

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«ПЕРМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ГУМАНИТАРНО-
ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ЕСТЕСТВЕННОНАУЧНЫЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра ботаники

Выпускная квалификационная работа

**ВЛИЯНИЕ НЕМОДУЛИРОВАННОГО СВЧ - ИЗЛУЧЕНИЯ НА РОСТ
КУЛЬТУР *ESCHERICHIA COLI***

Работу выполнила:
студентка z651 группы
направления подготовки
44.03.01 Педагогическое
образование, профиль «Биология»
Калугина Наталья Юрьевна

(подпись)

«Допущена к защите в ГАК»

Зав. кафедрой

Руководитель:

кандидат биологических наук,

доцент кафедры ботаники

Лаврский Алексей Юрьевич

(подпись)

(подпись)

« ____ » _____ 20__ г.

ПЕРМЬ

2018

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1 Биологические особенности объекта исследования.....	6
1.2 Электромагнитное излучение и его природа.....	8
1.3 Влияние СВЧ-излучения на живые организмы.....	9
1.3.1 Влияние ЭМИ на эукариот.....	10
1.3.2 Влияние ЭМИ на прокариот.....	16
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	20
2.1. Культура <i>Escherichia coli</i> на среде МПА и планиметрический метод учета роста бактерий.....	20
2.1.1 Закладка опыта.....	20
2.1.2 Снятие опыта.....	24
2.2 Суспензионно-фотометрический метод.....	25
2.2.1 Закладка опыта	25
2.2.2 Снятие опыта.....	27
ГЛАВА 3.РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	30
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	35
Список литературы.....	37
Приложение.....	40

Введение

В наше время, в постиндустриальный век, актуальна тема электромагнитного излучения, а так же проблемы влияния на организмы ЭМИ (СВЧ) - излучения различных диапазонов. Так же актуальности указанным темам добавляет возрастание уровня электромагнитного СВЧ - излучения вокруг мест жительства людей и их пределах. В частности идет активное изучение физических явлений (акустических волн и электромагнитных излучений) на биологические системы разного уровня организации; ферментов, клеток, поведенческих реакций животных и развитие реакций в цепях.

Развиваются исследования по оценке экологических последствий влияний на биогеоценозы таких раздражителей, как СВЧ - излучения и УФ - радиации. В России исследования воздействий электромагнитных полей на организмы ведутся более полувека. Была проведена колоссальная работа об отрицательном влиянии магнитных и электромагнитных полей. Уже во второй половине XX века были зафиксированы новые заболевания «Радиоволновая болезнь» или «Хроническое поражение микроволнами». В дальнейшем, в результате опытов и исследований русских ученых было установлено, что максимально чувствительной к воздействию электромагнитных полей, является нервная система человека. Результаты проведенных работ были использованы при разработке санитарных нормативных документов в России.

В Швеции "электромагнитную аллергию" считают заболеванием, однако, Всемирная Организация Здравоохранения классифицирует данную реакцию организма, как "возможное заболевание", симптомы которого – головная боль, хроническая усталость, расстройства памяти.

Но влияние электромагнитного поля нельзя характеризовать как однозначно негативное – электромагнитное излучение используется в физиотерапии для лечения многих заболеваний: оно способствует регенерации тканей и оказывает противовоспалительный эффект.

В Пермском государственном гуманитарно-педагогическом университете так же проводились исследования влияния электромагнитного излучения на процесс митоза в клетках растений, на скорость митотического деления и частоты возникновения хромосомных aberrаций в меристеме.

Объектом исследования в данной работе является кишечная палочка *Escherichia coli*, наиболее распространенный тестовый штамм ATCC25922 (Американской коллекции типовых культур). Предметом исследования – влияние немодулированного ЭМИ низкой интенсивности на рост культур этой бактерии.

В этой работе изучается действие электромагнитного излучения на клетки прокариот, в частности на рост колоний кишечной палочки (*Escherichia coli*) штамма ATCC25922 на агаризованных средах и в суспензионной культуре.

Выбор бактерии *E. coli* объясняется быстрой сменой поколений у этого организма и небольшим размером генома, что позволяет за короткий период времени исследовать процессы, которые у более сложных организмов занимают тысячелетия. Благодаря тому, что эта бактерия десятилетиями используется в молекулярной биологии, она хорошо исследована, технологии работы с ней хорошо отлажены.

Цель: изучение влияния немодулированного СВЧ-излучения на рост культур кишечной палочки (*Escherichia coli*) штамма ATCC25922 на агаризованных средах и в суспензии.

Задачи:

1. Используя чистую культуру *E.coli*, произвести облучение растущих колоний электромагнитными волнами разной частоты в пределах 3 ггц.
2. С помощью метода планиметрического учета оценить влияние облучения на размеры колоний, путем сравнения с контрольной группой, не подвергавшейся облучению.

3. Проанализировать влияние СВЧ излучения различной частоты на суспензионные культуры *E.coli*, с использованием фотометрического учета численности микроорганизмов после инкубации.
4. Сравнить динамики роста бактерий на твердых агаризованных средах и в суспензионной культуре и оценить их корреляцию. Проанализировать влияние на рост бактерий отдельных участков исследуемого спектра.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Биологические особенности объекта исследований

Эшерихии (*Escherichia*) - род палочковидных перитрихальных аспорогенных грам-хемоорганотрофных факультативно-анаэробных бактерий из сем. *Enterobacteriaceae*. В роду выделяют виды: *E. coli*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris*.

Кишечная палочка *Escherichia coli* – бактерия, которая способна к росту без доступа кислорода и не образует эндоспор, в результате жизнедеятельности выделяются углекислый газ и другие газы, выделяя в том числе - молекулярный водород. Клетки имеют вид палочки с закругленными концами, размером - 0,4-0,8 на 1-3 мкм. Объем клетки обычно $0,6-0,7\mu\text{m}^3$. Имеют органы движения - жгутики. Жгутики расположены перитрихально (рис.1). На конце жгутика расположен белок FimH, который прикрепляется к молекулам сахаров на поверхности, а сам жгутик состоит из цепочки взаимосвязанных белковых сегментов, закрученных в форме тонкой длинной пружины и упруго вытягивающихся при воздействии силы.

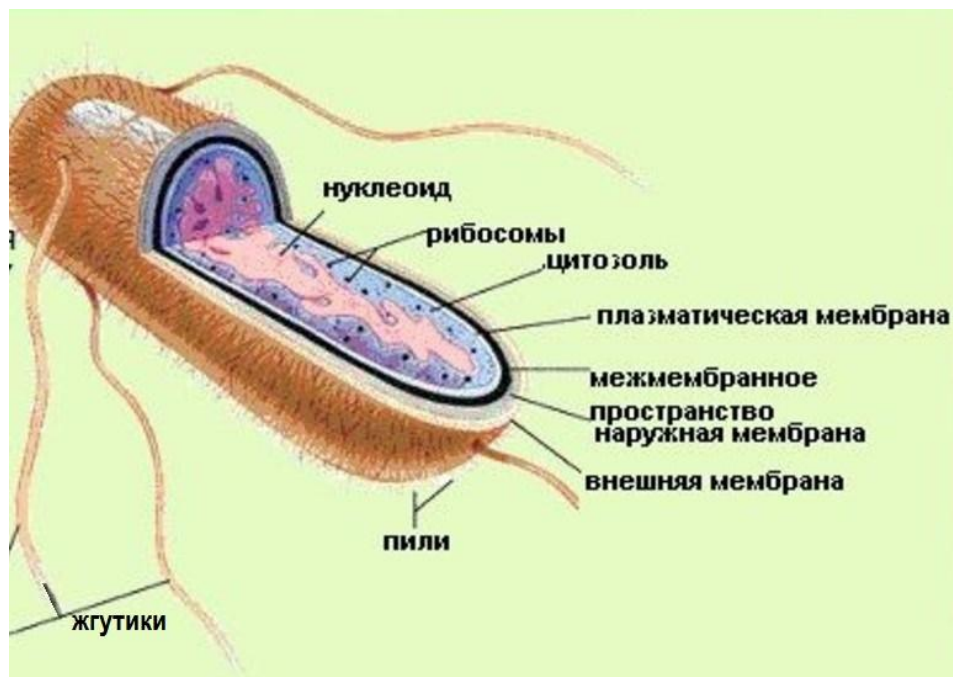


Рис.1 Внешний и внутренний вид *Escherichia coli*

Наиболее интенсивный рост происходит при температуре 37, а иногда возможен до 49°C. Рост может стимулироваться дыханием, различными парами окислителей и восстановителей.

Кишечная палочка используется в качестве исходного материала при проведении микробиологических исследований. Культивируемые штаммы, например, *Escherichia coli* K12 хорошо приспособлены к росту в искусственной среде, и, в отличие от штаммов дикого типа, неспособны заселять кишечник. Многие лабораторные штаммы утратили способность формировать биологические плёнки. Данные функциональные особенности предохраняют штаммы дикого типа от антител и химических агентов, но требуют больших затрат вещества и энергии.

В первой половине XX века было описано явление конъюгации бактерий, используя кишечную палочку в качестве модельного организма, *Escherichia coli* широко используется при изучении конъюгации и в настоящее время (Lederberg, Tatum, 1946). *Escherichia coli* была важным компонентом первых экспериментов по генетике бактериофагов, ранние исследователи использовали *Escherichia coli* и вирус фаг T4 для изучения структуры генов (<https://ru.wikipedia> [15]) .

Кишечная палочка *Escherichia coli* была одним из первых бактерий, чей геном был полностью расшифрован.

Эволюционные изменения *Escherichia coli* в лабораторных условиях были изучены в результате долговременного эксперимента по эволюции (Докинз, 2012). В данном эксперименте одна популяция *Escherichia coli* получила возможность аэробно метаболизировать цитрат. Такая способность встречается крайне редко у *Escherichia coli*. Способность к росту в аэробных условиях используют для того, чтобы отличить *Escherichia coli* от других, родственных бактерий.

Escherichia coli широко используется в современной промышленной микробиологии и биологической инженерии. Работа Стенли Нормана Коэна и Герберта Бойера на *Escherichia coli*, с использованием плазмид и

эндонуклеаз рестрикции для создания рекомбинантной ДНК, находится у истоков современной биотехнологии (Рыбчин, 2002).

Кишечная палочка является универсальным организмом для преобразования чужеродных белков. Биосинтез белков для промышленной ферментации осуществляется путем ввода генов в *Escherichia coli* при помощи плазмид. Также разработаны системы для синтеза в *Escherichia coli* рекомбинантных белков. Например, использованием технологии рекомбинантных ДНК является синтез аналога инсулина человека. Модифицированные *Escherichia coli* используются в медицине, например, при разработке вакцин, синтеза иммобилизованных ферментов и решения других задач.

В качестве биологических объектов, при изучения эффектов взаимодействия с низкоинтенсивными миллиметровыми волнами, микроорганизмы были первыми, по этой причине объектом моей работы стали именно бактерии и в частности *Escherichia coli*.

1.2. Электромагнитное излучение и его природа

Электромагнитное излучение — это электромагнитные волны, которые возникают при возмущении магнитного или электрического поля.

Электромагнитные волны классифицируются:

- радиоволны (начиная со сверхдлинных);
- терагерцевое излучение;
- инфракрасное излучение;
- видимый свет;
- ультрафиолетовое излучение;
- рентгеновское излучение и жёсткое (гамма-излучение).

Радиоволны — электромагнитное излучение с длинами волн в электромагнитном спектре длиннее инфракрасного света. Радиоволны имеют частоту от 3 кГц до 300 ГГц, и соответствующую длину волны от 1 миллиметра до 100 километров. Как и все другие электромагнитные волны,

радиоволны распространяются в вакууме со скоростью света. Различают, как естественные, так и искусственно созданные радиоволны. Искусственно созданные радиоволны используются для средств радиосвязи, навигационных систем, компьютерных сетей, и многих других задач.

Микроволновое излучение, сверхвысокочастотное излучение (СВЧ-излучение) – электромагнитное излучение, включающее в себя дециметровый, сантиметровый и миллиметровый диапазон радиоволн (длина волны от 1 м, частота 300 МГц до 1 мм, 300 ГГц). Различают микроволновые излучения малой и большей интенсивности. Основным источником микроволновых излучений высокой интенсивности служат электровакуумные приборы (лампы) - магнетроны. Испускаемое ими излучение используется для бесконтактного нагрева тел (например в СВЧ печах), радиолокации и в средствах дальней связи. Низкоинтенсивными источниками служат различные полупроводниковые приборы обычно на основе арсенида галлия. Они входят в состав современных электронных устройств, таких как сотовые телефоны, WiFi – модули компьютеров, роутеров, точек доступа и т.д.

1.3. Влияние СВЧ-излучения на живые организмы

Источники электромагнитного излучения встречаются нам во всем окружающем нас мире. Высокая интенсивность ЭМИ может отрицательно воздействовать на биогеоценоз.

Внедрение электромагнитной энергии во все области человеческой деятельности привело к добавлению существующему естественному фону электромагнитных полей техногенного характера, уровень которых существенно превышает уровень естественного электромагнитного фона.

Широкое распространение ЭМИ и их быстрое проникновение во все сферы деятельности человека повлияли возникновению новой группе загрязнителей, получившей название «электромагнитный смог», под которым понимают совокупность ЭМП и различных излучений, возникающих во время работы сложного электромагнитного оборудования.

Спектр частот ЭМИ очень широк и охватывает диапазон длин волн: от десятков и сотен километров до долей нанометров; от радиоволн малой частоты до ионизирующего излучения в виде космических лучей.

Многие ученые исследуют воздействие электромагнитного излучения на флору и фауну. Стоит отметить, что воздействие ЭМИ на различные живые организмы, начиная от бактерий и заканчивая человеком, совершенно различно. Впервые действие ЭМИ на живые организмы упоминаются в литературе в 1966 году.

За последние 25-30 лет было проведено существенное количество работ по изучению эффектов и поиску механизмов действия ЭМИ КВЧ, как на изолированные клетки, так и высокоорганизованные организмы.

Благодаря Данилевскому В. Я. мир узнал экспериментальные и теоретические основы проблемы биологического действия электромагнитного излучения - от клеток до организмов, описанные в его двухтомной монографии (Данилевский, 1900—1901).

Актуальность изучения биологических эффектов низкоинтенсивных ЭМИ определяется несколькими обстоятельствами:

- актуализацией изучения влияния экологических факторов и техногенной среды на человека и другие живые организмы;
- необходимостью определения научно обоснованных безопасных норм труда при работе на установках, генерирующих ЭМИ;
- широким применением в медицине и в быту.

1.3.1 Влияние СВЧ - излучения на эукариот

Рассмотрение литературных данных о действии ЭМИ на субклеточном уровне может помочь конкретизировать наши представления о вероятных путях воздействия на организмы этого вида излучения.

Одно из направлений изучения первичных реакции живых организмов на действие ЭМИ - исследования на изолированных клетках и простейших организмах. Клеточные препараты удобны для исследования биологических эффектов ЭМИ, по нескольким причинам:

- в большой степени сохраняют характерные им функции;
- легко доступны для различного биохимического воздействия;
- облегчают анализ результатов и позволяют определять степень излучения.

На сегодняшний день выявлено воздействие СВЧ-излучения на все стороны жизнедеятельности микроорганизмов – морфологию, культуральные, физиологические, физические свойства и биохимический состав.

При дальнейших опытах, выполненных с другими микроорганизмами (актиномицеты, плесневые, дрожжеподобные и микрофильные грибы, дрожжи) было определено, что под воздействием миллиметровых волн низкой интенсивности изменяется их характер жизнедеятельности. Например, облучение волнами миллиметрового диапазона влияло:

- на митоз клетки;
- на синтез ферментов;
- на ферментацию;
- на фенотип микроорганизмов.

А. П. Кузнецов с соавторами, исследовавшие эффекты ЭМИ на жизненные процессы дрожжей, также обнаружили отсутствие однонаправленных изменений под воздействием СВЧ-излучения. По мнению исследователей, отсутствие однозначных зависимостей между экспозицией и эффектом является одной из ключевых особенностей ЭМИ (Голант, Кузнецов и др., 1994).

По результатам многочисленных исследований, наиболее остро реагирующими на действие ЭМИ КВЧ являются клетки иммунной системы и периферической крови, что подтверждает проведенное исследование действий низкоинтенсивного модулированного ЭМИ на функциональную активность нейтрофилов мыши *in vitro* (Аловская, Гапеев и др., 1997)

Установлено увеличение функциональной активности лимфоцитов и нейтрофилов крови под действием КВЧ-излучения, найдено частотно-зависимое ингибирование исходно повышенного НСТ-теста у моноцитов и нейтрофилов, изменение активности фагоцитоза, уровня хемилюминесценции лейкоцитов.

Под влиянием ЭМИ КВЧ на лимфоциты и фибробласты человека активизируется синтез фитокина, воздействующий на клетки этой линии подобно фактору роста. Предполагается, что изменения в жизнедеятельности клеток крови под действием ЭМИ КВЧ связаны с влиянием на клеточную мембрану и кальций-регулируемую активность, однако, конкретные биофизические механизмы этого влияния неизвестны.

Результаты опытов доказывают и о высокой чувствительности эритроцитов к ЭМИ миллиметрового диапазона. Так, ЭМИ КВЧ достоверно увеличивает скорость оседания эритроцитов *in vitro*, что имеет возможность быть связано с увеличением их объединения.

Большое количество работ посвящено изучению действия ЭМИ КВЧ на клетки возбудимых тканей. Так, были выявлены эффекты изменения при КВЧ - воздействии спонтанной электрической активности одиночных нейронов мозга *Taeniopygia guttata*.

Было исследовано влияние ЭМИ КВЧ (61,22 и 75,0 ГГц) на спонтанную электрическую активность пейсмекерных нейронов моллюска и показано развитие динамической реакции торможения электрической активности нейронов (Алексеев, Зискин, 1997). Обнаружены влияния микроволн не только на рецепторы, но и на нервные волокна, установлено стимулирующее действие КВЧ - излучения с длиной волны 5,6 мм на рост нейритов сенсорных нейронов и пролиферацию глиальных элементов (Акоев, Авелев и др., 1992). Опыты, проведенные на отдельных нервных препаратах (аксон кальмара, седалищный нерв лягушки и др.), доказали возможность непосредственного воздействия миллиметрового излучения на периферические элементы нервной системы. Было обнаружено

стимулирующее влияние ЭМИ на восстановление периферических нервов, ускорение их роста и процессов формирования миелиновых оболочек вокруг отростков нервных клеток в период их созревания.

Под влиянием ЭМИ КВЧ (54 ГГц, 5 мкВт/см²) наблюдалось ускорение процесса регенерации проводниковой функции седалищного нерва лягушки, свидетельствующее о том, что действие микроволн оказывает воздействие на процесс восстановления амплитуды потенциала действия. При разьяснение полученных данных, авторы работ делают вывод о возможности специфического действия ЭМИ КВЧ на электровозбудимые клетки.

Установлено, что ЭМИ КВЧ на разных частотах может взаимодействовать с различными участками биомакромолекул . Интересные данные получены по воздействию КВЧ - излучения на молекулы гемоглобина, при этом на резонансных частотах эти молекулы могут переходить в новые конформационные состояния. При этом на резонансных частотах перестраивается третичная структура в глобиновой части молекулы, спектров преобразуются ее динамические свойства (Дерягин, Голованов, 1986).

Исследования оптического поглощения гемоглобина после КВЧ - облучения показали изменение спектра поглощения в области 630 нм, доказывающее о частичном окислении железа, и увеличение скорости перехода оксигемоглобина в метгемоглобин (Андреева, Дмитриева и др., 1976).

К иным эффектам взаимодействия ЭМИ КВЧ с клеточными объектами можно отнести следующие факты:

- способность миллиметровых волн инициировать синтез АТФ в клетках;
- генерация с помощью ЭМИ КВЧ резонансных колебаний мембран митохондрий, приводящих к увеличению биохимических процессов в клетке.

Биологические мембраны имеют универсальное значение в жизнедеятельности клеток различного типа благодаря наличию в них специализированных белков-рецепторов, способности контролировать энергетические и биохимические процессы в клетке, а также создавать водное пространство внутри и снаружи клетки (Гапеев, Черемис, 2000).

Установлено, что в клеточных мембранах есть колебания дипольных групп, что определяет возможность резонансного взаимодействия ЭМИ с мембранной структурой живой клетки. Литературные данные по влиянию ЭМИ именно на мембраны включают в себя исследования возбудимых и невозбудимых клеток, модельных систем – липосом и бислойных липидных мембран (Arber, Lin, 1985). В одной из работ было показано понижение величины мембранного потенциала нервных клеток, изолированных ганглиев моллюска в результате действия ЭМИ, причем величина эффекта зависела от поглощенной энергии излучения. Явление деполяризации мембраны под действием излучения связывалось авторами этой работы с изменением мембранной проницаемости для ионов, ответственных за генерацию мембранного потенциала. Некоторые исследователи отмечали гиперполяризацию мембран возбудимых клеток при облучении (Мирутенко, Богач, 1975).

Большое количество работ по изучению воздействия ЭМИ на мембранные системы посвящено исследованию проницаемости мембран невозбудимых клеток (эритроцитов, лимфоцитов). Мембраны эритроцитов, циркулирующих в капиллярном русле, меняя свои барьерные свойства при действии излучения, могут оказывать регуляторное действие, как на весь организм в целом, так и на отдельные органы. Благодаря работам С. А. Ильиной доказано (Ильина, 1987):

- уменьшение осмотической устойчивости мембран эритроцитов под действием ЭМИ;
- уменьшение проницаемости мембран для ионов калия на 30-40% по сравнению с необлученными образцами;

- снижение ионной проницаемости мембран эритроцитов, увеличенной в результате электрического пробоя;
- увеличение электрической прочности эритроцитов при действии ЭМИ КВЧ (40-50 ГГц, 1-5 мВт/см²).

Таким образом, итоги экспериментальных работ показывают высокую чувствительность клеточных мембран к ЭМИ КВЧ низкой интенсивности. КВЧ-излучение нетепловых интенсивностей способно преобразовывать структурные перестройки в мембранах, что сопровождается переменной ионной проводимости клеточных мембран и быстрым закрытием пробойных каналов ионных утечек.

Обобщая результаты изучения влияния ЭМИ на клетки и клеточные мембраны, можно сделать вывод, что биологические эффекты, полученные опытным путем на различных микроорганизмах и клеточных культурах, имеют много одинаковых закономерностей. При облучении клеток ЭМИ КВЧ наблюдаются как функциональные, так и структурные метаморфозы. Мембраны могут играть ключевую роль в эффективном восприятии и дальнейшем проявлении действия ЭМИ КВЧ в функциональных изменениях на уровне всей клетки. Первичное действие КВЧ-излучения состоит в корректировке проницаемости мембран и их транспортных функций. Однако вопрос о конкретных физико-химических механизмах рецепции КВЧ-излучения на мембране и последующей передаче возбуждения к внутриклеточным структурам требует дальнейших исследований, но, независимо от природы этих мишеней, действие ЭМИ КВЧ можно рассматривать на уровне систем внутриклеточной регуляции. Живая клетка в определенных состояниях может оказаться высокочувствительной к воздействию ЭМИ, поэтому, подбирая параметры излучения, можно целенаправленно воздействовать на те или иные функции клетки. Но объясняя действие ЭМИ на уровне сложного организма нельзя ограничиваться изучением реакций только субклеточных и клеточных систем. Стоит отметить, что чувствительность к внешним ЭМП максимальна

у целостных организмов по сравнению с изолированными клетками и органами, макромолекулами (Пресман, 1974). Потому как, с одной стороны, это является следствием роли миллиметровых волн в процессах жизнедеятельности, когда клетка с клеткой «разговаривает на языке данных волн», а с другой стороны, это можно объяснить пространственной организацией биологических структур.

Рассмотрев данные факты, стоит отметить о необходимости изучения, как первичного восприятия ЭМИ, так следующего за ним отклика на уровне физиологических реакций целого организма с учетом многочисленных функциональных связей между органами и системами органов. Тем более, что рецепции информационных ЭМИ возникают на уровне сложноорганизованных биологических систем и полностью проявляются только в целостном организме.

1.3.2 Влияние ЭМИ на прокариот

О влиянии ЭМИ на эукариотические клетки и организмы существует достаточно много разнообразной информации, но не менее важным является вопрос о действии этого фактора на прокариоты. Эти вопросы важны, так как прокариоты являются важной частью окружающей среды и внутренней микрофлоры человека и животных, а также активно используются в современной биотехнологии. Также бактерии чрезвычайно удобны в качестве экспериментальной биологической тест – системы, поскольку намного менее трудоемки в культивировании, и перспективны при хорошей корреляции реакций на факторы с эукариотическими системами.

Под влиянием СВЧ-облучения наблюдалось ослабление пигментации и уменьшение размеров колоний Золотистого стафилококка (*Staphylococcus Aureus*). Показана возможность предотвращения репрессивного воздействия реагентов на клетки пивоваренных дрожжей путем их предварительного облучения ЭМИ КВЧ и восстановления жизнедеятельности культуры микроорганизмов путем их облучения после репрессии (Исаева, 1991).

Влияние ЭМИ может реструктурировать клетки. Данный факт подтверждается экспериментами с микробами коклюша (Алексеева, 1995). Так же данные исследования показали что электромагнитные излучения влияют на изменение иммунологических свойств данных клеток. Эти свойства оценивались по наличию поверхностных антигенов – агглютиногенов 1, 2 и 3.

В работе Холодной Л.С. было показано, что миллиметровые волны модифицируют иммунологические свойства антигенов стафилококка. Кроме того, было обнаружено, что основной патогенный фактор стафилококка – белок А – изменяет свою способность взаимодействия с иммуноглобулинами после облучения электромагнитными волнами (Холодная, 1995).

Исследования эффектов электромагнитного излучения на фотосинтезирующие микроорганизмы *S.platensis* и *P.vividis* установили, что такое воздействие стимулирует их рост, увеличивает содержание хлорофилла в клетках и интенсифицирует выход кислорода. В этой работе подтверждается, что первичное действие электромагнитного излучения по изменению проницаемости мембран и, соответственно, транспорта ионов натрия и нитрат-ионов приводит к смещению равновесия между дыханием и фотосинтезом в направлении последнего (Тамбиев, 1995).

Аналогичные исследования на бактериях *btilis* показали наличие частот, на которых воздействие электромагнитного излучения стимулировало рост биомассы и производительность по белку. Были также найдены частоты, воздействие на которых подавляло функциональную активность этих микроорганизмов. Стимуляция проявлялась в увеличении биомассы на 30 % , а подавление – в уменьшении на 50 % относительно контрольных величин. Таким образом, миллиметровые волны изменяют метаболизм бактерий *btilis*, но модифицируют не весь процесс в целом, а влияет на различные метаболические реакции в зависимости от действующей частоты (Криницкая, 2001).

Выявлены эффекты КВЧ-излучения, влияющий на метаболизм микроорганизмов (кишечной палочки, цианобактерий):

- значительное ускорение роста и увеличение биомассы фотосинтезирующих бактерий;
- усиление процессов фотосинтеза, сопровождающаяся повышением выделения O_2 и содержания в клетках фотосинтезирующих пигментов;
- увеличение выделения органических соединений в среду;
- изменение реакционной способности экзометаболитов;
- изменение транспорта ионов и макро — и микроэлементного состава клеток;
- также снижение токсического действия ряда химических веществ (Тамбиев, Кирикова, 2000; Тамбиев и др., 2003).

Кишечная палочка - один из наиболее распространенных модельных микроорганизмов, одна из причин — надежда на то, что открытые при ее изучении закономерности окажутся свойственны и другим более или менее похожим организмам. Зачастую использование модельных организмов обусловлено отсутствием технической возможности проведения аналогичных исследований на человеке, так же немаловажно этическая сторона данной замены. Так же причинами использования модельных организмов являются схожесть происхождения всех живых организмов, в механизмах хранения и реализации наследственной информации, метаболизме и т.д. Следует отметить и преимущества данной замены - быстрая смена поколений, возможность генетических манипуляций.

Значимое воздействие ЭМИ (136 ГГц, ППМ 7 мкВт) на процессы размножения клеток было найдено в опытах с кишечной палочкой (*Escherichia coli*). Наблюдалось замедление роста клеток в облученной культуре, составляющее через 4 часа облучения около 600%. Стоит отметить действие ЭМИ и на обмен веществ клеток, особенно в первый период роста. Были установлены частоты, пропорциональные наибольшему поглощению

излучения клетками и доказано, что частоты поглощения излучения клетками и клеточными компонентами совпадали. Под воздействием ЭМИ выявлена высокая степень взаимозависимости между скоростью размножения кишечной палочки и показателями белкового, фосфолипидного, энергетического обменов клеток, дегидрогеназной активностью.

Так же интересны исследования о воздействии низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ на наследственный аппарат клетки. Наличие мутагенных эффектов миллиметрового излучения было изучено во второй половине XX века, а более поздние исследования подтверждают результаты этой работы. Тогда же, проведенные опыты указывают на способность миллиметровых волн влиять на структуру и функции хромосом, клеточную неустойчивость к стандартным мутагенам и негативным влияниям.

Работы И.Ю. Беляева и В.Г. Кравченко посвящены изучению воздействия ЭМИ на конформационные состояния генома *E. Coli.* и хроматина в тимоцитах крысы (Беляев, Кравченко, 1994).

В настоящее время исследования о воздействии ЭМИ КВЧ на организмы продолжаются, так как весь спектр реакций как целого организма, так и отдельно взятой клетки на ЭМИ различных величин еще полностью не раскрыт (возникают все новые и интересные факты). В частности продолжается исследования по воздействию ЭМИ на *Escherichia coli* из-за широкого использования данного микроорганизма, как биологического материала, как в промышленности, так и в медицине.

Глава 2. Материалы и методы исследований

В разные годы использовались 2 варианта эксперимента на культуре, сначала использовался более простой метод - облучались растущие колонии на твердой среде МПА. Затем была применена более точная и совершенная методика сформированная на основе методических указаний института эпидемиологии (Семина, Сидоренка и др., 2004), методика была адаптирована для выполнения поставленных в исследовании задач.

В обоих случаях применялись различные методики учета роста культур микроорганизмов, что связано с особенностями культивирования. В первом случае применялся планметрический учет – по площади колоний на сканах, во втором - фотометрический, являющийся более точным, и позволяющий оценить прирост М.О, в КОЕ/мл. Более подробно методики постановки опытов описаны ниже.

2.1. Культура *Escherichia coli* на среде МПА и планметрический метод учета роста бактерий

2.1.1 Закладка опыта

Для получения максимально схожих колоний М.О. использовался «матричный посев» по шаблону, помещаемому под дно чашки Петри. Шаблон представлял собой матрицу крестов 5*5 (Рис.2). Чашка Петри устанавливалась в центр шаблона, ориентируясь по кресту, и больше не двигали в течение всего посева. При соблюдении общих правил асептики, и работы с чистыми культурами МО производился «матричный посев» *E.coli* на агар. Таким же образом засевали 25 точек в чашке Петри, и все 4 чашки на один опыт. Все дальнейшие манипуляции производились с перевернутыми чашками Петри.

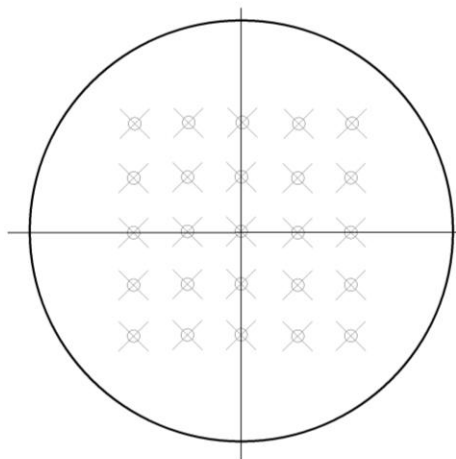


Рис.2 Шаблон для матричного посева кишечной палочки (*Escherichia coli*) на МПА

Две чашки Петри инкубировали в воздушном термостате при температуре 37,0 °С (контроль), а другие две чашки маркировались датой и частотой ЭМИ и помещались в жидкостный термостат, совмещенный с облучателем, заключенный в экранированный и заземленный металлический кожух (рис.3). Установка чашек Петри в облучатель производилась по меткам на дне, таким образом, чтобы элементы антенны - облучателя точно находились над колониями МО. В кожухе термостата размещался зонд - антенна анализатора спектра, через который производилась калибровка и установка уровня излучения (на дальней чашке Петри зонд располагался сверху дна, и попадает в предел круга разметки на дне). В термостатируемый облучатель постоянно подавался воздух с помощью микрокомпрессора, чтобы исключить влияние нестабильности состава воздушной среды (кожух сам по себе не предполагает вентиляции).

При данной схеме исследуемый материал облучается равномерно, а так же позволяет измерять действующую амплитуду колебаний в разных участках зоны роста при помощи анализатора спектра с заранее откалиброванной шкалой.



Рис.3 Жидкостный термостат-облучатель для инкубаций бактерий на агаризованных средах

- 1) Внешний экранирующий кожух облучателя;
- 2) Корпус жидкостного термостата;
- 3) Шланги теплоносителя жидкостного термостата;
- 4) Крышка жидкостного термостата;
- 5) Антенна облучателя;
- 6) Чашки Петри;
- 7) Антенна анализатора спектра;

В качестве эталонного источника использовался телефон, работающий в диапазонах GSM-850, 900, 1800, 1900, с ручным переключением, для измерения начального уровня мощности. Показатель SAR (Specific Absorption Rate) для данной модели телефона равно 0,74 Вт/кг, что подобно передатчику, работающего в GSM среднего уровня мощности.

С помощью устройства-эмулятора подбирался источник излучений равной мощности, но разных частот. На данном этапе опытов было необходимо измерить влияние немодулированного излучения.

В виде источника исходного сигнала использовался генератор РГШ- 3000 разработанный ООО «Радий-ТН», диапазон которого 1-3000 МГц, с функциями программного аттенюатора и модуляции сигнала. Сигнал с РГШ- 3000 поступал на усилитель на основе микросхемы GSM-передатчика SKY77325, и настраивался с помощью анализатора спектра до требуемого уровня, для поправки неравномерности АЧХ выходного тракта системы. Установка частоты производилась программно. В программе – драйвере генератора «Generator USB» устанавливали частоту, в соответствии плану опытов: 301, 601, 881, 1200, 1537, 1792, 2250 в МНz, и включали генератор (рис.4).

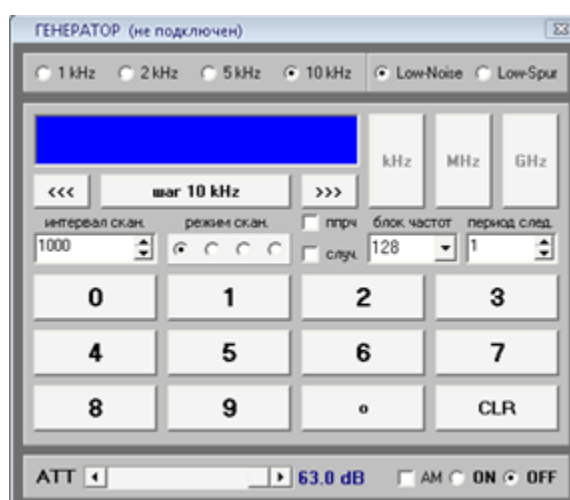


Рис. 4 Программное обеспечение генератора РГШ-3000, «Generator USB»

На анализаторе спектра устанавливали показатель на табличное значение шкалы.

После включения усилителя, устанавливали подстроечным резистором ток, следя за тем, чтобы ток не превышал 600 миллиампер, а пик достигал 3-4 делений в высоту (что соответствует заданной мощности сигнала).

Опыт проводился при экспозиции 24 часа.

2.1.2 Снятие опыта

После 24 часов инкубации при установленных условиях производился контрольный замер амплитуды колебаний, после чего источник излучения отключался. Все 4 чашки Петри (2 подвергавшихся облучению, и 2 контрольных) помещались в стандартный планшетный сканер, после чего сканировались с разрешением 600dpi на темном фоне (рис.5).

После сразу следовал запуск следующего опыта.

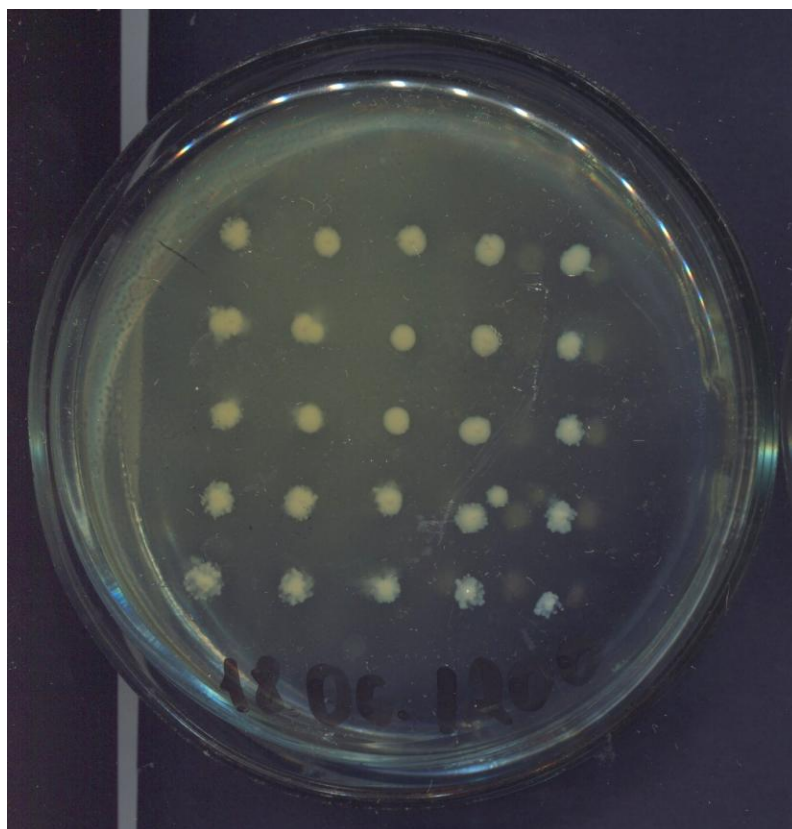


Рис.5 Сканы чашек Петри подвергшихся облучению

Анализ изображений колоний осуществлялся при помощи программы – координатного процессора CooRecorder и MS Excel вычислялись площади колоний на полученных сканах (прил.1).

2.2. Суспензионно-фотометрический метод

2.2.1 Закладка опыта

При суспензионно-фотометрическом методе анализа роста колоний *E.coli* ,для единичного опыта использовались две цельные стандартные планшеты 8*16 лунок с крышками (для инкубации), и одна разборная фотометрическая планшета с П-образным дном лунок (рис.6).

Планшеты являются одноразовыми при их использовании в иммунологических исследованиях, из-за прочного связывания компонентов ИФА - диагностических систем со стенками лунок. В случае суспензий М.О. такой проблемы не возникает, по этой причине планшеты стерилизовались низкотемпературными методами и использовались повторно. Значимого влияния на результаты фотометрии не отмечалось, и визуально цельные планшеты и отдельные фотометрические модули не отличались от новых. При появлении желтизны или помутнений планшеты выбраковывались.

Стерилизация планшет осуществлялась в течение суток в 2% растворе универсального антисептика «3D - sept» в герметичном эксикаторе. Затем они промывались под проточной водой, подвергались сушке, и дополнительно стерилизовались в пакетах из крафтовой бумаги или полиэтилена в СВЧ печи в течение 5 мин. Все дальнейшие манипуляции с посевом осуществлялись в УФ - боксе, где хранились также штативы с наконечниками для микропипеток и калибровочные растворы на ГРМ - бульоне. Тестовые засевы планшет подтверждают их стерильность.

Инкубационные планшеты засевали по 210 мкл свежей суспензии бактерий, в одну - опыт, в другую – контроль. Данные суспензии получали, добавляя в 10 мл ГРМ бульона 1 мл исходной суспензии *E.coli*.

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			SM1_1 1/1			SM1_9 1/1		SM1_17 1/1					
B			SM1_2 1/1			SM1_10 1/1		SM1_18 1/1					
C			SM1_3 1/1			SM1_11 1/1		SM1_19 1/1					
D			SM1_4 1/1			SM1_12 1/1		SM1_20 1/1					
E			SM1_5 1/1			SM1_13 1/1		SM1_21 1/1					
F			SM1_6 1/1			SM1_14 1/1		SM1_22 1/1					
G			SM1_7 1/1			SM1_15 1/1		SM1_23 1/1					
H			SM1_8 1/1			SM1_16 1/1		SM1_24 1/1					

Рис.6 Схема засева планшеты для инкубации

Затем планшеты помещались в шейкер (слева опыт, т.к. там располагается облучатель, справа-контроль) и запускали перемешивание (рис.7). Шейкер термостатировался при температуре 37°C. Оба посадочных места в шейкере экранированы друг от друга заземленными кожухами из алюминия.

Снизу роль экрана выполняет сама платформа шейкера, которая также заземлена.



Рис. 7 Внешний вид шейкера «Shaker ST-3»

Установка частоты облучателя осуществлялась аналогично описанному выше методу культур на МПА. Используемые частоты приведены в таблице 1.

Таблица 1

Частоты ЭМИ при культивировании *E.coli* на среде МПА и в суспензионной культуре

№	Частота (MHz)	Частота (MHz) (суспензионная культура)
1	301	311
2	601	620
3	881	881
4	1200	1200
5	1537	1620
6	1792	1842
7	2250	1776
8		1950
9		2005

2.2.2 Снятие опыта

После 24 часов инкубации при установленных условиях производился контрольный замер амплитуды колебаний, после чего источник излучения отключался.

В рамку разборной фотометрической планшеты помещали модули лунок (Рис.8).

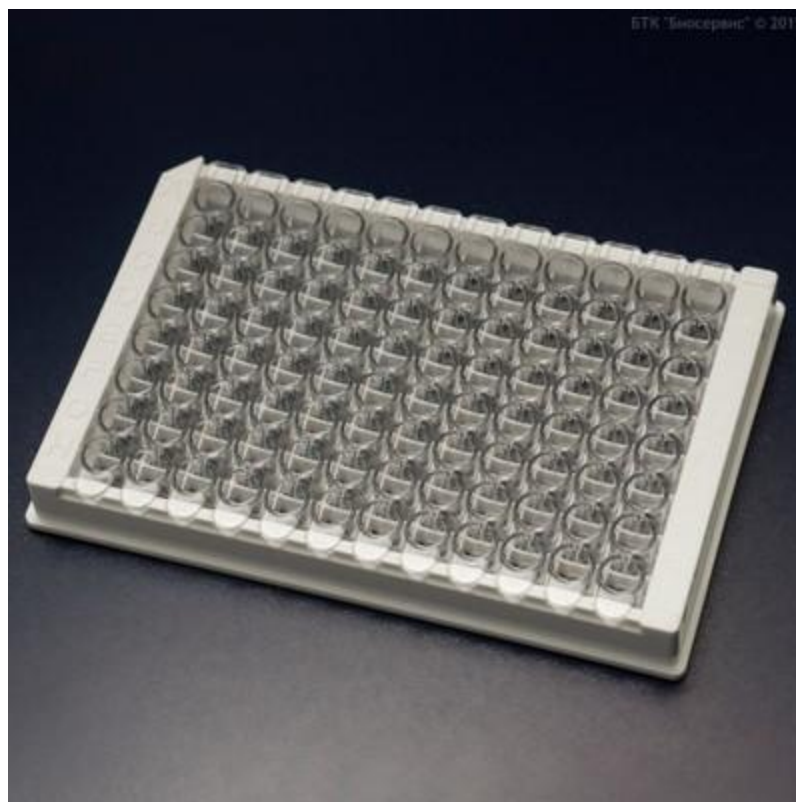


Рис.8 Фотометрическая планшета

В модули 1 и 2 заливали калибровочные растворы по стандарту МакФарланда соответствующей оптической плотности на ГРМ - бульоне. Значения оптической плотности были подобраны экспериментально, для того чтобы рост бактерий на планшетах укладывался в пределы калибровочных растворов.

В модули 3-5 пипеткой перенесли суспензию из лунок засеянных рядов планшеты «опыт», а в модули 6-8 - суспензию из 3 рядов лунок планшеты «контроль» (рис.9).

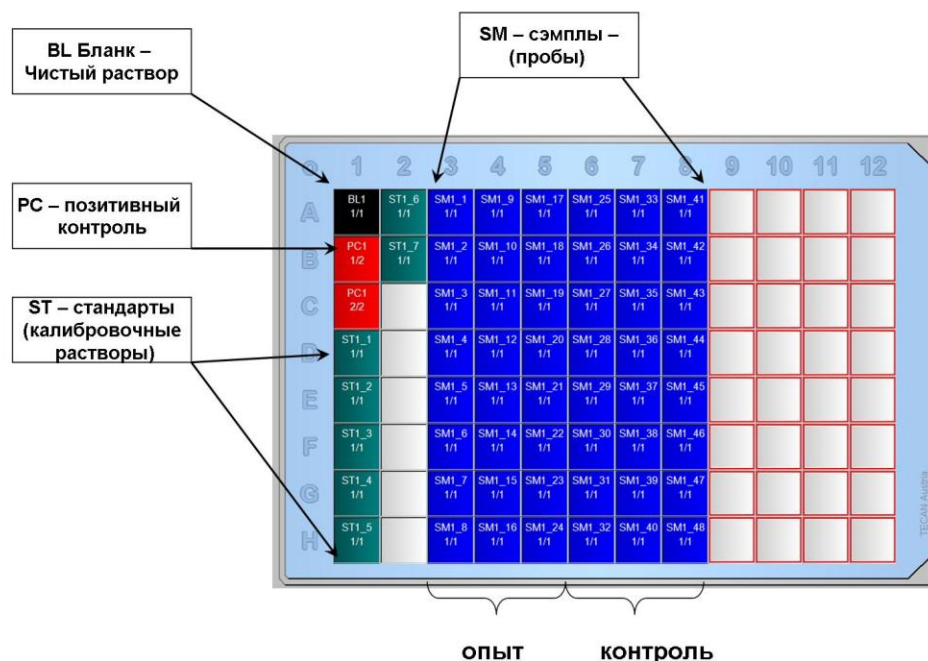


Рис 9. Схема планшеты для фотометрии

Затем производили замер колоний на микропланшетном фотометре (рис.10) при помощи программы Magellan и последующих вычислений в MS Excel, была вычислена оптическая плотность колоний (прил.2), массив контроля был отфильтрован по правилу 3 сигм (прил.3).

После сразу следовал запуск следующего опыта.



Рис.10 Внешний вид микропланшетного фотометра «Tecan Sunrise»

Глава 3. Результаты исследований и их обсуждение

Установлено, что при использовании планиметрического метода, достоверные отличия роста колоний *E.coli* от контрольной группы выявлены при частотах: 881 МГц, 1200 МГц и 1537 МГц. Площади составляли соответственно: 28,26 мм²; 15,58 мм² и 42,52 мм². И отличаются от контроля с коэффициентами достоверности: 3,05; 8,82; 11,11.

Кроме того, на частоте 1792 МГц также установлено достоверное отличие, но площадь колоний наоборот, значительно превосходит средний показатель в контрольной выборке на 73,45 мм² с $t_d = 2,30$. Полученные величины говорят о стимулирующем влиянии ЭМИ при данной частоте, но эти данные необходимо уточнить дополнительными экспериментами.

Результаты измерения средней площади колоний при инкубации в облучателе при различных частотах, а также без излучения (контроль) представлены ниже (табл. 2).

Таблица 2

Площади колоний *E.coli* при облучение электромагнитными волнами разных частот

Частота МГц	S _{колонии} (мм ²) ± m	Разность d	t в сравнении с контролем
Контроль	41,30±1,41	-	-
301	38,55±1,84	0,57	0,25
601	41,68±1,47	2,55	0,76
881	28,26±0,72	9,24	3,05
1200	15,58±17,39	23,54	8,82
1537	42,57±11,52	27,20	11,11
1792	73,45±1,83	26,42	2,30
2250	35,9±1,41	6,34	0,55

Как видно из их таблицы, установлена площадь контроля $41,30 \pm 1,41$. В сравнение с ним самый активный рост наблюдается при частоте 1792 МГц, при которой площадь колоний - $73,45 \pm 1,83$, самый слабый рост колоний можно отметить при частоте излучения 1200 МГц.

Оценить установленное влияние ЭМИ на рост колоний в графической форме можно на графике (Рис. 11). Из рисунка видно, что рост площади колоний заметно угнетается в сравнении с контролем при частотах 881 МГц и 1200 МГц, а при излучении 1792 МГц, напротив, усиливается.

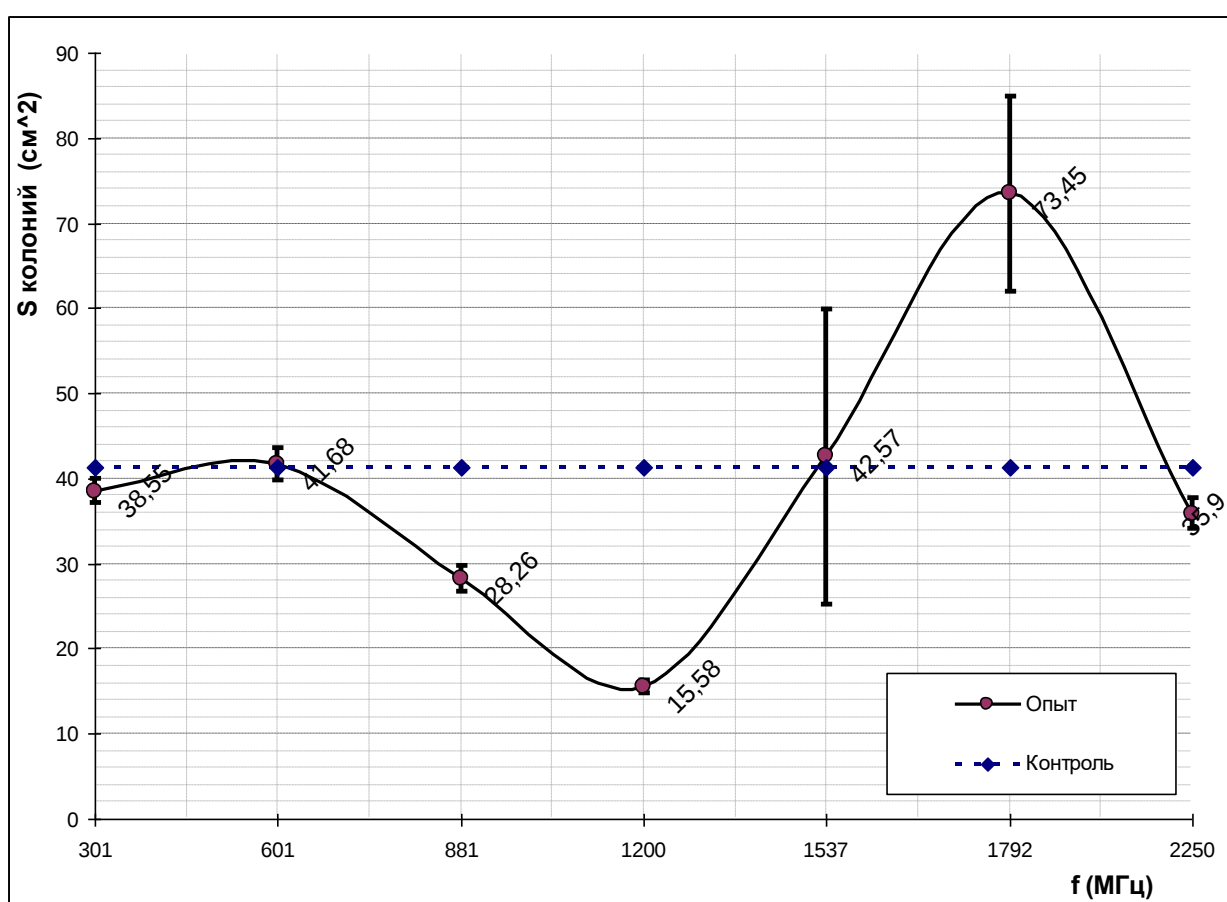


Рис.11 Средняя площадь колоний при действии электромагнитного излучения разной частоты в сравнении с контрольной группой

В таблице 3 приведена средняя установленная оптическая плотность колоний при облучении ЭМИ разных частот с использованием для учета суспензионно-фотометрического метода. Установлено, что достоверные

отличия плотности колоний от контрольной группы отмечаются при частотах 311 MHz, 620 MHz, 881 MHz, 1200 MHz, 1620 MHz, 1842 MHz. Плотность колоний составляли соответственно 27,79 Р; 30,52 Р; 31,41 Р; 18,76 Р; 5,14 Р; 25,66 Р. И отличаются от контроля с коэффициентами достоверности: 5,28; 11,37; 16,33; 4,85; 11,88; 6,38.

Таблица 3

Плотность суспензий *E.coli* при облучении электромагнитными волнами разных частот.

Частота MHz	Плотность суспензий (Р) в единицах мутности МакФарланда $\pm m$	Плотность суспензий КОЕ / см ³	Разность d (%)	t
Контроль	41,30 $\pm$ 0,28	66,67		
311	27,79 $\pm$ 1,01	83,38	5,57 (25,07%)	5,28
620	30,52 $\pm$ 0,67	91,56	8,29 (37,34%)	11,37
881	31,41 $\pm$ 0,48	94,24	9,19 (41,37%)	16,33
1200	18,76 $\pm$ 0,65	56,29	3,45 (15,56%)	4,85
1620	5,14 $\pm$ 1,41	15,42	17,08 (76,87%)	11,88
1842	25,66 $\pm$ 0,45	76,98	3,44 (15,47%)	6,38
1776	21,50 $\pm$ 0,38	64,50	0,72 (3,25%)	1,5
1950	19,54 $\pm$ 1,33	58,62	2,68 (12,07%)	1,97
2005	22,53 $\pm$ 0,22	67,60	0,31 (1,39%)	0,86

Оценить установленное влияние ЭМИ на рост колоний можно на графике (Рисунок 12).

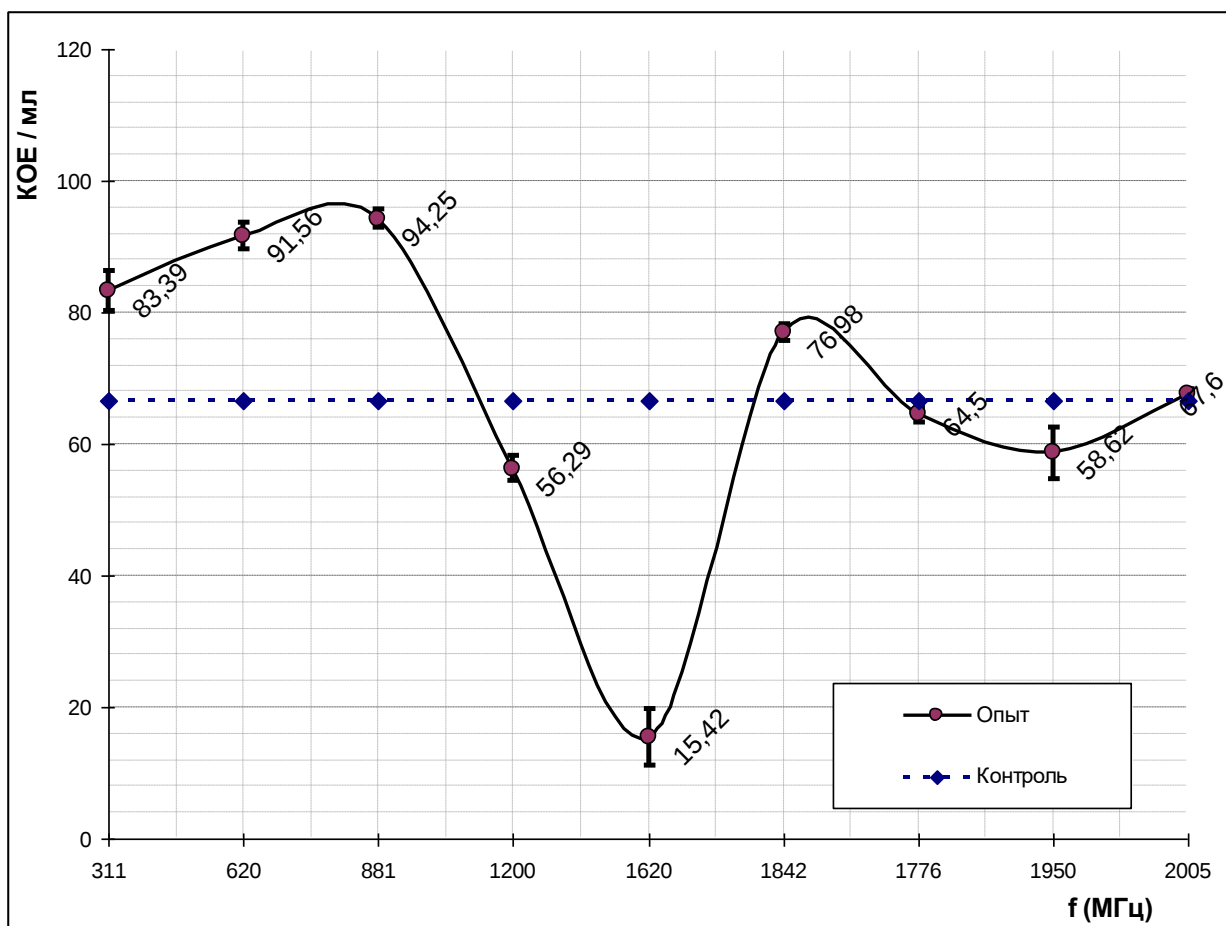


Рис. 12 Плотность суспензий (КОЕ / мл) при действии электромагнитного излучения разных частот (MHz)

На графике виден характерный пик при частоте 881 MHz, он подтверждается статистически с высокой точностью, и составляет 41,37% при $t = 16,33$, при частотах 1200 MHz и 1620 MHz наоборот, отмечается значительный спад прироста плотности суспензий 56,29 КОЕ / см³ и 16,42 КОЕ / см³.

Для сравнения роста культур на твердых агаризованных средах и в суспензионной культуре, были взяты максимально приближенные частоты из двух методов. Из планиметрического метода взяли частоты: 301, 601, 881, 1200, 1537, 1792 MHz, а из суспензионно-фотометрического: 311, 620, 881, 1200, 1620, 1776 MHz. Была обнаружена значимая корреляция при значении коэффициента Пирсона $r = 0,77$ при частотах от 301 MHz до 1200 MHz, таким

образом, обе методики независимо подтверждают полученные данные о динамике роста *E.coli* в этих пределах частот (рис.13).

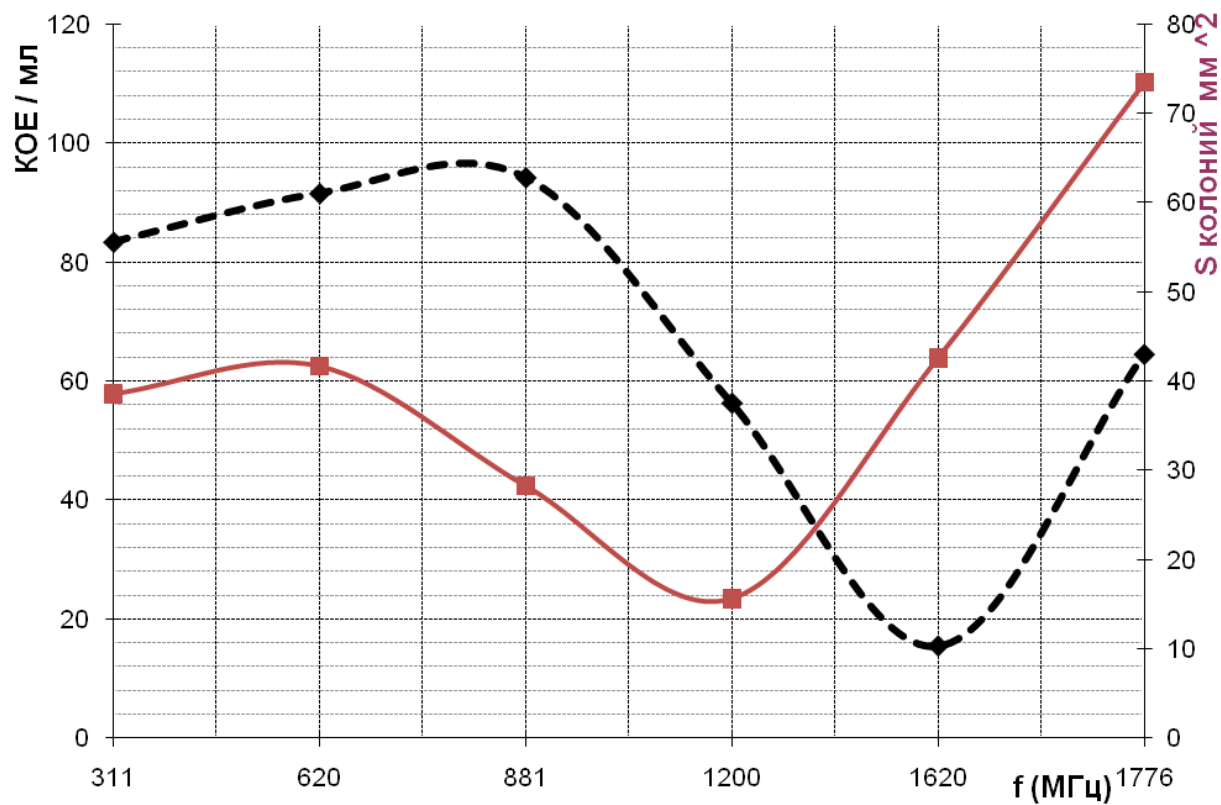


Рис. 13 Сравнение роста культур на твердой агаризованной среде МПА и в суспензионной культуре

Заключение

В результате проведенных исследований было установлено некоторое влияние немодулированного СВЧ-излучения на рост культур кишечной палочки (*Escherichia coli*) штамма ATCC25922 на агаризованных средах и в суспензии.

1. При облучении культуры *E.coli* на питательной среде МПА электромагнитными волнами разной частоты были зафиксированы статистически достоверные отличия роста колоний от контроля.
2. Установлено, что при частотах 881 MHz, 1200 MHz, 1537 MHz и 1792 MHz средняя площадь колоний при инкубации в течение 24ч. составила 28,26 мм²; 15,58 мм²; 42,52 мм² и 73,45 мм² соответственно, и достоверно отличается от контрольной группы, площадь колоний которой $41,30 \pm 1,41$. Коэффициенты достоверности разности (t) с контролем составляют соответственно: 3,05; 8,82; 11,11 и 2,30.
При этом, на частотах 881 MHz, 1200 MHz угнетается рост колоний, тогда как на частотах 1537 MHz и 1792 MHz напротив, усиливается, стоит отметить, что при частоте 1792 MHz средняя площадь колоний *E.coli* значительно преобладает над контрольной выборкой.
3. В результате анализа влияния СВЧ излучения различной частоты на суспензионные культуры *E.coli*, было установлено, что плотности суспензий достоверно отличаются от контрольной группы при частотах с 311 до 1842 MHz с коэффициентами достоверности (t) от 4,8 до 16,3. Прирост плотности суспензии установлен при частотах: 311 MHz, 620 MHz, 881 MHz, и составляли 83,38 КОЕ / см³; 91,56 КОЕ / см³; 94,24 м. соответственно, при частотах 1200 MHz и 1620 MHz наоборот, отмечается значительный спад плотности суспензий: 56,29 КОЕ / см³ и 16,42 КОЕ / см³.
4. При сравнении динамики роста бактерий на среде МПА и в суспензионной культуре, была обнаружена значимая корреляция в диапазоне частот от 301 MHz до 1200 MHz, значение коэффициента

корреляции Пирсона на этом участке составляет $r=0,77$, что свидетельствует о высоком сходстве динамики роста культур.

Можно отметить, что установленная закономерность выявляется независимо при двух различных методах культивирования бактерий, и вероятно не является случайной.

Таким образом, в ходе работы было выявлено, что под влиянием СВЧ – излучения различных частот рост культур кишечной палочки (*Escherichia coli*) штамма ATCC25922 может стимулироваться или же напротив – угнетаться. Наблюдаемая зависимость не является линейной, и не поддается объяснению нагреванием вещества электромагнитными волнами.

Установленные факты говорят в пользу существования более сложных механизмов взаимодействия биологических объектов с электромагнитным излучением СВЧ диапазона.

Список литературы

1. Акоев Г.Н., Авелев В.Д., Семенов П.Г. Восприятие низкоинтенсивного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона электрорецепторами скатов. ДАН № 322, 1992, стр. 791-794.
2. Алексеева И.А. и др. Исследования влияния электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на иммуногенетические особенности возбудителя коклюша. Доклады 10 Всероссийского симпозиума "Миллиметровые волны в медицине и биологии 24-26 Арг. 1995, Moscow, стр.97-98.
3. Алексеев С.И., Зискин М.С. Миллиметровые волны и нейрональные мембраны: эффекты и механизмы // 11 Российский симпозиум с международным участием "Миллиметровые волны в медицине и биологии": Сб. докл.- М.: ИРЭ РАН, 1997.- С.136-139.
4. Аловская А.А., Гапеев А.Б., Сафронова В.Г., Фесенко Е.Е., Чемерис Н.К., Якушина В.С. Резонансное ингибирование активности перитонеальных нейтрофилов мыши при действии низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ в ближней и дальней зонах антенны // Вестник новых медицинских технологий.- 1997.- Т. IV, N 3.- С.38-45
5. Андреева А.П., Дмитриева М.Г., Ильина С.А. Влияние СВЧ-излучения малой мощности на гемоглобин // Электронная техника. Серия Электроника СВЧ.- 1971.- Вып.11.- С.121-123
6. Беляев И. Я., Кравченко в. г. резонансное воздействие низкоинтенсивных миллиметровых волн на конформационного состояния хроматина тимоцитов крыс. // 3. Naturforsch. 1994. -- с. 352-358.
7. Гапеев А.Б., Черемис Н.К. Действие непрерывного ЭМИ КВЧ на клетки животных. Физико-химические механизмы действия электромагнитного излучения крайне высоких частот на клеточном и организменном уровнях. Вестник новых медицинских технологий.

2000. Т-7. №3-4. С.61-64.

8. Голант М.Б., Кузнецов А.П., Божанова Т.П. О механизме синхронизации культуры дрожжевых клеток КВЧ-излучением. Биофизика, 1994, том 39, вып. 3, стр. 490-494.
9. Данилевский В.Я. Исследования над физиологическим действием электричества на расстоянии, ч.1, Харьков. 1900—1901. - 159 с.
10. Дерягин Б.В., Голованов М.В. Об электромагнитной природе сил отталкивания, формирующих ореолы вокруг клеток // Коллоидный журнал.- 1986.- Т. 28, N 2.- С.246-250
11. Докинз Р. «Самое грандиозное шоу на Земле». М.: Астрель: CORPUS, 2012. - 496 с
12. Ильина С.А. Влияние миллиметрового излучения низкой интенсивности на свойства мембран изолированных эритроцитов и гемоглобина крови человека // В сб. статей "Медико-биологические аспекты миллиметрового излучения" / Под ред. Н.Д.Девяткова.- М.: ИРЭ АН СССР, 1987.- С.149-169.
13. Исаева В.С. Влияние КВЧ-облучения на жизнедеятельность микроорганизмов // Сб. Междун. симп. «Миллиметровые волны нетепловой интенсивности в медицине». М.: ИРЭ АН СССР. 1991. - С. 478-482.
14. Криницкая А.Ю. и др. Влияние когерентного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона нетепловой интенсивности на скорость роста *Bacillus subtilis*. Биомедицинская электроника, 2001, №2, сс. 49-53.
15. Мирутенко В.И., Богач П.Г. Изменение мембранного потенциала нервных клеток изолированных ганглиев моллюсков *Planorbis corneus* под влиянием СВЧ электромагнитного поля // Физиологический журнал АН УССР.- 1975.- Т. 21, N 4.- С. 528-531.

16. Пресман А. С. Электромагнитная сигнализация в живой природе (факты, гипотезы, пути исследований). М., "Сов. радио", 1974, 64 стр.
17. Рыбчин В. Н. Основы генетической инженерии. 2 изд. СПб.: Изд-во СПбГТУ, 2002.
18. Семина С.Н., Сидоренко С.В., Резван С.П. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам, 2004.
19. Тамбиев А.К., Курикова Н.Н. Основные закономерности действия электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на фотоинтегрирующие объекты. Доклады 10 Всероссийского симпозиума "Миллиметровые волны в медицине и биологии 24-26 Апр. 1995, Москва, сс.100-102.
20. Холодная Л.С. Влияние миллиметровых волн на иммунобиологические особенности условно-патогенных бактерий. Доклады 10 Всероссийского симпозиума "Миллиметровые волны в медицине и биологии 24-26 Апр. 1995, Москва, сс.100.
21. Arber S.L., Lin J.C. Microwave - induced changes in nerve cells: effects of temperature and modulation // Bioelectromagnetics.- 1985.- Vol. 6.- P.257-270.
22. Lederberg J, Tatum EL . «Gene recombination in E. coli». 1946.- 158 с.
23. Википедия. [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B5%D0%BD%D0%B7%D0%B5%D1%80,%D0%A1%D0%B5%D0%B9%D0%BC%D1%83%D1%80>

Приложение 1

Площади колоний (мм²), (филтрация выбросов по методу трех сигм)

контроль	301	601	881	1200	1537	1792	2250
24,16446	40,78744	50,23889	36,26506	14,32178	16,16581	84,27101	43,24709
31,51383	43,31669	42,25656	42,09415	16,49295	10,99851	74,46726	43,08149
27,06365	37,69533	45,68612	26,03821	11,14319	11,38023	85,86074	38,08082
45,98981	35,30659	47,70805	29,74096	14,91159	11,15566	23,73708	37,31151
28,33859	28,00384	44,82132	28,91316	18,9486	10,67495	59,44012	35,24562
43,43501	32,24698	42,99693	35,2629	20,00508	12,6868		35,88445
27,13285	27,11774	42,79331	22,31457	26,42934	12,86759		30,88373
43,67734	50,55613	52,50454	29,56455	22,01841	11,27136		30,51379
27,32861	41,78972	39,43339	28,71847	13,08985	12,80812		39,61827
29,37328	33,30348	37,83945	37,24108	15,70787	9,210121		27,50527
42,31336	29,72212	36,47442	25,05965	13,00732			33,245
53,79513	37,24331	28,16723	26,38891	13,88347			29,27344
46,4473	44,04271	30,35104	25,53464	20,84461			27,67307
46,92163	50,81321	42,21162	34,63701	17,19169			30,1633
36,36731	44,59082		26,1441	14,46368			30,56855
37,08676	34,05275		25,34327	14,0855			27,85963
41,8462	41,42873		21,93946	16,92347			24,81564
38,68441	42,50719		36,69063	13,46873			33,48357
51,79511	32,56665			13,01443			24,30259
37,03456	26,75611			11,79274			
44,88302	29,9996			14,21636			
33,36486	50,93618			16,00794			
43,87139	43,90088			11,39001			
41,39809	38,85392			14,0562			
54,31766	52,49129			17,22312			
	36,32541			10,43186			
	34,0586						
	38,87345						

Приложение 2

Оптические плотности суспензий *E.coli* инкубируемых в планшетах при облучении ЭМИ различной частоты, в единицах мутности МакФарланда

(t (эксп) = 24ч.)

311	620	881	1200	1620	1842	1776	1950	2005
33,6	25,221	24,793	10,233	2,6905	26,412	21,414	21,701	21,487
32,414	28,65	33,174	18,74	22,974	28,659	23,793	22,85	24,154
26,654	27,945	30,893	22,13	3,4511	25,248	21,897	1,1543	22,398
29,252	33,816	29,95	17,182	2,9048	27,951	21,931	23,138	21,77
23,059	30,998	32,43	20,455	2,0476	28,7	21,241	9,3564	24,257
24,565	32,172	32,975	17,961	22,135	27,702	21,448	22,527	23,183
24,565	32,783	34,81	15,74	2,1905	28,783	20,69	20,048	22,649
23,899	31,186	32,727	13,247	2,2143	21,653	21,448	20,263	22,869
19,059	29,166	27,719	20,338	3,1805	27,161	21	20,228	20,01
37,045	33,769	30,347	21,818	3,2481	25,913	24,354	20,515	22,524
25,581	30,669	30,942	22,675	3,2481	25,955	22,552	21,916	23,654
22,218	28,509	30,843	19,948	2,9524	25,373	22,724	21,844	21,55
28,348	34,661	31,14	17,416	2,7857	24,707	21,552	0,8087	21,455
27,106	35,178	29,802	21,39	3,4737	22,069	22,103	21,305	23,623
28,969	33,44	33,818	17,494	1,8333	26,745	19,207	19,545	22,021
21,613	32,689	31,488	23,026	1,8333	23,659	22,345	21,09	21,267
24,678	32,877	29,851	16,597	3,203	22,259	23,069	22,204	24
30,438	30,106	28,909	22,87	2,7143	25,789	22,138	28,885	22,115
33,713	20,485	32,182	21,195	2,1667	24,957	14,517	20,156	23,12
26,202	30,153	31,19	21,234	2,0952	27,369	23,069	22,419	23,78
21,95	30,622	34,364	18,117	23,72	24,083	19,862	21,772	23,026
32,245	26,63	31,686	15,623	2,619	28,076	21,931	23,461	21,613
36,141	30,81	31,934	16,792	2,2381	24,873	20,931	20,587	22,712
33,769	29,965	36	18,117	1,425	21,767	20,793	21,162	21,55

Приложение 3

Массив контроля с отфильтрованными выбросами по правилу
трех сигм

28,631	21,576	27,669	20,026	18,591	27,577	23,138	20,299
24	27,945	27,669	20,532	22,166	28,7	22,69	20,084
28,744	24,423	29,157	18,896	22,725	28,825	18,103	23,03
27,558	29,025		17,026	21,389	24,957	23,517	22,204
26,372	21,212		20,766	23,098	27,244	22,241	17,174
27,445	22,343		18,312	21,233	27,993	21,483	20,551
19,933	17,212		18,312	22,819	25,664	20,31	18,503
23,731	22,545		21,74	19,834	19,609	21,897	26,504
18,689	24,141		20,338	22,725	24,25	21,897	22,599
27,162	27,71		19,909	22,539	26,912	16,759	23,964
21,613	28,039		18,623	23,409	26,537	15,862	18,216
20,067	27,335		21,74	21,326	25,539	16,69	22,132
24,395	29,589		21,623	22,104	22,94	16,414	18,611
22,824	16,727		17,805	22,694	22,069	16,897	25,405
20,672	24,611		21,156	23,907	23,659	16,586	16,132
22,588	23,758		15,584	19,057	23,924	17,586	19,042
24,113	22,667		16,442	20,394	22,372	17,517	22,707
	24,611		21,857	23,378	27,036	18,31	22,24
	24,564		16,714	21,295	26,08	17,069	
			17,143	23,534	22,524	18,31	
			20,61	22,352	24,208	15,621	
			19,792		26,62	23,621	
					24,624	20,69	
					22,637	21,103	