

Studio innovativo sugli effetti della radiofrequenza utilizzando vibrioni bioluminescenti

V. Nassisi, D. Delle Side, R. Longo, F. Paladini, S. Rizzato, M.V. Siciliano, L. Velardi

Laboratorio di Elettronica Applicata e Strumentazione, LEAS, Department of Physics, University of Salento & INFN
- Lecce, Via Provinciale Lecce-Monteroni, 73100 Lecce - Italia Tel. +39 0832 297500, Fax. +39 0832 297482

P. Alifano, A. Talà, S.M. Tredici

Laboratorio di Microbiologia, Department of Biology, Di.S.Te.B.A., University of Salento, via Provinciale Lecce-Monteroni, C.P. 193, 73100 Lecce - Italia

G. Buccolieri, G. Palamà

Dipartimento di Scienza dei Materiali, University of Salento, via Provinciale Lecce-Monteroni, C.P. 193, 73100 Lecce - Italia

RIASSUNTO

La bioluminescenza rappresenta un ulteriore e nuovo indicatore biologico utilissimo per studiare il comportamento di organismi viventi sottoposti a radiofrequenza (RF). La RF è oggi sempre più presente in qualsiasi ambiente in cui viviamo a causa dei moderni mezzi di comunicazione per mezzo dei cellulari. Allo scopo abbiamo sviluppato un'opportuna linea di trasmissione utilizzata come cella per gli irraggiamenti e testata alla massima frequenza della trasmissione GSM e UMTS, cioè a 1800 e 2100 MHz. In questo esperimento la tensione applicata alla linea è stata di circa 1V. A causa delle dimensioni ridotte della linee e alle frequenze applicate oltre alle onde progressive sono presenti anche onde stazionarie e l'entità del campo elettrico è risultata differente particolarmente nella direzione longitudinale. La distribuzione del campo magnetico non risultò particolarmente legata al campo elettrico come per un'onda piana, a causa della presenza di onde stazionarie e per l'irraggiamento energetico all'esterno. I campi a radiofrequenza furono misurati mediante due sonde opportunamente costruite. Le misure dei campi furono condotte in assenza di qualsiasi campione. Poiché i nostri campioni sono composti di materia vivente, il valore del campo reale fu determinato utilizzando codici di simulazione tipo Comsol Multiphysics. Gli esperimenti di bioluminescenza furono condotti a solo 900 MHz per due valori di campo elettrico a 53 e a 140 V/m per una durata di 12 e 24 ore. Durante l'esperimento l'intensità bioluminescente diminuiva rispetto al valore esibito dal controllo. Infatti, l'intensità luminosa risultò del 77% e del 68% rispettivamente per le colture sottoposte a campo elettrico minore e maggiore dopo 24 ore di irraggiamento. Al contrario, il tasso di crescita e di sopravvivenza dei batteri risultava invariato in seguito ad esposizione alla RF. Poiché la bioluminescenza è controllata da

meccanismi di trasduzione del segnale e dal fenomeno del "quorum sensing", questo risultato dimostrava un chiaro effetto della RF su questi processi. Inoltre, per comprendere in maniera più fine tale effetto, abbiamo eseguito la deconvoluzione degli spettri di emissione di luce da parte dei batteri. Tale analisi ha dimostrato l'esistenza di due maggiori picchi luminosi, il primo a 460_{nm}, il secondo a 510_{nm}. Dopo l'irraggiamento RF, il rapporto tra emissione a 510_{nm} ed emissione a 460_{nm} cambiava. Dal momento che la bioluminescenza potenzia la riparazione del DNA mediante foto-riattivazione, e che l'enzima-chiave di questo processo, la fotoliasi, è attivato preferenzialmente dalla luce blu/violetta, lo shift indotto dalla RF nei picchi di emissione potrebbe spiegare, almeno in parte, l'effetto anti-mutageno della RF documentato su alcuni microrganismi.

Introduzione

I batteri bioluminescenti, al contrario di molti altri, hanno il vantaggio di emettere radiazioni e ciò rappresenta un nuovo indicatore biologico utile per studiarne il comportamento. La RF oggi rappresenta un nuovo metodo di stimolazione contribuendo alla comprensione del comportamento del DNA.

I batteri della specie *Vibrio harveyi* sono bioluminescenti e hanno un ruolo sociale in quanto si trovano spesso in simbiosi con organismi marini che utilizzano la bioluminescenza come una forma di comunicazione ottica per attirare i compagni della stessa specie o la preda, o per la difesa contro i predatori in ambienti bui [1].

E' ben noto che la luminescenza nei *Vibrio ps.* è controllata dal operone *luxCDABE*, che codifica per la luciferasi e per il complesso della acido grasso-reducenti. L'attività luminescente è collegata al circuito di comunicazione che molti batteri usano per percepire la presenza di simili e regolare, in maniera co-

ordinata, una gamma diversificata di attività fisiologiche che sono presumibilmente dovute solo quando gruppi di cellule agiscono insieme [2]. Questo comportamento viene chiamato quorum sensing [3]. Batteri bioluminescenti sembrano essere sensibili ai campi di radiofrequenza (RF) prossimi a quelli oggi utilizzati dalle comunicazioni mobili. Pertanto, studiarli possono dare un supporto agli effetti indotti da telefoni cellulari (TC) il cui uso è fortemente aumentato così come le loro stazioni emittenti. Di conseguenza il livello di esposizione della popolazione mondiale a campi elettrici e magnetici, è cresciuta di ordini di grandezza. I sistemi di comunicazione mobile che usano la radiazione RF dello spettro elettromagnetico ultimamente sviluppati sono la Global System for Mobile Communications (GSM) e la Universal Mobile Telecommunications System (UMTS). Il primo funziona a frequenze da 400 a 1900 MHz, mentre il secondo funziona a frequenze tra 700 e 2100 MHz. Le onde elettromagnetiche a radiofrequenza modulata (RF-EMR) emesse dai TC possono raggiungere una potenza massima di 3,6 W durante la trasmissione. Tuttavia molti hanno cercato di indagare gli effetti specifici su vari sistemi biologici ed i risultati sono ancora molto discutibile [4, 5].

Le energie dei fotoni della RF sono molto basse per aspettarsi sostanziali transizioni quantistiche e ancor meno per la rottura dei legami chimici. Invece, non è trascurabile la sua proprietà di propagazione all'interno del tessuto dove può interagire con i sistemi biologici, in ragione di altri processi come, ad esempio, la frequenza di risonanza e/o gli effetti multifotonici [6]. Una molecola può interagire con i campi RF e acquisire energia per cambiare la sua posizione originale e/o indurre modificazioni nelle reazioni chimiche presenti nei tessuti biologici. È stato stimato che il trasferimento di energia potrebbe indurre reazioni endoergiche [7]. Inoltre, la capacità delle RF-EMF per modulare la trasduzione del segnale cellulare e di indurre percorsi di risposta allo stress è stato investigato utilizzando colture cellulari e modelli animali [8-10].

Studi in questo campo sono stati eseguiti utilizzando emettitori di RF o celle a campo trasversale elettromagnetico (TEM) commerciali per esporre le specie viventi alle radiazioni e osservarne gli effetti anomali. In questi casi, la tipologia del campo non è ben nota, ma solo simulata. Inoltre, gli esperimenti comportano l'uso di materia vivente, spesso piastrata su Agar marino, che ne modifica sostanzialmente i campi risultanti quali risultano influenzati dalle costanti dielettriche del sistema.

Generalmente in una cella TEM di grandi dimensioni o in un forno domestico a magnetron molte delle riflessioni delle onde RF investono i campioni da analizzare in determinando la dose. Pertanto, noi ci proponiamo di indagare il campo elettrico e magnetico prima delle esposizioni mediante due sonde opportunamente progettate e realizzate per stimare i valori dei campi, mentre per determinarli in presenza del campione biologico spalmato sull' Agar marino utilizziamo una simulazione fatta con Comsol Multiphysics V3.5 [11].

Materiali e metodi

Linea di trasmissione

Il nostro obiettivo era quello di effettuare misure fino a 2100 MHz e per questo motivo abbiamo realizzato una piccola linea di trasmissione al fine di limitare gli effetti di disadattamento. È costituita da due conduttori piani di lunghezza $l = 15 \text{ cm}$ e larghezza $a = 10 \text{ cm}$, separati da 4 supporti in PVC di spessore $h = 1,5 \text{ cm}$. La lunghezza della linea non influenza l'impedenza caratteristica. Il generatore RF era un RHODE & SCHWARZ SM. La sua frequenza massima è di 3 GHz e la potenza di uscita 20 mW. L'espressione dell'impedenza caratteristica della linea piana, escludendo l'irraggiamento esterno, si ottiene dalla seguente formula:

$$R_0 = \sqrt{\frac{L}{C}} = \sqrt{\frac{\mu_0}{\epsilon_0}} \frac{h}{a} \quad (1)$$

dove ϵ_0 e μ_0 sono rispettivamente la permittività elettrica e la permeabilità magnetica. Dalla Eq. 1 si ricava che la nostra linea ha un'impedenza di circa 50 Ω come quella del generatore. Entrambe le estremità della linea sono dotate di due connettori di 50 Ω , uno è collegato ad una resistenza di carico di 50 Ω , mentre l'altro è collegato al generatore tramite un cavo di alta frequenza. La Fig. 1 mostra la foto della linea. Nella figura si può anche osservare che l'elettrodo di massa ha una serie di piccoli fori per inserire le sonde per la diagnostica. La disposizione è data da una matrice di 7 (longitudinale) x 5 (trasversale) fori.

Tutte le misure elettriche sono state fatte con un oscilloscopio veloce Le Croy Wavepro 7100, 200GS/s con massima larghezza di banda di 1 GHz. Per caratterizzare la linea fino a 2100 MHz, frequenza massima UMTS, è stato necessario sviluppare delle sonde in grado di rivelare solo l'ampiezza dei se-

gnali. Per questo scopo abbiamo costruito una sonda per il campo elettrico e una sonda per il campo ma-

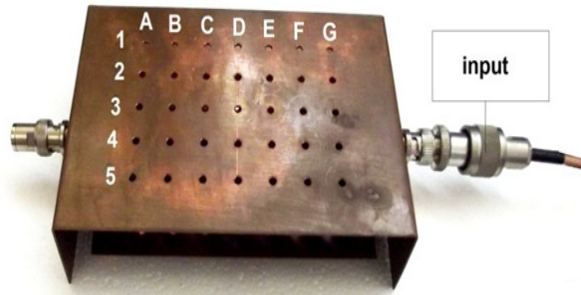


Figura 1: Foto della linea di trasmissione.

gnetico.

La prima consisteva di un conduttore lineare, mentre la seconda di una bobina da appena due spire. Entrambi i sistemi sono stati collegati all'oscilloscopio

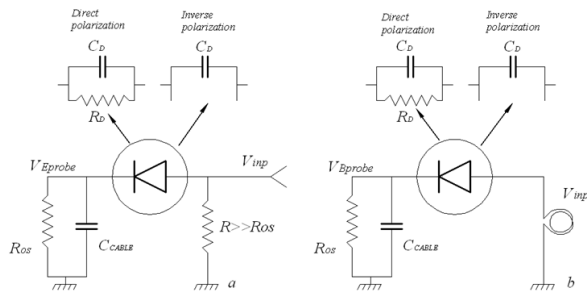


Figura 2: Schematizzazione del circuito della sonda: a) sonda elettrica; b) sonda magnetica.

da un cavo coassiale e un diodo veloce, come mostrato in Fig. 2.

Il diodo utilizzato è stato un HSMS-285B della Agilent Technology. E' realizzato da una giunzione Schottky che riduce di molto la capacità di giunzione, 0.3-0.16 pF e la tensione di soglia risulta di 0.1 V. Inoltre, a frequenze superiori a 1 GHz, il piccolo valore della capacità del diodo permette di superare il limite imposto dal valore soglia. Infatti, dai circuiti equivalenti di Fig. 2, si evince il circuito elettrico della sonda elettrica, Fig. 2a, e quello magnetico, Fig. 2b. Durante la polarizzazione diretta del diodo, la resistività di giunzione è bassa e la tensione del cavo raggiunge lo stesso valore della V_{inp} .

Quindi a causa della alta frequenza dei segnali e della

bassa intensità di corrente di uscita del diodo si sono avuti di nuovo segnali sinusoidali, ma shiftati verso valori positivi. Quindi, per mappare i campi della linea di trasmissione abbiamo considerato il valore massimo della sinusoide.

Fig. 3 mostra le foto delle due sonde realizzate in laboratorio utilizzate. La presenza dei resistori in Fig. 3a di valore $R \gg R_{os}$, come indicato in Fig. 2a è dovuto

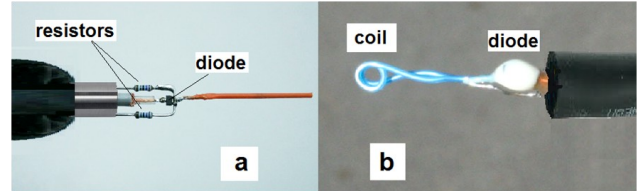


Figura 3: Foto delle sonde utilizzate: a) sonda elettrica; b) sonda magnetica.

ta per evitare l'accumulo di cariche spurie che falserebbero la lettura.

Abbiamo eseguito la taratura di entrambe le sonde a segnali di bassa frequenza (50 MHz) al fine di escludere la presenza di onde stazionarie che ci permettono di considerare i valori di tensione e corrente della cella pari a quelli del generatore. La relazione per valutare il campo elettrico è:

$$E = k_E V_{Esonda} \quad (2)$$

mentre il coefficiente della sonda magnetica dipende dalla frequenza del segnale:

$$B = k_B V_{Bsonda} / \omega \quad (3)$$

dove ω rappresenta la frequenza dell'onda misurata in $rad s^{-1}$, e V_{Esonda} e V_{Bsonda} rappresentano i valori letti dalle sonde.

Sotto queste condizioni, abbiamo ottenuto il seguente coefficiente di attenuazione:

$$k_E = 3.8 \times 10^3 m^{-1}$$

e

$$k_B = 8.74 \times 10^4 T rad s^{-1} V^{-1}$$

La Fig. 4 mostra la distribuzione dell'ampiezza del campo elettrico all'interno della linea di trasmissione, misurata dalla sonda elettrica. Come si può vedere, in assenza delle piastre di coltura, il valore massimo del campo elettrico, E , all'interno della linea è risultato essere di circa 140, 226 e 190 Vm^{-1} rispettivamente per 900, 1800 e 2100 MHz. Nelle zone adiacenti il massimo valore del campo diminuisce in maniera indipendente per i tre casi.

Il massimo campo magnetico trasversale è stato 8.4, 14.2 e 8.6 $\times 10^{-7}$ T, rispettivamente a 900, 1800 e 2100 MHz. La Fig. 5 mostra la distribuzione dell'ampiezza del campo magnetico all'interno della linea di trasmissione, misurata dalla sonda magnetica.

Per studiare l'attività di bioluminescenza, i batteri del genere *Vibrio* sp. PS1 sono stati coltivati a 20 °C in brodo nutriente (Difco) contenente 3% di NaCl fino a una densità ottica di 1,0 a 550_{nm}. 10 ml di sospensione batterica sono stati posti al centro di una piastra di Petri contenente lo stesso terreno contenente agar al 1.5%. Successivamente, i campioni sono stati inseriti tra gli elettrodi della linea di trasmissione per essere irradiati. Durante l'esperimento, la linea e i campioni sono stati tenuti temperatura (30° C) e di umidità quasi costanti. Fig. 6 mostra l'apparato con la linea collegata al generatore. Tutti i trattamenti sono stati effettuati a 900 MHz per una durata di 12 e 24 h utilizzando due piastre posizionate su due valori di campo differenti.

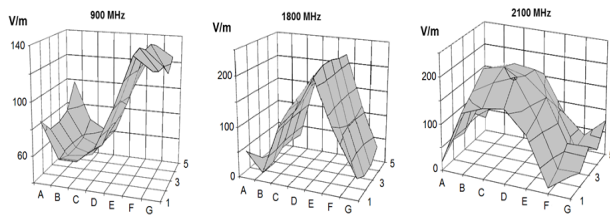


Figura 4: Distribuzione dell'ampiezza del campo elettrico all'interno della linea di trasmissione. a) per 900 MHz; b) per 1800 MHz; c) per 2100 MHz

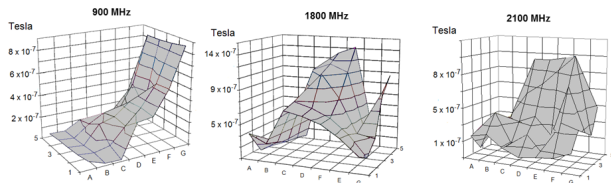


Figura 5: Distribuzione dell'ampiezza del campo magnetico trasversale all'interno della linea di trasmissione. a) per 900 MHz; b) per 1800 MHz; c) per 2100 MHz

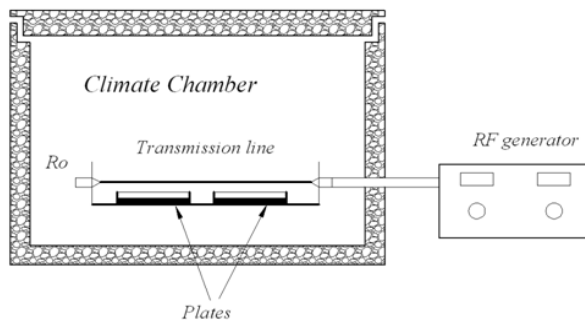


Figura 6: Apparato sperimentale per l'irraggiamento.

Procedimento sperimentale e risultati

Isolamento e identificazione della specie batterica.

Vibrio sp. PS1 è un batterio luminescente, tassonomicamente legato alla specie *V. harveyi*, che è stato recentemente isolato dall'idroide della *Plumularia setacea*. Questo idroidetecate, osservato sotto luce blu, mostrava una chiara fluorescenza sul lato esterno della perisarco (esoscheletro chitinoso) intorno all'idrocladia grazie allo sviluppo di un biofilm luminoso ad opera dei batteri [12].

Simulazione e risultati

Come si può vedere, in assenza delle piastre, il valore massimo del campo elettrico, E , al valore di picco, risultava essere circa 140 Vm^{-1} a 900 MHz. Alla posizione di minimo basso, sempre a 900 MHz, è un campo di 53 Vm^{-1} . Quando le piastre dei batteri sono state inserite nella linea, il campo elettrico all'interno dello strato di cellule è stato stimato utilizzando un semplice modello di mezzo dielettrico stratificato, costituito da due strati di polistirene (0.9 mm di spessore ognuno), terreno di coltura (agar, 3 mm), batteri (2 μ m) e aria (10,2 mm). In questo caso l'ampiezza del campo elettrico nello strato i -esimo può essere espressa dalla seguente espressione:

$$E_i = E \frac{h}{\epsilon_i \sum_n \frac{d_n}{\epsilon_n}} \quad (4)$$

dove E_i è il campo presente nel mezzo i -esimo, h è la distanza tra gli elettrodi della linea, ϵ_n e d_n sono la costante dielettrica e lo spessore relativi del n -iesimo strato. Utilizzando dati riportati in letteratura al range delle microonde per la costante dielettrica del polistirene consideriamo ($\epsilon = 2.5$) [13] e per l'agar ($\epsilon \approx 80$) [14]. Inoltre, assumendo che le proprietà dielettriche dei nostri batteri siano simili a quelle dalla *Salmonella typhimurium* utilizziamo ($\epsilon = 74$) [15]. Dall'Eq. 4 il campo nel layer delle cellule risulta di 2.5 Vm^{-1} nella zona di campo alto, mentre di 0.93 Vm^{-1} nella zona di campo basso. Sempre dall'Eq. 4 si trova che il campo nel layer di aria si modifica fino a 190 e 73 Vm^{-1} rispettivamente per la zona di campo basso e di campo alto.

Questo risultato è stato confermato anche da quello ottenuto con la simulazione con i codici di COMSOL Multiphysics v3.5, vedere Fig. 7, che ha dato un campo elettrico sopra le lastre di circa 200 e 80 Vm^{-1} rispettivamente nella zona di massimo e minimo di

intensità.

Monitoraggio della bioluminescenza

Le misure di bioluminescenza sono state fatte in due modi; i: misurando l'intensità totale mediante il setup sperimentale di Fig. 8; ii) determinando gli spettri di emissione mediante il setup sperimentale di Fig. 9.

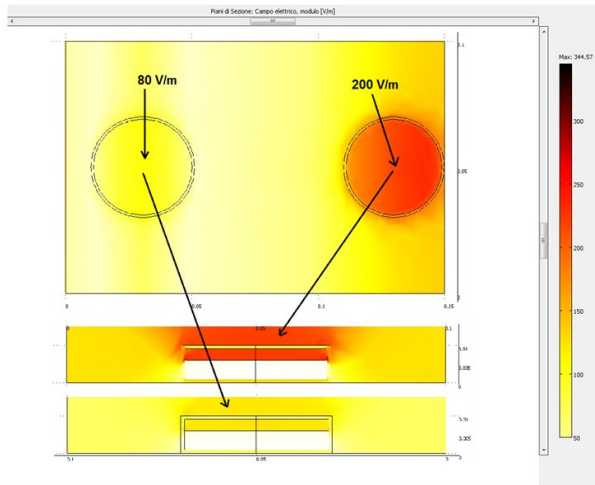


Figure 7: Simulazione del campo elettrico con Comsol Multiphysics v3.5

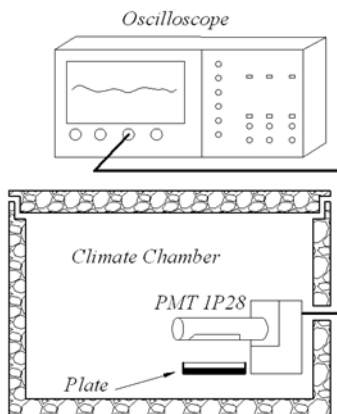


Figure 8: Setup sperimentale per la misura dell'intensità luminosa

Per la misura dell'intensità luminosa è stato utilizzato un fotomoltiplicatore molto sensibile (PMT) 1P28 in grado di registrare luce di bassa intensità. Il fattore di guadagno del PMT è 5×10^6 . Il range di sensibilità del fotomoltiplicatore è di 185-700 nm. La sua finestra attiva che raccoglie tutta la luce emessa dai campioni ha le dimensioni di 24 mm di lunghezza per 8 mm di larghezza. I segnali del fotomoltiplicatore, proporzionali alla luce emessa, sono stati indirizzati ad un oscilloscopio digitale, Le Croy 422. Abbiamo misurato

la luminosità a 12 e 24 ore. L'intensità luminosa dei campioni sottoposti a RF fu più bassa di quella del controllo. La variazione di luminosità è stata più evidente con i valori di campo alto. La tabella I riporta i risultati:

	Luminosità (a.u.) a 12 h	Luminosità (a.u.) a 24 h
Controllo	6.10	6.50
Campione a 53V/m	4.10	5.00
Campione a 140 V/m	3.90	4.40

Tabella I: Risultati di luminosità

Dai risultati della Tabella I possiamo fornire l'intensità luminosa normalizzata al controllo. Tabella II riporta i risultati.

	Percentuale di Luminosità a 12 h	Luminosità di luminosità a 24 h
Controllo	100%	100
Campione a 53V/m	67%	77%
Campione a 140 V/m	64%	68%

Sia a 12 che a 24 ore la luminosità diminuisce rispetto al controllo e la diminuzione è più marcata per il campo più alto. Questo risultato è indice di induzione di stress per i batteri da parte della RF.

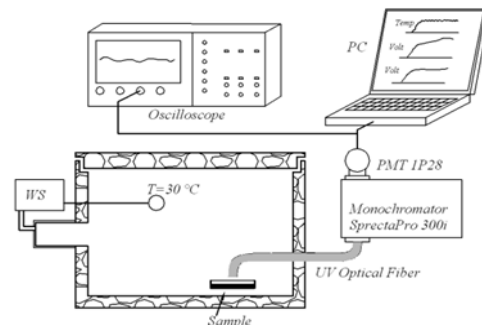


Figure 9: Setup sperimentale per la determinazione dello spettro di emissione

Questo nuovo risultato ha stimolato la misurazione della lunghezza d'onda emessa dai batteri. Così, abbiamo utilizzato l'apparato di Fig. 9. In esso un monocromatore SP-308 di lunghezza focale di 0,300 m dotato di un reticolo UV di 1200 gr/mm come mostrato in un precedente articolo [16] è connesso ai campioni mediante una fibra ottica UV, che guida la luce emessa verso l'ingresso monocromatore. Le piastre contenenti i campioni sono posizionate nella camera climatica. L'uscita del monocromatore è accoppiata ad un secondo fotomoltiplicatore 1P28. Il se-

gnale del PMT è stato interfacciato con un oscilloscopio e un PC in grado di disegnare gli spettri. Il range di sensibilità dell'apparecchiatura è da 300 a 700 nm. Quasi tutti i segnali in uscita sono stati molto bassi a causa dei pochi fotoni raccolti dal fotomoltiplicatore e quindi è stato necessario utilizzare come metodo di rilevazione quello del conteggio a singolo fotone (*single photon counting*). Ciò prevede che per stimare il valore di intensità si opera la sovrapposizione degli impulsi di uscita fino a 300 per ottenere un valore di campionamento continuo. Registrando i segnali alle

varie lunghezze d'onda, abbiamo determinato gli spettri, Fig. 10.

Tutti gli spettri presentavano due picchi di differente intensità, il primo centrato a circa 460_{nm}, il secondo a 510_{nm}. Il picco a 510_{nm} del campione di controllo è più alto. Con l'applicazione del campo RF, il picco a 510_{nm} decresce rispetto a quello 460_{nm}. Il suddetto rapporto diminuiva di più per il campione sottoposto al campo più alto. Infatti, il rapporto dell'area di emissione A_2/A_1 andava da 3 per il controllo, a 2 per campione soggetto a campo basso ed infine a 0.5 per il campione soggetto a campo alto. Dal momento che la bioluminescenza potenzia la riparazione del DNA mediante foto-riattivazione, e che l'enzima-chiave di questo processo, la fotoliasi, è attivato preferenzialmente dalla luce blu/violetta, lo shift indotto dalla RF nei picchi di emissione potrebbe spiegare, almeno in parte, l'effetto anti-mutageno della RF documentato su alcuni microrganismi.

Conclusioni

Dai risultati sperimentali ottenuti si evince che i batteri luminosi costituiscono un ottimo modello per studiare i meccanismi biofisici che sono alla base degli effetti biologici della RF. In questo studio abbiamo sottoposto una coltura di vibroni ad un campo di 53 e 140 V/m alla frequenza di 900 MHz. E' stata studiata la bioluminescenza a 12 e 24 h. La bioluminescenza diminuiva sotto l'azione del campo della RF proporzionalmente all'intensità del campo. Essa veniva ridotta al 64% con l'esposizione al campo più alto dopo 12 h di crescita. Al contrario, il tasso di crescita e di sopravvivenza dei batteri risultava invariato in seguito ad esposizione alla RF. Poiché la bioluminescenza è controllata da meccanismi di trasduzione del segnale e dal fenomeno del "quorum sensing", questo risultato dimostrava un chiaro effetto della RF su questi processi. Inoltre, per comprendere in maniera più fine tale effetto, abbiamo eseguito la deconvoluzione degli spettri di emissione di luce da parte dei batteri. Tutti gli spettri presentavano due picchi di differente intensità, il primo centrato a circa 460_{nm}, il secondo a 510_{nm}. Il picco a 510_{nm} del campione di controllo era più alto. Con l'applicazione del campo RF, il picco a 510_{nm} decresceva rispetto a quello 460_{nm} con l'intensità della RF. Il suddetto rapporto diminuiva di più per il campione sottoposto al campo più alto. Infatti, il rapporto dell'area di emissione A_2/A_1 andava da 3 per il controllo, a 2 per campione soggetto a campo basso ed infine a 0.5 per il campione soggetto a campo alto. Dal momento che la biolumi-

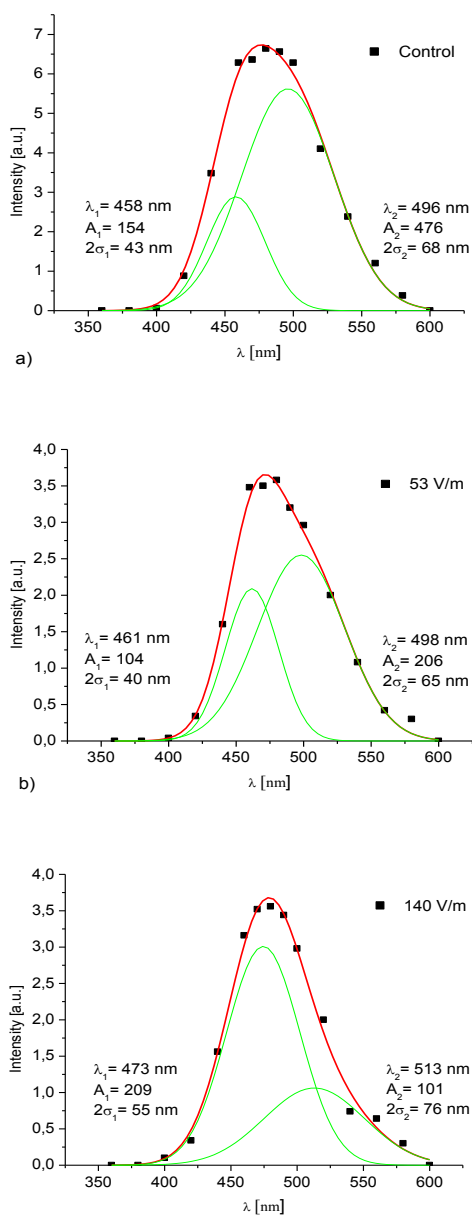


Figura 10: Spettro di emissione e relativa analisi di deconvoluzione a 12 h. a) controllo; b) spettro del campione a 53 V/m; c) spettro del campione a 140 V/m.

nescenza potenzia la riparazione del DNA mediante foto-riattivazione, e che l'enzima-chiave di questo processo, la fotoliasi, è attivato preferenzialmente dalla luce blu/violetta, lo shift indotto dalla RF nei picchi di emissione potrebbe spiegare, almeno in parte, l'effetto anti-mutageno della RF documentato su alcuni microrganismi.

Riferimenti

- [1] S.H.D. Haddock, M.A Moline, J.F. Case, *Annu. Rev. Marine Sci.* 2, 443 (2010).
- [2] M.B. Miller, B.L. Bassler, *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 165 (2001).
- [3] T. Defoirdt, N. Boon, P. Sorgeloos, W. Verstraete, P. Bossier, *ISME J.* 2, 19 (2008).
- [4] C.T. Ponne, G.M. Gorris, M. Balk, O. Hancioglu, L.G.M. Gorris, *Lebensm. Wiss. u. Technol.* 20, 48 (1996)
- [5] J. A. Fortune, B.L. Wu, A.M. Klivanov, *Biotechnology Progress*, 26, 1772 (2010)
- [6] D. Leszczynski, S. Joenväärä, J. Reivinen, and R. Kuokka, *Differentiation* 70, 120 (2002)
- [7] J.D. Bond, and N. C. Wyeth, *Cell Biophys.* 7, 293 (1985)
- [8] S.F. Cleary, L.M. Cao, P. M. Egle, and K. R. Shelton, *Bioelectromagnetics* 18, 499 (1997)
- [9] K. Fritze, C. Wiessner, N. Kuster, C. Somer, P. Gass, D.M. Hermann, M. Kiessling, K.A. Hossmann, *Neuroscience* 81, 627 ((1997)
- [10] F. Belloni, V. Nassisi, P. Alifano, C. Monaco, A. Talà, S.M. Tredici and A. Rainò, *Rev. Sci. Instrum.* 76, 0543021-6 (2005)
- [11] www.comsol.com.
- [12] L. Stabili, C. Gravili, S.M. Tredici, S. Piraino, A. Talà, F. Boero and P. Alifano, *Microb. Ecol.* 56, 625 (2008)
- [13] Marcuvitz N., *Waveguide Handbook* (New York: Dover) p 13–15 (1965)
- [14] Roebuck B D and Goldblith S A, *J. Food Sci.* 40 899 (1975)
- [15] Guy A W, Chou C K and McDougall J A, *Bioelectromagnetics*, 20 21 (1999)
- [16] P. Alifano, V. Nassisi, M.V. Siciliano, A. Talà and S.M. Tredici, “Unexpected photo reactivation of *Vbrio harveyi* bacteria living in ionization enviroment” *J. Appl. Phys.* 104703, 109 (2011)