

¹ Інститут радіоактивності навколишнього середовища Університету Фукусіма, Японія, Фукусіма, e-mail: olena.pareniuk@gmail.com

² Національний університет біоресурсів і природокористування, Україна, 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15

³ Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А

✉ olena.pareniuk@gmail.com, (097) 786-27-11

МІКРОБІОМ ҐРУНТУ «РУДОГО ЛІСУ»: ЯК ВПЛИНУЛО ЗАБРУДНЕННЯ РАДІОНУКЛІДАМИ НА СТРУКТУРУ ҐРУНТОВОЇ МІКРОФЛОРИ?

Навіть після 30-річного вивчення біологічних та екологічних наслідків аварії на Чорнобильській АЕС серед дослідників немає повної та узгодженої думки щодо впливу радіонуклідного забруднення на стан екосистем. Є немало робіт про вплив різних доз іонізуючого випромінювання на ріст і розвиток представників окремих таксономічних угруповань рослин, тварин, водоростей, бактерій тощо [1–4]. Проте питання комплексної оцінки такого впливу на компоненти екосистеми дотепер залишається відкритим.

Мікрофлора ґрунту є однією з ключових ланок екосистеми, адже саме тут відбувається переважна більшість процесів розкладення рослинних і тваринних решток. За сукупністю й узгодженістю функцій, можливостями щодо адаптації до впливу чинників навколишнього середовища угруповання ґрунтових мікроорганізмів значною мірою діє як один організм, і саме тому для його характеристики було обрано термін «мікробіом» [5, 6]. Залежно від матеріалу, що має бути розкладено, мікроорганізми формують субстратспецифічні угруповання, що змінюються під впливом чинників навколишнього середовища, серед яких визначальними є наявність речовин для деструкції, вологість ґрунту [7], температура навколишнього середовища [8]. В той же час існує безліч чинників, здатних специфічно модифікувати структуру угруповання. Так, наприклад, ацидофільні бактерії існують переважно в ґрунтах з низьким рН [9], метаболізм неорганічного азоту істотно залежить від доступності вуглецю [10] тощо. Також показано, що певні речовини, наприклад важкі метали, можуть істотно модифікувати структуру угруповання, зміщуючи баланс у той чи інший бік [11, 12].

Опубліковано значну кількість робіт щодо визначення індивідуальної радіочутливості різ-

них видів ґрунтових бактерій [5, 13]. Ці дані дають підстави припустити, що ефект від радіонуклідного забруднення на рівні радіоактивності «рудого лісу» [14] не вплине на характеристики виживаності жодного з видів мікробіому ґрунту. Однак для адекватної оцінки впливу радіонуклідного забруднення необхідно застосовувати системний підхід та враховувати весь склад мікробіому. До недавнього часу стандартні мікробіологічні методи дослідження мікробіому базувалися лише на висіві ґрунтової витяжки на поживні середовища, що унеможливило адекватну оцінку всього складу мікробного угруповання, обмежуючи відомості лише тими колоніями, що можуть прорости у конкретних штучних умовах [3, 13, 15]. Саме через велику суб'єктивність методики не існує одностайної думки щодо впливу іонізуючої радіації на структуру ґрунтових угруповань. Наукові дані свідчать як про збіднення різноманіття [16, 17], так і про повну неможливість достовірно виявити будь-який радіобіологічний ефект [15, 18].

Метою нашої роботи було охарактеризувати біорізноманіття ґрунтової мікрофлори на забруднених радіонуклідами територіях і дослідити вплив радіонуклідного забруднення на мікробіом ґрунту.

Матеріали і методи

Для відбору проб було обрано дві точки з траншеї Т22, розташовані за 2,5 км від аварійного 4-го блоку Чорнобильської АЕС, які проаналізовано та описано раніше [14, 15]. Для порівняння також відбирали ґрунт з лісу поблизу відселеного с. Чистогалівка, де не проводилася деконтамінація, отже, екосистему можна вважати такою, що не була піддана антропогенним змінам, окрім забруднення радіонуклідами.

Ґрунт відбирали за допомогою ґрунтового буру з глибини 5–20 см у червні 2014 р. Патрони до буру стерилізували після кожного відбору за допомогою етанолу. Після відбору ґрунт зберігали у стерильних пробірках у переносному холодильнику при +4 °С. Одну частину ґрунту, заплановану для генетичних аналізів, зберігали у лабораторії при –80 °С, в іншій було визначено вологість, рН, вміст основних поживних елементів тощо (табл. 1).

ДНК виділяли за допомогою Power Soil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, США) згідно з протоколом виробника. Концентрацію отриманого продукту перевіряли на флуориметрі Qubit® 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, США), після чого готували бібліотеки фрагментів 16S рРНК для NGS секвенування на приладі MiSeq System (Illumina, США) згідно з вимогами виробників.

Кислотність водної витяжки ґрунту ($\text{pH}_{\text{води}}$) визначали за стандартною агрохімічною методикою за допомогою рН-метра при співвідношенні ґрунт : дистильована вода як 1 : 2,5 для мінеральних ґрунтів (ГОСТ 26423-85). Вміст основних поживних елементів (N, P, K) визначали за загальноприйнятими методиками (ГОСТ 26213-91).

Біоінформатичну обробку проводили за допомогою пакетів програм QIIME [19] та Illumina BaseSpace 16s Metagenomics. Статистичну обробку проводили у STAMP [20] та Origin 8.1. Для побудови ілюстрацій використовували усі чотири перелічені вище пакети програм.

Результати та обговорення

Ґрунти на території зони відчуження належать до дерново-підзолистих слабо- і середньопідзолених суглинків. Для врахування впливу навколишнього середовища на склад ґрунтової

мікрофлори важливою є оцінка основних агрохімічних показників ґрунту, які представлені у табл. 1.

Дослідження біорізноманіття ґрунтової мікрофлори на забруднених радіонуклідами ґрунтах «рудого лісу» проводилося раніше французькими дослідниками [15], і тому для порівняння результатів наших досліджень точки відбору «рудий ліс, траншея» та «рудий ліс» було підібрано згідно з координатами, вказаними у процитованій вище роботі. Обидві точки розташовані в межах полігону «рудий ліс» – території, яку було найбільше забруднено альфа-, бета- та гамма-емітерами [14]. Високі концентрації радіонуклідів спонукали до проведення у 1986 р. негайної деконтамінації, в результаті якої верхній шар ґрунту і вся надземна біомаса соснового лісу були зняті і поховані у траншеях, викопаних тут же. Пустку, що утворилася, було покрито шаром річкового піску потужністю до 1 м і засаджено молодими деревами (переважно сосною). Таким чином, утворився полігон з хвилястим рельєфом, де потужність експозиційної дози на поверхні кожної траншеї (у нашому дослідженні точка «рудий ліс, траншея») у десятки разів перевищувала цей показник поза межами траншей (точка «рудий ліс»). Крім того, в результаті захоронення значної біомаси хімічний склад ґрунту траншеї також суттєво відрізняється від інших територій – вміст азоту, фосфору та калію тут майже вдвічі більший, ніж поза ділянками захоронення. Для порівняння було проаналізовано ґрунт, відібраний з лісу поблизу с. Чистогалівка, де зберігся характерний для лісових ґрунтів мікробіом.

Отримані результати свідчать про збільшення видової різноманітності в траншеї. Так, кількість видів тут була майже вдвічі більшою, ніж поза територією захоронення решток (табл. 2).

Таблиця 1

Загальна характеристика точок відбору проб

Точка відбору зразків	Активність ^{137}Cs , Бк/кг	Вологість ґрунту, %	$\text{pH}_{\text{води}}$	P, мг/кг	K, мг/кг	N, мг/кг
«Рудий ліс, траншея»	$8,66 \times 10^4$	2,9	4,5	50	37	74,2
«Рудий ліс»	$3,37 \times 10^4$	10,7	3,0	4	16	56
с. Чистогалівка	$1,25 \times 10^4$	4,1	3,6	13	23	37,8

Таблиця 2

Міра видового різноманіття за Шенноном

№ з/п	Точка відбору проби	Індекс Шеннона [22]	Кількість ідентифікованих видів
1	«Рудий ліс, траншея»	2,621	1283
2	«Рудий ліс»	2,390	750
3	с. Чистогалівка	2,447	802

Згідно з висловленою гіпотезою такий ефект спричинений саме більшою кількістю поживних речовин, доступних на траншеї. Також може мати місце помірний еволюційний тиск, спричинений випромінюванням. Використовуючи ERICA [21] як інструмент для оцінки доз, було визначено, що потужність дози для ґрунтових мікроорганізмів варіює від 4,25 МЗв/год на траншеї до 3,24 МЗв/год поза її межами, що може формувати дозу, відчутну навіть для мікроорганізмів. Варто зазначити, що у розглянутому нами випадку поглинуті дози можуть бути навіть більшими через те, що бактеріальні клітини у ґрунті перебувають у безпосередньому контакті з радіонуклідами, не будучи екранованими ґрунтовими частками, водою чи повітрям.

Видовий склад зразків подібний, але наявні істотні відмінності в структурі угруповання. Так, у ґрунті з траншеї домінують представники родини Thermomonosporaceae, частка яких складає 10,6%. Але в зразках з меншою радіоактивністю домінуючими є Acidobacteriaceae, частка яких складає, відповідно, 19,5 і 10,5% у ґрунті з «рудого лісу» та с. Чистогалівка. Також за кількістю домінуючих видів зразки з траншеї показують значну

перевагу – більше 5% тут становлять представники шести родин: Acidobacteriaceae, Microviridae, Thermomonosporaceae, Mycobacteriaceae, Rhodospirillaceae та Hyphomicrobiaceae. В зразках з «рудого лісу» бар'єр у 5% змогли подолати лише Acidobacteriaceae, Microviridae, Thermomonosporaceae, Mycobacteriaceae, Rhodospirillaceae, так само як і в зразку з с. Чистогалівка – ті самі родини, за винятком Rhodospirillaceae. Це ще раз підтверджує обраховані вище значення індексу Шеннона.

Висновки

Ґрунти, навіть піддані такому екстремальному впливу, як забруднення радіонуклідами та антропогенна трансформація ландшафту і рослинного покриву, мають надзвичайні можливості щодо підтримання структури мікробіому та відновлення популяції мікроорганізмів. Водночас підвищені рівні радіонуклідного забруднення приводять до суттєвого збільшення різноманіття, що може бути пов'язано з підвищеним еволюційним тиском на окремі організми в межах угруповання.

ЛІТЕРАТУРА

1. Strandberg G. Microbial cells as biosorbents for heavy metals: accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa* // Appl. Environ. Microbiol. – 1981. – 1, № 441. – P. 237–245.
2. Rediske J.H., Selders A.A. The Absorption and Translocation of Strontium by Plants // Plant Physiol. – 1953. – 28, № 4. – P. 594–605.
3. Zhdanova N.N., Zakharchenko V.A., Vember V.V., Nakonechnaya L.T. Fungi from Chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor // Mycol. Res. – 2000. – 104, № 12. – P. 1421–1426.
4. Gudkov I.N., Gaychenko V.A., Pareniuk O.Yu., Grodzinsky D.M. Changes in biocenoses in the Chernobyl NPP accident zone // Nuclear Physics and Atomic Energy. – 2011. – 12, № 4. – P. 362–374.
5. Gilbert J., Meyer F., Jansson J. The Earth Microbiome Project: Meeting report of the «1st EMP meeting on sample selection and acquisition» at Argonne National Laboratory October 6th 2010 // Stand Genomic Sci. – 2010. – 3, № 3. – P. 249–253.
6. Marchesi J.R., Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal // Microbiome. – 2015. – 3, № 1. – P. 1–31.
7. Lynch J.M., de Leij F. Rhizosphere. – Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, 1990. – 283 p.
8. Luo C., Rodriguez R.L.M., Johnston E.R. Soil microbial community responses to a decade of warming as revealed by comparative metagenomics // Appl. Environ. Microbiol. – 2014. – 80, № 5. – P. 1777–1786.
9. Fierer N., Lauber C.L., Ramirez K.S., Zaneveld J., Bradford M.A., Knight R. Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients // ISME J. – 2012. – 6, № 5. – P. 1007–1017.
10. Kaye J.P., Hart S.C. Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms // Trends Ecol. Evol. – 1997. – 12, № 4. – P. 139–143.
11. Brookes PC. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals // Biol. Fertil. Soils. – 1995. – 19, № 4. – P. 269–279.
12. Giller K.E., Witter E., Mcgrath S.P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review // Soil Biol. Biochem. – 1998. – 30, № 10–11. – P. 1389–1414.
13. Galitskaya P., Biktasheva L., Saveliev A., Ratering S., Schnell S., Selivanovskaya S. Response of soil microorganisms to radioactive oil waste: results from a leaching experiment // Biogeosciences. – 2015. – 12, № 12. – P. 3681–3693.
14. Bugai D., Kashparov V., Dewiere L., Khomutinin Y., Levchuk S., Yoschenko V. Characterization of subsurface geometry and radioactivity distribution in the trench containing Chernobyl clean-up wastes // Environ. Geol. – 2005. – 47, № 6. – P. 869–881.
15. Chapon V., Piette L., Vesvres M.H. Microbial diversity in contaminated soils along the T22 trench of the Chernobyl experimental platform // Appl. Geochemistry. – 2012. – 27, № 7. – P. 1375–1383.
16. Parekh N.R., Poskitt J.M., Dodd B., Potter E.D., Sanchez A. Soil microorganisms determine the sorption of radionuclides within organic soil systems // J. Environ. Radioact. – 2008. – 99, № 5. – P. 841–852.

17. Mousseau T.A., Milinevsky G., Kenney-Hunt J., Møller A.P. Highly reduced mass loss rates and increased litter layer in radioactively contaminated areas // *Oecologia*. – 2014. – 175, № 1. – P. 429–437.
18. Niedrée B., Vereecken H., Burauel P. Effects of low-level radioactive soil contamination and sterilization on the degradation of radiolabeled wheat straw // *J. Environ. Radioact.* – 2012. – 109, № 1. – P. 29–35.
19. Kuczynski J., Stombaugh J., Walters W.A., González A., Caporaso J.G., Knight R. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities // *Curr. Protoc. Bioinformatics*. – 2011. – 158, № 45. – P. 245–268.
20. Parks D.H., Tyson G.W., Hugenholtz P., Beiko R.G. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles // *Bioinformatics*. – 2014. – 30, № 21. – P. 3123–3124.
21. Brown J.E., Alfonso B., Avila R., Beresford N.A., Copplestone D., Hosseini A. A new version of the ERICA tool to facilitate impact assessments of radioactivity on wild plants and animals // *J. Environ. Radioact.* – 2016. – 153, № 34. – P. 141–148.
22. Hill M.O. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences // *Ecology*. – 1973. – 54, № 2. – P. 427–432.

PARENIUK O.^{1,2}, SHAVANOVA K.², ILLIENKO V.², SAMOFALOVA D.³, GUDKOV I.²

¹ *Institute of Environmental Radioactivity of Fukushima University, Japan, Fukushima, e-mail: olena.pareniuk@gmail.com*

² *National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Ukraine, 03041, Kyiv, Heroyiv Oborony str., 15*

³ *Institute of Food Biotechnology and Genomics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskogo str., 2A*

«RED FOREST» SOIL MICROBIOME: HOW DOES RADIONUCLIDE CONTAMINATION AFFECT THE STRUCTURE OF SOIL MICROFLORA?

Aim. The aim of this study is to characterize the microbiome of soil with high levels of radionuclide contamination and figure out if its impact on microflora. **Methods.** Microbiome study was conducted via New Generation Sequencing. **Results.** Microflora diversity was higher in samples, collected from most contaminated areas. Anyway, nutrient availability here was higher as well so more careful study is needed to show the impact of radionuclide contamination. Acidobacteriaceae, Microviridae, Thermomonosporaceae, and Mycobacteriaceae, were dominant in all studied samples, but the structure of the community varied significantly. **Conclusions.** Soils, even subjected such extreme conditions such as radionuclide contamination and anthropogenic transformation of terrain and vegetation, have unprecedented capabilities to maintain and restore the structure of microbiome. However, according to our results, increased levels of radioactive contamination lead to a significant increase in diversity, which, in our opinion, may be associated with increased evolutionary pressure on certain individuals within the group.

Keywords: soil microflora, radionuclide contamination, Chernobyl, NGS.