

О.М. Лісова, Г.М. Багацька, С.М. Махно, П.П. Горбик

## ВПЛИВ МІКРОХВИЛЬОВОГО НИЗЬКОІНТЕНСИВНОГО ЕЛЕКТРОМАГНІТНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА ЖИТТЄДІЯЛЬНІСТЬ КЛІТИН ДРІЖДЖІВ У СЕРЕДОВИЩІ ЛИМОННОЇ КИСЛОТИ

Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України  
вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна, E-mail: oksana.garkusha@gmail.com

Представлено результати дослідження впливу лимонної кислоти різної концентрації (рН суспензії) в умовах екзогенного та ендогенного метаболізму з контролем газо- і тепловиділення в процесі життєдіяльності дріжджових клітин *Saccharomyces cerevisiae*, попередньо опромінені низькоінтенсивним електромагнітним випромінюванням різної частоти міліметрового діапазону.

Показано, що невеликі концентрації лимонної кислоти (до 2 мг/мл) пригнічують ферментативний процес дріжджів лише на початковій стадії та активізують процеси життєдіяльності клітин, як опромінені, так і неопромінені. Суттєве збільшення тривалості та величини теплового ефекту за рахунок ферментації в присутності лимонної кислоти свідчить про більш повну засвоюваність вуглеводів.

**Ключові слова:** клітини дріжджів, лимонна кислота, рН середовища, низькоінтенсивне електромагнітне випромінювання, резонансний ефект

### ВСТУП

Вплив електромагнітних полів на біологічні об'єкти різного рівня організації привертає увагу спеціалістів різноманітних областей знань. Особливий інтерес викликає дія мікрохвильового низькоенергетичного (до 20 мВт/см<sup>2</sup>) електромагнітного випромінювання (МНЕВ), яка може бути пов'язана з резонансними ефектами на функціональних складових клітини, або макромолекулах [1]. Незважаючи на значну кількість публікацій, що стосуються даного питання, на сьогодні не існує вичерпної інформації щодо механізмів впливу МНЕВ на біологічні об'єкти. Основною причиною зміни активності біологічних структур вважається зміна властивостей води під дією електромагнітного опромінювання [2, 3], а також частотно-селективний механізм впливу МНЕВ, і найчастіше пов'язується з резонансним поглинанням на частотах молекулярного кисню та нітроген(II) оксиду [4].

При формуванні біологічного відгуку на зовнішні фізичні впливи вирішальну роль відіграють клітинні мембрани завдяки їх здатності до регулювання біохімічних процесів у клітині, можливості змінювати швидкість дифузії іонів та субстратів, а також електронну

структуру вільних радикалів, орієнтацію біологічних макромолекул та ін. Адаптаційні ефекти, що виникають під дією опромінювання МНЕВ, можуть бути пов'язані як з мембранними структурними реорганізаціями, так і з плазматичними та внутрішньоклітинними. Морфологічні та функціональні порушення мембран виявляються відразу після опромінювання, навіть при малих дозах. Зміна іонного складу, що виникає при цьому, може спричинити прискорення активності транспорту катіонів натрію, активацію перекисного окиснення ненасичених жирних кислот і відокремлення процесів окиснення та фосфорилування в мітохондріях [5].

Лимонна кислота присутня в кожному акті життєдіяльності мікроорганізму, оскільки є ключовим елементом циклу трикарбонових кислот, а тому відіграє важливу роль у метаболізмі живих клітин, що використовують кисень, і діє як прискорюючий, так і гальмуючий регулятор деяких ферментативних процесів первинного метаболізму, в залежності від концентрації. На життєдіяльність дріжджів значно впливає активна кислотність. Іони гідрогену змінюють електричний заряд колоїдів клітинної оболонки і, в залежності від концентрації, можуть збільшувати або зменшувати її проникність для окремих

речовин та іонів. Від величини рН залежить швидкість надходження речовин у клітину, активність ферментів, утворення вітамінів. Відомо, що клітини дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* активізуються у підкисленому середовищі в оптимальному діапазоні рН 4.8–5; основні ж процеси їх життєдіяльності відбуваються при рН від 2 до 8. Встановлено [6], що суспензії, які відбродили і містили адаптовані (багаторазово пасажировані на меласному суслі концентрацією 27 % сухих речовин з активною кислотністю 4) дріжджі мали менший вміст незброджених цукрів при рН початкового суслу 4 і 4.5, що свідчить про їх здатність до більш глибокого засвоєння вуглеводів. Вказана відмінність нівелюється при пониженні кислотності.

Мета роботи – виявлення закономірностей впливу лимонної кислоти в суспензії дріжджів в діапазоні концентрацій 0–4 мг/мл на процеси життєдіяльності клітин після опромінення МНЕВ.

#### ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

В дослідях використовували дегідратовані промислові дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* виробництва «С.І.Лесафф», Франція. Застосовували харчову лимонну кислоту виробництва КНР. Кислотність розчинів контролювали за допомогою іономіра лабораторного И-160МИ, Білорусь. Опромінення МНЕВ клітин проводили в стані їх стандартного зберігання протягом 1 години (потужність 5 мВт) за допомогою установки на основі генератора Г4-141 [7]. Вплив концентрації лимонної кислоти (рН суспензії) досліджували як в умовах екзогенного метаболізму з контролем газовиділення, так і в умовах ендогенного метаболізму з контролем тепловиділення в процесі життєдіяльності дріжджових мікроорганізмів.

Інтенсивність дихання дріжджових суспензій оцінювали в ході кожного експерименту – вимірювали швидкість газовиділення одночасно для чотирьох суспензій: дві з них містили лимонну кислоту так, що одна з суспензій містила опромінені (на частоті 47.75 ГГц, яка підвищує інтенсивність метаболічних процесів [7]) дріжджові клітини, і дві контрольні, тобто такі, що не містили лимонну кислоту, але одна з них мала опромінені дріжджові клітини.

Дослідження тепловиділення в умовах ендогенного ефекту проводили з використанням диференціального мікрокалориметра (ДМК) в ізотермічному режимі (295±0.5 К). Методика проведення експерименту [8] дозволяє визначати тепловий ефект, зумовлений оводненням клітини, що супроводжується частковим переходом клітинної води у зв'язаний стан, а також тепловий ефект, обумовлений подальшим проявом життєдіяльності клітинного організму в процесі його метаболізму за рахунок наявності характерних для цих клітин запасних (резервних) вуглеводів – трегалози та глікогену. Чутливість ДМК по тепловому потоку становить  $10^{-5}$  Вт. Інтенсивність теплового потоку на першій стадії експерименту зумовлена адсорбцією води, як на поверхні ендоплазматичної мембрани клітинного організму, так і здебільшого, на внутрішньоклітинних поверхнях різних клітинних органодів, а на другій – життєдіяльністю клітинних організмів. Потужність тепловиділення в суспензіях реєстрували з моменту переведення дріжджових клітин з анабіотичного (дегідратованого) стану в оводнений (перша стадія), а далі – в стан життєдіяльності (друга стадія).

Двостадійний процес взаємодії клітини з водою представлений у вигляді термограм, які обробляли відповідно до методики [8]. Термограми представлено у вигляді кінетичних кривих інтенсивності тепловиділення, що розглядаються як тепловий релаксаційний процес. Даний процес характеризується певним часом релаксації, за який відбувається відновлення життєдіяльності мікроорганізму (перша стадія, оводнення) до повного розщеплення запасних резервних речовин (друга стадія). Друга стадія (ферментація) процесу релаксації ентальпії відповідає активізації ферментативних реакцій в клітинному організмі. Відзначимо при цьому, що потужність тепловиділення відображає в інтегральній формі всі процеси, зумовлені оводненням, метаболізмом клітини та різноманітними структурними змінами в ній. Потужність тепловиділення, що реєстрували в дослідях, пропорційна електричній силі (ЕРС) на термобатарей вимірювальної комірки ДМК. Значення ентальпії  $\Delta H_i$  розраховували за кінетичною кривою ентальпії (релаксаційною

кривою) за допомогою інтегрального рівняння Тіана:

$$\Delta H_u = P \int_{t_0}^t K \cdot dt + \mu \int_{t_0}^t dK = P \cdot A + \mu(K_t - K_0), \quad (1)$$

де  $K$  – напруга детекторної термобатарей, мВ;  $\mu$  – теплове значення калориметра;  $A$  – площа під експериментальною кривою;  $K_0$ ,  $K_t$  – значення нуля на початку і в кінці експерименту;  $P = 3.14 \cdot 10^{-5} \frac{\text{Дж}}{\text{с} \cdot \text{мВ}}$  – константа

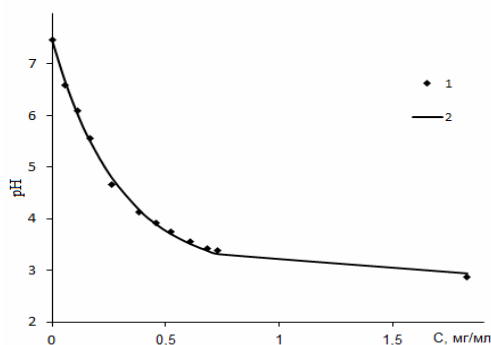
приладу. Аналіз результатів калібровки теплових ефектів вказує на точність  $\pm 2\%$ . Графіки кінетичних кривих тепловиділення подані в координатах ЕРС (В) – час (с).

#### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1 представлені залежності рН водогінної води від концентрації ( $C$ ) лимонної кислоти. За експериментальними значеннями залежності рН від концентрації (крива 1), отриманими за допомогою іономіра, виведено емпіричне рівняння (2):

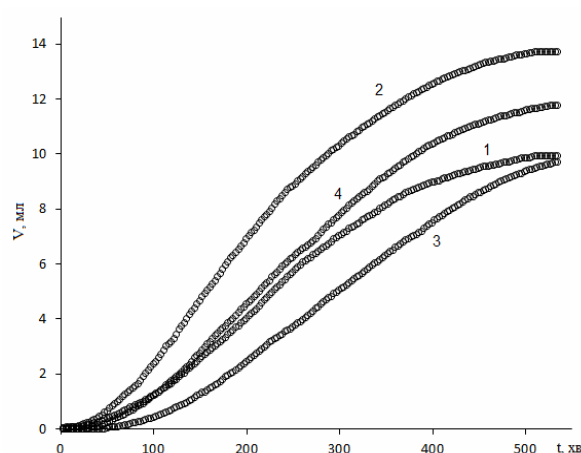
$$pH = D \cdot \exp\left(-\frac{C}{t}\right) + B, \quad (2)$$

де  $C$  – концентрація лимонної кислоти г/мл;  $D = 4.531 \pm 0.074$ ;  $B = 2.931 \pm 0.063$ ;  $t = 2.96 \cdot 10^4 \pm 1.3 \cdot 10^5$ . Крива 2 відображає розрахунок рН суспензії від концентрації лимонної кислоти у водогінній воді. Згідно рівняння (2) в подальшому визначали значення рН розчину лимонної кислоти у воді із вказаною точністю.



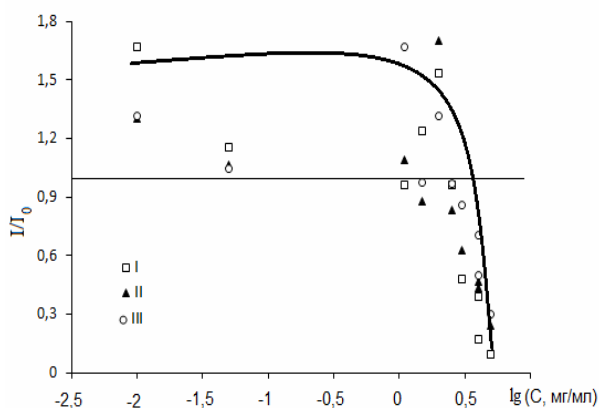
**Рис. 1.** Залежність рН водопровідної води від концентрації в ній лимонної кислоти: 1 – експериментально отримана з використанням іономіра; 2 – розрахована за емпіричним рівнянням (2)

Газовиділення контрольних суспензій (рис. 2, криві 1 і 2) відбувається більш інтенсивно, ніж у присутності лимонної кислоти. На першій стадії розвитку суспензії дріжджів (20 хв) відбувається пригнічення акту дихання неопромінених клітин у присутності лимонної кислоти, внаслідок чого дріжджі контрольних суспензій раніше досягають лаг-фази. Протягом експерименту спостерігається деяка адаптація клітин дріжджів та прискорення швидкості газовиділення при невеликих концентраціях (до 0.8 мг/мл), за яких відбувається стимуляція ферментативних процесів.



**Рис. 2.** Інтегральна залежність швидкості газовиділення суспензій дріжджів від часу: контрольна (1); містить опромінені на частоті 47.75 ГГц дріжджі (2); з початковим вмістом лимонної кислоти 3 мг/мл (3); містить опромінені на частоті 47.75 ГГц дріжджі і кислоту 3 мг/мл (4)

На основі кінетичних кривих газовиділення з різним вмістом лимонної кислоти побудовано залежність відносної швидкості газовиділення в суспензіях дріжджів для трьох стадій експерименту (рис. 3). Перша стадія (до 40 хв) є найбільш чутливою до присутності лимонної кислоти. На другій (II) стадії (лаг-фаза) спостерігається деяка активізація ферментативного процесу (у 1.3 рази по відношенню до контрольної суспензії) в присутності невеликої кількості лимонної кислоти (до 2 мг/мл), що відповідає рН близько 3. Заключна стадія (III) розвитку суспензії є найменш чутливою до присутності лимонної кислоти і спостерігається пригнічення лише при досягненні концентрації 3 мг/мл (рН 2.4).



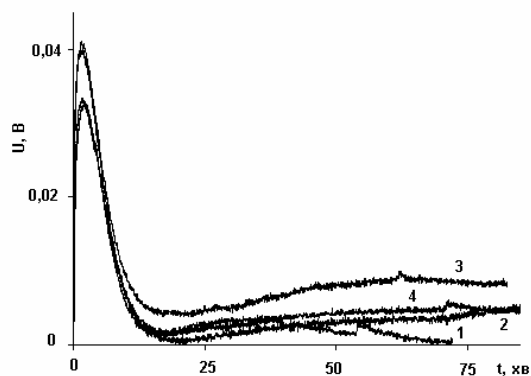
**Рис. 3.** Залежність відносної швидкості газо-виділення в суспензіях дріжджів від логарифму концентрації лимонної кислоти (I стадія – змочування, II – лаг-фаза, III – заключна стадія)

Дослідження в умовах ендogenousного метаболізму, тобто за відсутності зовнішнього живильного середовища, а лише за рахунок розщеплення резервних вуглеводів проводили за допомогою ДМК. Як і в дослідях екзогенного метаболізму, експеримент проводили в присутності лимонної кислоти при попередньому опроміненні клітин МНЕВ на стимулюючій частоті 47.75 ГГц. Необхідно зазначити, що у випадку ендogenousного метаболізму транспорт продуктів метаболізму (через плазмолему) на межі поділу поверхня клітини – розчин є одностороннім, тобто в цьому випадку відбувається лише тепло-масоперенесення з клітинного організму назовні.

На рис. 4 представлені вихідні залежності напруги на детекторній термобатарей ДМК, які характеризують релаксацію ентальпії систем дріжджів. Розділити процеси оводнення і ферментації можна шляхом логарифмування залежностей напруги від часу.

Ферментація клітин дріжджів у водному середовищі відбувається протягом 1 год. В присутності лимонної кислоти ферментація спостерігається довше (понад 3 год), відбувається більш інтенсивно для опроміненних клітин, в результаті чого її тривалість менша (близько 2 год). На кривих релаксації теплового потоку спостерігається відхилення від регулярності теплового режиму для суспензій дріжджів, що містять лимонну кислоту. Це відхилення проявляється між часом оводнення і початком ферментації.

Характерна поведінка релаксаційних кривих для систем, що містять лимонну кислоту, свідчить про наявність перехідного періоду між першою та другою стадіями розвитку в суспензіях, що обумовлено структурною перебудовою плазмолемі клітинного організму для самозахисту від проникнення надлишкової лимонної кислоти в цитоплазму клітини. Така перебудова білкової структурної організації плазмолемі потребує додаткових енергетичних витрат і ресструється у вигляді надлишкового теплового процесу.



**Рис. 4.** Залежності напруги на детекторній термобатарей для систем дріжджів: дріжджі – вода (1); дріжджі – вода – лимонна кислота з концентрацією 2 мг/мл (2); опромінені на частоті 47.75 ГГц дріжджі – вода (4); опромінені на частоті 47.75 ГГц дріжджі – вода – лимонна кислота з концентрацією 2 мг/мл (3)

За релаксаційними кривими ентальпії розраховано теплові ефекти процесів змочування та ферментації в залежності від концентрації лимонної кислоти в субстраті (рис. 5) для неопроміненних та опроміненних на частоті 47.75 ГГц дріжджів. Інтенсивність тепловиділення суспензій дріжджів в залежності від концентрації лимонної кислоти має нелінійний характер: максимум спостерігається при рН 2.7. Ентальпія змочування дріжджових клітин від вмісту лимонної кислоти залежить слабо, на відміну від ферментації. Залежність ферментативних процесів від вмісту кислоти в умовах екзогенного метаболізму має нелінійний характер і має максимум при концентрації 0.7 мг/мл. Опромінення збільшує енергію змочування та ферментації, особливо це проявляється зі зростанням вмісту лимонної кислоти. Так, для концентрації 3 мг/мл

спостерігається збільшення енергії змочування та ферментації більш ніж удвічі.

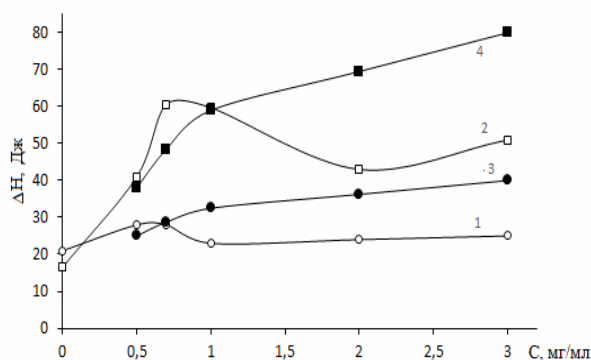


Рис. 5. Залежність теплоти змочування (1, 3) та енергії ферментації (2, 4) для неопромінених (1, 2) та опромінених на частоті 47.75 ГГц (3, 4) дріжджів від концентрації лимонної кислоти

#### ВИСНОВКИ

Досліджено зміну процесів життєдіяльності дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, як неопромінених клітин, так і попередньо

опромінених МНЕВ, від вмісту лимонної кислоти в діапазоні концентрацій (0–4 мг/мл), що відповідає інтервалу рН від 7.4 до 2.4. Невеликі концентрації лимонної кислоти (до 2 мг/мл) пригнічують ферментативний процес лише на початковій стадії та активізують процеси життєдіяльності клітин, як опромінених, так і неопромінених. Суттєве збільшення теплового ефекту за рахунок ферментації та її тривалості в присутності лимонної кислоти свідчить про більш повну засвоєність вуглеводного запасу клітинами.

Опромінення дріжджових клітин МНЕВ на частоті 47.75 ГГц, що стимулює активність процесів життєдіяльності, є додатковим чинником, що сприяє збільшенню інтенсивності ферментації, навіть в агресивному по відношенню до клітин середовищі.

Зростання ентальпії процесів оводнення і ферментації при збільшенні концентрації лимонної кислоти може бути наслідком перебудови білкової структури плазмолем з метою самозахисту клітинного організму від зовнішніх впливів.

### Влияние микроволнового низкоинтенсивного электромагнитного излучения на жизнедеятельность клеток дрожжей в среде лимонной кислоты

О.М. Лисова, А.Н. Багацкая, С.Н. Махно, П.П. Горбик

Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины  
ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина, oksana.garkusha@gmail.com

Представлены результаты исследования влияния лимонной кислоты различной концентрации (рН суспензии) в условиях экзогенного и эндогенного метаболизма в процессе жизнедеятельности дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae*, предварительно облученных низкоинтенсивным электромагнитным излучением различной частоты миллиметрового диапазона.

Показано, что небольшие концентрации лимонной кислоты (до 2 мг/мл) подавляют ферментативный процесс лишь на начальной стадии и активизируют процессы жизнедеятельности клеток, как облученных, так и необлученных. Существенное увеличение продолжительности и величины теплового эффекта за счет ферментации в присутствии лимонной кислоты свидетельствует о более полной усвояемости углеводов.

**Ключевые слова:** дрожжевые клетки, лимонная кислота, рН среды, низкоинтенсивное электромагнитное излучение, резонансный эффект

## The effect of low-intensity microwave electromagnetic radiation on vital functions of yeast cells in the medium of citric acid

O.M. Lisova, A.N. Bagatskaya, S.N. Makhno, P.P. Gorbyk

Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine  
17 General Naumov Str., Kyiv, 03164, Ukraine, oksana.garkusha@gmail.com

*The impact of electromagnetic fields on biological objects of various organization levels attracts specialists of different disciplines. At formation of the biological response to external physical effects, cell membranes play crucial role due to their ability to regulate biochemical processes in the cell, the possibility to change the rate of diffusion of ions and substrates and electronic structure of free radicals, orientation and other biological macromolecules. Citric acid is present in every act of microorganism's vital activity as a key element of the cycle of tricarboxylic acids, and therefore plays an important role in the metabolism of living cells that use oxygen, and acts as accelerating and braking regulator of certain enzymatic processes of primary metabolism depending on the concentration. The active acidity significantly affects the vital activity in yeast. The purpose – to identify the patterns of influence of citric acid on yeast in suspension in the concentration range of 0–4 mg/ml, on vital processes of cells following the exposure of low electromagnetic radiation of millimeter range. The results of studies on the effect of citric acid (pH of the slurry) with different concentrations on exogenous and endogenous metabolism with the control of gas and heat during the life of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, previously irradiated with low-intensity electromagnetic radiation of different frequencies of millimeters range are presented. It has been shown that low concentrations of citric acid (up to 2 mg/ml) inhibit the enzymatic process only at an initial stage and activate the processes of cell metabolism as both irradiated and nonirradiated. A substantial increase in the duration and thermal effect due to fermentation in the presence of citric acid indicates more complete assimilation of carbohydrates. The changing of the behavior of the relaxation curves for the systems containing citric acid indicates the presence of transition between stages of flooding and fermentation of such suspensions, which may be due to the restructuring plasmolemma of the cellular organism in self-defense against excessive concentration of citric acid in cells cytoplasm. The restructuring of the protein structural organization of plasmolemma requires additional energy costs and is recorded in the form of excess heat.*

**Key words:** yeast, citric acid, pH, low-intensity electromagnetic radiation, resonant effect

### ЛІТЕРАТУРА

1. Коваленко О.И., Кивва Ф.В., Калиниченко С.В., Коворотный А.Л. Особенности прямого и опосредованого воздействия электромагнитных полей низкой интенсивности на семена растений и микроорганизмы // Радиофизика и электроника. – 2007. – Т. 12, № 1. – С. 273–282.
2. Туранская С.П., Туров В.В., Гунько В.М., Богатирьев В.М. Асоціати води у частково зневоднених дріжджах і на поверхні гідрофобного кремнезему // Поверхня. Хімія, фізика та технологія поверхні. – 2004. – С. 207–211.
3. Поверхностные пленки воды в дисперсных структурах / Под ред. акад. Е.Д. Щукина. – Москва: Изд-во МГУ, 1988. – 280 с.
4. Паршина С.С., Головачева Т.В., Киричук В.Ф., Афанасьева Т.Н. и др. Новые аспекты клинического использования терагерцовой терапии на частотах молекулярного спектра оксида азота у больных стенокардией // Миллиметровые волны в биологии и медицине. – 2009. – № 1–2. – С. 5–21.
5. Вызулина В.И. Влияние коротковолнового сверхвысокочастотного магнитного излучения на биологическую активность микроорганизмов. Дисс. канд. физ.-мат. наук. 03.00.16. – Краснодар, 2008.
6. Янчевский В.К., Коваленко А.Д., Яровенко В.Л. и др. Накопление продуктов брожения при различном рН мелассного сула // Ферментная и спиртовая промышленность. – 1984. – № 1. – С. 18–24.
7. Горбик П.П., Мазуренко Р.В., Махно С.Н., Гаркуша О.М., Багацька А.Н. Влияние высокодисперсных оксидов и низкоинтенсивного электромагнитного излучения на активность биологических систем // Наноматериалы и нанокompозиты в медицине, биологии, экологии. – Киев: Наук. думка, 2011. – С. 90–111.
8. Гаркуша О.М., Махно С.Н., Багацька А.Н., Горбик П.П. Тепловые эффекты при иммерсионном смачивании силикагеля и дрожжевых клеток в процессе образования их водных суспензий // Коллоидный журнал. – 2010. – Т. 72, № 3. – С. 323–328.

REFERENCES

1. Kovalenko O.I., Kivva F.V., Kalinichenko S.V., Kovorotny A.L. Features direct and mediating impact of electromagnetic fields of low intensity on plant seeds and micro-organisms. *Radiophysics and Electronics*. 2007. **12** (1): 273. [in Russian].
2. Turanska S.P., Turov V.V., Gunko V.M., Bogatyrev V.M. *The water associates in partially dehydrated yeast on the surface of the hydrophobic silica*. Surface. Chemistry, physics and technology of surface. (Kyiv: KM Academy, 2004). [in Ukrainian].
3. *Surface water film in dispersed structures*. Ed. Acad. ED Shchukin. (Moscow: MGU, 1988). [in Russian].
4. Parshina S.S., Golovacheva T.V., Kirichuk V.F., Afanasyeva T.N. New aspects of the clinical use of terahertz therapy at frequencies of molecular spectrum of nitric oxide in patients with angina. *Millimeter waves in biology and medicine*. 2009. 1–2: 5. [in Russian].
5. Vyzulina V.I. Ph.D. (Physical and mathematical sciences) Thesis.(Krasnodar, 2008). [in Russian].
6. Yanchevskii V.K., Kovalenko A.D., Yarovenko V.L. The accumulation of fermentation products at different pH molasses wort. *Enzyme and alcohol promyshlennost*. 1984. **1**: 18. [in Russian].
7. Gorbyk P.P., Mazurenko R.V., Makhno S.N., Garkusha O.M., Bagatskaya A.N. Influence of superfine oxides and low-intensity electromagnetic radiation on the activity of biological systems *Nanomaterials and nanocomposites in medicine, biology, ecology*. (Kiev: Naukova Dumka, 2011). [in Russian].
8. Garkusha O.M., Makhno S.N., Bagatskaya A.N., Gorbyk P.P. Thermal effects during the immersion wetting of silica gel and the yeast cells during the formation of aqueous suspensions. *Colloid Journal*. 2010. **72**(3): 323. [in Russian].

Надійшла 17.09.2015, прийнята 16.06.2016