НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Особливості біорізноманіття ґрунтової мікрофлори забруднених радіонуклідами територій та її вплив на доступність радіонуклідів рослинам

ПАРЕНЮК
Олена Юріївна

кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник науково-дослідної теми 110/1м-пр
НУБіП України

Київ - 2018

Актуальність роботи

Накопичення радіонуклідів рослинами, їх відповідь на стрес

Мікроорганізми є основною редукуючою ланкою екосистем і саме вони більшою мірою впливають на інтенсивність обмінних процесів в ґрунті

Відповідь екосистеми на привнесення новітніх забрудників?

Накопичення радіонуклідів рослинами значною мірою впливає на їх стресостійкість і здітність до адаптації до змінених умов навколишнього середовища

Видовий склад і біологічна активність ґрунтових мікроорганізмів

Рухомість і біологічна доступність радіонуклідів в ґрунті

Отже, актуальним є визначення впливу радіонуклідного забруднення на малорухомі компоненти екосистем – мікроорганізми та рослини

Мета і завдання роботи

Метою роботи було оцінити відповідь мікробіомів на радіонуклідне забруднення ґрунту та виявлення особливостей переходу ^{137}Cs з ґрунту в різні види сільськогосподарських рослин

Поставлена мета зумовила необхідність вирішення таких завдань:

- Визначити кількісний і видовий склад ґрунтового мікробоценозу забруднених радіонуклідами ґрунтів зони відчуження та зони безумовного (обов'язкового) відселення та оцінити сезонну динаміку кількості еколого-трофічних груп мікроорганізмів на досліджуваних територіях;
- Ідентифікувати домінуючі види ґрунтових бактерій та сформувати колекцію;
- Провести порівняльний аналіз здатності до акумуляції 137Cs мікроорганізмами, виділеними із забруднених радіонуклідами ґрунтів, та культур із колекції Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України;
- Оцінити біорізноманіття мікрофлори всередині 4-го енергоблоку ЧАЕС та визначити можливість формування протоекосистем всередині зруйнованого об'єкта.
- Визначити вплив обраних мікроорганізмів на надходження 137Cs у рослини;

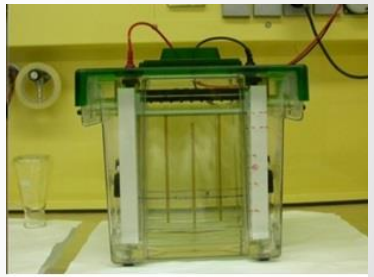
Методи досліджень

- Загально-мікробіологічні методики - висіву ґрунтової суспензії у різних розведеннях на селективні і елективні поживні середовища, експозиція тест-систем у ґрунті протягом вегетаційного періоду.

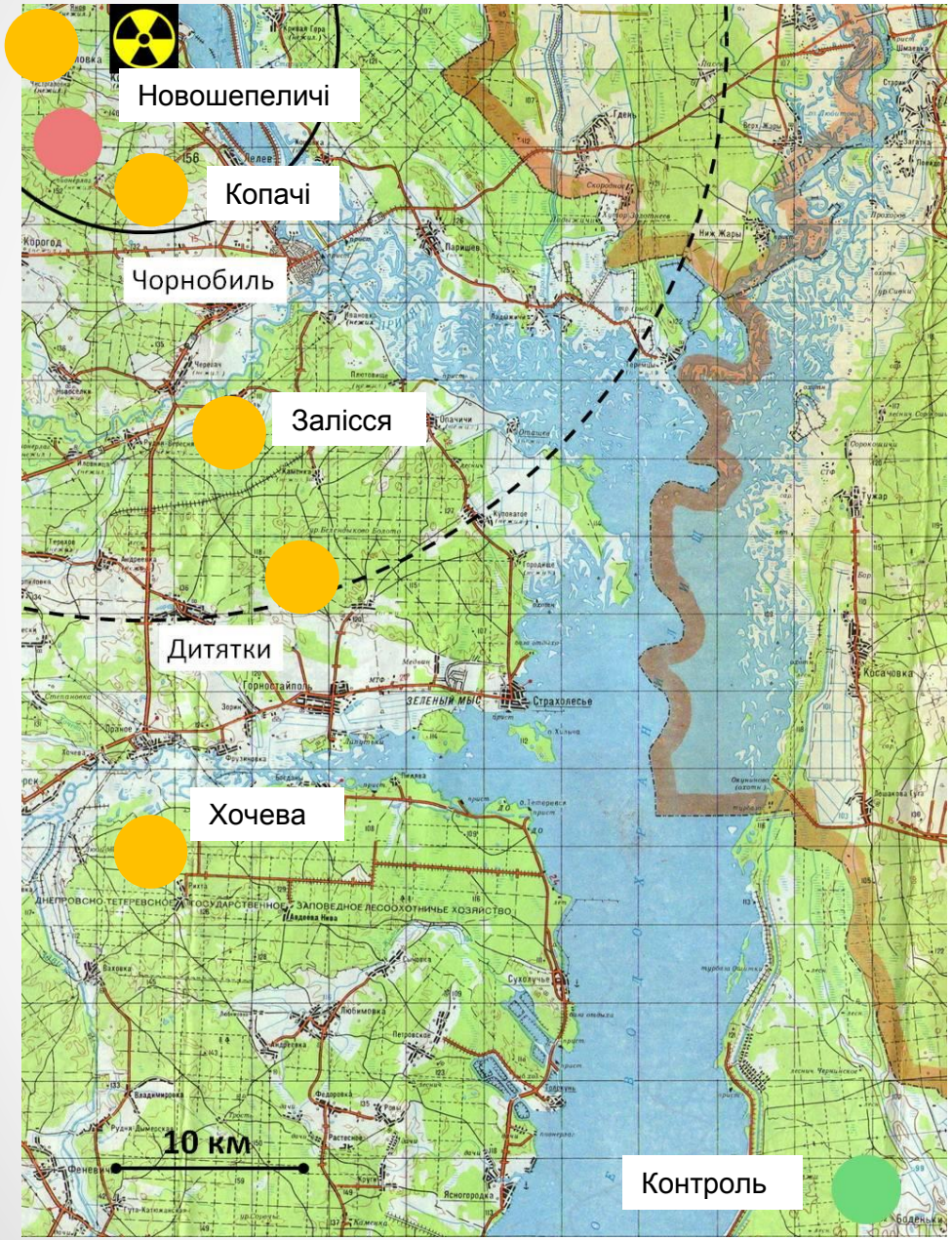
- Мікроскопія (конфокальна скануюча лазерна та скануюча електронна мікроскопія) – для визначення основних морфологічних характеристик обраних видів мікроорганізмів. Молекулярно-генетичні методи – для видової ідентифікації представників ґрунтової мікрофлори.

- Модельні експерименти– для визначення впливу мікроорганізмів на перехід та накопичення радіонукліду у рослинній та бактеріальній біомасі.

- Секвенування нового покоління (NGS) для визначення загального біорізноманіття мікробіомів.



Розміщення дослідних ділянок



Атомна електростанція

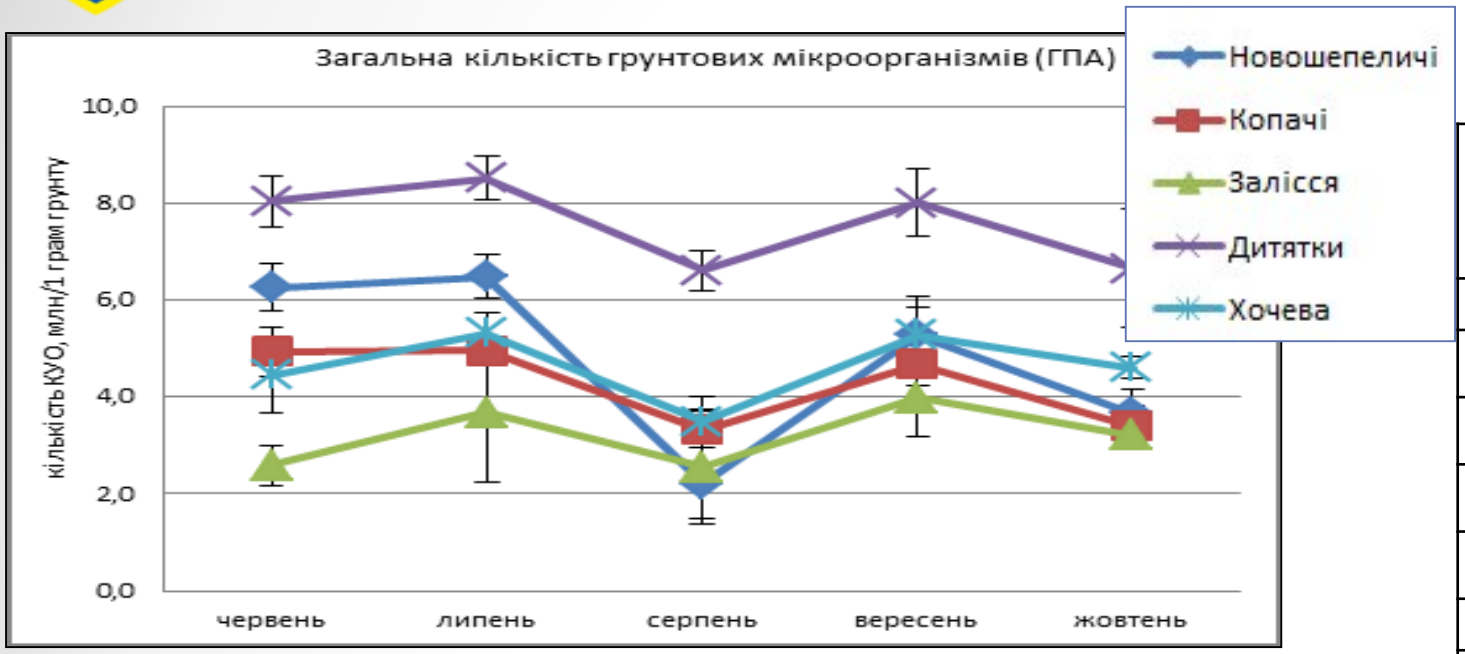
Дослідні ділянки для відбору проб мікрофлори та експозиції тест-систем

Оцінка різноманіття бактеріальної мікрофлори, виділених з точок відбору зразків і видова ідентифікація домінуючих штамів

№ з/п	код ізоляту	Довжина секвенованого фрагмента ДНК, п.н.	Найближчий відомий організм (номер в GenBank)	Індекс домінування (Ід)			
				Хочева	Дитятки	Залісся	Копачі
1	B1	758	*Bacillus mycoides* strain BCHMAC12	0,18	0,11	0,05	0,02
2	B4d	911	*Arthrobacter oxydans* strain Z1369 / strain 1662	0,20	0,20	0,26	0,30
3	B2	739	*Flavobacterium* sp. TISTR 1602	0,07	0,10	0,17	0,06
4	B5	594	*Massilia* sp. mf19-1	0,09	0,08	0,11	0,08
5	B6b	819	*Burkholderia glathei* Hg11	0,12	0,10	0,05	0,07
6	B10	622	*Pseudomonas frederiksbergensis* strain TPK 2-	0,15	0,04	0,07	0,10
7	B11	485	*Burkholderia* sp. IMER-B1-53	0,03	0,14	0,10	0,10
8	B7	759	*Streptomyces* sp. BK21 / 20 / 17	0,01	0,04	0,14	0,08
9	B15	549	*Streptomyces lavendulae* strain NRRL B-1230	0,08	0,03	0,02	0,16

- На основі аналізу видового складу мікробоценозу, забруднених радіонуклідами ґрунтів зони відчуження і зони безумовного (обов’язкового) відселення Чорнобильської АЕС, вперше виділено та ідентифіковано 11 видів мікроорганізмів, що домінували у всіх розглянутих у роботі пунктах відбору проб.

Загальна кількість мікроорганізмів та коефіцієнти мінералізації та оліготрофності в точках відбору проб



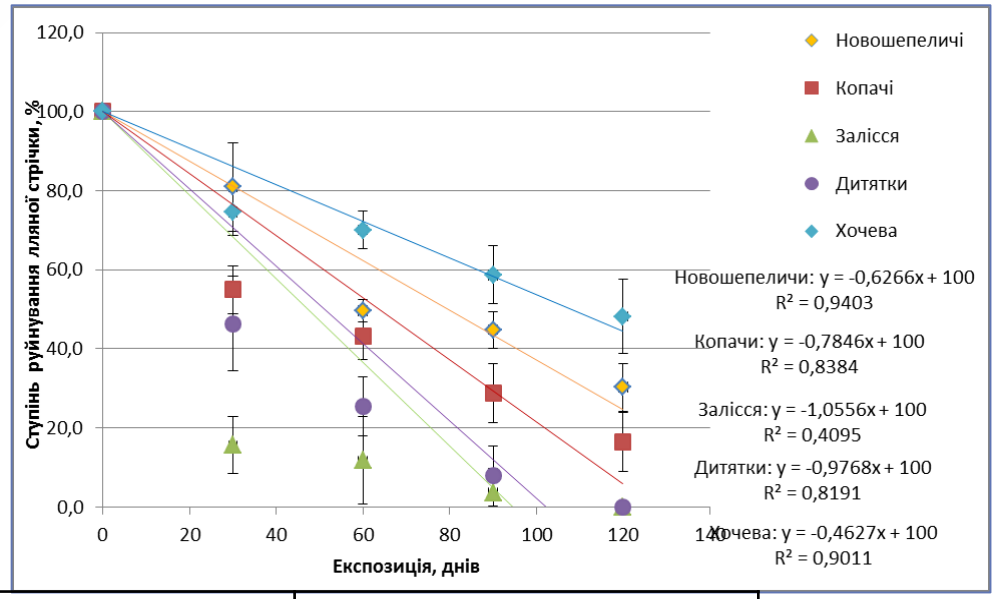
№ з/п	Час відбору проби	Місце відбору проб, село				
		Новошепеличі	Копачі	Залісся	Дитятки	Хочева
Коефіцієнт мінералізації ($К_{мін}$)						
1	червень	0,64	0,59	0,33	1,38	0,19
2	липень	0,80	0,61	0,48	2,02	0,26
3	серпень	0,73	0,68	0,34	3,10	0,15
4	вересень	0,43	0,56	0,28	2,30	0,19
5	жовтень	0,34	0,52	0,26	1,62	0,33
Коефіцієнт оліготрофності ($К_{оліг}$)						
1	червень	0,97	0,87	0,41	0,93	1,58
2	липень	1,10	0,46	0,30	0,50	0,40
3	серпень	0,61	0,84	0,52	0,20	3,19
4	вересень	0,36	0,27	0,15	0,83	2,05
5	жовтень	1,14	0,67	0,35	3,34	1,52

- За результатами висівів ґрунтової суспензії на селективні середовища виявлено достовірну кореляцію між питомою активністю ^{137}Cs у ґрунті і динамікою кількості мікроорганізмів-амоніфікаторів.
- Значення коефіцієнта мінералізації коливаються в межах 0,15 – 3,10 (невелика інтенсивність мінералізації органічних сполук азоту), отже, на всіх досліджених ділянках відбуваються процеси накопичення органічних решток і процеси гуміфікації. Це свідчить про відновлення природнього гомеостазу ґрунтів в умовах обмеженого антропогенного тиску.

7

Целюлазна активність ґрунту

Тест-система з рештками лляної смужки, відібрана після 90 діб експозиції у ґрунті на території відселеного с. Копачі

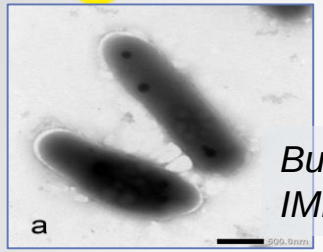


№ з/п	Точка відбору зразків, село	Кут нахилу прямої апроксимації, градус
1	Новошепеличі	32,1˚
2	Копачі	38,1˚
3	Залісся	46,5˚
4	Дитятки	44,3˚
5	Хочева	24,8˚

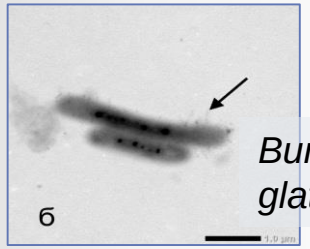
Загальний вигляд системи для визначення целюлозної активності після експозиції у ґрунті протягом 90 діб

- Інтенсивність ферментативної целюлозолітичної активності ґрунтових мікроорганізмів у розглянутих екосистемах стабільна у часі, що свідчить про високу буферність ґрунту. Достовірної залежності швидкості руйнування рослинних решток від ступеня радіонуклідного забруднення ґрунту виявлено не було.

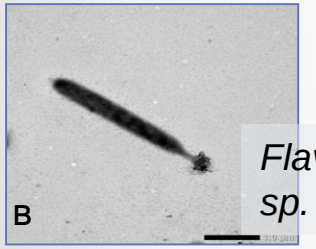
Здатність представників ґрунтової мікрофлори до акумуляції ^{137}Cs



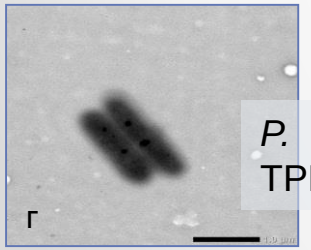
Burkholderia sp. IMER-B1



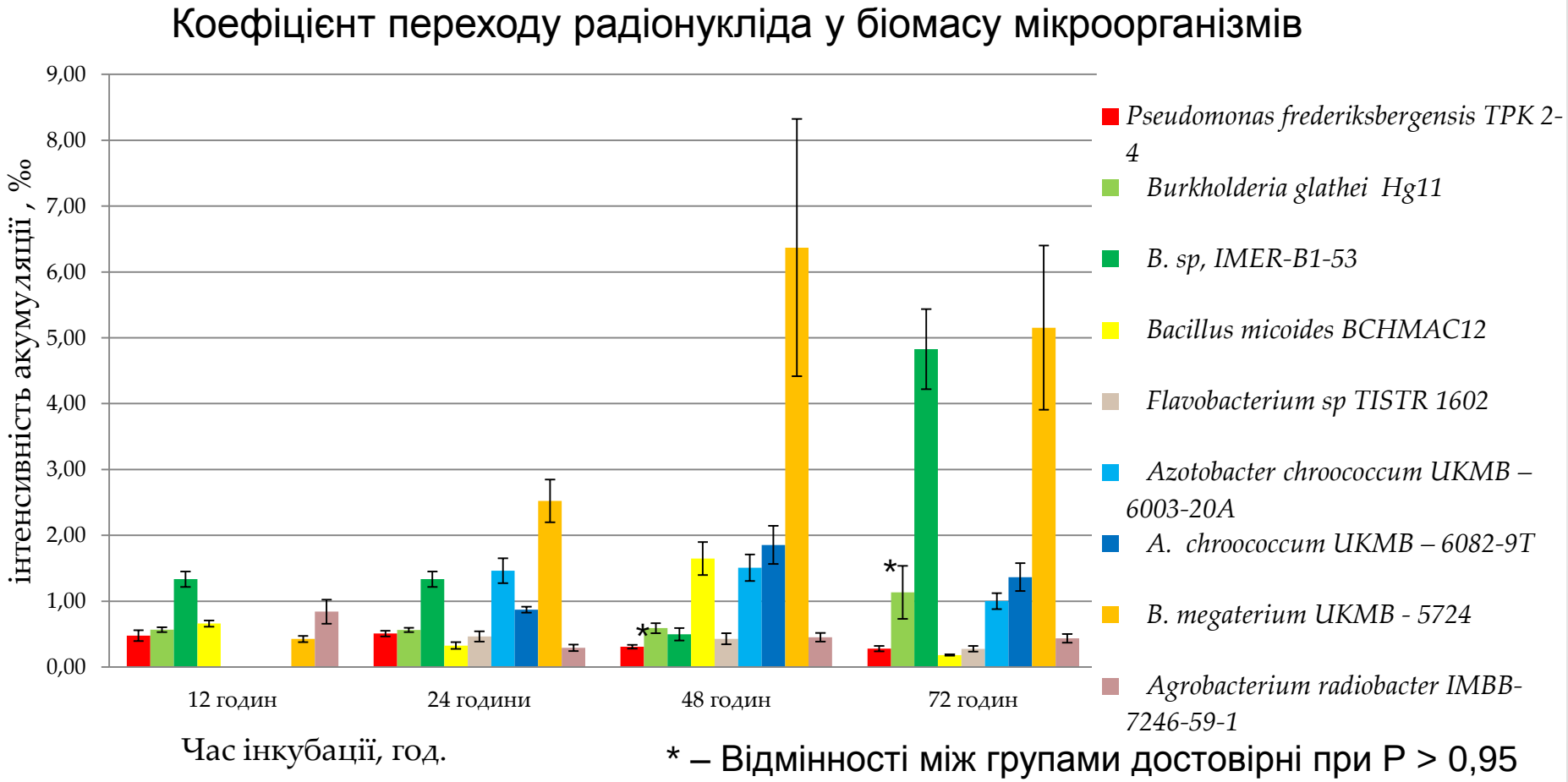
Burkholderia glathei Hg11



Flavobacterium sp. TISTR 1602



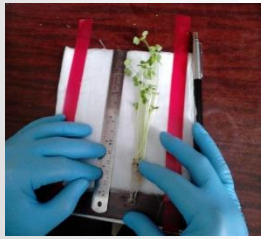
P. frederiksbergensis ТРК 2-4



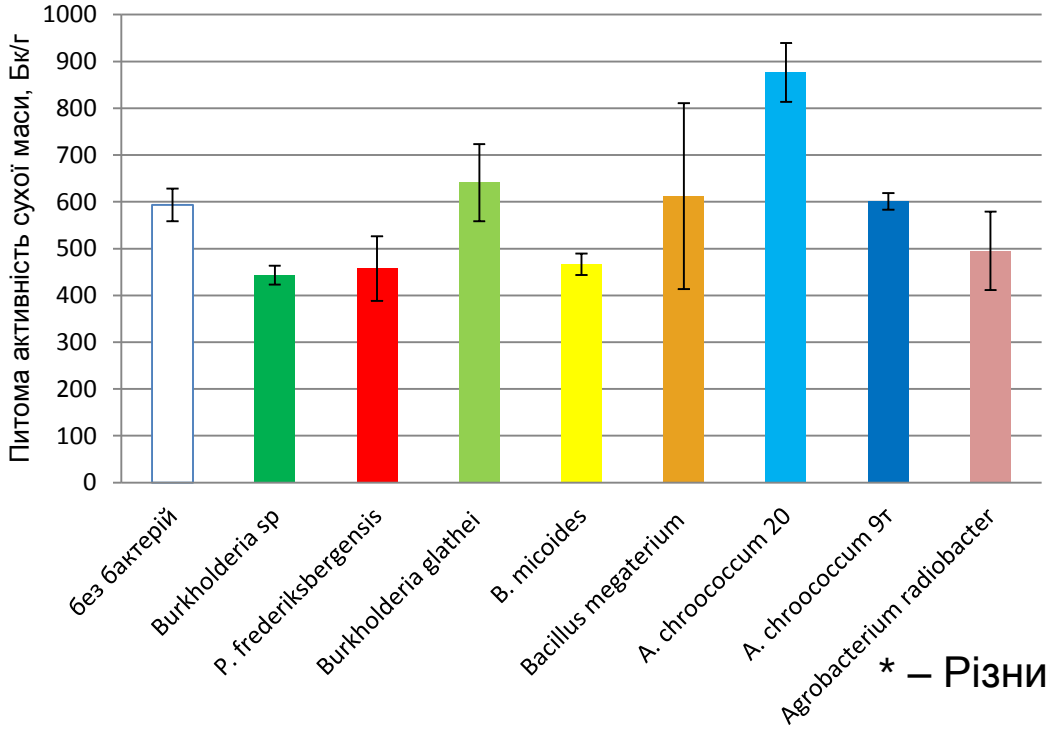
* – Відмінності між групами достовірні при P > 0,95

- Встановлено, що штам *Bacilus megaterium* УКМ В-5724 із колекції Інституту мікробіології та вірусології НАН України, порівняно з мікроорганізмами-компонентами біоценозів забруднених радіонуклідами ґрунтів, має підвищену здатність до накопичення ^{137}Cs

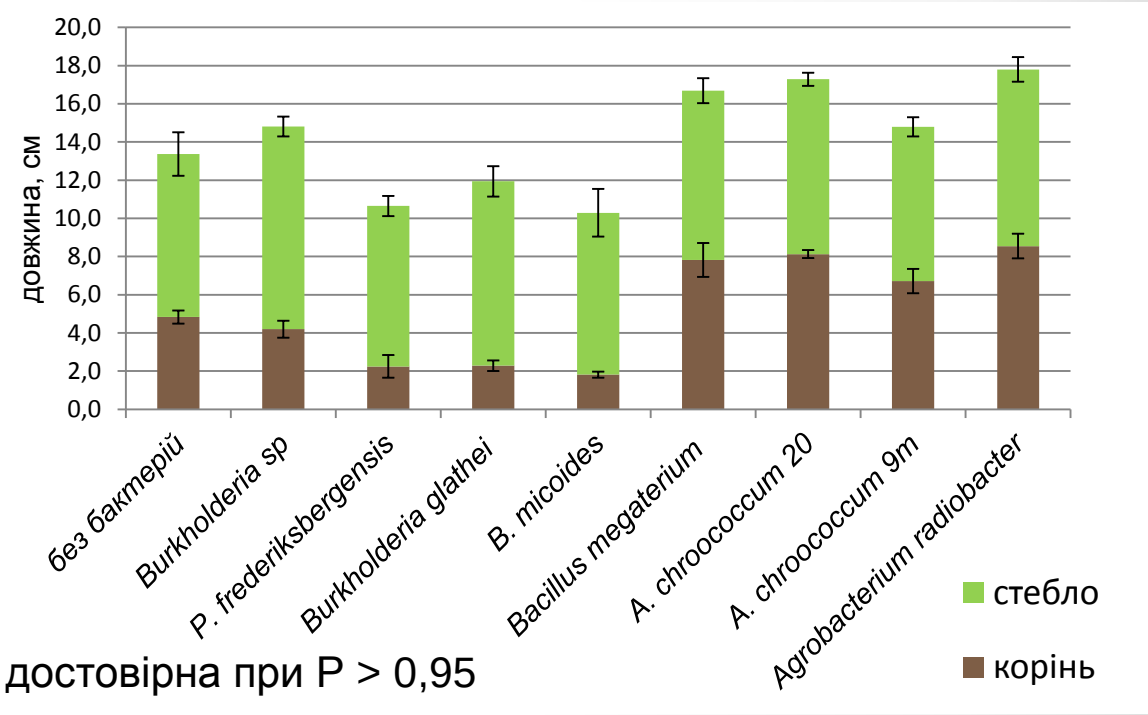
Зміна біологічної доступності ^{137}Cs під впливом мікрофлори ґрунтів



Питома активність повітряно-сухої біомаси ріпаку після пророщування з інтродукованими в ризосферу мікроорганізмами



Морфологія рослин ріпаку після пророщування з інтродукованими в ризосферу мікроорганізмами

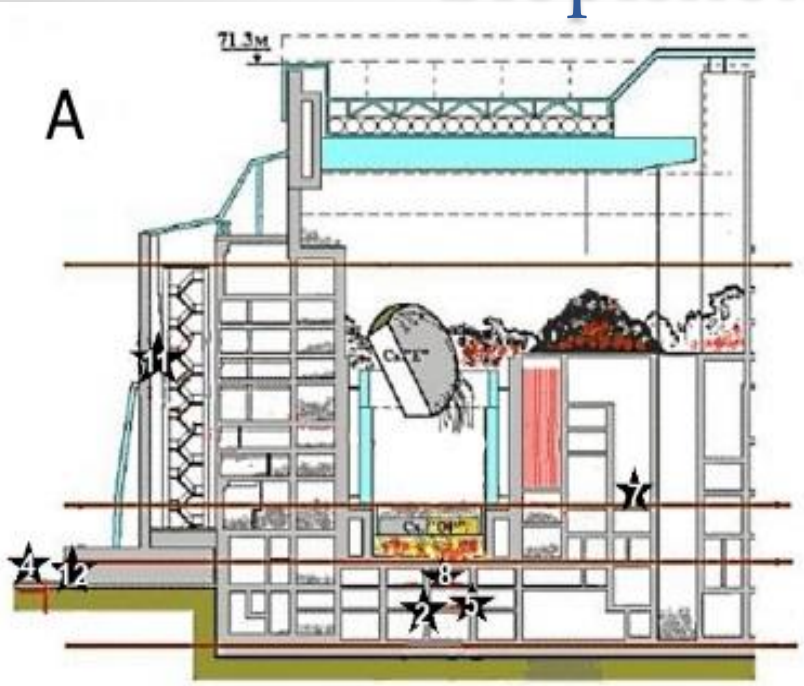


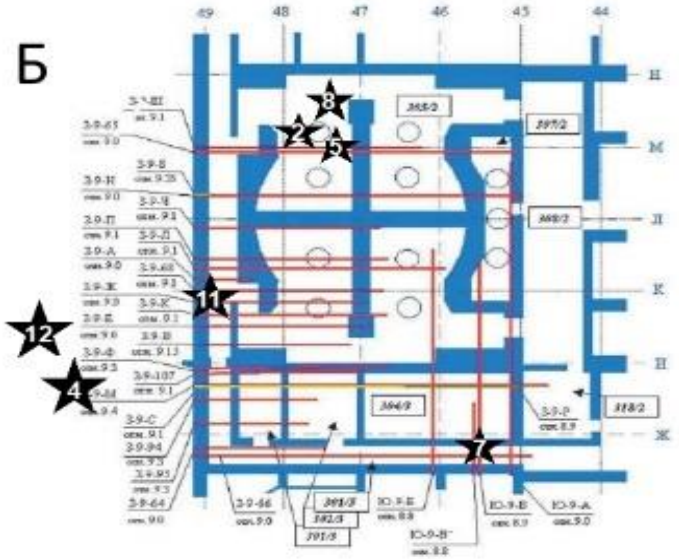
* – Різниця достовірна при P > 0,95

- Встановлено, що мікроорганізми окремих видів можуть модифікувати коефіцієнт переходу ^{137}Cs із субстрату в рослини. Найбільше, в 1,5 рази, перехід радіонукліда із субстрату в рослини стимулював штам *Azotobacter chroococcum* УКМ В-6003-20А, а найкращий показник щодо зниження накопичення ^{137}Cs ріпаком, у 1,3 рази, спостерігався після інокуляції насіння штамом *Burkholderia* sp IMER-B1-53.

Біорізноманіття мікрофлори всередині 4-го блоку ЧАЕС

Опис точок відбору зразків



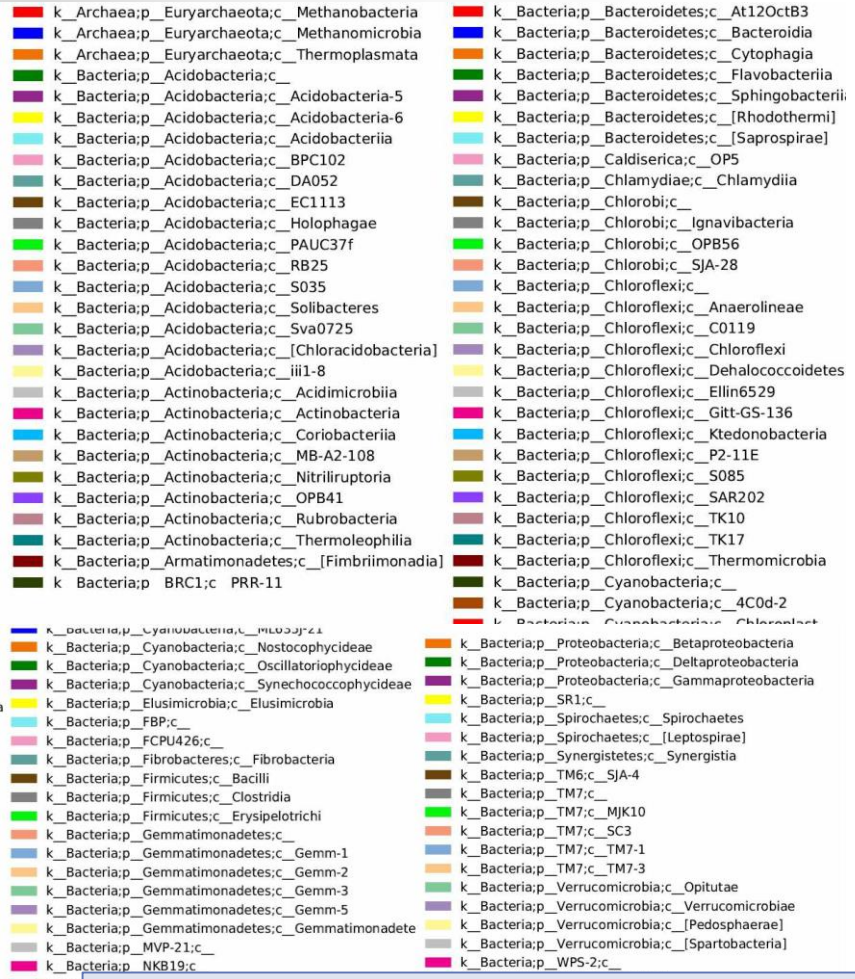


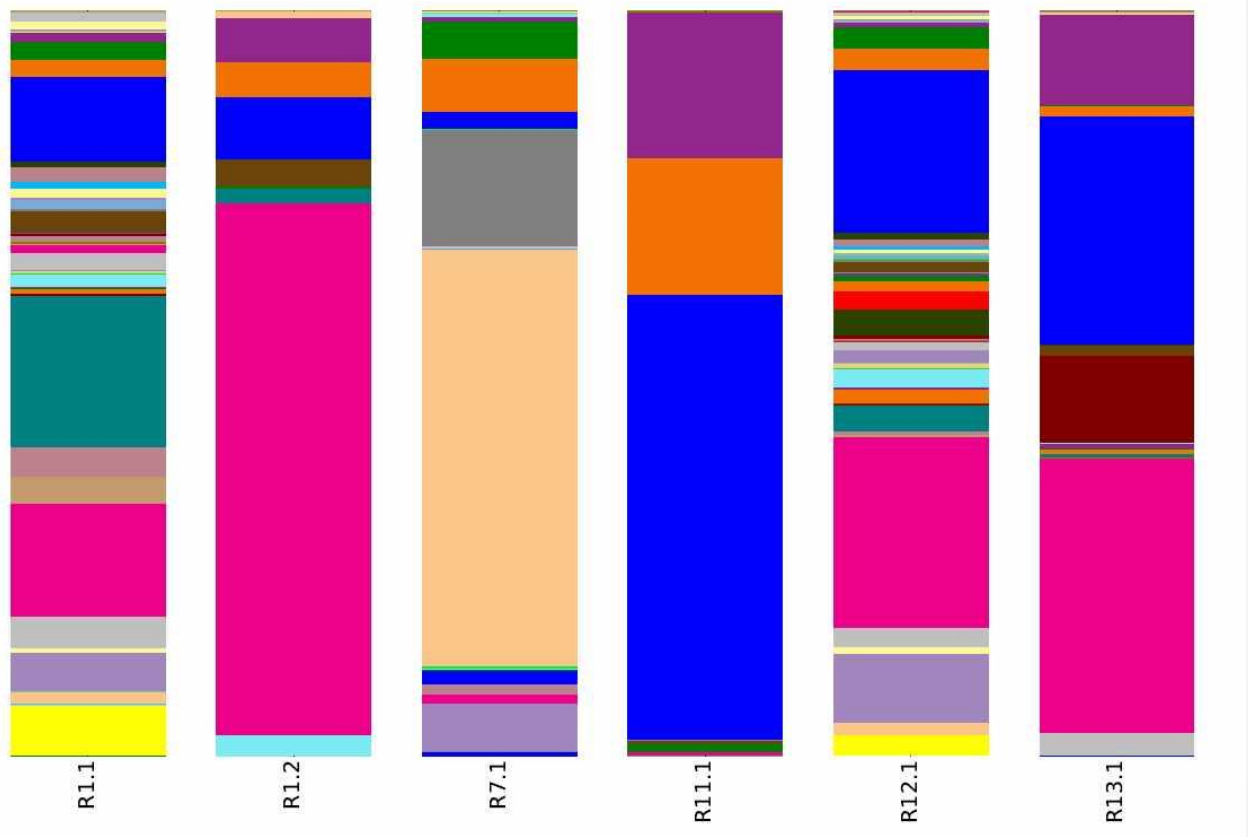
№ зразка	Характеристика точки відбору	Візуальна оцінка механічного складу зразка
2	Приміщення під шахтою зруйнованого реактора, з місця скупчення лавоподібних паливовмісних матеріалів (ПВМ)	Пісок, цементна крихта
4	Проммайданчик поблизу входу до Укриття. Контрольний зразок	Пісок, глина, протогрунт
5	Приміщення під шахтою зруйнованого реактора, в кутку	Пісок, цементна крихта
7	Внутрішній вихід шахти Ю-9-В	Цементна крихта, слиз
8	Приміщення під шахтою зруйнованого реактора, в кутку, зразок зі стелі	Цементна крихта, вологий зразок
11	Шахта КЗ-9-К системи моніторингу реактора Фініш	Вологий зразок: іржа, слиз, пісок
12	З-під стіни саркофагу, відібрано з боку проммайданчика Укриття	Пісок, глина, протогрунт
13	Дренажна труба, що виходить з приміщень Укриття	Мул, пісок

Біорізноманіття мікрофлори всередині 4-го блоку ЧАЕС
Питома активність радіонуклідів у зразках

№ зраз-ка	Середня розрахунко-ва потужність дози, Гр/год	Максималь-на розрахунко-ва потужність дози, Гр/год	Питома активність радіонукліда, Бк/г		
			^{137}Cs	^{241}Am	^{226}Ra
2	0,37	1,38	$1,9\times10^{3}\pm2,8\times10^{2}$	$1,1\times10^{5}\pm1,2\times10^{3}$	-
4	0,007	0,008	$2,3\times10^{3}\pm89,4$	-	-
5	0,02	0,05	$5,1\times10^{4}\pm7,9\times10^{3}$	$2.7\times10^{3}\pm2,5\times10^{2}$	-
7	0,03	0,06	$7,4\times10^{4}\pm1,2\times10^{3}$	$3,9\times10^{3}\pm3,6\times10^{2}$	-
8	0,09	0,12	$5,1\times10^{4}\pm9,8\times10^{2}$	-	$1,1\times10^{4}\pm3,1\times10^{3}$
11	0,11	0,12	$3,3\times10^{5}\pm2,8\times10^{3}$	-	-
12	0,02	0,03	$1,6\times10^{4}\pm46,4$	-	$2,7\times10^{3}\pm2,8\times10^{2}$
13	0,02	0,02	$1,1\times10^{3}\pm33,1$	-	$2,5\times10^{3}\pm24,6$

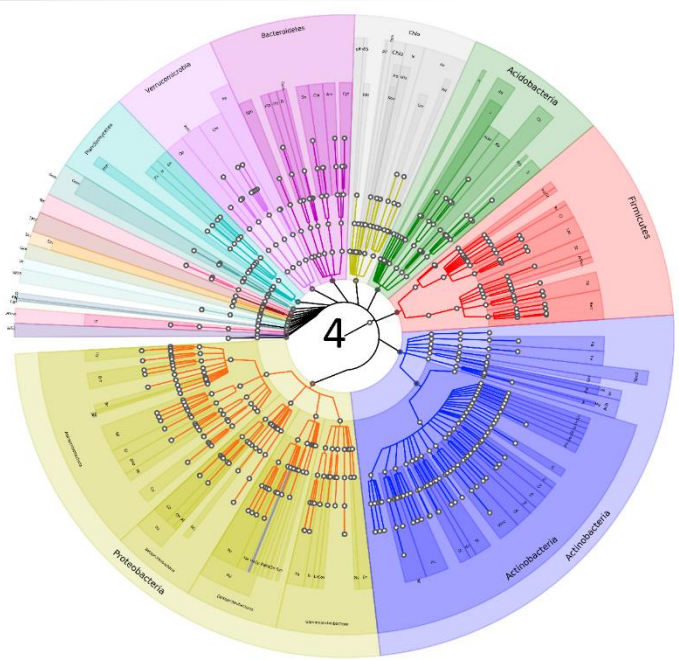
Біорізноманіття мікрофлори всередині 4-го блоку ЧАЕС
Загальне біорізноманіття мікрофлори

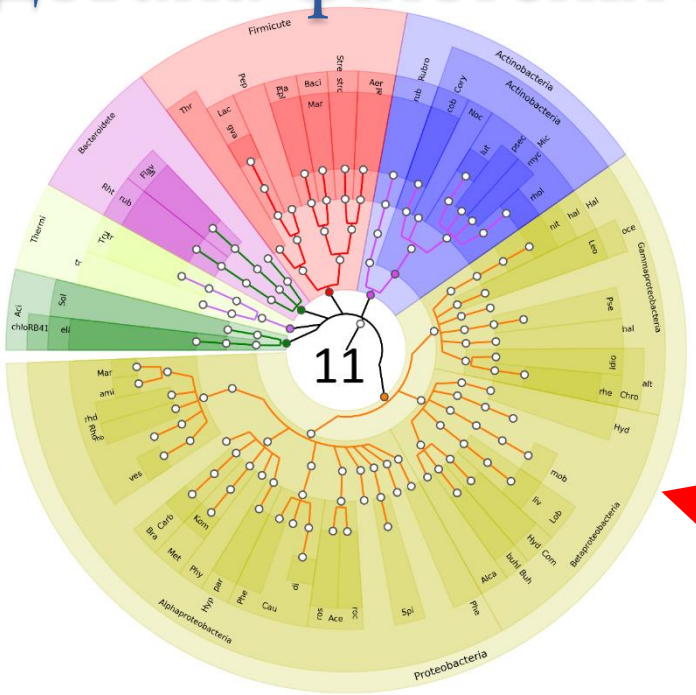


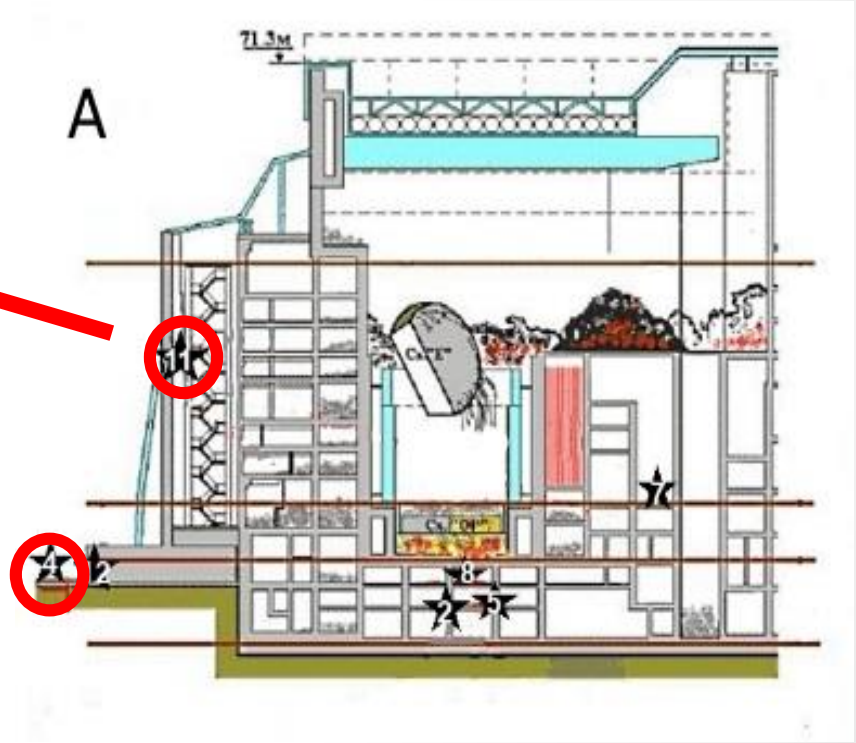


- Найбільш різноманітним, а, отже, і стабільним, виявився мікробіом зразку 4, що був умовно прийнятий за контроль. В той же час значення індексів біорізноманіття для зразка 11, потужність дози на місці відбору якого була найвищою, свідчать про формування мікробіому з виразно вираженими домінантами. Такий склад може свідчити як про екстремальність умов його формування і функціонування угруповання, так і про ускладнений доступ до поживних для мікроорганізмів речовин

Біорізноманіття мікрофлори всередині 4-го блоку ЧАЕС
Побудована філогенія зразків: 4 зразок, 11 зразок







- Згідно з отриманими результатами, можна стверджувати про наявність мікроорганізмів та формування протоекосистем в зразках 4, 5, 7, 11, 12 та 13. Виділити ДНК зі зразків 2 та 8 не вдалося, що може бути як наслідком формування високих доз опромінення і загибелі мікроорганізмів, так і бути пов’язане з недосконалістю процесу виділення нуклеїнових кислот зі зразків подібного типу.

Дякую за увагу!