



Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта :

ЕФЕКТИ МИКРОТАЛАСНОГ ЗРАЧЕЊА МОБИЛНИХ ТЕЛЕФОНА НА РАСТ ГРАМ-НЕГАТИВНИХ БАКТЕРИЈА IN VITRO

Кључне речи :

симулатор мобилног телефона, микроталасно зрачење, гентамицин

Предмет, садржај и циљ истраживања

Сажетак

УВОД: Излагањем микроталасном зрачењу суспензије ћелија *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* долази до нарушавања структуре ћелијског зида, и до цурења ДНК и протеина из ћелија. Међутим, не долази до значајнијег смањења броја ћелија, јер се оне само инактивирају. Електронском микроскопијом утврђено је да микроталасно зрачење на површини ћелија *Escherichia coli* доводи до озбиљних оштећења, док на површини ћелија *Bacillus subtilis* не доводи до значајнијих промена.

МЕТОД: У истраживању биће укључене следеће АТСС грам-негативне бактерије: *Escherichia coli* АТСС 10536, *Klebsiella pneumoniae* АТСС 700603, *Proteus mirabilis* АТСС 12453 и *Pseudomonas aeruginosa* АТСС 9027. Манипулисање са референтним културама обавићемо по упутству MicroBioLogics. Када добијемо примарну културу, вршимо њено пресејавање на коси агар (Miller Hinton agar). У епруветама на косом агару где се налази култура додајемо стерилисану дестиловану воду и правимо њену суспензију. Затим колориметријски одређујемо број микроорганизама у 1мл суспензије. Онда одређену запремину суспензије наносимо на готову хранљиву подлогу у петри кутије. Претходо треба спремити одређене запремине антибиотика гентамицина и то 5, 10, 15, 20 и 25 µg/ml. На једном крају петри кутије додајемо суспензију микроорганизама, а на супротном раствор антибиотика одређене концентрације. Затим благим покретима равномерно распоређујемо и антибиотик и микроорганизам. Потом испитујемо да ли и у ком обиму ЕМП учесталости од 900 до 1800 MHz, симулатора мобилног телефона (СМТ) утиче на горе наведене бактерије, са и без присуства гентамицина у хранљивој подлози. Симулатор мобилног телефона, са рачунаром је повезан преко УСБ порта. Контролише се из корисничког програма који се извршава на корисничком рачунару (ПЦ), или преко додатног мобилног телефона.

ОЧЕКИВАНИ РЕЗУЛТАТИ: Након излагања електромагнетном пољу СМТ, без симулирања позива у току 24 сата, доћи ће до смањења броја, промена величине и облика колонија у односу на контролу. Након излагања електромагнетном пољу СМТ, са симулацијом



позива 3x30 минута у току 24 сата, доћи ће до знатног смањења броја, промене величине и облика колонија у односу на контролу и код узорка где се не симулира позивање. Са повећањем концентрација гентамицина у подлози, код свих испитиваних параметара, ефекат електромагнетног поља СМТ, без симулирања позива биће још већи. Највећи ефекат електромагнетног поља СМТ, са симулацијом позива 3x30 минута у току 24 сата, испољиће се у подлози са гентамицином. Вредности испитиваних параметара, биће различити у зависности од врсте бактерије.

ОЧЕКИВАНИ ЗАКЉУЧАК: Резултати ових лабораторијских испитивања, би имали велику вредност, да омогуће потпуније сагледавање штетних ефеката високофреквентног електромагнетног зрачења, што је веома значајно са аспекта сталне евалуације и могућег редефинисања постојећих стандарда за максималну дозвољену изложеност електромагнетном пољу мобилних телефона.

Циљ истраживања

Испитати у ком обиму утиче електромагнетно зрачење симулатора мобилног телефона на поједине грам-негативне бактерије и то:

1. испитати да ли и у ком обиму ЕМП учесталости од 900 до 1800 MHz утиче на раст бактерије *Escherichia coli* АТЦЦ 10536
2. испитати да ли и у ком обиму ЕМП учесталости од 900 до 1800 MHz утиче на раст бактерије *Klebsiella pneumoniae* АТЦЦ 700603
3. испитати да ли и у ком обиму ЕМП учесталости од 900 до 1800 MHz утиче на раст бактерије *Proteus mirabilis* АТЦЦ 12453
4. испитати да ли и у ком обиму ЕМП учесталости од 900 до 1800 MHz утиче на раст бактерије *Pseudomonas aeruginosa* АТЦЦ 9027
5. поред базичне експозиције у присуству апарата (стање када апарат не симулира обављање разговора), свакодневно у одређеним временским интервалима симулирати 3 x 30мин. коришћење мобилног телефона.
6. испитати да ли и у ком обиму ЕМП учесталости од 900 до 1800 MHz утиче на горе наведене бактерије, гајених у подлози са раличитим концентрацијама гентамицина.



Актуелност истраживања

Опасности које носи излагање електромагнетном пољу мобилних телефона нису видљиве у кратком периоду јер су ефекти на људско здравље и околину, мали и кумулативни. Извештај независне експертске групе за мобилне телефоне коју је оформила Британска влада садржи збир свих релевантних резултата бројних студија о биолошким ефектима електромагнетног поља-ЕМП. У њему се препоручује превентивни приступ који подразумева: ограничену дужину разговора током дана, измештање репетитора радио и мобилне телефонije из насељених места, лимитирана употреба или забрана коришћења код деце и др. **(1)**.

Биолошки ефекти експозиције организма микроталасном електромагнетном пољу мале снаге које не испољава термалне ефекте загревања ћелија и ткива, су још увек недовољно познати. Познато је да излагање електромагнетном пољу у микроталасном опсегу доводи до стрес реакције ћелија чак и када је количина апсорбоване енергије (SAR-specific absorption rate) знатно испод нивоа неопходног за загревање ћелија **(2)**.

Интеракција електромагнетских поља високе учесталости и живих организама и биолошки утицај ових поља на људе су већ низ година предмет интензивних истраживања **(3-5)**. На основу обимне литературе у овој области могу се уочити две основне групе ефеката електромагнетног зрачења на организме: термички и нетермички. Постојање термичких ефеката електромагнетног зрачења високе учесталости је у потпуности доказано и одговарајуће мере заштите уграђене су кроз одговарајуће стандарде и прописе **(4,6)**. Са друге стране, у научној јавности већ дуже време постоји претпоставка постојања нетермичких ефеката код живих организама услед дуготрајне изложености релативно слабом ЕМ пољу високе учесталости **(3,7)**. Резултати истраживања дугорочних последица ових ефеката на здравље људи су донекле контрадикторни, а даља истраживања треба да дају потпуније одговоре на ова питања.

Доказано је да излагање ЕМ пољима на фреквенцијама изнад 100 kHz може довести до апсорбије енергије у организму и до пораста температуре у телу. Простирање електромагнетских таласа кроз биолошка ткива разликује се од простирања кроз слободни простор. Загревање ткива услед апсорбије енергије РФ поља (хипертермија) је значајан ефекат, који је недвосмислено доказан. Благо повећање температуре ткива до одређене мере може се компензовати природним терморегулационим механизмима, али даљи пораст температуре доводи до оштећења ткива **(8)**.

Одређене врсте бактерија, актиноциета и гљивица биле су изложене микроталасном зрачењу од $2,450 \pm 20$ MHz у присуству и одсуству воде. Утврђено је, да до смрти микроорганизама долази само када се они налазе у воденој средини, док у лиофилизираном стању, не утиче чак и продужена изложеност зрачењу. Претпоставља се да до смрти микроорганизама долази услед термичког ефекта, јер вода апсорбује зрачење и убија микроорганизме. Претпоставка је да постоји и нетермички ефекат, али он не убија микроорганизме јер нема довољно воде да апсорбује енергију и доведе до њихове смрти **(9)**.

Излагањем микроталасном зрачењу суспензије ћелија *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* долази до нарушавања структуре ћелијског зида, и до цурења ДНК и протеина из ћелија.



Међутим, не долази до значајнијег смањења броја ћелија, јер се оне само инактивирају. Електронском микроскопијом утврђено је да микроталасно зрачење на површини ћелија *Escherichia coli* доводи до озбиљних оштећења, док на површини ћелија *Bacillus subtilis* не доводи до значајнијих промена (10- 13).

Приликом пастеризације неких производа који се користе у исхрани нема доказа да енергија радиофреквентних таласа на 18 MHz, и јачина електричног поља од око 0,5 kV/cm, може да доведе до инактивације микроорганизама у течности без присуства топлотне енергије. Штавише, нема доказа да се подржи став да постоји синергистички ефекат енергије радиофреквентних таласа и топлотне енергије (14,15).

Најчешћи узрочници уринарних инфекција су грам-негативне бактерије из фамилије *Enterobacteriaceae*. Од њих је најчешћа *E.coli*, затим *Klebsiella*, *Proteus* и *Enterobacter*. Интрахоспиталне инфекције су често изазване резистентним сојевима *Pseudomonas aeruginosa* и *Serratiae marscescens* (16).

Гентамицин спада у групу аминогликозидних антибиотика, који инхибирају синтезу протеина у бактеријској ћелији тако што ометају везивање мРНК за рибозоме. Аминогликозиди су бактерицидни антибиотици, који превасходно делују на аеробне грам-негативне бациле. Примењују се само парентерално јер се не апсорбују из дигестивног тракта. Пре свега се користе за лечење инфекција грам-негативним бактеријама (инфекције уринарног тракта, абдоминалне инфекције). Гентамицин се излучује скоро неизмењен у урину, због чега је погодан за терапију уринарних инфекција. Дневна доза гентамицина је 3mg/kg телесне масе (17).

Предмет и опис истраживања, задачи, методологија, очекивани резултати:

У истраживању биће укључене следеће ATCC [American Type Culture Collection, (добављач: ПроМедиа д.о.о. Пословни центар Кикинда, Краља Петра 1/114, 23300 Кикинда)] грам-негативне бактерије:

- *Escherichia coli* ATCC 10536,
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603,
- *Proteus mirabilis* ATCC 12453 и
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

За поуздан рад у микробиолошкој лабораторији неопходна је употреба референтних култура. У нашим истраживањима користићемо KWIK-STIK™ паковања, са лиофилизованим облицима бактерија. Манипулисање са референтним културама обавићемо по упутству MicroBioLogics, да бисмо добили примарну културу, која нам даље служи за добијање субкултура, које користимо у нашим истраживањима.

Када добијемо примарну културу, помоћу езе, и у стерилним условима вршимо њено пресејавање на коси агар (Miller Hinton agar). Затим се култура инкубира на температури од 37 °C у сушници (E28; BINDER, Немачка) у току 24 сата.

У епруветама на косом агару где се налази култура, у стерилним условима додајемо стерилисану дестиловану воду у запремини од 7мл. Благим покретима и лупкањем епрувете о длан одвајамо културу од хранљиве подлоге и правимо њену суспензију. Затим



колориметријски (Портабл колориметар: CO7500, WPA, Engleska) одређујемо број микроорганизама у 1мл суспензије.

Сада, када нам је познат број микроорганизама у једном милилитру, онда одређену запремину суспензије наносимо на готову хранљиву подлогу у Петри кутије (Петри кутије треба да буду пречника 35мм, са већ разливеним Miller Hinton агаром).

Претходо треба да спремимо одређене запремине антибиотика гентамицина и то 5, 10, 15, 20 и 25 $\mu\text{g/ml}$ (зависно од прелиминарних резултата, концентрације датог антибиотика могу да се смање или повећају).

На једном крају петри кутије додајемо суспензију микроорганизама, а на супротном раствор антибиотика одређене концентрације (ово је неопходно да се уради, јер када бисмо истовремено и на истом месту додали културу и антибиотик, могло би да дође до инактивације културе услед велике концентрације антибиотика). Затим благим покретима у правцу казаљке на сату померамо Петри кутију, да бисмо равномерно распоредили и антибиотик и микроорганизам.

Затим испитујемо да ли и у ком обиму ЕМП учесталости од 900 до 1800 MHz, симулатора мобилног телефона (СМТ) утиче на горе наведене бактерије, са и без присуства гентамицина у хранљивој подлози.

Симулатор мобилног телефона (Конструктор: Иновациони центар Електротехничког факултета у Београду д.о.о. (ИЦЕФ) 11120 Београд, Булевар краља Александра 73.) ће имати следеће карактеристике: напаја се са градске мреже (230 V) преко адаптера који овај напон спушта на напон безбедан за људе (5 V), са рачунаром је повезан преко УСБ порта. Контролише се из корисничког програма који се извршава на корисничком рачунару (ПЦ), или преко додатног мобилног телефона. У оквиру корисничког програма могуће је видети са којим оператером је успостављена веза, број телефона саговорника, снагу сигнала коју прима СМТ од базе станице, статус везе итд. Карактеристике зрачења СМТ одговарају карактеристикама рада оригиналног мобилног телефона у GSM-900 MHz (Global System for Mobile communications: originally from Groupe Spécial Mobile), GSM-1800 MHz и DCS-1800 MHz (Digital Cellular System 1800 MHz) опсезима. Опсег у коме ради СМТ није могуће подесити већ то зависи од договора СМТ са базном станицом изабраног мобилног оператера што представља реалну ситуацију. СМТ поседује одговарајућу антену, смештену у кутији, која по снази и опсезима зрачења у потпуности одговара GSM-900 MHz, GSM-1800 MHz и DCS-1800 MHz GSM фреквенцијским опсезима. У мирном режиму СМТ троши 100 mA. Приликом успостављања везе СМТ има скок потрошње на 2 A (томе и одговара највећи интензитет зрачења) У току симулације разговора СМТ има потрошњу од 500 mA. Уређај је смештен у пластичну кутију која на свом поклопцу има област за узорке који треба да буду изложени зрачењу, ограничену кружницом пречника 10 cm.

За сваку бактерију имаћемо:

- контролу (нетретирана култура),
- контрола плус експозиција СМТ, без симулирања позива у току 24 сата
- контрола плус експозиција СМТ, са симулацијом позива 3x30 минута у току 24 сата (на сваких осам сати).
- бактерија плус гентамицин (познате концентрације) без експозиције СМТ,
- бактерија плус гентамицин плус експозиција СМТ, без симулирања позива у току 24 сата



-бактерија плус гентамицин плус експозиција СМТ, са симулацијом позива 3x30 минута у току 24 сата.

Да бисмо одредили степен утицаја ЕМП учесталости од 900 до 1800 MHz симулатора мобилног телефона на горе наведене бактерије, пратићемо број и величину колонија у односу на нетретирание бактерије.

У истраживањима користиће се микроскоп марке: Motic SFC-28 са увећањима од 4, 10, 40 и 100 пута. Микроскоп има уграђену камеру марке: Moticam 1000 (1,3 MP Live Resolution, Digital Microscopy), са спецификацијом: Live Resolution 1280 x 1024 Pixels и софтвером Motic Images Plus 2.0 ML.

Истраживања ће бити обављена у алтернативним условима (собна температура, смена дана и ноћи). Сва истраживања треба да се обаве у шест понављања.

Статистичка обрада података:

Упоредбе између броја и величине колонија у различитим групама, вршиће се помоћу једнофакторске анализе варијансе, и уз употребу Студентовог Т теста. Да би резултати били статистички значајни, вероватноћа нулте хипотезе мора бити мања од 0,05.

Очекивани резултати:

1. након излагања електромагнетном пољу СМТ, без симулирања позива у току 24 сата, доћи ће до смањења броја, промена величине и облика колонија у односу на контролу.
2. након излагања електромагнетном пољу СМТ, са симулацијом позива 3x30 минута у току 24 сата, доћи ће до знатног смањења броја, промене величине и облика колонија у односу на контролу и код узорка где се не симулира позивање.
3. са повећањем концентрација гентамицина у подлози, код свих испитиваних параметара, ефекат електромагнетног поља СМТ, без симулирања позива биће још већи.
4. највећи ефекат електромагнетног поља СМТ, са симулацијом позива 3x30 минута у току 24 сата, испољиће се у подлози са гентамицином.
5. вредности испитиваних параметара, биће различити у зависности од врсте бактерије.

Значај истраживања

Нагли развој бежичних телекомуникационих система и либерализација телекомуникационог тржишта довели су до постављања великог броја станица које емитују електромагнетне (ЕМ) таласе из РФ и микроталасног дела спектра, као што су базне станице система за мобилне комуникације, примопредајне станице микроталасних линкова, радиодифузни предајници итд. Велики број ових станица постављен је у оквиру или у близини насељених места тако да су РФ и микроталасном зрачењу изложене готово све структуре становништва. Интеракција електромагнетских поља високе учесталости и живих организама и биолошки утицај ових поља на људе су већ низ година предмет интензивних истраживања.

Резултати ових лабораторијских испитивања, би имали велику вредност, да омогуће потпуније сагледавање штетних ефеката високофреквентног електромагнетног зрачења, што је веома значајно са аспекта сталне евалуације и могућег редефинисања постојећих стандарда за максималну дозвољену изложеност електромагнетном пољу мобилних телефона.



Временски оквир

Уколико би се сва неопходна средства за реализацију ове студије, обезбедила почетком 2010 год., истраживања би се обавила до краја 2010 године. Међутим, зависно од добијених резултата, ова студија би могла да укључи и друге бактерије у истраживања и да траје две до три године.

Литература

1. IEGMP-Mobile Phones and Health. National Radiological Protection Board, Didcot Oxon, London; 2000.
2. Lai H. Genetic Effects of Nonionizing Electromagnetic Fields. Proceedings of The International Workshop on Biological Effects of Ionizing Radiation, Electromagnetic Fields and Chemical Toxic Agents; 2001 October 2-6; Sinaia, Romania. Sinia; 2001.p. 154-9.
3. G.J. Hyland, "Non-thermal bioeffects induced by low intensity irradiation of living systems", *Engineering Science and Education Journal*, 1998; 7(6): 261-9.
4. J. Lin, "Evaluating Scientific Literature on Biological Effects of Microwave Radiation", *IEEE Microwave Magazine*, Vol. 5 ., pp. 34-37, March 2004.
5. Belyaev IY, Grigoriev YG, Problems in assessment of risks from exposures to microwaves of mobile communication. *Radiats Biol Radioecol*. 2007 Nov-Dec; 47(6):727-32.
6. *American National Standard for Safety Levels with Respect to Human Exposure to Radio Frequency Electromagnetic fields*, 300 kHz to 300 GHz, ANSI C95.1, 1982.
7. A. Vander Vorst, "Microthermal and Isothermal Biological Effects under Microwave Exposure", *Microwave Review*, Vol.11, No.2, pp. 34-37, pp.2-12, November 2005.
8. Крстић Д, Ђинђић Б, Коцић Г, Петковић Д, Радић С, Соколовић Д. Штетна деловања електромагнетног поља учестаности 50 Hz на биолошке системе. *Acta Medica Medianae* 2003; 42(4):7-14.
9. Vela, G. R., and J. F. Wu. 1979. Mechanism of lethal action of 2,450-MHz radiation on microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:550-553.
10. Woo IS, Rhee IK, Park HD (2000). Differential damage in bacterial cells by microwave radiation on the basis of cell wall structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2243–2247.
11. Xiong, Y., T. Wu, Y. Zhang, R. M. Tanguay, L. Nicole, Y. Yuan, and G. Zhang. 1997. Preliminary studies on the relationship between autoantibodies to heat stress proteins and heat injury of pilots during acute heat stress. *J. Tongji Med. Univ.* 17:83–85.
12. Zou, J., W. F. Salminen, S. M. Roberts, and R. Voellmy. 1998. Correlation between glutathione oxidation and trimerization of heat shock factor 1, an early step in stress induction of the Hsp response. *Cell Stress Chaperones* 3:130–141.
13. Serap Gedikli, Özge Tabak, Özlem Tomsuk, Ahmet Çabuk, Effect of Microwaves on Some Gram Negative and Gram Positive Bacteria, *Journal of Applied Biological Sciences* 2 (1): 67-71, 2008
14. Geveke, D. J., M. Kozempel, O. J. Scullen, and C. Brunkhorst. 2000. The combined effects of RF energy and thermal energy on microorganisms. Paper no. 6104. American Society of Agricultural Engineers Annual International Meeting, Milwaukee, Wis.
15. Geveke, D. J., M. Kozempel, O. J. Scullen, and C. Brunkhorst. 2002. Radio frequency energy effects on microorganisms in foods. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 3:133–138.
16. Велибор Марковић. Урологија. Новинско-издавачка установа службени лист СРЈ-Београд, 1997.



17. Јанковић СМ, Простран М, Тодоровић З. Фармакологија и токсикологија. I издање. Медицински факултет, Крагујевац, 2007.

Руководилац пројекта:

Милорад Милошев, сарадник

Главни истраживач:

Милорад Милошев, сарадник

Ангажовани истраживачи:

Проф. др Слободан Јанковић
Милан Новаковић, сарадник