

MICROBIOLOGIA ȘI BIOTEHNOLOGIA

EPECTELE UNDELOR MILIMETRICE ASUPRA PRODUCȚIEI DE BIOMASĂ ȘI COMPOZIȚIEI BIOCHIMICE A LEVURII *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CNMN-Y-20 ÎN FUNCȚIE DE DURATA IRADIERII

Usatfi Agafia, Chiselița Natalia, Efremova Nadejda, Borisova Tamara

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei

Rezumat

A fost evaluat impactul undelor milimetrice de intensitate extra înaltă asupra activității biosintetice a levurii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 în funcție de durata iradierii. S-a relevat că cantitatea maximală de biomasă, proteină, carbohidrați, β -glucani și catalază este acumulată la iradierea culturii cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz timp de 15-20 min. La tulpina de levuri iradiată, s-a stabilit un grad înalt de dependență (coeficienții de determinare variază în limitele $R^2 = 0,633... 0,949$), între conținutul componentelor celulare, fapt ce demonstrează că procesele biosintetice sunt influențate de același fenomen din fundal, de undele milimetrice. În premieră se propune un procedeu de sporire la levuri a conținutului de β -glucani cu utilizarea în calitate de factor stimulator al undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă.

Cuvinte cheie: *Saccharomyces cerevisiae*, β -glucani, carbohidrați, biomasă celulară, proteină, activitatea catalazei, unde milimetrice.

Depus la redacție 02 iunie 2014

Adresa pentru corespondență: Usatfi Agafia, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei, str. Academiei, 1, MD 2028 Chișinău, Republica Moldova; tel. (+37322)73-80-13; e-mail: usatyi.agafia@gmail.com

Introducere

În publicațiile de specialitate se indică faptul că sub acțiunea câmpului electromagnetic, procesele funcționale ale celulei sunt legate de formarea unor substructuri ale membranei celulare, care ulterior determină frecvența și intensitatea undelor acustice generate de către însăși celula [11,14]. În cazul lipsei iradierii exterioare aceste substructuri, sub acțiunea mișcării browniene, treptat revin la starea inițială [7,16,18]. Devierile apărute nu întotdeauna se păstrează pe o durată lungă de timp, de aceea, pentru intensificarea proceselor fiziologice, în cazul studiului efectelor undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă, este important de a stabili durata optimă de

acțiune a acestora asupra organismului. Studiul în dinamică a derulării ciclului mitotic și biosintezei principiilor bioactive sub influența undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă, poartă un caracter teoretic și practic.

Pentru aplicațiile practice a undelor milimetrice în microbiologie și biotehnologie este esențială cunoașterea procesului de creștere a culturii ca răspuns la acțiunea factorului extern. Obiectele biologice posedă sensibilitate diferită la iradiere, deaceia în vederea caracterizării reacției de răspuns a levurii este important de a depista timpul când celula își sincronizează activitatea la frecvența undelor milimetrice aplicate. Un indice important al ameliorării calităților tehnologice ale tulpinilor de levuri este caracteristica bioproductivă – producția de biomasă, conținutul de proteine, carbohidrați, β -glucani, alte principii bioactive.

Scopul cercetărilor expuse în lucrare constituie aprecierea efectului biologic al undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă asupra tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 în funcție de durata expunerii și elaborarea procedurii de sporire a conținutului de β -glucani în biomasa levuriană.

Materiale și metode

Obiect de studiu a servit tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, producător de β -glucani, păstrată în colecția laboratorului Biotehnologia Levurilor și în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei [3].

Medii și condiții de fermentare. Materialul semincer a fost obținut prin cultivarea tulpinii levuriene pe must de bere, timp de 24 ore, pe agitator (200 rpm.), la temperatura de 25°C. Inoculul s-a utilizat pentru iradiere cu unde milimetrice. După expunerea la undele milimetrice cu frecvență extra înaltă, celulele de levuri în volum de 5%, 2×10^6 celule/ml, au fost inoculate pe mediul lichid și crescute în condiții identice cu martorul. Cultivarea în profunzime s-a realizat în baloane Erlenmeyer ce conțin 0,2 L mediu nutritiv YPD: 1% extract de drojdie, 2% peptonă, 2% glucoză, apă potabilă 1 L, pH 5,5 [2], durata de cultivare 120 h, la temperatura de 25°C.

Ca generator de unde milimetrice a fost utilizat dispozitivul KBЧ-НД, RS-232, cu lungimea de undă $\lambda = 5,6$ mm, ceea ce corespunde frecvenței $f = 53,33$ GHz, (maxim 10 mW/cm^2), oferit cu amabilitate de către colaboratorii Institutului de Inginerie Electronică și Nanotehnologii „D. Ghițu”. Aparatul este certificat și permis spre utilizare în practica medicală.

Durata tratării culturii de levuri a constituit: pentru iradierea ordinară - 5, 10, 15, 20, 25 min, pentru iradierea dublă – 10, 10+10, 20, 20+20 min.

Metode de investigație. Biomasa celulară s-a determinat gravimetric [8]. Carbohidrații totali în biomasa de levuri au fost determinați la spectrofotometru PG T160 VIS Spectrophotometer, la lungimea de undă 620 nm cu utilizarea reactivului antron și D-glucozei în calitate de standard [4]. Determinarea conținutului de β -glucanii s-a realizat gravimetric [8,13]. Proteina a fost determinată conform metodei Lowry [9]. Activitatea catalazei a fost stabilită conform metodei descrise de Efremova [1,5].

Prelucrarea statistică a rezultatelor a fost efectuată computerizat cu calcularea erorilor standard pentru valorile relative și medii, au fost apreciate diferențele dintre experiment și martor după criteriul t-Student și pragul de semnificație “P” [17].

Rezultate și discuții

În vederea depistării intervalului de timp în care are loc intensificarea proceselor fiziologice sub influența undelor milimetrice cu intensitate extra înaltă, a fost determinat conținutul de carbohidrați totali, β -glucani, biomasă celulară, proteină, activitatea catalazei.

Din datele prezentate în figura 1 reiese că cantitatea maximală de β -glucani, carbohidrați și biomasă uscată (B.U.) este acumulată la iradierea culturii timp de 15-20 min. Conținutul de biomasă este de 4,85– 4,98 g/L, ceea ce depășește martorul cu 14,1-17,2%; al carbohidraților - de 35,94-36,33% din biomasă uscată sau cu 19,6-20,8 % mai mult comparativ cu martorul neiradiat; al β -glucanilor - de 18,84-20,0 % la substanța uscată sau cu 18,5-25,7% mai mult față de martor.

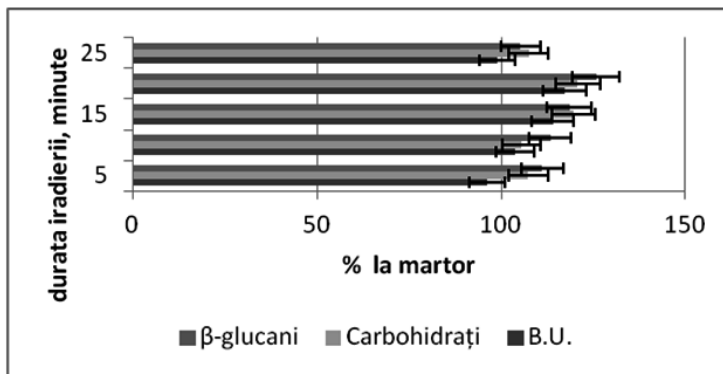


Figura 1. Efectul undelor milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz asupra conținutului de β -glucani, carbohidrați și biomasă la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 în funcție de durata iradierii.

Prin aplicarea analizei statistice, au fost determinate ecuațiile liniilor de regresie, precum și coeficienții de determinare R^2 , ce descriu relația dintre două valori variabile, în cazul nostru relația dintre valorile cantitative ale biomasei și cele ale componentelor peretelui celular la iradierea culturii cu unde milimetrice emise timp de 5, 10, 15, 20, 25 min (fig. 2, 3, 4).

Calculul coeficientului $R^2 = 0,949$, interpretat procentual, ar însemna că 94,9% din varianta biomasei este însoțită de varianta acumulării carbohidraților (fig. 2).

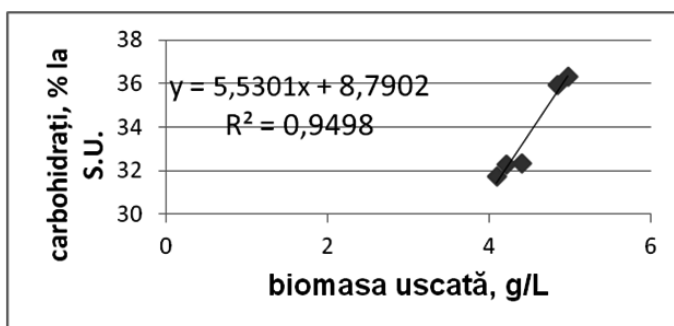


Figura 2. Interdependența acumulării biomasei și carbohidraților la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, iradiată cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz.

Calculul coeficientului de determinare pentru alte două variabile - biomasă și β -glucani, caracteristic levurilor supuse iradierii cu unde milimetrice, a relevat o asociere puternică, pozitivă. Coeficientul de determinare $R^2 = 0,718$ sau 71,8 % din variația valorilor acumulării biomasei este însoțită de variația valorilor celeilalte variabile - a β -glucanilor (fig. 3).

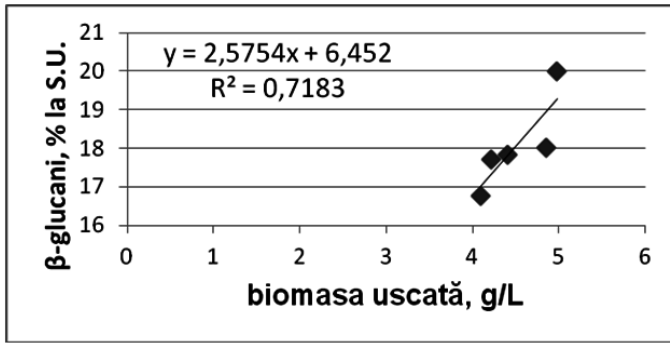


Figura 3. Interdependența acumulării biomasei și β-glucanilor la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, iradiată cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz.

Analiza legăturii parametrilor conținutului de β-glucani și carbohidrați a stabilit o tendință ascendentă a unei valori care implică, la rândul său, o tendință ascendentă a celeilalte variabile. Legătura între ele identificată ca $R^2=0,633$ sau 63,3%, argumentează ipoteza existenței unei legături reale în baza careia se poate pronostica valorile uneia în raport cu valorile celeilalte pe baza ecuației de regresie. O posibilă explicație ar fi că ambele variabile, carbohidrații și β-glucanii, sunt influențate de același fenomen din fundal, adică de undele milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz (fig. 4). Efectul de activare a biosintezei carbohidraților și β-glucanilor la acțiunea undelor milimetrice cu frecvența menționată se asociază cu modificările oscilațiilor de frecvență a biomembranei celulare a levurii.

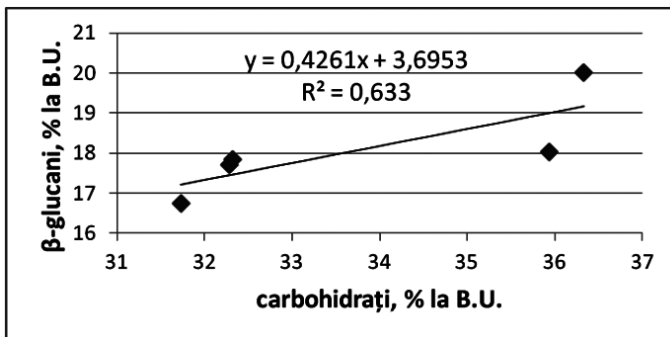


Figura 4. Interdependența acumulării β-glucanilor și carbohidraților la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, iradiată cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz.

Studiul conținutului de proteină și activității enzimei antioxidante catalaza la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 a demonstrat un maximum de acumulare a proteinei (41,00%) și de activitate a catalazei (2642 U/mg proteina), ceea ce este cu 33,00-38,00% mai mult față de proba neiradiată, care se manifestă la durata de iradiere de 15 min (fig. 5).

Examinarea relației dintre conținutul de proteină și activitatea catalazei la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, iradiată cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz, a demonstrat un grad de dependență înalt, coeficientul de determinare a constituit 0,864 (fig. 6).

Astfel, pentru tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, regimul optimal de acumulare a componentelor structurale necesare formării unei generații noi, cantitatea maximală de biomasă, carbohidrați și β-glucani și proteină, activității catalazei, se constată la iradierea cu unde milimetrice cu frecvența 53,33 GHz timp de 15-20 min.

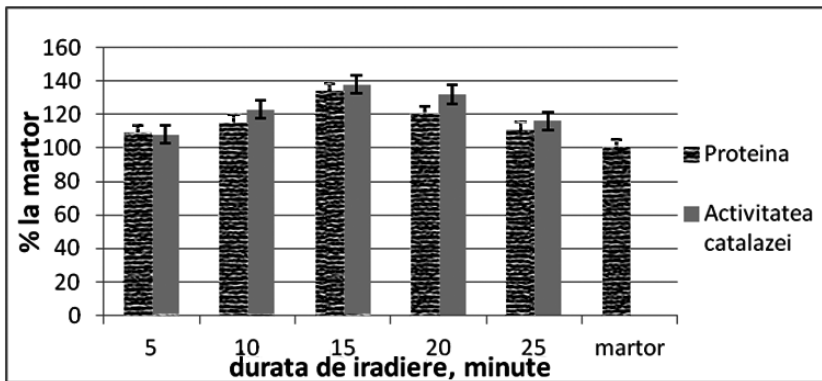


Figura 5. Efectul undelor milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz asupra cantității de proteină și activității catalazei la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 în funcție de durata iradierii.

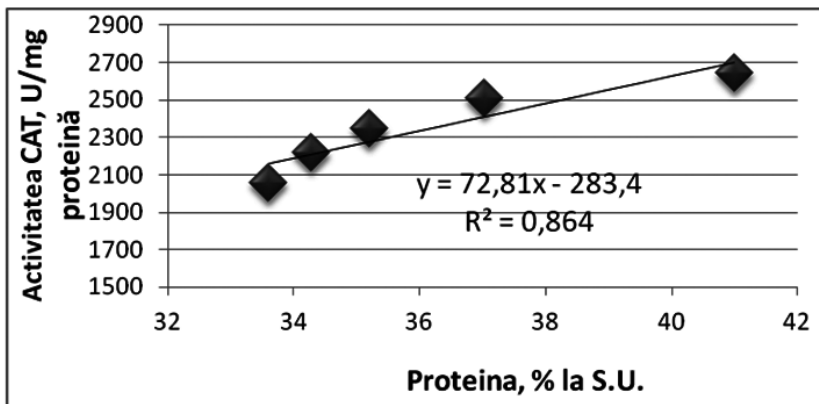


Figura 6. Relația dintre conținutul de proteină și activitatea catalazei la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 iradiată cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz.

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

Investigațiile ulterioare au avut drept scop evaluarea efectului iradierii duble cu unde milimetrice de intensitate extra înaltă a tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 în vederea relevării regimului optim de stimulare a proceselor biosintetice.

În experiențele noastre, cultura de levuri, a fost iradiată inițial în faza de latență (până la inoculare) și repetat în faza creșterii accelerate (după 24 ore de cultivare în profunzime). În vederea inițierii unui stres al culturii, care poate iniția dereglări în metabolismul celular, temperatura de cultivare a levurii a fost ridicată până la 28-30 °C cu 3-5°C mai mult comparativ cu optimul specific tulpinii date.

În calitate de indicatori sensibili a stării funcționale a levurii s-a cercetat conținutul de biomasă, carbohidrați, glucani, proteină și activitatea catalazei.

Cercetările au demonstrat că iradierea dublă a culturii de *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, inițial în faza de latență (până la inoculare) și repetat în faza creșterii accelerate (după 24 ore de cultivare în profunzime la temperatura de 30°C) nu induce schimbări esențiale ale conținutului de β -glucani, carbohidrați și producției de biomasă, comparativ cu variantele culturii iradiată o singură dată (fig. 7).

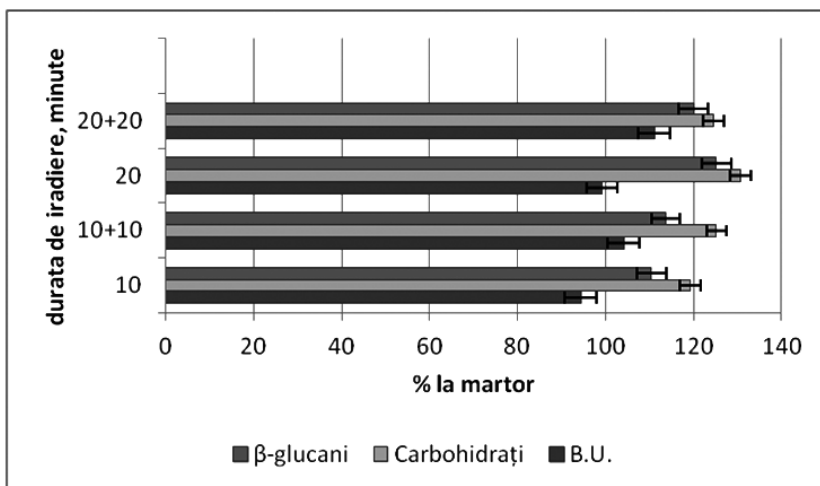


Figura 7. Efectul iradierii duble cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz asupra conținutului de β -glucani, carbohidrați și producției de biomasă la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20

Rezultate relevante s-au obținut în experiențele de elucidare a potențialului de biosinteză a proteinei și activității catalazei la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 iradiată repetat.

La analiza rezultatelor s-a constatat că iradierea dublă, cu durata de 10 min, are efect stimulator asupra conținutului de proteină și activității catalazei. Conținutul maximal de proteină prevalează martorul cu 20,0 și respectiv 36,0% (fig. 8). Iradierea dublă cu durata de 20 min nu inițiază efecte semnificative asupra conținutului de proteine comparativ cu iradierea culturii o singură dată, în faza de latență.

Cercetările au evidențiat că iradierea dublă, cu durata de 20 min, provoacă o micșorare a activității catalazei. Acest efect poate fi explicat prin faptul că iradierea dublă provoacă stres oxidativ puternic, ceea ce contribuie la formarea radicalilor liberi, precum și peroxidului de hidrogen. Numărul mare de radicali liberi inhibă activitatea enzimelor antioxidante, inclusiv și a catalazei. Rezultatele obținute în experiențele noastre sunt similare cu datele din literatura de specialitate, care demonstrează că activitatea enzimelor antioxidante și conținutul de proteină sunt legate de stresul oxidativ [6, 10, 12, 15].

Astfel, răspunsul pozitiv al celulei se exprimă prin sporirea substanțială a conținutului de proteină și al activității catalazei în variantele experimentale, în care levura a fost iradiată repetat cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz timp de 10 min.

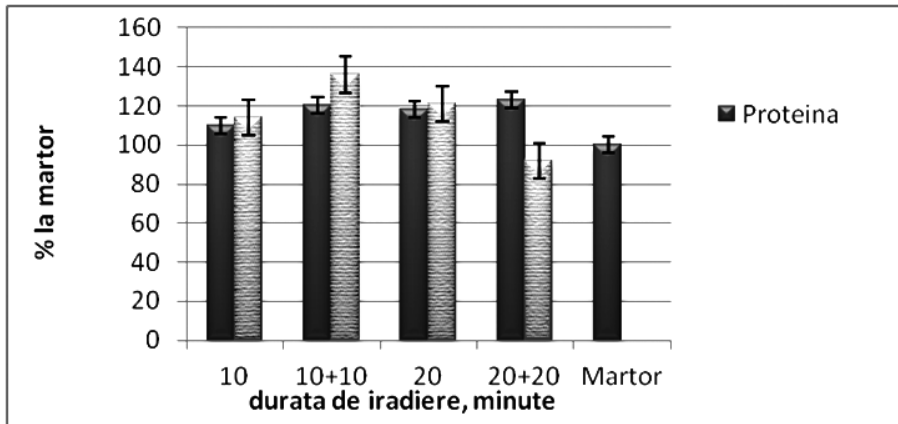


Figura 8. Efectul iradierii duble cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz asupra conținutului de proteină și activității catalazei la *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20.

În conformitate cu rezultatele cercetărilor se propune un procedeu nou de sinteză orientată a glucanilor prin utilizarea undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă.

Procedeul de intensificare a biosintezei β -glucanilor include: prepararea materialului semincer prin cultivarea germeilor în submers 24 ore, la temperatura de 25°C ; tratarea timp de 15-20 min cu unde milimetrice de intensitate extra înaltă ($f=53,3$ GHz) emise în regim continuu; însămânțarea ulterioară a mediului de fermentație steril cu inocul iradiat (2×10^6 celule ml^{-1}), în concentrație de 5 % în bază volumetrică; cultivarea în profunzime, în condiții de agitare continuă (200 r.p.m.) la 25°C , timp de 120 ore.

Schema realizării procedurii este prezentată în figura 9 și include următoarele etape:

Etapa I. Obținerea inoculului.

Materialul semincer se obține prin cultivarea levurii în profunzime, pe must de bere sau YPD, timp de 24 ore, pe agitatorul rotativ (200 r.p.m.), la temperatura de 25°C .

Etapa II. Iradierea culturii cu unde milimetrice de intensitate extra înaltă.

Inoculul se iradiază cu unde milimetrice cu frecvența $f=5,33$ GHz, timp de 15-20 min. Inoculul iradiat, în volum de 5% în bază volumetrică, 2×10^6 celule/ml, este utilizat pentru mediile de fermentație.

Etapa III. Cultivarea levurii în profunzime. Cultivarea submersă a levurii se realizează în baloane Erlenmeyer cu capacitate de 1l ce conține 0,2 l mediu nutritiv YPD: extract de levuri 1%, peptonă 2 %, glucoză 2%, apă potabilă 1 L, pH 5,5 (Liu Hong Ziu 2009), pe agitatorul rotativ (200 r.p.m.), la temperatura de $+25^{\circ}\text{C}$, timp de 96-120 ore. Biomasa levuriană se separă de lichidul cultural prin centrifugare 3000 rot/min timp de 20 min.

Etapa IV. Extragerea β -glucanilor. Extragerea β -glucanilor se efectuează conform procedurii: biomasa celulară (ajustată la 15% g / g conținut de substanță solidă și pH 5) se supune autolizei la 50°C 24 ore, ulterior autolizatul se încălzește la $80 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 15 min, se răcește, se centrifughează la 3565g 10 min. Pereții celulari se colectează. La pereții celulari se adaugă 5 volume de NaOH 1N, amestecul se supune tratării termice la $80 \pm 5^{\circ}\text{C}$, timp de 2 ore. Ulterior, se adaugă 5 volume de acid acetic 0,5N și se încălzește

la $75 \pm 5^\circ\text{C}$ timp de 1 oră. Amestecul se centrifughează la 3565g 10 min la temperatura camerei. Depozitul (β -glucanii) se spală de trei ori cu apă distilată, se usucă.

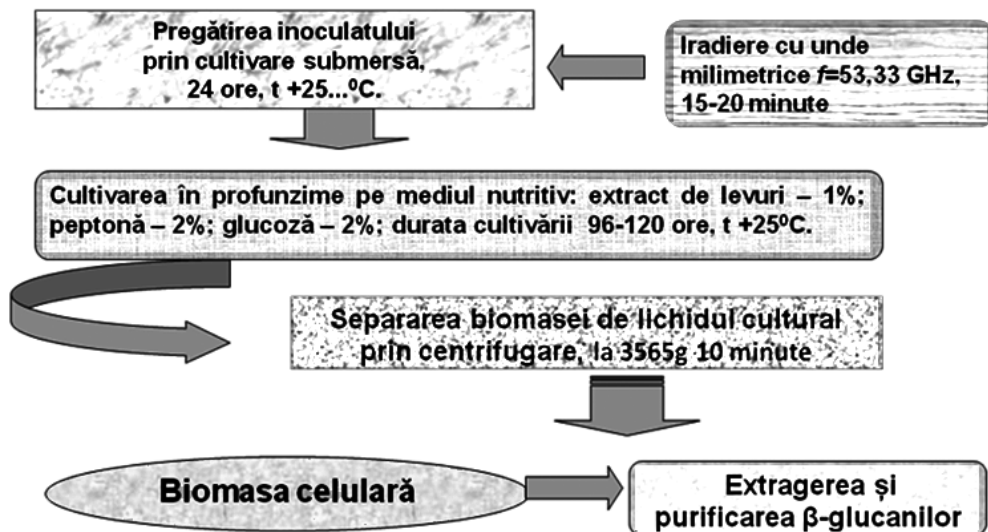


Figura 9. Schema realizării procedurii de sporire a conținutului de β -glucani la *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 prin utilizarea undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă.

Procedeul propus asigură majorarea conținutului de β -glucani cu 25,7 % față de martor. Rezumând rezultatele experimentale se poate deduce că cantitatea maximală de biomasă, carbohidrați și β -glucani este acumulată la iradierea culturii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33\text{ GHz}$ timp de 15-20 min. Sporirea conținutului de proteină și activității catalazei s-a observat la iradierea tulpinii timp de 15 min.

Analiza relației interdependenței conținutului de biomasă, carbohidrați, β -glucani, proteină și activitatea catalazei la tulpina de levuri iradiată, a stabilit o tendință ascendentă de corelare foarte puternică ($R^2 = 0,949\text{...}0,633$), deci variabilele examinate sunt influențate de același fenomen din fundal, de undele milimetrice cu frecvența $f=53,33\text{ GHz}$. Iradierea dublă, fie cu durata de 10 sau 20 min, nu induce schimbări esențiale, comparativ cu variantele culturii iradiată o singură dată, a conținutului de β -glucani, carbohidrați și producției de biomasă celulară. Majorarea substanțială cu 20% a proteinei și cu 36% a activității catalazei s-a înregistrat la tratarea repetată a tulpinii timp de 10 min cu unde milimetrice de intensitate extra înaltă.

În premieră se propune procedeul de sporire a β -glucanilor la levura *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 cu utilizarea în calitate de factor stimulator al undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă $f=53,33\text{ GHz}$ și durata de iradiere de 15-20 min. Avantajul procedurii propus constă în majorarea conținutului de β -glucani cu 25,7% față de martor.

Concluzii

Undele milimetrice cu frecvența $f=53,33\text{ GHz}$ manifestă influență pozitivă asupra levurii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 la iradierea timp de 15-20 min.

Un grad înalt de dependență (coeficienții de determinare variază în limitele $R^2 = 0,633... 0,949$), la tulpina de levuri iradiată, s-a stabilit între conținutul de biomasă, carbohidrați, β -glucani, proteină și activitatea catalazei, fapt ce demonstrează că aceste componente celulare sunt influențate de același fenomen din fundal, de undele milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz.

Utilizarea undelor milimetrice de intensitate extra înaltă în procesul de cultivare a levurii permite obținerea biomasei celulare cu conținut sporit de β -glucani și respectiv procedeul propus poate fi încadrat cu succes în fluxurile tehnologice de producere industrială.

Bibliografie

1. Aebi H. Catalase in Vitro. In: Methods in Enzymology, 1984, no. 105, p. 121-126.
2. Aguilar-Uscanga, B.; Francois, J.M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation.// Letters in Applied Microbiology, 2003, 37, 268-274.
3. Chiselița O., Usatii A., Taran N., Rudic V., Chiselița N., Adajuc V. Tulpină de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* – sursă de β -glucani. Brevet de invenție 4048 B1, MD, C12N 1/16. BOPI nr. 6/2010, p. 20-21..
4. Dey P., Harborn J. Methods in Plant Biochemistry. Carbohydr. Academic Press, 1993, vol. 2, 529 p.
5. Efremova N., Usatii A., Molodoi E. Metodă de determinare a activității catalazei. Brevet de invenție 4205 MD, BOPI nr. 2/2013, p. 26.
6. Gonzalez-Parraga P., Hernandez J., Carlos Arguelles J. Role of antioxidant enzymatic defences against oxidative stress (H_2O_2) and the acquisition of oxidative tolerance in *Candida albicans* //Yeast, 2003, 20: 1161–1169.
7. Gromozova E. N., Voychuk S. I. Influence of radiofrequency EMF on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as model eukaryotic system. // Imst of Microbiol. and Virology, NAS Ukraine, 2005, p.167-175.
8. Liu Hong-Zhi., et al. Statistical optimization of culture media and conditions for production of mannan by *S. cerevisiae*. // Biotech. and Bioprocess Engineering, 2009, vol. 14(5), p. 577-583.
9. Lowry O., Rosebough N., Farr A. et. al. Protein measurement with the folin phenol reagent.// J. Biol. Chem., 1951, vol. 193, p. 265-275.
10. Nedjoud, G., Fadila K., Mouna A., Zohra G., Sana G. Effect of zinc on growth, metabolism and activity of antioxidant enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.// Global Journal of Biodiversity Science And Management, 2013, 3(2): 243-248.
11. Ruiz-Gomez M. J, Prieto-Barcia M. I, Ristori-Bogajo E., Martinez-Morillo M. Static and 50 Hz magnetic fields of 0.35 and 2.45 mT have no effect on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. //Bioelectrochemistry, 2004, 64, 151– 155.
12. Shim I., Momose Y., Yamamoto A., Kim D., Usui K. Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants.// Plant Growth Regulation, 2003, 39: 285–292.
13. Thammakiti S., Suphantharika M., Phaesuwan, T., Verduyn. Preparation of spent brewer's yeast β -glucans for potential applications in the food industry.// International Journal of Food Science&Technology, 2004, 39(1), 21-29.
14. Vrhovac Ivana., Reno Hrascan., Jasna Franekic. Effect of 905 MHz microwave radiation on colony growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* strains FF18733, FF1481 and D7. //Radiol. Oncol 2010; 44(2): 131-134. doi:10.2478/v10019-010-0019-7.
15. Zwirska-Korczała K, Jochem J, Adamczyk-Sowa M, Sowa P, Polaniak R, Birkner E, Latocha M, Pilc K, Suchanek R. Effect of extremely low frequency of electromagnetic

fields on cell proliferation, antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in 3T3-L1 preadipocytes--an in vitro study.// J Physiol Pharmacol., 2005, 56(6):101-108.

16. *Божанова Т.П., Брюхова А.К., Голант М.Б., Кичаев В.А.* Ускорение процесса понижения активности клеток после воздействия на них КВЧ излучения.// Миллиметровые волны в медицине и биологии. Москва, 1989, с.205-2007.

17. *Доспехов Б.* Методика полевого опыта. Москва: Агропромиздат, 1985, 351 с.

18. *Савельев С.В., Бецкий О.В., Морозова Л.А.* Основные положения теории действия миллиметровых волн на водосодержащие и живые биологические объекты // Журнал Радиоэлектроники, 2012, № 11, 1-12.