzymane wartości przeliczono poprzez zastosowanie wzoru 16 dla liczby kolonii na pojedynczej próbce, mieszczącej się w przedziale od 4 do 10 kolonii lub wzoru 17 dla próbek o liczbie kolonii przekraczającej 10. W przypadku wyznaczenia mniej niż 4 kolonii w próbce, przyjmuje się, że liczba drobnoustrojów jest znikoma. Wyniki zostały podane w jednostkach tworzących kolonie [jtk] (ang. cfu - colony forming units) w 1g badanego materiału.

$$L_b = \frac{\sum C}{V \cdot d} \tag{16}$$

gdzie: L_b- liczba drobnoustrojów w badanym materiale [jtk·g^{-1}];

$\sum C$- suma kolonii na dwóch wybranych, liczonych płytkach z dwóch kolejnych rozcieńczeń, z których co najmniej jedna zawiera minimum 10 kolonii [szt.];

V - objętość inokulum naniesionego na każdą płytkę [ml];

d - wskaźnik rozcieńczenia odpowiadający pierwszemu liczonemu rozcieńczeniu [-].

$$L_b = \frac{\sum C}{V \cdot 1{,}1 \cdot d} \tag{17}$$

Oznaczenia jak we wzorze 16.

Horyzontalna metoda oznaczania liczby drożdży i pleśni, poprzez zliczanie kolonii w temperaturze 25±1°C, pozwala na oznaczenie liczby grzybów mających zdolność do wzrostu przy aktywności wody niższej lub równej 0,95 (w przypadku miodów aktywność wody przyjmuje wartości równe lub wyższe od 0,6, ale nie przekraczające 0,9). Procedura polegała na przeniesieniu 0,1 ml zawiesiny wyjściowej o rozcieńczeniu 10^{-1} do jałowej, polistyrenowej szalki Petriego, na której umieszczono uprzednio pożywkę agarową DG18. Podobnie jak w przypadku wcześniejszych oznaczeń, jako rozcieńczalnik zastosowano wodę peptonową o stężeniu masowym równym 0,1%. Jałową szpatułką Drigalskiego rozprowadzono inokulum równomiernie po powierzchni pożywki, do momentu jego wchłonięcia. Tak przygotowany materiał inkubowano w cieplarce, w temperaturze 25±1°C przez 5 dni. Zliczanie kolonii odbywało się poprzez

ręczne oznaczanie każdego skupiska komórek grzybowych, a następnie ich sumowanie. Procedura została powtórzona dla każdej partii materiału - dwukrotnie dla rozcieńczenia 10^{-1} oraz dwukrotnie dla 10^{-2}. Wzory oraz jednostki stosowane do wyznaczenia liczby drożdży i pleśni, pokrywają się ze standardami przedstawionymi w metodzie określania liczby drobnoustrojów.

Obecność bakterii z rodzaju *Clostridium sp*., zarówno form wegetatywnych jak i zarodników, została określona na podstawie testu, którego wyniki mają charakter binarny, tj. potwierdzają lub zaprzeczają obecności opisywanej grupy bakterii w badanym materiale. Bakteria ta produkuje botulinę (tzw. jad kiełbasiany), będącą substancją bezbarwną, bezwonną i bezsmakową, a jednocześnie stanowiącą jedną z najbardziej niebezpiecznych znanych ludzkości, naturalnie wytwarzanych toksyn (Lund i Peck 2013). Liczne badania, w tym prowadzone na miodach pochodzenia polskiego, wskazują na obecność zarodników *Clostridium botulinum* w wielu analizowanych miodach (Wojtacka i in. 2016; Wojtacka i in. 2017; Pinheiro i in. 2018; Grenda i in. 2018; Maikanov i in. 2019).

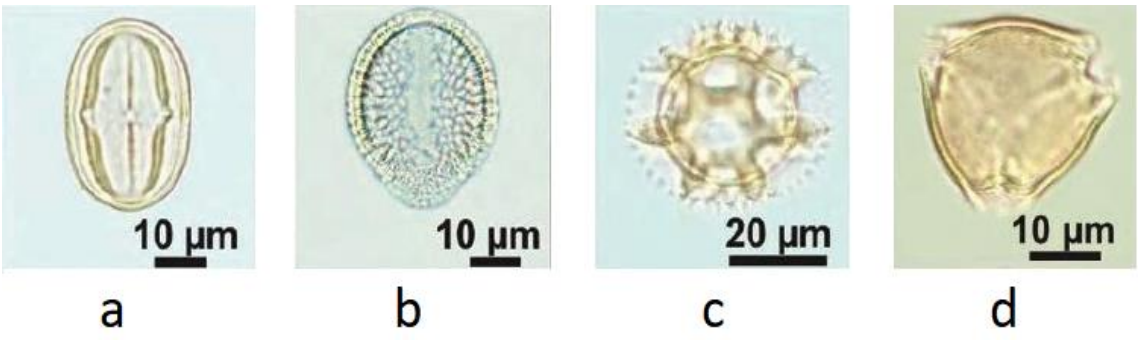
Procedura określania obecności *Clostridium sp.* polegała na przeniesieniu 0,5 ml zawiesiny wyjściowej o rozcieńczeniu 10^{-1} do wysterylizowanej w autoklawie, szklanej probówki o pojemności 25 ml, w której umieszczono uprzednio pożywkę laktozowo-siarczynową (LS). Jako rozcieńczalnik zastosowano wodę peptonową o stężeniu masowym równym 0,1%. W celu zapewnienia warunków beztlenowych, probówka została zamknięta od góry poprzez trzpień utworzony z trzyprocentowego roztworu agaru tryptonowo-sojowego (TSA). Tak przygotowane próbki inkubowano w cieplarce, w temperaturze 30±1°C przez 3 dni. Procedura została powtórzona dla każdej partii materiału - dwukrotnie dla rozcieńczenia 10^{-1} oraz 10^{-2}. Wytrącenie się związku w postaci siarczku żelaza (II), widocznego jako odbarwienie mieszaniny na kolor czarny oraz wytworzenie siarkowodoru, który powodował wypychanie trzpienia agarowego, było znakiem obecności przedmiotowych bakterii.

Wykorzystywane, znormalizowane metody mikrobiologiczne, bazujące na zliczaniu pojedynczych kolonii drobnoustrojów w ramach kolejnych rozcieńczeń, są powszechnie stosowane, ze względu na brak konieczności dysponowania zaawansowanym sprzętem lub trudnodostępnymi odczynnikami. Jednakże, metody te obarczone są znacznym błędem, który wynika z konieczności ręcznego oznaczania i zliczania grup drobnoustrojów. Zgodnie z przyjętą normą (PKN 2013), maksymalna różnica

bezwzględna między dwoma pojedynczymi, niezależnymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, na identycznym materiale badawczym, w tym samym laboratorium, przez tego samego analityka z użyciem tego samego sprzętu, w krótkim odstępie czasu nie jest większa niż wartość $0{,}25\,log_{10}N$, gdzie N oznacza liczbę drobnoustrojów w badanym materiale. Określony błąd pomiarowy jest miarodajny jedynie dla niewielkich ilości kolonii. W praktyce, jak wskazują Stefaniuk, Bosacka i Hryniewicz (2015), dla metod mikrobiologicznych precyzję pomiaru określa się przy użyciu współczynnika zmienności. Zgodnie z raportem organizacji PDA (Parenteral Drug Association) zrzeszającej producentów farmaceutycznych i biofarmaceutycznych, jeżeli współczynnik ten osiąga wartości w zakresie 15-30%, to precyzję pomiaru można uznać za akceptowalną (PDA 2013).

2.5. Analizy melisopalinologiczne

W celu identyfikacji gatunku miodu oraz weryfikacji, czy został on wytworzony z pyłku roślin, które deklaruje producent, wykonano badanie metodą melisopalinologiczną, opisaną przez Von Der Ohe i in. (2004) oraz Ibrahim, Reuter i Spivak (2007). Metoda ta polega na obserwacji przy pomocy mikroskopu uprzednio przygotowanego i odbarwionego preparatu na bazie miodu, w celu wyszczególnienia w nim ziaren pyłków roślin (rys. 7). W przeprowadzonych badaniach nie uwzględniano liczebności poszczególnych ziaren pyłku, a jedynie identyfikowano ich rodzaj. W tym przypadku konieczne było użycie odpowiednich atlasów (Stuchlik 2001; Da Silva i in. 2020).



Rys. 7 Przykłady pyłków roślin miododajnych: a) koniczyna biała; b) rzepak ozimy; c) śliwa domowa; d) mniszek lekarski

Źródło: Da Silva i in. 2020

Przygotowanie preparatu mikroskopowego polegało na rozpuszczeniu 10±0,1 g miodu w 20 ml wody destylowanej o temperaturze 35±1°C i odwirowaniu przygotowanej

mieszaniny przy parametrach nastawy wirówki laboratoryjnej równych 1000 rpm (ang. rate per minute) i czasie 10 minut. Następnie zdekantowano ciecz znad osadu i za pomocą pipety Pasteura dodano kolejne 20 ml wody destylowanej kierując jej strumień na dno probówki, aby umożliwić rozpuszczenie ewentualnych pozostałości miodu. Kolejno powtórzono proces odwirowywania, skracając jego czas do 5 minut. W łaźni wodnej o temperaturze wody równej 40°C podgrzano żelatynę glicerynową Kaisera i odbarwiono ją fuksyną zasadową w ilości 1 ml fuksyny na 10 ml żelatyny. Na podstawowe szkiełko mikroskopowe wprowadzono za pomocą pipety pozostały po wirowaniu osad i równomiernie rozprowadzono go po uprzednio wyznaczonym kwadracie o wymiarach 22 x 22 mm. Po wyschnięciu preparatu zabezpieczono go szkiełkiem nakrywkowym, na którym umieszczono wcześniej kilka kropel zabarwionej żelatyny glicerynowej. Po zestaleniu, przygotowany materiał identyfikowano przy użyciu mikroskopu optycznego wyposażonego w obiektyw o 150-krotnym powiększeniu.

2.6. Analizy statystyczne

Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu pakietu statystycznego PQStat (wersja 1.8.2.156). Normalność rozkładu badanych parametrów analizowano testem Kołmogorova-Smirnova, a jednorodność wariancji między grupami porównywano testem Levenea.

W pierwszym doświadczeniu, tj. podczas stymulacji materiału polem o stałej indukcji magnetycznej i stałym czasie trwania oddziaływania, ze skokowymi zmianami częstotliwości, zależność emisji fotonowej (wyrażonej w imp·600 s^{-1}) od częstotliwości (wyrażonej
w Hz) porównywano jednoczynnikową analizą wariancji oraz testem post-hoc Fishera, analizując dodatkowo trend. Oszacowano również model regresji linowej predykcji emisji w zależności od częstotliwości.

W drugiej części badań (stymulacja materiału polem o zmiennej indukcji i stałym czasie trwania oddziaływania, ze skokowymi zmianami częstotliwości), w celu uproszczenia analizy, wartość określoną jako liczba bakterii poddano transformacji logarytmicznej o podstawie równej 10. Zgodnie z metodyką oznaczania liczby drobnoustrojów otrzymany wynik przedstawia się w postaci wykładniczej (tzw. notacji naukowej), a zastosowanie logarytmu dziesiętnego pozwala przekształcić uzyskane wyniki do powszechnie stosowanego zapisu liczb rzeczywistych, ułatwiając tym samym ich interpretację. Wynik po logarytmowaniu pozwala bezpośrednio określić rząd

wielkości badanego parametru. Przykładowo, jeśli wynik logarytmowania wynosi 2, to liczba bakterii jest równa 100, a jeśli wynikiem logarytmu jest liczba 3, to liczba bakterii jest równa 1000 itd. Ponadto, logarytm wyliczany jest z wyrażenia (n+1). Jest to spowodowane własnością logarytmu, dla którego liczba logarytmowana nie może wynosić 0, z kolei logarytm z wartości 0+1 wynosi 0. Podobnie jak dla poprzedniej analizy liczbę bakterii [jtk·g^{-1}] log10(n+1) w zależności od częstotliwość [Hz] porównywano jednoczynnikową analizą wariancji oraz testem post-hoc Fishera, wskazując również równanie regresji predykcji emisji w zależności od częstotliwości.

Emisję fotonową i liczbę bakterii w zależności od indukcji, czasu, dawki i częstotliwości analizowano szacując modele jedno- i wieloczynnikowej regresji liniowej. Za istotne uznano prawdopodobieństwo testowe na poziomie $p<0,05$, a za wysoce istotne przyjęto prawdopodobieństwo testowe na poziomie $p<0,01$.

3. Opis systemu technicznego

W Etapie I sformułowano zadanie koncepcyjne podjęte w pracy. Określono warunki brzegowe określające założenia systemu, na podstawie których powstał model funkcjonalny. Przedstawiono parametry skonstruowanego systemu oraz opracowano w środowisku FEMM wirtualny model elementu roboczego w postaci cewki z rdzeniem powietrznym. Skonstruowane stanowisko sparametryzowano pod względem równomierności rozkładu temperatury.

W Etapie II scharakteryzowano zmiany w połączeniu uzwojeń cewki, a także zweryfikowano rozkład indukcji magnetycznej w jej obszarze roboczym. Określono niepewność generowanych parametrów. Następnie, opisano modyfikację systemu chłodzenia cieczą i zaprezentowano strukturę generowanej mocy cieplnej w zależności od częstotliwości i natężenia prądu elektrycznego. Uzyskane w ten sposób wyniki zestawiono z mocą chłodniczą. Ponadto, zaprezentowano wykonaną obudowę separującą cewkę od reszty elementów systemu.

W Etapie III przedstawiono, wprowadzony jako dodatkowy, układ chłodzenia powietrzem, a także zobrazowano zmiany w mocy chłodniczej po przeprowadzonej modyfikacji. Zaprezentowano widmo energii cieplnej dla wartości skrajnych rozpatrywanego zakresu częstotliwości. Wprowadzono kod źródłowy opisujący ruch ramienia robota, które zostało dołączone do systemu. Na końcu tego etapu zwizualizowano ukończony system.

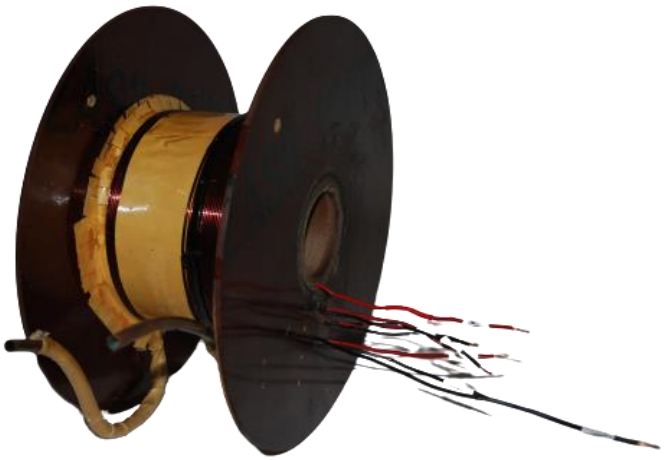
3.1. Etap I

Pierwszy prototyp systemu bazował na istniejącej już koncepcji wykorzystania solenoidu do indukowania zmiennego pola elektromagnetycznego, oddziałującego na materiał biologiczny znajdujący się w rdzeniu powietrznym cewki. Takie stanowisko powstało na Wydziale Inżynierii Produkcji i Energetyki Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie i służyło do stymulacji sadzeniaków (Marks i Szecówka 2010; Marks i Szecówka 2011). W omawianym stanowisku, uzwojenie cewki zostało wykonane z miedzianych rurek, wewnątrz których krążył czynnik chłodzący w postaci wody. Zasilanie odbywało się przy pomocy specjalnie zaprojektowanego transformatora o mocy 15 kVA, który pozwalał na zmianę uzyskanej na wyjściu indukcji magnetycznej pola w obrębie trzech wartości, tj. 20, 40 lub 80 mT.

W zadaniu koncepcyjnym, podjętym w niniejszej pracy doktorskiej, zdecydowano się na wykonanie modelu funkcjonalnego, w którym uwzględniono następujące założenia:

- regulacja indukcji pola będzie następowała w sposób płynny, a nie skokowy, dając możliwość oscylacyjnego charakteru stymulacji materii organicznej w czasie;
- wymiary cewki zostaną pomniejszone (materiał badawczy będą stanowić próbki umieszczone w probówkach), a sam rdzeń powietrzny cewki będzie charakteryzował się długością wynoszącą 100 mm oraz średnicą równą 50 mm;
- stanowisko będzie umożliwiało płynną i oscylacyjną zmianę częstotliwości prądu zasilającego, ze szczególnym uwzględnieniem niskich częstotliwości (od 10 do 100 Hz);
- cewka elektromagnetyczna będzie posiadała uzwojenie, które może być konfigurowane w zależności od wymagań procesu stymulacji, bez konieczności ingerencji w budowę cewki.

Powstały system, uwzględniający przyjęte założenia składał się z generatora sygnałów (oscylatora RC) typu G502, który pozwala na wytworzenie sygnału sinusoidalnego lub prostokątnego, w zakresie częstotliwości od 10 Hz do 100 kHz; regulowanego źródła prądowego, w postaci wzmacniacza mocy pasma akustycznego (model M.2600) o mocy 2000 W oraz cewki o rdzeniu powietrznym, której wewnętrzna średnica wynosiła 50 mm (grubość ścianek karkasu równa 2 mm), a długość całkowita - 100 mm (rys. 8).

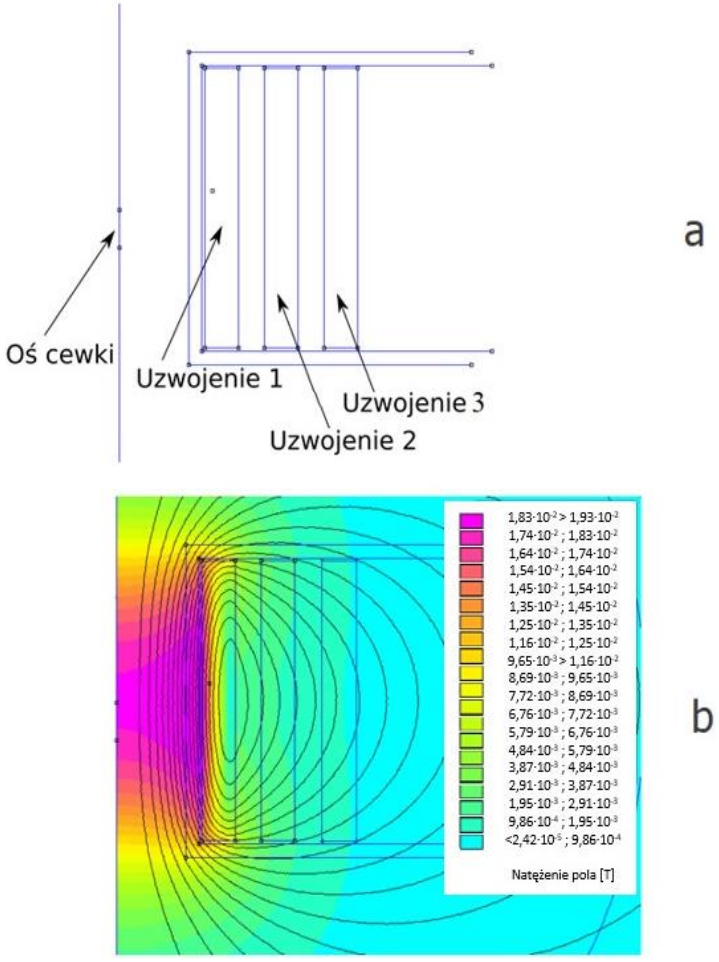


Rys. 8. Cewka stanowiąca element roboczy stanowiska do stymulacji materiału biologicznego zmiennym polem elektromagnetycznym

Fot. E. Popardowski

Zgodnie z prawem Biota-Savarta oraz przy założeniu braku zmian właściwości cewki w czasie, a także stałej przenikalności magnetycznej powietrza, indukcja magnetyczna

pola zależy głównie od natężenia prądu elektrycznego. Aby zwiększyć prąd płynący w układzie zastosowano wzmacniacz akustyczny, który poza opisywaną własnością, pozwalał dodatkowo na realizację dwóch niezależnych obwodów (wzmacniacz dwukanałowy). Ponieważ jednak urządzenie to do prawidłowej pracy musi zostać obciążone rezystancją wyższą niż ta, którą posiada cewka, układ został wyposażony w dwa rezystory, po 4 Ω każdy. Takie rozwiązanie pozwoliło uzyskać stanowisko, w którym możliwa jest płynna regulacja indukcji magnetycznej oraz napięcia w przedziale 0-55 V prądu przemiennego. Podobną konstrukcję zastosowali Potylitsyn, Maykov i Kudinov (2020). Solenoid został zbudowany na zamówienie, zgodnie z dostarczoną specyfikacją. Uprzednio jednak wykonano model (rys. 9), przedstawiający rozkład indukcji magnetycznej w projektowanej cewce. Posłużono się w tym celu środowiskiem FEMM (ang. Finite Element Method Magnetics), służącym do analizy układów płaskich i osiowo symetrycznych metodą elementów skończonych dla pól elektrycznych i magnetycznych niskich częstotliwości.



Rys. 9. Przekrój zastosowanej cewki a) schemat b) model opracowany w środowisku FEMM

Źródło: opracowanie własne

Moodel przedstawia rozkład indukcji magnetycznej wyrażonej w teslach dla prądu przemiennego równego 3 A i liczby zwojów wynoszącej 677 (pierwsza pętla uzwojenia). Ze względu na symetrię osiową solenoidu wygenerowany przez program obraz przedstawia jedynie fragment analizowanej cewki.

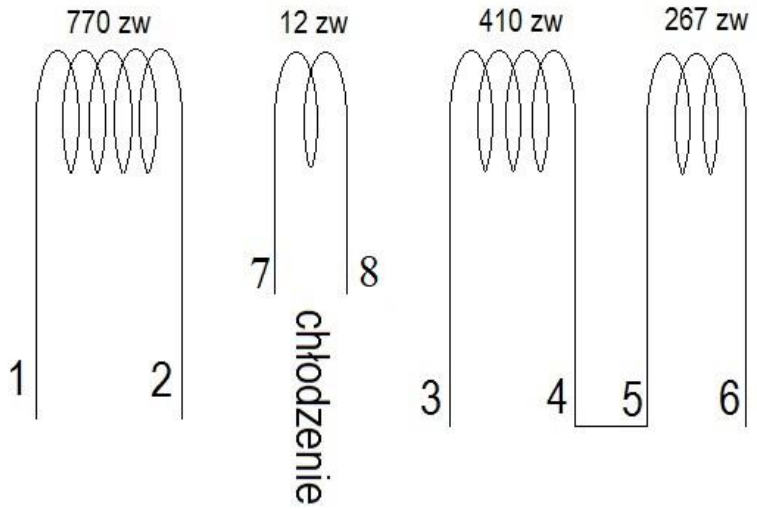
Miedziane uzwojenie zostało nawinięte tak, aby utworzyć trzy niezależne pętle, których końce zostały wyprowadzone na zewnątrz cewki. Takie rozwiązanie pozwala na ewentualne konfigurowanie stanowiska przez użytkownika, według specyfikacji parametrów stymulacji materii organicznej. Wykonano uzwojenie z miedzianej rurki o średnicy wewnętrznej 6,35 mm. Wymiar ten był determinowany z jednej strony koniecznością odbierania przez czynnik chłodzący, krążący we wnętrzu tego uzwojenia, energii cieplnej od elementów roboczych, z drugiej strony potrzebą zapewnienia jednorodności rozkładu pola elektromagnetycznego w centralnej części rdzenia cewki. Zastosowanie miedzi jako materiału na chłodnicę cewki jest powszechną praktyką wynikającą z jednej strony ze stosunkowo wysokiej przewodności cieplnej (370-400 $W \cdot (m \cdot K)^{-1}$), z drugiej - niskiej względnej przenikalności magnetycznej (0,99). Na tym etapie zdecydowano o użyciu wody jako medium chłodniczego, które było rozprowadzane poprzez zastosowanie pompy obiegowej Renkforce o wydajności 6,7 $l \cdot min^{-1}$, która była zasilana czynnikiem chłodzącym o stałej temperaturze wynoszącej 7°C. Charakterystykę stanowiska wykonano przy wykorzystaniu czujnika pola elektromagnetycznego SMS-102 Smart Magnetic Sensor. Zgodnie z parametrami przedstawionymi przez producenta, błąd pomiaru przy użyciu opisanego urządzenia dla prądu przemiennego wynosił ±1%. Próbkowanie odbywało się z częstotliwością co 10 mm, wzdłuż osi cewki.

Etap ten zakończono parametryzacją stanowiska pod względem równomierności rozkładu temperatury, zarówno wzdłuż osi poprzecznej, jak i podłużnej solenoidu. Zabieg ten miał na celu określić, czy system chłodzenia odprowadza wytwarzaną energię cieplną w jednakowym stopniu z całej powierzchni części roboczych cewki. Istnienie jakiejkolwiek nierównomierności mogłoby skutkować nie tylko przegrzewaniem się uzwojenia, ale również zintensyfikowanym podgrzewaniem miejscowym części materiału, co w konsekwencji mogłoby prowadzić do uszkodzenia struktur biologicznych na skutek działania czynnika termicznego. Do identyfikacji rozkładu temperatury posłużono się kamerą termowizyjną FLIR TG275. Zdjęcia obejmowały dwie płaszczyzny stanowiska, tj. płaszczyznę równoległą do osi poprzecznej

cewki, umożliwiającą wizualizację zmian temperatury rdzenia cewki oraz płaszczyznę prostopadłą, przedstawiającą uzwojenie cewki i jego nagrzewanie w czasie. Omawiana parametryzacja termiczna została przeprowadzona dla trzech wartości indukcji magnetycznej (określonych jako minimalna, średnia i maksymalna), osobno dla każdej częstotliwości pola z przedziału 10-100 Hz. Dodatkowo w celu ujednolicenia skali barwowej otrzymanych zdjęć, przy pomocy pirometru określono temperaturę poszczególnych elementów. Badania te zostały powtórzone i szczegółowo opisane w kolejnych etapach.

3.2. Etap II

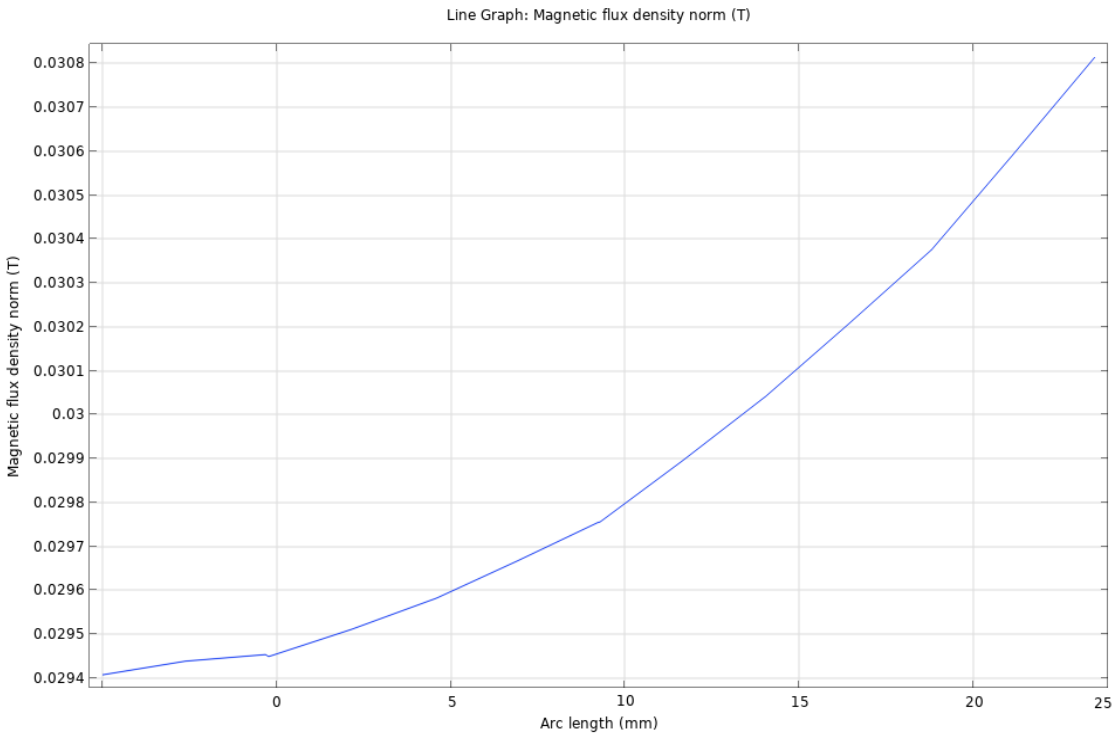
Po pozytywnej walidacji modelu funkcyjnego, która wykazała, że zbudowany system może być stosowany do różnicowania aktywności biologicznej substancji organicznej, a także po identyfikacji tzw. słabych punktów, podjęto decyzję o modyfikacji. Celem wprowadzonych zmian miało być uzyskanie stanowiska, które będzie pozwalało na generowanie sygnału sinusoidalnego w stabilnych warunkach termicznych i uzyskiwanie indukcji magnetycznej o niskich wartościach (poniżej 100 mT), ale także będzie zapewniało równomierny rozkład indukcji oraz temperatury uzwojenia na całej długości cewki. W tym celu pozostawiono główne elementy składowe, tj. solenoid, generator sygnałowy oraz wzmacniacz mocy. Zastosowano jednak inne połączenie zwojów. Przeanalizowano wszystkie kombinacje połączeń uzwojenia cewki pod kątem równomierności rozkładu pola elektromagnetycznego. W tym celu wyznaczono (analogicznie do etapu I) charakterystykę stanowiska, obejmującą pomiary czujnikiem pola elektromagnetycznego. Do określenia wartości indukcji magnetycznej zastosowano miernik marki Phywe, model 13610-93, który umożliwia automatyczny zapis sekwencji pomiarów, a jego dokładność pomiarowa dla prądu przemiennego wynosi ± 0,1 mT. Próbkowanie ponownie odbywało się z częstotliwością co 10 mm wzdłuż osi cewki. Uzyskane wyniki zestawiono z wykonanymi przy użyciu programu Comsol modelami cewki, uwzględniającymi rzeczywisty rozkład indukcji magnetycznej. Zastosowany do dalszych badań układ (rys. 10) posiadał dwie pętle połączone ze sobą równolegle, przy czym jedną z nich stanowiło szeregowe połączenie dwóch uzwojeń.



Rys. 10. Schemat uzwojeń cewki

Źródło: opracowanie własne

Rozkład pola elektromagnetycznego wzdłuż osi poprzecznej rdzenia solenoidu, uwzględniający odcinek od środka rdzenia powietrznego do karkasu cewki, przedstawiono na rysunku 11. Krzywa ta odnosi się do pola elektromagnetycznego o częstotliwości 100 Hz i została wyznaczona automatycznie przez program Comsol, po wprowadzeniu wszystkich zanotowanych parametrów pola.

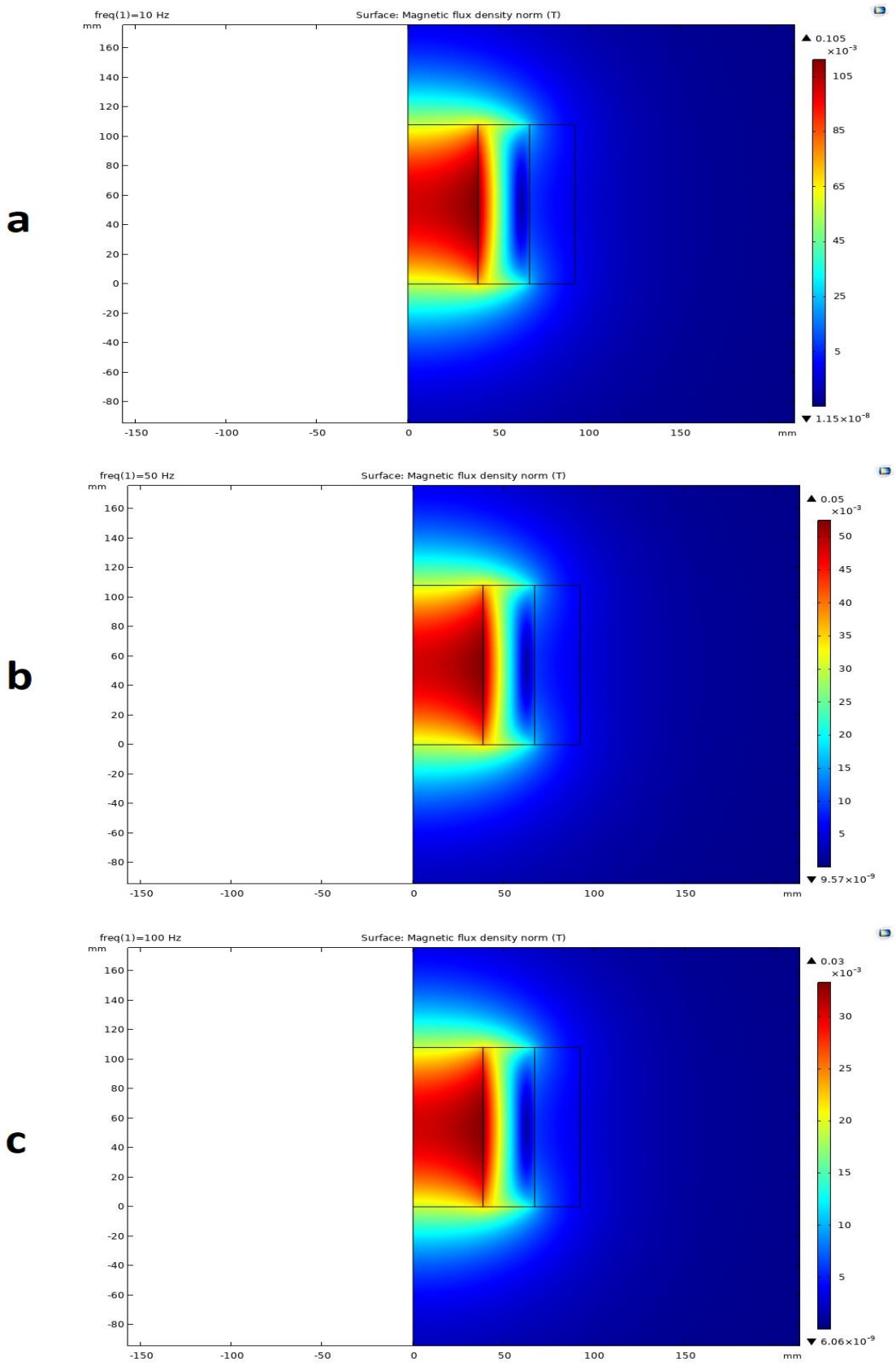


Rys. 11. Charakterystyka rozkładu indukcji magnetycznej dla przekroju poprzecznego cewki zasilanej przemiennym prądem elektrycznym o częstotliwości 100 Hz

Źródło: opracowanie własne

Na odcinku 25 mm różnica w otrzymanych wartościach indukcji magnetycznej wynosiła 1,4 mT. Rozkład ten został uwzględniony podczas badań prowadzonych przy użyciu niniejszego stanowiska, tak aby zredukować do minimum niejednorodność pola, a tym samym zagwarantować równomierną stymulację materiału badawczego. Uwzględniając średnicę stosowanych w badaniach probówek, maksymalna różnica indukcji magnetycznej wzdłuż przekroju poprzecznego naczynia z badanym materiałem wynosi około 0,5 mT. Wartość ta mieści się w zakresie średniego, bezwzględnego błędu nastawy parametrów systemu, przedstawionej w dalszej części pracy (por. str. 46). Omawiany rozkład pola elektromagnetycznego został dodatkowo przedstawiony w postaci modeli dla trzech wybranych częstotliwości pola (rys. 12). Rezultaty dla wariantów, które nie znalazły zastosowania w niniejszej pracy przedstawiono dla pola elektromagnetycznego o częstotliwości 50 Hz i umieszczono w Aneksie.

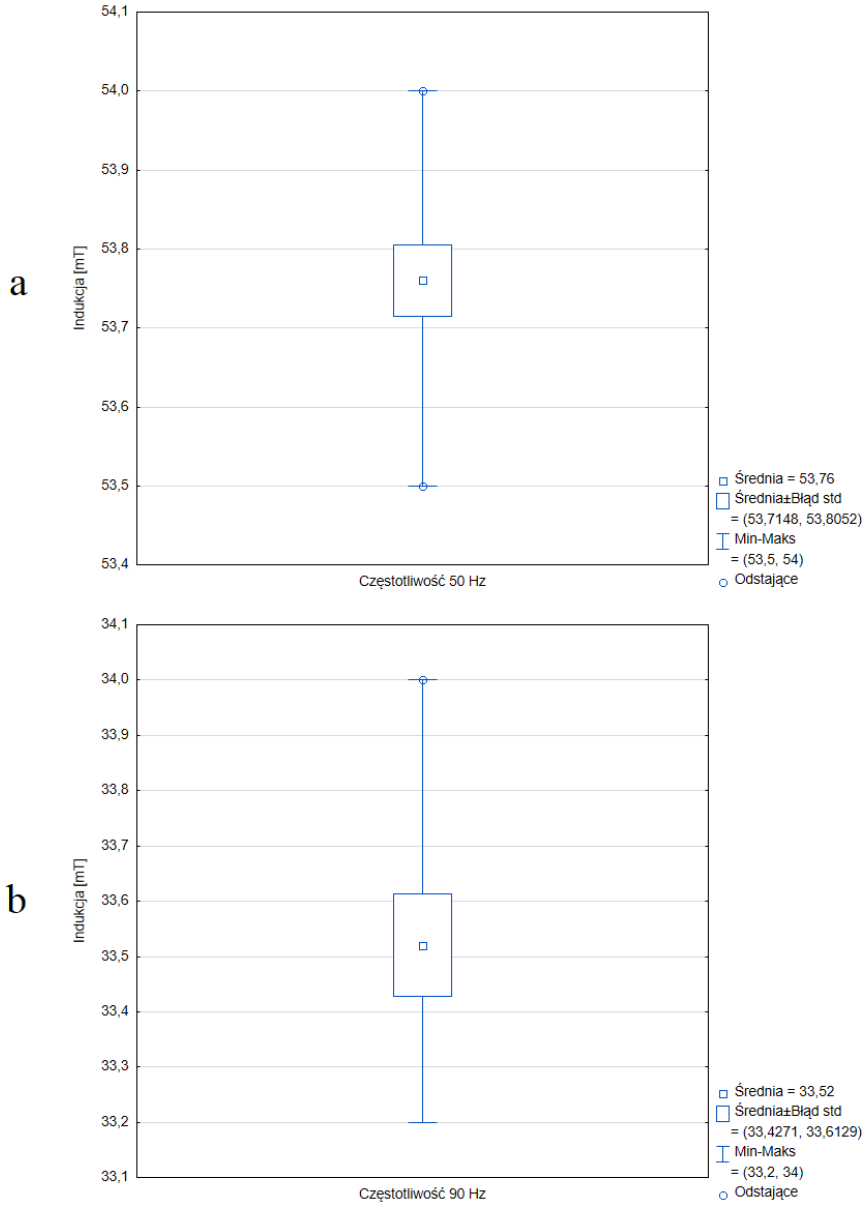
Dla całego zakresu częstotliwości analizowanego w niniejszej pracy, rozkład indukcji magnetycznej w rdzeniu powietrznym cewki, tj. w miejscu, w którym w trakcie badań znajduje się materiał poddawany stymulacji, był równomierny wzdłuż osi podłużnej cewki, ze spadkiem uzyskiwanych wartości na końcach cewki. Na odcinkach od 0 do 20 mm oraz od 80 do 100 mm, zmniejszenie wartości indukcji było na tyle intensywne, że prowadzenie stymulacji pozwalającej osiągnąć wiarygodne i miarodajne wyniki musiało zostać ograniczone do strefy od 20 do 80 cm na osi podłużnej cewki. Porównanie rezultatów uzyskanych poprzez modelowanie w środowisku FEMM (dla rzeczywistych parametrów systemu) wraz z bezpośrednim pomiarem indukcji magnetycznej, pozwoliło stwierdzić, że otrzymane wartości są ze sobą zbieżne ze średnim odchyleniem standardowym dla całego zakresu częstotliwości wynoszącym 0,3 mT. Różnice te mogą wynikać z dokładności pomiarowej miernika czy uproszczeń stosowanych przez program Comsol, ale również precyzji nastawy parametrów pola elektromagnetycznego. Z tego powodu podjęto decyzję o określeniu niepewności pomiarowej skonstruowanego systemu technicznego.



Rys. 12. Model rozkładu indukcji magnetycznej wzdłuż osi podłużnej dla cewki zasilanej prądem elektrycznym o częstotliwości a) 10 Hz, b) 50 Hz, c) 100 Hz

Źródło: opracowanie własne

Korzystając z metody szacowania niepewności, która została opisana w podrozdziale 2.3.1 wykonano analogiczne obliczenia, ale odnoszące się do nastawy generowanych parametrów skonstruowanego systemu. W tym celu, dwóch niezależnych operatorów zrealizowało serię pomiarów, które polegały na ustawieniu poszczególnych parametrów stanowiska w takim sposób, aby otrzymać żądaną wartość indukcji magnetycznej w rdzeniu cewki. Uwzględniono przy tym błąd pomiarowy miernika indukcji pola Phywe 13610-93 oraz wielofunkcyjnego miernika mocy Lutron DW-6090. Na rysunku 13 przedstawiono uzyskane rezultaty pomiarów dla dwóch wybranych częstotliwości, które charakteryzowały się największą oraz najmniejszą niepewnością pomiarową.



Rys. 13. Wyniki pomiarów niepewności rozszerzonej nastawy generowanych parametrów skonstruowanego systemu podczas zasilania prądem o częstotliwości a) 50 Hz, b) 90 Hz,

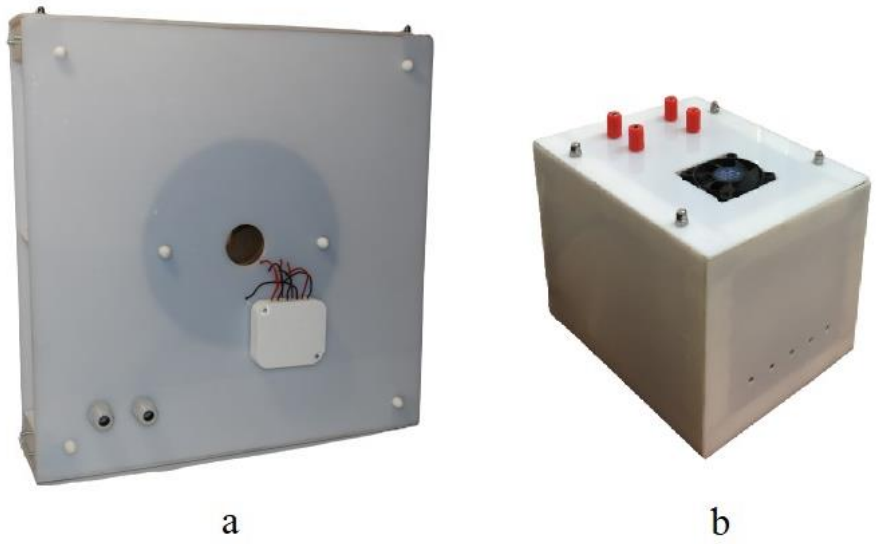
Źródło: opracowanie własne

Przeprowadzone analizy wykazały, że przy częstotliwości pola elektromagnetycznego wynoszącego 50 Hz, wartość niepewności rozszerzonej wynosi 0,26 mT (0,49%). Z kolei najwyższą wartość niepewności wynoszącą 0,43 mT (1,28%) odnotowano dla częstotliwości pola równej 90 Hz. Bezwzględny błąd pomiarowy dla całego zakresu omawianych w niniejszej pracy częstotliwości wynosił średnio ± 0,28 mT.

Ze względu na intensywne nagrzewanie się elementów roboczych, przeprojektowano stosowany dotąd system chłodzenia cieczą. W miejsce pompy obiegowej zanurzonej w chłodzonym zbiorniku z wodą wprowadzono agregat chłodniczy SCH Piccolo/B/0.5/EVK, o mocy elektrycznej 837 W, wydajności pompy równej 12 $l \cdot min^{-1}$ i temperaturze cieczy chłodzącej wynoszącej 0°C. Jako medium chłodnicze zastosowano ciecz specjalnego przeznaczenia, bazującą na glikolu monoetylenowym, o stężeniu równym 50%. Początkowa temperaturze wrzenia cieczy wynosi 107,5°C, a temperatura krzepnięcia około -37°C. Zastosowane rozwiązanie pozwoliło no wydłużenie maksymalnego czasu przebywania próbki w polu elektromagnetycznym, np. z 300 s do 420 s dla częstotliwości pola wynoszącej 10 Hz (wzrost o 40%). Wraz ze wzrostem częstotliwości zwiększał się również możliwy czas stymulacji materiału, który już przy częstotliwości 50 Hz pozwalał na ciągłe przebywanie próbki wewnątrz rdzenia cewki przez okres 1710 s. Należy w tym miejscu wspomnieć, że mianem maksymalnego czasu określano taki przedział czasowy, w którym temperatura próbki nie przekraczała 40°C. Wartość tę przyjęto za graniczną biorąc pod uwagę dwa czynniki. Po pierwsze, stymulacja dotyczyła materiału biologicznego, w przypadku którego rozpoczęcie procesu denaturacji termicznej, w zależności od rodzaju białka wynosiło od 40°C dla miozyny do 76°C dla aktyny (Martens, Stabursvik i Martens 1982; Skipnes i in. 2008). Zakres ten jest szeroki ponieważ wartości te zależą między innymi od pochodzenia danego białka (Kołakowski, Wianecki i Milewska 2008), kinetyki podgrzewania (Ovissipour i in. 2017) czy też jego wcześniejszej obróbki (Jin i in. 2017), a także pH (Rios-Mera, da Silva Pinto i Contreras-Castillo 2017; Leeb, Haller i Kulozik 2018). Stąd na przykład Llave i in. (2018) udokumentowali niższą temperaturę wynoszącą 35°C, jednakże wyniki te osiągnęli dla konkretnego rodzaju mięsa ryb morskich i przy zwiększonej prędkości podgrzewania ($10°C \cdot min^{-1}$). Drugim czynnikiem uwzględnianym przy doborze temperatury była niepewność pomiarowa czujnika, ustalona na poziomie 1,5%, a także współczynnik przewodności cieplnej szkła, który mieści się w przedziale 0,6-1,38 $W \cdot (mK)^{-1}$ (Výborný i Anton 2012; Abdullah, Gary i Marla 2007).

Konieczność wprowadzenia ograniczenia temperaturowego w trakcie stymulacji polem elektromagnetycznym do 40°C wskazują również Lin i in. (2019).

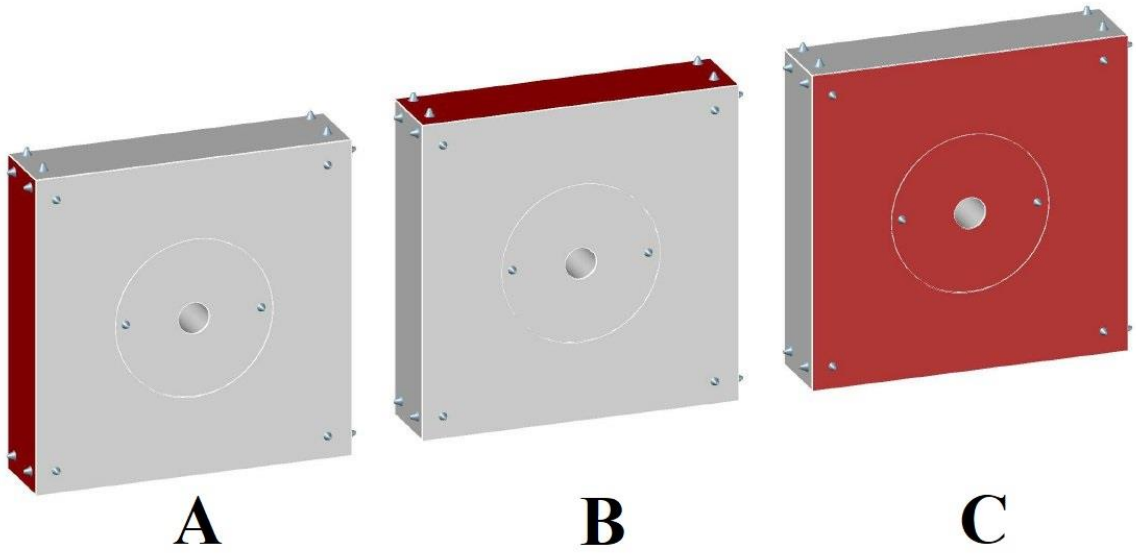
Solenoid został obudowany przy użyciu szkła akrylowego, o grubości 4 mm, którego poszczególne elementy połączono ze sobą poprzez zastosowanie wykonanych z poliamidu, gwintowanych prętów o gwincie metrycznym M6 (rys. 14a). Pozwoliło to odseparować cewkę od reszty elementów stanowiska. W podobną obudowę został wyposażony układ, w którego skład wchodziły dwa oporniki wyposażone w radiator i powietrzny system chłodzenia. Obudowa układu posiadała dodatkowo wyprowadzenia przewodów (punkty pomiaru napięcia na uzwojeniach) (rys. 14b).



Rys. 14. Rzeczywisty wygląd wybranych elementów systemu po obudowaniu szkłem akrylowym a) cewki; b) układu oporników

Fot. E. Popardowski

Zdjęcia termowizyjne ze względu na prostopadłościenny kształt obudowy cewki obejmowały trzy, a nie jak poprzednio – dwie płaszczyzny stanowiska, oznaczone na rysunku 15 kolorem czerwonym. Poza płaszczyzną równoległą do osi poprzecznej cewki (płaszczyzna C), zobrazowano boczną (płaszczyzna A) oraz górną ścianę obudowy (płaszczyzna B). Zastosowano tę samą kombinację parametrów badanego pola elektromagnetycznego, co w etapie I.



Rys. 15. Płaszczyzny stanowiska poddane badaniu przy użyciu kamery termowizyjnej
Źródło: opracowanie własne

Ponadto, posługując się wielofunkcyjnym miernikiem mocy DW6090A Lutron, wyznaczono moc czynną solenoidu, która określa zdolność odbiornika prądu elektrycznego do wykonania pracy, co w elementach elektrycznych typu cewka jest związane z nieodwracalną przemianą energii elektrycznej na energię cieplną zgodnie ze wzorem 18.

$$P_{śr} = U_{sk} \cdot I_{sk} \cdot cos\varphi \tag{18}$$

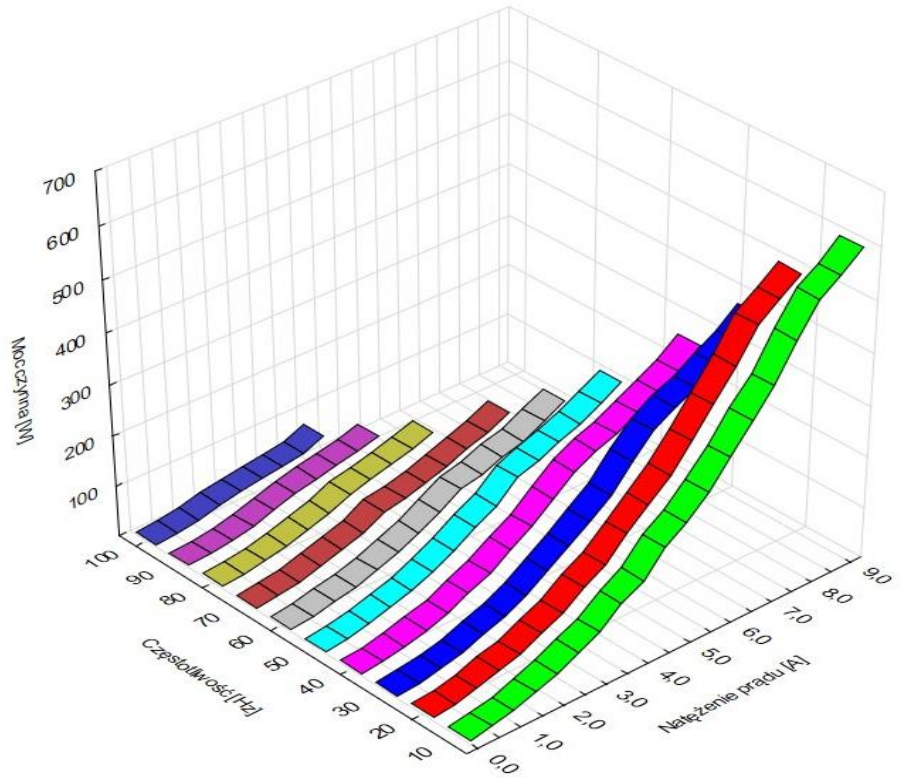
gdzie: $P_{śr}$– wartość średnia mocy czynnej [W];

U_{sk}– napięcie skuteczne prądu [V];

I_{sk} – natężenie skuteczne prądu [A];

$cos\varphi$ – kąt przesunięcia fazowego pomiędzy napięciem, a prądem [-].

Ze względu na możliwości zastosowanego miernika określono zarówno bezpośrednio moc czynną, jak i poszczególne składowe niezbędne do wyliczenia wartości średniej mocy zgodnie z przedstawionym wzorem 18. Uzyskane wyniki przedstawiono na wykresie poniżej (rys. 16).



Rys. 16. Moc czynna generowana przez cewkę w zależności od częstotliwości i natężenia prądu elektrycznego

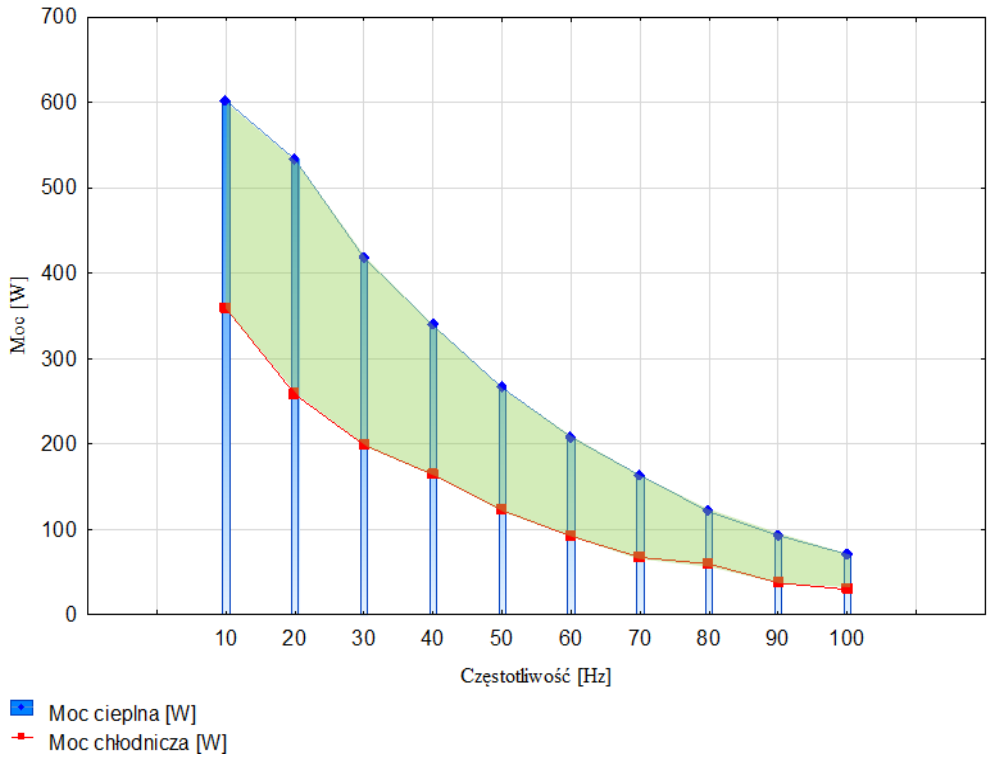
Źródło: opracowanie własne

Zgodnie z opisanym uprzednio (por. str. 12, 13) przekształceniem prawa Joule'a-Lenza, najintensywniejszy przyrost energii cieplnej, a tym samym najszybszy wzrost temperatury rdzenia cewki, następował przy najniższych z analizowanych częstotliwości pola elektromagnetycznego. Dla 10 Hz i maksymalnej możliwej do osiągnięcia przy tej częstotliwości indukcji pola (109,3 mT), stanowisko generowało moc 540 W, co oznacza, że w każdej minucie pracy solenoidu wytwarzane było ciepło o wartości 32,4 kJ. Wartości te malały wraz ze zmniejszaniem się indukcji magnetycznej oraz ze wzrostem częstotliwości. Dla 100 Hz oraz maksymalnej dla tej częstotliwości indukcji 32,0 mT, moc wyniosła zaledwie 35 W.

Znając wymiary i własności wymiennika ciepła w postaci 12 uzwojeń miedzianej rurki, a także biorąc pod uwagę ciepło właściwe czynnika chłodzącego, różnicę jego temperatury na zasilaniu i powrocie, gęstość glikolu monoetylenowego oraz wydajność pompy układu chłodzenia, zredukowaną na skutek różnicy przekrojów między króćcem tłocznym agregatu chłodniczego, a miedzianą chłodnicą stanowiącą integralną część cewki, możliwe było określenie mocy chłodniczej skonstruowanego układu. Na rysunku 17 przedstawiono maksymalną moc cieplną generowaną przez stanowisko, tj. przy

maksymalnej do osiągnięcia dla omawianego systemu wartości indukcji magnetycznej w obszarze roboczym stanowiska, w zależności od częstotliwości pola. Wyniki te zestawiono z mocą chłodniczą zbudowanego systemu.

Kolorem zielonym zaznaczono obszar ilustrujący nadwyżkę mocy cieplnej względem mocy chłodniczej, w zależności od częstotliwości zastosowanego pola. Zmienną determinującą uzyskane wartości mocy chłodniczej był gradient temperatur czynnika chłodzącego występujący pomiędzy zasilaniem i powrotem, mierzony w miejscu połączenia uzwojenia w postaci miedzianej rurki i przewodów połączonych z agregatem chłodniczym. Ponieważ różnica ta była zdecydowanie największa przy najniższej z analizowanych częstotliwości, toteż ochłodzony glikol monoetylenowy był w stanie skompensować około 59,6% mocy cieplnej.



Rys. 17. Porównanie maksymalnych mocy - cieplnej generowanej przez solenoid oraz chłodniczej wytworzonej przez cieczowy układ chłodzenia

Źródło: Opracowanie własne

Wraz ze wzrostem częstotliwości następował spadek gradientu temperatur, a tym samym obniżenie mocy chłodniczej. Dla częstotliwości 10 Hz moc chłodnicza stanowiła zaledwie 40,6% mocy cieplnej. Jednakże, biorąc pod uwagę występujący równocześnie trend malejący funkcji przedstawiającej moc cieplną, uzyskanie stanu, gdy temperatura wewnątrz rdzenia solenoidu nie przekracza założonych 40°C, przestawało stwarzać trudności.

3.3. Etap III

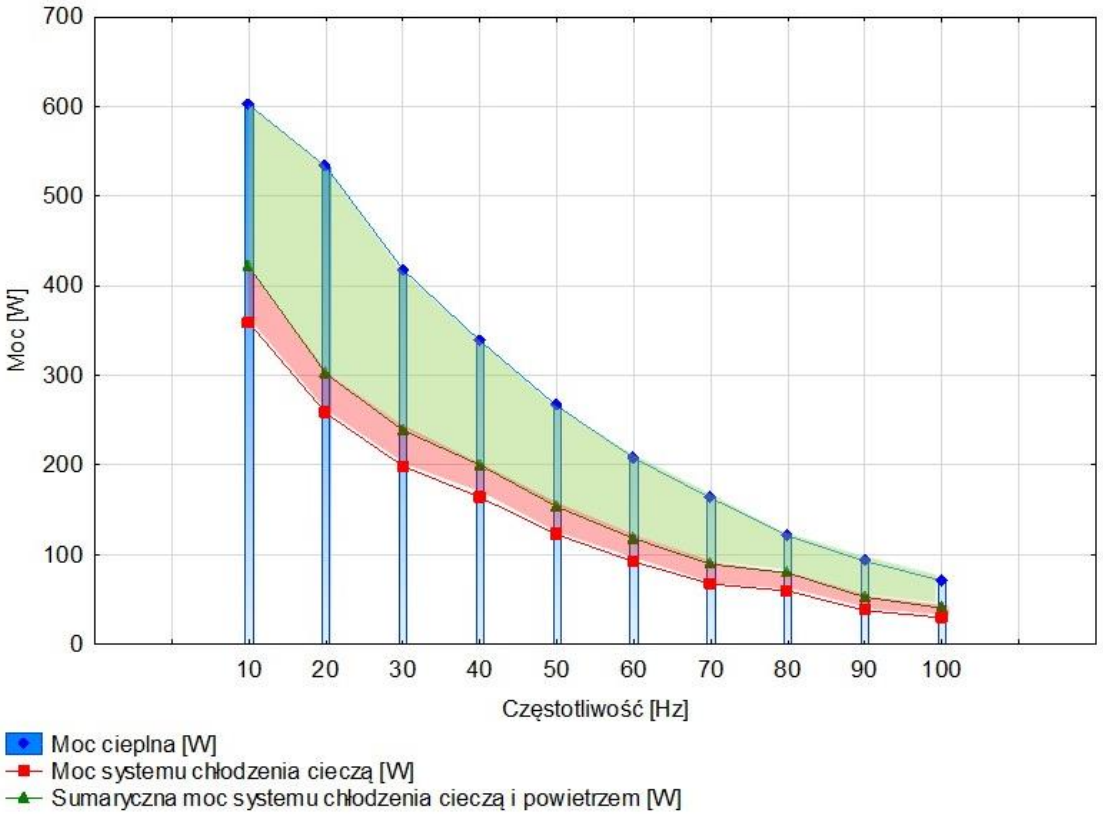
Na skutek przeprowadzonych w poprzednim etapie analiz, podjęto decyzję o wprowadzeniu dodatkowego chłodzenia za pomocą strumienia powietrza. W tym celu, na jednej z bocznych ścian obudowy cewki wykonano dwa otwory. W jeden z nich wmontowano króciec umożliwiający zamontowanie wentylatora, drugi miał za zadanie wyprowadzać ogrzane powietrze z wnętrza obudowy (rys. 18a). W celu wymuszenia przepływu powietrza wokół cewki, tak aby odbierał on energię cieplną z zewnętrznej części uzwojenia, zastosowano wewnątrz obudowy przegrodę (rys. 18b). Umożliwiło to wprowadzenie czynnika prostopadle do osi wzdłużnej cewki, który po obniżeniu temperatury elementów roboczych i przestrzeni wokół nich, był wyprowadzany otworem wylotowym.

Odbiór części energii cieplnej uzwojenia miał za zadanie redukcję czasu nagrzewania się rdzenia oraz umieszczonej w jego wnętrzu próbki materiału. Wprowadzany strumień powietrza charakteryzował się objętościowym współczynnikiem przepływu równym 105 $m^3 \cdot h^{-1}$ i stałą temperaturą na wejściu, wynoszącą 16°C. Po dokonanej modyfikacji, sparametryzowano stanowisko pod kątem charakterystyki emisji energii cieplnej, zgodnie z procedurą obowiązującą w przypadku wcześniejszych etapów.



Rys. 18. Powietrzny system chłodzenia a) modyfikacja bocznej ściany; b) przegroda wewnątrz obudowy
Fot. E. Popardowski

Na rysunku 19 przedstawiono sumaryczną moc chłodniczą stanowiska i podobnie jak w etapie II zestawiono ją z maksymalną mocą cieplną dla poszczególnych częstotliwości pola.



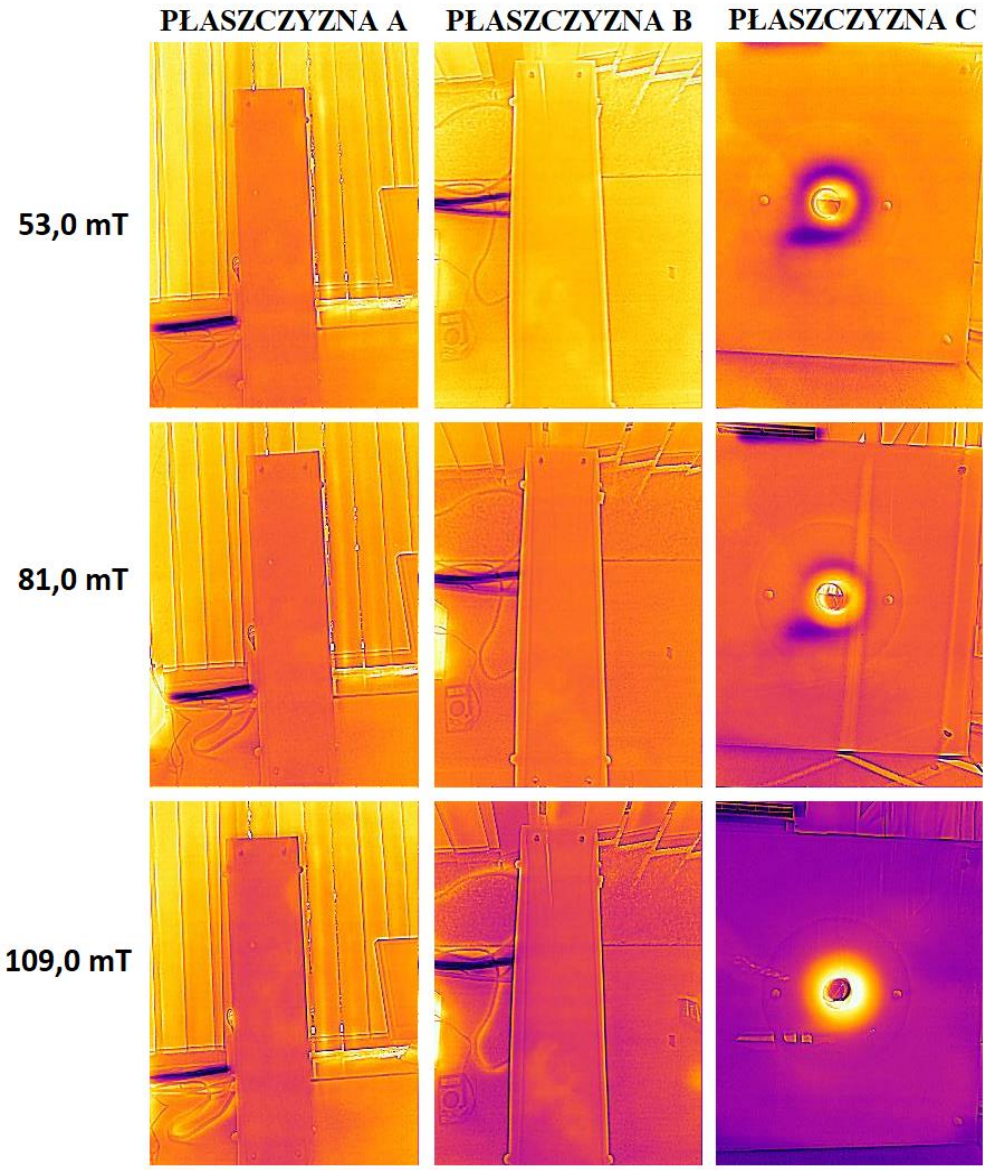
Rys. 19. Porównanie maksymalnych mocy - cieplnej generowanej przez solenoid oraz chłodniczej wytworzonej przez cieczowy i gazowy układ chłodzenia

Źródło: Opracowanie własne

Podobnie jak na rysunku 17, kolorem zielonym oznaczono obszar przedstawiający tę część mocy cieplnej, która nie jest kompensowana, w tym przypadku przez dwuczynnikowy układ chłodzenia, tj. chłodzenie cieczą oraz powietrzem. Dodatkowo przy użyciu koloru czerwonego wyodrębniono pole obrazujące wzrost mocy chłodniczej, po wprowadzeniu chłodzenia powietrzem, względem stosowanego w poprzednim etapie chłodzenia jedynie cieczą. Utrzymana została tendencja spadkowa sumarycznej mocy chłodniczej wraz ze wzrostem częstotliwości pola elektromagnetycznego. Intensyfikacja chłodzenia, po wprowadzeniu w danym etapie dodatkowych elementów stanowiska, mieściła się w przedziale od 14,9% do 26%, co spowodowało, że dla częstotliwości 10 Hz moc chłodnicza neutralizowała około 70% mocy cieplnej (poprzednio dla chłodzenia cieczą 59,6%), a dla 100 Hz – 56,7% (poprzednio 40,6%).

Na rysunkach 20 oraz 21 przedstawiono zdjęcia wykonane kamerą termowizyjną dla najniższej oraz najwyższej ze stosowanych w niniejszej pracy częstotliwości pola elektromagnetycznego, z uwzględnieniem trzech płaszczyzn oraz trzech wartości indukcji magnetycznej. Prezentowane zdjęcia zostały wykonane każdorazowo w momencie osiągnięcia przez rdzeń stanowiska temperatury wynoszącej około 40°C, choć czas w jakim została ona osiągnięta był odmienny i ściśle uzależniony od wartości indukcji magnetycznej.

Na rysunku 20 zwizualizowano zmiany widma energii cieplnej zarejestrowane dla trzech płaszczyzn stanowiska oraz trzech kombinacji parametrów pola



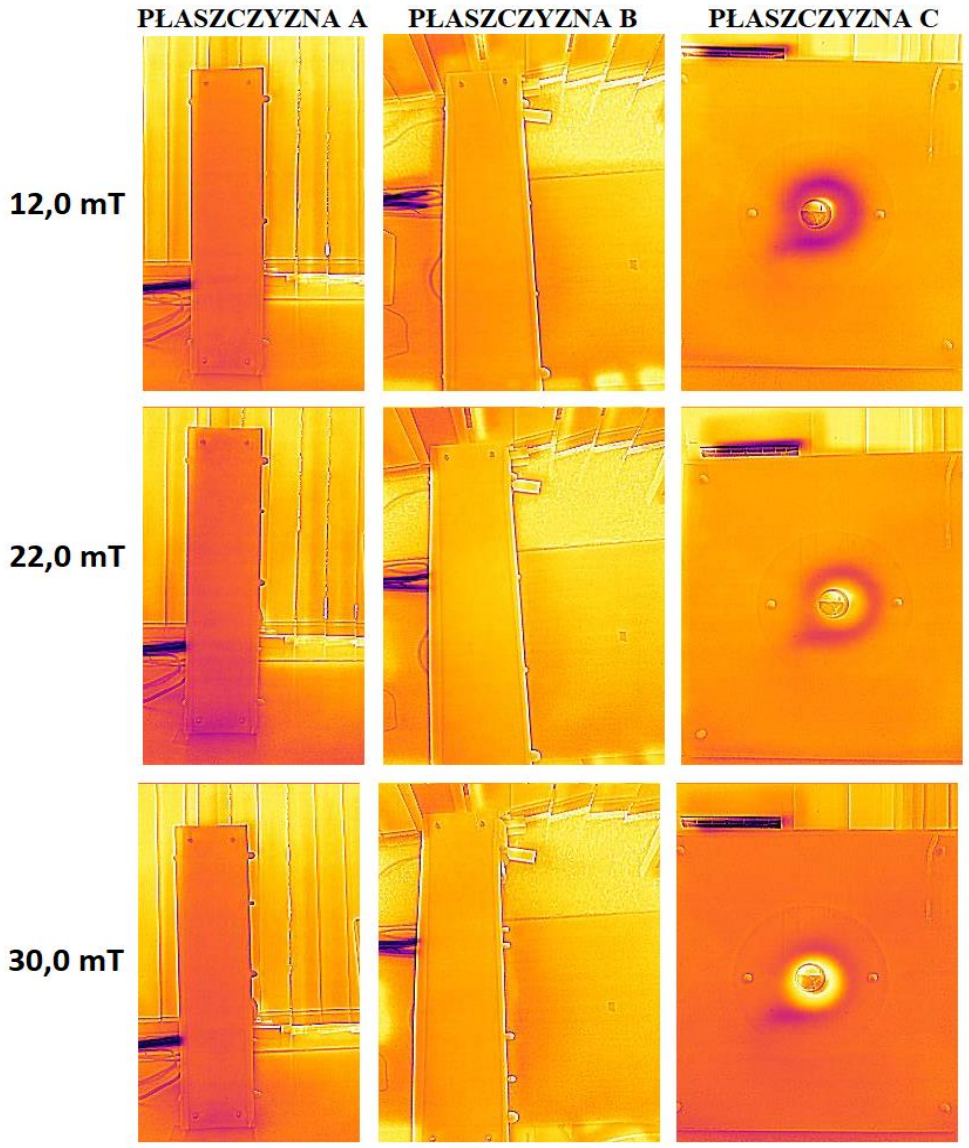
Rys. 20. Widmo energii cieplnej generowanej przez stanowisko w trakcie badań przy częstotliwości pola elektromagnetycznego równej 10 Hz

Źródło: opracowanie własne

. Pomiar był prowadzony przy częstotliwości równej 10 Hz. Nad rysunkiem oraz po jego lewej stronie oznaczono poszczególne wartości indukcji magnetycznej oraz płaszczyzny pracy zgodnie z oznaczeniami wprowadzonymi w etapie II. W przypadku płaszczyzny A i B punktem odniesienia do skali barwowej może być przewód doprowadzający ciecz chłodzącą, widoczny jako podłużna linia w kolorze ciemnego granatu. Przepływający nim czynnik posiadał temperaturę wynoszącą 5°C. Równolegle do pomiarów przy użyciu kamery termowizyjnej prowadzono pomiar przy zastosowaniu pirometru.

Różnica pomiędzy temperaturą rdzenia cewki, a obudową stanowiska wzrastała wraz ze zwiększaniem się indukcji magnetycznej. Dla kolejnych wartości indukcji zabarwienie (płaszczyzna A oraz B) przybierało coraz ciemniejszy odcień. Płaszczyzna C (prostopadła do osi podłużnej cewki) obrazuje sposób nagrzewanie elementów roboczych, które znajdujowały się w bezpośrednim sąsiedztwie materiału poddawanemu stymulacji. Dla wszystkich trzech wartości indukcji magnetycznej przedstawione zdjęcia wykonano w momencie osiągnięcia przez rdzeń cewki tej samej temperatury (40°C). Dla B=53,0 mT nagrzewanie rdzenia było kompensowane przez układ chłodzący z wyraźnie widocznymi na zdjęciu zwojami rurki nawiniętej wokół cewki. Przy indukcji równej 81,0 mT możliwe było zaobserwowanie zintensyfikowanego nagrzewania, którego efektem było przyspieszone ogrzewanie cieczy roboczej. Wyraźnie widoczny w przypadku wcześniejszej wartości indukcji układ chłodzący, na rysunku tym został ograniczony do fragmentu króćca przyłączeniowego, którym tłoczony jest czynnik ziębniczy. Dla najwyższej z odnotowanych indukcji pola (B=109,0 mT) zobrazowany graficznie rozkład generowanego strumienia ciepła wokół rdzenia cewki przybierał kształt współśrodkowych okręgów z najwyższą temperaturą (widoczną jako kolor biały) w centralnej części, poprzez kolejne odcienie żółtego aż do pomarańczowego.

Ze względu na wspomnianą szybkość nagrzewania się mediów chłodniczych, w odmienny sposób prezentuje się analogiczne zestawienie zdjęć z kamery termowizyjnej dla częstotliwości pola równej 100 Hz (rys. 21). Również w tym przypadku ujęto trzy wartości indukcji magnetycznej (w tym najwyższą z możliwych do uzyskania przy danej częstotliwości) i zestawiono je w odniesieniu do poszczególnych płaszczyzn stanowiska.



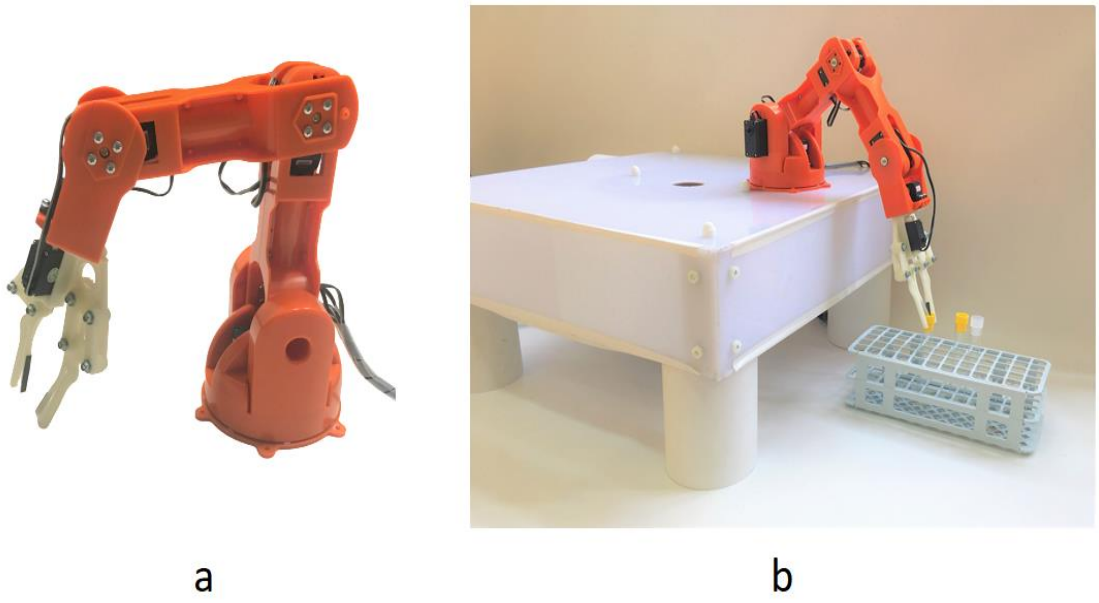
Rys. 21. Widmo energii cieplnej generowanej przez stanowisko w trakcie badań przy częstotliwości pola elektromagnetycznego równej 100 Hz

Źródło: opracowanie własne

Płaszczyzny obrazujące górną oraz boczną ścianę obudowy dla kolejnych parametrów niemal nie różnią się między sobą. Zmiany dostrzegalne są dla trzeciej z analizowanych powierzchni. Dla danej częstotliwości proces rozgrzewania się uzwojenia cewki można opisać funkcją zbliżoną do funkcji liniowej (a nie, jak w poprzednim przykładzie, funkcji wykładniczej). Występujące przy częstotliwości 10 Hz pierścienie wokół rdzenia cewki obrazujące nagrzewanie się kolejnych warstw, zostały w przypadku częstotliwości 100 Hz zastąpione jednym okręgiem o temperaturze około 40°C, wokół którego widoczny jest ciemny kolor pochodzący od elementów układu chłodzącego. Efekt ten widoczny jest w sposób najbardziej wyraźny dla indukcji

magnetycznej równiej 12,0 mT, ale można go również dostrzec w przypadku B=22,0 mT oraz B=30,0 mT.

Jedną z ostatnich faz modyfikacji stanowiska było umieszczenie cewki na czterech cylindrycznych podporach i skierowanie jej horyzontalnie względem pierwotnego ułożenia. Dzięki takiemu rozwiązaniu fragment obudowy mógł zostać zaadoptowany jako baza dla ramienia robota Braccio TinkerKit (rys. 22). Robot ten spełnia dwie zasadnicze funkcje. Po pierwsze, zapewnia powtarzalność i precyzję umieszczenia probówki dokładnie w osi symetrii cewki, wykluczając tym samym możliwość wykonania nieprawidłowego doświadczenia. Nawet niewielkie odchylenie probówki od pionu i zmiana jej docelowego położenia, może powodować stymulację fragmentu lub całości materiału polem o parametrach innych niż zakładane. Po drugie, przy wykonywaniu wielu powtórzeń, szczególnie przy zastosowaniu wyższych częstotliwości, gdzie czas stymulacji może wynosić nawet kilka godzin, robot eliminuję konieczność kontroli czasu przebywania materiału w cewce przez personel, a tym samym czyni stanowisko niemal bezobsługowym.



Rys. 22. Ramie robota Braccio TinerKit a) w trakcie spoczynku b) w trakcie pobierania próbki ze statywu
Źródło: opracowanie własne

Przed przystąpieniem do programowania robota wykonano powtórnie opomiarowanie stanowiska przy użyciu czujnika pola elektromagnetycznego, podobnie jak opisano to w etapie II (rozdział 3.2). Miało to na celu weryfikację ewentualnych zmian rozkładu pola elektromagnetycznego w wyniku pojawienia się w bliskiej odległości od cewki dodatkowego urządzenia elektrycznego. W wyniku pomiarów, nie stwierdzono zmian

uzyskiwanych parametrów w obrębie obszaru roboczego stanowiska, co może być wynikiem zastosowania ramienia zbudowanego w przeważającej części z tworzyw sztucznych, które nie wpływają na zmianę linii pola elektromagnetycznego.

Robot posiada 4 serwomechanizmy o momencie do 3,8 $kg \cdot cm^{-1}$ (około 0,37 Nm) oraz 2 serwomechanizmy o momencie do 14,5 $kg \cdot cm^{-1}$ (około 1,42 Nm). Maksymalny udźwig ramienia wyposażonego w chwytak szczękowy to 150 g. Kontroler umożliwiając obsługę robota bazuje na tzw. płytce Arduino, podłączonej bezpośrednio do komputera. Język programowania wykorzystywany w Arduino bazuje na środowisku Wiring i języku C/C++. Zastosowanie tego modułu w stanowisku pozwoliło na automatyzację procesu implementacji próbki do wnętrza rdzenia solenoidu, a następnie odkładania na statyw poddanego uprzednio kondycjonowaniu materiału. Cały proces ruchowy ramienia robota został opisany za pomocą kodu przedstawionego w dalszej części rozdziału. Ramie robota, po uruchomieniu i kontroli poprawności działania poszczególnych serwomechanizmów, wykonuje obrót w kierunku statywu na probówki, znajdującego się w pobliżu stanowiska, jednocześnie otwierając chwytak. Kolejno następuje nachylenie ramienia i zamknięcie chwytaka w taki sposób, aby pomiędzy szczękami znajdowała się probówka z badanym materiałem. Robot unosi trzymany element i ponownie wykonuje obrót (w przeciwnym kierunku) zwracając się w stronę rdzenia cewki. Probówka zostaje odłożona do uprzednio przygotowanego uchwytu, znajdującego się pod stanowiskiem, w taki sposób, aby stymulowany materiał znajdował się wewnątrz rdzenia solenoidu, a poza jego obrys wystawał jedynie polietylenowy korek zamykający probówkę. Po zakończeniu stymulacji, zgodnie z wcześniej ustalonym okresem zwłoki, pozostający dotąd w spoczynku robot sięga po próbkę i trzymając ją w zaciśniętych szczękach chwytaka przenosi do statywu umieszczonego obok stanowiska, finalnie umieszczając ją w szczelinie równoległej do probówek oczekujących na badanie. Zaprezentowany fragment kodu źródłowego (rys. 23) opisuje ruch ramienia robota podczas pojedynczego cyklu stymulacji. Po wprowadzeniu do kolejnych pętli kodu odległości pomiędzy otworami statywu, proces stymulacji całej partii materiału przygotowanego do badań może odbywać się automatycznie.

```
#include <Braccio.h>
#include <Servo.h>

Servo base;
Servo shoulder;
Servo elbow;
```

```
Servo wrist_rot;
Servo wrist_ver;
Servo gripper;

void setup() {
 //Inicjowanie i ustawianie pozycji początkowej ramienia robota
  //Ustawienie serwomechanizmów w pozycji wyjściowej, tj.:
 //Base (M1):90 degrees
 //Shoulder (M2): 45 degrees
 //Elbow (M3): 180 degrees
 //Wrist vertical (M4): 180 degrees
 //Wrist rotation (M5): 90 degrees
 //gripper (M6): 10 degrees
 Braccio.begin();
}

void loop() {
   //pochylenie ramienia robota w kierunku statywu z probówkami i otwarcie chwytaka
 Braccio.ServoMovement(20,       0, 140, 180, 140, 90, 40);
 delay(4000);

 //zamknięcie szczęk chwytaka na korku probówki
 Braccio.ServoMovement(20,       0, 140, 180, 140, 90, 73);

 //wysunięcie probówki z dolnej części statywu
 Braccio.ServoMovement(10,       0, 130, 170, 160, 90, 73);
 delay(200);

 //wysunięcie probówki z górnej części statywu
 Braccio.ServoMovement(10,       0, 120, 160, 170, 90, 73);
 delay(200);

 //uniesienie probówki i obrót ramienia w kierunku rdzenia cewki
 Braccio.ServoMovement(20,       153, 40, 180, 140, 90, 73);
 delay(1000);

 //ustawienie probówki w osi wzdłużnej rdzenia cewki
 Braccio.ServoMovement(20,       153, 55, 180, 175, 90, 73);
 delay(1000);

 //pozycjonowanie fiolki, w celu ustawienia jej w pozycji prostopadłej do stanowiska
 Braccio.ServoMovement(20,       153, 55, 180, 170, 90, 73);
 Braccio.ServoMovement(20,       153, 55, 180, 175, 90, 73);
 delay(1000);

 //otwarcie szczęk chwytaka, w celu umieszczenie probówki wewnątrz cewki
 Braccio.ServoMovement(20,       155, 55, 180, 175, 90, 40);
 delay(2000);

 //ustawienie ramienia w pozycji wyjściowej - oczekiwanie na zakończenie stymulacji
 Braccio.ServoMovement(20,       153, 90, 90, 90, 90, 40);
 delay(5000);

 //pochylenie ramienia robota w celu pobrania probówki z wnętrza cewki
 Braccio.ServoMovement(20,       153, 92, 175, 178, 90, 40);
 delay(2000);

 //zamknięcie szczęk chwytaka na korku probówki
 Braccio.ServoMovement(20,       153, 92, 175, 178, 90, 73);
 delay(2000);
```

```
 //wysunięcie 1/3 długości probówki z rdzenia cewki
 Braccio.ServoMovement(10,       153, 80, 175, 178, 90, 73);
 delay(200);

 //wysunięcie 2/3 długości probówki z rdzenia cewki
 Braccio.ServoMovement(10,       153, 65, 175, 178, 90, 73);
 delay(200);

 //uniesienie probówki ponad rdzeń cewki
 Braccio.ServoMovement(10,       153, 50, 175, 178, 90, 73);
 delay(200);

 //obrót ramienia w kierunku statywu na probówki
 Braccio.ServoMovement(20,       0, 50, 175, 178, 90, 73);
 delay(2000);

 //ustawienie probówki nad statywem
 Braccio.ServoMovement(20,       15, 140, 150, 140, 90, 73);
 delay(2000);

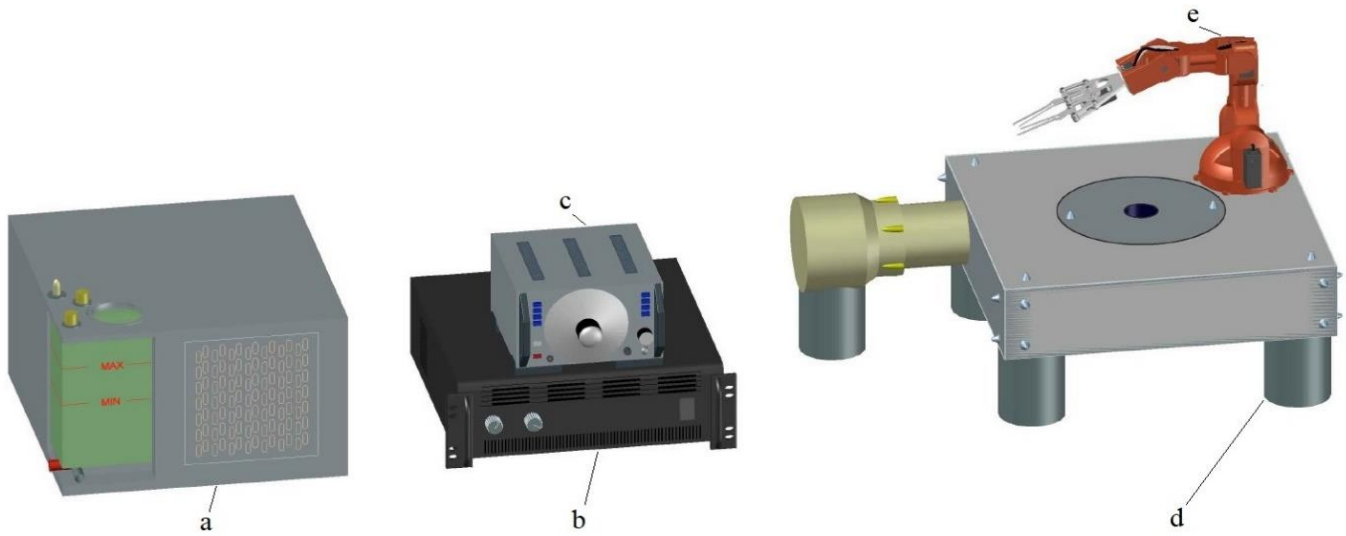
 //otwarcie szczęk chwytaka, w celu umieszczenie probówki w statywie
 Braccio.ServoMovement(20,       5, 140, 150, 140, 90, 40);
 delay(2000);

 //ustawienie ramienia w pozycji wyjściowej
 Braccio.ServoMovement(20,       0, 90, 90, 90, 90, 73);
 delay(5000);
}
```

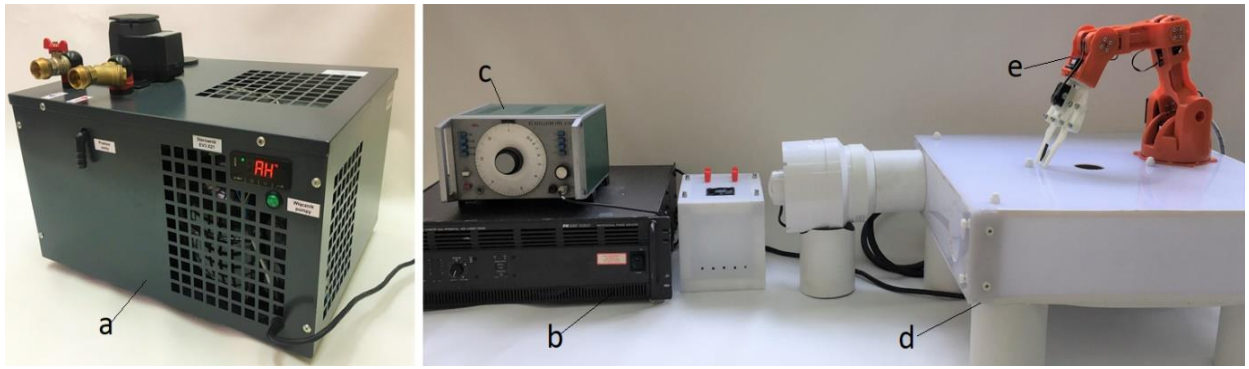
Rys. 23. Fragment kodu źródłowego opisujący ruch ramienia robota podczas pojedynczego cyklu stymulacji

Źródło: opracowanie własne

System techniczny będący efektem końcowym opisywanych w trakcie kolejnych etapów modyfikacji został przedstawiony na rysunkach 24 i 25.



Rys.24 Rysunek poglądowy systemu technicznego do różnicowania aktywności biologicznej substancji organicznej polem elektromagnetycznym, składający się z: a) agregatu chłodniczego, b) wzmacniacza, c) oscylatora, d) cewki powietrznej, e) ramienia robota Źródło: Opracowanie własne



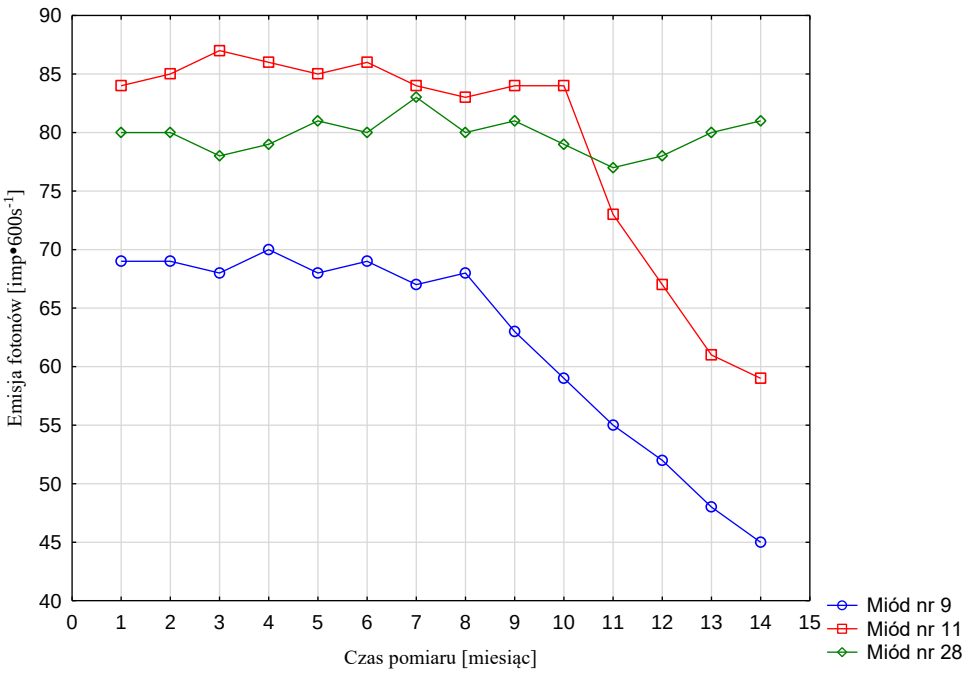
Rys. 25. System techniczny do różnicowania aktywności biologicznej substancji organicznej polem elektromagnetycznym, składający się z: a) agregatu chłodniczego, b) wzmacniacza, c) oscylatora, d) cewki powietrznej, e) ramienia robota Fot. E. Popardowski

4. Wyniki badań

4.1. Wybór materiału badawczego do dalszych analiz

Zgodnie z procedurą opisaną w metodyce, na podstawie pomiarów emisji fotonowej 30 miodów różnych gatunków, wyselekcjonowano trzy próbki, które odznaczały się największą homogenicznością, tzn. mierzony parametr przyjmował zbliżone wartości niezależnie od miejsca poboru próbki w obrębie całej objętości opakowania. W tym celu posłużono się klasyczną miarą zróżnicowania cechy, tj. współczynnikiem zmienności. Uzyskane wyniki badań umieszczono w tabeli znajdującej się w Aneksie (tab. 11).

Po przeprowadzonej analizie wyselekcjonowano trzy próbki, oznaczone numerami 9, 11 oraz 28. Miody, z których pobrano próbki do badań, charakteryzowały się zmiennością na poziomie niższym niż 2,5%. Z poddawanych dalszym pomiarom miodów dwa należały do tzw. miodów spadziowych, jeden z nich był miodem wielokwiatowym. Na wszystkich wyselekcjonowanych gatunkach, równolegle z pilotażowymi badaniami nad wpływem stymulacji polem elektromagnetycznym, prowadzono badania zmierzające do określenia, który z miodów zachowuje stałość parametrów w czasie. Posłużono się w tym celu, podobnie jak poprzednio, pomiarem emisji fotonowej. Badania wykonywano przez okres 14 miesięcy (od grudnia 2018 roku do lutego 2020 roku), w miesięcznych interwałach (rys. 26).



Rys. 26. Zmiana w czasie emisji fotonowej próbek miodu nr 9, 11 i 28

Źródło: opracowanie własne

Na ich podstawie stwierdzono, że miód spadziowy oznaczony numerem 9 przez pierwsze osiem miesięcy emitował stałą liczbę fotonów (zliczanych jako impulsy) w jednostce czasu (z odchyleniem standardowym około 1 imp·600s^{-1}). Po tym czasie nastąpił niemal liniowy spadek uzyskiwanych wartości, średnio o 4 fotony przy każdym kolejnym pomiarze. Miód oznaczony numerem 11 posiadał stałą emisję fotonową (z odchyleniem standardowym 1 imp·600s^{-1}) przez okres dziesięciu miesięcy, jednak kolejne pomiary wskazywały zmniejszenie otrzymywanych wyników, a trend ten był zbliżony do funkcji logarytmicznej. Jedynie miód wielokwiatowy posiadający numer 28 zachował stałą w czasie charakterystykę (z odchyleniem standardowym 2 imp·600s^{-1}) przez cały okres pomiarów. Na podstawie uzyskanych wyników zdecydowano, że do dalszych badań zostanie użyty miód oznaczony numerem 28.

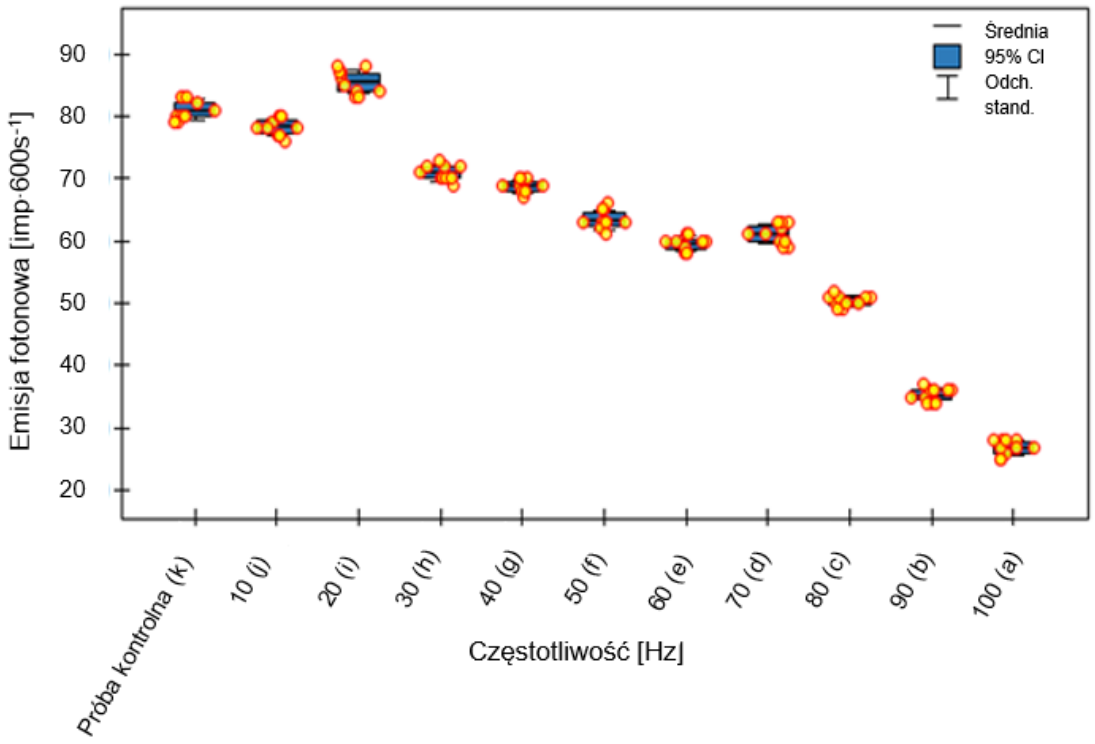
Ostatnim etapem przed przystąpieniem do badań nad wpływem pola elektromagnetycznego na uprzednio wyselekcjonowany materiał była kontrola miodu pod względem jego zgodności z deklaracjami producenta. Z racji wyboru miodu wielokwiatowego, w jego strukturze powinny znaleźć się pyłki wielu rodzajów roślin, bez wyraźnej przewagi któregokolwiek z surowców. Wyniki przeprowadzonej analizy opartej na metodzie melisopalinologicznej wykazały obecność pyłków m.in. wierzby (*Salix*), śliwy domowej (*Prunus domestica*), chabra łąkowego (*Centaurea jacea*), koniczyny białej (*Trifolium repens*), lucerny (*Medicago lupulina L.),* oraz rzepaku ozimego (*Brassica napus L.*). Żadna ze składowych nie stanowiła więcej niż 30% objętości materiału. Zgodnie z założeniami przyjętymi przez Kirs i in. (2011), miodem jednogatunkowym można nazwać miód, dla którego odnotowano co najmniej 45% udziału pyłku jednej rośliny. Potwierdza to zatem, że analizowany miód nr 28 był miodem wielokwiatowym.

4.2. Stymulacja materiału polem o stałej indukcji magnetycznej i stałym czasie trwania oddziaływania, ze skokowymi zmianami częstotliwości

Wybrany do analiz miód wielokwiatowy został poddany stymulacji w 10 powtórzeniach dla każdej z analizowanych częstotliwości, przy zachowaniu stałej indukcji magnetycznej wynoszącej 32,0 mT oraz w nieprzekraczalnym czasie 990 s. Oznaczało to, że zastosowana dawka (zgodnie ze wzorem 7) wynosiła 807 kJ·m^{-3}. Wybór danych parametrów był determinowany najwyższą możliwą do uzyskania wartością

indukcji magnetycznej dla częstotliwości 100 Hz, oraz maksymalnym czasem przebywania materiału biologicznego w rdzeniu solenoidu dla częstotliwości 10 Hz (przy indukcji równej 32,0 mT). Po stymulacji próbki zostały przebadane w celu określenia emisji fotonowej oraz ogólnej liczby bakterii zdolnych do wzrostu i tworzenia kolonii. Każdy z dwóch wymienionych parametrów poddano osobnej analizie.

Na rysunku 27 przedstawiono wyniki uzyskane dla emisji fotonowej, a w tabeli 2 – wyniki wykonanych analiz statystycznych.



Rys. 27. Emisja fotonowa przy zmiennej częstotliwości i stałej indukcji magnetycznej pola oraz czasie stymulacji

Źródło: opracowanie własne

Z przeprowadzonego doświadczenia wynika, że emisja fotonowa przy założonych parametrach stymulacji ulega zmianie, a ogólny trend wskazuje zmniejszanie się liczby impulsów emitowanych w jednostce czasu, wraz ze wzrostem częstotliwości pola. Średnia odnotowana emisja jest niższa od próby kontrolnej. Jedynie dla wariantu, w którym zastosowano częstotliwość wynoszącą 20 Hz, uzyskane wyniki są wyższe od próbki niepoddanej stymulacji. W wielu przypadkach różnice między uzyskiwanymi wynikami dla kolejnych częstotliwości nie różniły się znacząco. Na przykład różnica pomiędzy wartością średnią uzyskaną dla pola o częstotliwości 60 Hz i 70 Hz wynosi w przybliżeniu zaledwie 1 imp·600s^{-1}, co jest wartością mieszczącą się w granicach błędu dla tej metody pomiarowej. Pomimo tego, analiza statystyczna wykazała, że emisja

fotonowa w całym analizowanym spektrum częstotliwości, różniła się wysoce istotnie ($p<0,01$), a różnice te mają charakter liniowego trendu spadkowego.

Tab. 2. Zależność emisji fotonowej od częstotliwości pola przy stałej indukcji magnetycznej oraz czasie stymulacji

Emisja fotonowa [imp·600s^{-1}]		Częstotliwość [Hz]										
		Próba kontrolna	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Średnia arytmetyczna		81	78	86	71	69	63	60	61	50	35	27
Odchylenie standardowe		1,63	1,42	1,96	1,29	1,03	1,51	1,18	1,60	0,97	1,06	1,18
Test Kołmogorova-Smirnova	D	0,23	0,18	0,18	0,26	0,18	0,31	0,26	0,18	0,23	0,25	0,23
	df	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	p	0,59	0,83	0,86	0,45	0,84	0,25	0,41	0,83	0,57	0,51	0,57
Test Levene	F	1,6919										
	p	0,0931										
ANOVA dla grup niezależnych	F	1783,7857										
	df	10;99										
	p	<0,0001										
	η^2	0,9945										
Trend liniowy (Fisher LSD)	F	15896,1551										
	p	<0,0001										
Jednorodne grupy		k	j	i	h	g	f	e	d	c	b	a

Źródło: opracowanie własne

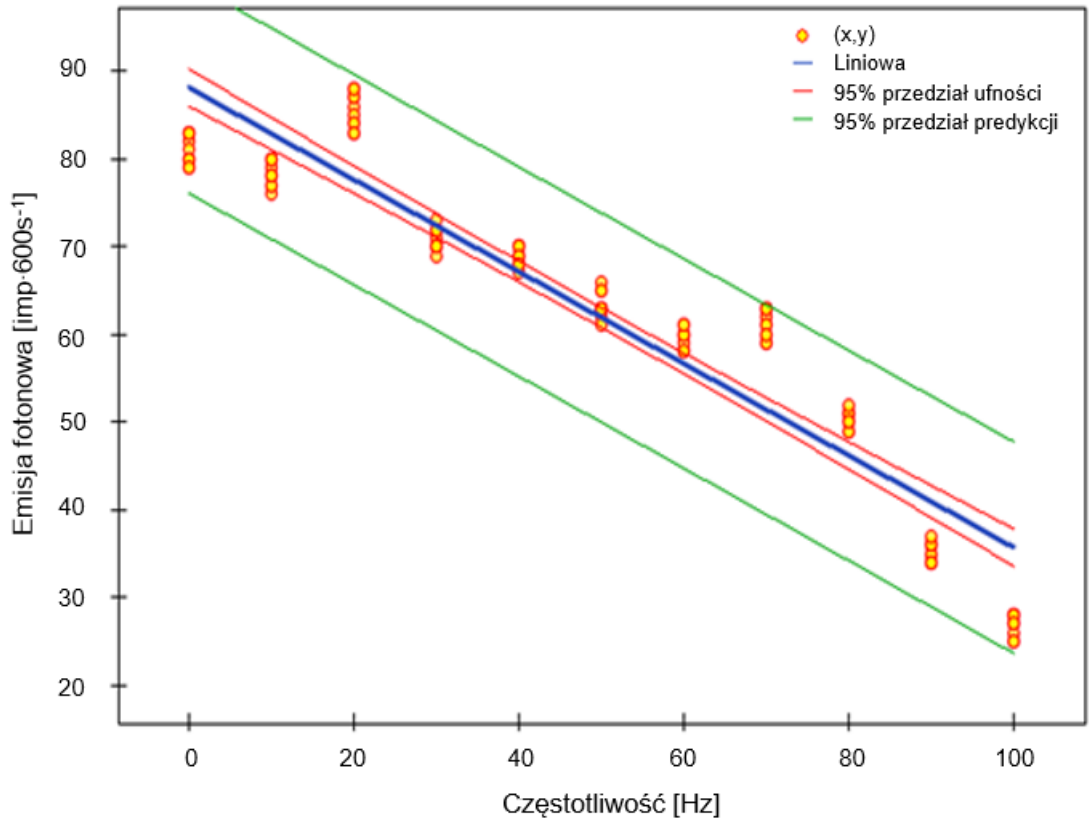
Korzystając z otrzymanych danych wykonano predykcję bazującą na równaniu regresji liniowej, co zostało zobrazowane na rysunku 28. Model matematyczny został opisany wzorem 19, a wartości poszczególnych współczynników wraz z ich analizą przedstawiono w tabeli 3.

Tab. 3. Współczynniki modelu regresji liniowej predykcji emisji na podstawie częstotliwości dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.2

	wsp. B	błąd b	-95% CI	+95% CI	stat. t	wartość p
w. wolny	88,1318	1,0694	86,0122	90,2515	82,4156	<0,0001
Częstotliwość [Hz]	-0,5243	0,0181	-0,5601	-0,4884	-29,0047	<0,0001

Źródło: opracowanie własne

$$E = 88{,}1318f - 0{,}5243 \tag{19}$$



Rys. 28. Wykres regresji liniowej predykcji emisji na podstawie częstotliwości dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.2

Źródło: opracowanie własne

Model regresji liniowej predykcji emisji za pomocą częstotliwości okazał się wysoce istotny (F=841,27, p<0,0001). Współczynnik korelacji wyniósł 0,9414 a współczynnik determinacji 0,8862 (po skorygowaniu 0,8852). Błąd standardowy przedstawionej estymacji kształtował się na poziomie 5 imp·600s^{-1}.

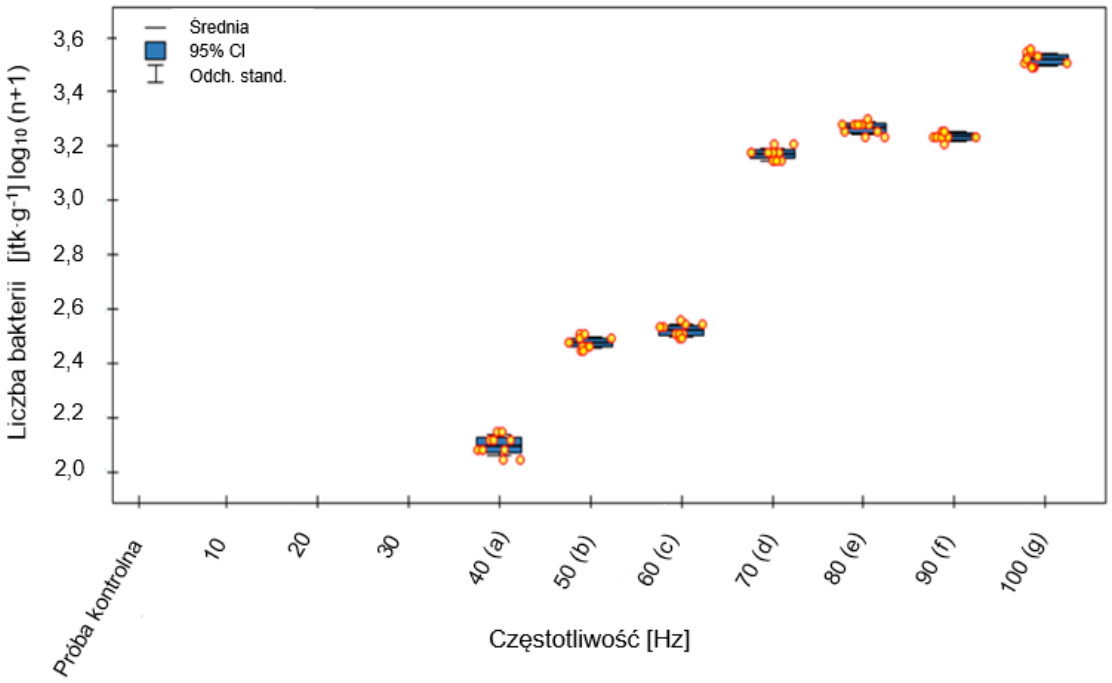
Osobno przeanalizowano wyniki uzyskane w badaniach mikrobiologicznych. Do analizy statystycznej, zgodnie ze stosowaną metodyką, wynik ogólnej liczby bakterii przekształcono przy użyciu logarytmu dziesiętnego i zestawiono w tabeli 4 oraz zaprezentowano na wykresie (rys. 29).

Tab. 4. Zależność ogólnej liczby bakterii od częstotliwości pola przy stałej indukcji magnetycznej oraz czasie stymulacji

Ogólna liczba bakterii [jtk·g^{-1}]log$_{10}$(n+1)		Częstotliwość [Hz]										
		Próba kontrolna	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Średnia arytmetyczna		0	0	0	0	2,099	2,476	2,522	3,170	3,267	3,236	3,518
Odchylenie standardowe		0	0	0	0	0,037	0,022	0,024	0,023	0,023	0,016	0,025
Test Kołmogorova-Smirnova	D	---	---	---	---	0,188	0,21	0,243	0,248	0,300	0,318	0,197
	df	---	---	---	---	10	10	10	10	10	10	10
	p	---	---	---	---	0,81	0,6505	0,522	0,497	0,269	0,213	0,763
Test Levene	F	---				2,3327						
	p	---				0,0426						
ANOVA dla grup niezależnych	F	---				3578,2243						
	df	---				6 / 27,847						
	p	---				<0,0001						
	η^2	---				0,9976						
Trend liniowy (Fisher LSD)	F	---				24357,1762						
	p	---				<0,0001						
Jednorodne grupy		---	---	---	---	a	b	c	d	e	f	g

Źródło: opracowanie własne

Dla trzech wariantów dotyczących stymulacji polem o częstotliwości 10, 20 oraz 30 Hz, podobnie jak dla próby kontrolnej (próbka nie poddana działaniu pola elektromagnetycznego) nie zaobserwowano obecności bakterii. Powyżej tych wartości wyniki wykazywały liniowy trend wzrostowy, a poszczególne wartości różniły się od siebie wysoce istotnie ($p<0,01$). Jedyne odstępstwo stanowił materiał stymulowany polem o częstotliwości 90 Hz, dla którego odnotowano spadek ilości jednostek tworzących kolonie przypadających na 1 gram materiału.



Rys. 29. Ogólna liczba bakterii przy zmiennej częstotliwości i stałej indukcji magnetycznej pola oraz czasie stymulacji

Źródło: opracowanie własne

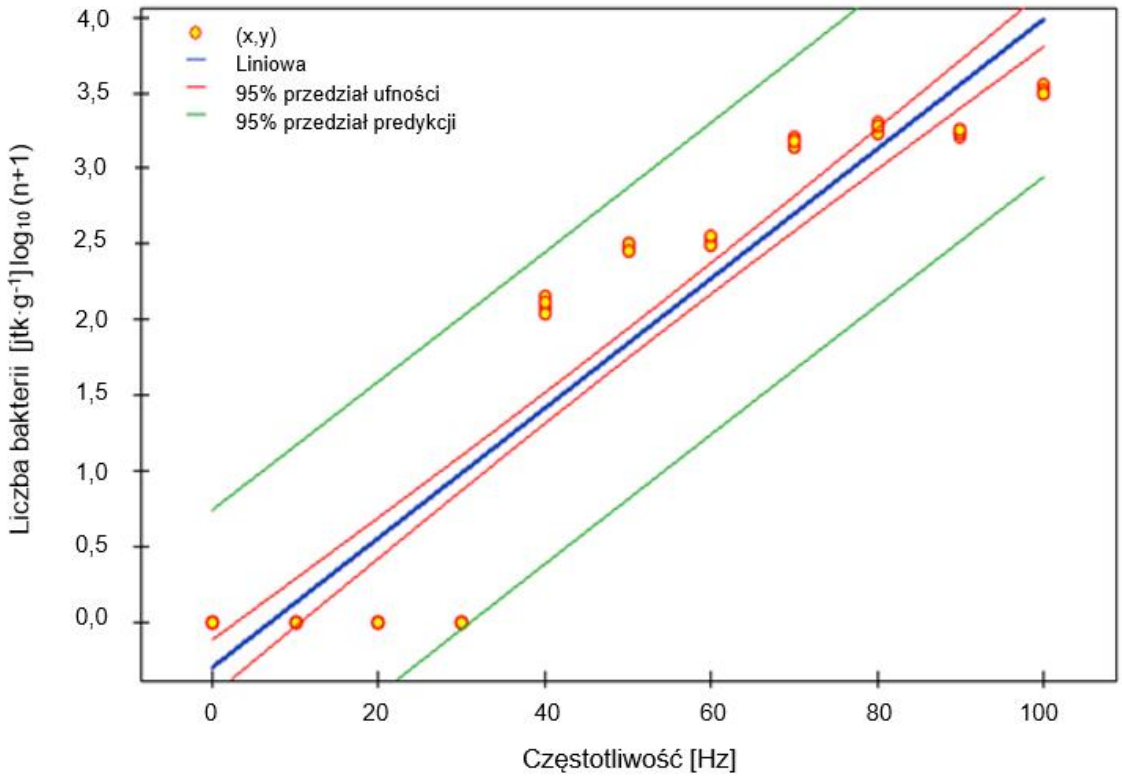
Predykcja opisywanego parametru w zależności od częstotliwości pola elektromagnetycznego, może odbywać się z uwzględnieniem lub z pominięciem wartości, dla których nie zaobserwowano obecności bakterii (f=10-30 Hz). Bazując na modelu regresji liniowej, wykonano dwa odrębne prognozowania obejmujące pełny oraz pomniejszony (f=70-100 Hz) zakres częstotliwości. Dane uzyskane dla pełnego spektrum zestawiono w tabeli 5, opisano wzorem 20 i przedstawiono na rysunku 30.

Tab. 5. Współczynniki modelu regresji liniowej predykcji ogólnej liczby bakterii na podstawie częstotliwości dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.2

	wsp. B	błąd b	-95% CI	+95% CI	stat. t	wartość p
w. wolny	-0,2964	0,0922	-0,4792	-0,1135	-3,2131	0,0017
Częstotliwość [Hz]	0,0428	0,0016	0,0397	0,0459	27,4609	<0,0001

Źródło: opracowanie własne

$$log_{10}L_b = 0{,}0428f - 0{,}2964 \qquad (20)$$



Rys. 30. Wykres regresji liniowej predykcji ogólnej liczby bakterii na podstawie częstotliwości dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.2

Źródło: opracowanie własne

Model ten okazał się wysoce istotny (F=754,1009, p<0,0001). Współczynnik korelacji wyniósł 0,9353 a współczynnik determinacji 0,8747 (po skorygowaniu 0,8736). Błąd standardowy estymacji był równy 0,5171.

W przypadku pominięcia wartości, dla których wskazanie liczby bakterii było równe 0, możliwe byłoby otrzymanie modelu regresji liniowej o następujących wskaźnikach (F=680,9617, p<0,0001): współczynnik korelacji 0,9535, współczynnik determinacji 0,9092 (po skorygowaniu 0,9079), błąd standardowy estymacji 0,1493.

4.3. Stymulacja materiału polem o zmiennej indukcji magnetycznej i zmiennym czasie trwania oddziaływania oraz skokowymi zmianami częstotliwości

Kolejny etap badań nad wyselekcjonowanym gatunkiem miodu obejmował stymulację materiału polem elektromagnetycznym charakteryzującym się maksymalną indukcją magnetyczną oraz maksymalnym czasem stymulacji dla każdej analizowanej częstotliwości. Oba te parametry zostały dobrane na podstawie możliwości technicznych stanowiska oraz właściwości badanego materiału, co zostało szczegółowo opisane i wyjaśnione w rozdziale 3.2. Po zakończonej stymulacji próbek, wykonano oznaczenie

ich emisji fotonowej, a następnie szereg badań mikrobiologicznych, mających na celu określenie potencjalnych zmian wywołanych stymulacją. Wyznaczono kolejno całkowitą liczbę drobnoustrojów zdolnych do wzrostu i tworzenia kolonii, liczbę żywych osmofilnych drożdży i kserofilnych pleśni, a także obecności bakterii beztlenowych z rodzaju *Clostridium sp.*, zgodnie z opisaną metodyką.

W tabeli 6 zestawiono wartości średnie dla wszystkich mierzonych parametrów.

Tab. 6. Wartości średnie wyników badań stymulacji materiału polem o zmiennej indukcji magnetycznej i zmiennym czasie trwania oddziaływania oraz skokowymi zmianami częstotliwości

f [Hz]	B [mT]	t [s]	D [kJ·m^{-3}]	Emisja [imp·600s^{-1}]	Ogólna liczba bakterii [jtk·g^{-1}]	Ogólna liczba drożdży i pleśni [jtk·g^{1}]	Obecność *Clostridium sp.*
0*	0,0	0	0	80	0	<1	Brak
10	109,3	420	3995	68	$7{,}1\cdot10^{4}$	<1	Brak
20	90,2	690	4470	52	$7{,}7\cdot10^{4}$	<1	Brak
30	47,5	930	4110	43	$8{,}5\cdot10^{5}$	<1	Brak
40	60,8	1110	3267	39	$2{,}4\cdot10^{6}$	<1	Brak
50	53,8	1710	3941	31	$2{,}3\cdot10^{7}$	<1	Brak
60	48,1	3300	6079	28	$2{,}8\cdot10^{7}$	<1	Brak
70	43,2	4200	8024	40	$1{,}4\cdot10^{7}$	<1	Brak
80	37,8	8790	10000	29	$9{,}8\cdot10^{7}$	<1	Brak
90	33,5	13500	12062	20	$1{,}4\cdot10^{8}$	<1	Brak
100	32,0	19800	16143	12	$1{,}9\cdot10^{8}$	<1	Brak

*próbka kontrolna

Źródło: opracowanie własne

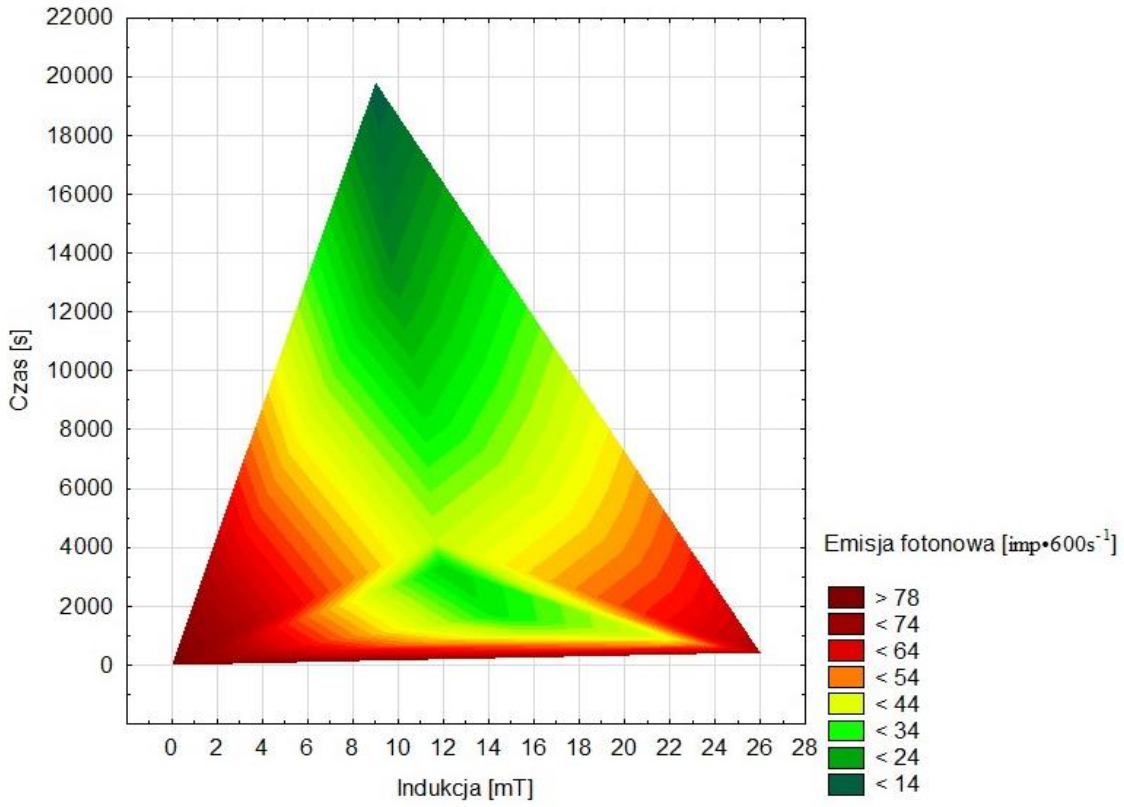
Podobnie jak w przypadku poprzednich badań (rozdział 4.2) zmierzona liczba fotonów (impulsów zidentyfikowanych przez fotopowielacz) w okresie 600 sekund, miała charakter liniowego trendu spadkowego z jednym punktem wyraźnie odbiegającym od tej tendencji (f=70 Hz; B=43,2 mT; t=578,5 s). Dla wszystkich badanych wariantów emisja była niższa od wartości uzyskanej przy próbie kontrolnej, tj. niepoddanej stymulacji polem elektromagnetycznym, a różnice te (pomijając wartości uzyskane przy częstotliwości 60 i 80 Hz) były wysoce istotnie ($p<0{,}01$).

Warto wspomnieć również, że wzrost liczby emitowanych fotonów i spadek ogólnej liczby bakterii, który zaobserwowano przy częstotliwości 70 Hz, występował w wielu

badaniach prowadzonych na przedmiotowym stanowisku, również w ramach doświadczeń nie wchodzących w skład niniejszej pracy.

Zgodnie z zastosowaną metodyką, w celu wykonania analiz statystycznych, wynik ogólnej liczby bakterii przekształcono przy użyciu logarytmu dziesiętnego.

W przypadku stymulacji materiału polem o zmiennej indukcji i zmiennym czasie trwania oddziaływania oraz skokowymi zmianami częstotliwości możliwe było wykonanie porównania poszczególnych parametrów stymulacji oraz wskaźnika skuteczności danego procesu w postaci emisji fotonowej i ogólnej liczby bakterii. Takie zestawienie miało za zadanie wskazać (zgodnie z przyjętymi w danej pracy założeniami) istotność uwzględniania częstotliwości pola jako jednego z czynników przedmiotowej stymulacji. Analizując jedynie te parametry, które są przedmiotem rozważań większości prac poświęconych stymulacji polem elektromagnetycznym substancji organicznej, tj. indukcję magnetyczną pola oraz czas trwania oddziaływania, możliwe jest wyznaczenie takiej ich kombinacji, w której emisja fotonowa osiąga najwyższą wartość. Jak wskazano na rysunku 31, aby uzyskać wysoką wartość emisji z badanego materiału, należy tak dobrać omawiane parametry pola, aby ich kombinacja sytuowała się w obszarze koloru czerwonego.



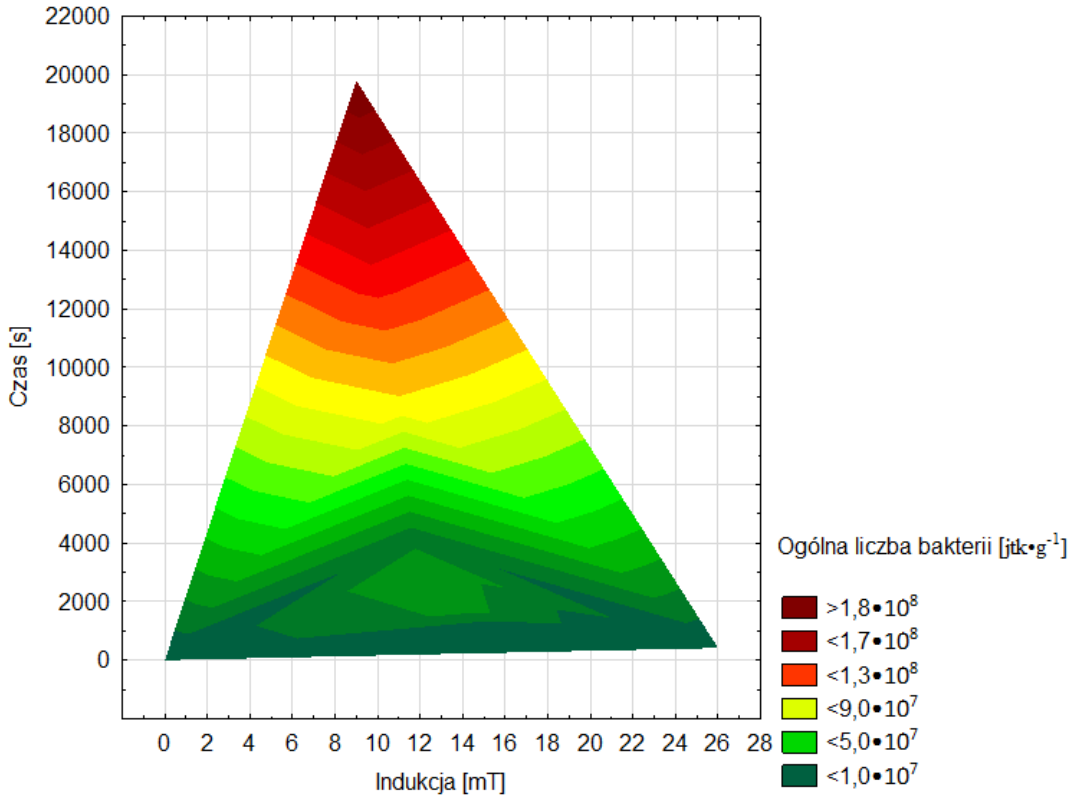
Rys. 31. Wartość emisji fotonowej w funkcji czasu stymulacji i indukcji magnetycznej pola

Źródło: opracowanie własne

Przedstawione wyniki wskazują, że czas stymulacji odgrywa w tym przypadku drugorzędną rolę, znacznie ustępując pod względem istotności indukcji magnetycznej. Ponadto, odnotowana emisja fotonowa z badanego materiału nie wskazuje jednoznacznego trendu. Otrzymane wyniki są najniższe w obszarze pomiędzy 41, a 63 mT i przybierają wyższe wartości zarówno ze wzrostem jak i spadkiem indukcji. Stosując wprowadzone w metodyce pojęcie dawki ekspozycyjnej (wzór 7) możliwe jest określenie jej wartości determinującej najwyższą emisję fotonową. Efekt ten zostanie uzyskany dla dawki z zakresu od 0 do około 159 kJ·m^{-3}, jak i od 7960 do 9510 kJ·m^{-3}.

Rozpatrując ponownie czas stymulacji oraz indukcję magnetyczną pola, ale tym razem przyjmując ogólną liczbę bakterii jako wskaźnik zmian wywołanych stymulacją (rys. 32), odnotowano, że czynnikiem determinującym uzyskane wartości jest czas stymulacji (odwrotnie niż w poprzednim akapicie).

W tym przypadku najwyższe wartości odnotowano, podobnie jak poprzednio, dla indukcji wynoszącej około 40 mT, ale przy czasie przekraczającym 18000 s.

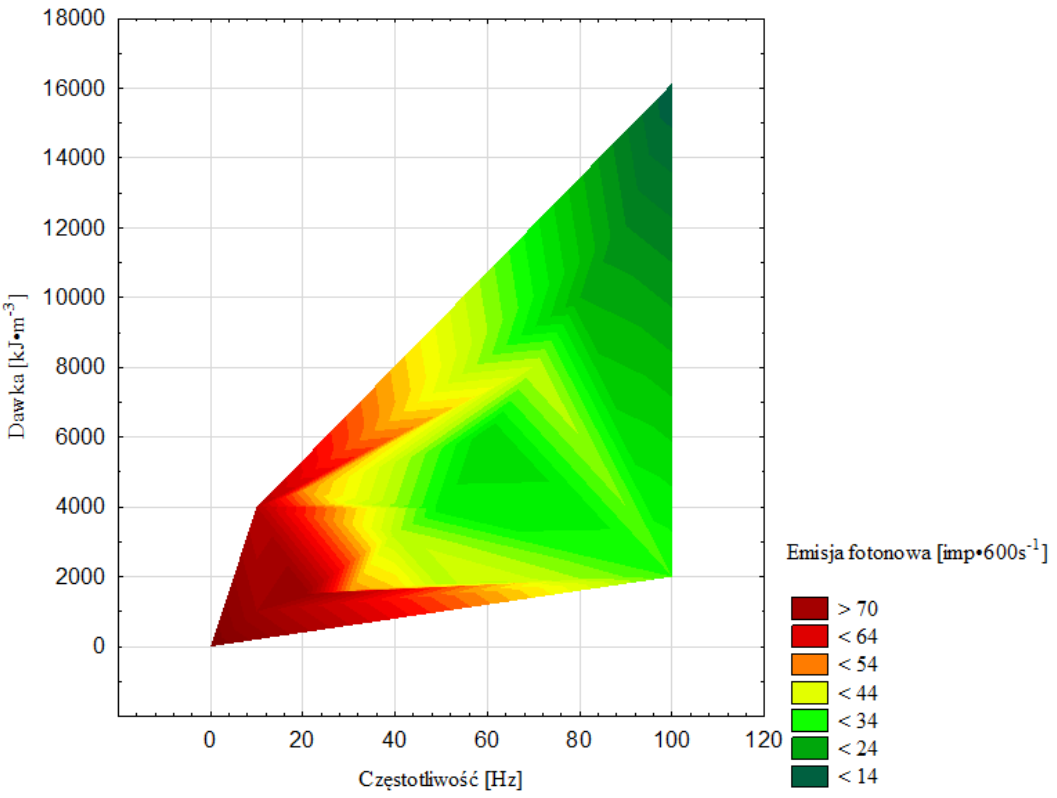


Rys. 32. Wartość ogólnej liczby bakterii w funkcji czasu stymulacji i indukcji magnetycznej pola
Źródło: opracowanie własne

Z perspektywy aktywności biologicznej miodu pożądaną własnością jest jak najniższa liczba zidentyfikowanych kolonii bakterii. Taki efekt zostanie osiągnięty dla dawki z przedziału od 0 do 270 kJ·m^{-3}.

Biorąc pod uwagę przedstawione wyniki można domniemywać, że najwyższa aktywność biologiczna miodu przejawiająca się najwyższą emisją fotonową i najniższą liczbą bakterii, zostanie osiągnięta (niezależnie od wartości indukcji) dla czasu nie przekraczającego 700 s.

Na rysunku 33 zestawiono ze sobą zastosowaną dawkę ekspozycyjną pola oraz jego częstotliwość, wraz z wynikową w postaci emisji fotonowej. Najniższą emisją fotonową odznaczały się próbki poddane stymulacji polem o częstotliwości 100 Hz, jednak wartości te malały wraz ze wzrostem dawki ekspozycyjnej pola. Analizując jedynie ten zakres dawki, który określony uprzednio jako najbardziej obiecujący z perspektywy aktywności biologicznej miodu, można zaobserwować, że wraz ze wzrostem częstotliwości pola wartość emisji fotonowej maleje. Oznacza to zatem, że rozpatrywanie wyników stymulacji polem elektromagnetycznym bez uwzględnienia czynnika w postaci częstotliwości spowoduje uzyskanie nieprecyzyjnych wyników.

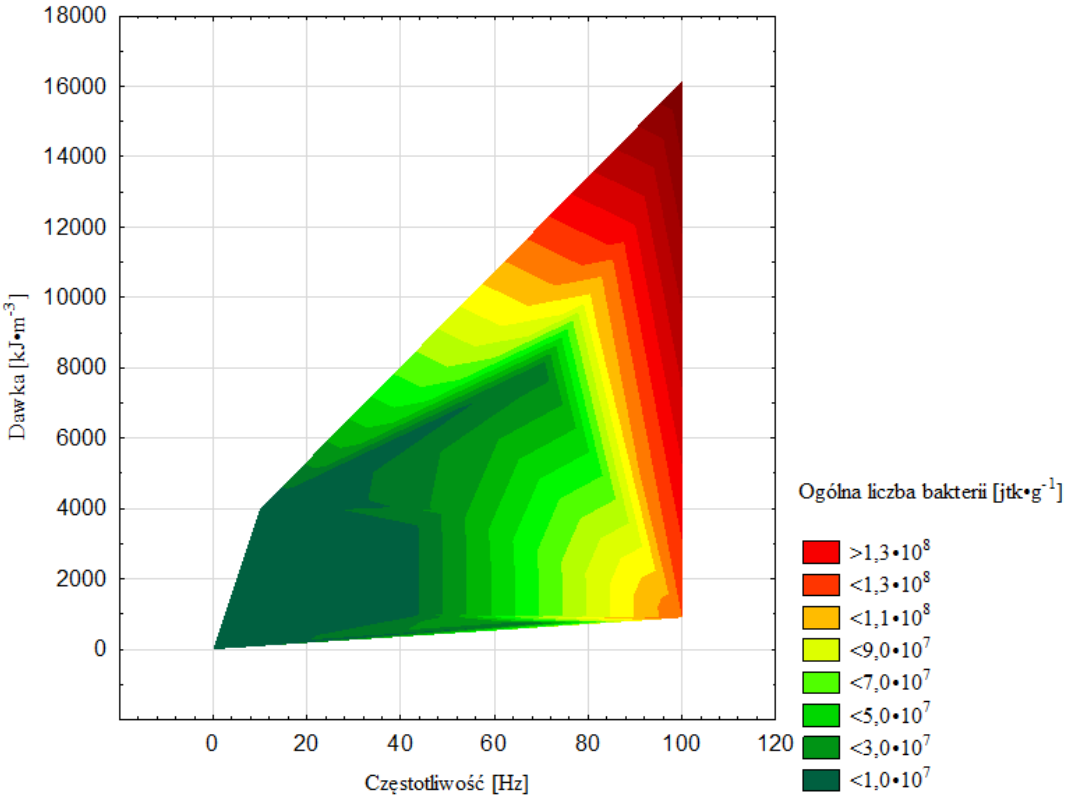


Rys. 33. Wartość emisji fotonowej w funkcji dawki ekspozycyjnej i częstotliwości pola

Źródło: opracowanie własne

Interpretację rezultatów stymulacji próbek miodu polem elektromagnetycznym, analogiczną do przedstawionej poprzednio, lecz uwzględniającą jako wskaźnik ogólną liczbę bakterii, przedstawiono na rysunku 34.

Najniższe wartości określające ogólną liczbę bakterii odnotowano dla kombinacji dawki i częstotliwości, dla której obszar przyjmował kolor ciemnej zieleni, z kolei najwyższe przy maksymalnej z rozpatrywanego zakresu częstotliwości i dawce (kolor ciemnoczerwony). Odnotowano, że dla zakresu od 0 do 40 Hz uzyskane rezultaty nie różniły się znacząco, niezależnie od dawki ekspozycyjnej. Jednakże, dalszy przyrost powodował stopniowe zwiększanie się liczby kolonii bakterii. Podobnie jak w poprzedniej analizie, rozpatrując dawkę jako wartość stałą, stwierdzono istotny wpływ częstotliwości pola na uzyskane rezultaty.



Rys. 34. Wartość ogólnej liczby bakterii w funkcji dawki ekspozycyjnej i częstotliwości pola

Źródło: opracowanie własne

W żadnej z analizowanych próbek wykorzystanych w eksperymencie nie wykryto obecności drożdży, pleśni, a także bakterii beztlenowych z rodzaju *Clostridium sp.* Może to świadczyć o braku tych drobnoustrojów w materiale badawczym, ale także o nieobecności zarodników (form przetrwalnikowych), które mogłyby zostać wzbudzone na skutek oddziaływania polem elektromagnetycznym i/lub o wysokiej skuteczności

stymulacji w pełnym spektrum zastosowanej częstotliwości pola w eliminacji tego rodzaju mikroorganizmów.

Zarówno wyniki emisji fotonowej, jak i ogólnej liczby bakterii różniły się od siebie wysoce istotnie ($p<0,01$), zachowując odwrotną proporcjonalność pomiędzy tymi dwoma parametrami. Emisja fotonowa charakteryzowała się trendem malejącym przy wzroście częstotliwości stymulacji, z kolei liczba bakterii miała tendencję wzrostową.

W badaniach tych występowały cztery zmienne (indukcja, czas stymulacji, dawka i częstotliwość pola) oraz dwie zmienne możliwe do zaprognozowania (emisja fotonowa i ogólna liczba bakterii). W tym celu wykonano analizę jednoczynnikowych, dwuczynnikowych i trójczynnikowych modeli regresji liniowej, zarówno dla predykcji emisji jak i ogólnej liczby bakterii. Poniżej opisano wyniki dla wszystkich analizowanych modeli, a wykresy analizy jednoskładnikowej i trójskładnikowej zawarte są w Aneksie (rozdział 10).

W analizach jednoczynnikowych, dla których zmienną objaśnianą była emisja fotonowa, ze statystycznego punktu widzenia indukcja stanowiła nieistotny predyktor ($p>0,05$), natomiast pozostałe parametry stymulacji, tj. czas stymulacji, dawka oraz częstotliwość były wysoce istotne ($p<0,01$). Prognozowanie emisji fotonowej przy użyciu trójczynnikowego (indukcja, czas stymulacji, częstotliwość pola) modelu regresji liniowej wykazało jego wysoką istotność ($F=290,09$, $p<0,0001$). Współczynnik korelacji wyniósł 0,9442, a współczynnik determinacji 0,8914 (po skorygowaniu 0,8884). Błąd standardowy danej estymacji przyjął wartość 6,411.

Zgodnie ze wzorem nr 7 przedstawionym w metodyce, indukcję magnetyczną pola oraz czas stymulacji materiału można powiązać ze sobą stosując parametr określany jako dawka ekspozycyjna (D). Wprowadzenie danej zależności pozwala ograniczyć zmienne objaśniające do dwóch parametrów, to jest dawki oraz częstotliwości pola, co zostało zaprezentowane w tabeli 7, wzorze 21 oraz na rysunku 35.

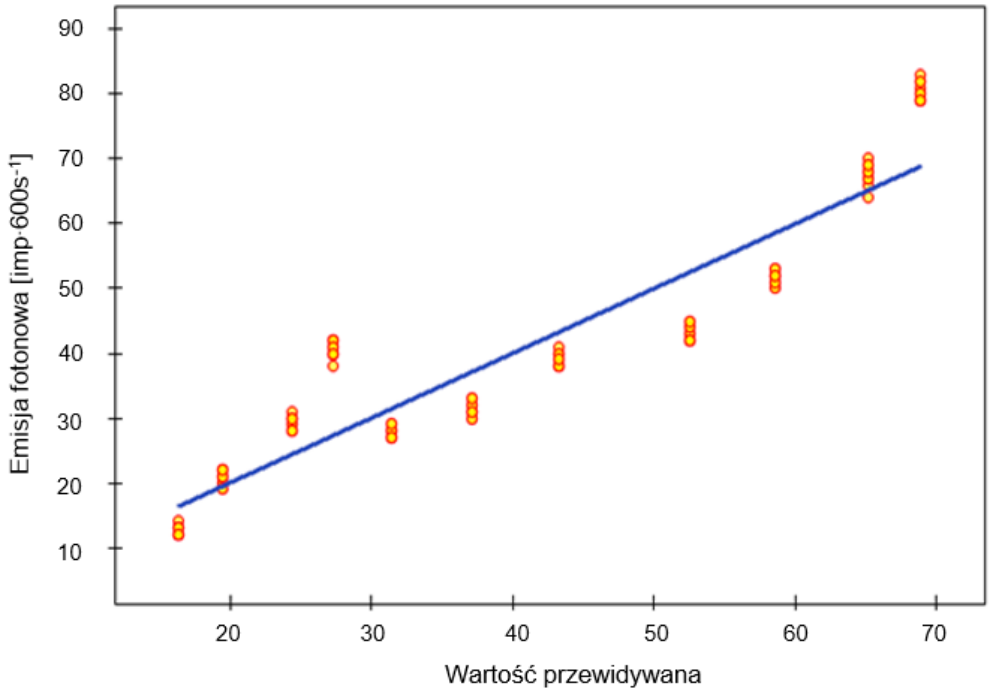
Tab. 7. Współczynniki dwuczynnikowego modelu regresji liniowej predykcji emisji dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3

	wsp. B	błąd b	-95% CI	+95% CI	stat. t	wartość p
w. wolny	68,8453	1,3197	66,2291	71,4614	52,1669	<0,0001
Dawka [kJ·m^{-3}]	0,0153	0,0046	0,0063	0,0244	3,356	0,0011
Częstotliwość [Hz]	-0,7209	0,0542	-0,8285	-0,6134	-13,2911	<0,0001

Źródło: opracowanie własne

$$E = 0{,}0153D - 0{,}7209f + 68{,}8453 \qquad (21)$$

Dwuczynnikowy model regresji liniowej predykcji emisji fotonowej okazał się wysoce istotny (F=323,1863, p<0,0001). Współczynnik korelacji wyniósł 0,9263 a współczynnik determinacji był równy 0,8580 (po skorygowaniu to 0,8553). Błąd standardowy estymacji był równy 7,2981.



Rys. 35. Wykres dwuczynnikowej regresji liniowej predykcji emisji dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3

Źródło: opracowanie własne

W analizach jednoczynnikowych, dla których zmienną objaśnianą był logarytm dziesiętny z ogólnej liczby bakterii zdolnych do wzrostu i tworzenia kolonii, ponownie nieistotną zmienną objaśniającą, z punktu widzenia statystyki, okazała się indukcja magnetyczna (p>0,05), natomiast wszystkie pozostałe predyktory były wysoce istotne (p<0,01).

Trójczynnikowy model regresji liniowej predykcji liczby bakterii, wykorzystujący jako zmienne objaśniające indukcję, czas stymulacji oraz częstotliwość pola elektromagnetycznego, okazał się wysoce istotny (F=1899,3355, p<0,0001), ze współczynnikiem korelacji na poziomie 0,9908. Dla modelu tego współczynnik determinacji przyjął wartość 0,9817, która po skorygowaniu wynosiła 0,9812, a błąd standardowy estymacji określono jako 0,3135. Odwołując się ponownie do pojęcia dawki

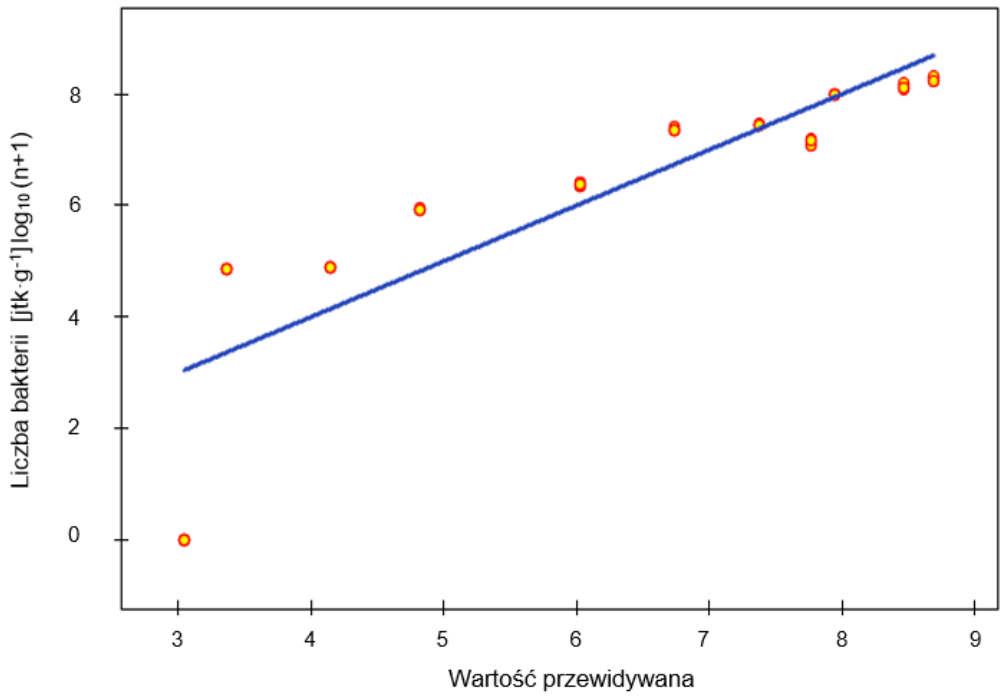
ekspozycyjnej wykonano analizę dwuczynnikową (tab. 8), której zależność opisano równaniem 22 oraz zobrazowano na rysunku 36.

Tab. 8. Dwuczynnikowy model regresji liniowej predykcji ogólnej liczby bakterii dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3

	wsp. B	błąd b	-95% CI	+95% CI	stat. t	wartość p
w. wolny	3,0453	0,2102	2,6286	3,4621	14,487	<0,0001
Dawka [kJ·m^{-3}]	-0,0024	0,0007	-0,0039	-0,001	-3,3375	0,0012
Częstotliwość [Hz]	0,0875	0,0086	0,0703	0,1046	10,1233	<0,0001

Źródło: opracowanie własne

$$log_{10}L_b = -0{,}0024D + 0{,}0875f + 3{,}0453 \qquad (22)$$



Rys. 36. Wykres dwuczynnikowej regresji liniowej predykcji ogólnej liczby bakterii dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3

Źródło: opracowanie własne

Uzyskany model regresji liniowej (dwuczynnikowy) predykcji liczby bakterii okazał się wysoce istotny (F=157,5484, p<0,0001), przyjmując następujące wskaźniki statystyczne: współczynnik korelacji 0,8640; współczynnik determinacji 0,7465; skorygowany współczynnik determinacji 0,7418; błąd standardowy estymacji 1,1625.

4.4. Stymulacja materiału ze zmianą częstotliwości w trakcie trwania oddziaływania

W ostatnim z przeprowadzonych doświadczeń, podjęto próbę sprawdzenia, czy modyfikacja częstotliwości w trakcie trwania stymulacji spowoduje istotną zmianę własności materiału, tj. zawartości substancji aktywnych biologicznie reprezentowanych przez emisję fotonową, ogólną liczbę bakterii oraz ogólną liczbę drożdży i pleśni, a także czy wpłynie na obecność bakterii z grupy *Clostridium sp.* W tym celu przygotowano trzy próbki, każdą w dziesięciu powtórzeniach. Pierwsza z nich została poddana stymulacji o następujących parametrach: częstotliwość pola 100 Hz, indukcja pola równa 32 mT, czas trwania stymulacji 20 min, dawka wynikająca z przyjętych wartości wynosząca 978 kJ·m^{-3}. W przypadku drugiej próbki zmieniono jedynie częstotliwość pola, która wynosiła w tym przypadku 50 Hz. Próbka trzecia była przez 10 minut stymulowana polem elektromagnetycznym o częstotliwości 100 Hz (indukcja 32 mT), a przez kolejne 10 minut polem o częstotliwości 50 Hz (indukcja również 32 mT). Oznacza to, że wszystkie trzy próbki przyjęły tę samą dawkę (978 kJ·m^{-3}), a jedyną zmienną była częstotliwość.

W tabeli 9 przedstawiono wartości średnie emisji fotonowej i zawartości mikroorganizmów przy zmianie częstotliwości w trakcie stymulacji ze 100 Hz na 50 Hz.

Tab. 9. Średnie wartości emisji fotonowej i zawartości mikroorganizmów przy zmianie częstotliwości w trakcie stymulacji (ze 100 Hz na 50 Hz)

f [Hz]	B [mT]	t [s]	D [kJ·m^{-3}]	Emisja [imp·600s^{-1}]	Ogólna liczba bakterii [jtk·g^{-1}]	Ogólna liczba drożdży i pleśni [jtk·g^{-1}]	Obecność *Clostridium sp.*
100	9,0	1200	978	45	$4{,}3 \cdot 10^3$	<1	Brak
50	9,0	1200	978	53	$3{,}4 \cdot 10^3$	<1	Brak
100	9,0	600	978	48	$4{,}2 \cdot 10^3$	<1	Brak
50		600					

Źródło: opracowanie własne

W badaniu tym ponownie nie zaobserwowano obecności drożdży, pleśni ani bakterii *Clostridium sp*. Jednakże, materiał stymulowany polem o częstotliwości 100 Hz wykazywał niższą emisję fotonową oraz wyższą liczbę bakterii w porównaniu do materiału stymulowanego tą samą dawką, ale przy częstotliwości wynoszącej 50 Hz. W przypadku próbki, dla której nastąpiła zmiana częstotliwości w trakcie stymulacji (ze

100 Hz na 50 Hz), uzyskane wyniki są zbliżone do wyników uzyskanych przy parametrach: f=100 Hz, t=1200 s, D= 978 kJ·m^{-3}.

Wydaje się zatem, że efekt wywołany oddziaływaniem pola o częstotliwości 100 Hz został jedynie zatrzymany po zmianie częstotliwości na 50 Hz, ale nie nastąpiło odwrócenie trendu, tj. ponowny przyrost aktywności biologicznej, oznaczający spadek liczby bakterii przy jednoczesnym wzroście liczby fotonów. Aby zweryfikować to przypuszczenie wykonano serię powtórzeń (tab. 10) dla innych parametrów pola. Tym razem pierwszą część materiału stymulowano przez 6 minut polem o częstotliwości 10 Hz, drugą część polem o f=50 Hz oraz trzecią część przez 3 minuty polem o częstotliwości 10 Hz, a przez kolejne 3 minuty polem o częstotliwości 50 Hz. We wszystkich wariantach indukcja wynosiła 32 mT, a dawka była stała i równa 783 kJ·m^{-3}.

Tab. 10. Średnie wartości emisji fotonowej i zawartości mikroorganizmów przy zmianie częstotliwości w trakcie stymulacji (z 10 Hz na 50 Hz)

f [Hz]	B [mT]	t [s]	D [kJ·m^{-3}]	Emisja [imp·600s^{-1}]	Ogólna liczba bakterii [jtk·g^{-1}]	Ogólna liczba drożdży i pleśni [jtk·g^{-1}]	Obecność *Clostridium sp.*
10	32,0	960	783	81	0	<1	Brak
50	32,0	960	783	72	1,1·10^3	<1	Brak
10	32,0	480	783	76	8,5·10^2	<1	Brak
50		480					

Źródło: opracowanie własne

Dla materiału stymulowanego polem o częstotliwości równej 10 Hz nie zaobserwowano obecności jakichkolwiek drobnoustrojów, a emisja fotonowa przyjęła wartość średnią na poziomie 81 imp·600s^{-1}. Oddziaływanie polem o częstotliwości 50 Hz spowodowało spadek emisji fotonowej do średnio 72 imp·600s^{-1} oraz wskazało na obecność bakterii (1,1·10^3 jtk·g^{-1}). Zmiana częstotliwości w połowie okresu trwania stymulacji (z niższej wartości na wyższą) skutkowała otrzymaniem ogólnej liczby bakterii wyższej niż dla stymulacji polem o f=10 Hz, ale niższej niż dla f=50 Hz. Analogicznie, liczba fotonów była odpowiednio niższa (w porównaniu z 10 Hz) i wyższa (dla 50 Hz). Może to zatem oznaczać, że pomimo niewykazania wpływu pola elektromagnetycznego przez pierwsze 3 min oddziaływania (10 Hz), późniejsza zmiana częstotliwości na wyższą spowodowała redukcję aktywności biologicznej materiału, skutkującą wzrostem mikroorganizmów zawartych w miodzie. Przeprowadzone

doświadczenie wskazuje, że spadek aktywności biologicznej miodu przejawiający się wzrostem ogólnej liczby bakterii oraz spadkiem emisji fotonowej jest procesem nieodwracalnym. Redukcja częstotliwości w trakcie stymulacji nie spowodowała gwałtownego spadku liczby bakterii, choć przy niższych częstotliwościach odnotowano mniejszą liczbę drobnoustrojów. Jednocześnie, zwiększenie częstotliwości w trakcie oddziaływania spowodowało spadek aktywności biologicznej materiału – przyrost liczby bakterii, który nie był notowany dla częstotliwości równej 10 Hz.

5. Dyskusja wyników

W niniejszej pracy zastosowano pole elektromagnetyczne o częstotliwościach w zakresie od 0 do 100 Hz, które zgodnie z definicją określane jest jako tzw. pole skrajnie niskiej częstotliwości (ang. extremely low frequencies) (Funk, Monsees i Zkucur 2009), do stymulacji materiału biologicznego w postaci miodu pszczelego. Jak zauważają Chen i in. (2019) badania nad stymulacją polem elektromagnetycznym są prowadzone z reguły przy wykorzystaniu jednej określonej częstotliwości i indukcji pola lub stałej częstotliwość i zmiennym natężeniach pola, co zdaniem tych autorów jest przyczyną uzyskiwania sprzecznych wyników przez różnych badaczy. Wśród niskich częstotliwości przeważają w zdecydowanej większości stanowiska zasilane prądem elektrycznym o częstotliwości 50 lub 60 Hz (Fischer i in. 2004).

Wpływ oddziaływania pola elektromagnetycznego na struktury biologiczne został opisany w licznych publikacjach. Jak wspomniano we wstępie (rozdział 1), materiałami poddanymi takiej stymulacji były między innymi: zboża, takie jak kukurydza (Aguilar i in. 2009; Zepeda-Bautista i in. 2010), pszenica (Balakhnina i in. 2015), czy jęczmień (Răcuciu, Oloşutean i Perju 2017), rośliny przemysłowe, np. słonecznik (Matwijczuk, Kornarzyński i Pietruszewski 2012), tytoń (Abdolmaleki i in. 2007; Mohammadi i in. 2018), warzywa (w tym nasiona), wśród których znalazł się groch (Iqbal i in. 2012), fasola mung (Huang i in. 2018), rzodkiewka (Novitskii, Novitskaya i Serdyukov 2014), ziemniaki (Marks i Szeówka 2010; Marks i Szecówka 2011; Statsyuk i in. 2016) i pomidory (Jedlička, Paulen i Ailer 2015; Anand i in. 2019), owoce (i ich nasiona) takie jak truskawki (Kutyrev i in. 2017; Izmailov i in. 2018), gruszki (Donetskikh i in. 2017), marakuja (Menegatti i in. 2019) i orzechy kokosowe (Kundu, Gupta i Mallick 2017), a także drożdże (Ostafin i in. 2016), czy bakterie (Fojt i in. 2009; Konopacki i Rakoczy 2019). W badaniach tych stosowano jednak głównie stałą częstotliwość.

Przy zastosowaniu częstotliwości analogicznych do zastosowanych w niniejszej pracy inni autorzy uzyskali wyniki hamujące przyrost i aktywność materiału biologicznego, co jest sprzeczne z rezultatami uzyskanymi przez autora dysertacji. Należy jednak zauważyć, że w badaniach tych materiałem poddanym działaniu były komórki ludzkie (Liu i in. 2020) i zwierzęce (Karbalay-Doust i in. 2021). W innych badaniach nad komórkami zwierzęcymi, gdzie zastosowano częstotliwość pola w zakresie 0-100 Hz, z interwałem 10 Hz i indukcją 1,8 mT, odnotowano wzrost namnażania się komórek

(względem próbki nie poddanej działaniu pola elektromagnetycznego) przy częstotliwości 10, 70 i 80 Hz, przy jednoczesnym zahamowaniu wzrostu dla częstotliwości od 30 do 60 Hz (Zhou i in. 2021). Z kolei w badaniach nad białkami wyekstrahowanymi z miazgi zębowej wskazano zmniejszanie się liczby antygenów wraz ze zmianą częstotliwości pola (Lim i in. 2021). Zastosowano w tym przypadku indukcję równą 10 mT i skokową zmianę częstotliwości – 40, 60, 70 i 150 Hz. Zbadano również wpływ stymulacji polem o zmiennej częstotliwości (w zakresie 20-70 Hz) na srebro koloidalne (Ignatov i Drossinakis 2020). Efektem badań było stwierdzenie zwiększenia aktywności tego materiału po stymulacji. Nie zróżnicowano jednak wyników tej aktywności w odniesieniu do zastosowanej częstotliwości. Kiedy jednak podobnej stymulacji (częstotliwość w zakresie 0-100 Hz, indukcja magnetyczna nie przekraczająca 3 mT, czas 1 h) poddano bakterię *Escherichia coli*, odnotowano wzrost jej aktywności wraz z przyrostem częstotliwości (Chen i in. 2019). Przy zastosowaniu niewielkiej indukcji z zakresu 0,2-1 mT zaobserwowano wzrost aktywności biologicznej (rozumianej w tym kontekście jako aktywność enzymu produkowanego przez bakterię *Aspergillus Niger*) i jej stopniowy przyrost wraz ze wzrostem indukcji i/lub czasu stymulacji (Gao, Zhang i Feng 2011), co jest jednoznaczne ze wzrostem dawki ekspozycyjnej. Wyniki te są zbieżne z wynikami przedstawionymi w niniejszej pracy, choć autorzy opisywanych badań stosowali stałą częstotliwość pola (50 Hz). Podobne efekty, to jest zwiększanie metabolizmu mikroorganizmów wraz ze wzrostem czasu trwania stymulacji (co przy stałej indukcji przekłada się na wzrost dawki) uzyskali Jadidi, Safari i Baghian (2013), ale i w tym przypadku zastosowano stałą częstotliwość pola.

Warto wspomnieć, że wzrost ilości emitowanych fotonów i spadek ogólnej liczby bakterii, który zaobserwowano w niniejszej pracy przy częstotliwości 70 Hz i 90 Hz (w zależności od wariantu doświadczenia), występował wielokrotnie w różnych eksperymentach prowadzonych na przedmiotowym stanowisku. Zależność ta była również odnotowywana w ramach doświadczeń nie wchodzących w skład omawianej pracy. Ponieważ jednak w literaturze niewiele jest opracowań, w których wykorzystywano szerokie spektrum częstotliwości pola oraz stymulację elektromagnetyczną miodu, nie znaleziono potwierdzenia opisanej wyżej zależności.

6. Wnioski

Wyniki badań jednoznacznie potwierdzają sformułowaną w rozprawie hipotezę I, zakładającą, że stymulowanie materiału biologicznego polem elektromagnetycznym prowadzi do zmiany aktywności substancji biologicznie czynnej. Aktywność ta może być identyfikowalna wielkością emisji fotonowej stymulowanego materiału (hipoteza II), co potwierdziły przeprowadzone w niniejszej pracy eksperymenty.

Z przeprowadzonych doświadczeń i analiz wynikają następujące wnioski:

1. Skonstruowany system do stymulacji materii organicznej polem elektromagnetycznym pozwala z akceptowalną niepewnością generować wymuszenia o specyficznej charakterystyce pod względem dawki indukcji oraz częstotliwości, a także temperatury stymulowanej materii organicznej, umożliwiając prowadzenie wielowariantowych eksperymentów bez ryzyka denaturacji białka.
2. Skonstruowany system pozwala na autonomiczną pracę urządzenia poprzez zastosowanie programowalnego ramienia robota w obrębie jednego zasobnika próbek, gdzie parametry stymulacji pod względem dawki indukcji, częstotliwości i temperatury wewnątrz rdzenia cewki są stałe.
3. System ma możliwość rozbudowy pozwalającej na pełną autonomiczność działania z uwzględnieniem zmiany parametrów stymulacji materii organicznej w czasie jej trwania.
4. Stwierdzono, że wzrost częstotliwości pola elektromagnetycznego przy stałej indukcji magnetycznej oraz stałym czasie stymulacji materii organicznej powoduje spadek emisji fotonowej tej materii, a zaobserwowane różnice w wartościach średnich przedmiotowej emisji są statystycznie istotne.
5. Stwierdzono, że wzrost częstotliwości pola elektromagnetycznego przy stałej indukcji magnetycznej oraz stałym czasie stymulacji materii organicznej powoduje wzrost liczby bakterii zdolnych do wzrostu i tworzenia kolonii w pożywce stałej po inkubacji w warunkach tlenowych w temperaturze 30°C, a zaobserwowane różnice w wartościach średnich są statystycznie istotne.
6. Stwierdzono, że najwyższą wartość ogólnej liczby bakterii uzyskano w przypadku maksymalnej dawki promieniowania elektromagnetycznego oraz najwyższej częstotliwości pola elektromagnetycznego.

7. Stwierdzono, że w przypadku stymulacji materii organicznej polem elektromagnetycznym o zróżnicowanych parametrach indukcji magnetycznej, częstotliwości pola elektromagnetycznego oraz zróżnicowanym czasie stymulacji, decydującymi czynnikami z punktu widzenia zmian aktywności biologicznej materii organicznej były: dawka promieniowania, czas stymulacji, a także częstotliwość pola elektromagnetycznego.
8. Stwierdzono, że zmiana częstotliwości pola elektromagnetycznego w trakcie trwania stymulacji powinna mieć określony trend, ponieważ wywołany nią wpływ na aktywność biologiczną substancji organicznej ma charakter nieodwracalny.
9. Stymulacja miodu polem elektromagnetycznym nie powoduje aktywacji zawartych w nim żywych osmofilnych drożdży i kserofilnych pleśni, a także bakterii beztlenowych z rodzaju *Clostridium sp.*

7. Literatura

1. Abdolmaleki P., Ghanati F., Sahebjamei H., Sarvestani A.S. (2007) Peroxidase activity, lignification and promotion of cell death in tobacco cells exposed to static magnetic field. Environment Systems and Decisions 27(4), 435–440.
2. Abrahamsen R.K., Borge G.I., Harstad O.M., Haug A., Wetlesen A. (2007) Milk quality – a future approach from a researcher's point of view. Journal of Animal and Feed Sciences 16(1), 209–226.
3. Aguilar C.H., Dominguez–Pacheco A., Carballo A., Cruz–Orea A., Ivanov R., Luis J. Pastor J. (2009) Alternating magnetic field irradiation effects on three genotype maize seed field performance. Acta Agrophysica 14(1), 7–17.
4. Al–Nahari A.A.M., Almasaudi A.B., Abd El–Ghany E.S.M, Barbour E., Al Jaouni A.K., Harakeh S. (2015) Antimicrobial activities of saudi honey against *Pseudomonas aeruginosa*. Saudi Journal of Biological Sciences 22(5), 521–525.
5. Al–Waili, N.S., Salom K., Butler G., Al Ghamdi A.A. (2011) Honey and microbial infections: a review supporting the use of honey for microbial control. Journal of Medicinal Food 14(10), 1079–1096.
6. Al–Waili N.S., Al Ghamdi A.A., Ansari M.J., Al–Attal Y., Al–Mubarak A., Salom K. (2013) Differences in composition of honey samples and their impact on the antimicrobial activities against drug multiresistant bacteria and pathogenic fungi. Archives of Medical Research 44, 307–316.
7. Aladjadjiyan A. (2010) Influence of stationary magnetic field on lentil seeds. International Agrophysics 24(3), 321–324.
8. Alqarni A.S., Balhareth H.M., Owayss A.A. (2014) Performance evaluation of indigenous and exotic honey bee (*Apis mellifera L.*) races in Assir region, southwestern Saudi Arabia. Saudi Journal of Biological Sciences 21(3), 256–264.
9. Alqurashi A.M., Masoud E.A., Alamin M.A. (2013) Antibacterial activity of Saudi honey against Gram negative bacteria. Journal of Microbiology and Antimicrobials 5(1), 1–5.
10. Altunatmaz S.S., Tarhan D., Aksu F., Ozsobaci N.P., Or M.E., Barutçu U.B. (2019) Levels of Chromium, Copper, Iron, Magnesium, Manganese, Selenium, Zinc, Cadmium, Lead and Aluminium of honey varieties produced in Turkey. Food Science and Technology 39(2), 1–6.
11. Alvarez–Suarez J.M., Tulipani S., Díaz D., Estevez Y., Romandini S., Giampieri F.,

Damiani E., Astolfi P., Bompadre S., Battino M. (2010) Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. Food and Chemical Toxicology 48(1), 2490–2499.

12. Anand A., Kumari A., Thakur M., Koul A. (2019) Hydrogen peroxide signaling integrates with phytohormones during the germination of magnetoprimed tomato seeds. Scientific Reports 9, 8814, 1–11.
13. Asadi Samani M., Pourakbar L., Azimi N. (2013) Magnetic field effects on seed germination and activities of some enzymes in cumin. Life Science Journal 10(1), 323–328.
14. Atak C., Emiro Ö., Alikamano S., Rzakoulieva A. (2003) Stimulation of regeneration by magnetic field in soybean (*Glycine max L. Merrill*) tissue cultures. Journal of Cell and Molecular Biology 2(1), 113–119.
15. Balakhnina T., Bulak P., Nosalewicz M., Pietruszewski S., Włodarczyk T. (2015) The influence of wheat *Triticum aestivum L.* seed pre–sowing treatment with magnetic fields on germination, seedling growth, and antioxidant potential under optimal soil watering and flooding. Acta Physiologiae Plantarum 37(59), 1–10.
16. Boue S. M., Cleveland T.E., Carter–Wientjes C., Shih B.Y., Bhatnagar D., McLachlan J.M., Burow M.E. (2009) Phytoalexin– enriched functional foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57(7), 2614–2622.
17. Carbonell M.V., Martinez E., Amaya J.M. (2000) Stimulation of germination in rice (*Oryza sativa L.*) by a static magnetic field. Electromagnetic Biology and Medicine 19(1), 121–128.
18. Chang X., Wang J., Yang S., Chen S., Song Y. (2011) Antioxidative, antibrowning and antibacterial activities of sixteen floral honeys. Food and Function 2(9), 541–546.
19. Chen D., Cao H.L., Ye Y.J., Dong C., Liu Y.M., Shang P., Yin D.C. (2016) A novel rotating experimental platform in a superconducting magnet. Review of Scientific Instruments 87(8), 1–7.
20. Chen Y., Cai Z.Z., Feng Q., Gao P., Yang Y., Bai X., Tang B.Q. (2019) Evaluation of the extremely–low–frequency electromagnetic field (ELF–EMF) on growth of bacteria *Escherichia Coli*. Cogent Biology 5(1), 1–11.
21. Danilewski W. J. (1901) Studies on the influence of electricity on physiology of plants. Kharkov. W: Presman, A.J. (Ed.) Electromagnetic Fields and Live Nature (1971),

Warszawa: PWN.

22. Da Silva C.I., Radaeski J.N., Arena M.V.N., Bauermann S.G. (Ed.) (2020) Atlas of pollen and plants used by bees. CISE–Consultoria Inteligente em Serviços Ecossitêmicos, Sorocaba, Brazil.
23. Davis, A.R. (1977). Apparatus and method for exposing seeds to a magnetic field, Patent Stanów Zjednoczonych Ameryki, zgłoszenie nr US4020590A.
24. Deng J., Liu R., Lu Q., Hao P., Xu A., Zhang J., Tan J. (2018) Biochemical properties, antibacterial and cellular antioxidant activities of buckwheat honey in comparison to manuka honey. Food Chemistry 252, 243–249.
25. Donetskikh V.I., Upadyshev M.T., Petrova A.D., Metlitskaya K.D. (2017) Application of AMIS–8 unit to grow improved virus–free planting rootstock of fruit crops. Machinery and Equipment for Rural Area 1, 16–22.
26. Drozd R., Wasak A., Konopacki M., Kordas M., Rakoczy R. (2018) The influence of rotating magnetic field on biochemical processing. W: Ochowiak M., Woziwodzki S., Doligalski E., Mitkowski P.T. (Ed.) Practical Aspects of Chemical Engineering. Springer International Publishing, New York City, USA.
27. Dróżdż T., Bieńkowski P., Kiełbasa P., Nawara P., Popardowski E. (2019) Stanowisko do stymulacji zróżnicowanym polem elektromagnetycznym substancji biologicznej. Przeglad Elektrotechniczny 95(3), 66–69.
28. Dziadek M., Pawlik J., Cholewa–Kowalska K. (2014) Bioactive glasses for tissue engineering. Acta Bio–Optica et Informatica Medica 20(3), 156–65.
29. Dżugan M., Wesołowska M. (2016) Jakość miodów produkowanych na Podkarpaciu. Oficyna Wydawnicza Zimowit, Rzeszów.
30. Edmiston J. (1972) The effect of the field of a permanent magnet on the germination and growth of white mustard (*Brassica alba L.*) seeds. International Journal of Biometeorology 16, 13–24.
31. European Accreditation (2003) EA 4/16 – EA guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing
32. Evans J.D., Schwarz R.S. (2011). Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. Trends in Microbiology 19(12), 614–620.
33. Falade A.O., Mabinya L.V., Okoh A.I., Nwodo U.U. (2019) Agrowastes utilization by raoultella ornithinolytica for optimal extracellular peroxidase activity. Biotechnology and Applied Biochemistry 66, 60–67.

34. Fenech M. (2008) Genome health nutrigenomics and nutrigenetics – diagnosis and nutritional treatment of genome damage on an individual basis. Food and Chemical Toxicology 46, 1365–1370.
35. Ferrada P., Rodríguez S., Serrano G., Miranda–Ostojic C., Maureira A., Zapata M. (2020) An analytical–experimental approach to quantifying the effects of static magnetic fields for cell culture applications. Applied Sciences 10(2) 1–22.
36. Fey D. P., Jakubowska M., Greszkiewicz M., Andrulewicz E., Otremba Z., Urban–Malinga B. (2019) Are magnetic and electromagnetic fields of anthropogenic origin potential threats to early life stages of fish? Aquatic Toxicology 209, 150–158.
37. Fischer G., Tausz M., Köck M., Grill D. (2004) Effects of weak 16 2/3 Hz magnetic fields on growth parameters of young sunflower and wheat seedlings. Bioelectromagnetics 25(8), 638–641.
38. Fojt L., Klapetek P., Strašák L., Vetterl V. (2009) 50 Hz magnetic field effect on the morphology of bacteria. Micron 40(8), 918–922.
39. Funk R.H.W, Monsees T., Zkucur N. (2009) Electromagnetic effects – from cell biology to medicine. Progress in Histochemistry and Cytochemistry 43(4), 177–264.
40. Gao M., Zhang J., Feng H. (2011) Extremely low frequency magnetic field effects on metabolite of *Aspergillus Niger*. Bioelectromagnetics 32(1), 73–78.
41. Ghramh A.H., Ali Khan K., Alshehri A.M.A. (2019) Antibacterial potential of some Saudi honeys from Asir region against selected pathogenic bacteria. Saudi Journal of Biological Sciences 26(6), 1278–84.
42. Gliniak M., Dróżdż T., Nawara P., Lis A., Szczuka M. (2018) The effect of static magnetic field on chemical properties of sewage sludge during biological treatment. Progress in Applied Electrical Engineering (PAEE), 1–5.
43. Grehl S., Martina D., Goyenvalle C., De Deng Z., Rodger J., Sherrard R.M. (2016) In vitro magnetic stimulation: a simple stimulation device to deliver defined low intensity electromagnetic fields. Front Neural Circuits 10(85), 1–16.
44. Grenda T., Grabczak M., Goldsztejn M., Kozieł N., Kwiatek K., Pohorecka K., Skubida M., Bober A. (2018) *Clostridium perfringens* spores in polish honey samples. Journal of Veterinary Research 62(3), 281–284.
45. Grigoryan K. (2016) Safety of honey. W: Prakash V., Martin–Belloso O., Keener L., Astley S.B., Braun S., McMahon H., Lelieveld H. (Ed.) Regulating safety of traditional and ethnic foods. Academic Press, Cambridge, 217–246.

46. Hossack V.L., Persinger M.A., Dotta B.T. (2019) Seed germination and their photon emission profile following exposure to a rotating magnetic field. Open Journal of Biophysics 9, 254–266.
47. Huang P.C., Tang J.Y., Feng C.H., Cheng P.Y., Jang L.S. (2018) Influences of extremely low frequency electromagnetic fields on germination and early growth of mung beans. IEEE International Conference on Consumer Electronics–Taiwan, 1–2.
48. Ibrahim A., Reuter G.S., Spivak M. (2007) Field trial of honey bee colonies bred for mechanisms of resistance against varroa destructor. Apidologie 38(1), 67–76.
49. Ignatov I., Drossinakis C. (2020) Effects of electromagnetic fields on colloidal nano silver for applications in nano medicine. Advances in Research 21(11), 20–27.
50. Iqbal M., Muhammad D., Zia–ul–Haq, Jamil Y., (2012) Effect of pre–sowing magnetic field treatment to garden pea (*Pisum sativum L.*) seed on germination and seedling growth. Pakistan Journal of Botany 44(6), 1851–1856.
51. Israili Z.H. (2014) Antimicrobial properties of honey. American Journal of Therapeutics 21(4), 304–323.
52. Izmailov A.Y., Smirnov I.G., Khort D.O., Filippov R.A., Kutyrev A.I. (2018) Magnetic–pulse processing of seeds of berry crops. Research in Agricultural Engineering 64(4), 181–186.
53. Jadidi M., Safari M., Baghian A. (2013). Effects of extremely low frequency electromagnetic fields on cell proliferation. Koomesh 15(1), 1–10.
54. Jang W.J., Lee J.M., Hasan M.T., Kong I.S. (2019) Fusion of the N–terminal domain of *Pseudomonas Sp.* phytase with *Bacillus Sp.* phytase and its effects on optimal temperature and catalytic efficiency. Enzyme and Microbial Technology 126, 69–76.
55. Jedlička J., Paulen O., Ailer S. (2015) Research of effect of low frequency magnetic field on germination, growth and fruiting of field tomatoes. Acta Horticulturae et Regiotectuare 1, 1–4.
56. Jin Y., Liang R., Liu J., Lin S., Yu Y., Cheng S. (2017) Effect of structure changes on hydrolysis degree, moisture state, and thermal denaturation of egg white protein treated by electron beam irradiation. LWT – Food Science and Technology 77, 134–141.
57. Jin Y., Guo W., Hu X., Liu M., Xu X., Hu F., Lan Y., Yanwen F.,Mengyu L., Shi T., Ma S., Fang Z., Huang J. (2019) Static magnetic field regulates arabidopsis root growth via auxin signaling. Scientific Reports 9(1), 1–14.
58. Jinapang P., Prakob P., Wongwattananard P., Islam N.E., Kirawanich P. (2010) Growth

characteristics of mung beans and water convolvuluses exposed to 425–MHz electromagnetic fields. Bioelectromagnetics 31(7), 519–527.

59. Junka A.F., Rakoczy R., Szymczyk P., Bartoszewicz M., Sedghizadeh P.P., Fijałkowski K. (2018) Application of rotating magnetic fields increase the activity of antimicrobials against wound biofilm pathogens. Scientific Reports 8(1), 1–12.
60. Juś K. (2018) Mikrobiologiczne metody ograniczania występowania grzybów i mykotoksyn fuzaryjnych w łańcuchu żywnościowym. Rozprawa Doktorska. Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu. Data nadania stopnia: 20-09-2018.
61. Karbalay–Doust S., Darabyan M., Sisakht M., Haddadi G., Sotoudeh N., Haghani M., Javad S.M. (2021) Extremely low frequency–electromagnetic fields (ELF–EMF) can decrease spermatocyte count and motility and change testicular tissue. Journal of Biomedical Physics and Engineering, 1–12.
62. Kasprzak K., Kręcisz M., Kupryaniuk K., Matysiak A. (2016) Związki polifenolowe jako składniki bioaktywne żywności funkcjonalnej – ich budowa, właściwości oraz analiza. W: Szala M., Kropiwiec K. Przegląd Wybranych Zagadnień z Zakresu Przemysłu Spożywczego, 101–113.
63. Kędzia B., Hołderna–Kędzia E. (2008) Miód – skład i właściwości biologiczne. Wydawnictwo Rzeczpospolita SA, Warszawa.
64. Kennedy S., Roco C., Déléris A., Spoerri P., Cezar C., Weaver J., Vandenburgh H., Mooney D. (2018) Improved magnetic regulation of delivery profiles from ferrogels. Biomaterials 161, 179–189.
65. Khan K.A., Al–Ghamdi A.A., Ansari M.J. (2016) The characterization of blossom honeys from two provinces of Pakistan. Italian Journal of Food Science 28(4), 625–638.
66. Kirs E., Pall R., Martverk K., Laos K. (2011) Physicochemical and melissopalynological characterization of Estonian summer honeys. Procedia Food Science 1, 616–624.
67. Kobayashi M., Soda N., Miyo T., Ueda Y. (2004) Effects of combined DC and AC magnetic fields on germination of hornwort seeds. Bioelectromagnetics 25(7), 552–557.
68. Kołakowski E., Wianecki M., Milewska I. (2008) Temperatura cieplnej koagulacji białek mięśniowych ryb i zwierząt rzeźnych wybranych gatunków. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość 6(61), 95–104.
69. Konieczka P., Namieśnik J. (2013) Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych: praca zbiorowa. Wydawnictwa Naukowo–Techniczne. Wydawnictwa Naukowo–Techniczne. Warszawa.

70. Kononiuk A., Karwowska M. (2016) Substancje biologicznie aktywne w mięsie i produktach mięsnych surowo dojrzewających. W: Szala M., Kropiwiec K. Przegląd Wybranych Zagadnień z Zakresu Przemysłu Spożywczego, 85–100.
71. Konopacki M., Rakoczy R. (2019) The analysis of rotating magnetic field as a trigger of Gram–positive and Gram–negative bacteria growth. Biochemical Engineering Journal 141(22), 259–267.
72. Kopeć B. (1984) Wpływ pól elektrycznych i magnetycznych na właściwości biologiczne nasion. Praca doktorska. Akademia Rolnicza w Lublinie.
73. Kopeć B. (1985) Zastosowanie pola magnetycznego do przedsiewnej obróbki nasion. Postępy Nauk Rolniczych 1, 93–100.
74. Kristinawati A., Sudarti S. (2017) The influence of extremely low frequency (ELF) magntic field exposure on the process of making cream cheese. Proceeding the 1st International Basic Science Conference, 181–183.
75. Kumar D., Desai K. (2011). Pollution abatement in milk dairy industry. Journal of Current Pharma Research 1(2), 145–52.
76. Kundu A., Gupta B., Mallick A.I. (2017) Specific absorption rate evaluation in a typical multilayer fruit: coconut with twig due to electromagnetic radiation as per Indian standards. Microwave Review 23(2), 24–32.
77. Kutyrev A. I., Khort D.O., Filippov R.A., Tsench Y.S. (2017) Magnetic–pulse treatment of garden strawberry seeds. Agricultural Machinery and Technologies 5, 9–15.
78. Laska A. (2017) Biomateriały stosowane w inżynierii tkankowej do regeneracji tkanek. Zeszyty Naukowe Towarzystwa Doktorantów UJ 14(1), 187–196.
79. Leeb E., Haller N., Kulozik U. (2018) Effect of pH on the reaction mechanism of thermal denaturation and aggregation of bovine β–lactoglobulin. International Dairy Journal 78, 103–111.
80. Leja M., Mareczek A., Wyżgolik G., Klepacz–Baniak J., Czekońska K. (2007) Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. Food Chemistry 100, 237–240.
81. Lenz E. (1834) Ueber die Bestimmung der Richtung der durch elektrodynamische Vertheilung erregten galvanischen Ströme. Annalen Der Physik 107(31), 483–494.
82. León–Ruiz V., González–Porto A.V., Al–Habsi N., Vera S., Paz San Andrés M., Jauregi P. (2013) Antioxidant, antibacterial and ACE–inhibitory activity of four monofloral honeys in relation to their chemical composition. Food and Function 4(11),

1617–1624.

83. Li Z., Yao F., Cheng L., Cheng W., Qi L., Yu S., Zhang L., Zha X., Jing J. (2019) Low frequency pulsed electromagnetic field promotes the recovery of neurological function after spinal cord injury in rats. Journal of Orthopaedic Research 37(2), 449–456.
84. Lim H., Nam M., Kim Y., Seo Y. (2021) Increasing odontoblast–like differentiation from dental pulp stem cells through increase of β–catenin/p–GSK–3β expression. Biomedicines 9, 1–15.
85. Limam Z., Selmi S., Sadok S., El Abed, A. (2011). Extraction and characterization of chitin and chitosan from crustacean by–products: Biological and physicochemical properties. African journal of biotechnology, 10(4), 640–647.
86. Lin J., Liu X., Li H., Yu L., Shen M., Lou Y., Xie S., Chen J., Zhang R., Yuan T.F. (2019) Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on sleeping quality and mood status in drug dependent male inpatients during abstinence. Sleep Medicine 58, 7–12.
87. Lis M. (2019) Effect of 50 Hz magnetic field on chicken embryo development and course of hatching. Science, Technology and Innovation 5(2), 44–49.
88. Liu C.Y., Chen C.H., Jang L.S., Wang M.H. (2020) 3D cell capture and sensing array electrode (3D ECCSA) under extremely low frequency electromagnetic fields (ELF–EMF). Sensors and Actuators B: Chemical 321, 1–6.
89. Liu J.R., Ye Y.L., Lin T.Y., Wang Y.W., Peng C.C. (2013) Effect of floral sources on the antioxidant, antimicrobial, and anti–inflammatory activities of honeys in Taiwan. Food Chemistry 139(1–4), 938–943.
90. Llave Y., Shibata–Ishiwatari N., Watanabe M., Fukuoka M., Hamada–Sato N., Sakai N. (2018) Analysis of the effects of thermal protein denaturation on the quality attributes of sous–vide cooked tuna. Journal of Food Processing and Preservation 42(1), 1–7.
91. Lu H., Wang X., Hu S., Han T., He S., Zhang G., He M., Lin X. (2020) Bioeffect of static magnetic field on photosynthetic bacteria: evaluation of bioresources production and wastewater treatment efficiency. Water Environment Research 98(2), 1131–1141.
92. Lund B.M., Peck M.W. (2013) *Clostridium Botulinum*. W: Labbe R.G., Garcia S. (Ed.) Guide to Foodborne Pathogens, John Wiley & Sons, New Jersey, USA, 91–111.
93. Luo J., He W., Xing X., Wu J., Gu X.W.S. (2019) The phytoremediation efficiency of eucalyptus globulus treated by static magnetic fields before sowing. Chemosphere 226, 891–897.

94. Maciejewska A., Krygielska B. (2011) Rola i znaczenie przestrzeni biologicznie czynnych (przykład Miasta Stołecznego Warszawy). Studia KPZK 142, 89–99.
95. Maffei M.E. (2014) Magnetic field effects on plant growth, development, and evolution. Frontiers in Plant Science 5, 1–15.
96. Maikanov B., Mustafina R., Auteleyeva L., Wiśniewski J., Anusz K., Grenda T., Kwiatek K., Goldsztejn M., Grabczak M. (2019) *Clostridium botulinum* and *Clostridium perfringens* occurrence in Kazakh honey samples. Toxins 11(8), 1–14.
97. Mandal M.D., Mandal S. (2011) Honey: Its medicinal property and antibacterial activity. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 1(2), 154–160.
98. Marks N., Szecówka P. (2010) Wpływ stymulacji sadzeniaków zmiennym polem magnetycznym na kształt bulw ziemniaka. Inżynieria Rolnicza 14(123), 181–188.
99. Marks N., Szecówka P. (2011) Wpływ stymulacji sadzeniaków zmiennym polem magnetycznym na plonowanie ziemniaków. Acta Agrophysica 17(1), 135–150.
100. Martens H., Stabursvik E., Martens M. (1982) Texture and colour changes in meat during cooking related to thermal denaturation of muscle protein. Journal of Texture Studies 13, 291–309.
101. Martinez E., Carbonell M.V., Amaya J.M. (2000) A static magnetic field of 125 mT stimulates the initial growth stages of barley (*Hordeum vulgare L.*). Electromagnetic Biology and Medicine 19(3), 271–277.
102. Martínez E., Carbonell M.V., Flórez M., Amaya J.M., Maqueda R. (2009) Germination of tomato seeds (*Lycopersicon esculentum L.*) under magnetic field. International Agrophysics 23, 45–49.
103. Mattila H.R., Rios D., Walker–Sperling V.E., Roeselers G., Newton I.L.G. (2012) Characterization of the active microbiotas associated with honey bees reveals healthier and broader communities when colonies are genetically diverse. PLoS One 7(7), 1–10.
104. Matwijczuk A., Kornarzyński K., Pietruszewski S. (2012) Effect of magnetic field on seed germination and seedling growth of sunflower. International Agrophysics 26(3), 271–278.
105. Menegatti R.D., De Oliveira L.O., Lira da Costa A.V., Braga E.J.B., Bianchi V.J. (2019) Magnetic field and gibberlic acid as pre–germination treatments of passion fruit seeds. Revista Ciência Agrícola 17(1), 15–22.
106. Mieszkowska K. (2005) Ogólnomiejski system terenów aktywnych biologicznie (Ostab) w Gdańsku, jako jeden ze sposobów wdrażania rewitalizacji przyrodniczej miasta.

Teka Komisji Architektury, Urbanistyki i Studiów Krajobrazowych PAN 1, 111–118.

107. Mildažienė V., Aleknavičiūtė V., Žūkienė R., Paužaitė G., Naučienė Z., Filatova I.,Yushkevich V., Haimi P., Tamošiūnė I., Baniulis D. (2019) Treatment of common sunflower (*Helianthus annus L.*) seeds with radio–frequency electromagnetic field and cold plasma induces changes in seed phytohormone balance, seedling development and leaf protein expression. Scientific Reports 9, 1–12.
108. Mohammadi F., Ghanati F., Sharifi M., Chashmi N.A. (2018) On the mechanism of the cell cycle control of suspension–cultured tobacco cells after exposure to static magnetic field. Plant Science 277, 139–144.
109. Moniruzzaman M., Sulaiman S.A, Khalil M.I., Gan S.H. (2013) Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of sourwood and other Malaysian honeys: a comparison with manuka honey. Chemistry Central Journal 7, 1–12.
110. Muleta T. (2016) The microbiology of ethiopian milk and milk products: review. International Journal of Current Research 8(7), 34606–34611.
111. Na S.S., Nam S.M., Yong M.S., Hwang–Bo G. (2019) Pulsed electromagnetic fields to influence pain relief following knee osteoarthritis in rats. Journal Of Magnetics 24, 310–113.
112. Neut C., Pathak J., Romond C., Beerens H. (1985) Rapid detection of *Clostridium perfringens*: comparison of lactose sulfite broth with tryptose–sulfite–cycloserine agar. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 66(5), 99–102.
113. Nevas M., Lindström M., Hörman A., Keto–Timonen R., Korkeala H. (2006) Contamination routes of *Clostridium botulinum* in the honey production environment. Environmental Microbiology 8(6), 1085–1094.
114. Novitskii Y.I., Novitskaya G.V., Serdyukov Y.A. (2014) Lipid utilization in radish seedlings as affected by weak horizontal extremely low frequency magnetic field. Bioelectromagnetics 35(2), 91–99.
115. Novitsky Y.I., Novitskaya G.V., Kocheshkova T.K., Nechiporenko G.A., Dobrovol'skii M.V. (2001) Growth of green onions in a weak permanent magnetic field. Russian Journal of Plant Physiology 48, 709–716.
116. Nur I.T., Jahan T., Akter S. (2020) Isolation of pathogenic microorganisms from burn patient and in vitro determination of antibacterial activity of honey against antibiotic resistance isolates. International Journal of Scientific Reports 6(8), 310–315.

117. Olaitan, P.B., Adeleke O.E., Ola I.O. (2007) Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. African Health Sciences 7(3), 159–165.
118. Olszewski S. (2016) Conservation of energy in classical mechanics and its lack from the point of view of quantum theory. Journal of Modern Physics 7, 2316–2328.
119. Ørsted, H.C. (1820) Experimenta circa effectum conflictus electrici in acum magneticam.Typis Schultzianis. Kopenhaga. Denmark.
120. Ostafin M., Bulski K., Dróżdż T., Nawara P., Nęcka K., Lis S., Kiełbasa P., Tomasik M., Oziembłowski M. (2016) Wpływ zmiennego pola elektromagnetycznego na wzrost drożdży *Yarrowia lipolytica*. Przeglad Elektrotechniczny 92(12), 117–120.
121. Ovissipour M., Rasco B., Tang J., Sablani S. (2017) Kinetics of protein degradation and physical changes in thermally processed atlantic salmon (*Salmo salar*). Food and Bioprocess Technology 10, 1865–1882.
122. Parenteral Drug Association (2013) Technical Report 33, Revised 2013 (TR 33) Evaluation, Validation and implementation of alternative and rapid microbiological met.
123. Phirke P. S., Patil M.N., Umbarkar S.P., Dudhe Y.H. (1996) The application of magnetic treatment to seeds: methods and responses. Seed Science and Technology 24(2), 365–373.
124. Pietruszewski S. (1998) Stanowisko do przedsiewnej biostymulacji nasion zmiennym polem magnetycznym. Inżynieria Rolnicza 2, 31–36.
125. Pietruszewski S. (1999) Magnetyczna biostymulacja materialu siewnego pszenicy jarej. Rozprawy Naukowe. Akademia Rolnicza w Lublinie 220, 1–55.
126. Pietruszewski S., Martínez E. (2015) Magnetic field as a method of improving the quality of sowing material: a review. International Agrophysics 29(3), 377–389.
127. Pietruszewski S., Muszyński S., Dziwulska A. (2007) Electromagnetic fields and electromagnetic radiation as non–invasive external stimulants for seeds (selected methods and responses). International Agrophysics 21(1), 95–100.
128. Pinheiro C.G.M.E., Abrantes M.R., Silva R.O.S., Junior C.A.O., Lobato F.C.F., Silva J.B.A. (2018) Microbiological quality of honey from stingless bee, jandaíra (*Melipona subnitida*), from the semiarid region of Brazil. Ciencia Rural 48(9), 1–6.
129. Piotrowska–Kirschling A., Drzeżdżon J., Chmurzyński L., Jackiewicz D. (2018) Critical micellar concentration and methods of its determination. Wiadomości Chemiczne 72 (11–12), 815–828.
130. Pittman U. J. (1967) Biomagnetic responses in Kharkov 22 M.C. winter wheat.

Canadian Journal of Plant Science 47, 389–393.

131. Pittman U.J., Ormrod D.P. (1970) Physiological and chemical features of magnetically treated winter wheat seed and resultant seedling. Canadian Journal of Plant Science 50, 211–217.
132. Ples M. (2014) Diamagnetyzm bizmutu. Młody Technik 8, 74–75.
133. Polski Komitet Normalizacyjny (2019) PN–ISO 21527–2 Mikrobiologia żywności i pasz horyzontalna metoda oznaczania liczby drożdży i pleśni część 2: metoda liczenia kolonii w produktach o aktywności wody niższej lub równej 0,95.
134. Polski Komitet Normalizacyjny (2018) PN–EN ISO/IEC 17025:2018–02 Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących.
135. Polski Komitet Normalizacyjny (2017) PN–EN ISO 6887–1:2017–05 Mikrobiologia łańcucha żywnościowego – przygotowanie próbek do badań, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych do badań mikrobiologicznych – część 1: ogólne zasady przygotowania zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych.
136. Polski Komitet Normalizacyjny (2013) PN–EN ISO 4833–2:2013–12 Mikrobiologia łańcucha żywnościowego – horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów – część 2: oznaczanie liczby metodą posiewu powierzchniowego w temperaturze 30 stopni C.
137. Polski Komitet Normalizacyjny (1988) PN–A–77626:1988 Miód pszczeli
138. Popardowski E., Kiełbasa P., Dróżdż T., Rad M. Structure analysis of the thermal energy spectrum generated during stimulation of organic matter by an electromagnetic field. Journal of Physics: Conference Series 1782, 1–6.
139. Potylitsyn V. S., Maykov O.A., Kudinov D.S. (2020) On the development of a digital receiver for registration electromagnetic fields and microseisms in the frequency range 0,1–100 Hz. W: Moscow Workshop on Electronic and Networking Technologies Proceedings, 1–4.
140. Răcuciu M., Oloşutean H., Perju M. (2017) Experimental results of laboratory simulation of extremely low frequency magnetic field pretreatment of barley seeds influence. Romanian Journal of Physics 62, 1–13.
141. Răcuciu M. (2012) Influence of extremely low frequency magnetic field on assimilatory pigments and nucleic acids in zea mays and curcubita pepo seedlings. Romanian Biotechnological Letters 17(5), 7662–7672.
142. Rakoczy R., Konopacki M., Fijałkowski K. (2016) The influence of a ferrofluid in the

presence of an external rotating magnetic field on the growth rate and cell metabolic activity of a wine yeast strain. Biochemical Engineering Journal 109, 43–50.

143. Rani G. N., Budumuru R., Bandaru N.R. (2017) Antimicrobial activity of honey with special reference to methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA). Journal of Clinical and Diagnostic Research 11(8), 5–8.
144. Rehman A., Farooq M., Asif M., Ozturk L. (2019) Supra–optimal growth temperature exacerbates adverse effects of low Zn supply in wheat. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 182(4), 656–666.
145. Reinke J. (1876) Untersuchungen der Wachstrum. Botan. 129. W: Barnothy M.F. (Ed.) Biological effect on magnetic fields. Plenum Press, 183–195.
146. Rios–Mera J.D., Pinto J.S.S., Contreras–Castillo C.J. (2017) Effect of ultimate pH and ageing on thermal denaturation of bovine muscle proteins. Meat Science 131, 25–27.
147. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 30 lipca 2015 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie metod analiz związanych z dokonywaniem oceny miodu (Dz. U. z 2015 r. poz. 678)
148. Roth B. J., Cohen L.G., Hallett M. (1991) The electric field induced during magnetic stimulation. Electroencephalography and Clinical Neurophysiology Supplement 43, 268–278.
149. Ruan G., Liu X., Zhang Y., Wan B., Zhang J., Lai J., He M., Chen C. (2019) Power–frequency magnetic fields at 50 Hz do not affect fertility and development in rats and mice. Electromagnetic Biology and Medicine 38(1), 111–122.
150. Sak–Bosnar M., Sakač N. (2012) Direct potentiometric determination of diastase activity in honey. Food Chemistry 135(2), 827–831.
151. Samarghandian S., Farkhondeh T., Samini F. (2017) Honey and health: a review of recent clinical research. Harmacognosy Research 9(2), 121–127.
152. Sanghera P. (2007). RFID+ Study Guide and Practice Exams. Syngress Publishing. Rockland. USA.
153. Shao W., Ebaid R., Abomohra A.E.F., Shahen M. (2018) Enhancement of *Spirulina* biomass production and cadmium biosorption using combined static magnetic field. Bioresource Technology 265, 163–169.
154. Shashurin M. M., Prokopiev I.A., Shein A.A., Filippova G.V., Zhuravskaya A.N. (2014) Physiological responses of plantago media to electromagnetic field of power–line

frequency (50 Hz). Russian Journal of Plant Physiology 61, 484–488.

155. Shepherd S., Hollands G., Godley V.C., Sharkh S.M., Jackson C.W., Newland P.L. (2019) Increased aggression and reduced aversive learning in honey bees exposed to extremely low frequency electromagnetic fields. PLoS One 14(10), 1–13.
156. Sinha S., Srivastava A., Mehrotra T., Singh R. (2018) A review on the dairy industry waste water characteristics, its impact on environment and treatment possibilities. W: Sinha S., Srivastava A., Mehrotra T., Singh R. Emerging issues in ecology and environmental science. Springer International Publishing. New York City. USA. 73–84.
157. Skipnes D., Plancken I., Loey A.V., Hendrickx M.E. (2008) Kinetics of heat denaturation of proteins from farmed atlantic cod (*Gadus morhua*). Journal of Food Engineering 85, 51–58.
158. Statsyuk N. V., Thakur K., Smetanina T.I., Kuznetsova M.A. (2016) Effect of a pre–planting treatment of seed tubers with low–frequency pulse electric field on the growth of potato plants of different varieties. Agricultural Biology 51(3), 360–366.
159. Stefaniuk E., Bosacka K., Hryniewicz W. (2015) Walidacja i weryfikacja metod i testów diagnostycznych w laboratorium mikrobiologicznym. Postepy Mikrobiologii 54(4), 515–424.
160. Stuchlik L. (Ed.) (2001) Atlas of Pollen and Spores of the Polish Neogene, Vol. 1 – Spores. Kraków: W. Szafer Institute of Botany, Polish Acadamy of Sciences.
161. Tan H., Guo S., Yang S., Xu X., Tang T. (2012) Physical characterization and osteogenic activity of the quaternized chitosan–loaded PMMA bone cement. Acta Biomaterialia 8(6), 2166–2174.
162. Tan L., Shao Y., Mu G., Ning S., Shi S. (2020) Enhanced azo dye biodegradation performance and halotolerance of Candida tropicalis SYF–1 by static magnetic field (SMF). Bioresource Technology 295, 1–7.
163. Tavighi, S. H., Saadatfar Z., Shojaei B., Rassouli M.B. (2018) Midbrain morphogenesis in beluga sturgeon (*Huso huso*) larvae. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine 21(1), 17–27.
164. Tessaro L.W.E., Murugan N.J., Persinger M.A. (2015) Bacterial growth rates are influenced by cellular characteristics of individual species when immersed in electromagnetic fields. Microbiological Research 172, 26–33.
165. Tolomei G. (1893) Anzione del magnetismo sulla germinazione. W: Barnothy M.F. (Ed.) Biological Effect on Magnetic Fields. Plenum Press, 183–195.

166. Tu R., Jin W., Xi T., Yang Q., Han S.F., Abomohra A.E.F. (2015) Effect of static magnetic field on the oxygen production of scenedesmus obliquus cultivated in municipal wastewater. Water Research 86, 132–138.
167. Vian A., Davies E., Gendraud M., Bonnet P. (2016) Plant responses to high frequency electromagnetic fields. BioMed Research International 1830262, 1–13.
168. Von der Ohe W., Oddo L.P., Piana M.L., Morlot M., Martin P. (2004) Harmonized methods of melissopalynology. Apidologie 35, 18–25.
169. Výborný J., Anton T. (2012) Lab Guide of Department of Materials Engineering and Chemistry. Rozdział 16. W: Jaroslav T., Výborný J., Anton T. Determination of Thermal Conductivity, 87–90.
170. Wang W., Xue C., Mao, X. (2020). Chitosan: Structural modification, biological activity and application. International Journal of Biological Macromolecules 164, 4532–4546.
171. Wasihun A.G., Kasa B.G. (2016) Evaluation of antibacterial activity of honey against multidrug resistant bacteria in Ayder Referral and Teaching Hospital, Northern Ethiopia. SpringerPlus 5(1), 1–8.
172. Wesołowska M. Dżugan M. (2017) Aktywność i stabilność termiczna diastazy występującej w podkarpackich miodach odmianowych. Żywnosc. Nauka. Technologia. Jakość 24(4), 103–112.
173. Wijesinghe M., Weatherall M., Perrin K., Beasley R. (2009) Honey in the treatment of burns: a systematic review and meta–analysis of its efficacy. New Zealand Medical Journal 122(1295), 47–60.
174. Wojtacka J., Wysok B., Kabašinskienė A., Wiszniewska–Łaszczych A., Gomółka–Pawlicka M., Szteyn J., Malakauskas M., Migowska–Calik A. (2017) Prevalence of *Clostridium botulinum* type A, B, E and F isolated from directly sold honey in Lithuania. Journal of Agricultural Science and Technology 19(2), 335–343.
175. Wojtacka J., Wysok B., Lipiński Z., Gomółka–Pawlicka M., Rybak–Chmielewska H., Wiszniewska–Łaszczych A. (2016) *Clostridium botulinum* spores found in honey from small apiaries in Poland. Journal of Apicultural Science 60(2), 89–100.
176. Wolski P. (2013) Znaczenie okien hydrologicznych. Problemy Ekologii Krajobrazu 36, 129–144.
177. Wróblewski A.K. (2006) Historia Fizyki. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa.
178. Wu L., Wu S., Qiu J., Xu C., Li S., Xu H. (2017) Green synthesis of isomaltulose from cane molasses by *Bacillus subtilis* WB800–PHA01–PalI in a biologic membrane reactor.

Food Chemistry 229, 761–768.

179. Yang H.J., Hwang S.J. (2019) Comparison of low-intensity pulsed ultrasound and PEMF for bone formation in DO. Clinical Oral Implants Research 30, 171–171.
180. Yano A., Hidaka E., Fujiwara K., Iimoto M. (2001) Induction of primary root curvature in radish seedlings in a static magnetic field. Bioelectromagnetics 22(3), 194–199.
181. Zepeda–Bautista R., Aguilar C.H., Domínguez–Pacheco A., Cruz–Orea A., Godina–Nava J.J., Martínez–Ortíz E. (2010) Electromagnetic field and seed vigour of corn hybrids. International Agrophysics 21(1), 63–73.
182. Zhou J., Gao Y.H., Zhu B.Y., He W.F., Wang G., Xian C.J., Chen K.M. (2021) The frequency window effect of sinusoidal electromagnetic fields in promoting osteogenic differentiation and bone formation involves extension of osteoblastic primary cilia and activation of protein kinase A. Cell Biology International 45(8), 1685–1697.
183. Zieliński R. (2017) Surfaktanty – budowa, właściwośc,i zastosowanie. Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu. Poznań.

8. Spis rysunków

Rys. 1. Stanowisko do stymulacji materiału biologicznego stałym polem magnetycznym 9
Rys. 2. Stanowisko do stymulacji materiału biologicznego zmiennym polem magnetycznym 11
Rys. 3. Stanowiska do stymulacji materiału biologicznego zmiennym polem elektromagnetycznym.....12
Rys. 4. Schemat koncepcyjny wykonanych pomiarów 27
Rys. 5 Stanowisko do pomiaru emisji fotonowej 29
Rys. 6 Przykład wyhodowanych kolonii bakterii a) zliczane bezpośrednio na szalce Petriego.....33
Rys. 7 Przykłady pyłków roślin miododajnych: a) koniczyna biała; b) rzepak ozimy; c) śliwa domowa; 36
Rys. 8. Cewka stanowiąca element roboczy stanowiska do stymulacji materiału biologicznego zmiennym polem elektromagnetycznym 40
Rys. 9. Przekrój zastosowanej cewki a) schemat b) model opracowany w środowisku FEMM 41
Rys. 10. Schemat uzwojeń cewki.....44
Rys. 11. Charakterystyka rozkładu indukcji magnetycznej dla przekroju poprzecznego cewki zasilanej przemiennym prądem elektrycznym o częstotliwości 100 Hz.....44
Rys. 12. Model rozkładu indukcji magnetycznej wzdłuż osi podłużnej dla cewki zasilanej prądem elektrycznym o częstotliwości a) 10 Hz, b) 50 Hz, c) 100 Hz.....46
Rys. 13. Wyniki pomiarów niepewności rozszerzonej nastawy generowanych parametrów skonstruowanego systemu podczas zasilania prądem o częstotliwości a) 50 Hz, b) 90 Hz,.....47
Rys. 14. Rzeczywisty wygląd wybranych elementów systemu po obudowaniu szkłem akrylowym a) cewki; b) układu oporników.....49
Rys. 15. Płaszczyzny stanowiska poddane badaniu przy użyciu kamery termowizyjnej 50
Rys. 16. Moc czynna generowana przez cewkę w zależności od częstotliwości i natężenia prądu elektrycznego.....51
Rys. 17. Porównanie maksymalnych mocy - cieplnej generowanej przez solenoid oraz chłodniczej wytworzonej przez cieczowy układ chłodzenia 52

Rys. 18. Powietrzny system chłodzenia a) modyfikacja bocznej ściany; b) przegroda wewnątrz obudowy 53
Rys. 19. Porównanie maksymalnych mocy - cieplnej generowanej przez solenoid oraz chłodniczej wytworzonej przez cieczowy i gazowy układ chłodzenia 54
Rys. 20. Widmo energii cieplnej generowanej przez stanowisko w trakcie badań przy częstotliwości pola elektromagnetycznego równej 10 Hz.....55
Rys. 21. Widmo energii cieplnej generowanej przez stanowisko w trakcie badań przy częstotliwości pola elektromagnetycznego równej 100 Hz.....57
Rys. 22. Ramie robota Braccio TinerKit a) w trakcie spoczynku b) w trakcie pobierania próbki ze statywu 58
Rys. 23. Fragment kodu źródłowego opisujący ruch ramienia robota podczas pojedynczego cyklu stymulacji.....61
Rys. 24 Rysunek poglądowy systemu technicznego do różnicowania aktywności biologicznej substancji organicznej polem elektromagnetycznym, składający się z: a) agregatu chłodniczego, b) wzmacniacza, c) oscylatora, d) cewki powietrznej, e) ramienia robota 62
Rys. 25 System techniczny do różnicowania aktywności biologicznej substancji organicznej polem elektromagnetycznym, składający się z: a) agregatu chłodniczego, b) wzmacniacza, c) oscylatora, d) cewki powietrznej, e) ramienia robota.....62
Rys. 26. Zmiana w czasie emisji fotonowej próbek miodu nr 9, 11 i 28 63
Rys. 27. Emisja fotonowa przy zmiennej częstotliwości i stałej indukcji magnetycznej pola oraz czasie stymulacji 65
Rys. 28. Wykres regresji liniowej predykcji emisji na podstawie częstotliwości dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.2 67
Rys. 29. Ogólna liczba bakterii przy zmiennej częstotliwości i stałej indukcji magnetycznej pola oraz czasie stymulacji.....69
Rys. 30. Wykres regresji liniowej predykcji ogólnej liczby bakterii na podstawie częstotliwości dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.2.....70
Rys. 31. Wartość emisji fotonowej w funkcji czasu stymulacji i indukcji magnetycznej pola 72
Rys. 32. Wartość ogólnej liczby bakterii w funkcji czasu stymulacji i indukcji magnetycznej pola.....73

Rys. 33. Wartość emisji fotonowej w funkcji dawki ekspozycyjnej i częstotliwości pola 74
Rys. 34. Wartość ogólnej liczby bakterii w funkcji dawki ekspozycyjnej i częstotliwości pola 75
Rys. 35. Wykres dwuczynnikowej regresji liniowej predykcji emisji dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3.....77
Rys. 36. Wykres dwuczynnikowej regresji liniowej predykcji ogólnej liczby bakterii dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3 78
Rys. 37. Rozkład indukcji magnetycznej dla cewki składającej się z dwóch uzwojeń (odpowiednio 1180 zwojów i 267 zwojów) połączonych równolegle a) przekrój podłużny, b) przekrój poprzeczny.....107
Rys. 38. Rozkład indukcji magnetycznej dla cewki składającej się z dwóch uzwojeń (odpowiednio 1037 zwojów i 410 zwojów) połączonych równolegle a) przekrój podłużny, b) przekrój poprzeczny.....108
Rys. 39. Rozkład indukcji magnetycznej dla cewki składającej się z trzech uzwojeń (odpowiednio 770 zwojów, 410 zwojów i 267 zwojów) połączonych szeregowo a) przekrój podłużny, b) przekrój poprzeczny 109
Rys. 40. Wykres jednoczynnikowej regresji liniowej predykcji emisji na podstawie indukcji dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3.....117
Rys. 41. Wykres jednoczynnikowej regresji liniowej predykcji emisji na podstawie czasu stymulacji dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3 117
Rys. 42. Wykres jednoczynnikowej regresji liniowej predykcji emisji na podstawie dawki dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3 118
Rys. 43. J Wykres jednoczynnikowej regresji liniowej predykcji emisji na podstawie częstotliwości pola dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3 118
Rys. 44. Wykres trójczynnikowej regresji liniowej predykcji emisji dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3.....119
Rys. 45. Wykres jednoczynnikowej regresji liniowej predykcji ogólnej liczby bakterii na podstawie indukcji dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3.....120
Rys. 46. Wykres jednoczynnikowej regresji liniowej predykcji ogólnej liczby bakterii na podstawie czasu stymulacji dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3 121
Rys. 47. Wykres jednoczynnikowej regresji liniowej predykcji ogólnej liczby bakterii na podstawie dawki stymulacji dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3 121

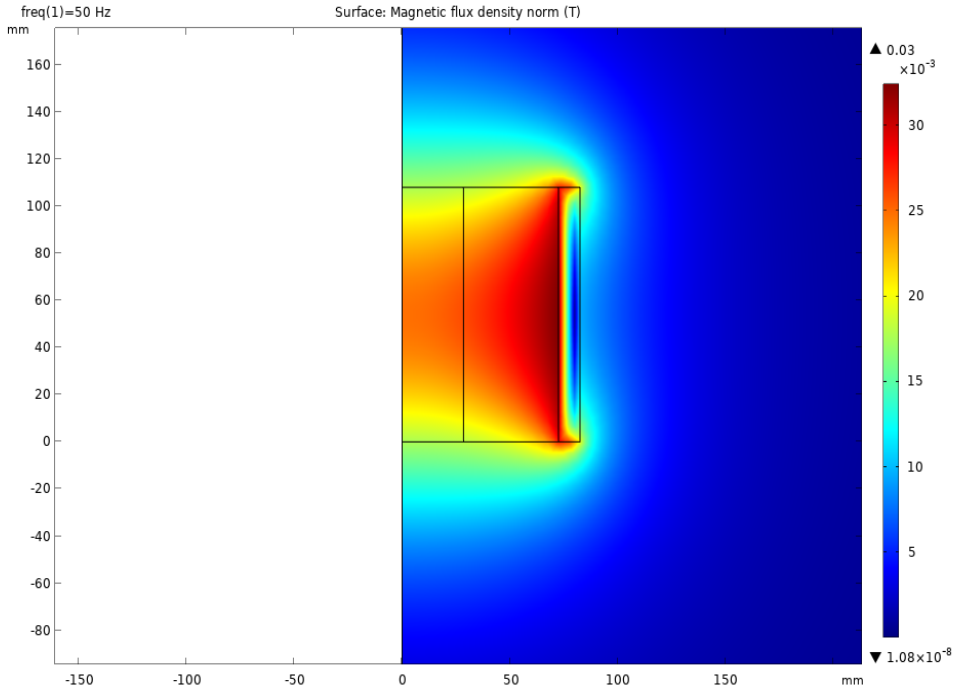
Rys. 48. Wykres jednoczynnikowej regresji liniowej predykcji ogólnej liczby bakterii na podstawie częstotliwości pola dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3 .122
Rys. 49. Wykres trójczynnikowej regresji liniowej predykcji ogólnej liczby bakterii dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3 123

9. Spis tabel

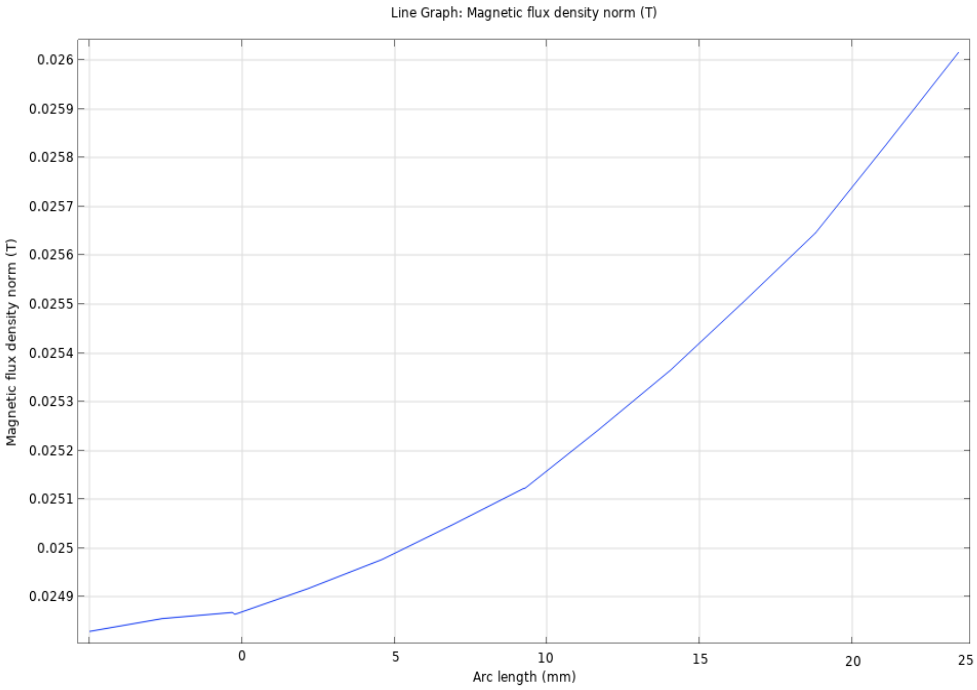
Tab. 1. Charakterystyka materiału badawczego 23
Tab. 2. Zależność emisji fotonowej od częstotliwości pola przy stałej indukcji magnetycznej oraz czasie stymulacji 66
Tab. 3. Współczynniki modelu regresji liniowej predykcji emisji na podstawie częstotliwości dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.2 67
Tab. 4. Zależność ogólnej liczby bakterii od częstotliwości pola przy stałej indukcji magnetycznej oraz czasie stymulacji 68
Tab. 5. Współczynniki modelu regresji liniowej predykcji ogólnej liczby bakterii na podstawie częstotliwości dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.2 69
Tab. 6. Wartości średnie wyników badań stymulacji materiału polem o zmiennej indukcji magnetycznej i zmiennym czasie trwania oddziaływania oraz skokowymi zmianami częstotliwości 71
Tab. 7. Współczynniki dwuczynnikowego modelu regresji liniowej predykcji emisji dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3 76
Tab. 8. Dwuczynnikowy model regresji liniowej predykcji ogólnej liczby bakterii dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3 78
Tab. 9. Średnie wartości emisji fotonowej i zawartości mikroorganizmów przy zmianie częstotliwości w trakcie stymulacji (ze 100 Hz na 50 Hz) 79
Tab. 10. Średnie wartości emisji fotonowej i zawartości mikroorganizmów przy zmianie częstotliwości w trakcie stymulacji (z 10 Hz na 50 Hz) 80
Tab. 11. Emisja fotonowa wybranych gatunków miodu 110
Tab. 12. Współczynniki jednoczynnikowy model regresji liniowej predykcji emisji dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3 116
Tab. 13. Współczynniki trójczynnikowego modelu regresji liniowej predykcji emisji dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3 119
Tab. 14. Współczynniki jednoczynnikowy model regresji liniowej predykcji ogólnej liczby bakterii dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3 120
Tab. 15. Współczynniki trójczynnikowego modelu regresji liniowej predykcji ogólnej liczby bakterii dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3 122

10. Aneks

a



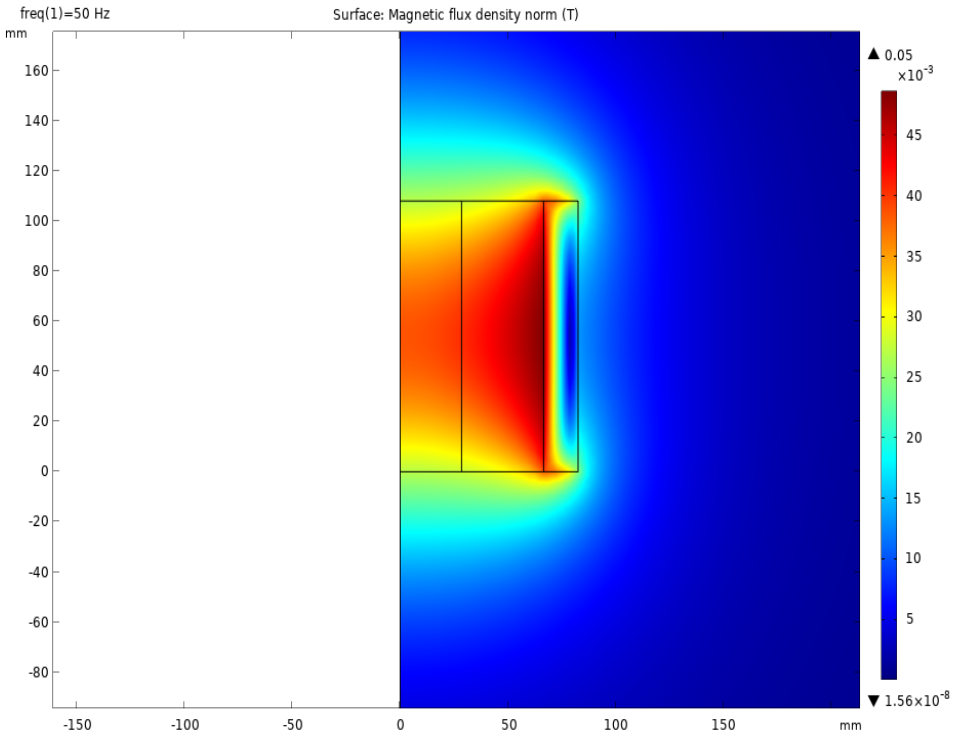
b



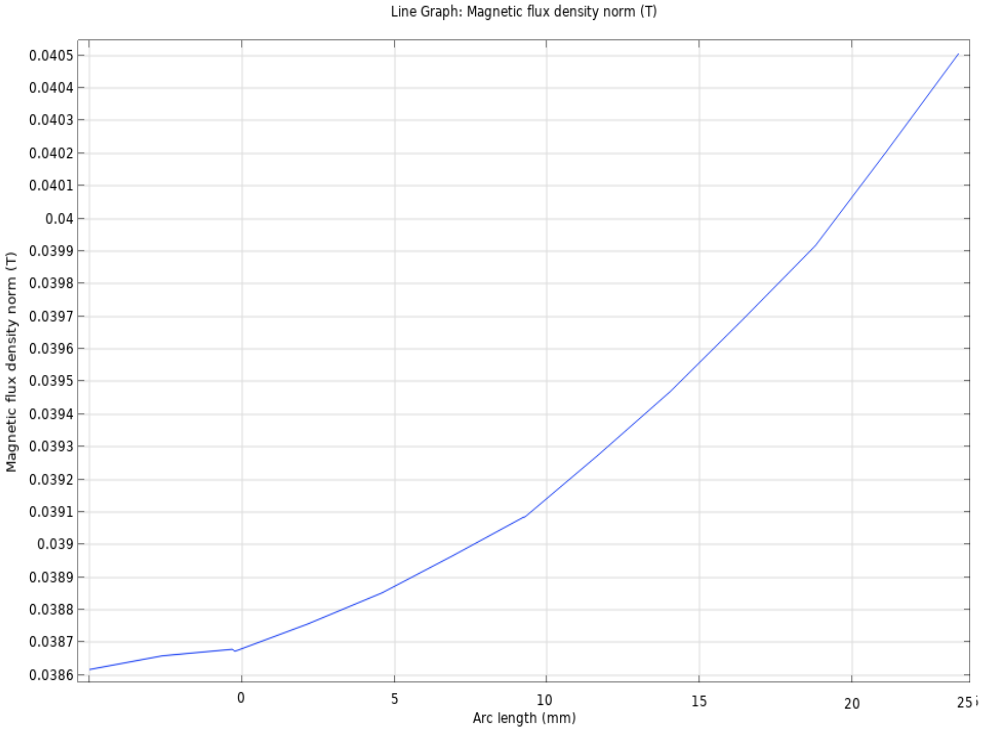
Rys. 37. Rozkład indukcji magnetycznej dla cewki składającej się z dwóch uzwojeń (odpowiednio 1180 zwojów i 267 zwojów) połączonych równolegle a) przekrój podłużny, b) przekrój poprzeczny

Źródło: opracowanie własne

a

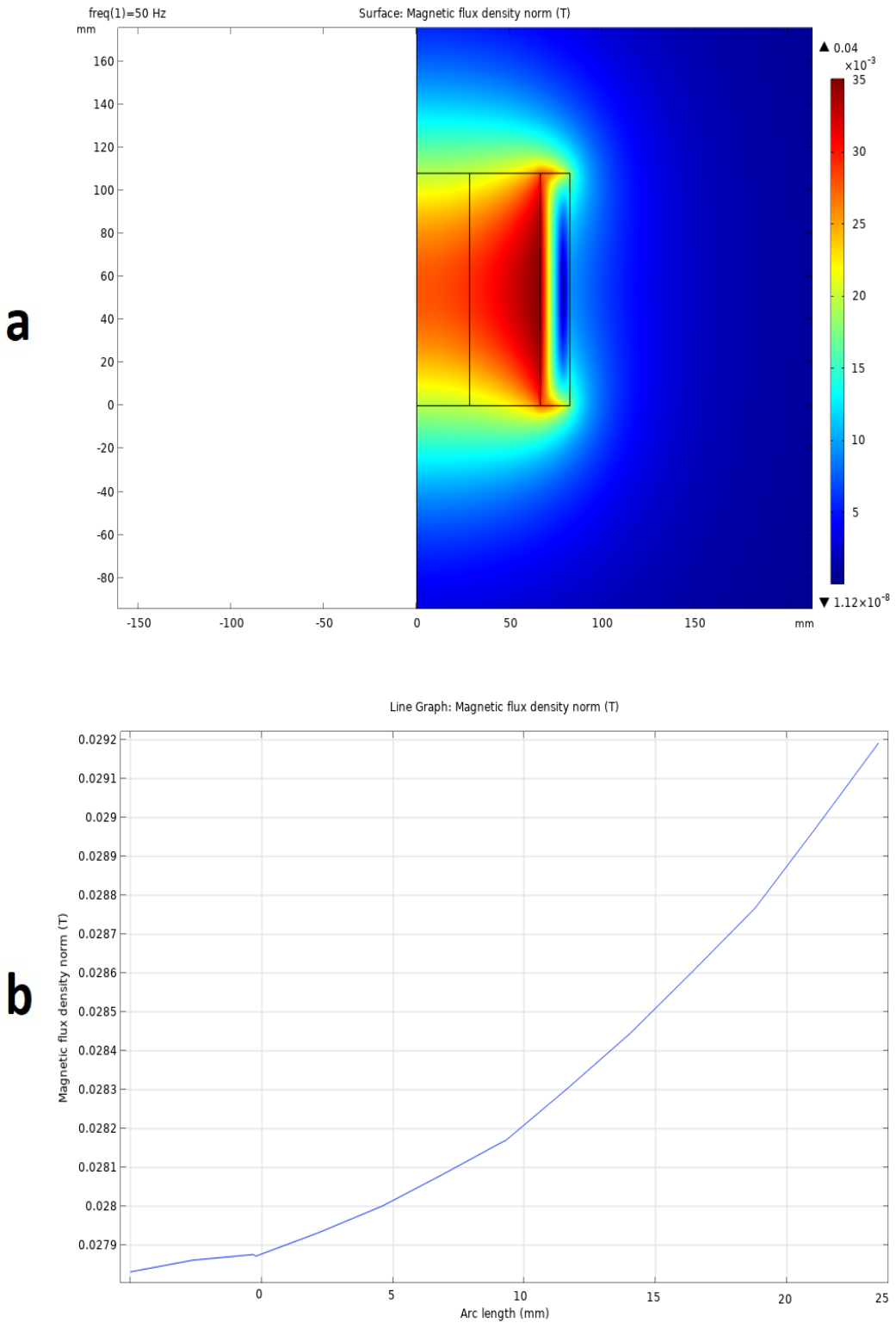


b



Rys. 38. Rozkład indukcji magnetycznej dla cewki składającej się z dwóch uzwojeń (odpowiednio 1037 zwojów i 410 zwojów) połączonych równolegle a) przekrój podłużny, b) przekrój poprzeczny

Źródło: opracowanie własne



Rys. 39. Rozkład indukcji magnetycznej dla cewki składającej się z trzech uzwojeń (odpowiednio 770 zwojów, 410 zwojów i 267 zwojów) połączonych szeregowo a) przekrój podłużny, b) przekrój poprzeczny

Źródło: opracowanie własne

Tab. 11. Emisja fotonowa wybranych gatunków miodu

Nr próbki	Odmiana miodu	Wyniki kolejnych powtórzeń [imp·600s^{-1}]	Współczynnik zmienności [-]
1	Akacjowy	55	0,166
		52	
		72	
		73	
		62	
		68	
		50	
		51	
		51	
		74	
2	Lipowy	103	0,053
		100	
		95	
		106	
		92	
		95	
		101	
		89	
		98	
		99	
3	Lipowy	69	0,115
		95	
		85	
		74	
		82	
		91	
		73	
		70	
		88	
		88	
4	Gryczany	85	0,090
		92	
		88	
		87	
		70	
		91	
		83	
		73	
		80	
		90	
5	Gryczany	68	0,112
		90	
		71	
		73	

		82	
		90	
		87	
		89	
		81	
		95	
6	Faceliowy	94	0,102
		90	
		84	
		76	
		85	
		88	
		70	
		74	
		83	
		71	
7	Nawłociowy	79	0,099
		85	
		88	
		72	
		74	
		89	
		71	
		78	
		68	
		70	
8	Nawłociowy	62	0,075
		51	
		55	
		64	
		58	
		58	
		62	
		59	
		53	
		54	
9	Nawłociowy	68	0,020
		69	
		67	
		70	
		68	
		70	
		71	
		68	
		71	
		69	

10	Rzepakowy	65	0,042
		62	
		62	
		66	
		67	
		64	
		70	
		63	
		63	
		68	
11	Spadziowy	86	0,024
		86	
		87	
		85	
		85	
		84	
		82	
		85	
		81	
		82	
12	Spadziowy	85	0,074
		94	
		86	
		88	
		100	
		95	
		93	
		89	
		105	
		102	
13	Spadziowy	95	0,070
		99	
		85	
		87	
		98	
		101	
		92	
		84	
		100	
		99	
14	Wierzbowy	94	0,049
		90	
		87	
		82	
		85	
		94	

		95	
		92	
		90	
		86	
15	Leśny	63	0,117
		69	
		84	
		85	
		81	
		76	
		66	
		69	
		63	
		80	
16	Lipowo - leśny	80	0,078
		82	
		79	
		70	
		68	
		84	
		74	
		67	
		73	
		75	
17	Leśny	91	0,100
		92	
		99	
		107	
		115	
		109	
		115	
		94	
		111	
		120	
18	Spadziowy	99	0,077
		97	
		80	
		82	
		90	
		87	
		94	
		89	
		93	
		80	
19	Spadziowy	110	0,096
		108	

		108	
		95	
		92	
		105	
		100	
		98	
		121	
		122	
20	Manuka	91	0,070
		93	
		93	
		100	
		109	
		99	
		109	
		96	
		106	
		107	
21	Manuka	89	0,069
		95	
		96	
		90	
		107	
		105	
		94	
		90	
		98	
		105	
22	Manuka	88	0,062
		88	
		90	
		95	
		96	
		99	
		82	
		84	
		85	
		89	
23	Manuka	72	0,071
		76	
		85	
		84	
		74	
		73	
		84	
		74	

		81	
		71	
24	Wielokwiatowy	68	0,091
		71	
		81	
		83	
		80	
		72	
		68	
		64	
		81	
		79	
25	Wielokwiatowy	100	0,077
		109	
		101	
		88	
		89	
		97	
		87	
		93	
		88	
		100	
26	Wielokwiatowy	77	0,106
		75	
		77	
		79	
		70	
		68	
		70	
		69	
		55	
		82	
27	Wielokwiatowy	80	0,072
		84	
		88	
		87	
		92	
		74	
		76	
		76	
		81	
		80	
28	Wielokwiatowy	78	0,021
		78	
		80	
		78	

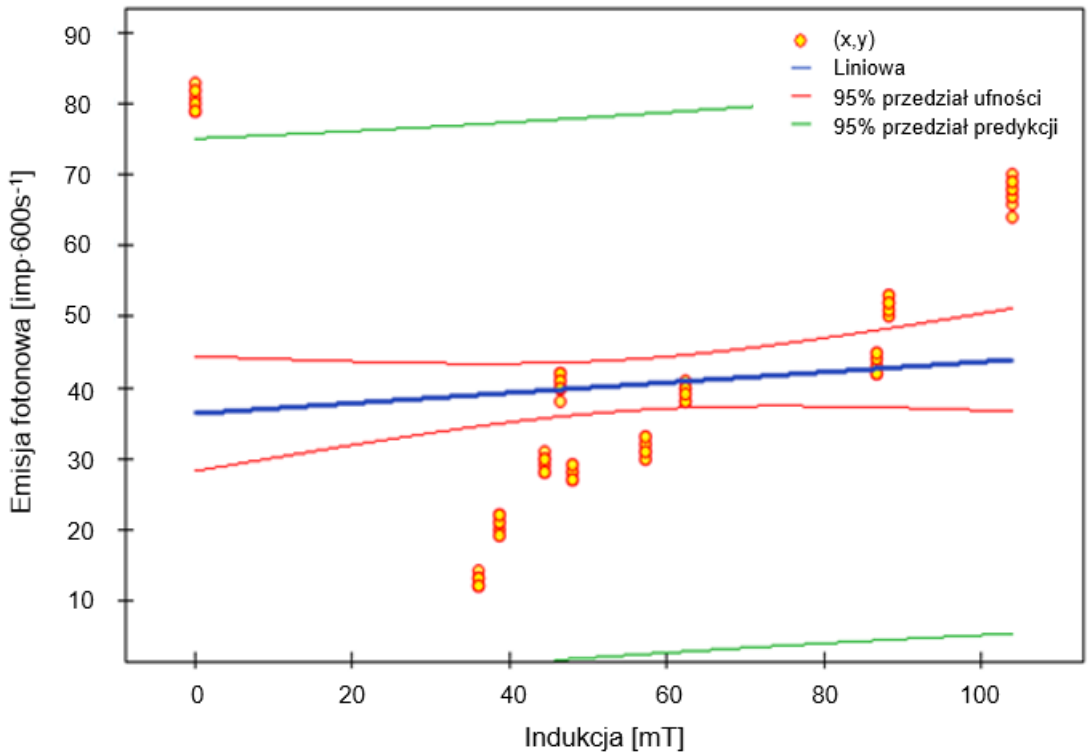
		81	
		82	
		80	
		80	
		81	
		77	
29	Wielokwiatowy	93	0,072
		96	
		90	
		91	
		80	
		79	
		80	
		88	
		87	
		80	
30	Wielokwiatowy	76	0,082
		82	
		85	
		72	
		80	
		69	
		77	
		77	
		84	
		66	

Źródło: opracowanie własne

Tab. 12. Współczynniki jednoczynnikowy model regresji liniowej predykcji emisji dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3

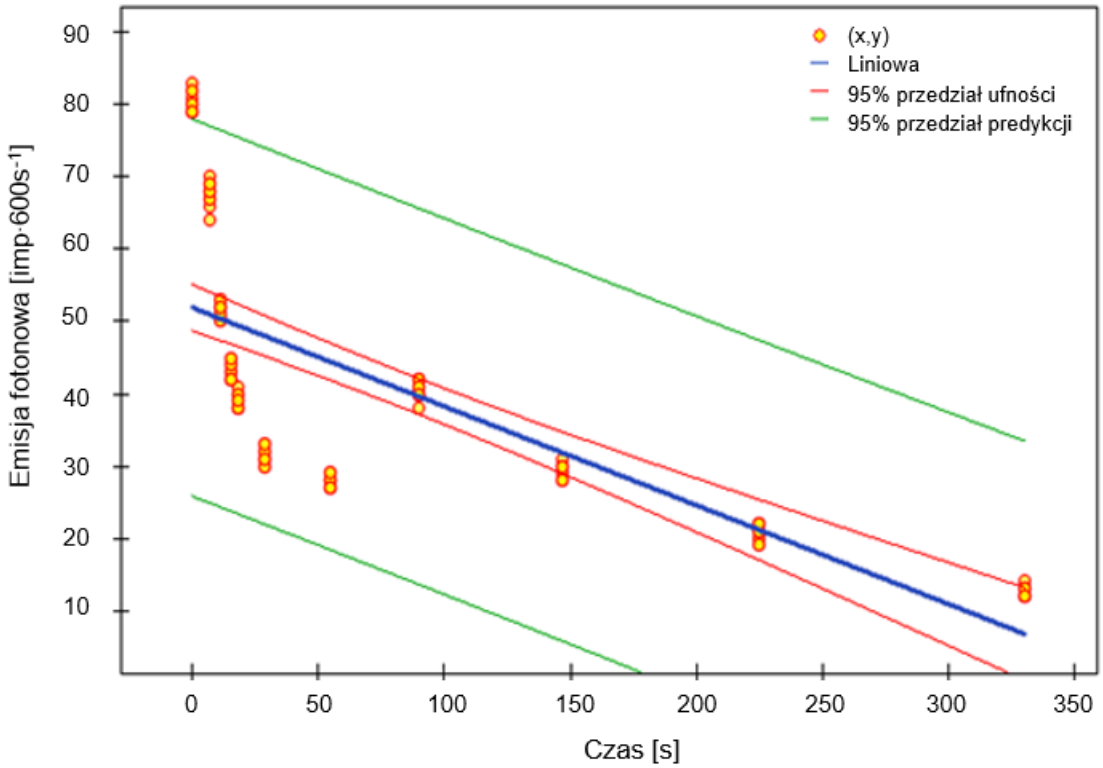
	wsp. B	błąd b	-95% CI	+95% CI	stat. t	wartość p
w. wolny	36,3267	4,0974	28,2049	44,4484	8,8658	<0,0001
Indukcja [mT]	0,292	0,2635	-0,2303	0,8143	1,1082	0,2702
w. wolny	51,9396	1,6145	48,7394	55,1397	32,1716	<0,0001
Czas [s]	-0,137	0,0122	-0,1611	-0,1128	-11,2574	<0,0001
w. wolny	60,281	1,8665	56,5812	63,9807	32,2964	<0,0001
Dawka [kJ/m3]	-0,0402	0,003	-0,0461	-0,0342	-13,3732	<0,0001
w. wolny	68,1182	1,3623	65,418	70,8184	50,0039	<0,0001
Częstotliwość [Hz]	-0,5545	0,023	-0,6002	-0,5089	-24,0831	<0,0001

Źródło: opracowanie własne



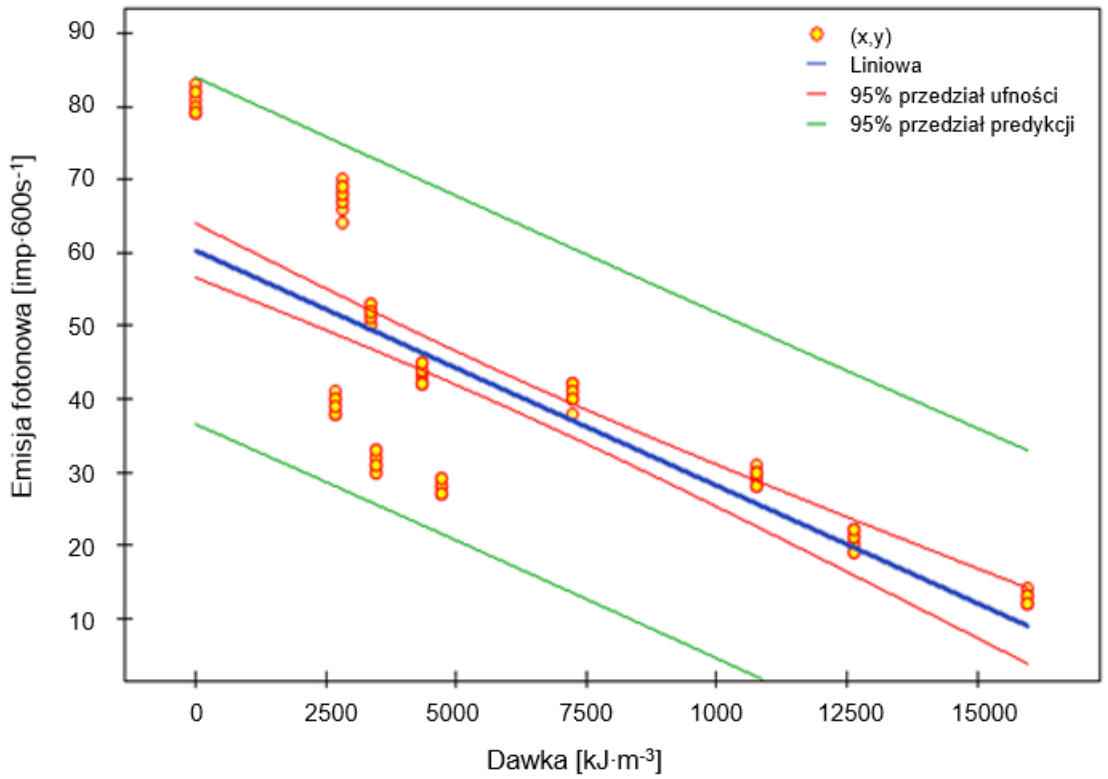
Rys. 40. Wykres jednoczynnikowej regresji liniowej predykcji emisji na podstawie indukcji dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3

Źródło: opracowanie własne



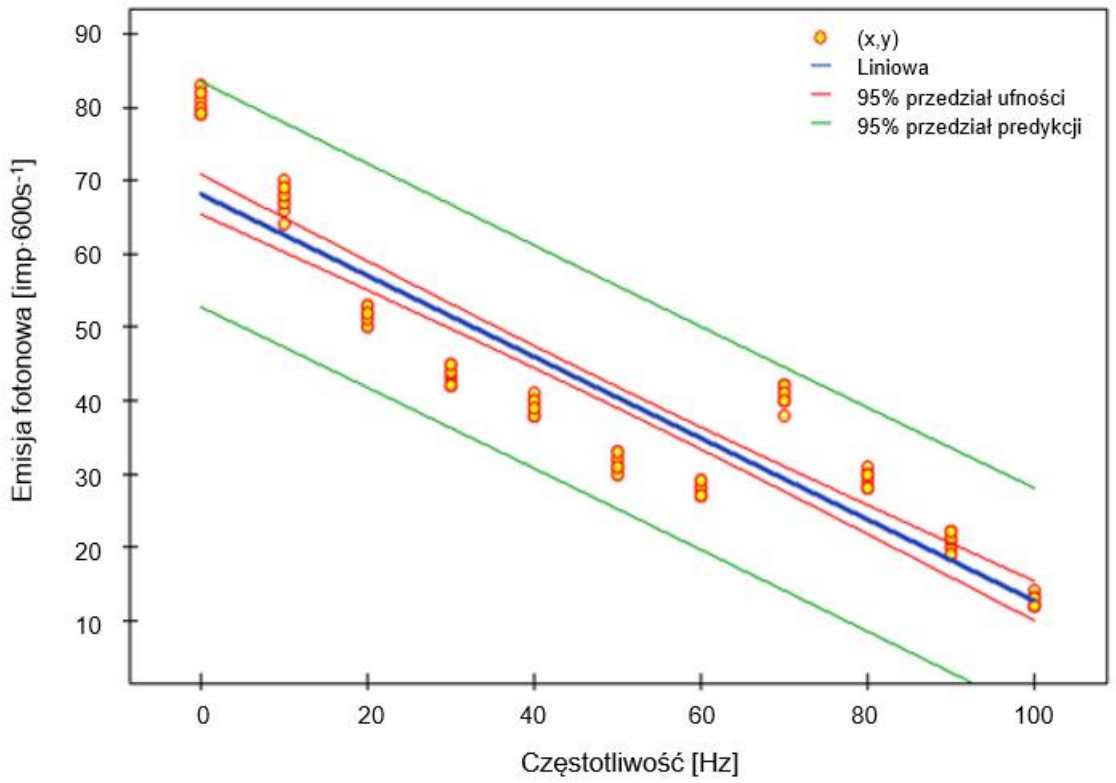
Rys. 41. Wykres jednoczynnikowej regresji liniowej predykcji emisji na podstawie czasu stymulacji dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3

Źródło: opracowanie własne



Rys. 42. Wykres jednoczynnikowej regresji liniowej predykcji emisji na podstawie dawki dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3

Źródło: opracowanie własne



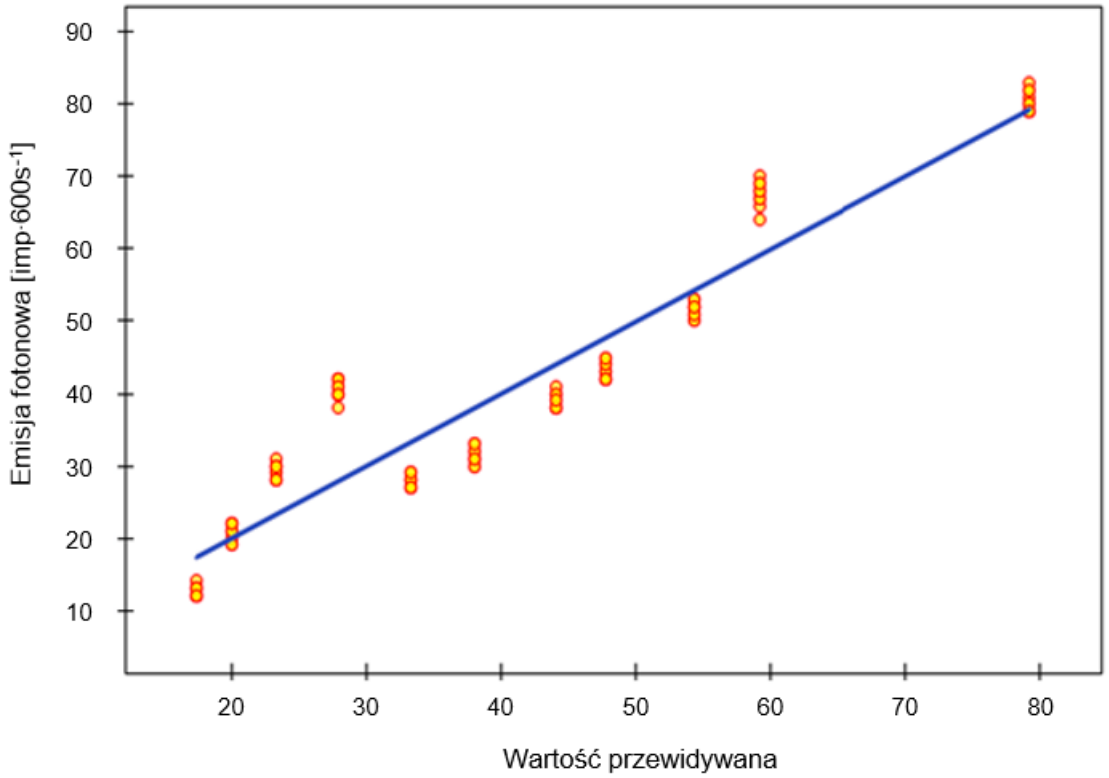
Rys. 43. Wykres jednoczynnikowej regresji liniowej predykcji emisji na podstawie częstotliwości pola dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3

Źródło: opracowanie własne

Tab. 13. Współczynniki trójczynnikowego modelu regresji liniowej predykcji emisji dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3

	wsp. B	błąd b	-95% CI	+95% CI	stat. t	wartość p
w. wolny	79,1958	2,015	75,2008	83,1908	39,3025	<0,0001
Indukcja [mT]	-0,5109	0,0952	-0,6997	-0,3221	-5,364	<0,0001
Czas [s]	0,0381	0,0125	0,0133	0,063	3,04	0,003
Częstotliwość [Hz]	-0,6982	0,0397	-0,7769	-0,6195	-17,5922	<0,0001

Źródło: opracowanie własne



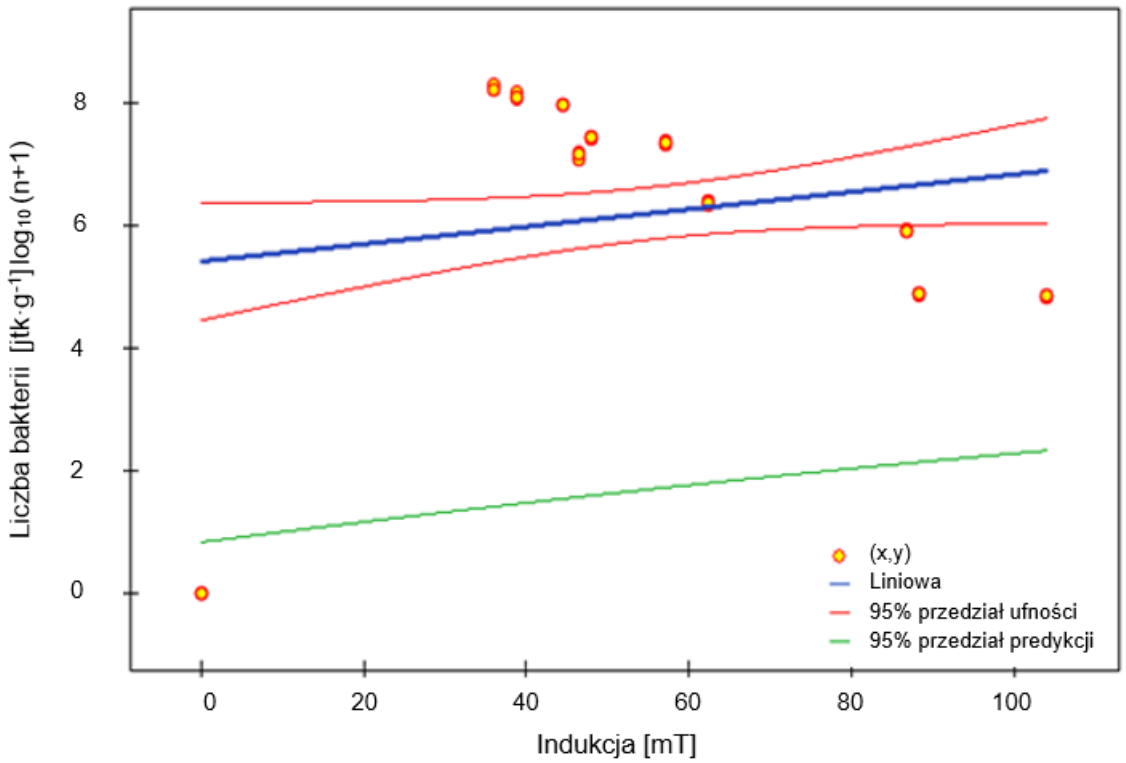
Rys. 44. Wykres trójczynnikowej regresji liniowej predykcji emisji dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3

Źródło: opracowanie własne

Tab. 14. Współczynniki jednoczynnikowy model regresji liniowej predykcji ogólnej liczby bakterii dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3

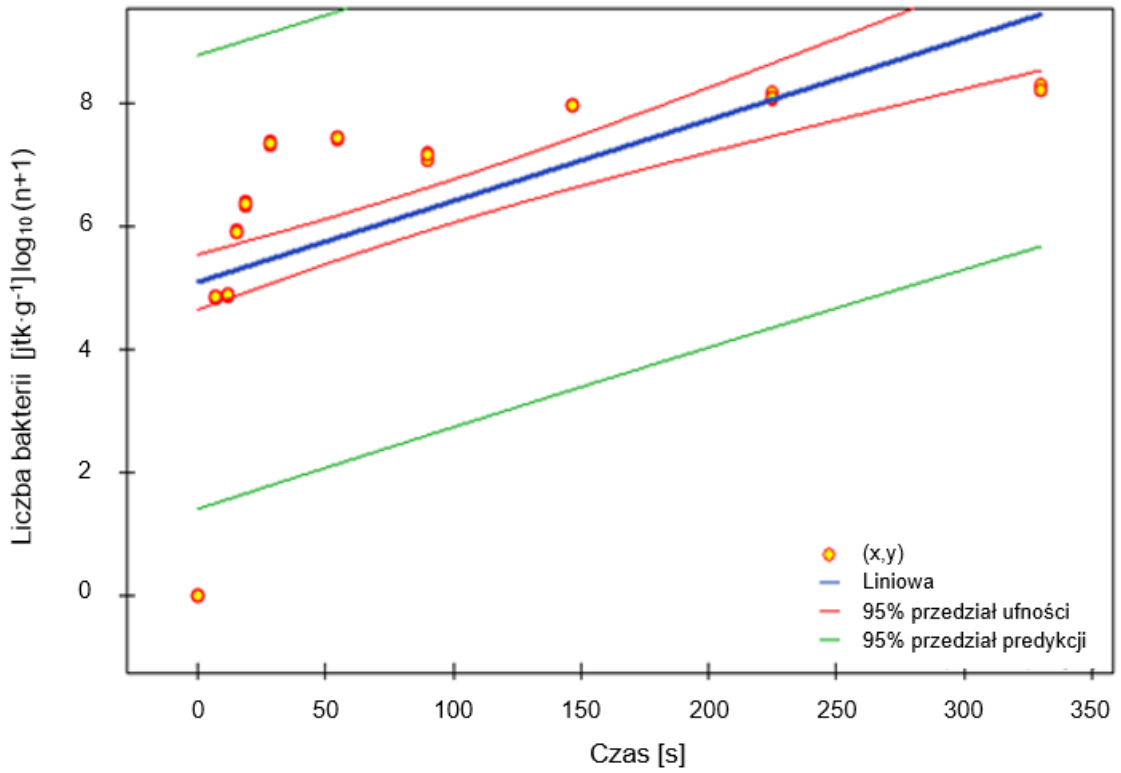
	wsp. B	błąd b	-95% CI	+95% CI	stat. t	wartość p
w. wolny	5,4255	0,4839	4,4663	6,3846	11,2122	<0,0001
Indukcja [mT]	0,0568	0,0311	-0,0049	0,1185	1,8251	0,0708
w. wolny	5,1029	0,2283	4,6504	5,5554	22,3518	<0,0001
Czas [s]	0,0132	0,0017	0,0098	0,0166	7,6725	<0,0001
w. wolny	4,0844	0,2555	3,5779	4,5908	15,9861	<0,0001
Dawka [kJ/m3]	0,0043	0,0004	0,0035	0,0051	10,4698	<0,0001
w. wolny	3,1605	0,2169	2,7306	3,5904	14,573	<0,0001
Częstotliwość [Hz]	0,0611	0,0037	0,0538	0,0684	16,6695	<0,0001

Źródło: opracowanie własne



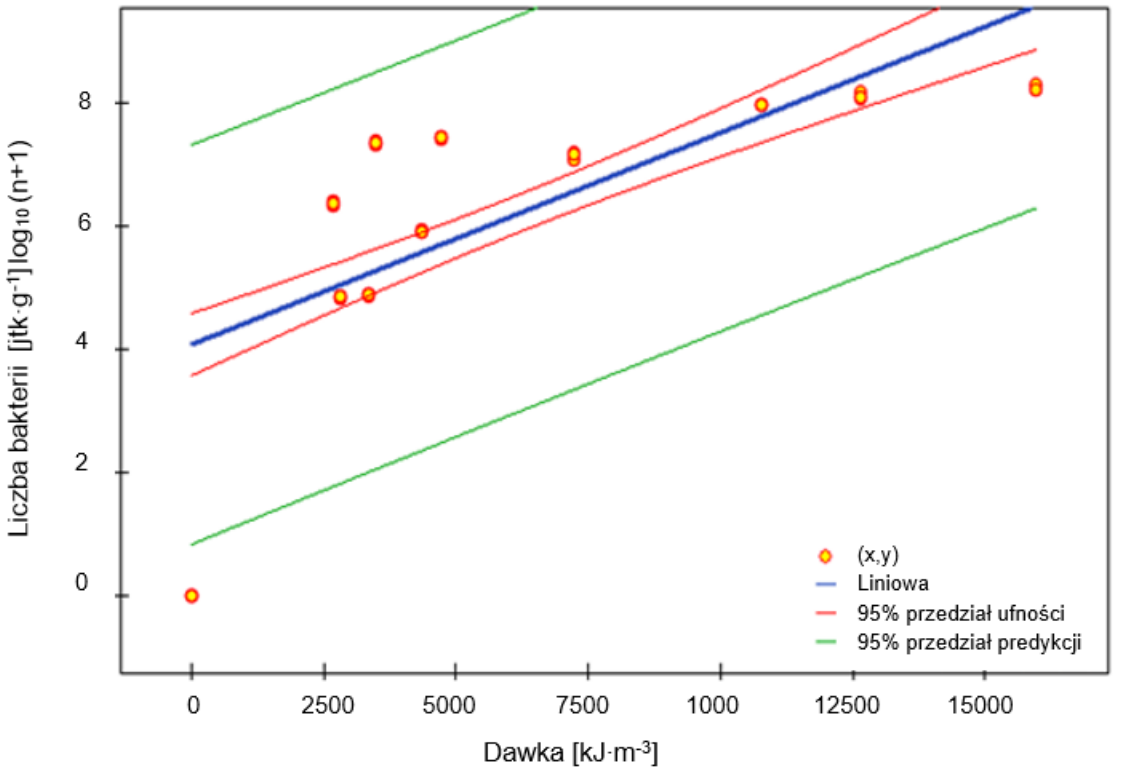
Rys. 45. Wykres jednoczynnikowej regresji liniowej predykcji ogólnej liczby bakterii na podstawie indukcji dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3

Źródło: opracowanie własne



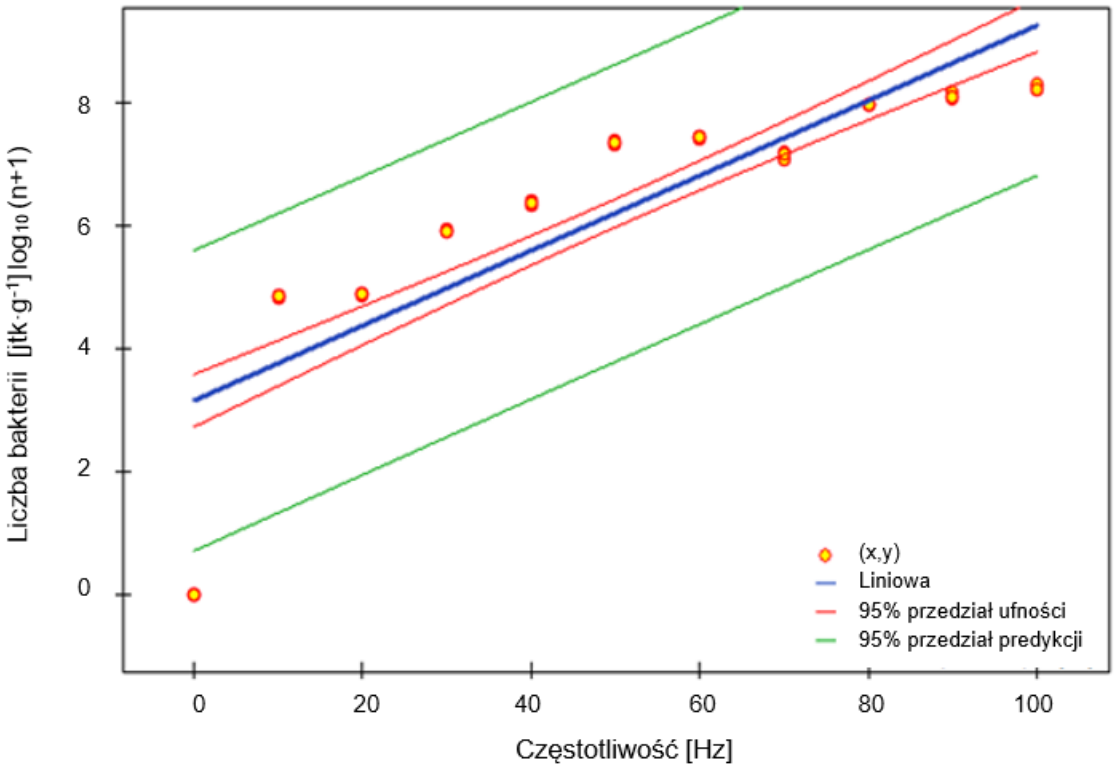
Rys. 46. Wykres jednoczynnikowej regresji liniowej predykcji ogólnej liczby bakterii na podstawie czasu stymulacji dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3

Źródło: opracowanie własne



Rys. 47. Wykres jednoczynnikowej regresji liniowej predykcji ogólnej liczby bakterii na podstawie dawki stymulacji dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3

Źródło: opracowanie własne



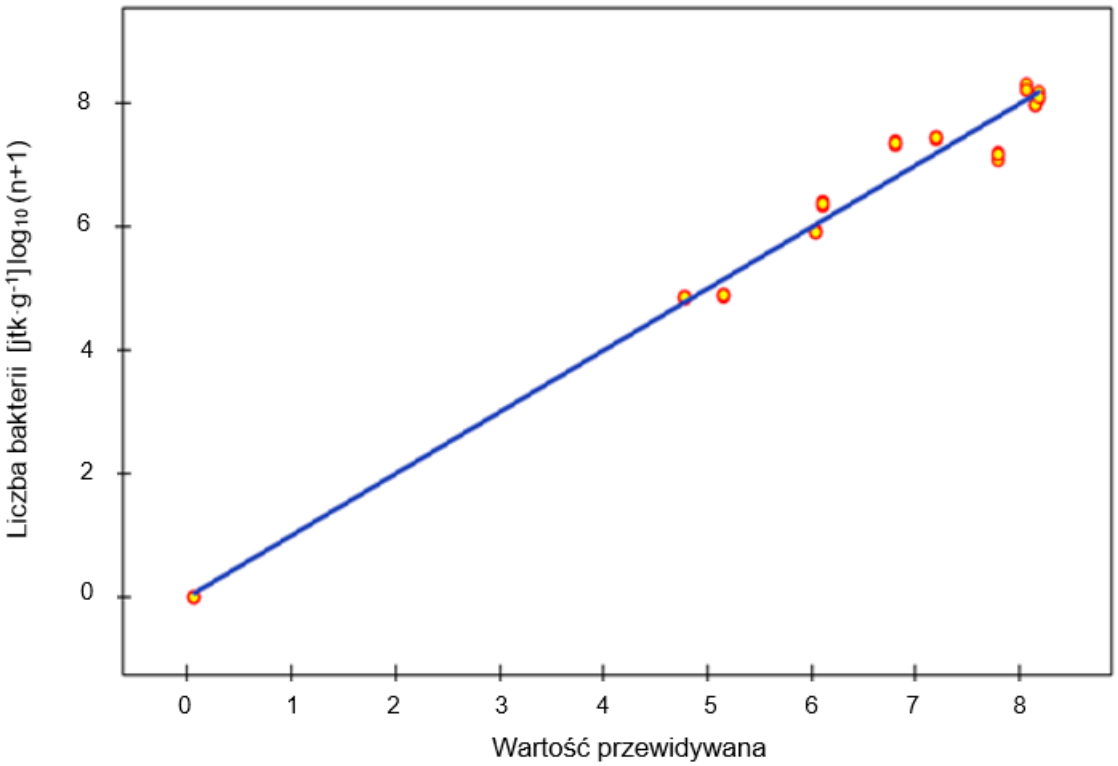
Rys. 48. Wykres jednoczynnikowej regresji liniowej predykcji ogólnej liczby bakterii na podstawie częstotliwości pola dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3

Źródło: opracowanie własne

Tab. 15. Współczynniki trójczynnikowego modelu regresji liniowej predykcji ogólnej liczby bakterii dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3

	wsp. B	błąd b	-95% CI	+95% CI	stat. t	wartość p
w. wolny	0,0596	0,0985	-0,1357	0,255	0,6053	0,5463
Indukcja [mT]	0,1465	0,0047	0,1373	0,1557	31,4536	<0,0001
Czas [s]	-0,0096	0,0006	-0,0108	-0,0084	-15,6715	<0,0001
Częstotliwość [Hz]	0,0986	0,0019	0,0947	0,1024	50,7841	<0,0001

Źródło: opracowanie własne



Rys. 49. Wykres trójczynnikowej regresji liniowej predykcji ogólnej liczby bakterii dla zestawu danych opisanych w podrozdziale 4.3

Źródło: opracowanie własne

Streszczenie

Praca doktorska dotyczyła konstrukcji i walidacji systemu technicznego, który pozwala na stymulację aktywności biologicznej substancji organicznej poprzez oddziaływanie polem elektromagnetycznym w sposób umożliwiający sporządzenie charakterystyk tej aktywności w zależności od parametrów pola oraz struktury jego oddziaływania. Obecnie w literaturze przedmiotu jednoznacznie potwierdzono tylko wpływ pola elektromagnetycznego na zmianę cech materiałów biologicznych, ale brak jest opracowań, które ilościowo parametryzują to zjawisko. Ponadto niewiele z nich dotyczy zróżnicowanego zakresu częstotliwości, który obejmowałby jej przedział od 10 Hz do 100 Hz, a nie ma opracowań dotyczących periodycznego oddziaływania zróżnicowanym polem elektromagnetycznym na materię organiczną i identyfikację występujących w takiej kombinacji oddziaływania ewentualnych synergizmów w aktywności biologicznej stymulowanej substancji. W pracy opisano proces budowy i walidacji systemu technicznego z podziałem na trzy etapy jego realizacji tj. etap I, II i III. W rezultacie skonstruowano system techniczny składający się z: agregatu chłodniczego, wzmacniacza, oscylatora, który umożliwia płynną i oscylacyjną zmianę częstotliwości prądu zasilającego, ze szczególnym uwzględnieniem niskich częstotliwości od 10 do 100 Hz, cewki powietrznej oraz ramienia robota pozwalającego na autonomiczną pracę systemu. Do walidacji efektów stymulacji zbudowanym systemem technicznym wybrano miód pszczeli, który charakteryzuje się unikatową stabilnością biologiczną, konieczną do realizacji zaplanowanych eksperymentów. Aktywność biologiczną substancji określano na podstawie emisji fotonowej oraz tradycyjnych badań mikrobiologicznych. W doświadczeniu zastosowano trzy różne kombinacje stymulacji dotyczące dawki ekspozycyjnej, indukcji magnetycznej oraz częstotliwość pola elektromagnetycznego, a także interwału oddziaływania pola na materiał biologiczny.

Stwierdzono, że skonstruowany system do elektromagnetycznej stymulacji materii organicznej pozwolił z zadowalającą dokładnością generować wymuszenia o specyficznej charakterystyce pod względem dawki indukcji oraz częstotliwości, co pozwoliło zaobserwować, że wartość emisji fotonowej miodu stymulowanego polem elektromagnetycznym w zakresie od 10 do 100 Hz jest odwrotnie proporcjonalna do częstotliwości tego pola. Ponadto, w miodzie stymulowanym polem elektromagnetycznym, wartość całkowitej liczby drobnoustrojów, zdolnych do wzrostu i tworzenia kolonii w pożywce stałej po inkubacji w warunkach tlenowych w temperaturze 30°C, jest wprost proporcjonalna w zakresie od 10 do 100 Hz do częstotliwości zastosowanego pola elektromagnetycznego.

Abstract

The doctoral thesis concerned the construction and validation of a technical system that allows the stimulation of biological activity of an organic substance through the interaction with an electromagnetic field in a way that allows the preparation of characteristics of this activity depending on the parameters of the field and the structure of its impact. Currently, the literature on the subject clearly confirms only the influence of the electromagnetic field on changing the properties of biological materials, but there are no studies that would quantify this phenomenon. Moreover, few of them concern the varied frequency range, which would cover its range from 10 Hz to 100 Hz, and there are no studies on periodic effects of a varied electromagnetic field on the organic matter and identification of possible synergies in the biological activity of the stimulated substance occurring in such combination. The dissertation describes the process of building and validating the technical system with a division into three stages of its implementation, i.e., stages I, II and III. As a result, a technical system consisting of a cooling unit, an amplifier, an oscillator, an air coil and a robot arm was constructed. It enables a smooth and oscillating change of the supply current frequency, with particular emphasis on low frequencies from 10 to 100 Hz and autonomous operation of the system. For the validation of the stimulation effects with the constructed technical system, bee honey was selected, which is characterized by unique biological stability, necessary for the implementation of the planned experiments. The biological activity of the substance was determined based on the photon emission and the traditional microbiological tests. In the experiment, three different combinations of stimulation were used: exposure dose, magnetic induction and frequency of the electromagnetic field, as well as the interval of the field's impact on the biological material.

It was found that the constructed system for electromagnetic stimulation of organic matter allowed with satisfactory accuracy to generate excitations with specific characteristics in terms of induction dose and frequency, which made it possible to observe that the value of photon emission of honey stimulated with an electromagnetic field in the range from 10 to 100 Hz is inversely proportional to the frequency this field. Moreover, in electromagnetic field stimulated honey, the value of the total number of microorganisms capable of growing and forming a colony in a solid medium after incubation under aerobic conditions at 30°C is directly proportional in the range from 10 to 100 Hz to the frequency of the applied electromagnetic field.