

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО СВЧ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ НА МИКРОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ И ОПТИЧЕСКУЮ ПЛОТНОСТЬ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ MRS-1

Кузнецов Д. Б.

Пермская государственная фармацевтическая академия Минздрава, Пермь, Россия. (614077, Пермь, ул. Бульвар Гагарина, 81), e-mail:denis.pfa@gmail.com

Множество работ сосредоточены на исследовании воздействия СВЧ-излучения на воду и культивирование микроорганизмов. В работе [3] рассмотрены возможности использования СВЧ-излучения в фармации. Нами проведено исследование воздействия низкоинтенсивного СВЧ-излучения миллиметрового диапазона на биолюминесценцию и оптическую плотность питательной среды MRS-1, используемой для культивирования лактобактерий с целью проверки как ранее экспериментальных данных с облучением бактерий и воды, так и для прояснения главного звена в механизме воздействия миллиметрового излучения при культивировании микроорганизмов. Гипотеза молекулярного механизма воздействия СВЧ-излучения на микроорганизмы, приведенная в работе [4,] говорит, что СВЧ-излучение поглощается водой и/или другими молекулами, что приводит к устойчивым структурным перестройкам. Последние исследования влияния электромагнитного излучения оптического и инфракрасного диапазона на воду, находящуюся на границе фаз, показали, что широкие макроскопические области жидкости на границе фаз приобретают свойств, отличные от обычной объемной воды [7].

Ключевые слова: СВЧ-излучение, биолюминесценция, УФ-спектрофотометрия, многослойная адсорбция, оптическая плотность, питательная среда.

STUDY EFFECTS OF LOW LEVEL SHF-RADIATION ON MICROLUMINESCENCE AND THE OPTICAL DENSITY CULTURE MEDIUM MRS-1

Kuznetsov D. B.

Perm of state pharmaceutical academia, Perm, Russia (614077, Perm, street B. Gagarina, 81), e-mail:denis.pfa@gmail.com

Numerous scientific studies focused on the effect of microwave radiation on water and cultivating microorganisms. In a scientific paper [3] considers the possibility of using microwave radiation in the pharmacy. We investigated the effects of low intensity microwave radiation at millimeter bioluminescence absorbance MRS-medium 1 used for culturing lactic acid bacteria in order to verify the experimental data as previously with radiation and water bacteria and to clarify the mechanism of the main link in the millimeter radiation exposure by culturing microorganisms. The hypothesis of the molecular mechanism of action of microwave radiation on microorganisms present in [4] says that the microwave radiation is absorbed by water and / or other molecules, resulting in a stable structural rearrangements. Recent study of the effect of electromagnetic radiation in the optical and infrared range of the water, located at the interface showed that the broad field of macroscopic liquid at the interface acquire properties different from ordinary bulk water [7].

Keywords: SHF-radiation, bioluminescence, UV spectrophotometry, multilayer adsorption, optical density, culture medium.

Введение

На протяжении многих исследований было показано, что низкоинтенсивное миллиметровое излучение влияет на биохимические процессы. При этом известно, что СВЧ-излучение миллиметрового диапазона очень сильно поглощается молекулами воды [1], которые в свою очередь входят в состав любого живого организма и любой питательной среды. Исследования действия СВЧ-излучения на микроорганизмы показало, что оно оказывает влияние на: морфологию клеток, процесс клеточного деления, ряд биологических свойств бактерий, скорость роста (выход биомассы), выход ферментов в среду. При этом отсутствовал мутагенный эффект [7].

Первоначально считалось, что в основе механизма СВЧ-излучения лежит воздействие на информационные процессы в клетке, проводя аналогию с радиоэлектроникой. И уже тогда считалось, что СВЧ-излучение влияет на процессы мембранного транспорта за счет изменения примембранных слоев воды. Резюме о представлениях того и настоящего времени написано в обзоре [5] и работе [3].

Дрокина Т. В. и др. [2] показали, что СВЧ-излучение миллиметрового диапазона обладает выраженным стимулирующим эффектом (в 1000 раз выше, чем в контроле) в отношении люминесценции бактерий *P. Leiognathi*, находящихся в логарифмической фазе развития и сохраняющихся до 3 суток.

В общем и целом современное представление о механизме воздействия электромагнитного излучения на живые объекты показано в работе [5]. Согласно приведенной гипотезе, при воздействии излучением миллиметрового диапазона на микроорганизмы, энергия излучения не только поглощается молекулами воды и/или другими молекулами, но и может аккумулироваться путем структурных перестроек на гидрофильной поверхности с вытеснением протонов из приповерхностных слоев. Таким образом, образуется градиент в виде $\Delta\mu_{\text{H}^+}$, который в свою очередь может расходоваться на синтез АТФ с помощью протонных АТФ-синтаз, что внешне проявляется как увеличение энергетического обмена в микроорганизмах и соответственно увеличение скорости роста. В связи с тем, что чем больше поглощается энергии системой, тем больше становится толщина адсорбированных слоев воды и тем больше возникает градиент протонов, что проявится в виде угнетения при избыточном облучении за счет развития оксидатного стресса.

Последние исследования влияния электромагнитного излучения оптического и инфракрасного диапазона на воду, находящуюся на границе фаз, показали, что широкие макроскопические области жидкости на границе фаз приобретают свойства, отличные от обычной объемной воды [6].

Однако непосредственное исследование воздействия излучения миллиметрового диапазона, с точки зрения адсорбции слоев молекул воды на поверхности раздела фаз, не были проведены.

В работе [4] рассмотрены возможности использования КВЧ-излучения в фармации, в частности при проведении технологических процессов с использованием микроорганизмов.

В данной работе приведены экспериментальные данные об изменении люминесценции индикаторного штамма *E. coli* оптической плотности питательной среды MRS-1, используемой для культивирования лактобактерий.

Гипотеза молекулярного механизма воздействия СВЧ-излучения на микроорганизмы, предложенная в [5], говорит, что СВЧ-излучение на резонансных частотах поглощается молекулами воды, что приводит к перестройке электронных плотностей и разделению зарядов и, как следствие, образованию упорядоченных макроскопических структур в виде многослойной сетки диполей на гидрофильных поверхностях.

Материалы и методы

Подготовка проб

Питательная среда MRS-1, используемая в эксперименте, была изготовлена из 10,0 пептона, 20 мл дрожжевого экстракта, 20,0 глюкозы, 1мл твина-80, 2,0 калия фосфорно-кислого двузамещенного, 5,0 натрия ацетата, 2,0 триаммония цитрата, 0,2 сульфата магния, 0,05 сульфата марганца ($MgSO_4 \cdot 4H_2O$), доведена до 1л водой и простерилизована, $pH = 6,2$ при $T = 25$ °С. Перед использованием воды для приготовления питательной среды проводили водоподготовку до требований ФС 42-2619-89 «Вода очищенная».

Подготовка к проведению измерений биолюминесценции включала регидратацию и приготовление рабочего разведения лиофилизированного индикаторного штамма люминесцентных бактерий (проба) *E. coli*lum+ с помощью воды очищенной имеющей $pH 7,0 \pm 0,2$ и охлажденной до температуры (6 ± 2) °С. Затем разведенную индикаторную культуру выдерживали не менее 30 мин при температуре (22 ± 2) °С.

Измерение оптической плотности

Было проведено измерение оптической плотности на спектрофотометре СФ-103 НПКФ «АКВИЛОН» (Россия). Измерения проводили при комнатной температуре.

Экспериментальная установка

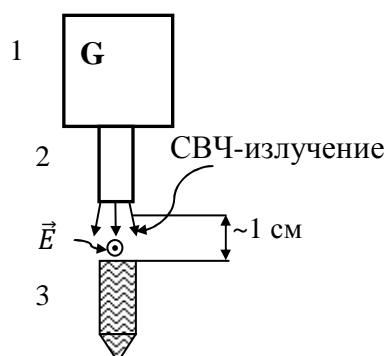


Рис. 1. Схема установки для облучения проб СВЧ-излучением с $\lambda=5,6$ мм и 4,9 мм

На рис. 1 изображена схема установки для облучения проб СВЧ-излучением с длиной волны $\lambda=5,6$ и 4,9 мм. В качестве генератора 1 был использован аппарат «МИЛГА-КВЧ» НПО «Космического приборостроения» (Россия) с выходной мощностью 10 мВт. СВЧ-излучение (волна H_{11}) распространялось по волноводу круглого сечения 2 и в виде расходящейся волны облучало пробирку с пробой 3. Расстояние между раскрытием волновода и пробиркой было выбрано порядка 1 см, что, с одной стороны, обеспечивало работу в дальней зоне $R \geq \frac{2d^2}{\lambda}$, где d – диаметр раскрытия волновода, для $\lambda=5,6$ мм $d=4,5$ мм и $R=7,2$ мм; для $\lambda=4,9$ мм $d=4,0$ мм и $R=6,5$ мм, с другой стороны, пробирка находилась внутри сечения СВЧ-пучка на уровне половинной мощности, которое, по нашим

расчетам, составляло порядка 1 см. Вектор напряженности электрического поля \vec{E} был ориентирован горизонтально.

Измерение биолюминесценции

Определение биолюминесценции под воздействием излучения в отношении энтеробактерий проводили с помощью экспресс-теста ингибирования биолюминесценции индикаторного штамма *Escherichiacolilum*⁺. Уровень гашения (стимуляции) свечения индикаторной культуры определяли с помощью люминометра «Биотокс-6» ООО «НЕРА-С» (Россия), через фиксированные промежутки времени после облучения: 10 мин, 1, 2, 3, 4, 5 и 24 ч. Обработку данных проводили с помощью программного обеспечения MSExcel.

Результаты и обсуждения

Данный эксперимент является продолжением более ранних исследований влияния электромагнитного излучения на околоповерхностные слои воды, которые показали, что энергия излучения может аккумулироваться в виде энтропии потерь и разделения зарядов только при наличии гидрофильной поверхности и воды. В ходе облучения происходит интенсивный рост толщины адсорбированных молекул воды на поверхности, причем зоны вырастают большей толщины, чем без излучения [8].

Чтобы проверить, что ключевую роль в процессе воздействия ЭМИ миллиметрового диапазона на микроорганизмы играют молекулярные перестройки на гидрофильных поверхностях, была измерена оптическая плотность питательной среды MRS-1 сразу после облучения. Другим экспериментом, подтверждающим правоту модели, приведенную в работе [5], служило исследование биолюминесценции тест-штамма *E.colilum*⁺.

В опыте, с облучением питательной среды, проведенном нами, гидрофильными поверхностями выступали стенки кварцевой кюветы, а также поверхности молекул гидрофильных веществ, входящих в состав питательной среды MRS-1.

Известно, что $\lambda=4,9$ и $5,6$ мм являются резонансными частотами поглощения в жидкой воде [6].

После облучения СВЧ-излучением на $\lambda=4,9$ и $5,6$ мм наблюдается резкое снижение оптической плотности в УФ-диапазоне (рис. 2), что говорит о том, что среда становится более прозрачной для УФ-диапазона. Данное явление может происходить только за счет коллективного эффекта. Стоит отметить, что спектры поглощения питательной среды, облученной $\lambda=4,9$ и $5,6$ мм, практически идентичны, что говорит об одинаковых процессах, происходящих в среде под действием этих длин волн. На спектре отчетливо видно, что пики поглощения, соответствующие $\lambda=234$, 252 и 264 нм, практически исчезают после облучения. Небольшие пики в контроле на $\lambda=243$ и 352 нм также незначительны после облучения.

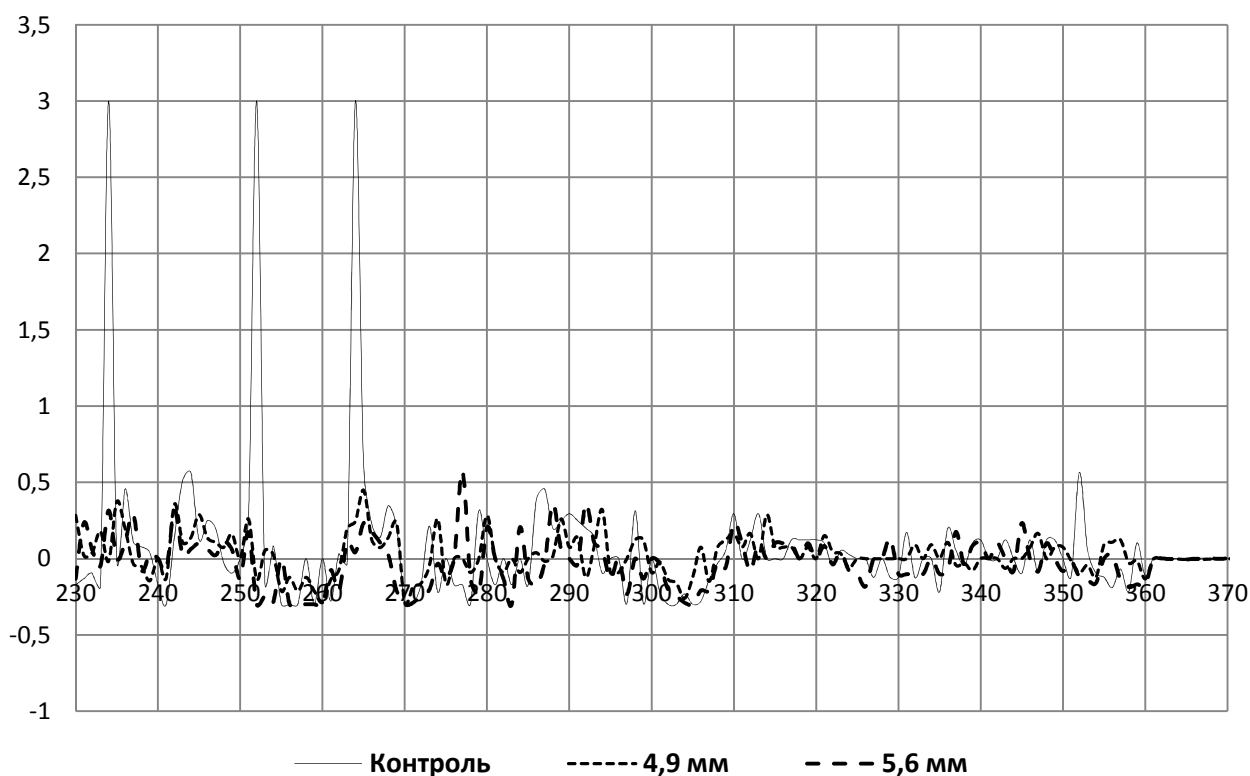


Рис. 2. Спектр поглощения питательной среды MRS-1 в УФ-диапазоне

Возможным молекулярным механизмом данного явления считается то, что молекулы становятся более поляризованными, а среда в целом становится более упорядоченной и ввиду этого приобретает свойства жидкого кристалла [10]. Другими словами, энергия излучения миллиметрового диапазона, поглощаясь молекулами, смещает их электронную плотность, повышает дипольный момент молекул, главным образом воды, усиливает водородные связи и приводит к молекулярным перестройкам на гидрофильных поверхностях.

Перетекание отрицательного заряда к поверхности вынуждает молекулы к переходу. Если частота электромагнитного излучения совпадает с собственной частотой колебательных переходов молекул воды, то этот эффект усиливается, что вызывает многоквантовые переходы между колебательными уровнями симметричной и ассиметричной мод через деформационную моду [6]. Перераспределенная электронная плотность запускает многослойную адсорбцию на гидрофильных поверхностях и уплотняет упаковку молекул воды с исключенными из себя растворенными веществами и ионами H^+ , что приводит к повышению колебательного возбуждения внутри сетки. Это означает, что электроны в адсорбированных слоях воды гораздо менее связаны, т.е. находятся в возбужденном состоянии, чем электроны вне зон многослойной адсорбции и, следовательно, для переизлучения квантов требуется меньше энергии, что и видно как снижение оптической плотности в спектре УФ-диапазона.

Измерение уровня люминесценции проб показало значительное повышение свечения относительно контроля (рис. 3). Более выраженное воздействие на люминесценцию оказало излучение с $\lambda=4,9$ мм (в первые десять минут после облучения уровень поднялся на 85 %), чем при облучении

пробы с $\lambda=5,6$ мм. Эффект стимуляции оставался на протяжении всего эксперимента и оставался стабильным после 3 часов для $\lambda=4,9$ на уровне 31 %. При облучении на $\lambda=5,6$ было увеличение уровня свечения до 55 % по сравнению с контролем, который аналогично падал в течение 3 часов, однако в сравнении с пробой, подвергшейся облучению на $\lambda=4,9$, уровень люминесценции после 3 часов начал расти и через 24 часа достиг первоначальной отметки 55 %.

Основываясь на мультиферментной модели строения и функционирования бактериальной люциферазы, приведенной в статье [9], эмиссия фотонов происходит благодаря возбуждению «эмиттера» за счет отдачи протона и двух электронов от FMNH₂. Таким образом, при воздействии СВЧ-излучения, вытесненные протоны из адсорбированных слоев воды на гидрофильной поверхности α -спирали люциферазы взаимодействуют с FMN и образуют FMNH₂, что, в свою очередь, и приводит к протеканию реакции свечения.

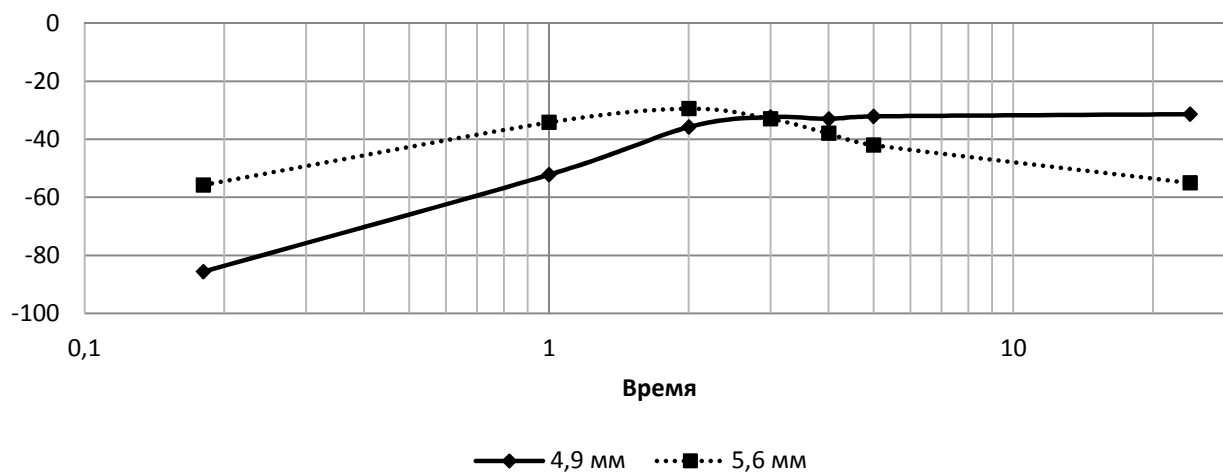


Рис. 3. Влияние СВЧ-излучения на биолуминесценцию *E. coli*l⁺.

Время экспозиции 60 мин

Заключение

Результаты исследования согласуются с результатами других авторов и показывают, что в основе воздействия СВЧ-излучения на живые организмы лежит влияние на процесс адсорбции и десорбции молекул воды на гидрофильных поверхностях.

Таким образом, обработка СВЧ-излучением на резонансных частотах культур микроорганизмов может привести как к положительным (стимуляция роста культуры), так и отрицательным (ингибирующий эффект) последствиям, что зависит от времени экспозиции, режима и мощности излучения. Также результат будет зависеть от конкретного микроорганизма, состава питательной среды, кислотности и внешних условий.

Список литературы

1. Борисенко Г. Г., Полников И. Г., Казаринов К. Д. Использование гидродинамической неустойчивости при микроволновом облучении жидких сред в биохимическом эксперименте // Электронная техника. Сер. 1. Электроника СВЧ. – 2007. – № 1(489). – С. 98–106.
2. Дрокина Т. В., Попова Л. Ю. Действие миллиметровых волн на люминесценцию бактерий // Биофизика. – 1998. – Т. 43. – Вып. 3. – С. 522–525.
3. Кузнецов Д. Б. Молекулярные механизмы воздействия инфракрасного излучения на микроорганизмы // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 4 (часть 2). – С. 414–418; URL: www.rae.ru/fs/?section=content&op=show_article&article_id=10000418 (дата обращения: 30.03.2013).
4. Кузнецов Д. Б. Перспективы применения электромагнитных излучений крайне высокой частоты малой мощности в фармации // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 10 (часть 2). – С. 400–404; URL: www.rae.ru/fs/?section=content&op=show_article&article_id=9999874 (дата обращения: 28.01.2013).
5. Кузнецов Д. Б. Физико-химические механизмы воздействия крайне-высокочастотного излучения на микроорганизмы // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 1; URL: <http://www.science-education.ru/107-8226> (дата обращения: 28.01.2013).
6. Рассадкин Ю. П. Вода обыкновенная и необыкновенная. – М.: «Галерея СТО», 2008. – 840 с.
7. Тамбиев А. Х., Кирикова Н. Н., Бецкий О. В., Гуляев Ю. В. Миллиметровые волны и фотосинтезирующие организмы. – М.: Радиотехника, 2003.
8. Chai B., Yoo H., Pollack G. H. Effect of radiant energy on near-surface water. J. PhysChem B 113(42):13953-13958. – 2009.
9. Nealson K. H., Hastings J. W. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance // Microbiol. Rev. – 1979. – V. 43. – № 4. – P. 496–518.
10. Zheng J. M., Pollack G. H. Long-range forces extending from polymer-gel surfaces. Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft. Matter. Phys. 2003; 68:031408. [PubMed].

Благодарности

Выражаю благодарность моему научному руководителю, проф. Т.Ф. Одеговой, сотрудникам ФАРМАТЕСТ, зав. кафедрой токсикологической химии Т.Л. Малковой за предоставленное оборудование, начальнику отдела бактериотерапии В.А. Несчисляеву и Директору Филиала ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России «Пермское НПО «Биомед» А.В. Казьянину, а также рецензентам.

Рецензенты:

Ростова Наталья Борисовна, доктор фармацевтических наук, профессор, должность – профессор, ГБОУ ВПО Пермская государственная фармацевтическая академия Росздрава, г. Пермь.

Гейн Владимир Леонидович, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой физколлоидной химии, ГБОУ ВПО Пермская государственная фармацевтическая академия Росздрава, г. Пермь.