

Az elektromos terek kihatásai egyes gombafajok fejlődésére

Szerző:

Lingvay Mónika

Babeş–Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár, Kémia és Vegyészmérnöki Kar,
Szerves- és biokémiai folyamatmérnöki szak, mesterképzés, I. év

Témavezetők:

dr. Paizs Csaba egyetemi docens,

Babeş–Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár, Kémia és Vegyészmérnöki Kar, Magyar Kémia
és Vegyészmérnöki Intézet

dr. Simon Alpár egyetemi docens,

Babeş–Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár, Fizika Kar, Magyar Fizika Intézet

Kivonat

Az antropogén eredetű elektromos tereknek az élővilágra gyakorolt hatásainak tanulmányozása egy aktuális, elméletileg bonyolult és nagy gyakorlati fontosságú interdiszciplináris (biológia, kémia, fizika stb.) témakör. Erre való tekintettel, kísérletileg tanulmányozva volt a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgomba (vizes szuszpenzióban) és az *Aspergillus niger* penészgomba (Czapek-Dox agar táptalajon) fejlődése, egyen- és váltakozó (50Hz frekvenciájú) feszültségek által képzett elektromos terekben ($E=5\ldots100\text{V/cm}$). A meghatározások egy speciálisan kiképzett kísérleti bioreaktorban voltak elvégezve, amelyben a zavaró elektromos tér erősségének numerikus számítása és modellezése az Ansoft Maxwell 14.0 szoftverrel történt. A gombafajok fejlődésére jellemző biomassa-növekedésnek követése a táptalaj/szuszenzió fajlagos vezetőképességének folyamatos mérésével történt.

Kulcsszavak: elektromos tér, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, táptalaj, sejtosztódás, fajlagos vezetőképesség, konduktometria

Tartalomjegyzék

Kivonat.....	2
Tartalomjegyzék.....	3
1. Bevezetés.....	4
2. Kísérleti rész.....	5
2.1. A kísérleti berendezés	5
2.1.1. A speciális bioreaktor kifejlesztése	5
2.1.2. A kísérleti szuszpenzióra ható elektromos térerők számítása numerikus modellezéssel	6
2.1.3. A feszültségforrások.....	11
2.2. Módszerek	12
2.2.1. Sejtszámlálás	12
2.2.2. A fajlagos vezetőképesség mérése	13
2.3. Felhasznált anyagok	14
2.3.1. Élesztőszuszpenzió.....	14
2.3.2. Aspergillus niger táptalajos oldata	14
2.4. A meghatározások menete	14
3. Kísérleti eredmények és azok értelmezése.....	15
3.1. Az elektromos terek hatása az élesztőgomba fejlődésére	15
3.2. Az elektromos terek hatása a feketepenyész fejlődésére	19
4. Következtetések	20
Köszönetnyilvánítás	20
Irodalomjegyzék.....	21

1. Bevezetés

Az elektromágneses szennyezés és ennek az élővilágra gyakorolt hatásainak a vizsgálata egy nagyon aktuális és nagyfontosságú, de ugyanakkor egy elméletileg bonyolult, interdiszciplináris témakör (biológia, biokémia, elektrokémia, fizika – villamosság stb.).

Az 1kHz-nél alacsonyabb frekvenciájú elektromágneses jelek hatásait az élő szervezetekre összefoglalóan először Andrew A. Marino és Robert O. Becker [1] vizsgálta. Kutatásaikból kitűnik, hogy az 50V/cm-nél nagyobb 50 Hz körüli térerő hatására az élőlények, fajtától függően, vagy elpusztulnak (egér, ecetmuslica stb.), vagy viselkedésükben / fejlődésükben komoly változások állnak be (a méhek egymást halálra szurkálják, az egerek májsejtjeinek mitózis-indexe megháromszorozódik stb.). Tanulmányukból ugyancsak kitűnik, hogy az alacsony térerejű, 50 Hz-es zavaró jelek is változásokat okozhatnak különböző élő szervezetekben (például a Rhesus majmoknál már a 0,0035 V/cm-es térerő fokozott vízigényt, szomjúságot vált ki). Behatóbb kutatásokból kitűnik, hogy az alacsony frekvenciájú (10 – 100Hz), 10V/cm nagyságrendű zavaró jelek, melyek főleg a villamos energia szállítási (magasfeszültségű vezetékek) és felhasználási rendszereiből származnak, a gyermekkori leukémia, idegrendszeri zavarok és különböző ráktípusok gyakoriságát számottevően növelik, valamint a Ca^{2+} membránátvitelében jelentős változásokat okoznak [2]. William R. Hendee [3] és társai ezeket a biológiai változásokat főleg az oxidációs stressz és a kalciumion homeosztázisában bekövetkezett módosulásokkal próbálják magyarázni.

Előzetes kutatásainkban a dielektromos spektroszkópiával tanulmányoztuk az 50Hz-es zavaró elektromos terek hatását a sörélesztő szuszpenzió dielektromos permittivitására [4-6], valamint az acetofenon, élesztő által katalizált, hidrogénezési (redukálási) reakciójának a szelektivitására [7]. A laboratóriumi eredmények azt mutatták, hogy az 50Hz-es elektromos terek számottevően befolyásolják az élesztőgomba metabolizmusát és feltehetőleg a fejlődését is. Ugyancsak tanulmányoztuk a gázvezetékeknél és a talajba ágyazott 20kV-os energia-kábeleknél használt polietilén penészgombák általi biorongálódását [8-10]. Az eredmények azt mutatták, hogy a talajba ágyazott 50Hz-es elektromos térben működő polietilén kábelköpeny biorongálódása számottevően nagyobb, mint a laboratóriumban, szabvány körülmények között végzett [11] meghatározások esetében. Ez azt sugallja, hogy a zavaró 50Hz-es elektromos tér hatására a penészgombák polietilénrongáló kapacitása számottevően megnő.

Ezekre való tekintettel, a dolgozat célja tanulmányozni az elektromos terek hatásait a közönséges élesztőgomba (*Saccharomyces cerevisiae*) és a feketepenész (*Aspergillus niger*) fejlődésére.

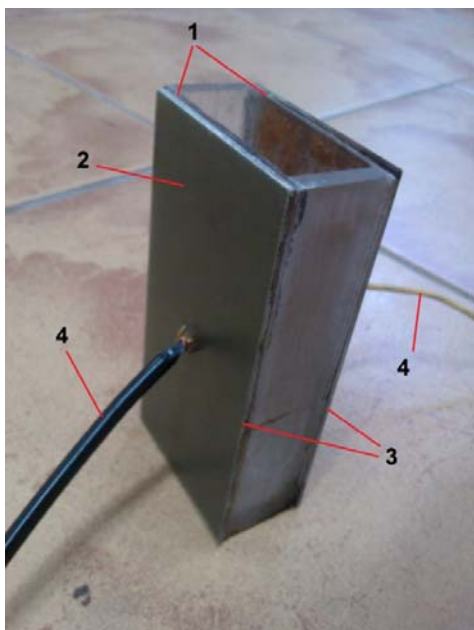
2. Kísérleti rész

Az egyenfeszültségű és 50Hz-es elektromos tereknek az élesztőgomba és a feketepénész fejlődésére való hatásainak tanulmányozására egy specializált kísérleti berendezés lett megtervezve és kifejlesztve.

2.1. A kísérleti berendezés

2.1.1. A speciális bioreaktor kifejlesztése

Az eredmények reprodukálhatóságának és értelmezhetőségének az érdekében egy speciális bioreaktor lett kifejlesztve, amellyel biztosítható az, hogy a vizsgált táptalajokon (szuszpenzió / oldat) egy egyenletesen eloszló (homogén) és ellenőrizhető (lépésekben állítható) elektromos tér legyen kialakítható, anélkül, hogy a vizsgált táptalaj fémfelületekkel érintkezzen (ne mehessen végbe elektrolízis). A kifejlesztett bioreaktorok fényképei az 1. ábrán láthatók.



1. ábra. A kísérleti reaktorok: 1 – az edény fala; 2 – elektromos szigetelés; 3 – síkpárhuzamos elektródák; 4 – kapcsolóhuzalok; 5 – elektromos csatlakozások.

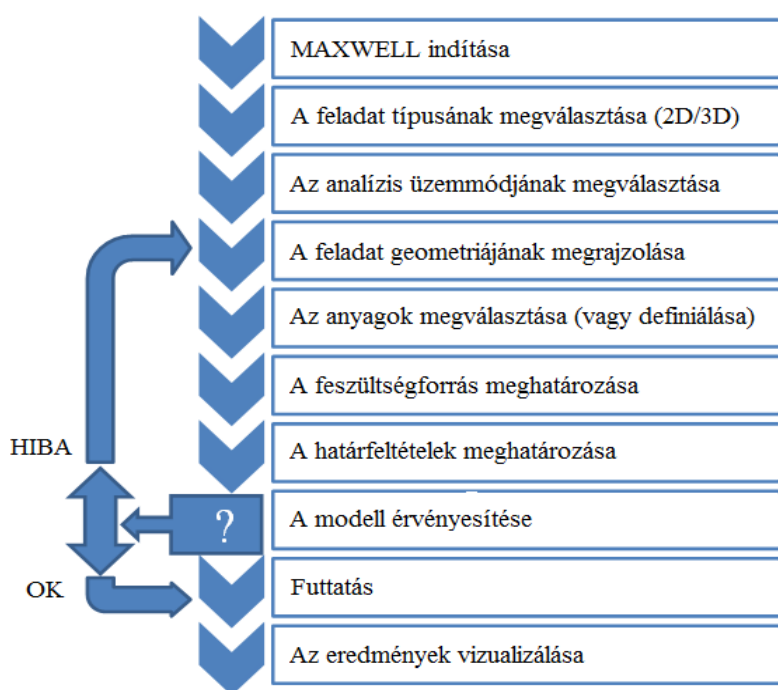
Az első kísérleti reaktor egy 2mm vastagságú PLEXIGLAS® (polimetilmetakrilát) lemezből készült hasáb alakú edény, melynek belső méretei 20 x 40 x 100mm. A reaktor két 40x100mm-es falának külső felületére egy-egy rézfóliás nyáklemez lett rögzítve, amelyekre a kívánt térerőnek megfelelő feszültség jön kapcsolva.

Tekintettel arra, hogy a penészgombák rongálják a PLEXIGLAS®-t, az *Asp. niger*. fejlődése egy 40 x 100 x 150mm belső méretű, 4 mm falvastagságú hasáb alakú üvegedényből kiépített reaktorban (második kép) volt vizsgálva.

2.1.2. A kísérleti szuszpenzióra ható elektromos térerők számítása numerikus modellezéssel

Megállapítható, hogy a kísérleti szuszpenzióra ható elektromos térerő függ a síkpárhuzamos elektródákra kapcsolt feszültségtől, a kísérleti reaktor geometriájától valamint a falak anyagától és a kísérleti oldatok/szuszpenziók elektromos paramétereitől (vezetőképesség és permittivitás). Erre való tekintettel szükséges a kísérleti oldatra/szuszpenzióra ható E elektromos térerő kiszámítása és eloszlásának modellezése. Ez a feladat aránylag egyszerűen megoldható numerikus modellezéssel, az Ansoft Maxwell 14.0 specializált szoftver segítségével. [12]

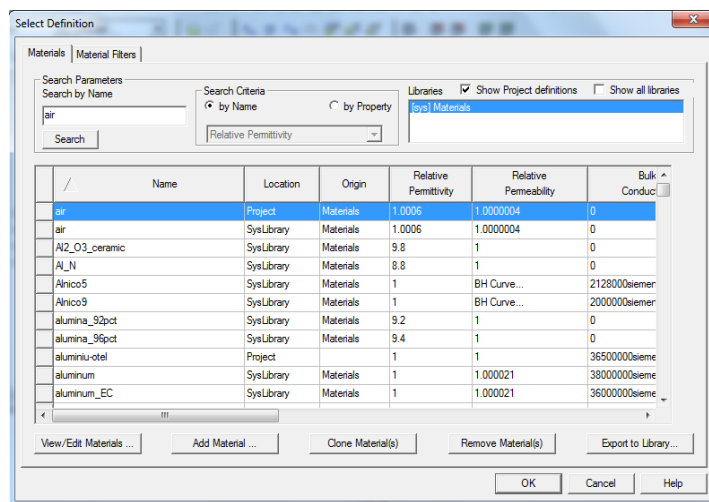
Egy klasszikus numerikus modellezés főbb lépéseit a 2. ábra mutatja be.



2. ábra. Az alkalmazott numerikus modellezés főbb lépései [12]

A szoftver indítása után, első lépésben ki lett választva a feladat típusa, ebben az esetben a *Project* menüből nyíló *Insert Maxwell 2D Design* opcióval. Következő lépésben az analízis üzemmódjának megválasztására került sor és a viszonyítási rendszer meghatározására – a *Solution Type* ablakból kiválasztható a „*Cartesian XY*” derékszögű koordináta-rendszer és az „*AC Conduction*” illetve „*DC Conduction*” üzemmódok. [12]

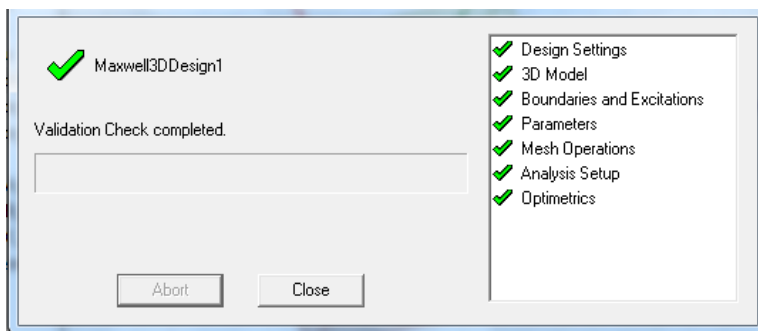
A feladat geometriájának megrajzolása a „*Draw*” ablakból a „*Rectangle*” opcióval történt meg, majd csak ennek végeztével volt lehetséges az anyagok kiválasztása az elérhető adatbázisból vagy új anyagokat definiálva (3. ábra). Ezután vált lehetségessé a feszültségforrás meghatározása az *Assign Excitation* almenüből a *Current* opcióval. [12]



3. ábra. Az anyagok adatbázisának elérése és az anyagok kiválasztása

A határfeltételek meghatározásához az *Edit/Select* menüből az *Edges* opció kiválasztása után a *Ctrl*-t lenyomva, az egérrel be lettek jelölve a határfelületek. Ezt követően a *Maxwell 2D/Boundaries/Assign* opcióval megnyílt ablakban ki kellett választani a feladat üzemmódjának megfelelő határfeltételt. [12]

A modell érvényesítése a *Maxwell 2D/Validation Check* opcióval történt, mely során a program ellenőrzi, hogy a feladat geometriájának megrajzolásának és az összes előző lépés helyességét (4. ábra). [12]



4. ábra. A modell érvényesítése

A feladat megoldásának futtatása a *Maxwell 2D* menüből az „*Analyze All*” opcióval történt. Az eredmények vizualizálása a menüből is lehetséges a *Maxwell 2D/Fields/Fields* opcióval. [12]

A fentebb leírtak szerint be volt rajzolva a kísérleti reaktor keresztmetszete a megfelelő anyagot rendelve a reaktorfalnak, be voltak táplálva a kísérleteknek megfelelően változó paraméterek – a szuszpenzió/táploldat permittivitásának és vezetőképességének különböző értékei –, majd különböző kapcsolt feszültségek értékeire ($U_{\text{eff}} = 2000\text{V}$, 2500V 50Hz-es váltakozófeszültségekre és $U=1250\text{V}$, 2500V egyenfeszültségekre illetve $U_{\text{eff}} = 7\text{kV}$ feszültségre) futtatva volt a program. A reaktorok középpontjában kapott térerősség értékeket az 1-3 táblázatok összesítik.

1. táblázat. A élesztő szuszpenzióra ható elektromos térerők (E) a reaktorra kapcsolt 50Hz-es U feszültség függvényében

$U_{\text{eff}} = 2000\text{V}$			$U_{\text{eff}} = 2500\text{V}$		
ε	σ [S/m]	E [V/m]	ε	σ [S/m]	E [V/m]
1000	0,0175	3432,616	1000	0,0175	4301.058
2000	0,0175	1735,729	2000	0,0175	2165.726
3000	0,0175	1160,621	3000	0,0175	1448.136
500	0,0144	6746,608	500	0,0144	8433.260
500	0,0175	6746,608	500	0,0175	8433.260
500	0,0298	6746,608	500	0,0298	8433.260

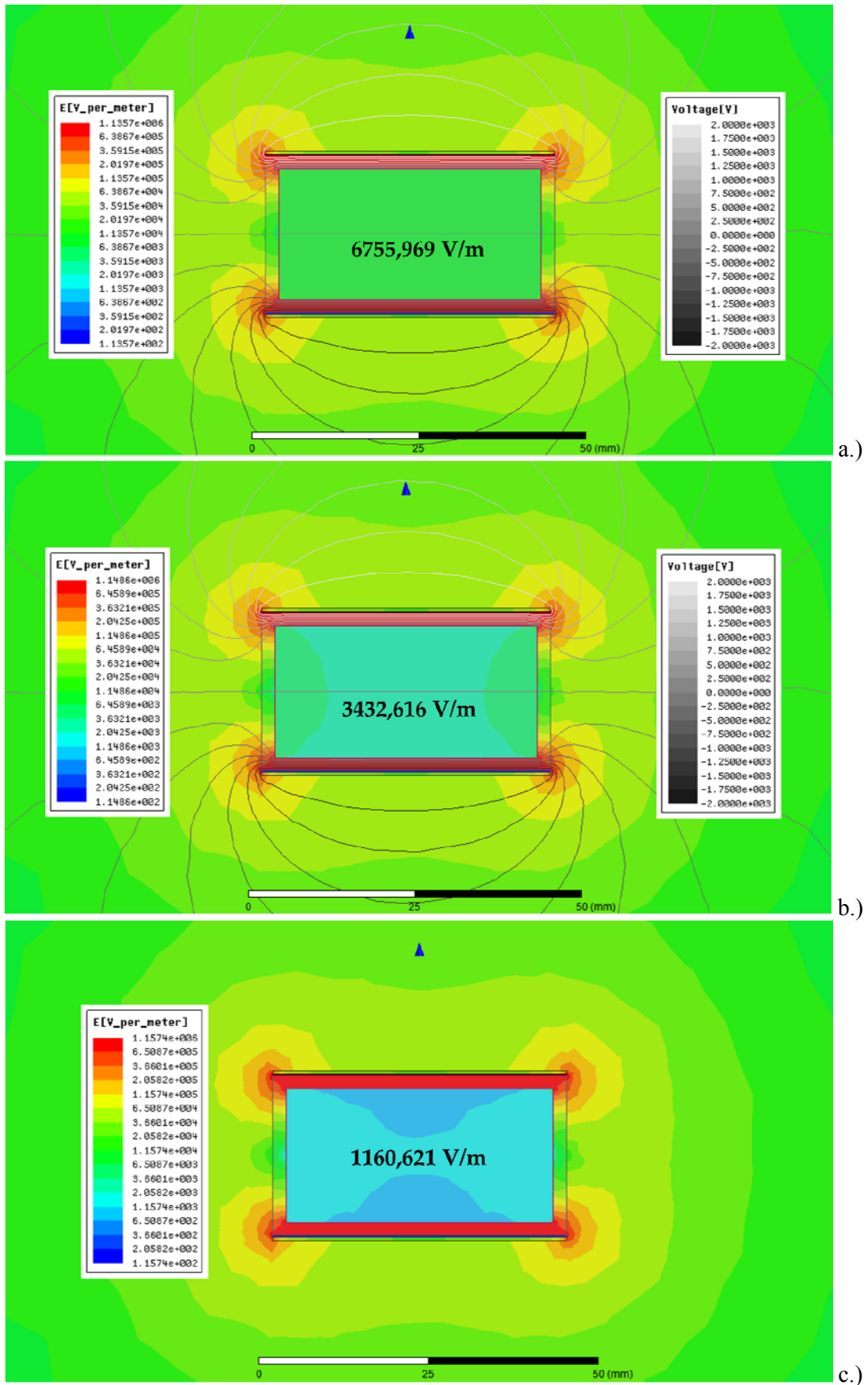
2. táblázat. A élesztő szuszpenzióra ható elektromos térerők (E) a reaktorra kapcsolt U egyenfeszültség függvényében

$U = 1250\text{ V}$			$U = 2500\text{V}$		
ε	σ [S/m]	E [V/m]	ε	σ [S/m]	E [V/m]
1000	0,0175	2164.074	1000	0,0126	4328.148
2000	0,0175	1091.837	2000	0,0126	2183.674
3000	0,0175	703.096	3000	0,0126	1460.192
500	0,0175	4269.3583	500	0,0126	8503.752
500	0,0300	4251.876	500	0,0260	8503.752

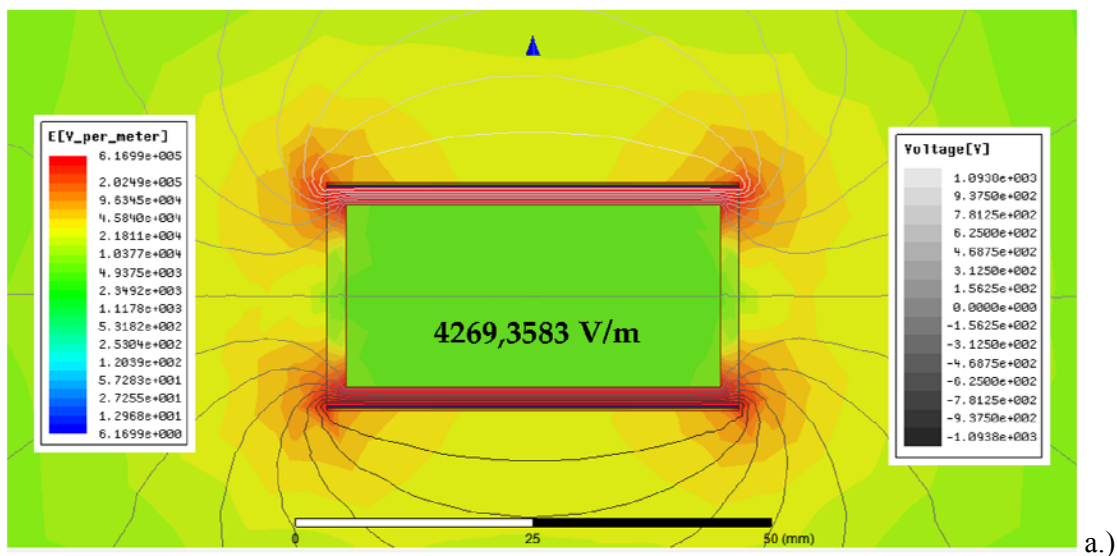
3. táblázat. A penészspórakkal beoltott tápoldatra ható elektromos térerők (E) az üveg reaktor esetében

$U_{\text{eff}} = 7000\text{ V}$		
ε	σ [S/m]	E [V/m]
500	0,475	18480.027
750	0,475	12544.662
1000	0,475	9495.166
500	0,475	18480.027
500	0,48	18480.027
500	0,54	18480.027
500	0,561	18480.027

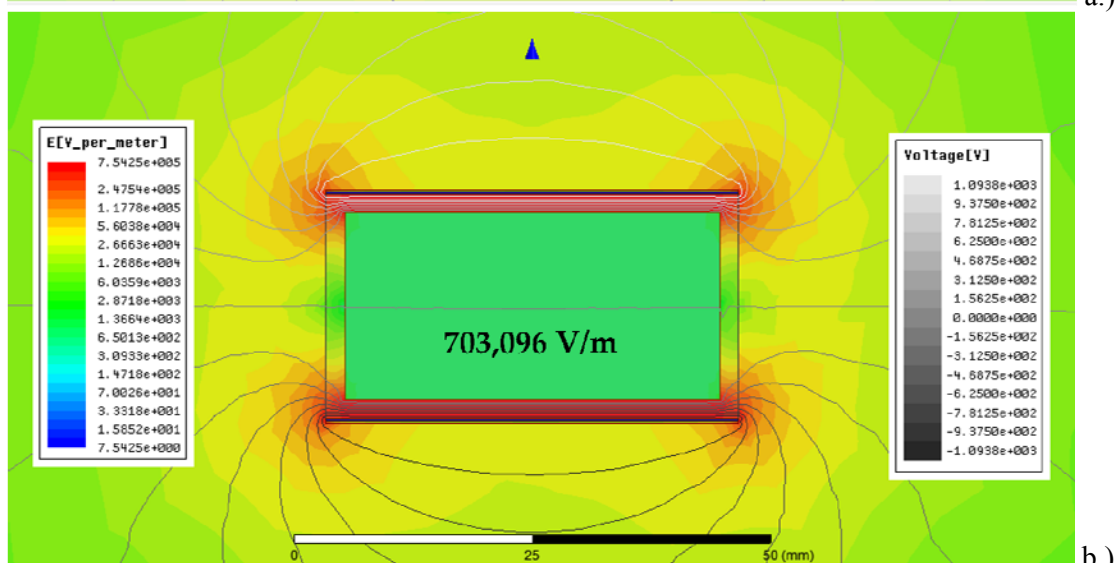
Ugyanakkor, a szoftver segítségével, a program futtatása után az elektromos tér eloszlását ábrázoltuk grafikusán, a különböző térerősség értékekkel rendelkező pontokat különböző színárnyalatokkal szemléltetve. A PLEXIGLAS® kísérleti reaktorban a téreloszlást az 5. és 6. ábrák, az üveg reaktorban pedig a 7. ábra mutatja be, a változó paraméterek néhány értékkombinációjára.



5. ábra. A térerő eloszlása a szuszpenzióval töltött reaktorban a szuszpenzió permittivitásának függvényében ($\sigma=175\mu\text{S/cm}$, $\varepsilon=500$ (a.), 1000 (b.) és 3000 (c.), $U_{\text{eff}}=2000\text{V}$, $f=50\text{Hz}$)

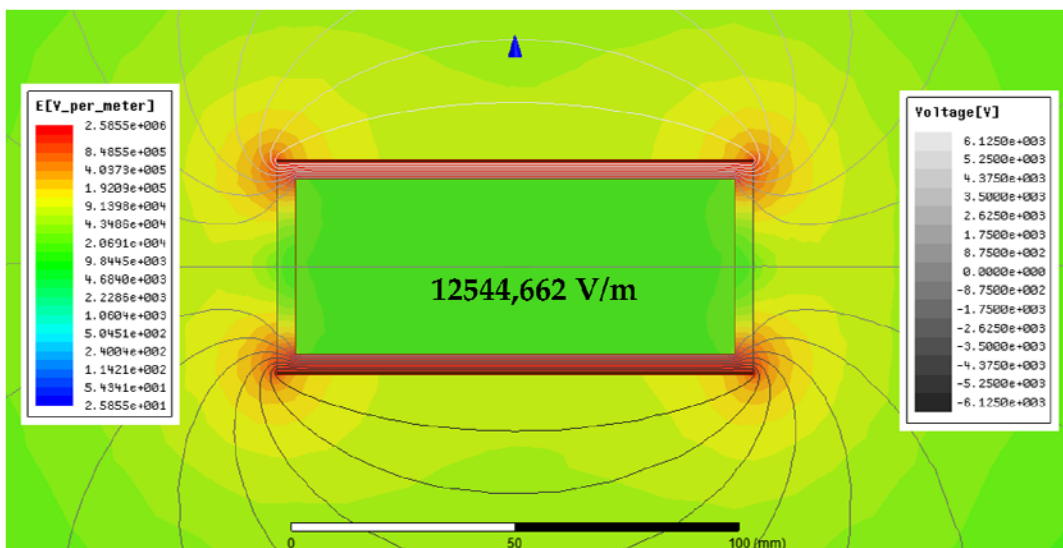


a.)



b.)

6. ábra. A térerő eloszlása a szuszpenzióval töltött reaktorban a szuszpenzió permittivitásának függvényében ($\sigma=175\mu\text{S/cm}$, $\varepsilon=500$ (a.) és 3000 (b.), $U=1250\text{V}$)



7. ábra. A térerő eloszlása a penészes tápoldattal töltött reaktorban ($\sigma=4,75\text{mS/cm}$, $\varepsilon=750$, $U_{\text{eff}}=7000\text{V}$, $f=50\text{Hz}$)

Az 5.-7. ábrák alapján megállapítható, hogy a megtervezett és kivitelezett kísérleti reaktorok geometriájának köszönhetően, adott zavaró feszültségeknél, az élő sejteket tartalmazó szuszpenzióra/tápoldatra – ennek egész térfogatában – egy aránylag állandó térerejű elektromos tér hat. A térerő értékét, adott U feszültségnél, nagyban befolyásolja a vizsgált szuszpenzió relatív permittivitása, míg a fajlagos vezetőképessége csak kis mértékben meghatározó.

Tekintettel arra, hogy az előzetes kutatásokban leírt eredmények szerint [4-6], az élesztő szuszpenzió relatív permittivitása kb. 500 és 3000 között oszcillál, valamint arra, hogy a fajlagos vezetőképessége, az idő függvényében kb. 130 és 300 $\mu\text{S}/\text{cm}$ közötti, a numerikus modellezés alapján megállapítható, hogy az élesztő metabolizmusában, a 3.1. alfejezetben bemutatott változásokat 11,60V/cm és 67,47V/cm közötti értékű zavaró 50Hz-es illetve 7,03V/cm és 42,69 V/cm közötti egyenfeszültségű térerők okozták.

A [13] tanulmány szerint az *Asp. niger* oldat relatív permittivitásának értéke 500 és 1000 közé becsülhető, így a numerikus számítások alapján, az elektromos térerősség értéke 94,95 V/cm és 184,8 V/cm közöttinek tekinthető.

2.1.3. A feszültségforrások

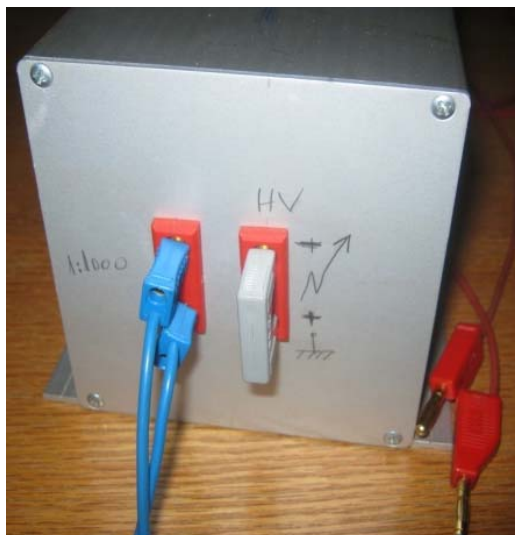
A használt feszültségforrások „házipia” voltak kivitelezve. A váltakozó feszültségeket egy csatlakozóssal ellátott 220V/4000V feszültségemelő transzformátor (8. ábra.) táplálta, melynek segítségével állítható volt a kívánt munkafeszültség (100V-os lépésekkel 50 és 4000V között – 50Hz).



8. ábra. A csatlakozóssal ellátott feszültségemelő transzformátor

A 4000V-nál nagyobb váltakozó feszültséget egy NID 2480-68 típusú, ELECTROTEHNICA – București gyártmányú nagyfeszültségű transzformátor biztosította.

Az egyenfeszültségű tápláláshoz egy feszültségsokszorozó egyenirányító lett megépítve, amelynek kimenő egyenfeszültsége a bemenő váltakozó feszültséggel arányos ($200V_{\text{rms}}$ táplálásnál kb. $2500V_{\text{DC}}$ van a kimeneten). Az egységbe (9. ábra) egy feszültségosztó lett beépítve amellyel a kimenőfeszültség mérhető / ellenőrizhető.



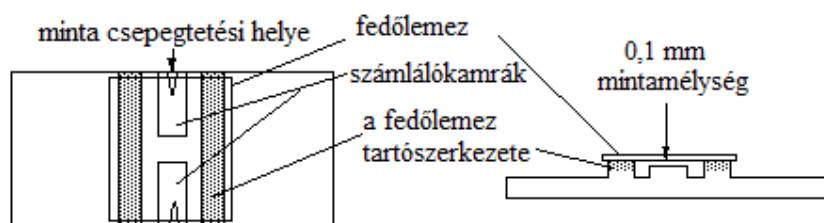
9. ábra. A feszültségsokszorozó egyenirányító ($5000V_{\text{DC}}$)

2.2. Módszerek

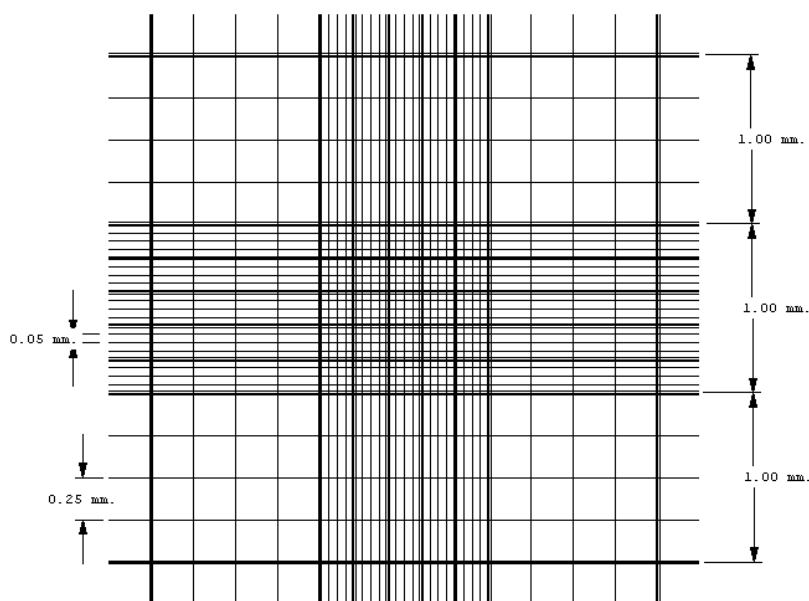
2.2.1. Sejtszámlálás

A biomassa mennyiségének időbeli alakulásának, azaz a sörélesztő fejlődésének követéséhez, első lépésben a hagyományos, direkt, mikroszkópiás számlálókamra módszerével volt meghatározva a szuszpenzióban levő sejtek száma. A meghatározások egy megfelelő fedőlemezzel ellátott, Neubauer típusú mikroszkópiás számlálókamrával és egy 210x nagyítású optikai mikroszkóppal voltak elvégezve.

A számlálókamrák (10. ábra) speciális mikroszkópiás tárgylemezek, melyeken egy ismert területű, hálózatos beosztás (11. ábra) segíti elő a különböző mikroorganizmusok vagy mikroszkopikus méretű testecskék (pl. vér alakos elemei) számlálását. A fedőlemez feltételével meghatározott magasságú réteg keletkezik, és ezáltal a beosztás fölött elhelyezkedő folyadék térfogata ismert. [14]



10. ábra. Számlálókamra felül- és oldalnézete [15]



11. ábra. Neubauer típusú számlálókamra beosztása [16]

A megszámlálandó 15 darab 0,25mm x 0,25mm felületű négyzet a számlálókamra egész felületéről véletlenszerűen volt megválasztva. A számlálásnál következetesen a felső és a bal oldali határvonalon levő sejtek a négyzet belsejében levőnek számítottak, illetve a sejtsoportok és a sarjadzó élesztősejtek egynek számítottak. Az egységnyi térfogatban (1cm³) található sejtek száma az alábbi képlettel számolható ki:

$$N \left[\frac{\text{sejt}}{\text{cm}^3} \right] = \frac{\langle n \rangle \cdot f}{0,25 \cdot 0,25 \cdot 0,1} \cdot 10^3 \quad (1)$$

ahol: $\langle n \rangle$ - a négyzetenként megszámlált sejt számok átlagértéke, f - hígítási tényező ($f=100$).

Ez a módszer egy aránylag időigényes megoldás. Ennek a hátránynak a kiküszöbölése indokoltta tette egy gyorsabb módszer keresését, mely egyszerűsége miatt alkalmas legyen a biomassza mennyiségének folyamatos, *in situ* mérésére.

2.2.2. A fajlagos vezetőképesség mérése

Figyelembe véve, hogy az élő sejtek fejlődése alatt ezek citoplazmájában és extracelluláris terükben számtalan metabolikus termék halmozódik fel, melynek többsége a sejtvízben/táptalajban disszociált/oldott állapotban található, valamint azt, egy oldat/elektrolit fajlagos vezetőképességét a benne levő ionok és gyökök töltése, mérete és mennyisége határozza meg, a további meghatározásokban a konduktometriás mérés módszere megfelelőnek tűnt, mely a sejtuszpenziók fajlagos vezetőképességének változásának a mérésén alapszik. [17-19]

A kísérletek során követve volt a sörélesztő vizes szuszpenziójának és a feketepénész spórákkal beoltott speciális tápoldat elektromos vezetőképességének időbeni alakulása. A fajlagos vezetőképesség mérések egy Radelkis OK-9023 típusú harangelektroddal (mérőcella) és egy Consort C863 típusú konduktométerrel (multiparaméter analízátor) voltak végezve.

2.3. Felhasznált anyagok

2.3.1. Élesztőszuszpenzió

5 g Budafok Ltd-Magyarország által gyártott kereskedelmi friss élesztőhöz 90 cm³ bidesztillált víz lett hozzáadva, majd a keverék 10 percig ultrahangos vízfürdőben volt homogenizálva. A kapott szuszpenzióhoz, a kísérlet során 5 g kereskedelmi kristálycukor lett hozzáadva, mint tápanyagforrás.

2.3.2. *Aspergillus niger* táptalajos oldata

A feketepenyész tenyészet számára szénforrásmentes Czapek-Dox agar táptalaj elkészítése volt szükséges. Ehhez 2g nátrium-nitrát (NaNO₃), 0,7g monokálium-foszfát (KH₂PO₄), 0,3g dikálium-foszfát (K₂HPO₄), 0,5g kálium-klorid (KCl), 0,5g magnézium-szulfát (MgSO₄ x 7H₂O), 0,01g vas-szulfát (FeSO₄) és 10g agaragar 1000mL desztillált vízben lett feloldva, majd az oldat a kísérleti edényekkel együtt autoklávban sterilizálva volt 3 bar nyomáson, 20 percig. A steril tápoldatnak egy része *Aspergillus niger* spórákat tartalmazó ásványi oldattal lett beoltva. [11]

2.4. A meghatározások menete

A konduktometriás módszer alkalmasságának bizonyítása érdekében követve volt egy kezdetben 5% élesztőt és 5% cukrot (szacharózt) tartalmazó vizes szuszpenzió fajlagos vezetőképessége. A mérések során 5 különböző időpontban 0,01cm³ minta lett véve, melyből 100-szoros hígítás után, sejtszámlálással meg lett határozva az eredeti szuszpenzió sejtkoncentrációja.

A vizsgált gombafajok elektromos térben való fejlődésének követése érdekében minden kísérleti meghatározás párhuzamosan történt két egyforma geometriájú reaktorban, melyekben a keverés intenzitása és a hőmérséklet is állandó és egyforma értéken volt tartva: egy referencia (elektromos tér nélkül) és egy, a feszültségforrásra csatolt kísérleti reaktorban. A próbák keverése iners gáz (Ar) buborékolatással volt megoldva (12. ábra).

Az élesztőszuszpenzió anyagcseréjének vizsgálata érdekében az elkészített élesztőszuszpenzió (~95 cm³) két egyforma térfogatú részben szét lett osztva a referencia és az 50 Hz-es feszültséggel polarizált reaktorba, rögtön a homogenizáció után. Ettől a pillanattól kezdve 5 percenként, 4 órán keresztül volt követve az oldat fajlagos vezetőképessége. Az első 10 perc lejárta után mindkét reaktor tartalmához hozzá lett adva 2,5-2,5 g kereskedelmi kristálycukor, mely a buborékolatás által homogén módon fel lett oldva a szuszpenzióban. A vezetőképességméréssel párhuzamosan, egy IKA® ETS-D5 típusú

hőmérsékletkontrollerrel volt ellenőrizve a próbák hőmérséklete úgy, hogy az a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ értéken konstans maradjon.



12. ábra. Az élesztő-metabolizmus tanulmányozási kísérlet berendezése (50 Hz-es feszültség kapcsolása a jobboldali edényre)

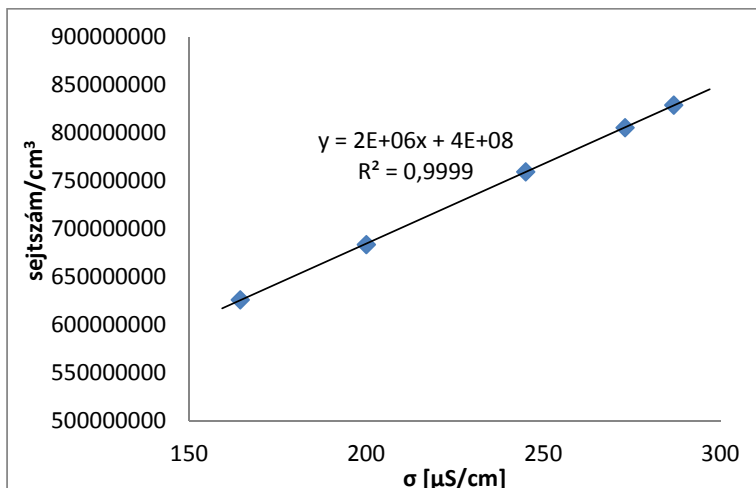
A különböző erősségű elektromos terek kihatásainak vizsgálatára a kísérlet $2000V_{\text{rms}}$ váltakozó feszültség illetve 1250V egyenfeszültség kapcsolásával volt elvégezve.

A feketepénész anyagcseréjének vizsgálatának érdekében a spórákkal beoltott Czapek-Dox táptalajos oldat egyenlő részben két edénybe volt osztva. A kísérleti reaktorra 50Hz-es 7kV feszültséget kapcsolva, 6 napon keresztül mérve volt a két oldat vezetőképessége. A mérések relatív állandó szobahőmérsékleten ($19 \pm 2^\circ\text{C}$) voltak végezve.

3. Kísérleti eredmények és azok értelmezése

3.1. Az elektromos terek hatása az élesztőgomba fejlődésére

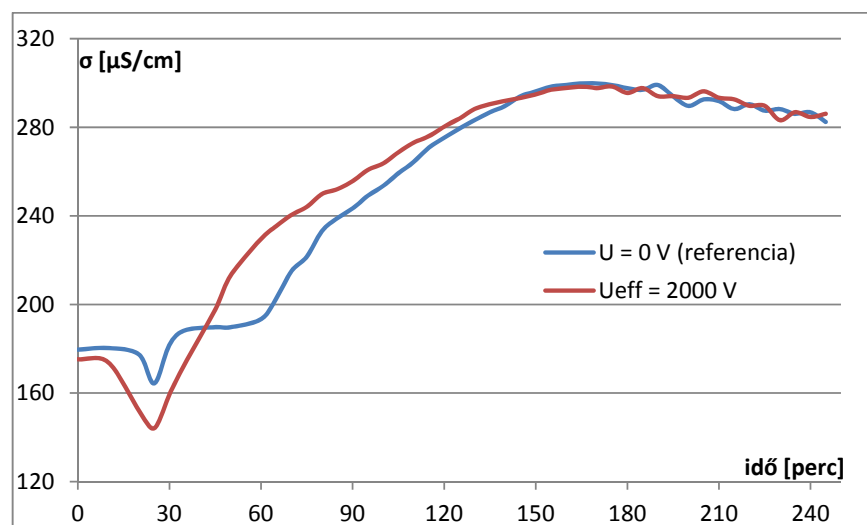
A cukros élesztőszuszpenzió sejtszámlálásából kapott sejtkoncentrációnak az oldat vezetőképességétől való függését a 13. ábra szemlélteti.



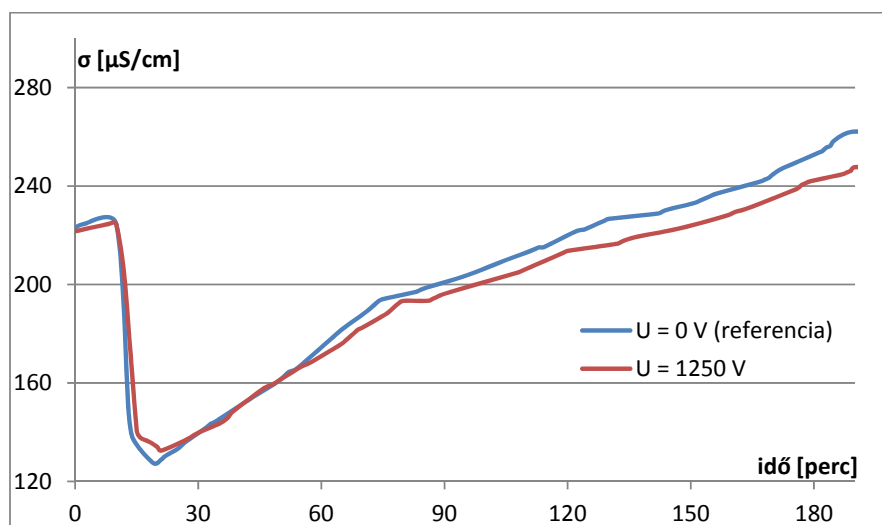
13. ábra. A biomassa mennyiségének az élesztőszuszpenzió vezetőképességétől való függése

A 13. ábrából megállapítható, hogy a sejtszám változása egyenesen arányos a szuszpenzió vezetőképesség-változásával, tehát ezzel a módszerrel megfelelően jellemezni lehet a gombák fejlődési, szaporodási folyamatát.

A kezdetben 5% élesztőt és 5% cukrot (szacharózt) tartalmazó vizes szuszpenziók vezetőképességének időbeni alakulásait, az élesztő fermentációs metabolizmusának (anaerob légzés) és szaporodásának következtében, a referencia oldatban és a különböző erősségű elektromos terek jelenlétében, a 14. és 15. ábra grafikonjai mutatják be.



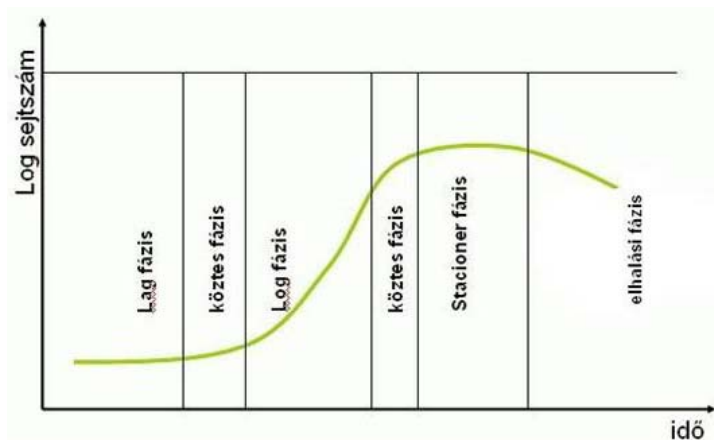
14. ábra. Az élesztőgomba szuszpenzió vezetőképességének időbeni változása 50 Hz-es elektromos tér hiányában és jelenlétében (2000 Vrms).



15. ábra. Az élesztőgomba szuszpenzió vezetőképességének időbeni változása egyenáramú elektromos tér hiányában és jelenlétében (1250 V).

Első ránézésre megállapítható, hogy a 14. és 15. ábrán megfigyelhető változási tendencia nagyon hasonlít a mikroorganizmusok szakirodalomból jól ismert növekedési görbéjéhez, mely a biomassa mennyiségének (a mikroorganizmus populáció nagy egyedszáma miatt a gyakorlatban célszerűbb az egyedek számának logaritmusa) időbeni függvényének ábrázolása. [20]

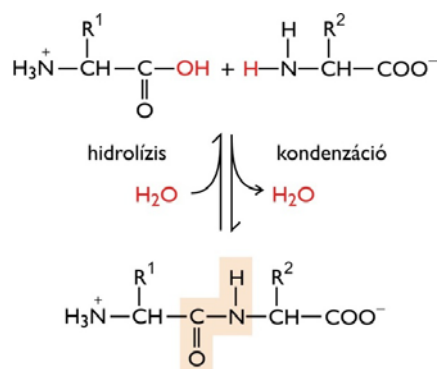
Amint a 16. ábrán is megfigyelhető, a mikrobák szaporodásában négy fő fázist lehet megkülönböztetni, illetve két köztes fázist, melyeknek elnevezései a Monod-féle kinetikai modell nomenklaturája szerint: lag vagy lappangási, gyorsuló növekedési (első köztes), log vagy exponenciális növekedési, lassuló szaporodási (második köztes), stacionárius és elhalási (pusztulási) szakaszok. [20, 21]



16. ábra. Baktérium tenyészet (biomassza) növekedési görbéje [21]

A szaporodási/metabolizmus kinetikai modell fázisai észlelhetők a 14. ábrán is. Úgy a zavaró 50 Hz-es elektromos tér hiányában, mint ennek jelenlétében, az élesztősejteknek a tápanyaghoz való hozzáférés első 30 percében felismerhető az úgynevezett *lag* vagy *lappangási fázis*, amely alatt az organismusok adaptálódnak a környezetükhöz. Ezalatt az idő alatt a számuk nem változik számottevően, mivel a növekedés és szaporodás helyett a sejtek a tápanyag lebontásához szükséges, különböző fehérjék és enzimek replikációjával (szintézisével), illetve a DNS állományuknak a következő szakaszhoz való felkészítésével vannak elfoglalva – azaz a sejtek nem osztódnak és nem pusztulnak el, anyagcseréjük viszont intenzív.

A kísérleti eredményekből tapasztalt vezetőképesség csökkenés is erre utal: az akkomodációs időszakban a sejtek citoplazmájában a kisméretű (nagy mobilitású), pozitív és/vagy negatív töltéssel rendelkező több ezer aminosav kondenzálódik (17. ábra), és egy nagy tömegű (kis mobilitású) és kisebb össztöltésű fehérje/enzim szintetizálódik, tehát összességében a sejtek citoplazmájának, és ezáltal a teljes szuszpenzió vezetőképessége csökken.

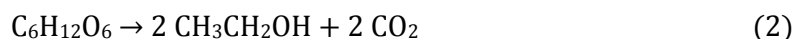


17. ábra. A peptidkötés kialakulása aminosavak kondenzációjával [22]

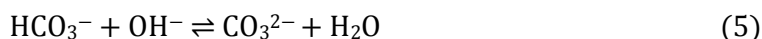
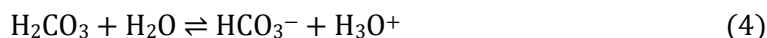
Továbbá megfigyelhető, hogy az elektromos térnek kitett élesztőszuszpenzió konduktivitása gyorsabban és nagyobb mértékben csökken, ami az aminosavaknak az elektromos tér irányába való orientációjával magyarázható, mivel ez megnövelheti a peptidkötések kialakulásának valószínűségét.

A lag fázis végére az adaptálódott sejtek szaporodásnak indulnak, és a sejtszám megtöbbszöröződik, a növekedés exponenciálissá válik, majd egy ideig gyengül az elfogyó szénforrás (szacharóz), nitrogénforrás vagy a felhalmozódó, az anyagcserében termelődő toxikus anyagok miatt. [21] A kísérleti növekedési görbéken szintén megfigyelhetők a *gyorsuló*, az *exponenciális* (log) és a *lassuló szaporodási* szakaszok.

A zavaró 50 Hz-es elektromos térnek kitett mintában a tulajdonképpeni metabolizmus termékek keletkezése / sejtek növekedése és szaporodása kb. 30 perccel hamarabb kezdődik meg (rögtön a konduktivitás csökkenés után), és nagyobb sebességgel folyik le mint a kontroll mintában, melyben csak egy újabb előkészítő fázis után indul be a metabolizmus. A kísérletben az élesztő sejtek számára elérhető egyetlen tápanyag a szacharóz (cukor), amelyet különböző metabolikus útvonalakon (aerob/anaerob légzés) képes lebontani. Mivel a szuszpenzió leülepedésének elkerülése végett argon gáz volt buborékolatva a próbákba, ezáltal biztosítva az anaerob (oxigénmentes) környezetet, a szacharóz többnyire alkoholos erjedés által bomlik le, melynek során etilalkohol és széndioxid keletkezik a (2) reakcióegyenlet szerint:



Mivel sem a szacharóz, sem az etilalkohol nem ionizál vizes környezetben, feltételezhető, hogy a sejtnövekedés / metabolizmus során tapasztalt konduktivitás növekedés nagy mértékben a széndioxid gáz (CO_2) fejlődésnek tulajdonítható. Oldatban a CO_2 reakcióba lép a vízzel és szénsavat képez (3), mely disszociál bikarbonát (4) és karbonát (5) ionokra, így megnövekedik a töltéshordozók száma, és egyben az oldat (szuszpenzió) vezetőképessége is:



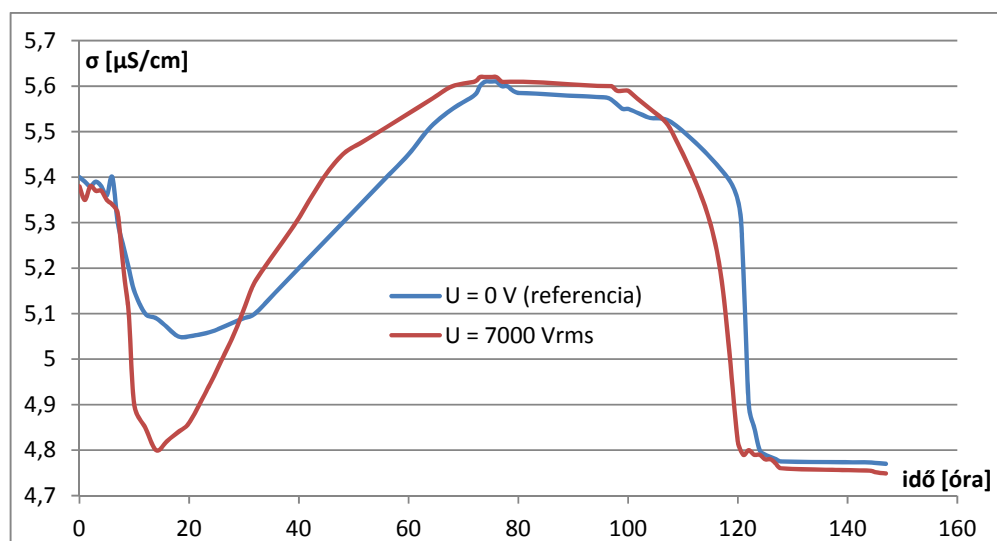
A 14. ábrán bemutatott kísérleti növekedési görbéken megfigyelhető, hogy mivel mindkét próbában limitált az élesztősejtek számára elérhető tápanyag, ezekben idővel beáll az egyensúlyi, vagy *stacionárius* fázis, amely kb. a 150...180. percekig tart. Ekkor a sejtek szaporodása lelassul és megkezdődik az elhalálozásuk, mely az utolsó, *pusztulási* fázisban előtérbe kerül. A grafikonok rávilágítanak arra is, hogy a zavaró elektromos térnek kitett próbában mért maximális, egyensúlyi konduktivitás érték megegyezik a kontroll próbában mért értékkel, majd a lassú csökkenési szakaszban is egymást fedik a görbék, ami, a kezdeti

értékek hasonlóságával együtt, azt bizonyítja, hogy a két próba kezdeti tartalma megegyezett, és az idő közben tapasztalható különbségek a zavaró elektromos térnek tulajdoníthatók.

A 15. ábrából megállapítható, hogy a zavaró egyenfeszültségű elektromos tér hatása a az élesztő fejlődésére nem számottevő. A metabolikus termékek képződése lassúbb (a kezdeti vezetőképesség csökkenés kisebb, illetve a szaporodási fázisban is alacsonyabb értékei vannak mint a referencia reaktorban), ami arra utal, hogy az egyenfeszültségű tér fékezi a sejtek élettani funkcióit.

3.2. Az elektromos terek hatása a feketepénész fejlődésére

Az *Aspergillus niger* spórákkal beoltott tápoldat vezetőképességének időbeni alakulását, a feketepénész metabolizmusának és szaporodásának következtében, a referencia oldatban és az 50 Hz-es elektromos tér jelenlétében, a 18. ábra grafikonjai mutatják be.



18. ábra. Az *Asp. niger* tápoldat vezetőképességének időbeni változása 50 Hz-es elektromos tér hiányában és jelenlétében (7000 Vrms).

A 18. ábrából megállapítható, hogy az 50 Hz-es elektromos térnek kitett penésztenyészet esetén a lappangási idő alatt gyorsabban és nagyobb mennyiségben képződnek nagy molekulatömegű fehérjék és enzimek, ami miatt a növekedési fázis is kb. 10 órával hamarabb tud megindulni. Szintén megfigyelhető, hogy a külső elektromos térnek kitett reaktorban a szaporodási sebesség eleinte nagyobb mint a referencia reaktorban, hogy kb. 70 óra elteltével mindkét reaktorban ugyanaz a stacionárius érték álljon be. Kb. 25 órával később mindkét reaktorban megindul a sejtek elhalálása, a halálzási sebesség szintén a külső térnek kitett reaktorban lévő nagyobb.

4. Következtetések

Az élesztőgomba (*Saccharomyces cerevisiae*) és a feketepénész (*Aspergillus niger*) fejlődése volt tanulmányozva természetes és elektromos térrel zavart táptalajokon. Ennek érdekében a szerző a kutatási célnak megfelelő speciális bioreaktorokat tervezett és készített el, síkpárhuzamos elektródákkal, amelyeket, egy megfelelő feszültségforrásra kapcsolva, egy aránylag állandó térerejű elektromos teret hoznak létre a vizsgált táptalajon. A táptalajra ható elektromos térerő numerikus számítása és modellezése (a síkpárhuzamos elektródákra csatolt feszültség, a bioreaktor geometriája és anyaga, valamint a vizsgált táptalaj fajlagos vezetőképességének és permittivitásának függvényében) az Ansoft Maxwell 14.0 specializált szoftverrel lett megoldva.

Kezdetben az élesztőgomba sejtosztódásának, illetve a biomassa fejlődésének követése mikroszkópos sejtszámlálással történt. Ez egy nagyon időigényes megoldás, ebből kifolyólag a további meghatározásoknál egy gyorsabb módszert alkalmaztam – a táptalaj szuszpenzió fajlagos vezetőképességének folyamatos (in-situ) mérését. A kísérleti eredmények igazolták, hogy a szuszpenzió fajlagos elektromos vezetőképességének időbeni alakulása jó összefüggésben (lineáris) van az egységnyi térfogatú szuszpenzióban levő sejtek számával [sejtszám/cm³].

A komparatív kísérleti meghatározások (referencia – természetes körülmények között és adott elektromos térben) eredményeiből megállapítható, hogy:

- 50Hz-es elektromos térben (kb. 11V/cm), a feketepénész és az élesztő biomassa-fejlődésnek a lappangási (lag) fázisában a metabolizmus/enzimeképződés számottevően felgyorsul, ezért a növekedési sebesség is nagyobb lesz;
- az 50Hz-es elektromos térnek nincs számottevő hatása a stacionárius és az elhalási fázisokban;
- a kb. 40V/cm térerejű egyenáramú elektromos térnek nem volt kísérletileg kimutatható hatása a biomassa fejlődésére.

Köszönetnyilvánítás

A szerző köszönettel tartozik dr. Czumbil Levente villamosmérnöknek, a Kolozsvári Műszaki Egyetem kutatójának, illetve a KME Elektrotechnika és Mérések Tanszékének a numerikus modellezések elvégzésében nyújtott szakmai és logisztikai támogatásért. Ugyanakkor köszönet jár a Kolozsvári Magyar Egyetemi Intézetnek és a Bethlen Gábor Alapkezelő Zrt.-nek a kutatás pénzbeli támogatásáért.

Irodalomjegyzék

- [1] A. A. Marino, R.O. Becker, „Biological Effects of Extremely Low Frequency Electric and Magnetic Fields: a Review”, *Physiol. Chem. & Physics*, 9, pp. 131-142, **1977**;
- [2] L. E. Anderson, „ELF: Exposure Levels, Bioeffects and Epidemiology”, *Health Phys.*, 61, pp. 41-46, **1991**;
- [3] W.R. Hendee, J. C. Boteler, „The Question of Health Effects from Exposure to Electromagnetic Fields”, *Health Phys.*, 66, pp.127-136, **1994**;
- [4] **Lingvay M.**, „Az antropogén eredetű elektromágneses terek szennyező jellege és ezek kihatásai az élővilágra”, *XVI. reál- és humántudományi Erdélyi Tudományos Diákköri Konferencia – ETDK*, Fizika szekció, Kolozsvár, **2013**. május 23-26;
- [5] **M. Lingvay**, C. Stancu, I. Szatmári, I. Lingvay, „Influența câmpului electric de 50Hz asupra permitivității dielectrice a suspensiei apoase de drojdie de bere – The influence of 50Hz electric field to dielectric permittivity of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) suspensions,” *Electronică, Electrotehnică, Automatizări – EEA*, 61 (1), pp. 43-36, **2013**;
- [6] C. Stancu, **M. Lingvay**, I. Szatmári, I. Lingvay, „Influence of 50 Hz Electromagnetic Field on the Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Metabolism,” *The 8th International Symposium on Advanced Topics in Electrical Engineering, CD Proceedings, IEEE Catalog Number CFP1314P-CDR*, <http://ieeexplore.ieee.org>, Bucharest, Romania, May 23-25, **2013**;
- [7] **M. Lingvay**, „Controlul prin câmp electric al reacției de obținere a (S)-(-)-1-feniletanolului prin reducerea 1-feniletanonei, mediată de *Saccharomyces cerevisiae* [Az (S)-(-)-1-feniletanol 1-feniletanon redukálásával történő, *Saccharomyces cerevisiae* által vezetett előállítási reakciójának elektromos térben való vezérlése]”, Szakdolgozat, Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Kémia és Vegyészmérnöki Kar, Kolozsvár, **2013**;
- [8] P. Prioteasa, N. Buruntea, I. Szatmári, **M. Lingvay**, „Studiul coroziunii oțelului carbon în prezența mucegaiului *Aspergillus niger* – Carbon Steel Corrosion Study in the Presence of fungi *Aspergillus niger*”, *Electronică, Electrotehnică, Automatizări – EEA*, in press;
- [9] **Lingvay M.**, Szatmári I., Butoi N., Marinescu V., „Hozzájárulások a gázvezetékeknél használt polietilén mikrobiológiai rongálódásának tanulmányozásához – Contribution to Study of Microbiological Degradation of Polyethylene from the Gas Pipelines”, *Műszaki Szemle*, Nr. 61, pp. 29-33, **2013**;
- [10] Lingvay J., Szatmári I., **Lingvay M.**, Tudosie L., „Az erősáramú kábelek öregedése. Esettanulmány – 5 éves megfigyelések eredményei – Underground power cables ageing.

- Case study – results of 5 year monitoring”, *Korróziós figyelő*, 53, pp. 71-80, **2013**;
- [11] *** IEC 68-2-10 (**1988**) *Basic Environmental Testing Procedures. Part 2: Tests - Test J and guidance: Mould growth*;
- [12] C. Munteanu, V.Țopa, A. Răcășan, C. Păcurar, *Aplicații de modelare numerică în câmp electromagnetic [Alkalmazások elektromágneses térben való numerikus modellezésekre]*, Timișoara: Editura Politehnica, **2013**;
- [13] O.M. Gomaa, N.S. Selim, J.E. Linz, „Biochemical and Biophysical Response to Calcium Chloride Stress in *Aspergillus niger* and its Role in Malachite Green Degradation”, *Cell Biochem. Biophys.*, Volume 65, pp. 413-423, **2013**;
- [14] Fekete-Kertész I., *Számlálókamrás eljárások csíraszám meghatározására*. [Online]. Elérhető: <http://www.mokkka.hu/drupal/keptar/3257> [Hozzáférés dátuma: 2014.04.23];
- [15] *Using a Counting Chamber* [Online]. [Hozzáférés dátuma: 2014.04.23] Elérhető: <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/microscopy/cellcounting.html>;
- [16] Directions for Use. Bright-Line/Dark-Line Counting Chambers [Használati utasítás. Világos/Sötét beosztású számlálókamrák];
- [17] D.D.Y. Ryu, S.O. Lee, R.J. Romani, „Determination of Growth Rate for Plant Cell Cultures: Comparative Studies”, *Biotechnol. Bioeng.* 35, pp. 305-311, **1990**;
- [18] M. Taya, M. Hegglin, J.E. Prenosil, J.R. Bourne, „On-line monitoring of cell growth in plant tissue cultures by conductometry”, *Enzyme Microb. Technol.* 11, pp. 170-176, **1989**;
- [19] K. Hahlbrock, J. Ebel, A. Oaks, J. Auden, M. Liersch, „Determination of specific growth stages of plant cell suspension cultures by monitoring conductivity changes in the medium”, *Planta*, 118, pp. 75-84, **1974**;
- [20] Mészáros S., Laslo É., Szilágyi J., Lányi Sz., „Baktériumos biopreparátumok tanulmányozása és jellemzése a biomassza megközelítő növekedési görbéje alapján”, *Műszaki Szemle*, nr. 59, pp. 16-27, **2012**;
- [21] Kutasi J., *Fermentációs biotechnológia*, **2007**. [Online] <http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tkt/fermentacios/ch01s04.html> [Hozzáférés dátuma: 2014.02.18];
- [22] Nyitray L., Pál G., *A biokémia és molekuláris biológia alapjai*, **2013**. [Online] Elérhető: http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/biokemia_alapjai/index.html [Hozzáférés dátuma: 2014.02.18].