

**EFECTELE UNDELOR MILIMETRICE ASUPRA PROCESULUI DE DEZVOLTARE
A POPULAȚIEI LEVURII *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CNMN-Y-20
ÎN FUNCȚIE DE DURATA IRADIERII**

Natalia CHISELIȚA

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM

În studiu sunt expuse rezultatele influenței duratei de iradiere cu unde milimetrice cu frecvență extra înaltă (53,33 GHz- $\lambda=5,6$ mm) asupra dezvoltării generațiilor populaționale și viabilității tulpinii de drojdie *S. cerevisiae* CNMN-Y-20. S-a stabilit că iradierea tulpinii cu unde milimetrice cu frecvența enunțată timp de 5, 10, 15, 20, 25 minute duce, în primele 6 ore de cultivare, la creșterea semnificativă a numărului de generații (cu 2,5 - 3,3 generații) și a viabilității tulpinii comparativ cu mărtoarul neiradiat. Efectul maximal de stimulare a viabilității (cu 56,2%) s-a observat după 24 ore de cultivare la probele iradiate timp de 20 de minute.

Cuvinte-cheie: *Saccharomyces cerevisiae*, proliferare, viabilitate, unde milimetrice cu frecvență extra înaltă.

**THE EFFECT OF MILLIMETER WAVES ON THE DEVELOPMENT OF POPULATIONS OF
SACCHAROMYCES CEREVISIAE CNMN-Y-20 YEAST STRAIN IN DEPENDENCE OF THE
DURATION OF IRRADIATION**

In this paper are presented results of the study of influence of the duration of irradiation by millimeter waves with extremely high frequency (53,33 GHz- $\lambda=5,6$ mm) on the development of population and viability of *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 yeast strain. It was established that the irradiation of yeast strain by millimeter waves with extremely high frequency during the 5, 10, 15, 20, 25 minutes has conducted to the significant increasing of amount of generations (with 2,5-3,3 generation) and of the viability of the strain in comparison with control during the first 6 hours of cultivation. Maximum of stimulation of viability (with 56,2 %) was revealed after 24 hours of cultivation in samples irradiated during 20 minutes.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, proliferation, viability, millimeter waves with extremely high frequency.

Introducere

Actualmente, în diferite centre științifice din lume o atenție deosebită se acordă cercetărilor legate de influența undelor milimetrice asupra obiectelor biologice. Vastul material științific, acumulat experimental, confirmă că mecanismul interacțiunii undelor milimetrice atât cu organismele unicelulare, cât și cu cele pluricelulare, atinge aspectele esențiale vitale ale animalelor, plantelor și microorganismelor. Multitudinea datelor experimentale cu privire la eficacitatea undelor milimetrice au pus baza utilizării lor în medicină [18].

Undele milimetrice se utilizează cu succes la tratarea unui spectru larg de boli cardiovasculare, neurologice, urologice, ginecologice, ale pielii, gastrointestinale, dentare, oftalmologice, oncologice – pentru a proteja sistemul hematopoietic, eliminând efectele secundare ale chimioterapiei [3,6,17,19-21,28,32].

De asemenea, este bine cunoscut și studiat efectul imunostimulator, imunomodulator și antiinflamator al undelor milimetrice asupra organismului uman [7,25].

La momentul actual, efectul acțiunii undelor milimetrice asupra organismelor vii este utilizat pe larg și în așa domenii ca medicina veterinară (tratarea diferitelor boli la animale), agricultura (protecția plantelor de diferite boli, ameliorarea germinării semințelor etc.), biotehnologia [5,12,13,15,16,30].

În prezent, în literatura de specialitate sunt disponibile date cu privire la efectul undelor electromagnetice milimetrice de intensitate joasă asupra organismelor fotosintetice – cianobacterii, micro- și macroalge, plante superioare. Sunt descrise timpul, frecvența și regularitatea acțiunii radiației undelor milimetrice asupra organismelor fotosintetice procariote și eucariote, precum și efectele fiziologice care rezultă din interacțiunea acestora. Este demonstrat efectul stimulator al iradierii asupra creșterii și acumulării de biomasă, transportului de ioni și a secreției din celulă a substanțelor biologice active la organismele procariote și eucariote [9,31].

Deoarece microorganismele sunt parte integrantă a proceselor de producere utilizate în industria alimentară, agricultură, biotehnologie și în alte domenii ale economiei, stimularea creșterii, îmbunătățirea parametrilor tehnologici și optimizarea proceselor de cultivare a acestora sunt sarcini actuale și relevante, a căror rezolvare are o mare importanță practică.

Pe lângă utilizarea factorilor chimici, o modalitate relevantă și actuală de a stimula creșterea și dezvoltarea microorganismelor este utilizarea factorilor fizici, care influențează activitatea fiziologică a microorganismelor. Recent, o atenție deosebită se acordă posibilității de utilizare a radiației undelor milimetrice ca mijloc de stimulare a proceselor biologice. Acest tip de radiație poate avea un efect semnificativ asupra diferitelor obiecte biologice, inclusiv microorganisme, care în acest aspect sunt puțin studiate. Cercetările demonstrează prezența efectelor undelor milimetrice cu frecvență redusă (maxim $10 \text{ mW}\cdot\text{cm}^2$) asupra dezvoltării și proliferării celulelor, activității enzimelor, funcționării membranelor celulare, altor sisteme biologice.

Prin alegerea corectă a parametrilor de iradiere, utilizarea undelor milimetrice poate îmbunătăți în mod semnificativ capacitatea de reglementare a proceselor metabolice din culturile microbiene. Mai mult, utilizarea acestui tip de iradiere nu are niciun efect negativ asupra mediului, nu lasă reziduuri toxice, este sigur pentru viața umană [14].

Utilizând drojdiile genului *Saccharomyces* în calitate de obiect de studiu, au fost cercetate modificările apărute în populația acestora la acțiunea undelor milimetrice [24,26,29].

Reieșind din cele expuse, scopul cercetărilor noastre a fost studiul efectului undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă asupra dezvoltării populației tulpinii de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 în dependență de durata iradierii cu unde milimetrice cu frecvență extra înaltă.

Material și metode

Obiectul de studiu. În calitate de obiect de cercetare a servit tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, producător de β -glucani, păstrată în colecția Laboratorului „Biotehnologia Levurilor” și în Colecția de Microorganisme Neapatogene a IMB al AȘM [2].

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 $+25^\circ\text{C}$. Inoculul a fost utilizat pentru iradiere cu unde milimetrice. După expunerea la undele milimetrice cu frecvență extra înaltă, celulele de levuri, în volum de 5%, 2×10^6 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 1L 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 $+25^\circ\text{C}$.

Ca generator de unde milimetrice cu frecvență extra înaltă a fost utilizat dispozitivul KBЧ-НД, RS-232, cu lungimile de undă $\lambda = 5,6 \text{ mm}$, ceea ce corespunde frecvenței $f = 53,33 \text{ GHz}$ (maxim $10 \text{ mW}/\text{cm}^2$), oferit cu amabilitate de către colaboratorii Institutului de Fizică Aplicată al AȘM. Aparatul este certificat și permis spre utilizare în practica medicală.

Durata tratării culturilor de drojdie 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 $\lambda = 540 \text{ nm}$ [4]. Coloniile dezvoltate pe mediul solid au fost caracterizate conform [11,23]. Numărul de generații și rata de creștere a levurii au fost determinate conform ecuației $[n = \log_{10} X - \log_{10} X_0 / 0,301]$ [8].

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” [27].

Rezultate și discuții

Particularitățile proliferării și viabilitatea celulelor nu au fost estimate în baza studiului numărului de generații produse în diferite segmente de timp și al gradului de viabilitate a celulelor. Cercetările s-au efectuat utilizând preinocul cultivat timp de 24 ore la temperatura de $+25^\circ\text{C}$. O astfel de populație conține celule în toate etapele ciclului celular (G1, S, G2 și M) (Fig.1).

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 1 ml mediu de cultură.

În Figura 2 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 $f = 53,33 \text{ GHz}$, timp de 5, 10, 15, 20, 25 minute, duce la stimularea semnificativă a numărului de generații (2,5 - 3,3 generații) produs în primele 6 ore de cultivare, urmată de faza de încetinire, în care numărul de generații este în scădere (1,4-

1,7 generații) comparativ cu martorul, în care numărul de generații produse este de 2,3, respectiv, 2,1. Reacționarea diferită a culturii de levuri supusă iradierii s-a observat și în perioada de dezvoltare 24-48 ore. În perioada menționată, conform curbei mitotice de dezvoltare, se atestă o sporire (0,3-0,5 generații) a numărului de generații specifice tuturor duratelor de iradiere, comparativ cu martorul, în care cultura practic nu se reproduce.

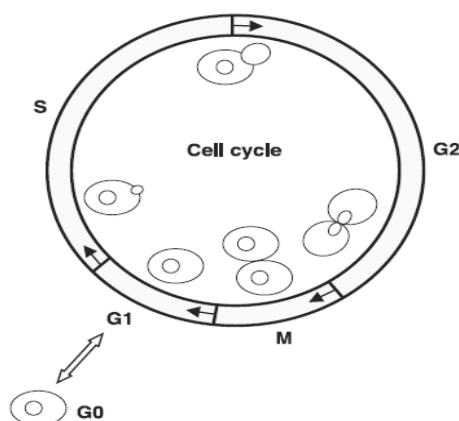


Fig.1. Ciclul celular al *S. cerevisiae* [10].

Legenda: Cultura, în faza creșterii exponențiale, conține celule specifice tuturor etapelor ciclului diviziunii celulare (G1, S, G2, M). Drojdia se divide datorită apariției mugurilor indicativi de la sfârșitul fazei G1 și începutul fazei S. Atât faza G2, cât și faza M includ celule cu muguri mari și celule G0 aflate orientativ în fazele de odihnă a ciclului mitotic.

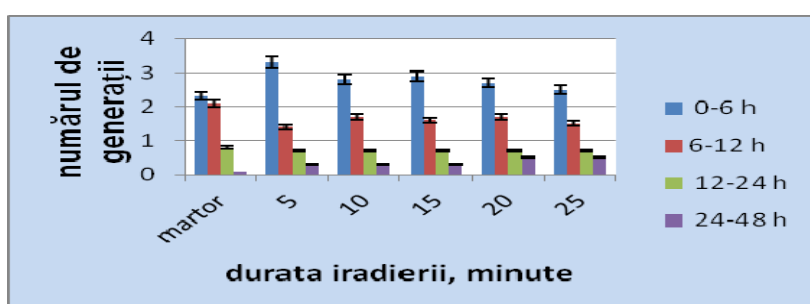


Fig.2. Efectul duratei de acțiune a undelor milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz asupra dinamicii procesului de creștere a populației *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

În perioadele de dezvoltare a culturii a fost identificat titrul celulelor vii ale levurii. Algoritmul de recalcul a inclus determinarea cotei (%) celulelor vii după iradiere comparativ cu numărul de celule vii neiradiate (cotate ca 100%). Rezultatele experimentale sunt exprimate sub formă de histogramă în Figura 3. Studiul individual al sensibilității celulelor expuse la undele milimetrice a marcat o viabilitate sporită, comparativ cu martorul, specifică tuturor duratelor de iradiere. Efectul maximal de stimulare a viabilității s-a observat după 24 ore de cultivare și se exprimă prin viabilitate maximală (cu 56,2% mai mult față de martor) la iradierea timp de 20 minute. Cele mai mici valori ale viabilității (cu 22,2%) s-au observat la durata de iradiere de 25 minute.

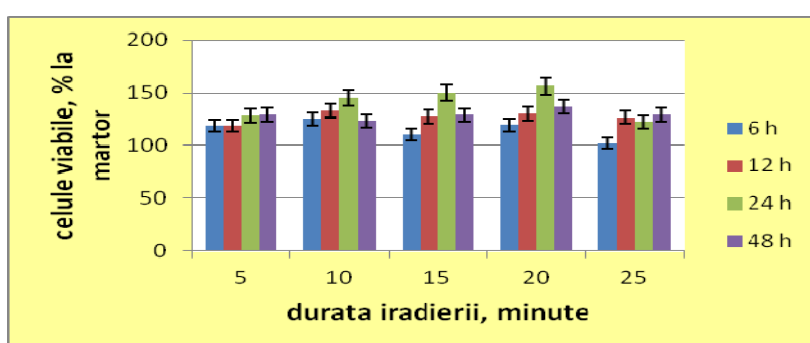


Fig.3. Efectul duratei de acțiune a undelor milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz asupra viabilității celulelor *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

La etapa următoare a fost evaluat efectul iradierii duble cu unde milimetrice de intensitate extra înaltă asupra tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Procedeele de utilizare a undelor milimetrice în scopul tratării diferitelor maladii prevăd aplicarea acestora pe parcursul a 5-10 runde, fapt ce duce la amplificarea semnalului interior al organismului. Aceste semnale ajută la neutralizarea factorilor nocivi. Din aceste considerente, este important a stabili reacția celulei levurii la aplicarea repetată a undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă.

În experiențele noastre, cultura *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 a fost iradiată inițial în faza de latență (până la inoculare) și repetat în faza creșterii accelerate (după 24 ore de cultivare în profunzime).

În calitate de indicatori sensibili ai stării funcționale a levurii au fost cercetate prolificitatea și viabilitatea tulpinii de drojdie în dinamică, pe durata a 48 ore de dezvoltare.

Din rezultatele expuse în Figura 4 se observă că iradierea dublă a culturii, în intervalul de 10-20 minute, nu induce diminuarea sau stimularea substanțială a numărului de generații, deci nu provoacă dereglări majore în ciclul mitotic al levurii comparativ cu varianta martor neiradiată. Cauza lipsei efectului iradierii duble cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz urmează a fi determinată ulterior. Însă, în literatura de specialitate deja este cunoscut fenomenul de anihilare a influenței undelor milimetrice asupra organismelor vii, în condiții nefavorabile de dezvoltare [22].

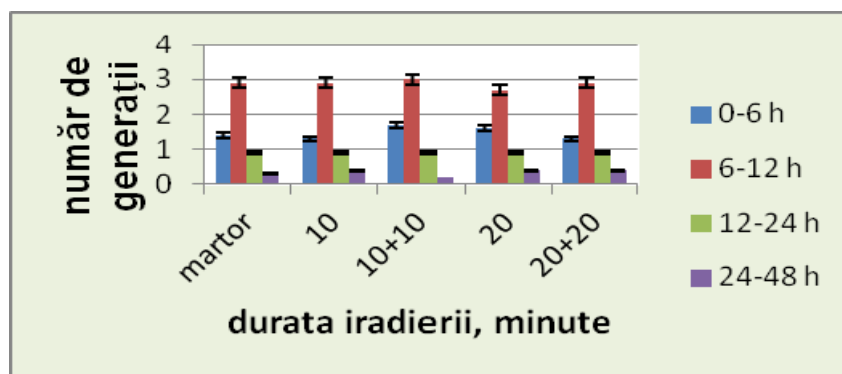


Fig.4. Efectul iradierii duble cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz asupra numărului de generații ale populației *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Nu s-au observat modificări majore ale efectelor dublei iradiere cu unde milimetrice nici în cazul experiențelor de determinare a viabilității celulelor, acest parametru variind neesențial la nivelul martorilor iradiati o singură dată (Fig.5). Acest fenomen poate fi explicat, din punctul nostru de vedere, prin încetinirea mecanismelor de autostimulare și reîntoarcerea la normalitate a stării funcționale a membranei celulare a levurii iradiată repetat la diferite intervale de timp.

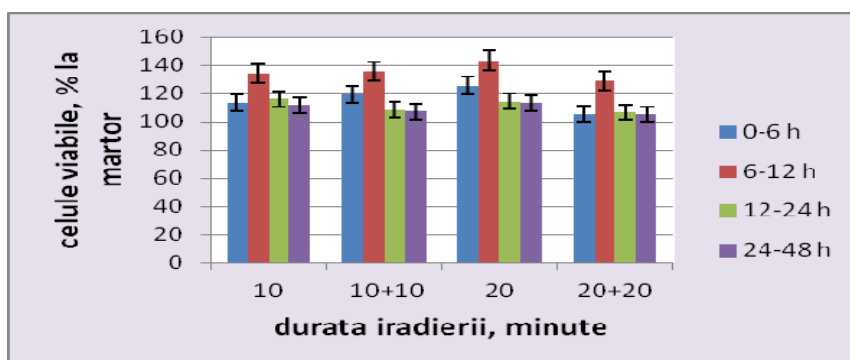


Fig.5. Efectul iradierii duble cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz asupra viabilității celulelor *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Prin urmare, datele obținute conduc spre concluzia că iradierea cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz provoacă o sporire a numărului de generații și a gradului de viabilitate a celulelor, comparativ cu martorul, specifică duratelor de emisie a undelor milimetrice de la 5 la 25 minute. De asemenea, putem afirma că

undele milimetrice cu frecvență extra înaltă modifică procesul de dezvoltare a levurii, iar efectul depinde de durata iradierii. Efectul biologic maximal al acțiunii undelor milimetrice asupra viabilității celulelor apare în primele 24 ore de la aplicare.

Concluzii

1. Iradierea culturii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz, timp de 5, 10, 15, 20, 25 minute, duce la stimularea semnificativă, în primele 6 ore de cultivare, a numărului de generații (2,5 - 3,3 generații).
2. Studiul individual al sensibilității celulelor expuse la undele milimetrice a marcat o viabilitate sporită, comparativ cu martorul, specifică tuturor duratelor de iradiere. Efectul maximal de stimulare a viabilității s-a observat după 24 ore de cultivare și se exprimă prin viabilitate maximală (cu 56,2%) la iradiere timp de 20 minute.
3. Iradierea dublă a culturii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, inițial în faza de latență (până la inoculare) și repetat în faza creșterii accelerate, nu induce diminuarea sau creșterea substanțială a numărului de generații și, deci, nu provoacă dereglări majore în ciclul mitotic al levurii comparativ cu varianta martor neiradiată.

Bibliografie:

1. AGUILAR-USCANGA, B., FRANCOIS, J.M. 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. CHISELIȚA, O., USATȚI, A., TARAN, N., RUDIC, V., CHISELIȚA, N., ADAJUC, V. *Tulpină de drojdie Saccharomyces cerevisiae – sursă de β -glucani*: brevet MD nr.4048, BOPI nr. 6/2010, p.20-21.
3. NICOLAS NICOLAZ, CH., ZHADOBOV, M., DESMOTS, F. et al. Study of narrow band millimeter-wave potential interactions with endoplasmic reticulum stress sensor genes. In: *Bioelectromagnetics*. 2009, vol.30, Issue 5, p.365-373. Online ISSN: 1521-186X.
4. GROMOZOVA, E.N., VOYCHUK, S.I. *Influence of radiofrequency EMF on the yeast Saccharomyces cerevisiae as model eukaryotic system*. Imst of Microbiol. and Virology, NAS Ukraine, 2005, p.167-175.
5. <http://volnyzhizni.ru/#ixzz2a3P5BpKo>
6. LOGANI MAHENDRA, K., SZABO, I., MAKAR, V. et al. Effect of millimeter wave irradiation on tumor metastasis. In: *Bioelectromagnetics*, 2006, vol.27, Issue 4, p.258-264. Online ISSN: 1521-186X.
7. MAKAR, V.R., LOGANI, M.K., BHANUSHALI, A. et al. Effect of cyclophosphamide and 61.22 GHz millimeter waves on T-cell, B-cell, and macrophage functions. In: *Bioelectromagnetics*. 2006, vol.27, Issue 6, p.458-466. Online ISSN: 1521-186X
8. MOLDOVEANU, D., MILITARU, C., MOLDOVEANU, Iu. *Microbiologie și inginerie genetică*. București: Fiat Lux, 2001. 352 p. ISBN 973-9250-60-2.
9. POOLEY, D.T. Bacterial Bioluminescence, Bioelectromagnetics and Function. In: *Photochemistry and Photobiology*, 2011, vol.87, Issue 2, p.324-328. ISSN: 1751-1097
10. RUIZ-GOMEZ, M.J., PRIETO-BARCIA, M.I., RISTORI-BOGAJO, E. et al. Static and 50 Hz magnetic fields of 0.35 and 2.45 mT have no effect on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioelectrochemistry*. 2004, vol.64, p.151-155.
11. VRHOVAC, Iv., RENO, H., JASNA, F. *Effect of 905 MHz microwave radiation on colony growth of the yeast Saccharomyces cerevisiae strains FF18733, FF1481 and D7*. *Radiol. Oncol* 2010; 44(2), p.131-134.
12. www.biophys.ru/archive/congress2012/proc-p170.htm
13. АНДРЕЕВ, А.В., АВДЕЕНКО, К.В., КАЛЮЖНЫЙ, И.И. КВЧ-терапия телят, больных бронхопневмонией. В: *ММ-волны в биологии и медицине*, 2003, с.25-27.
14. АСТРАХАНЦЕВА, М.Н. *Интенсификация метаболизма *Vacillus subtilis* и *Saccharomyces cerevisiae* под воздействием электромагнитного излучения миллиметрового диапазона и комплекса гидроксипропил-дифосфоновой кислоты* / Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 03.00.23 – биотехнология. Казань, 2006. 150 с. РГБ ОД, 61:07-5/524
15. БАБУШКИН, В.А., ТЕРЕНТЮК, Г.С., КЛЮЧНИКОВ, А.Г. Гормональные показатели при неосложненном и осложненном течении индуцированной беременности у собак. В: *ММ-волны в биологии и медицине*, 2003, с.29-30.
16. БАБУШКИН, В.А., ТЕРЕНТЮК, Г.С., КЛЮЧНИКОВ, А.Г. Коррекция гиповолемии у собак при тяжелых формах гестозов ЭМИ КВЧ-диаагона. В: *ММ-волны в биологии и медицине*, 2003, с.15-17.
17. БЕКРЕНЕВ, А.И. Применение миллиметровых волн в условиях детского санатория «Орлёнок». В: *Миллиметровые волны в медицине и биологии*, 1998, №1(11), с.46.

18. БЕСКАРАВАЙНАЯ, Е., МИТРОШИН, И., ХАРЫБИНА, Т. Тематическая коллекция «Влияние миллиметровых волн КВЧ-диапазона на биологические объекты. В: *Информационные ресурсы России*, 2009, №1, с.14-16. ISSN 0204-3653
19. БЕЦКИЙ, О.В., ЛЕБЕДЕВА, Н.Н. Применение низкоинтенсивных миллиметровых волн в биологии и медицине. В: *Биомедицинская радиоэлектроника*, 2007, с.13-16. ISSN 1560-4136
20. БЕЦКИЙ, О.В., ЛЕБЕДЕВА, Н.Н., КОТРОВСКАЯ, Т.И. В: *Миллиметровые волны в биологии и медицине*, 2005, №2 (38), с.36.
21. БЕЦКИЙ, О.В., КИСЛОВ, В.В., ЛЕБЕДЕВА, Н.Н. *Миллиметровые волны и живые системы*. Москва: «САЙНСПРЕСС», 2004. 271 с.
22. БЕЦКИЙ, О., ДЕВЯТКОВ, Н. Электромагнитные миллиметровые волны и живые организмы. В: *Радиотехника*, 1996, № 9-10, с.4-10.
23. БУРЬЯН, Н.И. *Практическая микробиология виноделия*. Симферополь: Таврида, 2003. 560 с.
24. ГАМАЮРОВА, В.С., КРЫНИЦКАЯ, А.Ю., АСТРАХАНЦЕВА, М.Н. Влияние ЭМИ КВЧ нетепловой интенсивности на рост дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В: *Биомедицинская технология и радиоэлектроника*, 2004, №1-2, с.117-120.
25. ГАПЕЕВ, А.Б., ЧЕМЕРИС, Н.К. Механизмы биологического действия электромагнитного излучения крайне высоких частот на уровне организма. В: *Биомедицинская радиоэлектроника*, 2007, №8-9.
26. ГАПОЧКА, Л.Д., ГАПОЧКА, М.Г., КОРОЛЕВ, А.Ф. Популяционные аспекты устойчивости одноклеточных организмов к действию электромагнитного облучения низкой интенсивности. В: *Миллиметровые волны в биологии и медицине*, 2002, №2 (26), с.3-9.
27. ДОСПЕХОВ, Б. *Методика полевого опыта*. Москва: Агропромиздат, 1985. 351 с.
28. КАБИСОВ, Р.К. Миллиметровые волны в системе реабилитации онкологических больных. В: *11-ый Российский симпозиум с международным участием «Миллиметровые волны в медицине и биологии»*, 21-24 апреля 1997 г. Москва: Сборник докладов, с.13-14.
29. КРЫНИЦКАЯ, А.Ю., СУХАНОВ, П.П., СЕДЕЛЬНИКОВ, Ю.Е. и др. Влияние последствия КВЧ-излучения на активность хлебопекарных дрожжей. В: *Миллиметровые волны в биологии и медицине*, 2004, №4, с.17-27.
30. СОРОКИНА, Л.В., АВДЕЕНКО, К.В., КАЛЮЖНЫЙ, И.И. КВЧ-терапия субклинического мастита у свиноматок. В: *ММ-волны в биологии и медицине*, 2003, с.23.
31. ТАМБИЕВ, А.Х., КИРИКОВА, Н.Н., БЕЦКИЙ, О.В. и др. Миллиметровые волны и фотосинтезирующие организмы / Под издательством академика РАН ГУЛЯЕВА, Ю.В. и профессора ТАМБИЕВА, А.Х. Москва: *Радиотехника*, 2003. 175 с. ISBN: 5-93108-040-6
32. ХЕЙЛЮ, Т.С. Миллиметровые волны в системе комплексного лечения дегенеративных заболеваний сетчатки глаза. В: *XIV Российский симпозиум «Миллиметровые волны в медицине и биологии»*. Москва, 2007, с.79-81.

Notă: Prezenta lucrare a fost efectuată cu susținerea financiară a Proiectului Instituțional 11 817 08 19A.

Prezentat la 10.04.2014