

ẢNH HƯỞNG CỦA DỊCH CHIẾT NẤM ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO TỚI TẾ BÀO VÀ DNA CỦA VI KHUẨN *Bacillus subtilis* BỊ CHIẾU XẠ

TRẦN XUÂN AN, NGUYỄN THỊ THƠM, HOÀNG ĐĂNG SÁNG, NGUYỄN VĂN BÌNH,
TRẦN BĂNG DIỆP

Trung tâm chiếu xạ Hà Nội, km 12, Đường 32, Minh Khai - Bắc Từ Liêm - Hà Nội

Email: ank55b1@gmail.com

Tóm tắt: Dịch chiết từ nấm đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) do phòng Nghiên cứu Công nghệ bức xạ - Trung tâm Chiếu xạ Hà Nội phân lập, nuôi trồng được sử dụng như một chất bảo vệ phóng xạ. Chất lượng của dịch chiết *Cordyceps militaris* được đánh giá thông qua hoạt tính chống oxy hóa bằng phương pháp quét gốc tự do DPPH. Trong khi đó, ảnh hưởng của dịch chiết tới khả năng làm giảm mức độ tổn thương gây ra bởi bức xạ tia gamma đối với tế bào và DNA của vi khuẩn *Bacillus subtilis* được kết luận dựa trên những khảo sát về tỷ lệ sống sót của tế bào vi khuẩn trong môi trường có bổ sung dịch chiết nấm *Cordyceps militaris* và kiểm tra mức độ đứt gãy DNA vi khuẩn *Bacillus subtilis* sau chiếu xạ bằng các phương pháp sinh học phân tử.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, bảo vệ phóng xạ, *Cordyceps militaris*

I. MỞ ĐẦU

Con người chúng ta thường xuyên tiếp xúc trong giới hạn an toàn với cả hai loại bức xạ: bức xạ tự nhiên và bức xạ nhân tạo. Mức độ gây tác hại của phóng xạ đối với chúng ta phụ thuộc vào thời gian tiếp xúc và cường độ của phóng xạ. Tia gamma nói riêng, tia phóng xạ nói chung được biết đến như tác nhân gây đột biến ở cấp độ tế bào, DNA và những sai sót trong quá trình sửa chữa DNA tự nhiên dẫn đến sự hình thành các tế bào ung thư [1].

Ảnh hưởng của tia gamma lên tế bào và DNA đã được quan tâm nghiên cứu trên nhiều đối tượng khác nhau như nguyên bào sợi và tế bào máu của người [2,3], tế bào chuột, plasmid [2], tế bào dâu tây [4], Arabidopsis [5],... Dưới tác dụng của tia gamma, DNA có một số biến đổi chủ yếu như: Đứt gãy mạch đơn của phân tử DNA, làm phân tử DNA biến dạng, giảm thể tích phân tử; Đứt gãy mạch kép của phân tử DNA, làm giảm độ nhớt của dung dịch; Tạo nhánh, tạo cầu liên kết giữa các phân tử; Tạo dimer giữa các nucleotide pyrimidine (thymine và cytosine), mà phổ biến nhất là hiện tượng nhị trùng phân thymine-thymine. Tất cả những biến đổi này đều ngăn cản sao chép DNA, hình thành đột biến trên phân tử DNA [2,3,4,5,6].

Nấm Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps*) là một loại nấm ký sinh nội bào, thuộc nhóm nấm Ascomycota. Hiện có khoảng trên 500 loài khác nhau, phân bố chủ yếu ở khu vực Bắc Mỹ, Nam Mỹ, Châu Âu và Châu Á. Hiện nay, một số loài của nấm này đã được nuôi trồng thành công trong điều kiện nhân tạo để đáp ứng nhu cầu của người dân về điều trị bệnh và nâng cao sức khỏe. Chủng nấm *Cordyceps militaris* được biết tới như một nguồn chất hỗ trợ tăng cường miễn

dịch cũng như bảo vệ phóng xạ tiềm năng nhờ mang hoạt chất chống oxy hóa cao và hiện được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu. Jae-Won Ha và cộng sự (2006), Kang HJ và cộng sự (2015) đã có những nghiên cứu về khả năng tăng cường miễn dịch của dịch chiết nấm *Cordyceps militaris* [7, 8]. Đặc biệt, Jeong và cộng sự (2014) đã công bố về việc sử dụng nấm *Cordyceps militaris* như một chất bảo vệ phóng xạ, dịch chiết *Cordyceps militaris* có tác dụng bảo vệ chống lại sự phá hủy DNA do bức xạ gây ra. Theo nhóm tác giả này, dịch chiết *Cordyceps militaris* đã làm tăng hiệu quả loại bỏ gốc tự do và giảm chuỗi DNA plasmid gây ra do bức xạ trong các thử nghiệm *in vitro* [9].

Nghiên cứu này tập trung khảo sát ảnh hưởng của dịch chiết nấm *Cordyceps militaris* được nuôi cấy tại Trung tâm Chiếu xạ Hà Nội tới tế bào và DNA của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* B5 bị chiếu xạ. Các kết quả thu được một lần nữa khẳng định tác dụng bảo vệ phóng xạ của dịch chiết nấm đối với tế bào và DNA của vi khuẩn nói riêng và xa hơn là tác dụng bảo vệ phóng xạ đối với tế bào, DNA của các loài sinh vật khác cũng như đối với con người.

II. NỘI DUNG

II. 1. Đối tượng và phương pháp

II.1.1. Nguyên vật liệu và hóa chất

Nấm *Cordyceps militaris* nuôi cấy tại phòng Nghiên cứu Công nghệ Bức xạ - Trung tâm Chiếu xạ Hà Nội. Chủng *Bacillus subtilis* B5 được cung cấp bởi Viện Công nghệ Sinh học – Đại học Bách Khoa Hà Nội.

2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH), môi trường nutrient broth (NB) của hãng Sigma-Aldrich. Một số hóa chất tách chiết và điện di DNA của Thermo Fisher Scientific.

Máy móc, thiết bị nuôi cấy vi sinh và nguồn chiếu xạ gamma nguồn Co-60 tại Trung tâm Chiếu xạ Hà Nội.

II.1.2. Phương pháp

Phương pháp thu nhận dịch chiết nấm Cordyceps militaris [10]

Một (01) g bột nấm *Cordyceps militaris* khô được cho vào 40 ml dung môi H₂O:C₂H₅OH tỷ lệ 1:1 và ủ trong bể ổn nhiệt ở 85°C trong khoảng thời gian 2,5 giờ. Sau ủ, toàn bộ hỗn hợp được chia vào các ống Falcon và ly tâm với tốc độ 8000 vòng/phút trong 30 phút ở 4°C. Dịch chiết sau ly tâm được sấy thăng hoa ở -80°C trong 24 giờ để thu dạng bột khô tinh khiết.

Phương pháp đánh giá khả năng bắt giữ gốc tự do DPPH [11]

Khả năng bắt giữ gốc tự do của dịch chiết nấm *Cordyceps militaris* được đánh giá bằng phương pháp DPPH theo Zhan và cộng sự (2006) [11]. Thành phần phản ứng bao gồm: 1 ml

dịch chiết nồng độ 0,5-9,0 mg/ml; 2 ml đệm acetate nồng độ 0,05mol/l, pH 5,5; 1 ml C₂H₅OH 100%; 1 ml DPPH nồng độ 0,5 mmol/l pha trong C₂H₅OH 100%. Hỗn hợp phản ứng được lắc đều và để ở nhiệt độ 30°C trong tối trong 30 phút. Độ hấp thụ quang của hỗn hợp được đo bởi máy đo quang phổ ở bước sóng 517 nm. Ascorbic acid (vitamin C) được sử dụng làm đối chứng dương, đối chứng âm là mẫu không bổ sung DPPH. Khả năng bắt giữ gốc tự do của dịch chiết được tính theo công thức:

$$\% \text{ bắt giữ gốc tự do} = \frac{Ab - (As - Asb)}{Ab} \times 100$$

Trong đó: Ab, As, Asb lần lượt là độ hấp thụ quang được đo ở bước sóng 517 nm của mẫu trắng (dung dịch không chứa mẫu), mẫu và mẫu trắng của mẫu tương ứng.

Phương pháp chiếu xạ

Đường cong sinh trưởng của chủng *B. subtilis* B5 được khảo sát trong môi trường nuôi cấy NB và trong môi trường này có bổ sung dịch chiết nấm Đông trùng hạ thảo (CM2) ở điều kiện lắc 120 vòng/phút, 37°C tại các thời điểm khác nhau từ 0-36 giờ.

Các ống nghiệm (10 ml/ống) chứa dịch nuôi cấy tế bào vi khuẩn *B. subtilis* B5 và dịch nuôi cấy tế bào vi khuẩn có bổ sung dịch chiết nấm Đông trùng hạ thảo ở pha Log (OD₅₅₀ = 0,6-0,7) được đem xử lý chiếu xạ ở dải liều 0-2000 trên nguồn gamma Co-60 Gy tại Trung tâm Chiếu xạ Hà Nội (3 ống nghiệm lặp lại cho mỗi liều/công thức thí nghiệm).

Phương pháp tính tỷ lệ sống sót

Dung dịch nuôi cấy tế bào vi khuẩn (trước và sau chiếu xạ) được pha loãng theo mũ thập phân. 0,1 ml mẫu ở các nồng độ pha loãng thích hợp được cấy vào đĩa petri chứa môi trường NA (3 đĩa petri/ độ pha loãng). Sử dụng que gạt vô trùng dàn đều dung dịch trên bề mặt thạch. Tiến hành đếm số lượng khuẩn lạc sau 24 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C và tính số lượng tế bào (Mi) trong 1ml mẫu theo công thức:

$$Mi \text{ (CFU/ml)} = Ai \times Di/V$$

Trong đó: Ai là số khuẩn lạc trung bình/ đĩa; Di là độ pha loãng và V là thể tích dung dịch cấy vào mỗi đĩa (ml).

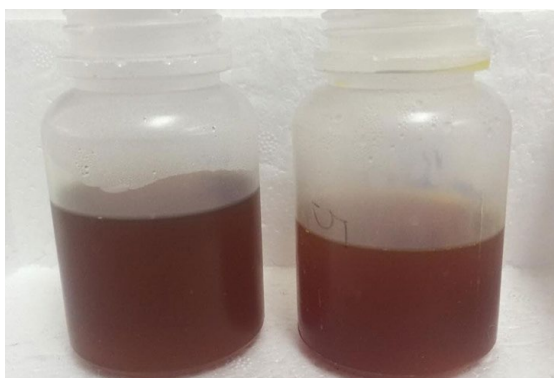
Phương pháp tách chiết DNA sử dụng phenol/chloroform

Dịch nuôi cấy sau khi chiếu xạ của vi khuẩn *B. subtilis* B5 được ly tâm làm giàu và tách chiết DNA tổng số bằng phương pháp sử dụng Phenol/Chloroform. Kết quả tách chiết DNA tổng số vi khuẩn *B. subtilis* B5 được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% sử dụng marker 1kb.

II. 2. Kết quả và bàn luận

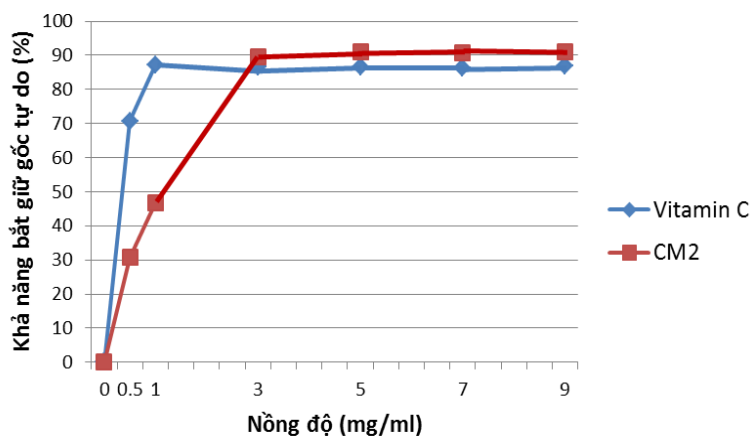
Khả năng bắt giữ gốc tự do của dịch chiết nấm Đông trùng hạ thảo Cordyceps militaris

Dịch chiết (CM2) *Cordyceps mitaris* được chiết xuất bởi dung môi H₂O:C₂H₅OH tỷ lệ 1:1 có dạng đồng nhất, màu nâu, không còn chứa tạp dạng bột. Thể tích dịch chiết thu được nằm trong khoảng từ 25ml đến 35ml tùy vào lượng hao hụt do bay hơi trong quá trình tách chiết (Hình 1).



Hình 1. Dịch chiết *Cordyceps militaris* thu nhận được

Dịch chiết (CM2) được sấy thăng hoa ở -80°C trong 24 giờ để thu dạng bột khô tinh khiết thuận lợi cho việc tạo ra các dung dịch chiết nồng độ khác nhau. Hoạt tính chống oxi hóa *in vitro* của dịch chiết được đánh giá thông qua khả năng bắt giữ gốc tự do DPPH. Kết quả được trình bày trong Hình 2.

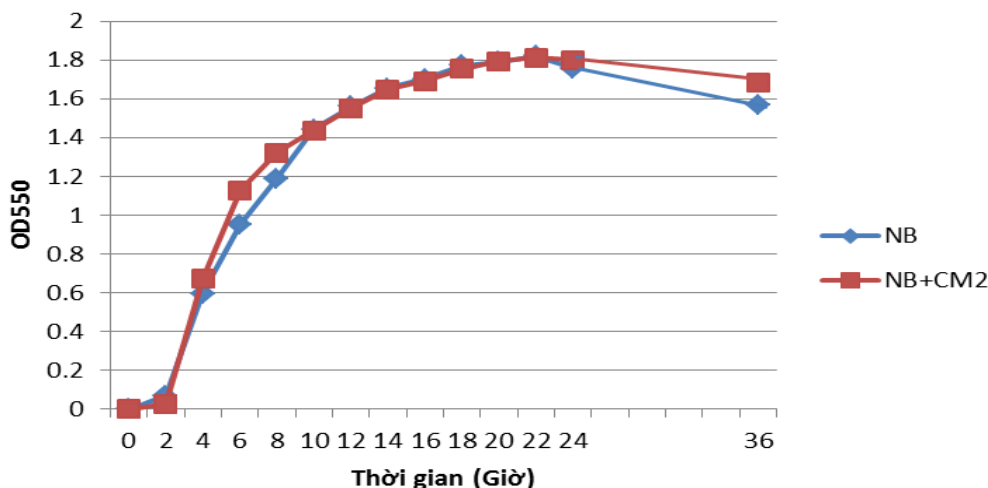


Hình 2. Khả năng bắt giữ gốc tự do của dịch chiết CM2 và vitamin C

Hình 2 cho thấy khả năng bắt giữ gốc tự do của dịch chiết CM2 tăng nhanh từ nồng độ 0-3 mg/ml và đạt khoảng 90% ở nồng độ 3-9 mg/ml. Ở khoảng nồng độ 3-9 mg/ml, khả năng bắt giữ gốc tự do của của dịch chiết CM2 ổn định, ít thay đổi theo chiều tăng của nồng độ và cao hơn mẫu đối chứng là dung dịch vitamin C có cùng nồng độ. Kết quả này tương đồng với nghiên

cứu của Zhan và cộng sự (2006) ở dải nồng độ tương tự [11]. Điều này cho thấy chất lượng nấm *Cordyceps mitaris* khá tốt cũng như phương pháp tách chiết đạt hiệu quả cao.

Ảnh hưởng của dịch chiết tới sinh trưởng, phát triển của tế bào B. subtilis B5



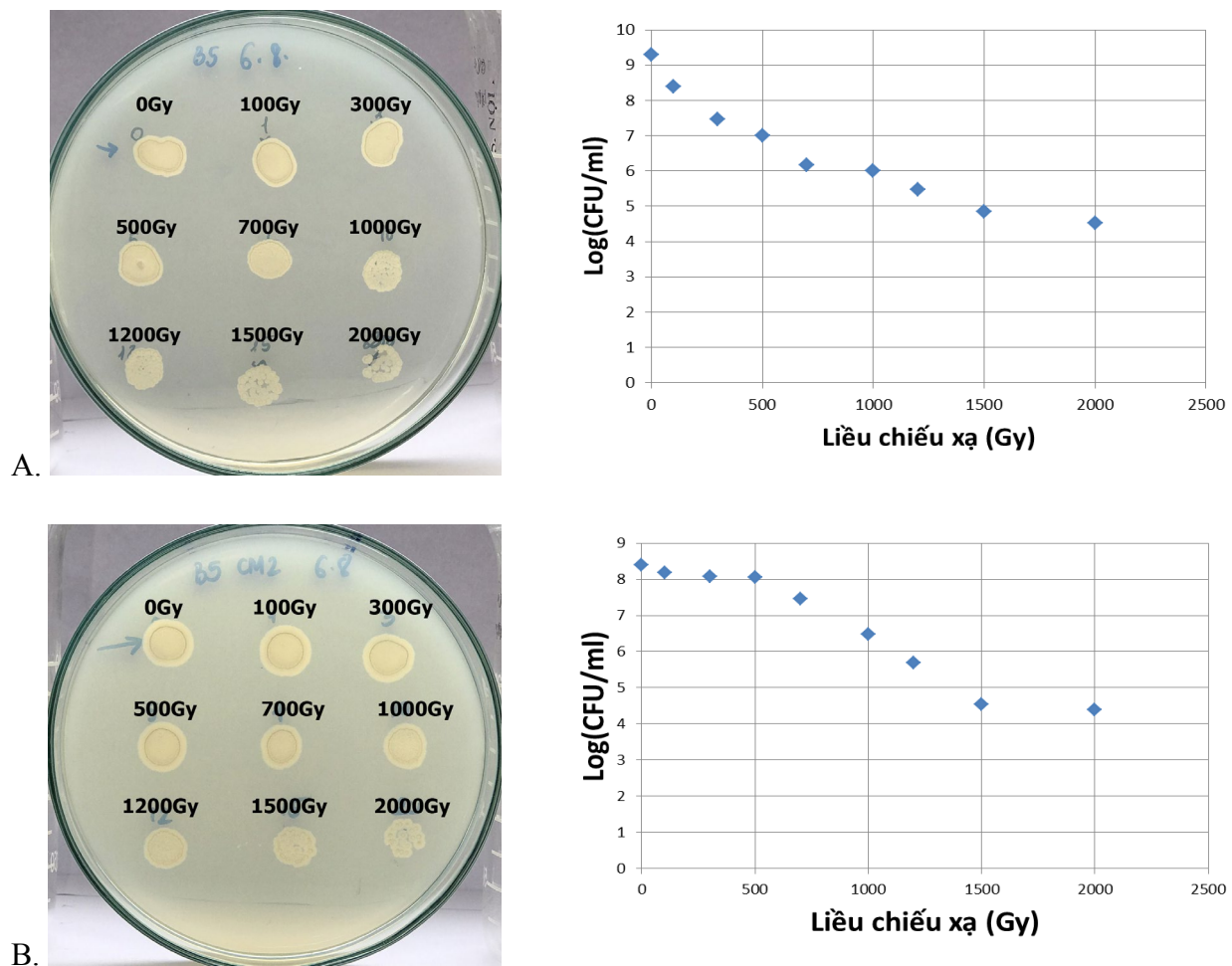
Hình 3. Đường cong hấp thụ ở OD₅₅₀ của dịch nuôi cấy tế bào vi khuẩn *B. subtilis* B5 ở các thời điểm khác nhau

Hình 3 biểu diễn độ hấp thụ quang của dịch nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy NB và môi trường NB có bổ sung dịch chiết CM2. Đồ thị cho thấy giai đoạn tăng trưởng rất mạnh- pha log là khoảng 2-6 giờ. Trong giai đoạn này, chủng vi khuẩn B5 ở môi trường có bổ sung dịch chiết CM2 có tốc độ sinh trưởng cao hơn so với chính nó ở môi trường không bổ sung dịch chiết, OD₅₅₀ ở thời điểm 6 giờ là 1,13 so với 0,95. Tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn chậm hơn ở giai đoạn tiếp theo khi bước vào pha cân bằng (8-18 giờ). Do hạn chế của phương pháp đo quang phổ là không phân biệt được tế bào sống-chết, đồ thị vẫn có chiều hướng đi lên và gần như đường thẳng. Ở giai đoạn này, tốc độ tế bào sống tăng lên bằng tế bào chết đi và không có sự khác biệt lớn về giá trị OD giữa môi trường có bổ sung dịch chiết CM2 và môi trường không bổ sung dịch chiết. Giai đoạn suy vong được tính từ 18h trở đi. Đồ thị ở giai đoạn này nằm ngang do trong dung dịch chỉ tồn tại tế bào chết, không có sự tăng thêm về số lượng tế bào sống. Thậm chí, các tế bào kết lại thành đám làm giá trị OD₅₅₀ giảm ở thời điểm 36 giờ xuống còn 1,57 và 1.68. Các kết quả cho thấy chủng *B. subtilis* B5 ở môi trường có bổ sung dịch chiết CM2 có tốc độ suy thoái chậm hơn so với chủng B5 ở môi trường không bổ sung dịch chiết.

Tỷ lệ sống sót của tế bào Bacillus subtilis B5 sau chiếu xạ

Tác động của bức xạ gamma tới tỷ lệ sống sót của vi khuẩn *B. subtilis* B5 được đánh giá bằng phương pháp nhỏ trực tiếp dịch nuôi cấy lên đĩa thạch và phương pháp đếm khuẩn lạc sống sót sau chiếu xạ (Hình 4A và 4B).

Dựa vào đồ thị hình 4 ta có thể thấy, ở cả hai loại môi trường số lượng tế bào vi khuẩn sống sót đều giảm đáng kể theo chiều tăng của liều chiếu xạ (giảm từ 10^9 xuống 10^4 khi liều tăng từ 0-2000Gy). Tuy nhiên, ở liều dưới 1000 ảnh hưởng của dịch chiết tới sự phát triển của tế bào sau chiếu xạ rõ rệt hơn. Ở khoảng liều này, trong môi trường có bổ sung dịch chiết, lượng tế bào sống sót chỉ giảm từ 10^9 xuống 10^7 , giảm chậm hơn so với môi trường không bổ sung dịch chiết, lượng tế bào sống sót giảm từ 10^9 xuống 10^6 . Hiệu ứng này cũng thể hiện rõ trên các đĩa thạch được nhỏ trực tiếp dịch nuôi cấy sau chiếu xạ, ở môi trường bổ sung dịch chiết khuẩn lạc mọc dày hơn, cho thấy khả năng sinh trưởng và phát triển tốt hơn (Hình 4). Qua đó khẳng định dịch chiết CM2 có tác dụng bảo vệ đối với tế bào vi khuẩn ở dải liều chiếu thấp, ít tác dụng ở các liều chiếu cao.

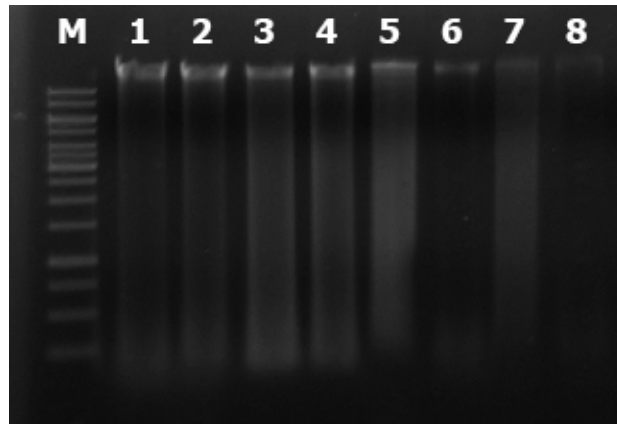


Hình 4. Tỷ lệ sống sót của chủng B5 và chủng B5 có bổ sung dịch chiết

A. Không bổ sung dịch chiết CM2; B. Có dịch chiết CM2

Mức độ đứt gãy DNA tổng số *Bacillus subtilis* B5 sau chiếu xạ

Để kiểm tra mức độ đứt gãy DNA của chủng vi khuẩn *B. subtilis* B5 gây ra do chiếu xạ. DNA tổng số của tế bào vi khuẩn trong dung dịch nuôi cấy ở các liều chiếu 0, 300, 700, 1500Gy được tách chiết (mỗi liều gồm mẫu đối chứng và mẫu có bổ sung dịch chiết (CM2)). Kết quả điện di DNA tổng số của các mẫu thí nghiệm được trình bày trong Hình 5. Điện di DNA tổng số sử dụng marker 1kb, gel agarose 1%.



Hình 5. Kết quả điện di DNA tổng số các mẫu

M: Marker 1kb; 1-2: B5 0 Gy; 3-4: 300 Gy; 5-6: 700 Gy; 7-8: 1500 Gy

Hình 5 cho thấy khá rõ ảnh hưởng của chiếu xạ tới sự đứt gãy của DNA tổng số. Mẫu 1 và 2 là mẫu không chiếu xạ cho kết quả băng DNA sắc nét, rõ ràng, không có vết đứt gãy phía dưới. Mẫu 3 và 5 là mẫu chiếu xạ ở liều 300 Gy và 700 Gy cho các băng sáng rõ, tuy nhiên do ảnh hưởng của chiếu xạ tạo ra các vết đứt gãy DNA rải rác phía dưới. Mẫu 4 và 6 là mẫu chiếu xạ ở liều 300 Gy và 700 Gy, tuy nhiên dưới tác dụng bảo vệ phóng xạ của dịch chiết CM2 các vết đứt gãy phía dưới đã giảm nhiều, chúng ta có thể quan sát rõ nhất ở mẫu số 6. Mẫu 7 và 8 là mẫu chiếu xạ ở liều 1500 Gy, ở liều chiếu cao các băng DNA tổng số không còn rõ ràng do bị đứt gãy nhiều. Mẫu 8 có bổ sung dịch chiết CM2 đã giảm số vết đứt gãy phía dưới, tuy nhiên ở liều cao, hiệu ứng này là không rõ ràng. Điều này có thể giải thích do ở liều chiếu cao, chiếu xạ đã gây đứt gãy lớn DNA, đồng thời ảnh hưởng lớn tới tế bào, DNA không thể phục hồi được bằng các cơ chế sửa chữa của tế bào. Như vậy, kết quả này khẳng định dịch chiết CM2 có tác dụng bảo vệ đối với DNA vi khuẩn *B. subtilis* B5 ở các liều chiếu thấp, ít tác dụng ở liều chiếu cao.

III. KẾT LUẬN

Khả năng bắt giữ gốc tự do của dịch chiết nấm Đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris* là trên 90% ở nồng độ từ 3mg/ml. Với hoạt tính chống oxy hóa tốt, dịch chiết này cho thấy khả năng bảo vệ đáng kể tế bào và DNA vi khuẩn *B. subtilis* ở những liều chiếu thấp. Khả năng bảo

vệ này chưa rõ ràng ở liều chiếu cao hơn. Trong nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi dự kiến sẽ PCR và giải trình tự gene 16S nhằm đánh giá mức độ tổn thương DNA của vi khuẩn ở mức độ nucleotide.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí bởi đề tài cấp cơ sở của Trung tâm Chiếu xạ Hà Nội, Viện Năng lượng Nguyên tử Việt Nam mã số CS/20/08-1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tindall K. R., Stein J., Hutchinson F., “Changes in DNA Base Sequence Induced by Gamma-Ray Mutagenesis of Lambda Phage and Prophage”, *Genetics*, 118(4), pp. 551–560, 1988.
2. Melanie Gulston, Jonathan Fulford, Terry Jenner, Catherine de Lara, and Peter O’Neill “Clustered DNA damage induced by gamma radiation in human fibroblasts (HF19), hamster (V79-4) cells and plasmid DNA is revealed as Fpg and Nth sensitive sites”, *Nucleic Acids Research*, 30(15), pp. 3464–3472, 2002.
3. Sudprasert W., Navasumrit P., Ruchirawat M., “Effects of low-dose gamma radiation on DNA damage, chromosomal aberration and expression of repair genes in human blood cells”, *Int J Hyg Environ Health*, 209(6), pp. 503-11, 2006.
4. J. D’amour, Gosselin C., Arul J., Castaigne F., Willemot C., “Gamma-Radiation Affects Cell Wall Composition of Strawberries”, *Food science*, Volume 58, pp. 182-185, 1993.
5. Seung Gon Wi, Byung Yeoup Chung, Jin-Hong Kim, Myung-Hwa Baek, Dae Hwa Yang, Ju-Woon Lee, Jae-Sung Kim, “Ultrastructural changes of cell organelles in *Arabidopsis* stems after gamma irradiation”, *Journal of Plant Biology*, Volume 48, pp. 195–200, 2005.
6. Đoàn Hồng Vân, Trần Minh Quỳnh, Nguyễn Thị Thơm, Đinh Ba Tuấn, Trần Tuấn Anh, Nguyễn Thuỳ Ngân, Tạ Bích Thuận, Võ Thị Thương Lan, “Đánh giá mức độ tổn thương phân tử DNA dưới tác dụng của tia tử ngoại”, *Hội nghị Khoa học và Công nghệ Hạt nhân toàn quốc lần thứ 11*, 162-163, 2015.
7. Jae-Won Ha, Hwa-Seung Yoo, Jang-Woo Shin, Jung-Hyo Cho, Nan-Heon Lee, Dam-Hee Yoon, Yeon-Weol Lee, Chang-Gue Son, Chong-Kwan Cho, “Effects of *Cordyceps militaris* Extract on Tumor Immunity”, *Korean Journal of Oriental Medicine*, Vol 27. No 4, pp. 12-29, 2006.
8. Kang H. J., Baik H.W., Kim S. J., Lee S. G., Ahn H. Y., Park J. S., Park S. J., Jang E. J., Park S. W., Choi J. Y., Sung J. H., Lee S. M., “*Cordyceps militaris* Enhances Cell-Mediated Immunity in Healthy Korean Men”, *J Med Food*, 18(10), pp. 1164-72, 2015.
9. Jeong M. H., Park Y. S., Jeong D. H., Lee C. G., Kim J. S., Oh S. J., Jeong S. K., Yang K., Jo WS, “In vitro evaluation of *Cordyceps militaris* as a potential radioprotective agent”, *International Journal of Molecular Medicine*, Volume 34 Issue 5, pp. 1349-1357, 2014.
10. Yu Zhan, Cai-Hong Dong, Yi-Jian Yao, “Antioxidant Activities of Aqueous Extract from Cultivated Fruit-bodies of *Cordyceps militaris* (L.) Link In Vitro”, *Journal of Integrative Plant Biology*, 48(11), pp. 1365–1370, 2006.
11. Zhang H., "The Optimization of Extraction of Cordycepin from Fruiting Body of *Cordyceps militaris* (L.) Link", *Advanced Materials Research*, Vols. 393-395, pp. 1024-1028, 2012.

EFFECT OF *Cordyceps militaris*'S EXTRACT ON THE CELL AND DNA OF IRRADIATED *Bacillus subtilis*

TRAN XUAN AN, NGUYEN THI THOM, HOANG DANG SANG, NGUYEN VAN BINH,
TRAN BANG DIEP

Hanoi Irradiation Center, Minh Khai- Tu Liem- Hanoi

Email: ank55b1@gmail.com

Abstract: The extractive from *Cordyceps militaris* isolated and cultivated by the Radiation Technology Research Laboratory - Hanoi Irradiation Center was used as a radioprotector. The quality of the *Cordyceps militaris*'s extract was assessed through antioxydant activity by radical oxygen species scavenging method (DPPH). Meantime, the effect of *Cordyceps militaris*'s extract on reducing cell and DNA damages at irradiated *Bacillus subtilis* was estimated based on survival rate of bacteria in the medium having *Cordyceps militaris*'s extract and examined *Bacillus subtilis* DNA modifications after gamma irradiation by molecular biology methods.

Keywords: *Bacillus substillis*, radioprotector, *Cordyceps militaris*