

**EFECTELE UNDELOR MILIMETRICE ASUPRA PROCESULUI DE DEZVOLTARE  
A POPULAȚIEI LEVURII *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CNMN-Y-18  
ÎN FUNCȚIE DE DURATA IRADIERII**

*Agafia USATÎI, Elena MOLODOI, Nadejda EFREMOVA, Ludmila FULGA*

*Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM*

Sunt prezentate modificările intervenite în ciclul mitotic al levurii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 în rezultatul aplicării undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă. S-a constatat că dinamica procesului de creștere a populației se manifestă în funcție de durata de iradiere. Efectul maximal de stimulare a viabilității s-a observat în intervalul 12-48 ore la iradierea timp de 20 minute cu unde milimetrice, frecvența  $f=53,33$  GHz. Iradierea dublă a culturii la diferite etape de dezvoltare modifică nesemnificativ numărul de celule comparativ cu martorul neiradiat.

**Cuvinte-cheie:** *Saccharomyces cerevisiae, proliferare, viabilitate, unde milimetrice.*

**THE EFFECTS MILLIMETRIC WAVES ON THE PROCESS OF DEVELOPMENT OF YEASTS POPULATION OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CNMN-Y-18 DEOENDING ON THE DURATION OF IRADIATION**

In this paper are presented modifications taken part in mitotic cycles of *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 as the result of application of millimeter waves with extremely high frequency. It was determined that the dynamics of the process of growth of the population depends on the duration of irradiation. Maximum effect of the increase of viability was established in the interval 12-48 hours at the irradiation at 20 minutes with millimeter waves with the frequency  $f=53,33$  GHz. The double irradiation of the culture at different stages of development, modify insignificantly the amount of cells in comparison with the unirradiated control.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae, proliferation, viability, millimeter waves.*

În ultimii ani, intens se cercetează influența radiației electromagnetice în diapazon milimetric asupra diferitelor organisme – de la cele inferioare până la om. Cercetările efectelor undelor milimetrice asupra obiectelor biologice poartă caracter atât fundamental, cât și aplicativ. Problemei de interacțiune a radiației cu mediile medico-biologice sunt consacrate numeroase lucrări științifice [13,15-16]. Undele milimetrice cu frecvență extra înaltă au capacitatea de a influența practic asupra tuturor tipurilor de celule cunoscute (nervoase, musculare, țesuturilor conjunctive etc.) ale obiectelor biologice (colonii de microorganisme, organe izolate, organism unitar, celule solitare, cultură de celule) [9,18].

În prezent, cercetările impactului câmpului electromagnetic asupra obiectelor biologice s-au amplificat în Germania, Italia, Franța, Rusia, Ucraina [2,3,11,17]. Ca rezultat, a fost creată o direcție nouă – biologia electromilimetrică. Cercetătorii au analizat factorii ce influențează interacțiunea obiectelor biologice cu câmpul electromagnetic milimetric, au elucidat unele legități în procesul interacțiunii undelor electromagnetice cu obiectele biologice [6,12].

Experimental s-a stabilit că efectul biologic al undelor milimetrice depinde de caracterul de rezonanță (frecvență) – mărimea liniei spectrale în care se observă efectul are, de regulă, ordinea  $10^{-3}$ – $10^{-4}$  frecvențe medii. Mai mulți cercetători au demonstrat că efectul biologic al acțiunii undelor milimetrice apare la un anumit prag al intensității și că efectul biologic este invariant la alternarea intensității radiației în limite largi, adesea de câteva ordine. Specific pentru undele milimetrice este și existența unui prag temporar de acțiune – după apariția efectului biologic expunerea obiectului radiației nu duce la variația acestuia. Un rol important în stabilirea efectului biologic al iradierii îl joacă și starea inițială a organismelor vii supuse radiației [6].

Actualmente, undele milimetrice sunt utilizate frecvent în diferite domenii – biotehnologie, medicină, agricultură. Studiul analitic al literaturii de specialitate a permis de a evidenția importanța aplicării undelor milimetrice în biotehnologia cultivării microorganismelor. În special, este oportun de a acumula date noi privitor la particularitățile de acțiune a undelor milimetrice, la fundamentarea unor principii ale interacțiunii câmpului electromagnetic cu organismele vii, la elaborarea procedurilor de sinteză orientată a substanțelor bioactive, la soluționarea problemelor de sporire a capacității biosintetice a microorganismelor.

În legătură cu cele relatate, **scopul** cercetărilor constă în evaluarea efectelor undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă asupra dinamicii procesului de creștere a populației *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 în dependență de durata de iradiere.

### Material și metode

*Obiect de studiu* a servit tulpina de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 – producătoare de manani, păstrată în colecția Laboratorului „Biotehnologia Levurilor” și în Colecția de Microorganisme Nepatogene a IMB al AȘM [7].

*Medii și condiții de cultivare.* Materialul semincer a fost obținut prin cultivarea tulpinii levuriene pe must de bere, timp de 24 h, pe agitator (200 rpm.), la temperatura de 25°C. Inoculul s-a utilizat pentru iradiere cu unde milimetrice. După expunerea la undele milimetrice cu frecvență extra înaltă, celulele de levuri în volum de 5%,  $2 \times 10^6$  celule/ml au fost inoculate pe mediul lichid și crescute în condiții identice cu martorul. Cultivarea în profunzime s-a realizat în baloane Erlenmeyer cu capacitate de 1 L ce conțin 0,2 L mediu nutritiv YPD: 1% extract de drojdie, 2% peptonă, 2% glucoză, apă potabilă 1 L, pH 5,5 [1], durata de cultivare 120 h, la temperatura de 25°C.

Ca generator de unde milimetrice cu frecvență extra înaltă a fost utilizat dispozitivul KBЧ-НД, RS-232, cu lungimile de undă  $\lambda = 5,6$  mm, ceea ce corespunde frecvenței  $f = 53,33$  GHz (maxim  $10 \text{ mW/cm}^2$ ), oferit cu amabilitate de către colaboratorii Institutului de Inginerie Electronică și Nanotehnologii „D.Ghițu” al AȘM. Aparatul este certificat și permis spre utilizare în practica medicală. Durata tratării culturilor de drojdie cu unde milimetrice a constituit: pentru iradierea ordinară – 5, 10, 15, 20, 25 minute, pentru iradierea dublă – 10, 10+10, 20, 20+20 minute.

*Metode de realizare a cercetărilor.* Numărul de celule dezvoltate pe mediul lichid a fost determinat colorimetric la lungimea de undă  $\lambda = 540$  nm [4]. Coloniile dezvoltate pe mediul solid au fost caracterizate conform [8,10]. Numărul de generații și rata de creștere a levurii au fost determinate conform ecuației  $[n = \log_{10} X - \log_{10} X_0 / 0,301]$  [5].

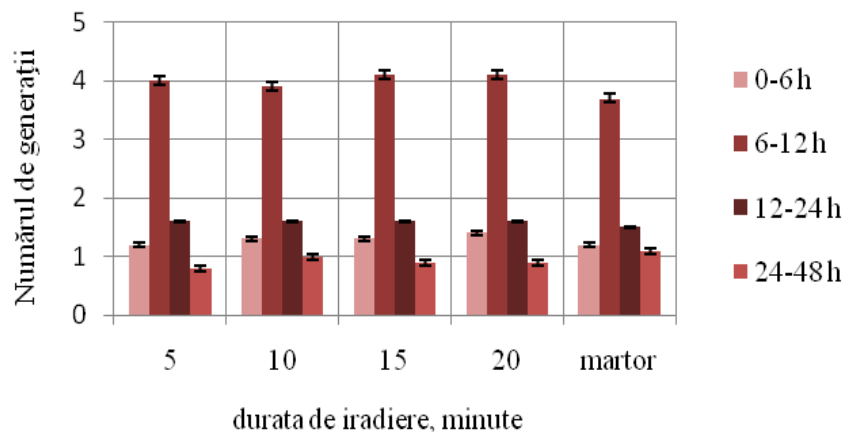
Prelucrarea statistică a rezultatelor s-a efectuat computerizat cu calcularea erorilor standard pentru valorile relative și medii, fiind apreciate diferențele dintre experiment și martor după criteriul t-Student și pragul de semnificație „P” [14].

### Rezultate și discuții

În vederea evaluării efectelor undelor milimetrice asupra dinamicii procesului de creștere a populației *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 în dependență de durata de iradiere, cercetările au fost axate pe studiul numărului de generații produse în diferite segmente de timp și a gradului de viabilitate a celulelor.

Creșterea populației de levuri a fost monitorizată prin măsurarea densității optice după 6, 12, 24, 48 ore de cultivare în profunzime cu recalcularea numărului de celule la ml mediu de cultură.

În Figura 1 sunt reflectate rezultatele examinării numărului de generații care se produc la diferite intervale de timp. Studiul a demonstrat că iradierea culturii cu unde milimetrice cu frecvența  $f = 53,33$  GHz, timp de 5, 10, 15, 20 minute, nu modifică semnificativ numărul de generații produs pe toată durata de cultivare, comparativ cu martorul neiradiat. Aceasta demonstrează că frecvența dată nu desincronizează ciclul mitotic al populației de levuri.



**Fig.1.** Multiplicarea celulelor *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 în dependență de durata iradierii cu unde milimetrice cu frecvența  $f = 53,33$  GHz.

Titulul celulelor vii ale levurii, identificat în perioadele de dezvoltare a culturii, calculat prin determinarea cotei (%) celulelor vii după iradiere, comparativ cu numărul de celule vii neiradiate (cotate ca 100%), a demonstrat o viabilitate sporită, comparativ cu martorul, specifică duratelor de iradiere de 15-20 minute (Fig.2). Efectul maximal de stimulare a viabilității s-a observat în intervalul 12-48 ore de cultivare și se exprimă prin valoarea de 20,6% mai înaltă la iradierea culturii timp de 20 minute.

Datele obținute conduc spre concluzia că iradierea cu unde milimetrice cu frecvența  $f=53,33$  GHz nu provoacă dereglări majore ale numărului de generații, comparativ cu martorul, dar cultura iradiată timp de 20 minute își sporește gradul de rezistență.

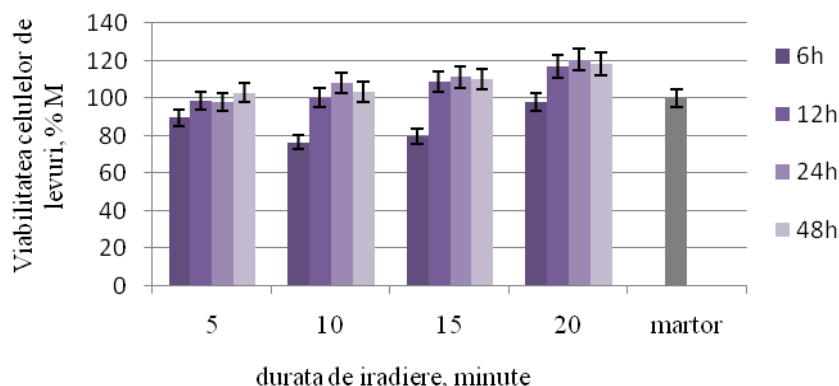


Fig.2. Viabilitatea celulelor *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 în dependență de durata iradierii cu unde milimetrice cu frecvența  $f=53,33$  GHz.

Mai multe studii afirmă faptul că undele milimetrice de intensitate extra înaltă își manifestă efectul în cazurile de stres sau patologie a bioobiectului, condiții când subiecții au deja o deviație de la starea de anormalitate, condiții nefavorabile de dezvoltare. O problemă importantă în studiul și modelarea proceselor biosintetice asupra obiectelor biologice constă în elucidarea comportamentului levurii la iradierea dublă cu unde milimetrice. În experiențele noastre, cultura de *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 a fost iradiată inițial în faza de latență (până la inoculare) și repetat în faza creșterii accelerate (după 24 ore de cultivare în profunzime). Temperatura de cultivare a fost mai ridicată comparativ cu optimul specific tulpinii date și a variat în limitele 28-30°C. În calitate de indicatori sensibili ai stării funcționale a levurii au fost cercetați: numărul de generații în segmente diferite ale dezvoltării culturii și viabilitatea celulelor.

Din rezultatele expuse în Figura 3 se observă că iradierea dublă a culturii, în intervalul de 10-20 minute, nu induce diminuarea sau stimularea substanțială a numărului de generații și nu provoacă dereglări majore în ciclul mitotic al levurii comparativ cu varianta martor neiradiată.

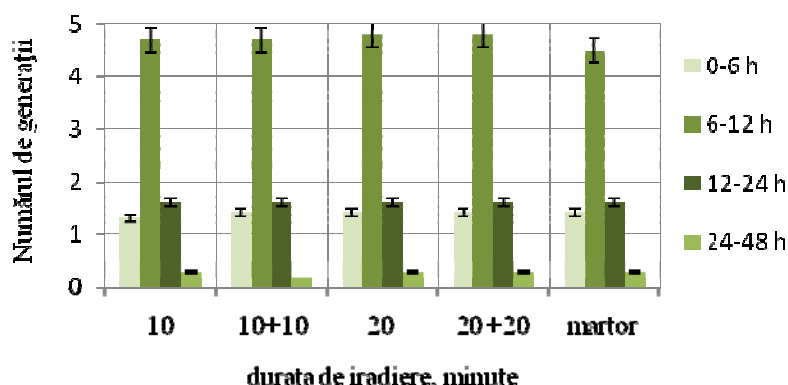


Fig.3. Efectul iradierii duble cu unde milimetrice cu frecvența  $f=53,33$  GHz asupra numărului de generații la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18.

În cazul experiențelor de determinare a viabilității celulelor s-a constatat că iradierea dublă a culturii la diferite etape de dezvoltare modifică nesemnificativ numărul de celule comparativ cu martorul neiradiat.

Aplicarea procesului de expunere a culturii de *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 la acțiunea undelor milimetrice timp de 20 minute a permis majorarea viabilității celulelor cu 10,57-27,32% față de martor în cazul iradierii culturii numai la etapa de latență și cu 12,43-15,0% în cazul iradierii duble (Fig.4).

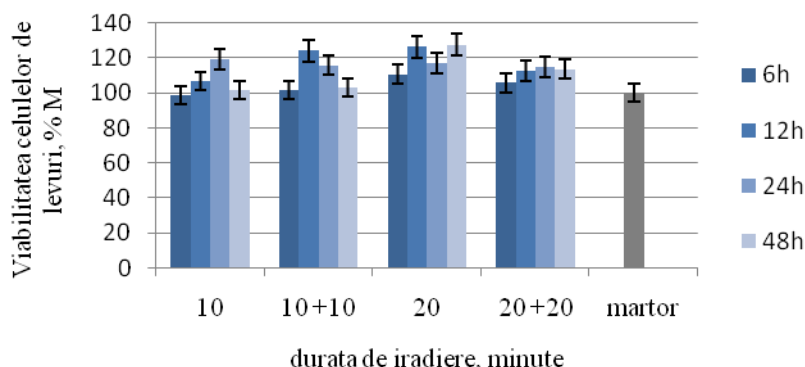


Fig.4. Efectul iradierii duble cu unde milimetrice cu frecvența  $f=53,33$  GHz asupra viabilității celulelor *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18.

### Concluzii

1. Undele milimetrice cu frecvența  $f=53,33$  GHz, aplicate timp de 5, 10, 15, 20 minute, nu desincronizează ciclul mitotic al populației de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18.
2. Efectul maximal de stimulare al viabilității s-a observat în intervalul 12-48 ore de cultivare și se exprimă prin valori maxime (cu 17-20,6%) la iradierea timp de 20 minute cu unde milimetrice cu frecvența  $f=53,33$  GHz.
3. Iradierea dublă a culturii, fie cu durata de 10 sau 20 minute, nu provoacă diminuarea sau stimularea substanțială a numărului de generații și nu produce dereglări majore în ciclul mitotic al levurii comparativ cu varianta martor neiradiată.

### Bibliografie:

1. AGUILAR-USCANGA, B., FRANCOIS, J. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. In: *Letters in Applied Microbiology*, 2003, no.37, p.268-274.
2. CIFRA, M., JELINEK, F., POKORNY, J., JANCA, R. et al. Measurement of electrical oscillations of yeast cells membrane at acoustic frequencies. In: *Biological Effects, Medical and Industrial Applications of EM Field, ISMOT Proceedings*, 20-23 june, 2011. Prague, Czech Republic, 2011, p.303-306.
3. DE VITA, A., CROCE, R., PINTOL, I., BISCEGLIA, B. Nonlinear interaction of electromagnetic radiation the cell membrane level: response to stochastic fields. In: *Progress in Electromagnetics Research*, 2011, vol.33, p.45- 67.
4. GROMOZOVA, E., VOYCHUK, S. Influence of radiofrequency EMF on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as model eukaryotic system. In: *Biophotonics and Coherent Systems in Biology*. Spring Street, New York: NY 10013, USA, 2007, p.167-175.
5. MOLDOVEANU, D., MILITARU, C., MOLDOVEANU, I. *Microbiologie și inginerie genetică*. București: Fiat Lux, 2001. 352 p. ISBN 973-9250-60-2
6. ROTARU, A., TODERAȘ, I., ANDRONIC, L., BULAT, D. Efecte biologice ale câmpului electromagnetic milimetric de densități reduse de putere. *Analele Științifice ale USM. Seria „Științe chimico-biologice”*, 2007, p.107-112.
7. USATÎI, A., MOLODOI, E., EFREMOVA, N., CHISELIȚA, N., BORISOVA, T., FULGA, L. *Tulpină de drojdie Saccharomyces cerevisiae – producătoare de manani*: brevet MD nr. 4216, BOPI nr.4/2013, p.24.
8. VRHOVAC, I., RENO, H., JASNA, F. Effect of 905 MHz microwave radiation on colony growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* strains FF18733, FF1481 and D7. In: *Radiol. Oncol.*, 2010, vol.44(2), p.131-134.
9. БЕЦКИЙ, О., ЛЕБЕДЕВА, Н., КОТРОВСКАЯ, Т. Электромагнитная биотехнология. В: *Биомедицинские технологии и радиоэлектроника*, 2002, №10-11, с.42-48.
10. БУРЬЯН, Н. *Практическая микробиология виноделия*. Симферополь: Таврида, 2003. 560 с.
11. ГАМАЮРОВА, В., КРЫНИЦКАЯ, А., АСТРАХАНЦЕВА, М. Влияние ЭМИ КВЧ нетепловой интенсивности на рост дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В: *Биомед. Технол. и Радиоэлектрон.*, 2004, №1-2, с.117-120.

12. ГАПОЧКА, Л., ГАПОЧКА, М., КОРОЛЕВ, А. Популяционные аспекты устойчивости одноклеточных организмов к действию электромагнитного облучения низкой интенсивности. В: *Миллиметровые волны в биологии и медицине*, 2002, №2(26), с.3-9.
13. ГРЕЦОВА, Н. *Механизмы воздействия низкоинтенсивного ЭМИ на клетку* / Автореф. дис. канд. физ-мат. наук. Волгоград, 2006.
14. ДОСПЕХОВ, Б. *Методика полевого опыта*. Москва: Агропромиздат, 1985. 351 с.
15. НИКУЛИН, Р. *Физические механизмы воздействия СВЧ-излучения низкой интенсивности на биологические объекты* / Автореф. дис. канд. физ-мат. наук. Волгоград, 2004.
16. ОГАЙ В. *Функциональная активность иммунокомпетентных клеток животных в норме и патологии: эффекты низкоинтенсивных электромагнитных излучений* / Автореф. дис. канд. биол. наук. Пущино, 2003.
17. САВЕЛЬЕВ, С., БЕЦКИЙ, О., МОРОЗОВА, Л. Основные положения теории действия миллиметровых волн на водосодержащие и живые биологические объекты. В: *Журнал Радиоэлектроники*, 2012, №11, с.1-12.
18. ТАМБИЕВ, А., КИРИКОВА, Н. Некоторые новые представления о причинах формирования стимулирующих эффектов КВЧ-излучения. В: *Биомедицинская радиоэлектроника*, 2000, №1, с.23-34.

*Notă:* Prezenta lucrare a fost efectuată cu susținerea financiară a Proiectului Instituțional 11.817.08.19A

Prezentat la 10.04.2014