

РУБАН Ю. В.¹✉, ШАВАНОВА К. Є.¹, ІЛЛЕНКО В. В.¹, КОРЕПАНОВА К. Д.^{1,2}, САМОФАЛОВА Д. О.^{1,3}, НІКОНОВ С. Б.^{1,4}, ШПИРКА Н. Ф.¹, НЕСТЕРОВА Н. Г.¹, ПАРЕНЮК О. Ю.¹

¹ Національний університет біоресурсів і природокористування України, Україна, 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, e-mail: yuliyaruban24@gmail.com

² ДСП «ЕКОЦЕНТР»,

Україна, 07270, Київська обл., Іванківський район, м. Чорнобиль, вул. Шкільна, 6

³ Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А

⁴ GeeksForLess,

Україна, 54031, м. Миколаїв, вул. Космонавтів, 130В

✉ yuliyaruban24@gmail.com, (095) 668-57-51

PLFA АНАЛІЗ СТРУКТУРИ МІКРОБНОЇ СПІЛЬНОЇ НА ПУНКТАХ ТИМЧАСОВОЇ ЛОКАЛІЗАЦІЇ РАДІОАКТИВНИХ ВІДХОДІВ ЗОНИ ВІДЧУЖЕННЯ ЧАЕС

Мета. ПТЛРВ – території, прилеглі до Чорнобильської АЕС, на яких у ході першочергових заходів із ліквідації створювалися траншеї та бурти для локалізації РАВ. Метою представленої роботи було охарактеризувати структуру мікробної спільноти на ПТЛРВ. **Методи.** Для повного опису впливу факторів навколишнього середовища на склад ґрунтової мікрофлори проводилася оцінка агрохімічних показників ґрунту (кислотності, гумусу, азоту, рухомого калію та фосфору). Дозове навантаження обраховували за допомогою пакета програм ERICA tool. Сукупну фракцію ліпідів екстрагували модифікованим методом Блайя-Дайера. **Результати.** рН ґрунту коливався в межах від 3,0 до 3,9. Вміст гумусу коливався в межах від 0,95 % до 2,11 %. Винятком став ґрунт на території Рудого лісу з траншеї/поза траншею, де вміст гумусу складав 2,52 і 1,98 % та з рН 4,5. Вміст азоту коливався від 33,6 мг/кг до 74,2 мг/кг. Вміст ПЛФА коливався від 15 мкг/г до 18,9 мкг/г, винятком стали Новошепеличі та Залісся (33,3 мкг/г та 23 мкг/г). **Висновки.** За структурним складом мікроорганізмів точки ПТЛРВ виявилися найодноріднішими порівняно із забрудненими радіонуклідами екосистемами. В природних екосистемах основною домінуючою групою виступили грампозитивні бактерії (на відміну від ПТЛРВ, таких груп було декілька).

Ключові слова: ПТЛРВ, структура мікробної спільноти, PLFA, біомаркери, ERICA tool.

Під час здійснення першочергових заходів із ліквідації аварії на Чорнобильській атомній

електростанції (ЧАЕС) протягом 1986–1987 років на території зони відчуження були створені об'єкти для захоронення та локалізації великих обсягів аварійних радіоактивних відходів (РАВ).

Пункти тимчасової локалізації радіоактивних відходів (ПТЛРВ) – території, прилеглі до ЧАЕС, загальною площею приблизно 10 гектарів, на яких у ході першочергових заходів із ліквідації Чорнобильської аварії створювалися траншеї та бурти для локалізації РАВ. Здебільшого такі РАВ представляли собою забруднені внаслідок аварійного викиду будівельні конструкції, побутові речі, верхній шар ґрунту тощо. На території зони відчуження розміщено дев'ять ПТЛРВ: «Станція Янів», «Нафтобаза», «Піщане плато», «Рудий ліс», «Стара Будбаза», «Нова Будбаза», «Прип'ять», «Копачі», «Чистогалівка». Оціночна кількість траншей і буртів ПТЛРВ від 800 до 1000 шт., точні місця розташування частини з них потребують уточнення.

Щорічно проводяться широкомасштабні роботи з обстеження, збору та систематизації даних, оцінки безпеки та ранжування ПТЛРВ однак питання моніторингу та вивчення структурного складу мікроорганізмів досі залишається відкритим.

На сьогодні широко розглядається можливість використання методів молекулярної біології та біомаркерів для більш детального вивчення мікробних угруповань. Аналіз фосфоліпідних жирних кислот (PLFA) ґрунтується на варіабельності жирних кислот, наявних у клітинних мембранах різних мікроорганізмів. На сьогодні представлений аналіз використовується

ся в якості альтернативи секвенуванню для оцінки кількісного і якісного складу мікробної біомаси і структури мікробіому.

Головною ідеєю та метою представленої роботи було охарактеризувати структуру мікробної спільноти на ПТЛРВ.

Матеріали і методи

Характеристика точок відбору зразків

Для оцінки компонентного складу використовували ґрунти ближніх територій зони відчуження ЧАЕС та ПТЛРВ: Рудий ліс, ПТЛРВ Копачі, ПТЛРВ Чистоголівка. Відбори проб ґрунту здійснювалися у серпні 2017 р.

Для забезпечення точності відбору зразків проводилася координатна прив'язка точок відбору зразків за допомогою супутникових GPS систем та прийомника GarminTrexH в системі WGS84 (World). Абсолютна похибка визначення координат складала менше 6 м.

Визначення основних агрохімічних характеристик ґрунту

Для повного опису впливу факторів навколишнього середовища на кількісний склад ґрунтової мікрофлори проводилася оцінка основних агрохімічних показників ґрунту. Гумус визначали за методом Тюріна [1].

Кислотність (рН) сольового екстракту визначали потенціометрично із застосуванням скляного електрода. Співвідношення ґрунт:розчин = 1:2,5 для мінеральних ґрунтів і 1:25 для органічних (ГОСТ 26483-85).

Визначення рухомого калію та фосфору проводили за методом Кірсанова. Калій із ґрунту екстрагували 0,2 М розчином HCl (рН < 1) у співвідношенні ґрунт:розчин = 1:5. Вміст калію визначали за допомогою полум'яного фотометра (ГОСТ 26207-91), а кількісне визначення P₂O₅ проводили колориметрично за методом Денігера (Кашпаров et al. 1999).

Легкогідралізований азот визначали за Корнфілдом. Ґрунт інкубували з 1 Н розчином NaOH в термостаті за 28°C в чашці Конвея з прошліфованою кришкою протягом двох діб. Аміак, утворений шляхом гідролізу, потрапляв у внутрішнє відділення чашки та поглинався розчином H₃BO₃. Після закінчення гідролізу аміак кількісно визначали титруванням 0,1 Н розчином H₂SO₄ [2].

Розрахунок дозових навантажень на мікробіомі ґрунтів

Поглинуті дози для мікроорганізмів були обраховані за допомогою пакета програм

ERICA dose assessment tool із фактором невідзначеності, що дорівнював 3 %. Всі обрахунки були зроблені на основі даних щодо питомої активності радіонуклідів у ґрунті. Питома активність ¹³⁷Cs була отримана експериментально, дані щодо активності ⁹⁰Sr – одержано із бази даних УкрНДІ сільськогосподарської радіології НУБІП України [2, 3].

Виділення фосфоліпідів

Виділення фосфоліпідів для характеристики мікробного угруповання вперше були описані [4]. Сукупну фракцію ліпідів екстрагували модифікованим методом Блайя-Дайера. До нав'язки ґрунту додавали розчин MeOH, хлороформу та цитрату / КОН (рН 4, об / об / об = 1:2:0,8) [5]. Очищення фосфоліпідів від сукупної фракції проводилося методом твердофазової колонкової хроматографії у середовищі активованого силікагелю. Фракція фосфоліпідів елютувалася розчином MeOH. Дериватизація для отримання метилових ефірів жирних кислот (FAME) проводилася гідролізацією NaOH в MeOH протягом 10 хв за 100°C і подальшим метилюванням BF₃ в MeOH (~ 1,25 М) за 80°C протягом 15 хв. Отримані зразки та суміш стандартів переносилися у флакони для газової хроматографії та вимірювалися системою GC-MS (GC5890 з MS 5971A, Agilent, Waldbronn, Німеччина).

Результати та обговорення

Основні агрохімічні характеристики точок відбору зразків

Точки відбору проб були обрані за допомогою бази даних УкрНДІ сільськогосподарської радіології НУБІП України [2], що дало змогу виділити максимально подібні за ґрунтовими умовами біогеоценози.

рН сольової витяжки ґрунту у семи з восьми досліджених точок коливався в межах від 3,0 до 3,9. Така кисла реакція є типовою для дерново-підзолистих ґрунтів поліської зони України. Виняток склала точка Рудий ліс – траншея, де рН водної витяжки ґрунту склав 4,5 що відповідає групі кислих ґрунтів.

Вміст гумусу коливався в межах від 0,95 % до 2,11 %. Винятком можна вважати ґрунт на території Рудого лісу з траншеї/поза траншеєю, де вміст гумусу був відносно високим і складав 2,52 і 1,98 %.

Що стосується забезпеченості основними елементами живлення, то варто відзначити, що вміст азоту коливається від 33,6 мг/кг ґрунту у

с. Залісся до 74,2 мг/кг ґрунту на території траншеї у Рудому лісі, а це добре узгоджується із даними щодо вмісту гумусу. Хоча кількісні показники вмісту азоту відрізняються в 2,5 рази, однак всі вони відносяться до групи дуже низької забезпеченості.

Таким чином, ґрунти точок дослідження виявилися достатньо однорідними за основними агрохімічними показниками. Показники загалом знаходилися в межах для типових показників дерново-підзолистих слабо- і середньоопідзолених суглинків, які широко розповсюджені в Поліссі України.

Дозиметрія дослідної ділянки

Проаналізувавши показники радіонуклідного забруднення території, ми з'ясували, що найбільший вміст ^{137}Cs характерний для території, що не була піддана деконтамінації, біля с. Новошепеличі і складає 11900 ± 1226 Бк/кг або $3,09 \times 10^9 \pm 3,18 \times 10^8$ кБк/км.

Такий вміст радіонукліда сформував дозу із потужністю у 3,83 $\mu\text{Гр/год}$ для мікроорганізмів, що населяють ґрунт. У водночас найменш забрудненим є ґрунт, відібраний біля с. Залісся, де питома активність ґрунту становить 133 ± 17 Бк/кг, що формує поверхневу активність

$4,00 \times 10^7 \pm 5,19 \times 10^6$ кБк/км. Потужність дози, зумовлена цезієм, тут склала 0,04 $\mu\text{Гр/год}$.

Мікробіологічний склад

Вміст PLFA у п'яти зразках ґрунту (рис. 1) коливався від 15 мкг/г до 18,9 мкг/г, винятком стали точки, відібрані з території біля с. Новошепеличі та с. Залісся (33,3 мкг/г та 23 мкг/г).

Після аналізу даних щодо співвідношення груп мікроорганізмів (рис. 2) було помічено підвищення вмісту грампозитивних та грамнегативних бактерій, актиноміцетів та грибів відповідно зі зростанням активності в зразках ґрунту із забруднених радіонуклідами територій. У зразках, відібраних із ПТЛРВ Рудий ліс, Копачі та Чистоголівка було помічено підвищення доли актиноміцетів, грибів та індикатору стресу грамнегативних бактерій. У зразках із ПТЛРВ, у порівнянні з іншими групами мікроорганізмів, грампозитивні бактерії не проявляли відповідь на рівень питомої активності радіонуклідного забруднення. У ході порівняння точок ПТЛРВ та забруднених екосистем було виявлено відносно низький рівень грибів, актиноміцетів, але підвищений рівень грамнегативних бактерій. Найвищу групову варіативність мали грамнегативні бактерії.

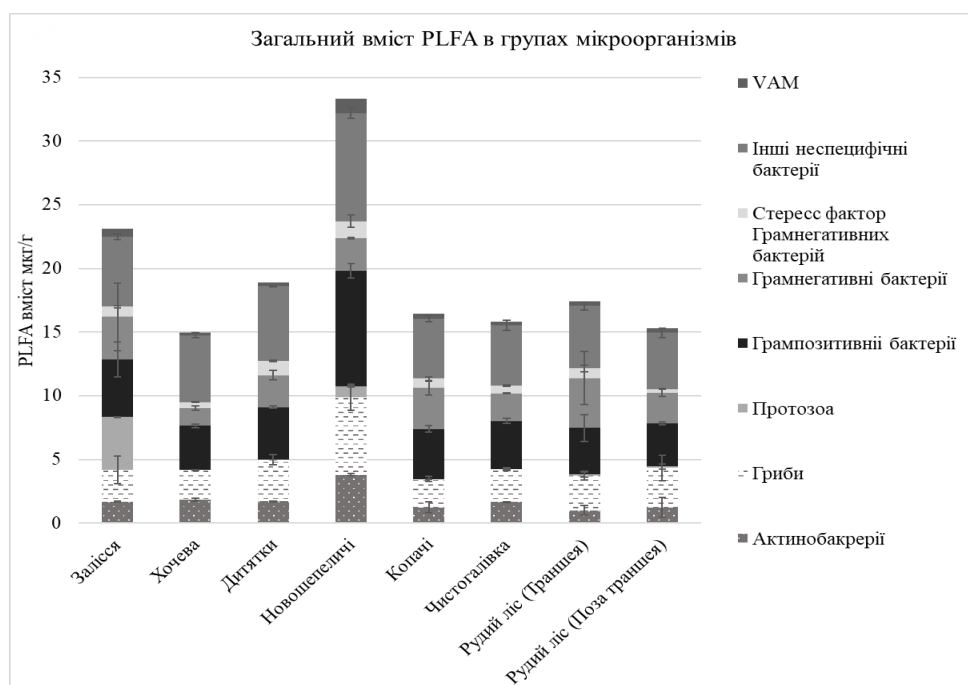


Рис. 1. Вміст PLFA в зразках ґрунту 1 – незабруднена точка, 2–3 – забруднені екосистеми, 4–7 – ПТЛРВ.

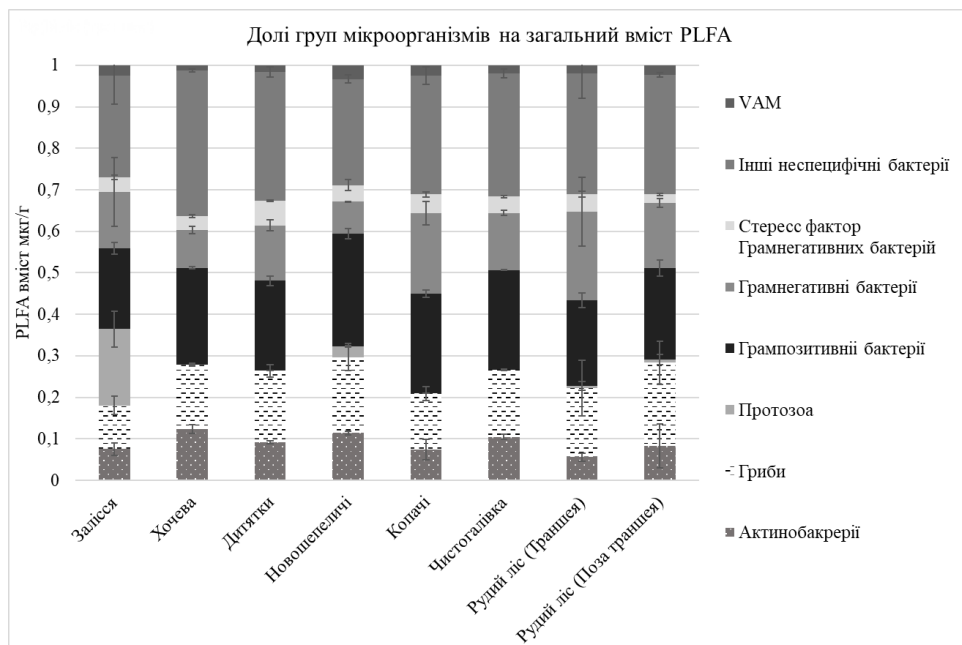


Рис. 2. Співвідношення груп мікроорганізмів у зразках ґрунту: 1 – незабруднена точка, 2–3 – забруднені екосистеми, 4–7 – ПТЛРВ.

Висновки

Незважаючи на відносну однорідність ґрунтів, їх мікробний склад значно відрізняється один від одного. За структурним складом мікроорганізмів точки ПТЛРВ виявилися неоднорі-

дними порівняно із забрудненими радіонуклідами екосистемами. В природних екосистемах основною домінуючою групою виступили грампозитивні бактерії (на відміну від ПТЛРВ, де таких груп було декілька).

References

1. Metody obshchey bakteriyolohyy: za red. F. Herkhard. Moskva: Myr, 1983. 536 s. [in Russian] / Методы общей бактериологии: за ред. Ф. Герхард. М.: Мир, 1983. 536 с.
2. Kashparov V.A., Lundin S.M., Khomutinin Yu.V., ta in. Radioaktivnoe zagriaznenie 30-km zony ChACS / 1999. [in Russian] / Кашпаров В.А., Лундин С.М., Хомутинин Ю.В., та ін. Радиоактивное загрязнение 30-км зоны ЧАЭС / 1999.
3. Brown J.E., Alfonso B., Avila R. et al. Short communication A new version of the ERICA tool to facilitate impact assessments of radioactivity on wild plants and animals. *Journal of Environmental Radioactivity*. 2016. Vol. 153. P. 141–148. doi: 10.1016/j.jenvrad.2015.12.011.
4. Frostegård Å., Tunlid A., Bååth E. Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content. *Journal of Microbiological Methods*. 1991. Vol. 14, No. 3. C. 151–163. doi: 10.1016/0167-7012(91)90018-L.
5. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*. 1959. Vol. 37, No. 8. C. 911–917. doi: 10.1139/o59-099.

RUBAN Yu.V.¹, SHAVANOVA K.E.¹, ILLENKO V.V.¹, KOREPANOVA K.D.^{1,2}, SAMOFALOVA D.O.^{1,3}, NIKONOV S.B.^{1,4}, SPYRKA N.F.¹, NESTEROVA N.G.¹, PARENYUK O.Yu.¹

¹ National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Ukraine, 03041, Kyiv, Heroiv Oborony str., 15, e-mail: yuliyaruban24@gmail.com

² DSP "Ekotsentr", Ukraine, 07270, Kyiv region, Ivankiv district, Chernobyl, Skilna str., 6

³ Institute of Food Biotechnology and Genomics, NAS of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osyipovskoho str., 2A

⁴ GeeksForLess, Ukraine, 54031, Mykolaiv, Kosmonavtov str., 130B

PLFA ANALYSIS OF THE MICROBIAL COMMUNITY STRUCTURE AT THE POINTS OF THE TEMPORARY LOCALIZATION OF RADIOACTIVE WASTE

Aim. PTLRW are the trenches and bursts for the localization of radioactive waste that were created during the first priority measures for elimination of the Chernobyl accident. The aim of the presented work was to characterize the microbial community structure on PTLRW. **Methods.** To describe the influence of environmental factors on the soil micro-

flora, the agrochemical parameters of soil (pH, carbon, nitrogen, mobile potassium and phosphorus) were evaluated. Dose loading was calculated using the ERICA tool software package. The total lipid fraction was extracted with a modified Bligh-Dyer method. **Results.** The pH of the soil ranged from 3.0 to 3.9. The carbon content ranged from 0.95% to 2.11%. The exception was Red Forest from the trench/outside the trench where the carbon content was 2.52 and 1.98% and with a pH 4.5. Nitrogen content ranged from 33.6 mg / kg to 74.2 mg / kg. The PLFA content ranged from 15 µg / g to 18.9 µg / g, except Novoshepelychi and Zalissia (33.3 µg / g and 23 µg / g). **Conclusions.** In terms of the structural composition of the microorganisms, the PTLRW points were more homogeneous compared to the contaminated radionuclide ecosystems. In natural ecosystems, gram-positive bacteria were the main dominant group, unlike PTLRW where there were several groups.

Keywords: PTLRW, microbial community structure, PLFA, biomarkers, ERICA tool.