

Т. І. Тугай¹, А. В. Тугай¹, М. В. Желтоножська², Л. В. Садовніков²¹ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ² Інститут ядерних досліджень НАН України, КиївЗАКОНОМІРНОСТІ ВПЛИВУ НИЗЬКИХ ДОЗ ОПРОМІНЕННЯ
НА МІКРОСКОПІЧНІ ГРИБИ

Проведено аналіз впливу хронічного опромінення на штами двох видів мікроскопічних грибів *Hormoconis resinae* та *Cladosporium cladosporioides* за двома параметрами – швидкістю радіального росту та виживаністю. Показано, що у досліджених видів грибів збільшення радіальної швидкості росту в діапазоні доз опромінення від 0 до 250 мГр відбувається нерівномірно, а з максимумами при певних дозах опромінення. При поглинутій дозі опромінення від 0,36 до 2 Гр у штамів *Hormoconis resinae* та *Cladosporium cladosporioides* як з радіоадаптивними властивостями, що були виділені із зони відчуження ЧАЕС, так і у штамів, що зазнали опромінення вперше, не виявлено пригнічення виживаності порівняно з контролем без опромінення. Установлено, що дози опромінення до 2 Гр (при потужності експозиційної дози 3,7 мР/год) є малими для цих видів мікроскопічних грибів.

Ключові слова: мікроскопічні гриби, хронічне опромінення, дози.

Вступ

Чорнобильська катастрофа призвела до «плямистого» радіоактивного забруднення ґрунту відносно низьких до значних рівнів. Надзвичайно актуальним стало дослідження реакцій-відповідей грибів, як найбільш чисельної і активної компоненти біогеоценозу, на низькі за величиною дози хронічного радіоактивного опромінення. Таке хронічне опромінення має місце на значних територіях і відповідно, з одного боку, спричиняє суттєвий вплив на функціонування мікробного ценозу, зокрема мікобіоти ґрунту, а з іншого – може бути джерелом малих доз опромінення, за дії яких у мікроскопічних грибів формується адаптивна відповідь до великих доз опромінення.

У мікроскопічних грибів, які були виділені з зони відчуження, як було раніше встановлено, сформувались радіоадаптаційні властивості, що проявлялись у позитивній реакції на дію значних доз хронічного опромінення та зберігалась у них роками [1 - 5]. Найвища частота прояву позитивних реакцій на дію значних доз опромінення виявлена у мікроскопічних грибів, виділених із місць існування з рівнем радіоактивності від 5 до 100 мР/год.

Для мікроскопічних грибів оцінка дозового навантаження в природних умовах зони відчуження ЧАЕС є складним і досить невизначеним параметром, проте надзвичайно актуальним. Така оцінка ефективності постійно діючих низьких доз є основою прогнозування майбутнього цього ценозу, виходячи з того, що мікроскопічні гриби беруть активну участь у транслокації у ґрунті поживних речовин, металів, у тому числі й

радіонуклідів, та в процесах їхнього включення в трофічні ланцюги [6 - 7].

Мета роботи: оцінити вплив низьких доз опромінення, що імітують радіаційний фон у зоні відчуження, на два види мікроскопічних грибів *Hormoconis resinae* та *Cladosporium cladosporioides* та встановити діапазон малих доз для них.

Матеріали та методи

Об'єктами дослідження були штами двох темнопігментованих видів мікроскопічних грибів *Hormoconis resinae* та *Cladosporium cladosporioides*, які зберігаються у колекції культур відділу фізіології і систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології НАН України, характеристика яких за радіоактивністю місць виділення наведена у табл. 1.

Методи культивування мікроскопічних грибів. Джерелом посівного матеріалу у всіх дослідженнях була культура відповідного штаму грибів, вирощена на агаризованому середовищі впродовж 14 діб. Культивування грибів проводили при 25 ± 2 °С в термостаті.

Для дослідження параметрів радіального росту кожний штам вирощували на двох агаризованих живильних середовищах різного складу: оптимальному – найбільш універсальному середовищі, прийнятому в мікологічних дослідженнях, сусло-агарі (СА) та на голодному агарі (ГА) – середовищі, яке найбільш наближене до реальних умов існування мікроміцетів в еконішах, в яких вони були виділені, і в якому як джерело вуглецю були присутні лише органічні речовини агар-агару [8].

Таблиця 1. Характеристика досліджених штамів мікроскопічних грибів

Вид	Штам	Місце та час виділення (рік)	Радіоактивність субстрату на час виділення
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fr.) de Vries	4	грунт території ЧАЕС, 1986	$3,6 \cdot 10^5$ Бк/кг
	10	приміщення 4-го блока ЧАЕС, 2002	50 мР/год
	396	ризосфера кукурудзи, Львівська область, 1957	фоновий рівень
	2181	приміщення будинку, 2003	фоновий рівень
	2183	приміщення будинку, 2003	фоновий рівень
<i>Hormoconis resiniae</i> (Lindau) von Arx et de Vries f. <i>resinae</i>	61	приміщення 4-го блока ЧАЕС, 2001	100 мР/год
	52	приміщення 4-го блока ЧАЕС, 2001	200 мР/год
	76	приміщення 4-го блока ЧАЕС, 2003	10000 мР/год
	801	чорноземний грунт, біля с. Костянтинівка, 2004	28 мкР/год

Склад середовищ (г/л): СА (пивне сусло, цукристість 4^0 за Баллінгом – 1 л, агар-агар – 20 г); ГА (дистильована вода – 1 л, агар-агар – 20 г).

Висів культур здійснювали уколом у центр чашки Петрі, температура культивування 25°C . Приріст діаметра колоній вимірювали двічі на добу кожні 12 год. Тривалість досліду 14 - 16 діб.

При дослідженні виживаності грибів культивування проводили аналогічним чином. Радіальну швидкості росту (K_r) визначали вимірюванням діаметра колоній кожні 12 год.

Розрахунок радіальної швидкості росту проводили за формулою [9]

$$K_r = \frac{R_t - R_0}{t - t_0},$$

де R_0 – радіус колоній у початковий момент часу t_0 ; R_t – радіус колоній у момент часу t .

Виживаність грибів після отримання відповідної дози опромінення визначали за кількістю колоній утворюючих одиниць (КУО) по відношенню до контролю. Контролем були ці ж штами, які культивували в аналогічних умовах, але без опромінення.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакета програм Sigma Stat-6.0, графічне зображення – за допомогою програм Microsoft Excel.

Результати та обговорення

Для вивчення впливу хронічного опромінення низької інтенсивності на мікроскопічні гриби була створена спеціальна модельна установка для проведення довгострокових досліджень у контрольованих умовах, в якій джерелом іонізуючого випромінювання був грунт з 5-кілометрової зони відчуження (рис. 1).

Такий методичний підхід дав змогу певною мірою змодельовати умови широкого діапазону доз хронічного опромінення, яке зазнавали мікроскопічні гриби впродовж тривалого часу знаходження в зоні відчуження.

Потужність експозиційної дози на площадці установки становила 3,7 мР/год.

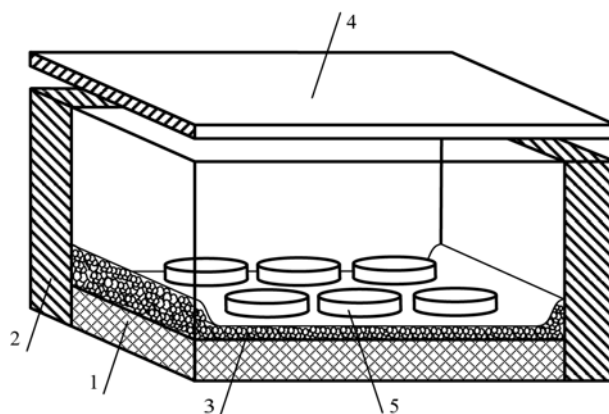
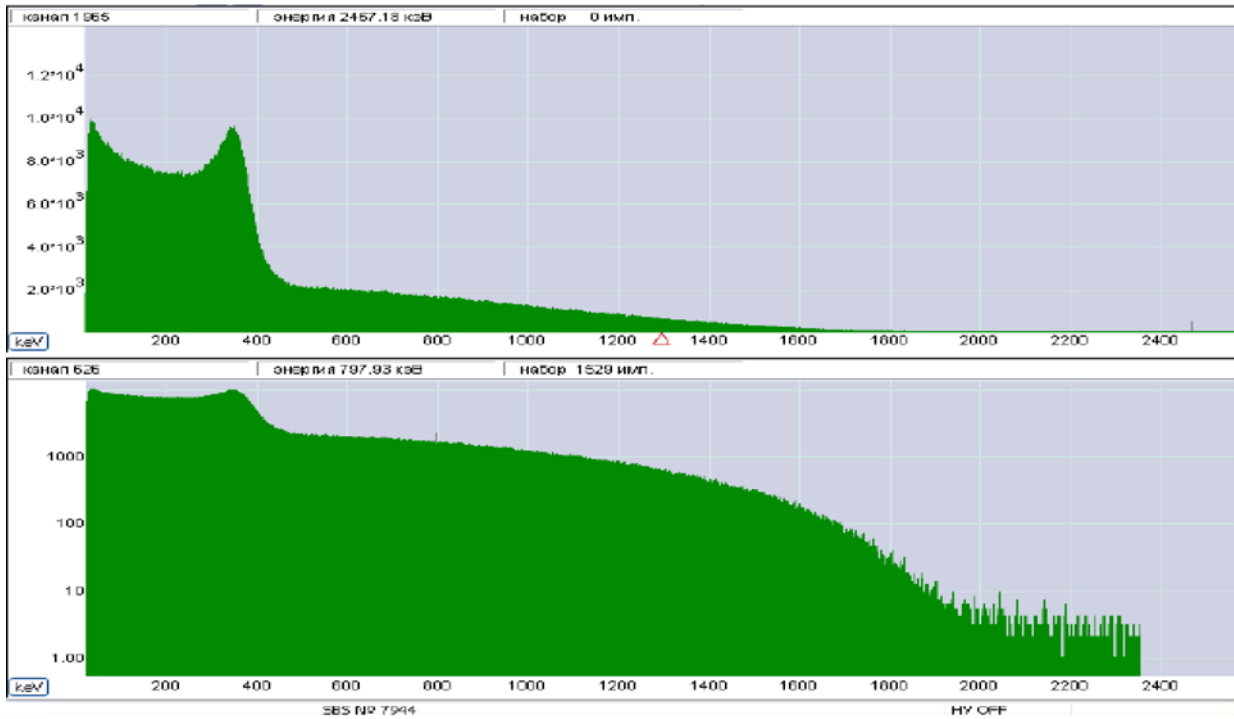


Рис. 1. Модельна система опромінення мікроскопічних грибів іонізуючою радіацією: 1 – шар радіоактивного ґрунту $A = 1 \times 10$ см; 2 – біологічний захист, свинець товщиною 100 мм; 3 – пінопластовий короб термостата; 4 – кришка термостата; 5 – чашки Петрі з поживним середовищем, засіяні культурами.

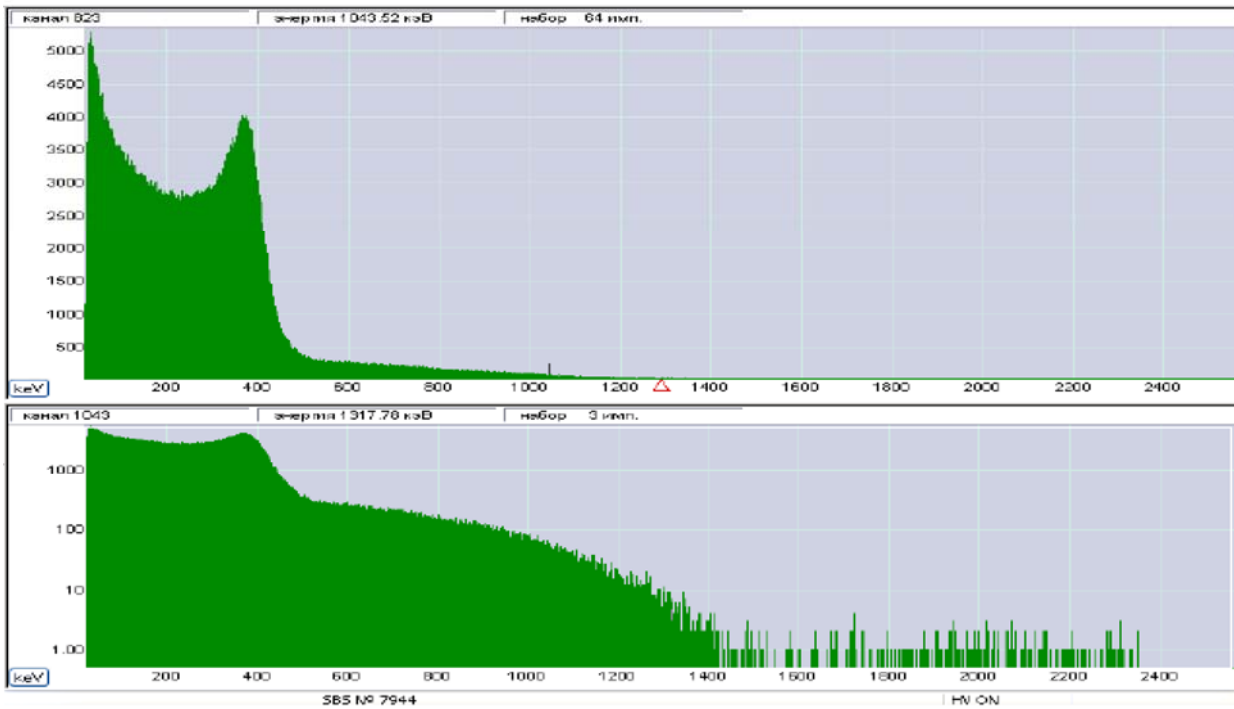
При підготовці до експерименту була теоретично розрахована поглинута доза зовнішнього γ -опромінення мікроскопічних грибів у перерахунку на масу грибів [10]. Крім того було проведено додаткове дослідження β -спектрів при проходженні опромінення через досліджувані зразки (чашка Петрі). За теоретичними дозиметричними оцінками поглинута доза повинна була становити близько 0,9 мГр/доб [10].

Проте при детальному дослідженні β -спектрів при проходженні опромінення через агаризоване середовище з культурами грибів було встановлено, що значно більшу дозу гриби отримували за рахунок вторинних електронів, що виникли при взаємодії з середовищем культивування грибів (рис. 2).

Установлено, що в результаті комптонівського розсіювання γ -квантів ^{137}Cs з енергією 662 кеВ на стінці чашки Петрі та агаризованому середовищі утворювався потік електронів з безперервним спектром та граничною енергією близько 500 кеВ (див. рис. 2), плюс незначна добавка від потоку електронів ^{90}Y з граничною енергією 2,3 МеВ.



a



б

Рис. 2. Бета-спектр випромінювання модельної площадки вихідний (*a*) та після проходження через чашку Петрі з культурою грибів (*б*).

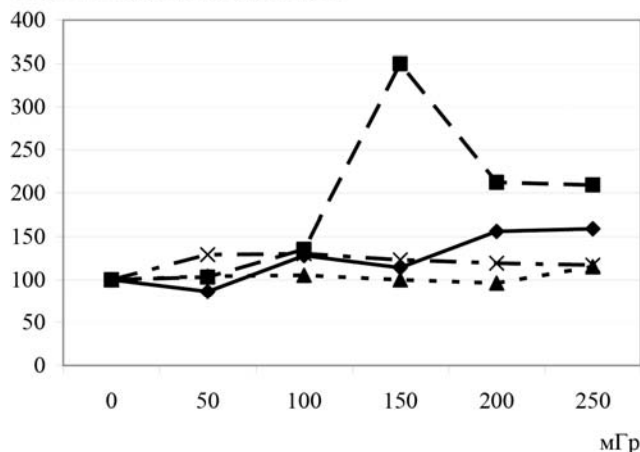
Дозове навантаження при цьому становило 10 - 14 мГр/добу на зразок.

Було також встановлено, що величина поглинутої дози опромінення несуттєво залежала від типу посуду, в якому проводили експеримент (скло, пластик), – її зміни не перевищували 10 - 15 %.

Для того щоб оцінити, як впливає створений нами в модельній установці діапазон низьких доз опромінення, що імітує радіаційний фон у зоні відчуження, а саме дози від 50 до 250 мГр при потужності експозиційної дози 3,7 мР/год на мікроскопічні гриби та чи є такі дози малими для них, ми провели аналіз швидкості їхнього радіального росту залежно від поглинутої дози. Щоб

нівелювати особливості росту кожного штаму, ми порівнювали швидкість росту штамів за дії

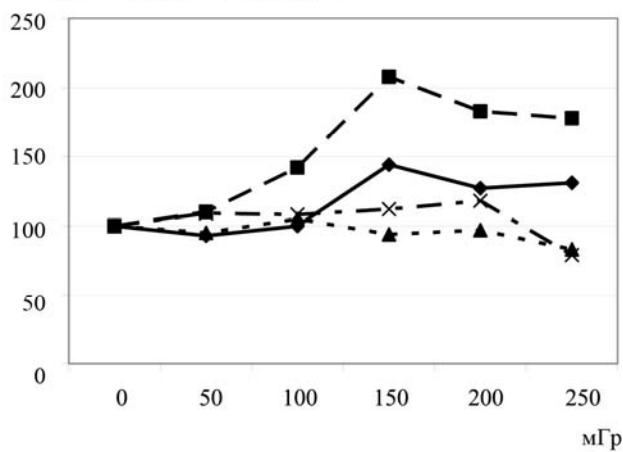
Швидкість радіального росту, %



а

опромінення у відсотках по відношенню до неопроміненого контролю (рис. 3).

Швидкість радіального росту, %



б

Рис. 3. Вплив низьких доз іонізуючого опромінення на швидкість радіального росту *Hormoconis resinae* при рості на СА (а) та на ГА (б).

—◆— Н. res. 801; —■— Н. res. 61; —▲— Н. res. 52; —×— Н. res. 76.

Іонізуюче опромінення в дослідженому діапазоні доз практично не впливало на швидкість радіального росту у *Hormoconis resinae* 52 та справляло рівномірний стимулюючий вплив на ріст *Hormoconis resinae* 76 при рості на обох середовищах, лише при рості на ГА за величини поглинутих доз більше 200 мГр у цих штамів спостерігали сповільнення росту (див. рис. 3). Ці штами, виділені з радіоактивно забруднених територій, проте не проявляли радіоадаптивних властивостей.

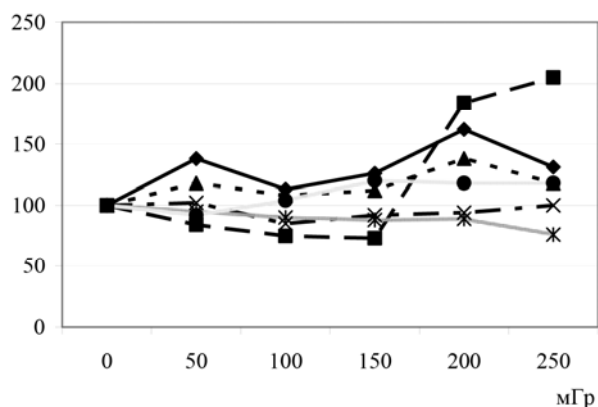
При опроміненні у штаму *Hormoconis resinae* 61, що мав виражені радіоадаптивні властивості, виявлено суттєву стимуляцію росту на обох середовищах з максимумом при поглинутій дозі

опромінення 150 мГр. У контрольного штаму *Hormoconis resinae* 801 при рості на ГА виявлено аналогічну, хоча й менш виражену, стимуляцію росту, а при рості на СА у нього спостерігалась стимуляція росту без вираженого максимуму у всьому діапазоні досліджених доз опромінення.

Слід зазначити, що цей штам було виділено з ґрунтів, забруднених міддю, що можливо і сформувало у нього адаптацію до різних несприятливих чинників довкілля, тобто не тільки до важких металів, а й до іонізуючого опромінення.

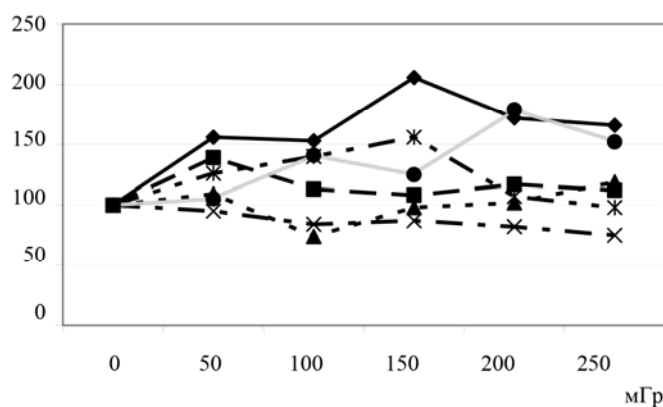
Деякі інші реакції-відповіді на дію опромінення виявлено у штаму виду *Cladosporium cladosporioides* (рис. 4).

Швидкість радіального росту, %



а

Швидкість радіального росту, %



б

Рис. 4. Вплив низьких доз іонізуючого опромінення на швидкість радіального росту *Cladosporium cladosporioides* при рості на СА (а) та на ГА (б).

—◆— C.Cl. 396; —■— C.Cl. 4061; —▲— C.Cl. 2181; —×— C.Cl. 2183;
—*— C.Cl. 4; —*— C.Cl. 10;

При дослідженні радіальної швидкості росту на СА у 50 % досліджених штамів *Cladosporium cladosporioides* спостерігали її сповільнення при дозах опромінення до 150 мГр, а у інших – 50 %-ну стимуляцію з кількома максимумами при різних величинах поглинутих доз.

При рості на ГА тільки у одного контрольного штаму *Cladosporium cladosporioides* 2183 виявлено уповільнення швидкості радіального росту у всьому дослідженому діапазоні доз опромінення. У інших штамів (83 %) виявлено стимуляцію росту при певних дозах опромінення й вона вища, ніж при рості на СА. Звертає на себе увагу той факт, що у досліджених штамів збільшення радіальної швидкості росту відбувається не рівномірно, а з максимумами, одним чи кількома при певних дозах опромінення. Нами не виявлено кореляції між характером радіостимуляції та наявністю радіоадаптивних властивостей у досліджених штамів.

Такий характер росту, можливо, пов'язаний з тим, що у штамів виду *Cladosporium cladosporioides* при опроміненні відбувається складний, багатоступеневий комплекс процесів перерегулювання метаболічних процесів, який визначається

модифікацією досліджених штамів без перевищення їхніх гомеостатичних можливостей і притаманний як штамам, що зазнали попереднього опромінення, так і контрольним, опроміненим уперше.

Слід зауважити, що отримані нами результати добре узгоджуються з раніше отриманими даними, в яких показано, що позитивна реакція грибів, виділених з радіоактивно забруднених територій, на дію опромінення – позитивний радіотропізм – так само проявлявся при визначеній чи певній дискретних дозах опромінення [11]. Можливий механізм такої реакції грибів на дію опромінення зараз ще невідомий і потребує детального подальшого вивчення.

Ще один параметр, за яким ми оцінювали дію опромінення на мікроскопічні гриби, – це виживаність грибів після отримання відповідної дози опромінення.

Для проведення цих досліджень усі штами були піддані впливу опромінення низької інтенсивності в модельних умовах протягом одного, трьох та шести місяців відповідно, сумарна поглинута доза при цьому становила у них 0,36, 1,08 і 2,06 Гр (табл. 2).

Таблиця 2. Вживаність мікроскопічних грибів, що зазнали впливу хронічного іонізуючого опромінення низької інтенсивності

Штам	Вживаність (% до контролю без опромінення)		
	0,36 Гр	1,08 Гр	2,06 Гр
<i>Hormoconis resinae</i> 801	115 ± 8	104 ± 8	98 ± 5
<i>Hormoconis resinae</i> 61	118 ± 7	107 ± 7	98 ± 5
<i>Hormoconis resinae</i> 52	111 ± 6	101 ± 6	96 ± 6
<i>Hormoconis resinae</i> 76	110 ± 6	99 ± 6	103 ± 6
<i>Cladosporium cladosporioides</i> 396	115 ± 6	108 ± 5	110 ± 7
<i>Cladosporium cladosporioides</i> 4061	108 ± 5	101 ± 5	104 ± 6
<i>Cladosporium cladosporioides</i> 2181	101 ± 6	98 ± 5	95 ± 6
<i>Cladosporium cladosporioides</i> 2183	99 ± 5	96 ± 5	93 ± 4
<i>Cladosporium cladosporioides</i> 4	112 ± 8	106 ± 5	98 ± 6
<i>Cladosporium cladosporioides</i> 10	114 ± 7	107 ± 6	98 ± 7

Показано, що при поглинутій дозі опромінення від 0,36 до 2 Гр у всіх досліджених штамів виявлено збільшення пророслих конідій порівняно з контролем, тобто низькі дози опромінення низької інтенсивності (3,7 мР/год) не тільки не проявляли інгібуючої дії на ріст грибів, а й підвищували їхню виживаність.

Слід зазначити, що за таких умов опромінення виживаність підвищувалась як у штамів з радіоадаптивними властивостями, що були виділені із зони відчуження, так і у контрольних штамів, що зазнали опромінення вперше.

Радіаційний гормезис, згідно з даними літератури, спостерігався у рослин, тварин, бактерій при малих дозах опромінення [12, 13].

Питання, які дози вважати малими, залежить від критерію оцінки. Існує багато визначень, які дози можна вважати малими. Слід зазначити, що мала доза – це така мінімальна доза, при якій можна виявити ефект її впливу. Найчастіше зустрічається таке визначення щодо малих доз опромінення для ссавців нижче 500 мГр, для людини – нижче 200 мГр, для культури клітин 1 - 10 сГр [16]. Дані щодо діапазону поглинутих доз, які будуть вважатися джерелом малих доз для мікроскопічних грибів, у літературі відсутні.

Аналіз впливу хронічного опромінення за двома параметрами – швидкістю радіального росту та виживаністю – дав змогу нам уперше визначити кількісні межі малих доз опромінення для мікроскопічних грибів.

Феномен формування адаптивної відповіді під впливом підвищеного радіаційного фону й малих доз радіації був установлений для багатьох організмів: бактерій [14], комах [15], рослин [16, 17], тварин і людини [18 - 20].

Результати проведених нами досліджень підтвердили висунуту гіпотезу, що низький рівень підвищеного радіаційного фону є джерелом малих доз радіації для мікроскопічних грибів, а позитивна реакція на дію опромінення при цьому

є проявом у них адаптивної відповіді на повторну дію значних доз іонізуючого опромінення.

Отже, отримані дані щодо малих доз опромінення є поясненням виявленого нами раніше факту, що найвища частота прояву позитивних реакцій на дію значних доз опромінення встановлена нами у досліджених грибах, виділених із місць існування з рівнем радіоактивності від 5 до 100 мР/год.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Тугай Т.И., Жданова Н.Н., Редчиц Т.И. и др.* Влияние ионизирующего излучения малой интенсивности на проявления реакции радиотропизма у грибов // 36. наук. праць Ін-ту ядерних досл. - 2003. - Т. 2, № 10. - С. 72 - 79.
2. *Тугай Т.И., Желтоножский В.А., Садовников Л.В.* Ответные реакции микромицетов на действие ионизирующей радиации // 36. наук. праць Ін-ту ядерних досл. - 2004. - Т. 2, № 13. - С. 132 - 137.
3. *Тугай Т.И.* Особливості прояву адаптаційних реакцій у мікроміцетів, виділених з радіаційно забруднених територій // XII з'їзд Українського ботанічного товариства: матеріали з'їзду. - Одеса, 2006. - С. 269.
4. *Тугай Т.И., Жданова Н.М., Желтоножський В.О. та ін.* Адаптивні властивості мікроміцетів, вилучених із радіоактивно забруднених ґрунтів // Міжвідомчий тематичний збірник "Агрохімія і ґрунтознавство". Спец. випуск до VII з'їзду УТГА. Ґрунти - основа добробуту держави, турбота кожного. - Кн. 3. - Харків, 2006. - С. 308 - 310.
5. *Тугай Т.И., Жданова Н.М., Желтоножський В.О. та ін.* Радіоадаптаційні властивості мікроміцетів, потенційно здатних до ремедіації забруднених територій // Міжнар. наук. конф. "Мікробні біотехнології": тези доп. - Одеса, 2006. - С. 210.
6. *Swift M.J.* The role of fungi and animals in the immobilization and release of nutrient elements from decomposing branch wood. In Soil organisms as components of ecosystems // Swedish Natural Science Research Council / Ed. by U. Lohm. - Stockholm: Ecol. Bull, 1977. - No. 25. - P. 193 - 202.
7. *Dighton J.* Nutrient cycling in different terrestrial ecosystems in relation to fungi // Can. J. Bot. - 1995. - Vol. 73, No. 1. - P. 1349 - 1360.
8. *Методи експериментальної мікології: справочник* / Под ред. В. И. Билай. - К. : Наук. думка, 1982. - 432 с.
9. *Кочкина Г.А., Мирчинк Е.Г., Кожевин П.А. и др.* Радиальная скорость роста колоний грибов в связи с их экологией // Микробиология. - 1978. - Т. 47, № 5. - С. 964 - 965.
10. *Моисеев А.А., Иванов В.И.* Справочник по дозиметрии, радиационной гигиене - М.: Энегтоатомиздат, 1984. - 296 с.
11. *Dighton J., Tugay T., Zhdanova N.* Fungi and ionizing radiation from radionuclides // FEMS Microbiol. Lett. - 2008. - Vol. 281. - P. 109 - 120.
12. *Бурлакова Е.Б., Голощанов А.Н., Жижина Г.П. и др.* Новые аспекты закономерностей действия низкоинтенсивного облучения в малых дозах // Радиационная биология. Радиоэкология. - 1999. - Т. 39, № 1. - С. 26 - 35.
13. *Кузин А.М.* Стимулирующее действие ионизирующего излучения на биологические процессы. - М.: Атомиздат, 1977. - 133 с.
14. *Петин В.Г., Морозов И.И., Кабакова Н.М. и др.* Некоторые эффекты радиационного гормезиса бактериальных и дрожжевых клеток // Радиационная Биология. Радиоэкология. - 2003. - Т. 43, № 2. - С. 176 - 178.
15. *Моссэ И. Б., Михайлова М. Е., Глушкова И. В. и др.* Генетический мониторинг природных популяций дрозофилы, обитающих в загрязненных радионуклидами районах Белоруссии // Там же. - 2006. - Т. 46, № 3. - С. 287 - 295.
16. *Гродзинский Д.М.* Радиобиология растений. - К. : Наук. думка, 1989. - 384 с.
17. *Журавская А. Н., Кершенгольц Б.М., Курилюк Т.Т. и др.* Энзимологические механизмы адаптации растений к условиям повышенного естественного радиационного фона // Радиационная биология. Радиоэкология. - 1995. - Т. 35, вып. 3. - С. 349 - 355.
18. *Алиев А.А., Ахундов И.Ю., Алекперов У.К. и др.* Влияние предварительного хронического облучения и α -токоферола на частоту aberrаций хромосом в клетках костного мозга мышей. индцированных острым воздействием γ -лучей // Радиобиология. - 1985. - Т. 25, № 1. - С. 78 - 81.
19. *Эйдус Л.Х.* О едином механизме инициации различных эффектов малых доз ионизирующих излучений // Радиационная биология. Радиоэкология. - 1996. - Т. 36, вып. 6. - С. 874 - 880.
20. *Мирзоев Э.Б., Шевченко А.С.* Изменение интенсивности перекисного окисления липидов в плазме крови овец при повторном γ -облучении после хронического γ -воздействия // Там же. - 1997. - Т. 37, вып. 2. - С. 143 - 147.

Т. И. Тугай, А. В. Тугай, М. В. Желтоножская, Л. В. Садовников
ЗАКОНОМЕРНОСТИ ВЛИЯНИЯ НИЗКИХ ДОЗ ОБЛУЧЕНИЯ
НА МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ГРИБЫ

Проведен анализ влияния хронического облучения на штаммы двух видов микроскопических грибов *Hormoconis resiniae* и *Cladosporium cladosporioides* по двум параметрам – скорости радиального роста и выживаемости. Показано, что у исследованных видов грибов увеличение радиальной скорости роста в диапазоне доз облучения от 0 до 250 мГр происходит неравномерно, а с максимумами при определенных дозах облучения. При поглощенной дозе облучения от 0,36 до 2 Гр у штаммов *Hormoconis resiniae* и *Cladosporium cladosporioides* как с радиоадаптивными свойствами, выделенных из зоны отчуждения, так и у штаммов, облученных впервые, не выявлено снижения выживаемости в сравнении с контролем, без облучения. Установлено, что дозы облучения до 2 Гр (при мощности экспозиционной дозы 3,7 мР/ч) являются малыми для этих видов микроскопических грибов.

Ключевые слова: микроскопические грибы, хроническое облучение, дозы.

T. I. Tugay, A. V. Tugay, M. V. Zheltonozhska, L. V. Sadovnikov
PRINCIPLES OF THE LOW DOZES IRRADIATION INFLUENCE
ON MICROSCOPIC FUNGI

Analysis of the influence of chronic irradiation on strains of two species of microscopic fungi *Hormoconis resiniae* and *Cladosporium cladosporioides* on two parameters – speed of radial growth and surviving is carried out. It was shown, the increase of radial growth rate under exposure doses from 0 to 250 mGy occurs non-uniformly, and to maxima at the certain dozes of irradiation at the investigated species of fungi. At the absorbed doze of irradiation from 0,36 up to 2 Gy as at strains *Hormoconis resiniae* and *Cladosporium cladosporioides* with radioadaptive properties isolated from the alienation zone, and at strains, irradiated for the first time, is not revealed decrease surviving of fungi in comparison with the control without irradiation. It was established, that the dozes of an irradiation up to 2 Gy (at capacity of an exposition doze 3,7 mR/h) are small for these species of microscopic fungi.

Keywords: microscopic fungi, chronic irradiation, dozes.

Надійшла 11.10.2012
Received 11.10.2012