

NAGYFREKVENCIÁS TÉR ÉS ULTRAHANGOS BESUGÁRZÁS HATÁSA AZ AZOTOBAKTER N-KÖTŐ KÉPESSÉGÉRE*

HELMECZI BALÁZS—NAGY JÁNOS

Agrártudományi Egyetem, Debrecen

Az utóbbi évtizedekben igen elterjedtek azok a vizsgálatok, amelyek révén az egyes szerzők azt igyekeznek kideríteni, hogy a különböző mikroorganizmusok miként reagálnak olyan fizikai behatásokra, mint a nagy dózisú rádióaktív besugárzás, a röntgen-, az ultrahang-, ultrahő-, neutron- és más elemi részecske besugárzása, valamint erős elektromos és mágneses terek.

Ilyen vizsgálatok során vált ismeretessé, hogy szuszpenzióban besugárzott különböző baktériumtörzsek — 10 watt/cm^2 feletti — ultrahang besugárzás hatására elpusztulnak, testük széttöredezik. Az ide vonatkozó első eredményeket WARNECKE (1953), BERGMANN (1954), STELTER (1956) részletesen összefoglalta. Kisebb intenzitás, illetve ultrahang terhelés esetén viszont baktériumokon és főleg baktériumspórákon végzett inszonáció esetén megváltozott morfológiai és fiziológiai tulajdonságokat, sőt fokozott növekedést és stimuláló hatást is tapasztaltak [HOFFMANN—HENSCHER (1955), SYNOWIEDZKI—TOPA—BOLDOK (1957), BERGER—CURRAN (1960), KNAYSI—CURRAN (1961)].

Hasonló megfigyelések adódtak — mint ez a szakirodalomból ismeretes — a gombák, illetve gombaszuszpenziók ultrahangos besugárzásánál is; vagyis kis dózisok — $2\text{--}2,5 \text{ watt/cm}^2$ — és rövid, mindössze néhány perces besugárzási idő a gombák szaporodását és növekedését serkentette [WOLTERS (1958)]. Nagy dózisok — 20 watt/cm^2 és $10\text{--}30$ percig — viszont intenzív letalitást, illetve fungicid hatást eredményeztek.

Viszonylag kevés közlemény található a nagyfrekvenciás elektromágneses terek mikroorganizmusokra gyakorolt hatását illetően. [NELSON—WHITNEY (1960), TEIXERA—PINTO (1960), BURTON (1949).]

A fenti körülmények, valamint az, hogy a szakirodalomból egyáltalán nem ismerünk a talajbaktériumokra vonatkozóan vizsgálatokat sem az ultrahang, sem a nagyfrekvenciás elektromágneses tér hatásaival kapcsolatban, indított bennünket a fenti probléma kísérleti vizsgálatára. Kiindulási célunk az volt, hogy megvizsgáljuk az *Azotobacter chroococcum* törzsek viselkedését a fenti két fizikai behatásra, s ennek során megállapítsuk a nitrogénkötés esetleges megváltozását, illetve a letalítás határát.

* Előadás a Talajbiológiai Tudományos Ülésen. Debrecen. 1973. szeptember 4.

Kezdeti vizsgálatainkat a letalitás-határ megállapítása céljából nagyobb teljesítményekkel végeztük, a kezelést kísérő hőhatás alapos mesterséges lecsökkentése mellett.

A kísérletek anyaga és módszere

1. A vizsgálatok céljára az I. táblázatban feltüntetett *Azotobacter chroococcum* törzseket használtuk fel:

I. táblázat

Sor-szám	Származási hely	A talaj	
		típus	altípus
1.	Pallagpuszta (erdő)	b. erdő	rb
2.	Pallagpuszta (szántó)	b. erdő	rb
3.	Debrecen (szántó)	kilúgozott csern.	—
4.	Hortobágy (szántó)	sz. csák. sz. ec.	k. sz.
5.	Hortobágy (szántó)	r. szolonyec	közép.
6.	Csehszlovákia		
7.	Csehszlovákia		
8.	Románia		
9.	Szovjetunió		

1—5: Saját izolálás (1954—1958).

6—9: Szegi J. bocsátotta rendelkezésre (1960).

2. Az ultrahang besugárzást Kretz gyártmányú, közel 9 cm²-es aktív sugárzó felületű maximálisan 3 watt/cm² teljesítményű ultrahang-generátorral 800 kc/s frekvencián az adófej közel-, illetve távolterében végeztük az erre a célra speciálisan kialakított besugárzó edényben, amelybe a baktériumot fiziológiás NaCl szuszpenzióban vittük be. A hengeres besugárzó edényt a rárogzított gumimembránnal együtt előzetesen fél órán át sterilizáltuk.

A közelteres besugárzás esetén a besugárzó edény közvetlenül az adófejre került. Az adófej és az edény közötti csatolást desztillált vízréteg biztosította, amely a gumimembránnal együtt gyakorlatilag veszteségmentes ultrahang-csatolást tett lehetővé.

A távolteres besugárzást desztilláltvízes csatolással oldottuk meg. A távolterben történő besugárzással a jobb energia-homogenitás biztosítása volt a célunk. A távolteret, illetve a besugárzás távolságát (d) a $k \approx D^2/4l$ összefüggés figyelembevételével állapítottuk meg úgy, hogy $d > k$ legyen (D a sugárzófej átmérője, k a közelter hossz). A többrétegű csatoló közeg itt észrevehető abszorpciót eredményezett és méréseink szerint jó energia-homogenitás volt elérhető, de az ultrahang teljesítmény 1—1,2 watt cm²-re csökkent le. Így a távolterben hosszabb időtartamú besugárzások váltak szükségessé. Számottevő melegeedés sem az egyik, sem a másik esetben nem volt tapasztalható. Minden besugárzás a generátor maximális teljesítményén történt, és vizsgálatainkban csak az időtartamot változtattuk.

3. A nagyfrekvenciás besugárzást két — erre a célra készített — ultrarövid hullámú adótróda oszcillátor (OT-100 és OQ-151/3000) megfelelő méretű tekercseinek belsejében végeztük. A kisebb teljesítményű (OT-100) önvezérelt kapacitív visszacsatolású oszcillátor $f = 35$ Mc/s frekvencián és $U_a = 1200$ V anódfeszültségen $P = 100$ watt URH-teljesítmény leadására volt képes. Az üzemi feltételek lehetővé tették a kisebb teljesítmény esetén $U_a = 900$ V anódfeszültségen történő üzemeltetést is.

A nagyobb teljesítményű oszcillátor $f = 29$ Mc/s feszültségen $P = 250$ watt teljesítmény leadására volt képes. A nagyfrekvenciás teljesítmény az anódfeszültség csökkentésével itt szintén csökkenthető volt.

A baktériumtenyészetet 25 ml fiziológiás NaCl oldatban szuszpendálva, üvegből készült és előzetesen sterilizált besugárzó edényekbe öntöttük, amelyeket az egyes oszcillátor tekercsek belsejébe helyeztünk. A termelt hő elvezetéséről léghűtéssel, illetve szükség esetén előzetes folyadékkihűtéssel gondoskodtunk. Így elérhető volt, hogy az egyes minták hőmérséklete jelentősen nem emelkedett.

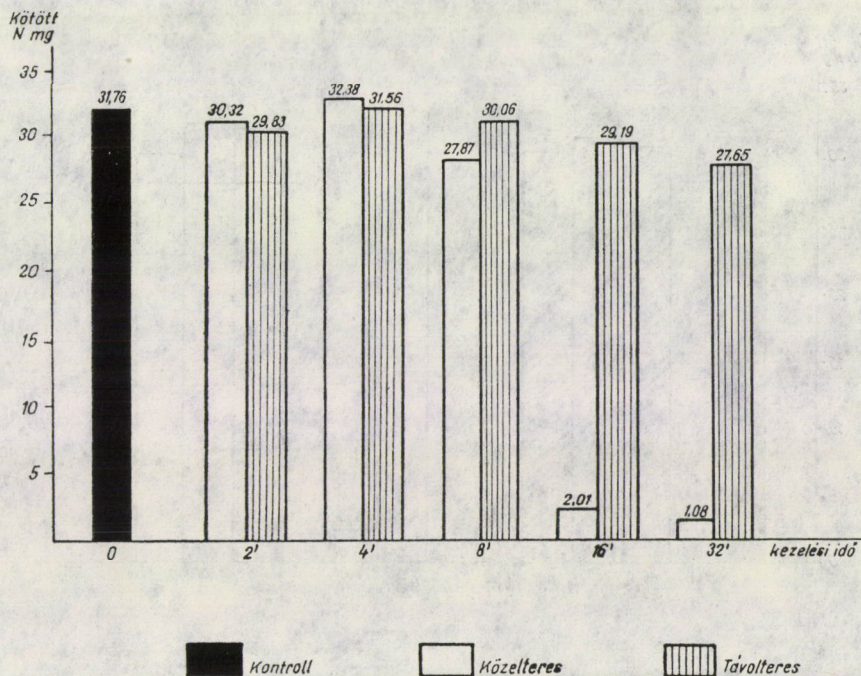
4. Az ultrahangos (közel- és távolteres), illetve nagyfrekvenciás besugárzást egyformán 24 órás tenyésztéssel végeztük. A kezelésnek alávetett *Azotobacter chroococcum* törzseket többszöri átoltással Fjodorov-féle N-mentes ferdeagaron neveltük elő. A fiziológias NaCl oldatban szuszpendált tenyészet csíraszámát Thoma-kamrával és POCHON (1958) szerint határoztuk meg, s az értékelés során az utóbbiak szerint mért adatokat vettük figyelembe.

A törzsek szuszpenziójából a kezelés után közvetlen 300 ml-es Erlenmayer lombikba helyezett 99 ml Fjodorov-féle folyékony N-mentes táptalajra 1 ml-t inokuláltunk és az inkubálás 28 °C-on 4 hétig történt.

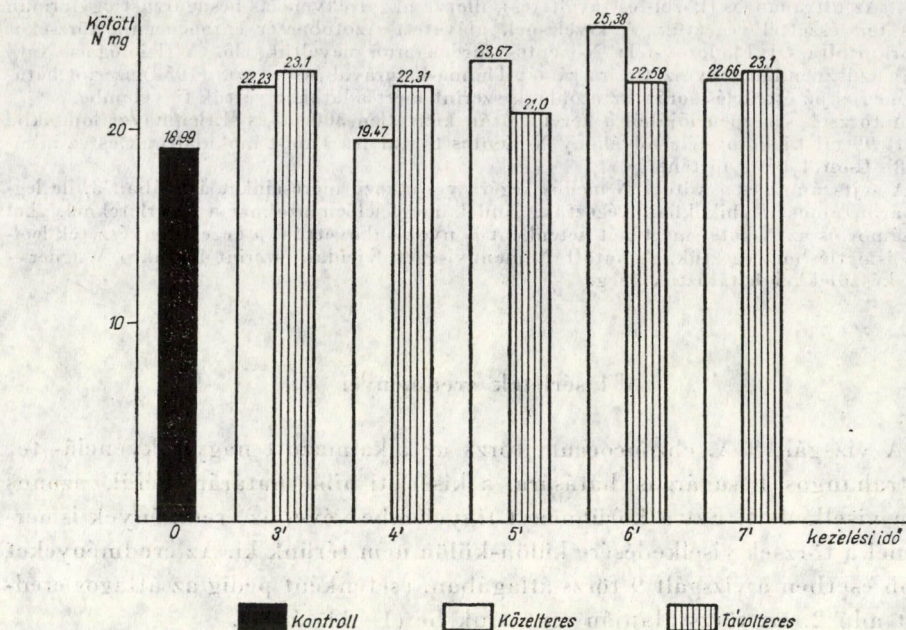
A sejtszámra és a kötött N mennyiségére vonatkozó méréseinket általában 3, de legálább párhuzamos lombikokban végeztük. Ennek megfelelően azoknál a kísérleteknél, ahol a sejtszámot és az N-kötés mértékét hetenként is nyomonkövettük, a kezelt tenyészetek leoltását 8 ismétlésből végeztük. A kötött N mennyiségét Kjeldahl szerint félmikro Wagner—Parnas készülékkel határoztuk meg.

A kísérletek eredményei

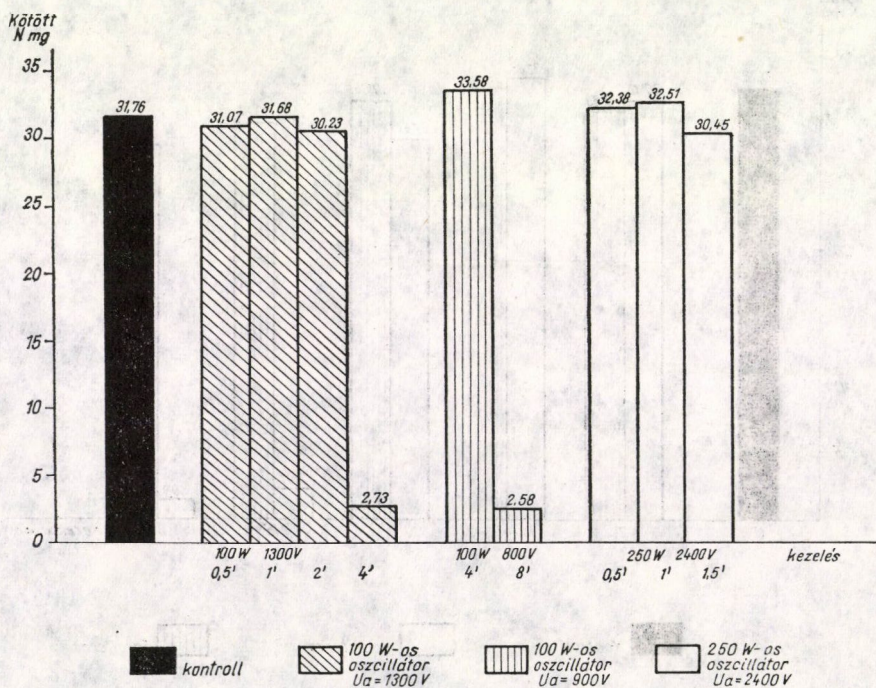
A vizsgált 9 *A. chroococcum* törzs az alkalmazott nagyfrekvenciás tér és ultrahangos besugárzás hatására, a kísérleti hiba határán belül, azonos módon viselkedett. Ezt a körülményt figyelembe véve, az eredmények ismeretetésénél a törzsek viselkedésére külön-külön nem térünk ki. Az eredményeket legtöbb esetben a vizsgált 9 törzs átlagában, esetenként pedig az átlagos eredményt adó 2. sz. törzs alapján mutatjuk be (1—11. ábra).



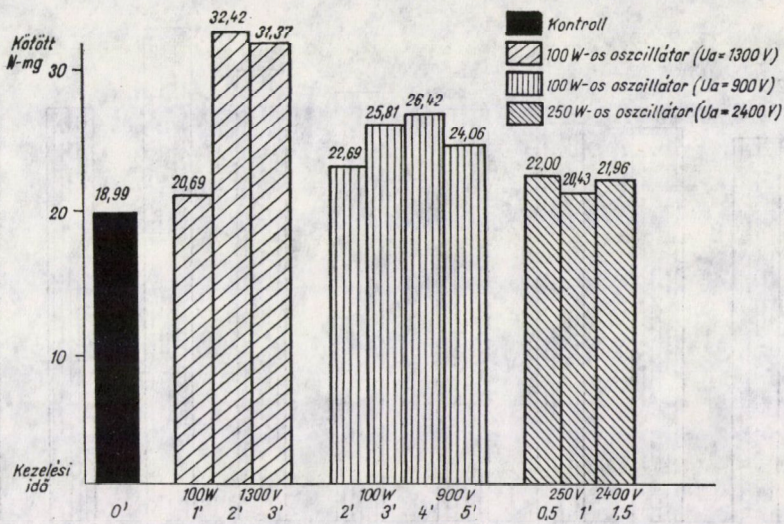
1. ábra. Közel- és távolteres ultrahang besugárzás hatása az azotobakter törzsek N-kötő képességére



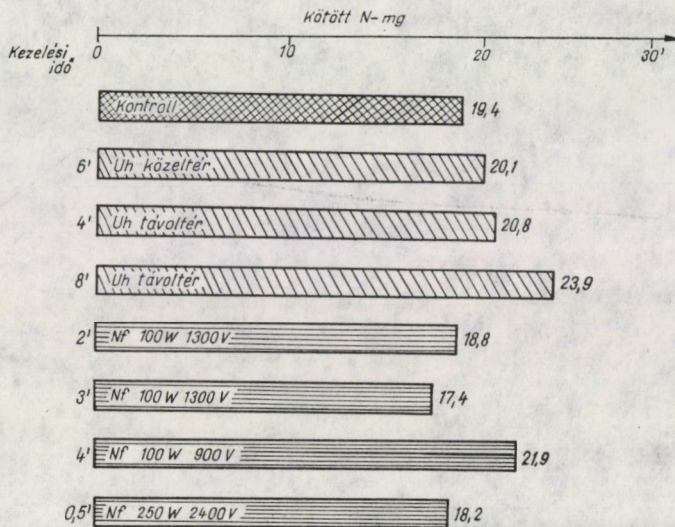
2. ábra Közel- és távolteres ultrahang besugárzás hatása az *Azotobacter chroococcum* törzsek N-kötő képességére



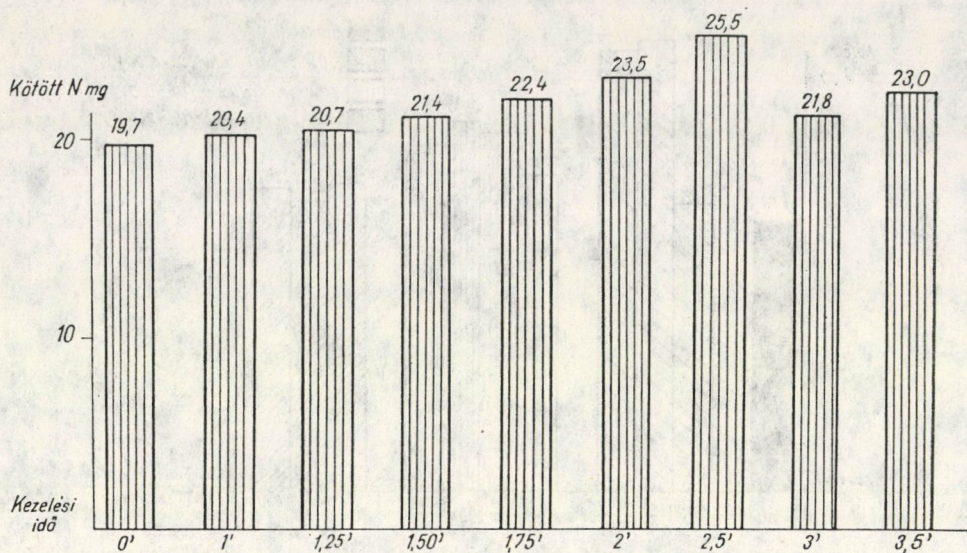
3. ábra. Nagyfrekvenciás kezelés hatása az azotobakter törzsek N-kötő képességére



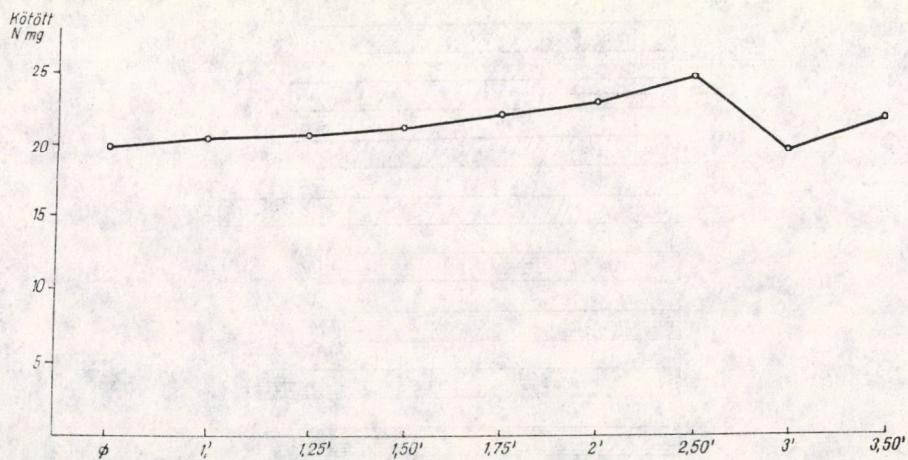
4. ábra. Nagyfrekvenciás kezelés hatása az *Azotobacter chroococcum* törzsek N-kötő képességére



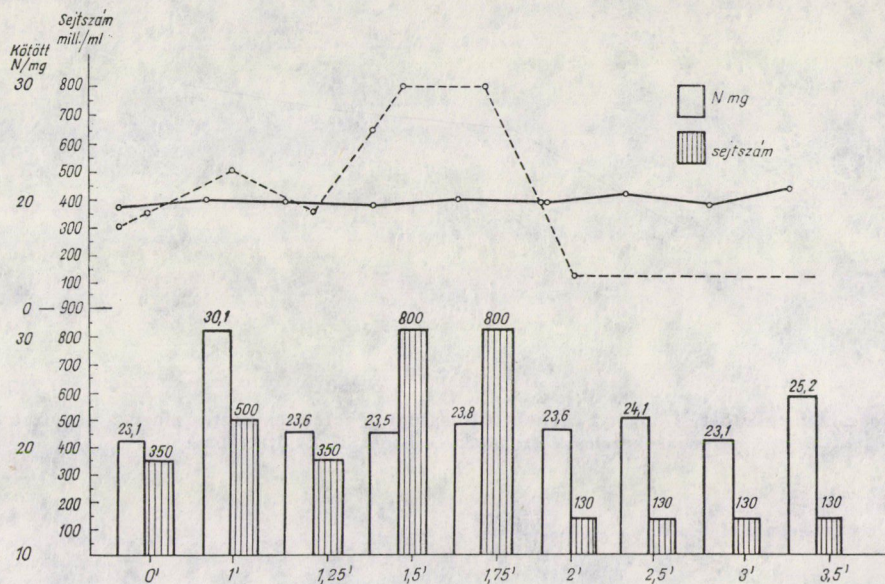
5. ábra. Ultrahang és nagyfrekvenciás besugárzás utóhatása az *azotobakter* törzsek N-kötő képességére



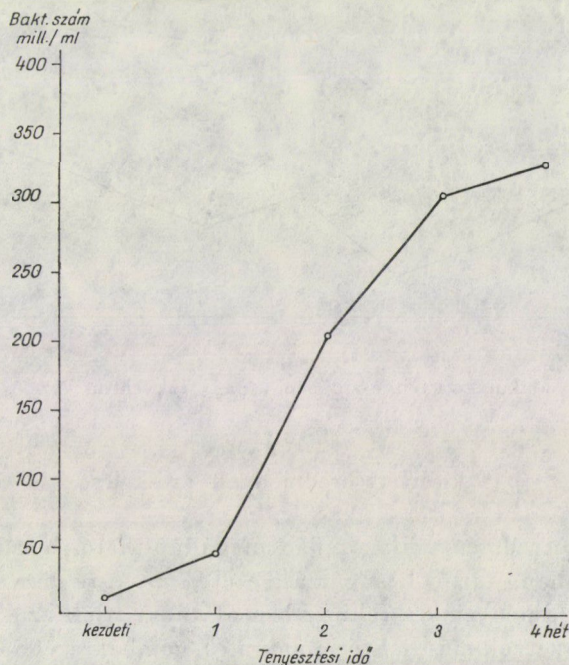
6. ábra. Nagyfrekvenciás kezelés hatása az azotobakter törzsek N-kötő képességére (100 W-os oszcillátor $U_a = 1300$ V)



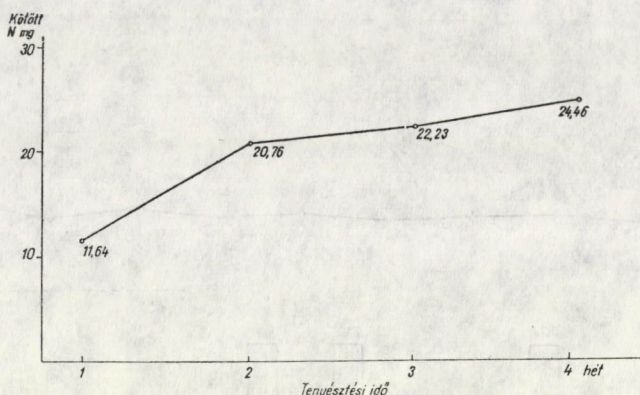
7. ábra. Nagyfrekvenciás kezelés hatása az *Azotobacter chroococcum* törzsek N-kötő képességére (100 W-os Oszcillátor $V_a = 1300$ V)



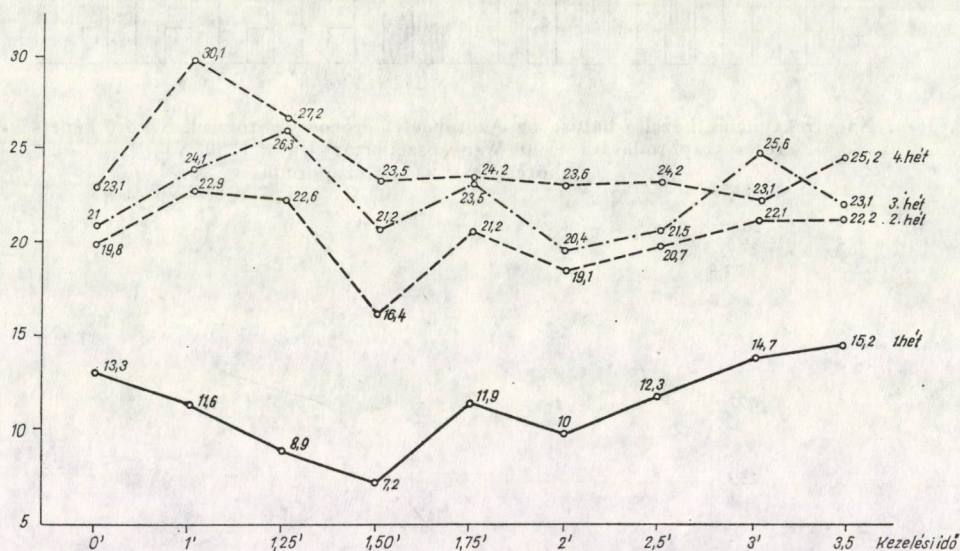
8. ábra. Nagyfrekvenciás kezelés hatása az *Azotobacter crococcum* törzsek N-kötő képességére és szaporodására (100 W-os oszcillátor $U_a = 1300$ V)
 ————— N-kötés, — — — — szaporodás



9. ábra. Az azotobakter sejtszám-változása a 4 hetes tenyésztés idején, a nagyfrekvenciás kezelések (törzsek és ismétlések) átlagában



10. ábra. A megkötött N mennyiségének változása a 4 hetes tenyésztés alatt, a nagyfrekvenciás kezelések (törzsek és ismétlések) átlagában



11. ábra. Az N-kötés alakulása a tenyészidőben, a nagyfrekvenciás kezelés időtartama szerint

A kísérleti eredmények értékelése

A kísérleti eredményeink alapján megállapítható, hogy elegendő nagy intenzitású ultrahang tartós besugárzása esetén az A.-re nézve nagyfokú letalitást mutat. Eredményeink e tekintetben alátámasztják azokat az adatokat, amelyeket más szerzők más baktériumokra és gombákra vonatkozóan kaptak [WARNECKE (1953), BERGMANN (1954), STELTER (1956)]. Ugyanakkor a rövidebb időtartamú ultrahang behatás főként a N-kötésre stimulálóan hatott.

Az azotobaktereknek a tartós ultrahang besugárzás következtében mutatkozó pusztulását HOFFMANN és HENSCHÉL (1954) és mások nyomán azzal magyarázhatjuk, hogy a szuszpenzióban fellépő mechanikai hatások (az intenzív nyomászívás hullámok, illetve a cavitáció) roncsolást és plasmolysist váltanak ki és a baktériumok testét széttörik. Ez a hatás — mint azt kísérleteink is mutatták — a besugárzás időtartamával fokozódik és feltételezzük, hogy kísérleteinkben is bekövetkezett.

Nem végeztünk ugyan olyan hosszú időtartamú besugárzást, amellyel az egész tenyészet elpusztítható lett volna, de ismeretes [HOFFMANN—HENSCHÉL (1955)], hogy 8 watt/cm² intenzitás esetén 45 perces besugárzás után a tenyészetben élő baktérium nem volt található. (Megjegyezzük, hogy az idézett vizsgálatok *Bac. subtilis*-re vonatkoznak.) A közel- és távolterés ultrahangos besugárzás hatásai közötti differenciát azzal magyarázhatjuk, hogy a köztér esetén az intenzitás jelentős csökkenés nélkül átvihető a baktérium-szuszenzióra. A távolterés kezelés esetén viszont — mint ezt ellenőrző méréseink is bizonyítják — az intenzitás az eredetinek a 40—50%-ára csökken.

A közel- és távolterés ultrahangos besugárzás esetén az N-kötésben mutatkozó növekedést — amely főleg a rövidebb kezelési időhöz tartozott — azzal magyarázhatjuk, hogy a szonikus oszcilláció megnöveli a sejtek permeabilitását anélkül, hogy egyéb tulajdonságaikat és növekedésüket károsítaná [KNAYSI—CURRON (1961)].

Megjegyezzük végül, hogy az ultrahang besugárzással kapott mérési eredményeink más szerzőknek egyéb mikroorganizmusokkal végzett vizsgálataival, illetve baktériumokra és gombákra vonatkozó adataival összhangban vannak, de az *Azotobacter chroococcum* törzsekre nézve ilyen természetű vizsgálataink úttörő jellegűek.

A nagyfrekvenciás kezelés a törzsek letalitását [NELSON—WHITNEY (1960), TEIXERA—PINTO (1960)] és N-kötő képességének változását — főleg növekedését — idézték elő. A letalitást első vizsgálatainkban feltehetően a nagyfrekvenciás áramok dielektromos *hőhatása* idézte elő. Ennek kiküszöbölése végett a későbbiekben a kezelendő baktérium-szuszenziókat előzetes lehűtés után helyeztük a nagyfrekvenciás térbe. A hűtést többször is megisméltettük, s a besugárzást 10—15 percre szüneteltettük. A periodikus lehűtés és besugárzás mellett biztosítható volt, hogy a szuszpenzió hőmérséklete a kezelés folyamán ne emelkedhessék 38 °C fölé.

Ilyen kísérleti feltételek között — a hőhatás kiküszöbölése ellenére — is tapasztaltunk letalitást, amelyet teljesen az intenzív nagyfrekvenciás térnek tulajdoníthatunk. Az N-kötésben ebben az esetben is tapasztaltunk növekedést, amelynek okát a baktériumok megváltozott morfológiai és fiziológiai tulajdonságaiban kereshetjük. Megjegyezzük, hogy ilyen természetű vizsgálatokat az irodalomban nem találtunk és figyelembe véve, hogy az eljárással a törzsek N-kötő képessége növelhető, a továbbiakban a nagyfrekvenciás tér

szempontjából kedvezőbb desztilláltvizesszuszpenzióban kísérjük meg vizsgálataink folytatását. Ilyen módon főként a nagy teljesítmények esetén fellépő hőhatás gyakorlatilag — eddigi méréseink szerint — periodikus hűtés és megszakított besugárzás alkalmazása nélkül is kiküszöbölhetővé válik.

Összefoglalás

Kísérleti vizsgálataink alapján megállapítható:

a) A nagyfrekvenciás elektromágneses tér és ultrahang besugárzás az *Azotobacter chroococcum* törzsek N-megkötő képességét a behatás erősségétől és időtartalmától függően kisebb-nagyobb mértékben befolyásolja.

b) Az esetek döntő többségében a rövidebb ideig tartó és gyengébb behatás serkentette, míg a hosszabb ideig tartó erősebb behatás nem érintette, esetenként pedig csökkentette az *A. chroococcum* törzsek N-megkötő képességét. Nagy dózis letalitást okozott.

IRODALOM

- BERGMANN, L. (1954): Der Ultraschall 6. Aufl. Stuttgart
 FARKAS, K.—IRÁNYI, J. (1956): Az ultrahang. Medicina Könyvkiadó. Budapest.
 FÜCHTBAUER, H.—THEISSMANN, H. (1949): Zur Wirkung des Ultraschalls auf Bakterien. Naturwiss. 36, 346—347.
 JAENICHEN, H.—HEIMANN, M. (1955): Untersuchungen über die Anwendungsmöglichkeit des Ultraschalls in der Phytotherapie. (Ultraschallbehandlung zur Abtötung parasitischer Pilze und Bakterien im Inneren von Samen, Früchten und Fruchständen.) Phytopatol. Z. 23, 419—462.
 KNAYSI, G.—CURRAN, H. R. (1961): Effects of Some Mechanical Factors on the Endospores of *Bacillus Subtilis*. 82, 691—702.
 KÜSTER, E.—THEISSMANN, H. (1949): Über den Einfluss von Ultraschall auf *Aspergillus niger*. Naturwiss. 36, 380—383.
 NELSON, S. O.—WHITNEY, W. K. (1960): Radio-frequency Electric Fields for Stored-grain Insect Control. Transactions of the ASAE. 3: (2), 144, 133—137.
 POCHON, J.—BARJAC, H. (1958): Traite de microbiologie des Sols. Paris. Dunod.
 STELTER, I. (1956): Mikrobiologische US-Wirkungen. Westdeutsch. Verl. Köln—Opladen.
 SYNOWIEDZKY, Z.—TOPA, M.—BOLDOK, C.—JANKOWSKA, J. (1957): The Application of Ultrasonic Waves in Biologic Research to Obtain Highly Effective Strains for the Production of Antibiotics. 7, 289—293.
 TEIXEIRA-PINTO, A. A.—NEJELSKI, L. L. JR.—CUTLER, J. L.—HELLER, J. H. (1960): The Behavior of Unicellular Organisms in an Electromagnetic Field. Experimental Cell Research. 20, 548—564.
 THOMAS, A. M. (1952): Pest Control by Highfrequency Electric Fields — Critical Resume. Technical Report W/T23, published by the British Electric and Allied Industries Research Association.
 WARNECKE, B. (1953): Bakteriologische Ultraschallstudien 138, 17—55.
 WOLTERS, K. (1958): Zur Wirkung von Ultraschall. Westdeutscher Verl. Köln—Opladen.