

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

NYUGAT-MAGYARORSZÁGI EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI RENDSZEREK MŰSZAKI INTÉZETE

**„Precíziós Növénytermesztési Módszerek” Alkalmazott
Növénytudományi Doktori Iskola**

Doktori Iskola-vezető:

Prof. Dr. Neményi Miklós, MTA levelező tagja

Tudományos vezetők:

Prof. Dr. Érsek Tibor DSc, egyetemi tanár

Prof. Dr. Neményi Miklós, MTA levelező tagja

A MIKROHULLÁM HATÁSA A PÉKÉLESZTŐRE (*SACCHAROMYCES CEREVISIAERE*)

Készítette:

SZERENCSI ÁGNES

Mosonmagyaróvár
2011

1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉS

1.1. Bevezetés

A közhasználatban lévő mikrohullámú és más készülékek az elektromágneses sugárzás kibocsátása révén olyan hatásokat fejtenek ki a közvetlen biológiai környezetükre, amelyek jó része még nem ismert, illetve egymásnak ellentmondó eredmények és értelmezések szerepelnek a szakirodalomban a nemionizáló elektromágneses (EM) és rádiófrekvenciás (RF) mikrohullámú sugárzás biológiai hatásait, veszélyes jellegét és a különböző felhasználási területeken tapasztalható technológiai előnyeit illetően. E jelenségek kutatása ezért mindenképpen szükségyszerű. Különösen a biológiai hatásokra fontos felhívni a figyelmet, mert azok az egészségre és a közvetlen környezetre nézve veszélyesek lehetnek. Meghatározott mikrohullámú besugárzás véletlen hatásaként káros, vagy a normál körülmények között bejutni képtelen egyéb anyagok transzportálódhatnak a sejtekbe, ami jelentős változásokat okozhat az élő szervezetekben. Biológiai hatás akkor jelentkezik, amikor az elektromágneses tér hatására sejt szinten válasz jön létre. Ezt az élő szervezet vagy érzékeli vagy nem. Ha a gerjesztett oszcilláció meghalad egy határértéket, akkor a sejtmembrán molekulaszervezete és ennek következtében áteresztőképessége is megváltozik. A mikrohullám hatásának objektumai az ionok, illetve a dipólusos kis- és makromolekulák. A besugárzás hatását sejtszinten és az élő biológiai rendszerekben mindenhol jelenlévő folyékony vizes közegeken vizsgáltuk.

1.2. Célkitűzések

Kutatásunk célja a 2,45 GHz frekvenciájú mikrohullámú besugárzás élesztősejtre (*Saccharomyces cerevisiae*), mindenekeelőtt a sejtmembránra történő hatásának, illetve a vízre mint a folyékony biológiai médiumok nélkülözhetetlen alkotórészére gyakorolt hatásának vizsgálata.

Vizsgálatainkkal az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- Hatással van-e a 2,45 GHz frekvenciájú 37 °C konstans hőmérsékletű besugárzás a *Saccharomyces cerevisiae*-re, és esetében kimutatható-e ún. biológiai hatás?
- Milyen változások következnek be az élesztő sejtmembránján, amely az élő sejt transzportfolyamatainak alapvető szabályozója?
- Miben rejlik a 2,45 GHz frekvenciájú folyamatos mikrohullámú besugárzás vizes közegre kifejtett hatása, ill. milyen jellegű változások mennek végbe?

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

A mikrohullámú hatást celluláris és szubcelluláris struktúrákon a NYME-MÉK Biológiai Rendszerek Műszaki Intézetében kifejezetten mikrobiológiai vizsgálatok céljára kialakított feltételek mellett, steril körülmények között kutattuk.

2.1. *Az élesztő (Saccharomyces cerevisiae) besugárzásának vizsgálata*

Mikroorganizmus, törzstenyészet: A vizsgálatokhoz *Saccharomyces cerevisiae* M26 törzsét alkalmaztuk, melyet budafoki ipari sütőélesztőből izoláltunk.

Kísérleti tápoldatos tenyészet: Kísérleti rendszerünket meghatározott optikai denzitású primer tenyészetből inokuláltuk. A primer tenyészetből mindig azonos inokulum mennyiséggel, azonos időpontban oltottunk be a kísérleti lombikokba, így lehetővé vált az egyes besugárzási kísérletek összehasonlíthatósága. A tápoldatos tenyészeteket 37 °C-on rázatva (160 rpm) inkubáltuk.

Konstans hőmérsékletű mikrohullámú besugárzási protokoll: A kísérleti sejt kultúrákat Model MARS[®] (Microwave Accelerated Reaction System, CEM Corporation, Matthews, North Carolina 28106) mikrohullámú berendezésben kezeltük. A besugárzás 2,45 GHz, a teljesítmény szakaszos leadásával 50 Watt (400W 12%-a), 0–45 perc, 37 °C konstans hőmérsékleti, légköri nyomású protokoll szerint zajlott. A kísérleti tenyészetek a növekedés exponenciális fázisának kezdeti szakaszában, azaz az inokulálást követő 120. percben kapták a besugárzást. A mikrohullám nemtermikus hatásának vizsgálatához

állandó 37 °C-os hőmérsékletet biztosítottunk a besugárzás és inkubálás teljes ideje alatt.

A kísérleti tápoldatos tenyészetek inkubálása és a besugárzás hatásainak kimutatása: A sejt kultúrák inkubálását 24 óráig, rázatással (160 rpm), 37 °C-on végeztük. Meghatározott időnként (120 perc) mintát vettünk és megmértük az optikai denzitást. Fénymikroszkóppal megvizsgáltuk a tenyésztési idő egyes szakaszaiban a sejtek morfológiáját, valamint ellenőriztük a kontaminációmentességet.

Más-más mikrohullámú besugárzási időtartam, ill. a tápoldathoz adagolt antibiotikumok (kloramfenikol, gentamicin, neomicin-szulfát) különböző koncentrációinak hatását a következőképpen vizsgáltuk:

Felvettük a besugárzási kísérletekhez használt élesztőtörzs fiziológias növekedési profilját. A kutatás első stádiumában megvizsgáltuk, hogy a péklesztő folyadék kultúráinak normál fiziológias növekedésében okoz-e változást a mikrohullámú sugárzás.

A gyakran előforduló kontamináció megelőzésére a sejt kultúrákhoz széles spektrumú, antibakteriális kloramfenikol, ill. gentamicin, vagy neomicin antibiotikumot adtunk meghatározott koncentrációban. Az antibiotikumos tápoldatban ellenőriztük az élesztő szaporodását besugárzás nélkül, ill. 45 perces besugárzást követően.

Miután kiderült, hogy az egyes antibiotikumok a besugárzás hatására az élesztő szaporodását is gátolják, vizsgáltuk egyrészt a különböző antibiotikum koncentrációk hatását konstans (30 perces) besugárzási időtartam mellett, másrészt pedig a különböző besugárzási időtartam (5–45 perc) hatását konstans antibiotikum koncentrációnál.

2.2. A vizes közeg besugárzásának vizsgálata

A mikrohullám vízbontó hatását a víz elektrolízisének mérésével mutattuk ki. A vizsgálati anyagok azonos térfogatú (200 mL), 1% NaCl-tartalmú vízminták voltak. A mikrohullámú besugárzást FISO MWS-4 hőmérsékletmérő száloptikával ellátott PANASONIC NNF 653 WF háztartási mikrohullámú készülékben végeztük. A besugárzási protokoll: 2.45 GHz, 100W, folyamatos teljesítményleadás, 50 perc, 12 °C – 45 °C. A mikrohullám folyadékmintákra kifejtett hatását az elektrolízis sebességének mérésével határoztuk meg. Ezt Hofmann-voltaméter készülékben, konstans folyadéktérfogatban 24, illetve 12V-os feszültség mellett a besugárzást követően azonnal, 24 h, illetve 48 h elteltével végeztük.

A kezdeti kísérletek során megvizsgáltuk, hogy a mikrohullámmal besugárzott vizes közeg elektrolízise és a bármely fizikai kezeléstől mentes kontrollminta elektrolízise között van-e eltérés.

A mikrohullám nemtermikus hatását két hőközlési módszer, a mikrohullám és a főzőlapon való melegítés közti különbséget összehasonlítva vizsgáltuk úgy, hogy egyik esetben sem engedjük 45 °C-nál magasabbra nőni a hőmérsékletet. A besugárzott és főzőlapon kezelt kontroll mintát egyidejűleg ugyanarról a kiindulási hőmérsékletről azonos időtartam alatt azonos lépésközzel melegítettük, majd megvizsgáltuk közöttük a különbséget.

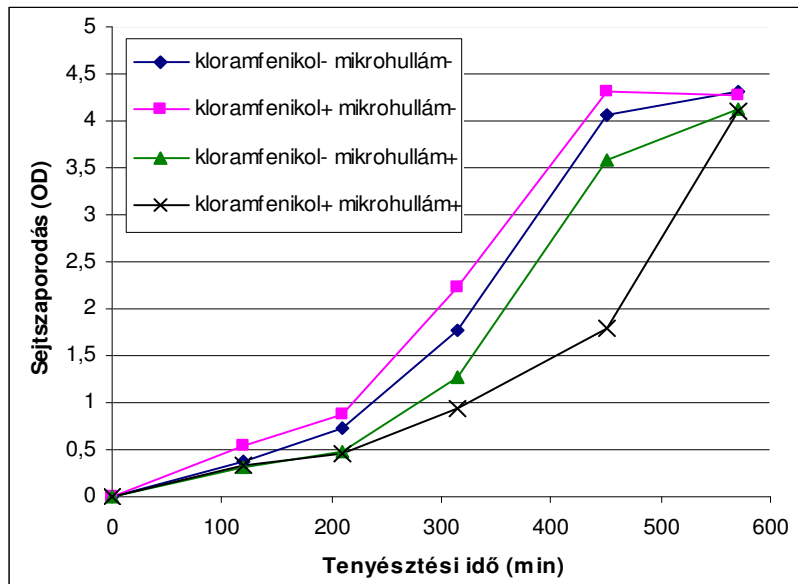
Vizsgáltuk a mikrohullám hatástartamát, tehát hogy a besugarozott minta mennyi ideig őrzi meg a behatástól számítva a mikrohullám által okozott változást. A vízmintákat a besugárzást követően 24, illetve 48 óráig szobahőmérsékleten tartottuk, majd elektrolízist végeztünk.

3. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

3.1. A 2,45 GHz mikrohullám hatása az élesztőgombára

Az optimalizált besugárzási eljárás (2,4 GHz, 37 °C, 50 Watt, 5–45 perc) lehetővé tette a *Saccharomyces cerevisiae* tápoldatos tenyészeinek zavartalan növekedését és nem károsította az élesztősejteket. Így egy stabil kísérleti sejtrendszert hoztunk létre, amellyel a besugárzásokat stabil körülmények között, biztonsággal végezhetjük.

Az élesztőtenyészetek bakteriális kontaminációjának megelőzése, ill. kiküszöbölése végett széles spektrumú antibakteriális antibiotikumot, kloramfenikolt adtunk a tápoldathoz. Mivel a kloramfenikolnak normális körülmények között nincs antifungális hatása, nem kellett attól tartanunk, hogy gátolja az élesztő szaporodását. Azt tapasztaltuk azonban, hogy amennyiben a besugárzás ideje alatt a kloramfenikol jelen volt a sejt kultúrában, szaporodásgátló hatás lépett fel (1. ábra). Ez a hatás besugárzás hiányában értelemszerűen elmaradt. A kloramfenikol jelenlétében végzett besugárzásos vizsgálat többszöri ismétlése alapján biztonsággal kijelenthető, hogy a kísérlet reprodukálható és a megismert jelenség valódi. Elmondható tehát, hogy egy véletlen körülmény a szakirodalomban ezidáig nem közölt, meglepő jelenség feltárásához vezetett. Más antibakteriális antibiotikumokkal – az aminoglikozid típusú gentamicinnel és neomicinnel szintén kimutattunk hasonló jelenséget. Bizonyítottuk tehát, hogy az említett antibakteriális antibiotikumok mikrohullámú besugárzás hatására képesek antifungális hatást kifejteni (1. ábra).



1. ábra. A 45 perces mikrohullámú besugárzás és a kloramfenikol (20 mgL^{-1}) együttes hatása a tápoldatos élesztőtenyészetek szaporodására

Megállapítottuk továbbá, hogy a szaporodásgátló hatás az antibiotikumkoncentráció függvényében nő. A mikrohullám hatásait különböző besugárzási idők esetén, de fix besugárzási paraméterek (2,4 GHz, $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 50W) mellett konstans antibiotikum koncentrációt tartalmazó tápoldatos tenyészeteken vizsgáltuk. Mindhárom vizsgált antibiotikum esetén kimutattuk, hogy bizonyos besugárzási idő után (40 perc) nem nő a mikrohullám gátló hatása.

Tisztáztuk, hogy a mikrohullámú sugárzás érzékenységet indukált az élesztőtörzsben a vizsgált antibakteriális antibiotikumokkal szemben. Az eltérő besugárzási időtartamok és a tápoldatok más-más antibiotikumkoncentrációi befolyásolják az élesztősejtek antibiotikum felvételét és az okozott hatás mértékét. A kloramfenikol, gentamicin és neomycin támadáspontja a prokariotikus riboszómák. Ilyen prokarióta típusú riboszómák eukariotikus sejtekben a mitokondriumokban vannak. Ennek magyarázata az endoszimbionta elméletben rejlik, nevezetesen:

az antibakteriális antibiotikumok olyan protocelluláris típusú proteinszintézis-gátló anyagok, melyek a prokariotikus típusú membránokon képesek átjutni. Tehát a prokarióta organizmusok sejthártyáján és emellett a mitokondrium membránján is könnyen átjutnak, mert ez a sejt szerv az őt körülvevő membránnal együtt prokariotikus eredetű. Normál fiziológiai körülmények között a vizsgált antibiotikumok az eukariotikus élesztősejtek ellen nem hatásosak, mert azok sejtjeibe nem tudnak bejutni. Esetünkben azonban gátolta az élesztősejtek szaporodását.

Az újonnan megismert jelenséget a besugárzás által kiváltott reverzibilis membrán permeabilitás változás okozhatja. Ennek következtében az élesztősejtek mitokondriumaiba bejutni képes antibiotikum a proteinszintézis gátlásával a sejt energiaellátásának bénítását okozhatja. A mikrohullám feltehetőleg átmeneti változást idéz elő a sejtmembránban úgy, hogy átmenetileg megváltoztatja a sejthártya kettős lipidrétegét alkotó foszfolipid-molekulák motilitását. Ennek oka, hogy a molekulák láncában rotációt, azaz forgó mozgást kelt. Ez a foszfolipid-molekulák közt a pórusok képződését fokozza. Kijelenthető tehát, hogy e folyamatokban biológiai értelemben vett hatás érvényesül.

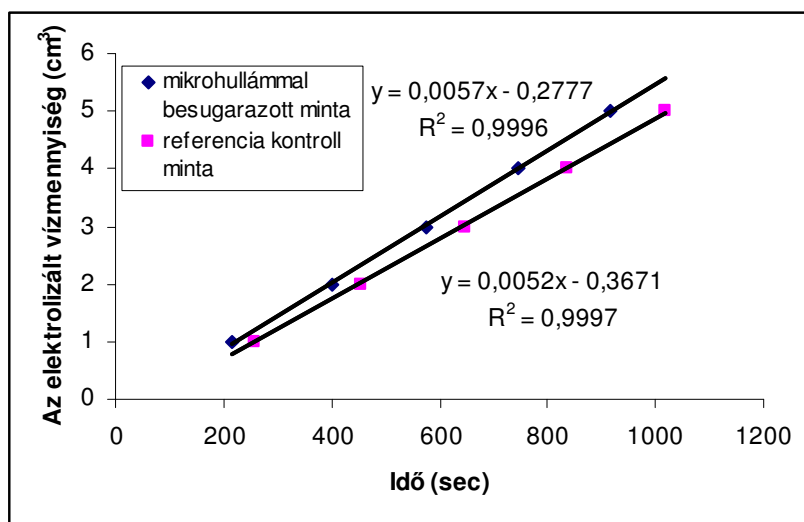
Az általunk kifejlesztett rendszer önmagában alkalmas eszköz a mikrohullámú sugárzás biológiai hatásainak vizsgálatára.

Az alkalmazott besugárzási protokoll hatékony eszköze lehet olyan molekulák sejtbe történő bejuttatásának, melyeket normál fiziológiai körülmények között a sejtek nem vesznek fel.

A megfigyelt jelenség hátterében lévő mechanizmus, a sejtben bekövetkező változások pontosabb megértéséhez és tisztázásához további kutatás szükséges.

3.2. A 2,45 GHz mikrohullám hatása a vizes közegre

A dipólusos tulajdonságú vízmolekulára a nemionizáló sugárzás hatással van, amit mérni tudunk. 24 V alkalmazása mellett egyértelmű különbség (13%) volt a mikrohullámmal besugarazott NaCl-oldat és a referencia kontrollminta elektrolízisének sebesség értéke között (2. ábra).



2. ábra. A besugarazott és a referencia kontrollminta (besugárzásmentes, melegítésmentes) elektrolízisének sebessége

A besugarazott minta elektrolízise sebessége 12V feszültségnél 10%-kal nagyobb volt, mint az ugyanolyan melegítési paraméterek mellett, főzőlapon melegített kontrollminta, ami igazolja a nemtermikus hatást.

A besugarazott minta elektrolízise sebessége a besugárzás utáni 24., illetve 48. órában is nagyobb volt a kontrollmintákénál. A kísérletek alapján a víz képes volt megőrizni az alacsony intenzitású mikrohullám hatását 48 órával a besugárzást követően.

A vizes közegre irányuló vizsgálatok eredményei alapján összességében a mikrohullámmal besugarazott minta elektrolízise egyértelműen gyorsabb, mint akár a főzőlapon melegített, akár a fizikai kezeléstől mentes minták esetében.

Összefoglalásként elmondható, hogy a mikrohullám hatással van a különböző anyagok közül a vizes közegre is. A vízmolekulára – annak dipólusos jellege, inhomogén töltéeloszlása miatt – a nemionizáló sugárzás hatással van. A mikrohullám által indukált hatás a besugárzást követően nem szűnik meg azonnal, hanem egy bizonyos ideig képes fennmaradni. A vízmolekula bizonyos besugárzási paraméterek mellett feltehetően orientált struktúrát hoz létre, amit bizonyos ideig megőriz, majd feltehetően reorganizálódik. A víz az anyagok alapvető és nélkülözhetetlen közege, így jelenléte közvetett hatással lehet minden mikrohullámmal besugarazott anyagban.

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Az új kutatási eredmények a következőkben foglalhatók össze:

1. A WHO (*World Health Organization*) és az ICNIRP (*International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection*) által engedélyezett és közhasználatban lévő mikrohullámú sugárzásoknak bőven vannak – kedvező vagy éppen kedvezőtlen – felderítetlen hatásaik. Jelen munka során egy eddig ismeretlen jelenséget figyelhető meg.
2. A kísérletes úton optimalizált besugárzási protokoll (2,45 GHz, 37°C, 50W, 0–45 perc időtartam) alkalmazásával a mikrohullám egy sajátos biológiai hatása bizonyítható élesztőtenyészeteken. Megállapítottam, hogy az alkalmazott konstans hőmérsékletű, nemtermikus mikrohullámú sugárzás a *Saccharomyces cerevisiae* szaporodását nem gátolja.
3. A besugárzás hatására bizonyos molekulaméretű és tulajdonságú anyagok transzportálódhatnak a sejten kívüli térből az élesztősejtekbe. Az alkalmazott besugárzási protokoll hatékony eszköz olyan molekulák élő sejtbe történő bejuttatásának, melyeket normál fiziológiai körülmények között a sejtek nem vesznek fel. A hatás monitorozására a *S. cerevisiae* esetében kis molekulatömegű antibakteriális antibiotikumok: a kloramfenikol, a gentamicin és a neomycin alkalmasnak bizonyultak.

4. A besugárzás és az élesztősejteket normál körülmények között nem gátló antibakteriális antibiotikumok együttes hatásaként jelentős szaporodásgátló hatást mértem. Előzmények hiányában a megismert jelenség legvalószínűbb oka az, hogy az élesztősejt plazmamembránjának átjárhatósága besugárzás hatására tranziensen és reverzibilisen megváltozik. A kidolgozott kísérleti rendszer alkalmasnak tűnik a mikrohullámú sugárzás különböző biológiai hatásainak tanulmányozására.

5. A különböző vizes közegek besugárzásakor a mikrohullám hatással van a vízre is. Elektrolízis útján mérhető, hogy a víz olyan hordozó közeg, amely a sugárzás hatására fellépő változást bizonyos ideig, akár 48 órán át képes megőrizni. Bizonyítottam, hogy ennek oka nem hőközlési folyamat, hanem a mikrohullám hatása.

6. Meghatározott hőmérséklettartományon belüli besugárzás és a hagyományos melegítés összevetése alapján a vizes közegekben okozott változás szintén a 2,45 GHz mikrohullám nemtermikus hatására következik be. Bizonyítottan létezik tehát a mikrohullám termikus hatása mellett egy nemtermikus hatás is. A mikrohullámú sugárzás okozta változások molekuláris mechanizmusainak pontos megértéséhez és tisztázásához további kutatás szükséges.

5. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

Szerencsi Á., Lakatos E., Kovács A. J., Neményi M. (2009): Non-thermal effect of microwave treatment on enzyme suspensions Part 1.: Water electrolysis Review of Faculty of Engineering, *Analecta Technica Szegedinensina*, Szeged, 2009, Norma Nyomdász Kft. Kiadó és Nyomda, ISSN: 1788-6392, pp. 58-62.

Lakatos E., Kovács A. J., **Szerencsi Á.**, Neményi M. (2009): Non-thermal effect of microwave treatment on enzyme suspensions Part 2.: Cellulase enzyme activity, Review of Faculty of Engineering, *Analecta Technica Szegedinensina*, Szeged, 2009, Norma Nyomdász Kft. Kiadó és Nyomda, ISSN: 1788-6392, 63, pp. 63-68.

A. Szerencsi, J. Erdei, A. Kovacs, E. Lakatos, M. Neményi (2010): Effect of Microwave Irradiation on Aminoglycosid Antibiotic Sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae*, *Acta Agronomica Óváriensis* 2010/2, vol. 52. No. 2., pp. 3-8.

TUDOMÁNYOS KONFERENCIÁK

Neményi M., Lakatos E., Kovács A. J., **Szerencsi Á.** (2008): Mikrohullámú kezelés hatása a celluláz enzim aktivitására. MTA AMB XXXII. Kutatási és Fejlesztési Tanácskozás. Gödöllő. Az előadások és konzultációs témák tartalmi összefoglalói. 76. p.

Neményi M., Lakatos E., Kovacs A., **Szerencsi Á.** (2008): The effect of microwave treatment on cellulase enzyme activity. EurAgEng-International Conference on Agricultural Engineering, Hersonissos, Crete, Greece, 2008 06 23-25. Book of Abstracts-Agricultural&Biosystems Engineering for a Sustainable World, p. 06, Conference Proceedings CD

Neményi M., Lakatos E., Kovács A.J., **Szerencsi A.** (2008): The effect of microwave treatment on baker's yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*). (Mikrohullámú kezelés hatása az élesztősejtekre (*Saccharomyces cerevisiae*.) XXXII. Óvári Tudományos Nap,

Agrárműszaki Kutatási és fejlesztési szekció, 2008. 10. 9., Mosonmagyaróvár, Hungary, Előadások és poszterek összefoglaló anyaga, NYME University of West Hungary, Conference CD, ISBN: 978-963-9883-05-5

Lakatos E., Kovács A.J., **Szerencsi A.**, Neményi M., (2008): The non thermal effect of microwave irradiation on cellobiase enzyme activity. (Mikrohullámú besugárzás nem termikus hatása a cellobiáz enzim aktivitására.) XXXII. Óvári Tudományos Nap, Agrárműszaki Kutatási és fejlesztési szekció, 2008. 10. 9., Mosonmagyaróvár, Hungary, Előadások és poszterek összefoglaló anyaga, NYME University of West Hungary, Conference CD, ISBN: 978-963-9883-05-5

Lakatos, Dr. Erika; Kovács Dr. Attila József; **Szerencsi Ágnes**; Neményi, Dr. Miklós (2009): Non-thermal effect of microwave treatment, Synergy and Technical Development International Conferences in Agricultural Engineering, Gödöllő, Hungary 2009.08. 30.- 09. 03., 34.p.

Szerencsi Á., Neményi M. (2009): A mikrohullámú kezelés hatása az élesztősejtekre (*Saccharomyces cerevisiae*). FVM-MTA Fiatal kutatók az élhető Földért, Budapest, 2008. november 24. Fiatal agrárkutatók az élhető Földért. 2009, Budapest, Szaktudás Kiadó. ISBN: 978-963-9935-02-0, 74. p.

A. Szerencsi, J. Erdei, A. Kovacs, E. Lakatos, M. Neményi (2010): Effect of Microwave Irradiation on Antibiotic Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae*, 7th International Conference of PhD Students, University of Miskolc, Hungary, 8-13 August 2010, Conference Proceedings CD, ISBN 978-963-661-935-0 Ö, ISBN 978-963-661-940-4 Book of Abstracts, p. 21.

J. Erdei, **A. Szerencsi**, A. Kovacs, E. Lakatos, M. Neményi (2010): Effect of 2,4 GHz Microwave Irradiation on Aminoglycosid Antibiotic Uptake of *Saccharomyces cerevisiae* (A 2,4 GHz Mikrohullámú besugárzás hatása a *Saccharomyces cerevisiae* aminoglükozid antibiotikum felvételére) XXXIII. Óvári Tudományos Nap, Agrárműszaki Kutatási és fejlesztési szekció, 2010. 10. 07., Mosonmagyaróvár, Hungary, Előadások és poszterek összefoglaló anyaga, NYME University of West Hungary, Conference CD, ISBN: 978-963-9883-55-0