

УДК 579.66:[620.193.8+504.054]

## НОВЫЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНЫХ ИЗЛУЧЕНИЙ (КВЧ) В ЭКОБИОТЕХНОЛОГИИ

© 2010 г.

*Д.В. Кряжев, В.Ф. Смирнов*

НИИ химии Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

fungo.cem@gmail.com

*Поступила в редакцию 10.04.2010*

Изучено влияние КВЧ-излучения на споры и мицелий грибов и клетки бактерий – деструкторов промышленных и строительных материалов. Показано, что действие КВЧ-излучения на споры исследованных грибов и грамположительные бактерии способно вызывать их гибель. Выявлен дозозависимый эффект и установлены оптимальные мощностные характеристики биоцидного действия КВЧ-излучения. Данный вид излучения может быть использован для создания нового поколения стерилизующих устройств.

*Ключевые слова:* биоповреждения, микромицеты, бактерии, фунгицидность, бактерицидность, КВЧ-излучение, дезинфекция.

### Введение

К настоящему времени накоплено достаточно большое количество фактического материала, свидетельствующего о значимом терапевтическом эффекте излучения миллиметрового диапазона, крайне высокой частоты и низкой интенсивности (КВЧ-излучения) при многих заболеваниях человека [1]. Однако, несмотря на множество работ о положительном эффекте применения КВЧ-терапии в медицинской практике, публикации, посвященные исследованию воздействия КВЧ-излучения на различные микроорганизмы, немногочисленны, и многие из них носят лишь фактологический характер [2, 3]. Подобная ситуация сдерживает использование КВЧ-излучения в практической реализации современных экологических биотехнологий.

Анализ литературных данных показывает, что имеются крайне немногочисленные сведения о влиянии КВЧ-излучения на микроорганизмы (причем в большинстве источников описывается стимулирующее действие [4, 5]) и практически отсутствуют сведения о биоцидном действии данного излучения на микроскопические грибы.

Изучение работ современных российских и иностранных авторов в области биотехнологии позволило выделить основные методы инактивации патогенных и вредных микроорганизмов [6].

1. Химический: использование различных дезинфектантов и биоцидов. Опыт многолетнего применения данных средств показывает, что микроорганизмы и в особенности микроскопи-

ческие грибы достаточно быстро (в течение 3–5 лет) вырабатывают устойчивость к тому или иному препарату.

2. Физический: обработка ультрафиолетом. В последние годы является малоэффективной вследствие появления большого количества штаммов микроскопических грибов и бактерий, резистентных к ультрафиолетовому облучению.

Подобная ситуация ставит перед специалистами в области экобиотехнологии задачу разработки и реализации новых безопасных и высокоэффективных технологических санитарных мероприятий по снижению заселенности микроорганизмами жилья человека, а также применения мер защиты персонала в наиболее микробиологически загрязненных рабочих местах.

В связи с этим, цель настоящего исследования – изучение воздействия КВЧ-излучения на бактерии и микроскопические грибы. Реализация данной цели кроме фундаментального аспекта – накопления фактического материала и создания концепции механизмов действия КВЧ-излучения на рост, развитие и метаболизм микроорганизмов – поможет решить и важнейшую прикладную задачу современной экобиотехнологии – предотвращение развития биоповреждений. Актуальность данной проблемы связана с экологией человека, так как многие деструкторы материалов являются условно патогенными микроорганизмами, способными вызывать серьезные заболевания. Активизация деятельности технофильных видов грибов способству-

ет увеличению инфекционной нагрузки в атмосфере, а также возникновению особенно агрессивных популяций грибов с высокой степенью эврибиотности. Они становятся обычными компонентами промышленных экониш, контаминируя различные материалы, сырье, изделия, оборудование [7]. Особой агрессивностью в данном отношении обладают микроорганизмы, на которые приходится более 40% от общего числа биоповреждений. Наиболее жизнеспособными, а поэтому и крайне опасными среди микроорганизмов являются микроскопические грибы.

### Экспериментальная часть

Источником КВЧ-волн служил аппарат КВЧ-ИК терапии СЕМ-ТЕСН (производитель ООО «Спинор», г. Томск), излучателем в аппарате является диод Ганна, выполненный на основе нанокристаллов арсенида галлия, генерирующий КВЧ-излучение с широкополосным шумовым спектром Ганна от 42 до 100 ГГц, длина волны 9.677–8.333 мм, плотность потока импульсной мощности  $5 \times 10^{-10}$  Вт /см<sup>2</sup>×с, частота импульсов излучения 9 Гц.

*Методика воздействия излучением на суспензии спор грибов и бактерий.* Готовили суспензию спор определённой концентрации (титра). В опытах с бактериями чашечным методом Коха довели разведение до 1:10000. Часть приготовленной суспензии служила контролем (проводили имитацию облучения контактом с неработающим излучателем). Другую часть облучали КВЧ-излучением. Во время облучения излучатель находился в непосредственном физическом контакте с биологическим объектом. Время облучения в экспериментах – 5 часов, что в пересчете на дозу составило 0.009 мДж/см<sup>2</sup>. Далее 1 мл (для грибов) и 0.05 мл (для бактерий) контрольной и опытной суспензий высевали на поверхность твёрдых питательных сред. Ингибирующий эффект ( $\Delta T$ ) излучения в процентах к контролю оценивали по сравнению количеств колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл суспензии, выросших на поверхности среды в контроле и опыте визуально на вторые (для грибов) и первые (для бактерий) сутки культивирования.

Величину  $\Delta T$  рассчитывали по формуле:

$$\Delta T = \frac{t_0 - t_1}{t_0} \times 100,$$

где  $t_0$  – количество КОЕ в контроле;  $t_1$  – количество КОЕ в опыте.

*Методика воздействия излучением на вегетативный мицелий грибов.* Посадка мицелия велась одним уколом на чашку с твёрдой питательной средой. Высаживался контроль (проводилась имитация облучения контактом с неработающим излучателем) и опыт. Все эксперименты осуществляли на пророщенном вегетативном мицелии без спороношений. Во время облучения излучатель находился в непосредственном физическом контакте с биологическим объектом. Время облучения в экспериментах – 3 часа, что в пересчете на дозу составило 0.0054 мДж/см<sup>2</sup>. Подавление роста под действием излучения в процентах к контролю ( $\Delta R$ ) оценивали сравнением диаметров выросших на поверхности среды Чапека-Докса колоний в контроле и опыте на 3, 5, 7, 10 и 14 сутки культивирования.

Величину  $\Delta R$  рассчитывали по формуле:

$$\Delta R = 100 - \left( \frac{d_0 - d_1}{d_0} \times 100 \right),$$

где  $d_0$  – диаметр колоний в контроле,  $d_1$  – диаметр колоний в опыте (мм).

Все измерения проводили в нормальных лабораторных условиях: температура окружающего воздуха  $20 \pm 5^\circ\text{C}$ ; относительная влажность  $80 \pm 5\%$ ; атмосферное давление 84–106 кПа. Полученные данные были обработаны с использованием методов математической статистики. Оценка достоверности различий изучаемых показателей проводилась с использованием парного  $T$ -критерия Стьюдента при уровне значимости  $p < 0.05$ . Опыты проводили как минимум в трёх биологических повторностях. В таблицах представлены средние арифметические значения и их среднеквадратичные отклонения.

### Результаты и их обсуждение

Известно, что в естественных условиях микроорганизмы существуют в виде всевозможных ассоциаций и ценозов и, следовательно, противодействовать биоповреждающему процессу, инактивируя отдельные виды микромицетов, не представляется возможным. В связи с этим представляло интерес изучение биоцидных возможностей КВЧ-излучения как по отношению к отдельным видам, так и к ассоциативной культуре микроскопических грибов. Данные по ингибирующему действию КВЧ-излучения на споры отдельных видов микроскопических грибов: *Alternaria alternata* ВКМ F-1120, *Aspergillus niger* ВКМ F-1119, *Chaetomium globosum* ВКМ F-109, *Fusarium moniliforme* ВКМ F-136, *Penicillium chrysogenum* ВКМ F-245, которые

активно участвуют в биоповреждающем процессе, а также способны вызывать заболевания человека, и их ассоциативную культуру, составленную из равных объемов спор всех вышеперечисленных видов, представлены в табл. 1. Результаты экспериментов показали, что воздействие КВЧ-излучения вызывает гибель не менее 50% КОЕ у всех тест-грибов. Данные результаты позволяют с уверенностью утверждать, что низкоинтенсивное шумовое излучение КВЧ-диапазона способно вызывать гибель значительных количеств спор микромицетов, при этом данный вид излучения способен достаточно эффективно реализовывать свое биоцидное действие и в ассоциативных культурах микромицетов (показатель  $\Delta T$  составил 49%).

Также представляло интерес изучить действие КВЧ-излучения на рост вегетативного мицелия микромицетов. Результаты эксперимента представлены в табл. 2. Результаты этой серии экспериментов показывают, что КВЧ-излучение не влияет на жизнедеятельность вегетативного мицелия микроскопических грибов. Этот факт объясняется тем, что вегетативный мицелий, культивируемый в течение нескольких суток на питательной среде, имеет набор различных

ферментов, обеспечивающих механизмы резистентности и противодействия неблагоприятным факторам внешней среды, а следовательно, дающий возможность грибному мицелию проявлять устойчивость к неблагоприятным факторам внешней среды, в том числе и к различным излучениям.

На втором этапе эксперимента представляло интерес изучение влияния КВЧ-излучения на жизнеспособность прокариотических организмов.

С этой целью действию КВЧ-излучения были подвергнуты водные суспензии вегетативных клеток бактерий: *Escherichia coli* (грамотрицательная) и *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* и *Bacillus megaterium* (грамположительные). Результаты данного эксперимента представлены в табл. 3. Как видно из данных таблицы, картина действия, оказываемого КВЧ-излучением на клетки бактерий, неоднозначна. Излучение не оказывает какого-либо значимого действия на клетки грамотрицательных бактерий; результаты же, полученные на грамположительных бактериях, практически повторяют данные, полученные на микромицетах: КВЧ-излучение способно оказывать негативное воз-

Таблица 1

Изменение титра КОЕ при воздействии КВЧ-излучения на суспензию спор микромицетов

Вид гриба	Количество КОЕ		
	контроль	опыт	ингибирование в % к контролю ( $\Delta T$ )
<i>Alternaria alternata</i>	37±2	14±3	62
<i>Aspergillus niger</i>	25±2	12±3	52
<i>Chaetomium globosum</i>	49±2	23±2	53
<i>Fusarium moniliforme</i>	74±5	33±1	55
<i>Penicillium chrysogenum</i>	24±4	12±4	50
Ассоциативная культура	168±3	86±3	49

Таблица 2

Воздействие КВЧ-излучения на мицелий микромицетов

Вид гриба	Время, сутки	Диаметр колоний, мм		
		контроль	опыт	ингибирование в % к контролю ( $\Delta R$ )
<i>Alternaria alternata</i>	3	30.3±0.6	30.0±0.0	99
	5	58.0±1.7	60.7±0.6	105
	7	75.3±1.2	76.7±2.3	102
	10	78.7±1.5	77.3±0.6	98
	14	84.3±0.6	82.0±2.6	97
<i>Penicillium chrysogenum</i>	3	30.0±0.0	32.0±2.0	107
	5	38.3±3.1	38.0±3.6	99
	7	48.7±6.7	47.7±4.2	98
	10	49.0±1.0	53.7±1.2	110
	14	49.3±3.2	54.7±1.5	111

действие на клетки грамположительных бактерий, оно вызывает гибель не менее 44% титра КОЕ у *Staphylococcus aureus*, 49% у *Bacillus subtilis* и 30% у *Bacillus megaterium*.

Объяснить подобный феномен, с нашей точки зрения, можно морфологическими особенностями царства бактерий. Согласно общепринятой в бактериологии концепции, клеточная стенка грамположительных бактерий отличается более простым устройством, чем грамотрицательных. Таким образом, низкоинтенсивное шумовое излучение КВЧ-диапазона также может вызывать гибель значительных количеств клеток грамположительных бактерий.

Представляло интерес определить степень гибели спор микромицетов в зависимости от мощности КВЧ-излучения. Результаты эксперимента по обработке КВЧ-излучением различной мощности суспензий спор представлены в табл. 4. Анализ результатов показывает, что с увеличением мощности КВЧ-излучения в два раза возрастает и степень его антимикробной активности, однако полной инактивации всего титра КОЕ добиться не удается. Трехкратное увеличение мощности КВЧ-излучения не приводит к значительному увеличению его биоцидного действия. Следует также отметить неодинаковость действия КВЧ-излучения повышенной мощности (0.027 мВт/см<sup>2</sup>) на споры светло- и темноокрашенных грибов: титр КОЕ у *Alternaria alternata* при воздействии КВЧ-излучения повышенной мощности снизился еще на 12%; у *Penicillium chrysogenum* – на 21%. Объяснить подобный феномен, с нашей точки

зрения, можно наличием у темноокрашенных видов грибов пигмента меланина, играющего у живых организмов роль протектора от всевозможных неблагоприятных физических воздействий (в том числе и излучений) [8].

Результаты по фунгицидному и бактерицидному действию КВЧ-излучения являются весьма актуальными по двум позициям.

Во-первых, учитывая полную экологическую безопасность данного способа (уровень излучения диода Ганна составляет  $5 \times 10^{-7}$  мВт/см<sup>2</sup>×с, тогда как допустимой в Российской Федерации является доза в 10 мВт/см<sup>2</sup>×с, а в странах Евросоюза этот показатель равен 1000 мВт/см<sup>2</sup>×с) и его низкую энергозатратность (ультрафиолетовому бактерицидному облучателю для достижения аналогичных эффектов требуется энергия, равная 60 мДж/см<sup>2</sup>; для использованного в наших экспериментах КВЧ-генератора эта величина составляет 0.009 мДж/см<sup>2</sup>). Следовательно, на основе диода Ганна возможно создание экологически безопасного и высокоэффективного прибора для дезинфекции воздуха и поверхностей в местах работы и проживания человека. Данный прибор может использоваться для обеззараживания микробно-пылевого аэрозоля, присутствующего в воздухе жилых помещений, либо в качестве приставки к бытовому кондиционеру, либо как отдельное устройство. Известно, что дезинфекция – это метод, используемый для сокращения количества живых микроорганизмов, однако при этом полного их удаления не происходит. Подобный способ противодействия биодеструкции успешно может быть применен для проведения профилактиче-

Таблица 3

**Изменение титра КОЕ при воздействии КВЧ-излучения на суспензию клеток бактерий**

Вид бактерий	Количество КОЕ		
	контроль	опыт	ингибирование в % к контролю ( $\Delta T$ )
<i>Bacillus subtilis</i>	340±12	175±26	49
<i>Bacillus megaterium</i>	334±31	235±15	30
<i>Escherichia coli</i>	106±16	104±2	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	75±10	42±9	44

Таблица 4

**Изменение титра КОЕ при воздействии КВЧ-излучения различной мощности на суспензию спор микромицетов**

Вид гриба	Количество КОЕ								
	0.009 мВт/см <sup>2</sup>			0.018 мВт/см <sup>2</sup>			0.027 мВт/см <sup>2</sup>		
	контроль	опыт	$\Delta T$ %	контроль	опыт	$\Delta T$ %	контроль	опыт	$\Delta T$ %
<i>Alternaria alternata</i>	37±2	14±3	62	26±6	7±1	73	27±2	7±2	74
<i>Penicillium chrysogenum</i>	24±4	12±4	50	165±5	51±3	69	117±11	34±7	71

ских и внеочередных дезинфекционных мероприятий в различных помещениях (промышленных, складских, жилых), находящихся в группе риска по возникновению и развитию биоповреждающего процесса.

Во-вторых, принимая во внимание то обстоятельство, что КВЧ-излучение данного спектра не оказывает существенного влияния на рост и развитие грибного мицелия, при этом успешно инактивируя споры микромицетов и бактерии. При подобном эффекте избирательности данная технология может быть использована для создания условий асептики в экобиологической технологии с использованием грибного мицелия при полном исключении попадания спор других микроорганизмов, являющихся загрязнителями.

### Выводы

1. Действие КВЧ-излучения на споры исследованных нами микромицетов способно вызывать их гибель, в том числе и в ассоциативных культурах.

2. Вегетативный мицелий исследованных нами грибов оказался не чувствительным к действию КВЧ-излучения в условиях данного эксперимента.

3. Действие КВЧ-излучения на вегетативные клетки и споры исследованных нами грамположительных бактерий способно вызывать их гибель.

4. Выявлена максимально эффективная биоцидная доза КВЧ-излучения ( $0.018 \text{ мДж/см}^2$ ), позволяющая инактивировать около 70% титра КОЕ у микроорганизмов-биодеструкторов.

5. Низкоинтенсивное излучение КВЧ-диапазона с широкополосным шумовым спектром Ганна может быть использовано для создания нового поколения безопасных для человека и высокоэффективных стерилизующих устройств,

которые могут применяться как в экобиотехнологии, так и в быту.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (программа СТАРТ 08: проект № 8289, контракт № 5782р/8289).*

### Список литературы

1. Балчугов В.А., Полякова А.Г., Анисимов С.И., Ефимов Е.И., Корнаухов А.В. КВЧ-терапия низкоинтенсивным шумовым излучением. Н. Новгород: ННГУ, 2002. 192 с.
2. Егоров Н.С., Голант М.Б., Ландау Н.С. // Тез. докл. IV Всесоюз. семинара «Изучение механизмов нетеплового воздействия миллиметрового излучения на биологические объекты и биологически активные соединения», М., 1981. С. 13.
3. Останенков А.М. К вопросу о воздействии электромагнитных полей на микроорганизмы // Электронная обработка материалов. 1981. № 2. С. 62–66.
4. Девятков Н.Д., Голант М.Б., Бецкий О.В. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности. М.: Радио и связь, 1991. 169 с.
5. Астраханцева М.Н., Крыницкая А.Ю., Гамаюрова В.С. и др. Особенности роста дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* под действием комплекса ГОЭДФ и КВЧ-излучения // Тез. докл. Всерос. научно-техн. конф.-выставки «Высокоэффективные пищевые технологии, методы и средства для их реализации», Москва, 2004. Ч. 1. С. 291–295.
6. Соломатов В. И., Ерофеев В.Т., Смирнов В.Ф. и др. Биологическое сопротивление материалов. Саранск: Изд-во Мордовского ун-та, 2001. 195 с.
7. Коваль Э.З., Сидоренко Л.П. Микодеструкторы промышленных материалов. Киев: Наукова думка, 1989. 192 с.
8. Барабой В.А. Структура, биосинтез меланинов, их биологическая роль и перспективы применения // Успехи современной биологии. 2001. Т. 121. № 1. С. 36–46.

### NEW ASPECTS OF APPLICATION OF LOW-INTENSITY RADIATION (EHF) IN ECOBIOTECHNOLOGY

*D.V. Kryazhev, V.F. Smirnov*

The impact of EHF radiation on spores, fungal mycelium and bacteria, destructors of industrial and building materials, was studied. It has been shown that the action of EHF radiation on the spores of the tested fungi and gram-positive bacteria can cause their destruction. As a result of the work, the dose-dependent effect has been shown to exist and the optimum power characteristics of EHF radiation have been established. This type of radiation can be used to create a new generation of sterilizing devices.

*Keywords:* biodamage, micromycetes, bacteria, fungicidity, bactericidity, EHF radiation, disinfection.