Національний університет біоресурсів і природокористування України
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Паренюк Олена Юріївна

УДК 579.26:504.5:628.4.047:546.36

ДИСЕРТАЦІЯ

Комплексна оцінка мікробіомів забруднених радіонуклідами ґрунтів і субстратів антропогенних систем

03.00.01 – радіобіологія
091 – біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ О.Ю. Паренюк

Науковий консультант **Гудков Ігор Миколайович,** доктор біологічних наук, професор, академік НААН України

Київ – 2026

АНОТАЦІЯ

Паренюк О.Ю. Комплексна оцінка мікробіомів забруднених радіонуклідами ґрунтів і субстратів антропогенних систем. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.01 «Радіобіологія». – Національний університет біоресурсів та природокористування України, МОН України, Київ, 2026.

Дисертаційна робота присвячена комплексному дослідженню впливу радіонуклідного забруднення та сформованих ним дозових навантажень на видове багатство, таксономічну структуру та функціональні характеристики мікробних угруповань ґрунтів і субстратів антропогенного походження.

За результатами морфолого-генетичних, фізико-хімічних та агрохімічних досліджень установлено, що ґрунти Чорнобильської зони відчуження (ЧЗВ), відібрані в місцях досліджень, є відносно однорідними за основними агрохімічними показниками та відповідають типовим для Українського Полісся дерново-підзолистим супіщаним і легкосуглинковим ґрунтам. Забезпеченість цих ґрунтів гумусом, легкогідролізованим азотом і обмінним калієм переважно була низькою або дуже низькою; вміст рухомого фосфору варіював від низького до середнього. Натомість субстрати, відібрані всередині об’єкта «Укриття» ЧАЕС, сформовані шарами розплавленого піску, пилу та техногенного матеріалу і ще не набули генетичних ознак ґрунту. Ґрунти зон, які важко повернути у господарювання навколо АЕС Фукусіма (ЗВП ФАЕС), виявилися більш забезпеченими азотом і більш вирівняними за вмістом рухомих сполук фосфору та калію, що відповідає властивостям бурих лісових ґрунтів гірських регіонів Японії.

Встановлено тенденцію до кореляції між концентрацією тотальної ДНК і вмістом легкогідролізованих сполук азоту (R^2 = 0,48), а також тісніший

зв’язок між вмістом загального гумусу та концентрацією тотальної ДНК у дерново-підзолистих ґрунтах ($R^2 = 0,75$), що свідчить про суттєвий внесок поживного режиму ґрунту у формування мікробної біомаси.

За допомогою програмних пакетів Biota DC та ERICA Tool розраховано індивідуальні потужності доз для бактеріальних клітин у точках відбору проб. Показано, що у зразках з об’єкта «Укриття» ЧАЕС потужність поглинутої дози становила від 1 до 135 мГр/год, у ґрунтах ЧЗВ - від 0,1 до 10 мкГр/год, а для мікробіомів ЗВП ФАЕС була характерна виражена сезонна динаміка – від 6-168 мкГр/год улітку до 12-402 мкГр/год узимку.

Із досліджуваних зразків виділено сукупну бактеріальну ДНК, підібрано праймери для ампліфікації 16S рРНК та оптимізовано підходи до підготовки зразків для секвенування. Концентрації ДНК у виділених пробах варіювали в широких межах, однак залишалися придатними для подальшої ампліфікації та секвенування. Для повногеномного аналізу відібрано зразки із зони лімітованого доступу ОУ ЧАЕС (R7) і контрольної точки із зони вільного доступу (R12).

Секвенування 16S рРНК-ампліконів показало, що найбільший обсяг первинних файлів було отримано для зразків із ЗВП ФАЕС, дещо менший – для ґрунтів ЧЗВ, а найменший – для субстратів ОУ ЧАЕС. Це свідчить як про відмінності у структурі мікробіомів, так і про обмеження, пов’язані з типом досліджуваного субстрату.

Для аналізу таксономічного складу та оцінки впливу метаданих, зокрема радіонуклідного забруднення і дозового навантаження, адаптовано біоінформатичні протоколи з використанням програмного забезпечення QIIME, PICRUSt та HUMAnN. Показано, що мікробіоми субстратів ОУ ЧАЕС суттєво відрізняються за показниками альфа-різноманіття: найвищу різноманітність виявлено у контрольному зразку із зони вільного доступу, тоді як у зразках із зони лімітованого доступу спостерігалося формування

спільнот із вираженими домінантами, що може свідчити про екстремальність умов існування та обмежену доступність поживних речовин. Встановлено наявність мікроорганізмів і формування протоекосистем у приміщеннях ОУ ЧАЕС з різними режимами доступу. Водночас виділити ДНК із частини зразків зони суворого режиму не вдалося, що може бути пов'язано як із високими дозовими навантаженнями, так і з особливостями матриці зразків.

Уперше в Україні проведено повногеномне секвенування зразків із ОУ ЧАЕС. Повногеномний аналіз зразків R7 і R12 дозволив виявити значно вищий таксономічний потенціал мікробіомів порівняно з аналізом 16S рРНК, зокрема ідентифікувати нові, раніше не описані таксономічні групи на рівні родин. Показано, що за результатами повногеномного аналізу мікробіоми характеризуються вищими показниками альфа-різноманіття, а їхній функціональний профіль визначається переважанням білків транспортної функції.

У результаті аналізу метагеномів ґрунтів ЧЗВ ідентифіковано понад 4300 видів мікроорганізмів, а в ґрунтах ЗВП ФАЕС – понад 7000. Для ґрунтів ЧЗВ показано варіювання індексів різноманіття і домінування, а також зв'язок структури мікробіомів із вмістом амонійної форми азоту та ^{137}Cs. У ґрунтах ЗВП ФАЕС встановлено виражену сезонну динаміку таксономічного складу та його зв'язок із рівнями радіонуклідного забруднення. На відміну від ЧЗВ, де серед домінант переважали *Actinobacteria* та *Alphaproteobacteria*, у ґрунтах ЗВП ФАЕС домінували *Clostridia* та *Actinobacteria*, що відображає відмінності природних умов, трофічного режиму та характеру антропогенного впливу.

Наукова новизна одержаних результатів полягає в узагальненні теоретичних і практичних положень щодо структури мікробіомів забруднених радіонуклідами субстратів та в розробленні концепції впливу радіонуклідного забруднення на мікробні угруповання.

Уперше:

- визначено фундаментальні характеристики біорізноманіття мікроорганізмів у ґрунтах і субстратах, забруднених радіонуклідами, на територіях України та Японії;
- запропоновано наукову концепцію впливу малих доз іонізуючого випромінювання на структуру мікробіомів аварійно забруднених територій;
- розроблено підходи до оцінки стабільності мікробних угруповань усередині ОУ ЧАЕС та в ґрунтах зон відчуження;
- одержано нові дані щодо впливу об'єктів ядерної енергетики на редукуючу ланку екосистем;
- оцінено ризик виникнення біокорозії на об'єктах ядерно-паливного циклу.

Удосконалено:

- біоінформатичні підходи до аналізу мікробіомів забруднених радіонуклідами субстратів;
- теоретичні та методологічні засади статистичної обробки результатів мікробіомних досліджень з урахуванням метаданих.

Набули подальшого розвитку:

- підходи до побудови моделей комплексної оцінки дозових навантажень на індивідуальних представників мікробіому;
- концептуальні уявлення про відповідь редукуючої ланки екосистеми на радіонуклідне забруднення.

Практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що отримані дані достовірно відображають стан бактеріального біорізноманіття субстратів, відібраних у різних ізодозових умовах поблизу об'єктів ядерно-паливного циклу в Україні та Японії. Результати впроваджено у науково-дослідну діяльність трьох установ (акти впровадження): ТОВ "ГД "БТУ-ЦЕНТР" – оцінка ґрунтових мікробіомів для біологізації землеробства; ТОВ

"Західний Буг" – управління ґрунтовими ресурсами; Інститут проблем безпеки АЕС НАН України – науковий супровід НДР щодо об'єкта "Укриття" ЧАЕС.

Окремі положення дисертації використовуються для підготовки фахівців на факультеті захисту рослин, біотехнологій та екології в межах спеціалізації «Радіоекологія».

Ключові слова: ґрунтова мікрофлора, метагеномний аналіз, мікробіомний аналіз, забруднені радіонуклідами ґрунти, Чорнобиль, Фукусіма.

Список публікацій здобувача

1. [25] Паренюк, О. Ю., Іллєнко, В. В., Гудков, І. М. Мікрофлора забруднених радіонуклідами ґрунтів. Монографія. Київ: НУБіП України, 2018. 210 с.

2. [29] Паренюк, О. Ю., Мошинець, О. В., Титова, Л. В., та ін. Qualitative composition of dominating forms of microorganisms isolated from radionuclide contaminated soil and their ability to accumulate ^{137}Cs. *Мікробіологічний журнал*. 2013. Vol. 75, No. 1. P. 33–40.

3. [382] Boretska, M., Datsenko, I., Suslova, O. Pareniuk, O., Moshynets, O., et. al. Amino Acid Composition of Tightly Bound Exopolymeric Substances Produced by Corrosion-Related Bacteria in Presence of Mild Steel. *Advances in Microbiology*. 2014. Vol. 04, No. 12. P. 808–815.

4. [27] Паренюк, Е. Ю., Шаванова, Е. Е., Ильенко, В. В., и др. Влияние почвенной микрофлоры на переход ^{137}Cs в растения. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2015. Т. 55, No. 1.

5. [263] Pareniuk, O., Shavanova, K., Laceby, J. P., et. al. Modification of ^{137}Cs transfer to rape (*Brassica napus* L.) phytomass under the influence of soil

microorganisms. *Journal of Environmental Radioactivity*. 2015. Vol. 149. P. 73–80.

6. [286] Ruban, Y., Illienko, V., Nesterova, N., et. al. Estimation of the effect of radionuclide contamination on Vicia sativa L. induction of chlorophyll fluorescence parameters using “floratest” optical biosensor. *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE*. 2017.

7. [265] Паренюк О.Ю., Шаванова, К. Є., Іллєнко, В. В., et. al. Різноманіття мікрофлори у зруйнованому четвертому енергоблоці ЧАЕС. *Ядерна фізика і енергетика*. 2017. Т. 18, N. 2. С. 179–187.

8. [185] Konoplev, A., Golosov, V., Wakiyama, Y., et. al. Natural attenuation of Fukushima-derived radiocesium in soils due to its vertical and lateral migration. *Journal of Environmental Radioactivity*. 2017. Vol. 186, P.23-33.

9. [163] Illienko, V., Nesterova, N., Pareniuk, O., et. al. Estimation of the effect of radionuclide contamination on Vicia sativa L. induction of chlorophyll fluorescence parameters using “Floratest” optical biosensor: Biophotonics—Riga 2017, SPIE, 07. December.17. P. 20.

10. [287] Ruban, Y., Shpyrka, N., Pareniuk, O., et. al. BLV leucosis biosensor based on ZnO nanorods photoluminescence: 2017 IEEE 37th International Conference on Electronics and Nanotechnology, ELNANO 2017 - Proceedings, 17.

11. [26] Паренюк, О. Ю., Сімутін, І. О., Самофалова, Д. О. Визначення основних метрик різноманіття мікробіомів забруднених радіонуклідами ґрунтів. *Біоресурси і природокористування*. 2018. Т. 10, No. 5–6.

12. [24] Паренюк, Е. Ю., Шаванова, Е. Е., Ильенко, В. В., и др. Состояние микробиома в помещениях четвертого энергоблока

Чернобыльской АЭС. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2018. Т. 58, No. 2. С. 195–204.

13. [247] Nesterova, N., Pareniuk, O., Illienko, V., et. al. Physiological Reactions in Cereals Family Avena Sativa L. and Avena Nuda L., Caused by Lowerature Stress Factors: 2019 IEEE 39th International Conference on Electronics and Nanotechnology, ELNANO 2019 - Proceedings, 19.

14. [77] Boretska, M., Shavanova, K. E., Ruban, Y., et. al. Impact of γ-irradiation on biofilm-formation by corrosion-relevant heterotrophic bacteria. *Наукові доповіді НУБіП України*. 2020. Т. 5, No. 5 (87).

15. [38] Рубан, Ю. В., Нестерова, Н. Г., Шаванова, К. Є., та ін. Вплив рельєфу на формування дозового навантаження на рослини внаслідок радіонуклідного забруднення, після аварії на АЕС «Фукусіма-1». *Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки*. 2020. Т. 2, No. 390.

16. [39] Рубан, Ю. В., Шаванова, К. Є., Іллєнко, В. В., та ін. PLFA аналіз структури мікробної спільноти на пунктах тимчасової локалізації радіоактивних відходів зони відчуження ЧАЕС. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2020. Т. 26. С. 149–153.

17. [17] Корепанова, К. Д., Шаванова, К. Є., Іллєнко, В. В., та ін. Розрахунок дозових навантажень на мікрофлору ґрунту, сформованих на пунктах зберігання радіоактивних відходів на території зони відчуження ЧАЕС. *Екологічні науки*. 2020. Т. 32. С. 164–168.

18. [13] Іллєнко, В. В., Шаванова, К. Є., Рубан, Ю. В., та ін. Надходження ^{137}Cs у рослини зернових культур за впливу комплексних бактеріальних препаратів. *Вісник ХНУ імені В. Н. Каразіна серія «Екологія»*. 2020. Т. 23. С. 139–149.

19. [40] Рубан, Ю. В., Шаванова, К. Є., Самофалова, Д. О., та ін. Порівняння мікробіомів двох різних екотипів Чорнобильської зони

відчуження: пунктів тимчасової локалізації радіоактивних відходів (ПТЛРВ) та забруднених екосистем. *Вісник проблем біології та медицини*. 2020. Т. 157, No. 3. С. 83–88.

20. [264] Pareniuk O., Yasuda N. Chornobyl exclusion zone: current status and challenges. *Annals of the ICRP.* 2021. 50(1_suppl). P. 201-208.

21. [335]Turbat, B., Yoshida, K., El-Hameed, A. A., Ruban, Y., Pareniuk, O., Rashed Nizam, Q. M., Yasuda, N. Verification of historical radiation monitoring data at residential areas for nuclear emergency occurred in a neighboring country. *Journal of Nuclear Science and Technology*. 2022. *59*(2), P. 188–197.

ANNOTATION

Pareniuk O.Y. Comprehensive assessment of microbiomes of radionuclide-contaminated soils and substrates of anthropogenic systems. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

The thesis for Doctor in Biology scientific degree on a specialty 03.00.01 "Radiobiology" – National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2026.

The dissertation is devoted to a comprehensive study of the impact of radionuclide contamination and associated dose loads on the species richness, taxonomic structure, and functional characteristics of microbial communities inhabiting contaminated soils and anthropogenic substrates.

Morphological, genetic, physicochemical, and agrochemical analyses showed that the soils sampled within the Chornobyl Exclusion Zone (ChEZ) were relatively homogeneous in their main agrochemical characteristics and corresponded to typical sod-podzolic sandy loam and light loamy soils of Ukrainian Polissya. These soils were generally characterized by low or very low contents of humus, easily hydrolyzable nitrogen, and exchangeable potassium, whereas the content of mobile phosphorus ranged from low to medium. In contrast, the substrates sampled inside the Shelter Object of the Chornobyl Nuclear Power Plant (SO ChNPP) consisted of molten sand, dust, and technogenic material and had not yet acquired the genetic features of fully formed soils. The soils of the Fukushima Nuclear Power Plant difficult-to-return zones (FNPP DRZ) were richer in nitrogen and more balanced in terms of mobile phosphorus and potassium, corresponding to the properties of brown forest soils typical of mountainous regions of Japan.

A tendency toward correlation between total DNA concentration and the content of easily hydrolyzable nitrogen compounds was observed ($R^2 = 0.48$), while a stronger relationship was found between total humus content and total

DNA concentration in sod-podzolic soils (R^2 = 0.75). These results indicate a substantial contribution of soil nutrient status to the formation of microbial biomass.

Using the Biota DC and ERICA Tool software packages, individual dose rates for bacterial cells were calculated for the sampling sites. It was shown that the absorbed dose rate in samples from the SO ChNPP ranged from 1 to 135 mGy/h, in ChEZ soils from 0.1 to 10 μGy/h, whereas microbiomes from the FNPP DRZ exhibited pronounced seasonal dynamics, ranging from 6–168 μGy/h in summer to 12–402 μGy/h in winter.

Total bacterial DNA was isolated from the studied samples, primers for 16S rRNA amplification were selected, and sample preparation protocols for sequencing were optimized. DNA concentrations varied widely but remained suitable for amplification and sequencing. Samples from the restricted access area of the SO ChNPP (R7) and from the free access control area (R12) were selected for whole-genome analysis.

16S rRNA amplicon sequencing demonstrated that the largest primary sequence files were obtained from the FNPP DRZ samples, somewhat smaller files from ChEZ soils, and the smallest from substrates of the SO ChNPP. These differences reflect both the specific composition of the microbiomes and the limitations associated with the substrate matrix.

Bioinformatic protocols based on QIIME, PICRUSt, and HUMAnN were adapted to assess taxonomic composition and to evaluate the effects of metadata, including radionuclide contamination and dose load. The microbiomes of the SO ChNPP substrates differed substantially in alpha-diversity indices: the highest diversity was observed in the free access control sample, whereas samples from the restricted access area were characterized by communities with pronounced dominant taxa, indicating environmental extremity and limited nutrient availability. The presence of microorganisms and the formation of proto-ecosystems were confirmed in premises of the SO ChNPP with different access regimes. At the same time, DNA could not be isolated from some samples

collected in the strict regime zone, which may be explained by either high dose loads or the specific properties of the substrate.

For the first time in Ukraine, whole-genome sequencing of samples from the SO ChNPP was performed. Whole-genome analysis of samples R7 and R12 revealed a considerably higher taxonomic potential of the microbiomes than 16S rRNA analysis and allowed the identification of previously undescribed taxonomic groups at the family level. Whole-genome data also demonstrated higher alpha-diversity values, while the functional profile of both microbiomes was characterized by the predominance of proteins involved in transport functions.

Metagenomic analysis of soils from the ChEZ identified more than 4,300 microbial species, whereas more than 7,000 species were identified in soils from the FNPP DRZ. In ChEZ soils, variation in diversity and dominance indices was observed, along with relationships between microbiome structure, ammonium nitrogen content, and ^137Cs concentration. In FNPP DRZ soils, pronounced seasonal dynamics of taxonomic composition and its association with radionuclide contamination levels were demonstrated. In contrast to the ChEZ, where *Actinobacteria* and *Alphaproteobacteria* predominated, the dominant taxa in FNPP DRZ soils were *Clostridia* and *Actinobacteria*, reflecting differences in environmental conditions, trophic status, and the nature of anthropogenic impact.

The **scientific novelty** of the dissertation lies in the generalization of theoretical and practical aspects of the structure of microbiomes inhabiting radionuclide-contaminated substrates and in the development of a concept describing the influence of radionuclide contamination on microbial communities.

For the first time, the following results were obtained:

- fundamental data on the biodiversity of microorganisms in radionuclide-contaminated soils and substrates in Ukraine and Japan;
- a scientific concept of the effects of low doses of ionizing radiation on the structure of microbiomes in accident-affected territories;
- new approaches to the assessment of the stability of microbial communities inside the SO ChNPP and in soils of exclusion zones;

- new evidence on the impact of nuclear energy facilities on the reducing component of ecosystems;
- an assessment of the risk of biocorrosion at nuclear fuel cycle facilities.

Improved:

- bioinformatic approaches to the analysis of microbiomes in radionuclide-contaminated substrates;
- theoretical and methodological principles of statistical processing of microbiome data with consideration of metadata.

Further developed:

- approaches to modelling complex dose loads for individual microbiome representatives;
- conceptual understanding of the response of the reducing component of ecosystems to radionuclide contamination.

The **practical significance** of the results lies in the fact that the obtained data reliably reflect the state of bacterial biodiversity in substrates sampled under different isodose conditions near nuclear fuel cycle facilities in Ukraine and Japan. The developed approaches to isolation, analysis, and interpretation of microbiome data may be used in further radioecological and radiobiological studies and in the training of specialists in radioecology..

Separate provisions of the dissertation are used for the training of specialists at the Faculty of Plant Protection, Biotechnology and Ecology within the "Radioecology" specialization.

Key words: soil microflora, metagenomic analysis, microbiome analysis, soils contaminated with radionuclides, Chornobyl, Fukushima.

КОМПЛЕКСНА ОЦІНКА МІКРОБІОМІВ ЗАБРУДНЕНИХ РАДІОНУКЛІДАМИ ҐРУНТІВ І СУБСТРАТІВ АНТРОПОГЕННИХ СИСТЕМ

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....17

ВСТУП 20

1. СТАН ПРОБЛЕМИ ЩОДО КОМПЛЕКСНОЇ ОЦІНКИ МІКРОБІОМІВ ЗАБРУДНЕНИХ РАДІОНУКЛІДАМИ ҐРУНТІВ І СУБСТРАТІВ АНТРОПОГЕННИХ СИСТЕМ.....29

1.1 Загальна характеристика радіонуклідного забруднення зони відчуження Чорнобильської АЕС 29

1.2 Загальна характеристика екосистем зон, які важко повернути у господарювання АЕС Фукусіма 37

1.3 Роль мікроорганізмів в біотичних колообігах речовин.....52

1.3.1 Перерозподіл елементів ядерного палива 52

1.3.2 Міграція стронцію у природних забруднених екосистемах.....61

1.3.3 Перерозподіл цезію в екосистемах 62

1.4 Радіостійкість мікроорганізмів.....64

1.5 Радіобіологічні аспекти формування мікробних угруповань у зонах радіоактивного забруднення 68

1.5.1 . Механізми радіорезистентності мікроорганізмів 69

1.5.2 . Вплив хронічного опромінення на структуру мікробних угруповань 70

1.6 Підбір протоколів для виділення ДНК із субстратів, відібраних на об’єктах ядерно-паливного циклу.....71

1.6.1 Пробопідготовка.....72

1.6.2 Екстракція ДНК 74

1.7 Метагеномний проєкт і його етапи 83

1.7.1 Аналіз метагеномних даних.....84

1.7.2 Секвенування метагеномів 87

1.7.3 Біоінформатичний аналіз 16s rRNA метагеномних даних.....88

1.7.4 Метадані у метагеномному аналізі та їх інтеграція.....94

Резюме до розділу 1 95

2 ОБ’ЄКТИ, УМОВИ ТА МЕТОДИ ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ.....96

2.1 Відбір проб ґрунту та визначення його основних характеристик.....96

2.1.1 Методи відбору проб ґрунту.....96

2.1.2 Точки відбору проб.....98

2.1.3 Визначення основних хімічних характеристик субстратів.....102

2.2 Вимірювання радіоактивності і дозових навантажень.....105

2.3 Вимірювання вмісту радіонуклідів у забруднених радіонуклідами субстратах 105

2.3.2 Характеристика сезонної зміни потужності дози експозиційного випромінювання на території ЗВП ФАЕС.....106

2.3.3 Розрахунок дозових навантажень на мікробіоми ґрунтів.....107

2.4 Виділення і секвенування ДНК 108
2.5 Біоінформатична обробка 109
2.5.1 Візуалізація даних 112
2.5.2 Статистична обробка результатів 112
2.6 Методологічна схема інтеграції радіаційних, біогеохімічних і мікробіомних даних 113
3 МІКРОБІОМИ ПРИМІЩЕНЬ ОБ'ЄКТА УКРИТТЯ ЧАЕС 116
3.1 Характеристика внутрішніх умов ОУ 116
3.2 Концентрація тотальної ДНК, виділеної зі зразків 122
3.3 Оцінка якості даних секвенування за допомогою FastQC 123
3.4 Біорізноманіття досліджуваних зразків 128
3.4.1 Відсоток неідентифікованих видів у блочних пробах. Обмеження технології 128
3.4.2 Загальне бактеріальне різноманіття зразків субстрату, відібраних з ОУ 130
3.5 Метрики для оцінки різноманітності всередині спільноти (альфа-різноманіття) 135
3.6 Функції мікроюіомів ОУ 142
3.7 Підготовка зразків до повногеномного аналізу 147
3.8 Повногеномний аналіз мікробіомів R7 та R12 150
3.8.1 Таксономічна оцінка мікробіомів R7 (ЗЛД) та R12 (ЗВД) 151
3.8.2 Альфа різноманіття мікробіомів зразків зон лімітованого та вільного доступу 155
3.8.3 Функціональна характеристика мікробіомів R7 та R12 156
Висновки до розділу 3 158
4 ВИДОВИЙ СКЛАД МІКРООРГАНІЗМІВ НА ЗАБРУДНЕНИХ РАДІОНУКЛІДАМИ ТЕРИТОРІЯХ ЗОНИ ВІДЧУЖЕННЯ ЧОРНОБИЛЬСЬКОЇ АЕС 163
4.1 Основні агрохімічні показники відібраних ґрунтів 163
4.1.1 Характеристика дослідних полігонів на території ЧЗВ 164
4.2 Радіонуклідне забруднення точок відбору зразків 170
4.3 Концентрація виділеної загальної ДНК зразків 172
4.4 Препроцесінг метагеномних даних у програмному пакеті QIIME 174
4.4.1 Кластеризація метагеномних даних у QIIME 175
4.5 Розрахунок альфа-різноманіття мікробіому 175
4.6 Розрахунок бета-різноманіття мікробіому 176
4.7 Функціональна реконструкція мікробіому 177
4.7.1 Робота з PICRUSt 177
4.7.2 Робота з HUMAnN 179
4.8 Візуалізація даних та побудова кладограм 180
4.9 Оцінка якості даних секвенування за допомогою FastQC 182
4.10 Загальна характеристика мікробіомів ґрунту ЧЗВ 186
4.10.1 Обмеження використання методу секвенування нового покоління для зразків, відібраних з територій ЧЗВ 186
4.10.2 Альфа-різноманіття ґрунтів ЧЗВ 188
4.10.3 Метрики біорізноманіття мікробіомів ЧЗВ 198
4.10.4 Бета-різноманіття мікробіомів ЧЗВ 204
4.11 Вплив факторів навколишнього середовища на мікробні спільноти ґрунтів, відібраних з територій ЧЗВ 208

Висновки до розділу 4 212
5 ВИДОВИЙ СКЛАД МІКРООРГАНІЗМІВ НА ЗАБРУДНЕНИХ РАДІОНУКЛІДАМИ ЗОН, ЯКІ ВАЖКО ПОВЕРНУТИ У ГОСПОДАРЮВАННЯ АЕС ФУКУСІМА 217
5.1 Основні агрохімічні характеристики зон, які важко повернути у господарювання АЕС Фукусіма 217
5.2 Радіонуклідне забруднення точок відбору зразків 225
5.2.1 Просторова динаміка дозового навантаження 229
5.2.2 Сезонна динаміка дозового навантаження 233
5.3 Концентрація виділеної загальної ДНК зразків 236
5.4 Підбір методології для біоінформатичної обробки результатів секвенування ДНК, із забруднених радіонуклідами ґрунтів 237
5.4.1 Загальна схема аналізів 237
5.5 Оцінка якості даних секвенування за допомогою FastQC 239
5.6 Загальна характеристика мікробіомів ґрунту ЗВП ФАЕС 240
5.6.1 Обмеження технології NGS для зразків, відібраних з території ЗВП ФАЕС 240
5.6.2 Альфа-різноманіття ґрунтів ЗВП ФАЕС 241
5.7 Метрики альфа біорізноманіття мікробіомів ЗВП ФАЕС 252
5.8 Метрики бета-різноманіття мікробіомів ґрунтів ЗВП ФАЕС 260
5.9 Вплив факторів навколишнього середовища на мікробні спільноти ґрунтів, відібраних із територій ЗВП ФАЕС 263
Висновки до розділу 5 269
6 МОДЕЛЮВАННЯ ПОГЛИНУТОЇ ДОЗИ ДЛЯ ҐРУНТОВИХ МІКРООРГАНІЗМІВ 273
ВИСНОВКИ 285
Список використаної літератури 289

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

Скорочення	**Розшифрування**
АЕС	атомна електростанція
БД	база даних
Бк, кБк	бекерель, кілобекерель
Гр, кГр	грей, кілогрей
ДК	дозові коефіцієнти
ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
ДСП ЧАЕС	Державне спеціалізоване підприємство «Чорнобильська атомна електростанція»
ЕДТА	етилендіамінтетраоцтова кислота
ЗВ	зона відчуження
ЗВД	зона вільного доступу персоналу до приміщень об’єкта «Укриття»
ЗВП ФАЕС	зони, які важко повернути у господарювання навколо АЕС Фукусіма
ЗЛД	зона лімітованого доступу персоналу до приміщень об’єкта «Укриття»
ЗСР	зона суворого режиму доступу персоналу до приміщень об’єкта «Укриття»
ІПБ АЕС НАН України	Інститут проблем безпеки АЕС Національної академії наук України
КПП	контрольно-пропускний пункт
ЛД37	летальна доза для 37 % організмів
ЛД50	летальна доза для 50 % організмів
ЛД90	летальна доза для 90 % організмів
МАГАТЕ	Міжнародне агентство з атомної енергії
МОН	Міністерство освіти і науки України
НУБіП України	Національний університет біоресурсів і природокористування України
ОУ ЧАЕС	об’єкт «Укриття» Чорнобильської атомної електростанції
ПАВ	поліароматичні вуглеводні

ПЕД	потужність експозиційної дози
ПЕГ	поліетиленгліколь
ПВПП	полівінілполіпіролідон
ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція
ПТЛРВ	пункти тимчасової локалізації радіоактивних відходів
ТЕПКО	Токійська електроенергетична компанія
ТУЕ	трансуранові елементи
УкрНДІСГР	Український науково-дослідний інститут сільськогосподарської радіології
ФАЕС	Фукусімська атомна електростанція
ЦТАБ	бромід цетилтриметиламонію
ЧАЕС	Чорнобильська атомна електростанція
ЧЗВ	Чорнобильська зона відчуження
ЯПЦ	ядерно-паливний цикл
ANOVA	analysis of variance
BiotaDC	software tool for dose coefficient assessment for biota
CCA	Canonical Correspondence Analysis
ChEZ	Chornobyl Exclusion Zone
ChNPP	Chornobyl Nuclear Power Plant
CTAB	cetyltrimethylammonium bromide
DNA	deoxyribonucleic acid
DRZ	Difficult-to-Return Zones
EMRAS	Environmental Modelling for Radiation Safety
ERICA Tool	Environmental Risk from Ionising Contaminants: Assessment and Management Tool
FAZ	Free Access Zone
FastQC	quality control tool for high-throughput sequencing data
FNPP	Fukushima Nuclear Power Plant
FREDERICA	database of radiation effects on biota used in environmental assessment
GraPhlAn	Graphical Phylogenetic Analysis
HPGe	high-purity germanium detector
HUMAnN	HMP Unified Metabolic Analysis Network

ICRP	International Commission on Radiological Protection
IMG	Integrated Microbial Genomes
IMG/M	Integrated Microbial Genomes & Microbiomes
KAAS	KEGG Automatic Annotation Server
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KOs	KEGG Orthology groups
MG-RAST	Metagenomics Rapid Annotation using Subsystem Technology
MEXT	Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology
MiSeq	Illumina MiSeq sequencing platform
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next Generation Sequencing
OTU	Operational Taxonomic Unit
PCoA	Principal Coordinates Analysis
PCR	polymerase chain reaction
PICRUSt	Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States
PLFA	phospholipid fatty acid analysis
QIIME	Quantitative Insights Into Microbial Ecology
RA	Reconstruction Agency
RAZ	Restricted Access Zone
RDA	Redundancy Analysis
RESRAD-BIOTA	biota dose assessment module within RESRAD
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEED	subsystem-based genome annotation resource
SILVA	ribosomal RNA database project
SO	Shelter Object
SSU	small subunit ribosomal gene

ВСТУП

Внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС у 1986 році було створено зону відчуження (ЧЗВ) – унікальну територію площею 2600 км², з якої евакуювали населення та припинили господарську діяльність. За відносно короткий період це зумовило інтенсивні зміни у структурі агроценозів, природних фітоценозів, зооценозів та мікробоценозів [49, 6, 175, 8]. Особливо важливими є зміни у ґрунтовому мікробіомі [46, 10] оскільки мікроорганізми відіграють ключову роль у перерозподілі радіонуклідів у ґрунтовому профілі та зміні їхньої біологічної доступності [233, 294].

До аварії на ЧАЕС вплив іонізуючого випромінювання на мікроорганізми досліджували переважно в контрольованих лабораторних умовах [214, 132, 117, 226, 164, 239, 158, 358, 136]. Однак роль мікроорганізмів у міграції радіонуклідів та зміні їхнього фізико-хімічного стану у природних умовах тривалий час залишалася поза увагою дослідників. Переважно розглядався односторонній вплив радіації на мікроорганізми, тоді як зворотний процес – вплив мікробної активності на поведінку радіонуклідів у ґрунті – практично не вивчався.

Ґрунтова мікрофлора характеризується високим біорізноманіттям і значною біомасою, що дає їй змогу впливати на фізико-хімічний стан радіонуклідів у ґрунті та їхню біодоступність для рослин. Це особливо важливо для сільськогосподарських культур, які на забруднених територіях є основним шляхом надходження радіонуклідів до людини через харчові продукти та продукцію тваринництва. Саме тому зменшення переходу радіонуклідів на першій ланці трофічного ланцюга "ґрунт–рослина" залишається пріоритетним завданням сільськогосподарської радіоекології та радіаційної гігієни навіть на пізній фазі аварії на ЧАЕС.

З часом після аварії відбувається фіксація ^{137}Cs у ґрунтовому вбирному комплексі та перехід у слабодоступні форми. Це знижує ефективність традиційних контрзаходів (вапнування кислих ґрунтів, внесення калійних добрив), про що свідчить зменшення коефіцієнтів накопичення і переходу радіонукліда [8]. У цій ситуації застосування мікробних препаратів, здатних впливати на фізико-хімічний стан як поживних елементів, так і радіонуклідів, може стати перспективним елементом системи контрзаходів, спрямованих на зменшення переходу ^{137}Cs із ґрунту у продовольчі рослини.

Сучасні досягнення у галузі геноміки та метагеноміки уможливлюють вивчення функцій мікробних спільнот з безпрецедентною точністю [180, 327]. Технології секвенування нового покоління (NGS) дають змогу аналізувати структуру мікробних угруповань на різних таксономічних рівнях – від типу до виду, що відкриває нові можливості для оцінки впливу екологічних чинників на мікробіоми екосистем [217], прогнозування наслідків антропогенного впливу, зокрема глобального потепління [217], а забруднення важкими металами, моніторингу територій, відчужених внаслідок радіаційних аварій. Це робить метагеномний аналіз ідеальним інструментом для оцінки впливу радіоактивного забруднення на функціональні характеристики ґрунтової мікрофлори зон відчуження навколо аварійних АЕС.

Наукова проблема, що розв’язується в дисертаційній роботі, полягає у встановленні закономірностей формування структури та функціонального потенціалу мікробіомів за умов хронічного радіонуклідного забруднення, коли дія іонізуючого випромінювання реалізується не як ізольований чинник, а у взаємодії з біогеохімічними характеристиками середовища. Сучасні дослідження радіоактивно забруднених ґрунтів показують, що зміни мікробних угруповань залежать не лише від активності радіонуклідів або потужності дози, а й від pH, вологості, органічної речовини, вмісту макро- і

мікроелементів, токсичності супутніх елементів та попередньої історії формування екосистеми [233, 381].

У такому підході мікробіом забруднених радіонуклідами ґрунтів і техногенних субстратів розглядається як інтегральний біологічний індикатор дії радіаційно-біогеохімічного фільтра. Цей фільтр поєднує селективний вплив хронічного дозового навантаження з дією едафічних і техногенних модифікаторів середовища: кислотності або лужності субстрату, доступності азотовмісних сполук, органічної речовини, вологості, сезонної динаміки та фізичної природи субстрату. Саме тому аналіз мікробіомів у роботі спрямований не лише на опис таксономічного складу, а й на встановлення радіобіологічних закономірностей формування мікробних угруповань у пост аварійних і техногенних системах [162, 381].

Такий підхід відповідає сучасному розумінню мікробіому як функціонально організованої системи, структура якої формується під впливом множинних екологічних градієнтів. Зокрема, метагеномні дослідження ґрунтових мікробних угруповань показують, що pH, співвідношення вуглецю до азоту, вологість і доступність поживних речовин можуть визначати не лише таксономічний склад, а й функціональний потенціал мікробіому [389, 388, 391].

Іонізуюче випромінювання є потужним стресовим чинником для мікроорганізмів, що індукує пошкодження ДНК, окисний стрес та порушення метаболічних процесів. Хронічне опромінення мікробних угруповань у зонах радіоактивного забруднення призводить до селективного тиску, внаслідок якого формуються адаптовані мікробіоми з підвищеною радіорезистентністю. Вивчення механізмів адаптації мікроорганізмів до радіаційного стресу, зокрема активації систем репарації ДНК, антиоксидантного захисту та метаболічних перебудов, є фундаментальним завданням радіобіології мікроорганізмів. Водночас мікробна активність впливає на міграцію

радіонуклідів через процеси біосорбції, біоакумуляції та зміни окисно-відновного стану елементів, що має пряме значення для радіоекологічного прогнозування та розробки контрзаходів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана у рамках бюджетних тематик кафедри радіобіології та радіоекології № 110/79-ф «Закономірності впливу радіонуклідного забруднення території на біорізноманіття ґрунтової мікрофлори» на 2016–2018 рр. (№ державної реєстрації 0116U0061585) та № 110/100-ф «Вивчення поведінки та прогнозування стану мікрофлори на об'єктах ядерного паливного циклу» на 2017–2019 рр. (№ державної реєстрації 0117U002646).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було встановити радіобіологічні закономірності формування таксономічної структури та функціонального потенціалу мікробіомів ґрунтів і техногенних субстратів, забруднених радіонуклідами внаслідок аварій на ЧАЕС [23] та АЕС Фукусіма-1[250], а також субстратів з Об'єкта «Укриття» ЧАЕС, за умов хронічного радіонуклідного забруднення та різного рівня поглинутої дози з урахуванням біогеохімічних модифікаторів середовища.

Поставлена мета зумовила необхідність вирішення таких **завдань**:

1. Відібрати зразки ґрунтів та субстратів з різною щільністю радіонуклідного забруднення на території ЧЗВ, зон важкого повернення у господарювання навколо АЕС Фукусіма-1 та Об'єкта «Укриття» ЧАЕС і визначити їхні основні фізико-хімічні характеристики.

2. Провести метагеномний аналіз мікробіомів досліджуваних субстратів методами ампліконного секвенування гена 16S рРНК та повногеномного секвенування (WGS).

3. Визначити таксономічний склад та оцінити біорізноманіття мікробних угруповань ґрунтів і субстратів з різним рівнем радіонуклідного забруднення.

4. Визначити внесок дозового навантаження у формування структури мікробіому порівняно з внеском супутніх едафічних, хімічних і техногенних факторів.

5. Оцінити функціональний потенціал мікробних угруповань високорадіоактивних субстратів з Об'єкта «Укриття» ЧАЕС.

6. Оцінити наявність дозозалежних змін у структурі та функціональному потенціалі мікробіомів і визначити умови, за яких радіаційний фактор є провідним або модифікованим біогеохімічними характеристиками середовища.

Об’єкт дослідження – закономірності впливу радіонуклідного забруднення на таксономічне біорізноманіття та функціональні характеристики ґрунтових мікробіомів.

Предмет дослідження – мікробні угруповання ґрунтів та субстратів територій, забруднених радіонуклідами внаслідок аварій на ЧАЕС (Україна) та АЕС Фукусіма-1 (Японія).

Методи дослідження: визначення складу мікробіомів проводили за алгоритмом метагеномних досліджень: виділення, перевірка концентрації, перевірка якості, очищення та підготовка ДНК до секвенування – молекулярно-генетичними методами; секвенування зразків – за допомогою технології секвенування нового покоління приладом Illumina HiSeq, перевірка якості рідів, обробка отриманих результатів – за допомогою біоінформатичних методів. Визначення фізико-хімічних характеристик відібраних субстратів – за стандартними (для ґрунтів Чорнобиля і Фукусіми) та експресними (для зразків, відібраних в об’єкті «Укриття» ЧАЕС)

агрохімічними методиками. Радіоактивність зразків визначали за допомогою гамма-спектрометрії.

Наукова новизна одержаних результатів полягає в узагальненні теоретичних і практичних положень щодо складу мікробіомів забруднених радіонуклідами субстратів і розробці концепції впливу радіонуклідного забруднення на структуру мікробіомів.

Вперше:

- отримано фундаментальні дані щодо біорізноманіття мікроорганізмів у ґрунтах, забруднених радіонуклідами, на територіях України та Японії;
- запропоновано наукову концепцію впливу малих доз іонізуючого випромінювання на структуру мікробіомів, які розташовані в зоні відчуження та зонах, які важко повернути у господарювання, навколо аварійних АЕС;
- розроблено нові підходи до визначення стабільності мікробних угруповань, розташованих усередині ОУ ЧАЕС та в ґрунтах зон відчуження та евакуації навколо АЕС;
- отримано відомості щодо впливу об’єктів ядерної енергетики на основну редукуючу ланку екосистеми;
- встановлено закономірності формування структури мікробних угруповань за умов хронічного радіонуклідного забруднення в ґрунтових екосистемах із мікрогрейними рівнями дозового навантаження та в техногенних субстратах ОУ ЧАЕС із мілігрейними рівнями потужності поглинутої дози;
- проведено оцінку ризику виникнення біокорозії на об’єктах ядерно-паливного циклу (ЯПЦ).

Удосконалено:

- біоінформатичні підходи до аналізу мікробіомів забруднених радіонуклідами субстратів;

- теоретичні та методологічні принципи статистичної обробки результатів мікробіомних досліджень з урахуванням метаданих

Отримали подальший розвиток:

- підходи щодо побудови моделей комплексної оцінки дозових навантажень на індивідуальних представників мікробіому забруднених радіонуклідами субстратів;
- розробка концепції відповіді редукуючої ланки екосистеми на радіонуклідне забруднення.

Практичне значення одержаних результатів. Дисертацію виконано на основі багаторічних наукових досліджень здобувача. Отримані дані щодо бактеріального різноманіття є науково обґрунтованими та достовірними і висвітлюють реальний стан мікробіомів субстратів, відібраних з різних ізодоз усередині та поблизу об'єктів ядерно-паливного циклу в Чорнобильській зоні відчуження. Виявлені закономірності свідчать, що структура мікробних угруповань у радіонуклідно забруднених ґрунтах і техногенних субстратах формується не за простою лінійною залежністю “доза–ефект”, а внаслідок поєднаної дії дозового навантаження, азотного режиму, pH, типу субстрату та сезонних чинників, що розширює фундаментальні уявлення про адаптацію мікробіомів до радіаційного забруднення.

Розроблено методичні підходи до комплексної оцінки мікробіомів радіаційно забруднених ґрунтів і техногенних субстратів. Навички застосування спеціалізованого програмного забезпечення для аналізу секвенсів нового покоління становлять важливий внесок у входження України в сучасну світову науку – геноміку та метагеноміку.

Результати впроваджено у науково-дослідну діяльність чотирьох установ (акти впровадження): ТОВ "ГД "БТУ-ЦЕНТР" – оцінка ґрунтових мікробіомів для біологізації землеробства; ТОВ "Західний Буг" – управління ґрунтовими ресурсами; Інститут проблем безпеки АЕС НАН України –

науковий супровід НДР щодо об'єкта "Укриття" ЧАЕС; Чорнобильський радіаційно-екологічний біосферний заповідник – радіоекологічний моніторинг.

Окремі положення дисертації використовуються для підготовки фахівців на факультеті агрономії та лісівництва Національного університету біоресурсів і природокористування України в межах спеціалізації «Радіоекологія».

Особистий внесок здобувача. Дисертантка особисто провела відбір зразків ґрунтів на території ЧЗВ (2015–2018 рр.) та субстратів з Об'єкта «Укриття» ЧАЕС (2016–2017 рр.) а також з території зон важкого повернення у господарювання навколо АЕС Фукусіма-1 (Японія); здійснила виділення сукупної ДНК з усіх досліджуваних зразків, підготовку бібліотек для секвенування та контроль якості отриманих препаратів; провела біоінформатичний аналіз даних метагеномного секвенування з використанням програмних пакетів QIIME2, MetaPhlAn, HUMAnN; виконала статистичну обробку результатів та побудову графічних матеріалів; здійснила аналіз і узагальнення отриманих результатів, сформулювала основні положення та висновки дисертації.

Дисертантка висловлює щиру подяку д. б. н. В. О. Кашпарову за методичну підтримку і рекомендації, заступнику директора з наукової роботи к. б. н. С. А. Паскевичу ІПБ АЕС НАН України – за конструктивну критику і поправки, внесені в текст дисертації, завідувачу відділення ядерної та радіаційної безпеки Інституту проблем безпеки АЕС НАН України В. О. Краснову – за всебічну підтримку у проведенні досліджень в ОУ і критику результатів та начальнику наукового відділу Чорнобильського біосферного раіоекологічного заповідника Денису Вишневському– за допомогу у процесі відбору проб на території ЧЗВ.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були представлені на міжнародних конференціях EMBO|EMBL Symposium: New Approaches and Concepts in Microbiology (Штутгарт, 2017), VI Международная школа молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика и системная биология» (Звенигород, 2014), «Radioecology and Environmental Radioactivity»: International Conference (Барселона, 2014), «The International Society for Microbial Ecology – ISME15»: International Congress (Кіото, 2015), The 1nd IER Annual Progress Report Meeting (Фукусіма, 2015), Молодь і поступ біології: XI міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів (Львів, 2015), 6 з'їзд Радіобіологічного товариства України (Київ, 2015), Ефекти радіації та інших ксенобіотиків на репродуктивну систему і організм: науково-практична конференція з міжнародною участю (Долина, Івано-Франківськ, 2016), ICRP International Conference on Recovery After Nuclear Accidents (Фукусіма, онлайн, 2020).

Публікації. Основні результати дисертаційної роботи опубліковано в 40 наукових працях, серед яких 21 стаття (з них 9 статей, що входять до БД Scopus, 12 публікацій у фахових виданнях України) у визначених Департаментом атестації кадрів МОН України фахових виданнях та 20 тез доповідей у збірках матеріалів міжнародних і вітчизняних наукових конференцій та конгресів.

Структура й обсяг дисертації. Дисертаційну роботу викладено на 325 сторінках друкованого тексту. Робота складається з анотації українською та англійською мовами, переліку умовних позначень, вступу, шести розділів, висновків і списку використаної літератури, що охоплює 394 джерела. Дисертація містить 51 таблицю та 62 рисунки.

1. СТАН ПРОБЛЕМИ ЩОДО КОМПЛЕКСНОЇ ОЦІНКИ МІКРОБІОМІВ ЗАБРУДНЕНИХ РАДІОНУКЛІДАМИ ҐРУНТІВ І СУБСТРАТІВ АНТРОПОГЕННИХ СИСТЕМ

1.1 Загальна характеристика радіонуклідного забруднення зони відчуження Чорнобильської АЕС

Навколо ЧАЕС було створено зону відчуження – унікальну територію площею 2600 км^2 з високою щільністю радіонуклідного забруднення, з якої було евакуйовано населення, вивезено велику кількість домашніх тварин і майже повністю припинено будь-яку господарську діяльність. І за відносно короткий час це спровокувало інтенсивні зміни в характері рослинності не тільки колишніх агроценозів, а й природних фітоценозів, зооценозів, мікробоценозів та всього біогеоценозу загалом [7, 15]. Важливими процесами, які тут відбуваються, є зміни у ґрунтовому мікробоценозі [47, 334, 6, 37] та функціонування мікрофлори, пов’язане з перерозподілом радіонуклідів у ґрунтовому профілі та зміною їхньої біологічної доступності [345, 294].

Після аварії на 4-му блоці всі компоненти довкілля зазнали потужного радіоактивного забруднення. Особливо сильно забрудненими є ділянки ближньої зони ЧАЕС (3–5 км на захід та північний схід від станції) [53].

Найбільш радіаційно небезпечною територією є проммайданчик АЕС. Рівні потужності експозиційної дози досягають десятків мР/год. Високі рівні іонізуючого випромінювання обумовлені забрудненням цієї території фрагментами ядерного палива, які викинуто вибухом з реактора. Рівні радіонуклідного забруднення ґрунтів проммайданчика досягають 400 МБк на квадратний метр [87, 176, 174].

Потрібно зазначити, що за 38 років радіаційна ситуація на території зони відчуження суттєво поліпшилась. Потужність дози на поверхні ґрунту

зменшилась у сотні разів. На ділянках, де виконувались роботи з дезактивації (видалення верхнього шару ґрунту), радіаційний фон зменшився на два-три порядки [177].

Основна частина радіоактивності сконцентрована у верхньому шарі ґрунту (5–10 см) та лісовій підстилці (в лісах). Існують ділянки, на яких інтенсивність вертикальної міграції радіонуклідів у ґрунті дещо вища, ніж на інших ділянках зони відчуження. Це місця, які зазнають періодичного підтоплення [87, 73, 192, 68, 53, 157].

За підрахунками на даний час на території Чорнобильської зони відчуження загальна активність радіоактивних речовин становить близько 8140 ТБк. Основна частина цієї активності припадає на ^{137}Cs та ^{90}Sr, активність яких зменшилась за останні 15 років на понад 40 %. При цьому активність ^{137}Cs становить 4–6 ПБк, а активність ^{90}Sr – 3 ПБк. Загальна активність альфа-випромінюючих радіонуклідів трансуранових елементів не перевищує 75 ТБк [49, 6].

Потрібно зазначити, що активність радіонуклідів паливної компоненти $^{239+240}$Pu змінюється слабко, зменшуючись менше ніж на 1 % за 100 років [177].

У Чорнобильській зоні відчуження здійснюється захоронення радіоактивних відходів з інших установ, розташованих на території країни. Такі захоронення здійснюються за всіма нормами та вимогами безпеки. На даний час у пунктах захоронення радіоактивних відходів накопичено близько 6 ПБк (за загальною активністю цезію та стронцію).

Об’єкт «Укриття» (ОУ), який є місцем тимчасового сховища неорганізованих радіоактивних відходів, містить до 740 ПБк активності (сума по цезію та стронцію). Активність альфа-випромінюючих нуклідів, які знаходяться в ОУ, становить близько 10 ПБк [177, 87] .

Наявність радіоактивних речовин у ґрунтах зони відчуження обумовлює забруднення ґрунтових вод, відкритих водойм, а також приземного шару атмосфери. Параметри забруднення цих компонентів середовища постійно контролюються.

Інколи спостерігаються різкі підвищення радіоактивності повітря. Це пов'язано з антропогенною діяльністю, метеорологічними умовами, а також певною мірою з лісовими пожежами. Підвищення обумовлюються виконанням робіт щодо створення протипожежних смуг, виробничою діяльністю в центральній частині зони відчуження (будівництво, дезактивація та ін.). Так, наприклад, улітку 1992 р. у зоні відчуження було багато пожеж, які стали причиною різкого збільшення вмісту ^{137}Cs у повітрі. Тоді рівні питомої активності досягали 17 мБк/м^3 [53].

Забруднення водойм радіонуклідами у післяаварійний час практично повністю зумовлене їх змивом з поверхні ґрунту, що відбувається як за періодичного затоплення територій, так і за умов опадів. На даний час вміст ^{137}Cs у воді річки Прип'ять становить 150 Бк/м^3, а ^{90}Sr – 300–350 Бк/м^3. Вміст трансуранових елементів досить низький і складає декілька одиниць беккерель на метр кубічний, що на кілька порядків менше за рівні, які регламентують ступінь забруднення [87, 53].

Оскільки основна зона, яка зазнала забруднення радіонуклідами, представлена переважно кислими, середньокислими і сильнокислими ґрунтами легкого механічного складу з низьким вмістом органічної речовини і глинистих мінералів, для біогеохімічних процесів характерна висока мобільність радіонуклідів [174]. Оскільки осідання радіонуклідів на поверхню Землі було інтенсивнішим у тих місцях, де під час проходження радіоактивних хмар випадали дощі, забруднення мають чітко виражений плямистий характер. Частина радіоактивних опадів була представлена так званими «гарячими частками» – це шматочки паливного матеріалу, які

містили продукти поділу урану. З часом паливні частинки руйнуються внаслідок взаємодії з компонентами навколишнього середовища, а радіонукліди, які потрапили в довкілля (у водойми, в рослини, в ґрунти), включаються у міграційні процеси та трофічні ланцюги [87].

На особливу увагу з огляду радіаційної безпеки території зони відчуження заслуговують так звані «Пункти тимчасової локалізації радіоактивних відходів» (ПТЛРВ), які являють собою місця захоронення різних радіоактивних матеріалів, переважно знятих верхніх шарів ґрунту. Такі захоронення були виконані нашвидкуруч й поховані матеріали не мають надійної ізоляції від довкілля (ґрунтових вод, атмосферних опадів, вітрів та ін.). На території Чорнобильської зони відчуження налічується близько 800 траншей, де захоронено радіоактивні відходи, а станом на жовтень 1987р. налічувалось 16 ПТЛРВ , в яких поховано $1{,}1\times10^{6}$ м^3 радіоактивних відходів, загальна активність яких, на 2018 рік, зберігалось в межах 11.1 ПБк.[12] Радіонуклідний склад локалізованих радіоактивних відходів нині визначається радіонуклідами ^{137}Cs, ^{90}Sr та трансурановими елементами (ТУЕ) [35, 12].

Значна частина ПТЛРВ у даний час заростає трав’яною, чагарниковою та деревною рослинністю. Кореневі системи цих рослин перебувають переважно в збагаченому елементами мінерального живлення високоактивному і найбільш родючому шарі ґрунту. Рослини інтенсивно накопичують радіонукліди (особливо ^{90}Sr). Як результат – дуже великі показники питомої активності біомаси цих рослин (досягають одиниць МБк/кг і класифікуються як середньоактивні відходи). Так, наприклад, на сьогодні питома активність рослин на території колишнього «Рудого лісу» перевищує питому активність похованих дерев, а щільність потоку γ-частинок від рослинності на порядок перевищує таку від поверхні ґрунту. Це

призводить до хронічного внутрішнього опромінення рослин та, як наслідок, до різних радіаційно-індукованих ефектів [178, 87, 176, 177].

Природно- кліматичні умови ЗВ представлені помірно-теплими та м'якими умовами і достатнім зволоженням. На території ЗВ у холодні місяці переважають температури в межах 6,3–7,6 °С. Абсолютний мінімум температури за зимові місяці становить 34–37 °С морозу. Температура літніх місяців коливається в межах 18,5–19,7 °С. Максимум літніх температур становить 38–39 °С. Це зумовлює вологе та жарке літо й холодну зиму. Часто на території ЗВ періоди заморозків припадають на кінець вересня – першу декаду жовтня. Тривалість безморозного періоду на поверхні ґрунту на території господарства становить 136–152 дні. Оскільки ЗВ розміщена в північній частині країни, то забезпеченість ґрунту вологою висока. Річна сума опадів на території господарства становить 600 мм. Найбільша кількість їх випадає переважно в теплий період року і лише 30 % припадає на холодний період. Частими є і бездощові періоди, тривалістю до 10–20 днів. Важливим кліматичним показником є також заморозки, котрі починаються в кінці вересня – першій декаді жовтня. Середня тривалість безморозного періоду в повітрі становить від 135 днів на північному сході та 173 дні на південному заході області. Порівняно із заморозками в повітрі, заморозки на поверхні ґрунту навесні закінчуються пізніше, а осінні починаються раніше. Приблизно цей період складає один-два тижні. Середній термін закінчення заморозків – перша декада травня.

Аналізуючи режим опадів та вологозабезпеченість рослинних культур, бачимо, що річна сума опадів становить у середньому 500–600 мм. Протягом року розподіл опадів не є рівномірним, оскільки біля 70 % усієї кількості опадів випадає переважно саме в теплий період, решта ж опадів – 30 % припадає на холодний період року. Протягом холодного періоду року кількість опадів за місяць мало змінюється і становить 150–180 мм. Протягом теплого періоду – 324–415 мм. Найбільша кількість опадів припадає на літні місяці, а саме на липень. Протягом теплого періоду відмічається в

середньому 53–60 днів, у котрі за добу випадає не менше 1 мм опадів. У цей період переважаючим типом опадів є короткочасні зливові дощі.

Для загальної характеристики теплозабезпеченості рослин найбільш поширеним показником є сума активних температур за період з середньодобовою температурою повітря вище 10 °С. Цей період прийнято вважати періодом активної вегетації сільськогосподарських культур. У цей час, як правило, заморозків не буває. Найбільша активність вегетації обмежена періодом із середньодобовою температурою повітря вище 15 ˚С.

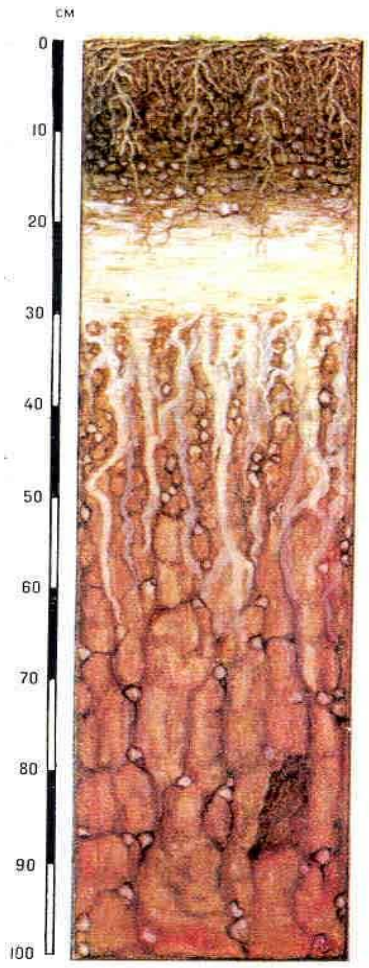
Ґрунтовий покрив зони відчуження представлений, здебільшого, легкими за механічним складом піщаними та супіщаними дерново-підзолистими кислими ґрунтами з низьким вмістом поживних речовин, малою сорбційною місткістю і промивним водним режимом. Дерново-підзолисті ґрунти займають близько 49 % території зони відчуження, дернові і лугові – до 34 %, болотні – 10 %, зруйновані і задерновані піски – 7 % [372, 31].

Дерново-підзолисті ґрунти утворюються під трав’яними або мохово-трав’яними лісами. В результаті сумісного прояву підзолистого і дернового процесів формуються дерново-підзолисті ґрунти. Таким чином, дерново-підзолисті ґрунти можуть утворюватись у результаті як змінної, так і сумісної дії підзолистого та дернового процесів.

При довгому розвитку трав’яної рослинності під пологом лісу в підзолистому ґрунті не накопичується велика кількість гумусу і поживних речовин. По-перше, це пов’язано з тим, що дерновому процесу протидіє підзолистий, який хоч і слабо проявляється. Але повністю не знімається під трав’янистими та мохо-трав’янистими лісами. По-друге, органічні рештки трав’янистих рослин, що зросли на бідному підзолистому ґрунті, містять порівняно мало зольних елементів і азоту, крім того, додатково обеззолюється при формуванні ґрунту опадами. Нестача зольних елементів, азоту, Ca, Mg у самому ґрунті і в органічних рештках уповільнює мінералізацію останніх

мікроорганізмів; утворюються кислі рухомі гумусові речовини. І тільки невелика кількість їх закріплюється в ґрунті біогенним кальцієм, залізом або глинистими мінералами. Як наслідок у гумусово-акумулятивному горизонті дерново-підзолистого ґрунту не накопичується велика кількість гумусу.

Найбільшу площу в ЗВ займають дерново-середньопідзолисті ґрунти. Морфологічна будова їх профілю характеризується ознаками:



НЕ 0–25 см Гумусо-елювіальний горизонт, ясно-сірий, супіщаний, свіжий, перехід до наступного – чіткий.

Eh 25–50 см Елювіальний горизонт з буро-червонуватим відтінком, супіщаний, перехід до наступного горизонту – чіткий.

І 60–115 см Ілювіальний горизонт має буро-червонуватий відтінок, ущільнений, горіхувато-призматичний, перехід до наступного горизонту – ясний.

Р 115 см і глибше Порода водно-льодовикові супіщані відклади.

Дерново-середньопідзолисті супіщані ґрунти в ЗВ займають незначну площу. По своїм морфологічним ознакам подібний до вищеописаної групової відміни. Дерново-середньопідзолисті слабозмиті займають друге місце. Відрізняються від ґрунтових відмін попередніх тим, що змито частково гумусо-елювіальний, а в деяких наступний за гумусовим горизонтом – елювіальний горизонт. Також у ЗВ поширені дерново-слабопідзолисті ґрунти пилувато-легкосуглинкові на водно-льодовикових відкладах.

Дерново-слабопідзолисті ґрунти. Утворились на давньоалювіальних пісках або водно-льодовикових відкладах під дубово-сосновими лісами. Генетичні горизонти: НЕ – гумусово-елювіальний, ясно-сірого кольору,

15–18 см; РЕ – ясно-жовтого кольору з білуватими плямами SiO_2 у верхній частині, рихлий, безструктурний; Рі – ілювіальний горизонт, жовтий пісок з прошарками ілювію 1–3 см; Р – материнська порода – зв'язані піщані відклади.

Реакція ґрунтового розчину коливається від кислої до близько до нейтральної ($pH_{сольове}$ 5,4–5,8–6,3). Ступінь насиченості основами 52,6–80,0 %. Гідролітична кислотність невисока (0,4–1,8 мг-екв на 100 г ґрунту). Вміст гумусу в орному шарі становить 0,7–1,5 %. Ці ґрунти слабо забезпечені поживними речовинами для рослин. Польові культури відчувають нестачу зольних елементів, а часто і води.

НЕ 0–36см Гумусо-елювіальний горизонт ясно-сірого кольору, пилувато-легкосуглинкові, неміцногрудкуватий, слабогумусовий, окремі рослинні рештки, перехід до наступного горизонту – ясний.

Eh 36–48 см Елювіальний горизонт, зв'язано-піщаний, білясто-жовтий, безструктурний, пухкий, перехід помітний.

І 48–118 см Ілювіальний горизонт, червонувато-бурого кольору, ущільнений, важкосуглинковий, дуже щільний, затьоки гумусу і окислів алюмінію і заліза, перехід помітний.

Р 118 см і глибше Порода – водно-льодовикові відклади, ясно-жовтого кольору.

Дерново-слабопідзолисті ґрунти в мікробіологічному відношенні малоактивні. Низькі запаси органічної речовини перешкоджають розвитку значної кількості бактерій.

1.2 Загальна характеристика екосистем зон, які важко повернути у господарювання АЕС Фукусіма

Великий землетрус у Східній Японії стався 11 березня 2011 року. Він був викликаний раптовим викидом енергії на стику між тихоокеанською та північноамериканською тектонічними плитами. Розрив земної кори задовжки близько 500 км і завширшки 200 км спричинив масовий землетрус магнітудою 9,0 і цунамі, яке вразило велику прибережну територію Японії, включаючи північно-східне узбережжя. Кілька хвиль досягали висоти більше за 10 м. Землетрус і цунамі спричинили великі людські втрати і масові руйнування споруд. Більше 23 000 осіб загинуло, понад 6000 отримали поранення, і, повідомлялося, що близько 2500 людей зникли [252]. Значні збитки було завдано будівлям та інфраструктурі, особливо вздовж північно-східного узбережжя Японії. На атомній електростанції Фукусіма Да-ічі (ФАЕС), що експлуатується Токійською електрогенеруючою компанією (ТЕПКО), землетрус завдав шкоди лініям електропостачання на місці, а цунамі спричинило істотне руйнування інфраструктури експлуатації та безпеки. Спільний ефект призвів до втрати електроенергії за межами ділянки та на місці. Це призвело до втрати функції охолодження на трьох діючих реакторних блоках (із шести реакторних блоків АЕС), а також у басейнах відпрацьованого палива [347, 154]. Чотири інші атомні електростанції (АЕС Хігасідорі, Онагава, Фукусіма Дай-ні та Токай Дай-ні) уздовж узбережжя також отримали пошкодження різних рівнів. Однак усі діючі реакторні установки на цих АЕС були безпечно закриті. Незважаючи на зусилля операторів ФАЕС, ядерні реактори в блоках 1–3 перегрівалися, ядерне паливо розплавлялося, а цілісність трьох захисних резервуарів для реакторів було порушено. Через високий тиск з резервуарів реакторів було випущено водень, що призвело до вибухів усередині корпусів реакторів блоків 1, 3 і 4, які пошкодили споруди та обладнання та спричинили ушкодження

персоналу. Радіонукліди були випущені з блоків в атмосферу і депоновані на суші та в океані. Мали місце також прямі викиди в море. Люди в радіусі 20 км від ділянки та в інших визначених місцях були евакуйовані, а в радіусі 20–30 км отримали вказівку знайти укриття, після чого їм порадили добровільно евакуюватися. Встановлено обмеження на розподіл і споживання продуктів харчування та споживання питної води. На момент написання праці (2024 рік) багато людей усе ще жили за межами районів, з яких вони були евакуйовані. Після стабілізації умов реакторів на ФАЕС почалися роботи з підготовки до їх остаточного виведення з експлуатації. У 2011 році розпочали відновлення територій, постраждалих від аварії, включаючи відбудову й активізацію громад та інфраструктури [160]. Аеральні дослідження території показали, що забруднення широко розповсюдилося та значно диспергувалося, але найбільша кількість радіонуклідів випала на північний захід від станції, 1 до приблизно 60 км були забруднені помітно більше (наприклад, за ^{137}Cs 1000 кБк/м2) [55] (рис. 1.1). Двома основними радіоактивними елементами, які виявилися широко депонованими, є йод (^{131}I) і цезій (насамперед ^{134}Cs і ^{137}Cs). Оскільки період напіврозпаду ^{131}I, ^{134}Cs і ^{137}Cs становить 8 днів, 2 роки і 30 років відповідно, деконтамінація території, забрудненої ^{137}Cs є найважливішим питанням для японського уряду. Обов’язки щодо подолання наслідків аварії було покладено на генеруючу компанію, якій належить ФАЕС – ТЕПКО, але, зважаючи на масштабність викидів, істотний вплив на навколишнє природне та соціальне середовище, до ліквідації наслідків долучився уряд Японії, а саме Міністерство здоров’я, праці та добробуту (MHLW) – за соціальний та економічний аспект ліквідації, Міністерство освіти, культури, спорту, науки та техніки (MEXT) – за інформаційну підтримку та фінансування досліджень щодо подолання наслідків аварії, Міністерство реконструкції (RA), сформоване у лютому 2012 року, – за імплементацію результатів досліджень,

організацію деконтамінації, підтримку евакуйованих жителів та надання допомоги при поверненні на очищені території тощо [292] .

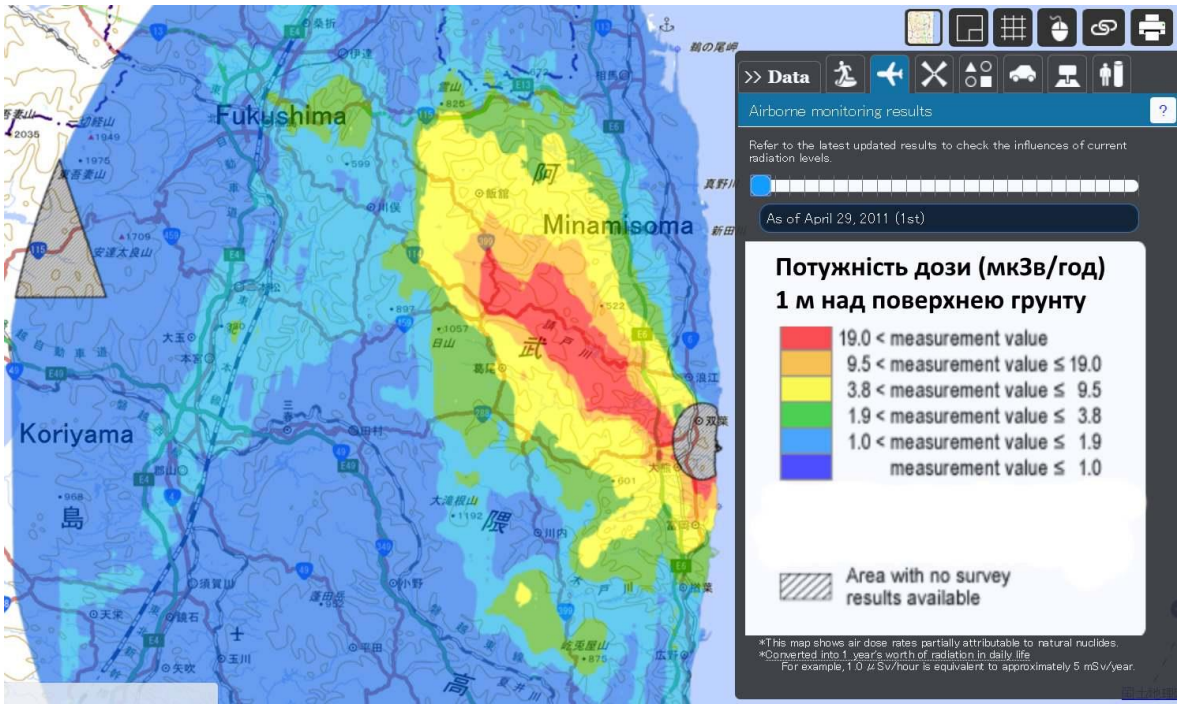


Рисунок 1.1. Потужність дози (мкЗв/год), аерозйомку проведено 23 квітня 2011 року. *Джерело карти*: MEXT

Забруднені площі можна умовно розділити на біоми двох типів: гірські малозаселені території і океанська рівнина, з великою щільністю населення. Більшість земель на забрудненій території – ліс (рис. 1.2) [149]. На приокеанській рівнині більшість території займають рисові поля та парки, забудовані території, сміттєзвалища та поля для гольфа, тимчасом як на гірських територіях багато паркових зон, лісів та високогірних полів.

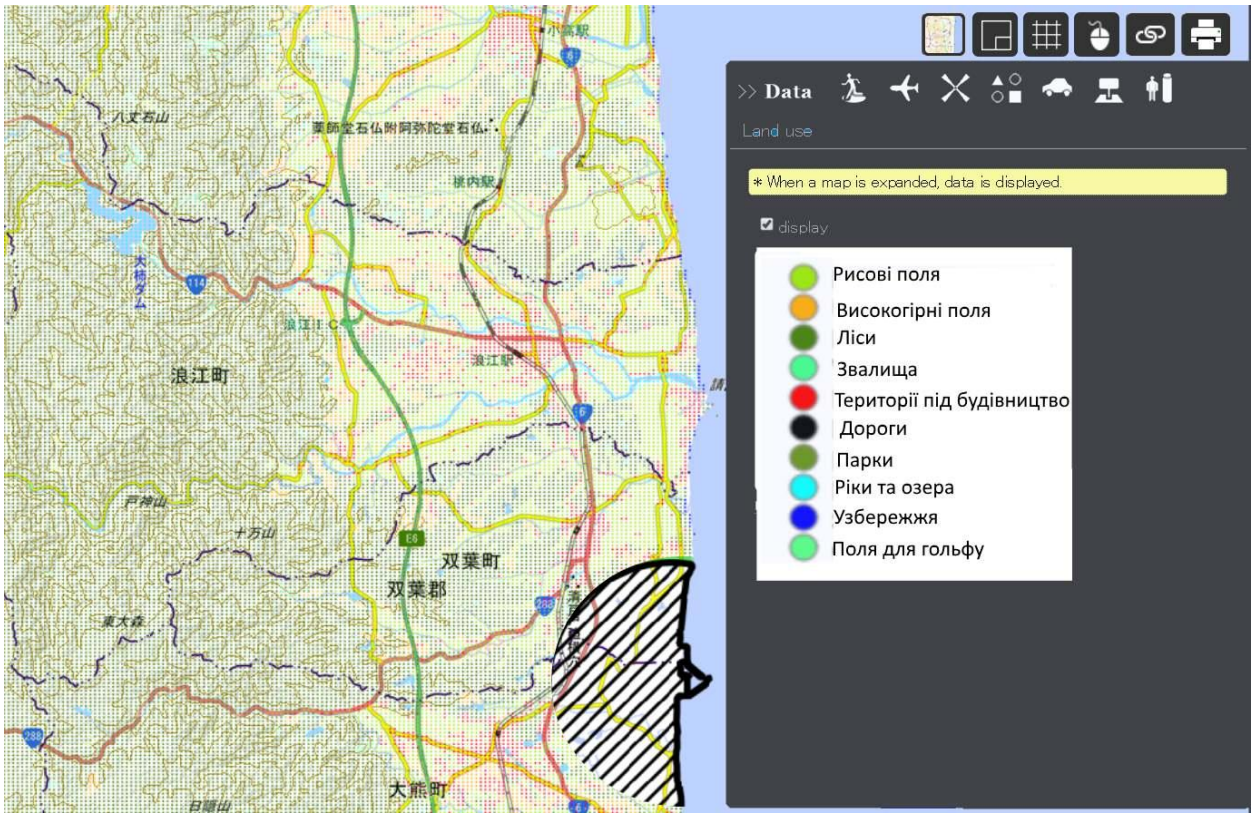


Рисунок 1.2. Доаварійне використання територій зони евакуації ФАЕС. *Джерело карти*: MEXT

Площа, забруднена після аварії, характеризується мусонним кліматом з річною кількістю опадів від 1100 до 1800 мм/рік протягом 2011–2016 років. За даними п’яти метеорологічних станцій Японського метеорологічного агентства (http://www.data. jma.go.jp/gmd/risk/obsdl/), точки відбору проб розташовані в повіті Наміе, що на забруднених територіях. Максимальна кількість опадів тут випадає в сезон тайфунів (середина серпня–жовтень) і сезон дощів (кінець травня – середина липня). Температура є репрезентативною для мусонного клімату з м’якою зимою: середні місячні значення вище нуля і зі спекотним, дощовим літом. Фактично немає періодів заморожування ґрунту, а разом з великими обсягами опадів влітку і відносно високою середньорічною температурою повітря, що сприяє вертикальній міграції ^{137}Cs у ґрунтах [184].

Незважаючи на те що цунамі зруйнувало значну частину прибережної інфраструктури, японська влада керувала евакуацією населення з потенційно постраждалих територій надзвичайно добре і швидко. Штаб японського ядерного реагування (NERHQ) визначив зони евакуації. 12 березня 2011 року радіус задовжки 20 км навколо ФАЕС був визначений як зона «евакуації» (рис. 1.3). У подальшому було проведено уточнення рівня забруднення та сформованої ним дози на населення, після чого зону евакуації (ЗЕ) біло умовно розділено на три частини: *Зона 3* – території, на які мешканці не зможуть повернутись протягом довгого часу. На цій території ведеться деконтамінація, наукові дослідження, а також виділені місця для депонування забрудненого ґрунту, знятого з поверхні решти зони евакуації та всієї префектури Фукусіма. *Зона 2* – території, в яких жителям поки що не дозволяється жити – активні роботи щодо деконтамінації, повернення жителів планується в межах 3–5 років. *Зона 1* – території, для яких накази евакуації готові до скасування – очікується, що населення матиме змогу повернутися на ці території протягом року. Відновлюється адміністративно-територіальний поділ, інфраструктура, налагоджуються соціальні інститути та шляхи взаємодії в спільноті. Приділяється багато уваги створенню робочих місць, підприємствам, що працюватимуть чи уже працюють у цій зоні надаються податкові пільги [151].

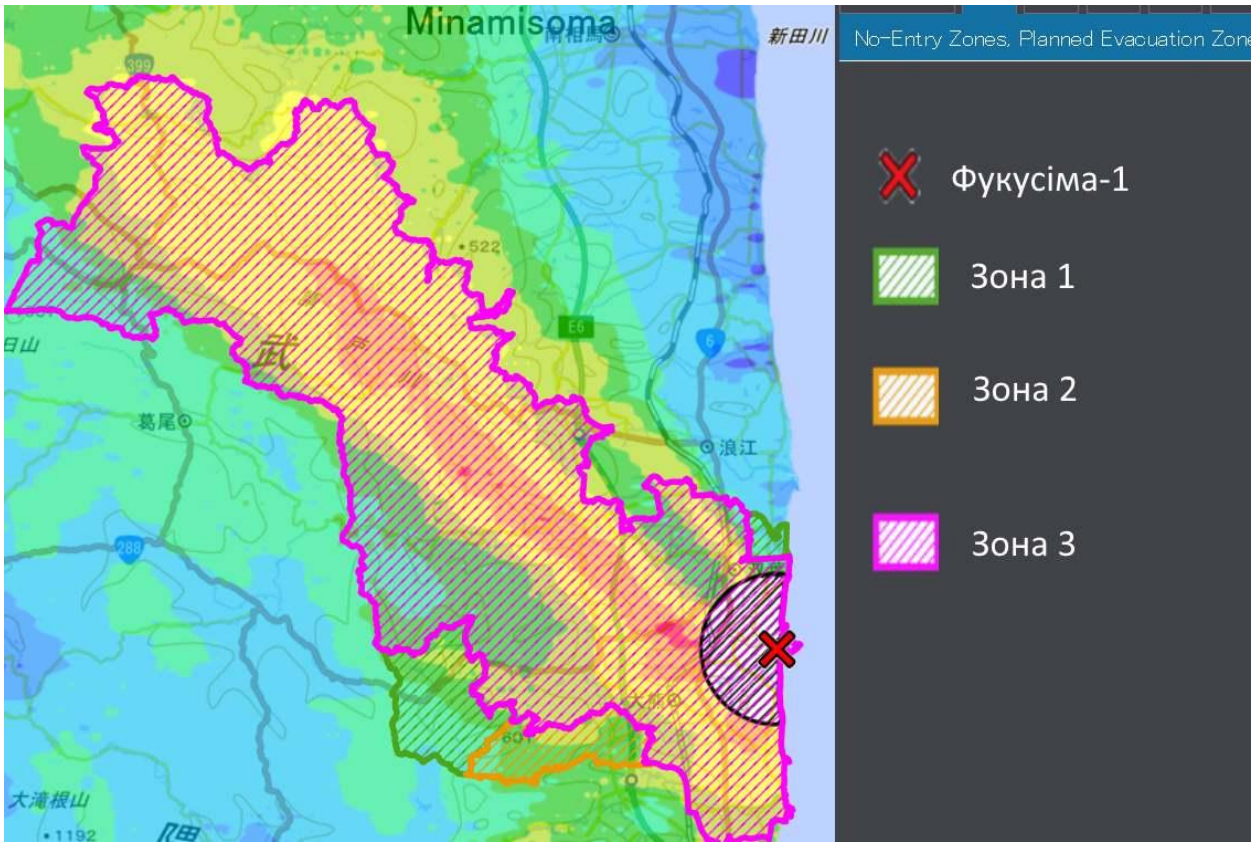


Рисунок 1.3. Районування ЗВП ФАЕС станом на 1 липня 2016 року. *Зона 1* – території, для яких накази евакуації готові до скасування. *Зона 2* – території, в яких жителям не дозволяється жити. *Зона 3* – території, на які мешканці не зможуть повернутись протягом довгого часу. *Джерело карти*: MEXT

Різноманітність ґрунтів на територіях, забруднених після аварії на ФАЕС, доволі значна у зв'язку з поєднанням гірських порід різного літологічного складу, інтенсивному вивітрюванню та денудації від високої сейсмічної активності і крутого нахилу гірських схилів. Яри мають області з коричневим ґрунтами (під буковим лісом), попело-вулканічні, багаті гумусом, кислі аллофонічні (анозольні) і вилужені коричневі ґрунти. Долини в основному використовуються як рисові поля і представлені алювіальними ґрунтами, сильно модифікованими через багаторічне землекористування. На нерівних ділянках річкових долин і вздовж каналізованих ділянок проточних каналів, характерних для міжгірських ярів, виникають незруйновані алювіальні ґрунти. Оброблювані землі, в основному рисові поля, займають

близько 12 % загальної території регіону, і трапляються переважно на великих западинах і передгірній низовині.

Район розміщення досліджуваної ділянки знаходиться в гірській місцевості з похилим схилом, орієнтація з півночі на південь (N–S). До аварії і евакуації, на території велася господарська діяльність, тому ґрунтовий рівень ділянки піднятий до горизонтального рівня методом терасування і схил дорівнює нулю. Ґрунтоутворювальні породи вулканічного гірського походження [18].

На північ від досліджуваної ділянки протікає річка Такасі, на досліджуваній ділянці річка знаходиться в залісненій території. Застою атмосферної вологи немає; ґрунтові води прісні (F). Судячи з глибини яру, де тече річка, вода перебуває на глибині близько 10 м.

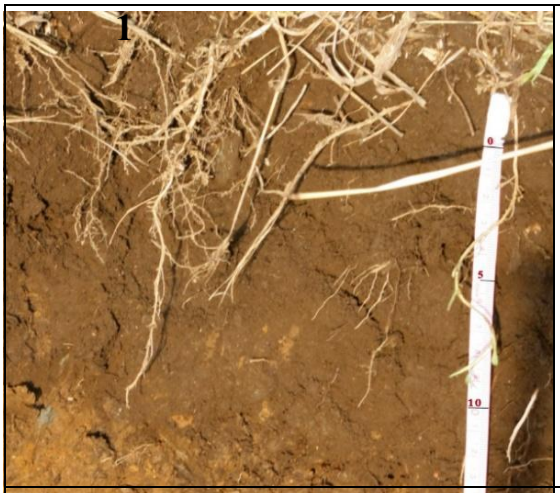
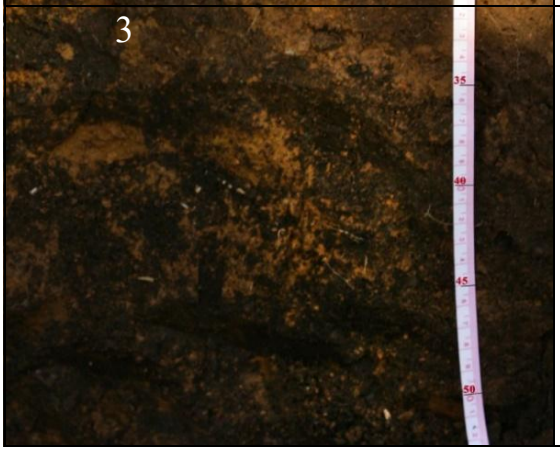
На поверхні ділянки відсутні елементи (0 %) оголених гірських порід чи відкладів. Розвиток процесів ерозії чи акумуляції не виявлений – 0 [18]. Тип ґрунту досліджуваної ділянки Wet Andosols.

Типові розрізи андозолів префектури Фукусіма:

Розріз № 1

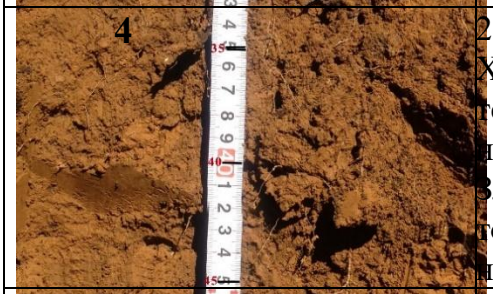
Розріз закладений у південно-східній частині ділянки, відстань до дороги 10 м, від річки 25 м. Ділянка знаходиться в улоговині гірського району на терасованій території. 15 м на схід крутий схил, гирло річки, 8 м на південь – схил тераси північно-південного напряму (N–S). Поверхня ґрунту щільна.

Загальна глибина розрізу 50 см [18].

	0–15 см Характер нижньої границі горизонту хвилястий. Колір: темно-коричневий. Вологість: сирий. Плями: дуже небагато < 2 %. Грубі елементи: > 3 %, розміру > 2 см і < 5 см. Структура: 1 окремі зерна. 2 Злегка ущільнений. Пористість: 0 непористий до < 2 %. Коріння: 2 тонке > 2 мм і < 4 мм. Середня кількість коренів: 3 небагато (22 корені/дм^2). Щільність каналів черв'яків: 0 немає каналів черв'яків.
	15–30 см Характер нижньої границі горизонту хвилястий. Вологість: сирий. Колір: червоно-коричневий. Плями: середня кількість 10 %, світло-коричневого, білого кольору. Структура важкосуглинкова. Грубі елементи: 15 % (середній), розміром від > 2 до < 7 см. Шарувата структура. Ущільнений. Непористий. Коріння дуже тонке, дуже небагато. Каналів черв'яків нема.
	30–50 см Характер нижньої границі горизонту хвилястий. Вологість: сирий. Колір: темно-коричневого кольору. Плями: багато 40 %, червоно-коричневі. Структура глиниста. Грубі елементи: багато 30 %, до 30 см. Шарувата структура 6. Ущільнений. Непористий. Коріння дуже тонке, дуже небагато 1 корінь/дм^2. Каналів черв'яків немає.

Розріз № 2

Розріз закладений у центрально-західній частині ділянки. Місце оброблялося до аварії на ФАЕС, відстань до дороги 50 м, від річки 65 м. 20 м на південь знаходиться схил тераси північно-південного напряму N-S.Загальна глибина розрізу 70 см.

	0–22 см Характер нижньої границі горизонту рівний. Колір: чорний. Вологість: злегка сирий. Плями: дуже небагато: 1 %. Грубі елементи: > 5 %, розміру > 2 см і < 5 см. Структура: 0 масивна. 2 Злегка ущільнений. Пористість: 2 середня 7 %. Коріння: 2 тонке < 3 мм. Середня кількість коренів: 2 небагато(20 коренів/дм^2). Щільність каналів черв'яків: 1 небагато (1 канал/дм^2).
	22–29 см Характер нижньої границі горизонту рівний. Колір: світло-коричневий. Вологість: злегка сирий. Плями: дуже небагато: 1 %, темно-коричневого кольору. Грубі елементи: 10 %, розміру 3–7 см. Структура: 0 масивна. 2 Злегка ущільнений. Пористість: 2 середня 10 %. Коріння: 2 тонке < 3 мм. Середня кількість коренів: 1 дуже небагато(17 коренів/дм^2). Щільність каналів черв'яків: 1 небагато (1 канал/дм^2).
	29–31 см Характер нижньої границі горизонту рівний. Колір: темно-коричневий. Вологість: злегка сирий. Плями: 0 немає. Грубі елементи: 0 %. Структура: 0 масивна. 2 Злегка ущільнений. Пористість: 1 низька 3 %. Коріння: 2 тонке < 2 мм. Середня кількість коренів: 1 дуже небагато(3 корені/дм^2). Канали черв'яків: немає.
	31–56 см Характер нижньої границі горизонту рівний. Колір: світло-коричневий. Вологість: сирий. Плями: 1 дуже небагато. Грубі елементи: 0 %. Структура: 0 масивна. 2 Злегка ущільнений. Пористість: 1 низька 4 %. Коріння: 2 тонке < 4 мм. Середня кількість коренів: 1 дуже небагато(8 коренів/дм^2). Канали черв'яків: немає.
	56–70 см Характер нижньої границі горизонту рівний. Колір: сіро-коричневий. Вологість: сирий. Плями: 1 дуже небагато, світло-коричневі. Грубі елементи: багато 20 %, < 10 см. Структура: 0 масивна. 4 Дуже ущільнений. Пористість: 1 непористий 2 %. Коріння: немає. Щільність каналів черв'яків: немає.

Проведено детальний аналіз фізико-хімічних та агрохімічних властивостей досліджуваних ґрунтів.

Таблиця 1.1. Характеристика фізико-хімічних властивостей вологих з товстим шаром гумусу андосолів [151]

Використання земель	Показник	Товщина шару, см	Щільність, мм	Густина, г/м3	Тверда фракція, %	Співвідношення рідкої фази, %	Газова фаза, %	Затримка води pF 1,5 , %	Затримка води pF 2,7 , %	Доступність води, %
Рисові поля	Середнє	16,2	11,6	0,79	32,2	55,7	12,2	57,2	49,2	7,9
	Медіана	16	12	0,78	30,2	59	8,9	59,7	49,6	6,2
	Стандартне відхилення (S)	2,9	5,5	0,12	7,4	11,2	9,5	6,8	7,6	5,7
	Дійсні значення	45	44	33	33	33	33	33	28	28
Звичайні поля	Середнє	15,5	2	0,65	22,5	42,5	35	42,5	32,1	10,4
	Медіана	15,5	2	0,65	22,5	42,5	35	42,5	32,1	10,4
	S	0,7	2,8	–	–	–	–	–	–	–
	Дійсні значення	2	2	1	1	1	1	1	1	–
Луки	Середнє	9	17	0,68	–	–	–	63,2	42,6	20,6
	Медіана	9	17	0,68	–	–	–	63,2	42,6	20,6
	S	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Дійсні значення	1	1	1	0	0	0	1	1	1
Загалом	Середнє	17,5	11,1	0,78	31,9	54,6	13,5	56,6	48,4	8,4
	Медіана	16	11	0,76	30,2	58	10	59,4	48,4	6,8
	S	5,5	5,5	0,12	7,4	11,7	10,8	7,3	8	6
	Дійсні значення	53	52	36	35	35	35	36	30	30

З табл. 1.1 видно, що найбільша товщина вологих андосолів характерна для рисових полів, показник нижчий на звичайних полях, де ґрунт не заливають водою. Найбільша щільність характерна лукам і рисовим полям, де середнє значення складає 17,0 та 11,6 мм відповідно. Густина ґрунту найвища на рисових ділянках, де використовується вода для затоплення та вирощування рису. Характеристики співвідношення рідкої та газової фази відповідають характеру використання угідь: рисові поля мають більшу частку рідкої фази, а рівень газової фази вищий у звичайних полях. Затримуюча здатність ґрунту вища на ділянках рисових полів, що і необхідно для вирощування рису. Рівень доступної вологи вищий у зразку ґрунту з

лучної території, що, найімовірніше, пов'язано зі збереженістю ґрунтового профілю та непошкодженості протікання природних процесів обміну [139].

Для оцінки мікробного потенціалу ґрунту важливо проаналізувати агрохімічні властивості ґрунту.

Таблиця 1.2. Характеристика агрохімічних властивостей вологих з товстим шаром гумусу андосолів [151]

Використання земель	Показник	pH (H_2O)	pH (KCl)	Обмінна кислотність, мг-екв/100 г	Електропровідність, мСм/см	Азот, %	Вуглець, %	Ємність катіонного обміну, ме/100 г	Замінний CaO, мг/100г	Замінний MgO, мг/100 г	Замінний K_2O, мг/100 г	Насиченість основами, мг/100 г	Доступний P, мг/100 г	Доступна H_2SiO_3, мг/100 г	Доступний азот, мг/100 г
Рисові поля	Середнє	5,9	4,9	1,22	0,1	0,4	5	26,1	314,4	43	26,1	55,1	26,3	23,3	16
	Медіана	5,9	4,9	0,5	0,1	0,4	4,7	24,8	311	36,5	21	57,2	14,1	11,1	13,9
	Стандартне відхилення	0,5	0,4	1,69	0	0,1	1,9	7,2	120,9	24,6	16	14,8	38,3	35	9,4
	Суттєві значення	45	43	38	42	45	45	45	45	45	45	45	42	37	37
Звичайні поля	Середнє	6	5,2	2,7	0,2	0,6	5,6	18,7	262,3	42,4	64,1	74,1	30,5		11,7
	Медіана	6	5,2	2,7	0,2	0,6	5,6	18,7	262,3	42,4	64,1	74,1	30,5	-	11,7
	Стандартне відхилення	0,2	0,5	0,7	0,2	0,1	0,8	2,8	138,2	29,8	55,9	52,6	21,5	-	2,9
	Суттєві значення	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	2
Луки	Середнє	5,7	4,7	1	,	0,8	8,7	29,3	319,5	12,8	9,9	41,8	,		1
	Медіана	5,7	4,7	1	,	0,8	8,7	29,3	319,5	12,8	9,9	41,8	,		1
	Стандартне відхилення	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Суттєві значення	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
Загалом	Середнє	5,9	4,9	1,16	0,1	0,4	5,1	26,4	318,4	45,8	32,1	56,2	31,7	23,3	15,1
	Медіана	5,9	4,9	0,5	0,1	0,4	5	25,2	319,5	40,8	22,5	56,5	16,6	11,3	13,5
	Стандартне відхилення	0,5	0,4	1,59	0,1	0,1	1,9	7,4	117,7	27,3	30	17,1	39,5	34,5	9,3
	Суттєві значення	53	48	45	49	50	50	53	53	53	53	53	49	38	42

З табл. 1.2 можна зробити висновки, що рівень кислотності ґрунту у водяному розчині при всіх варіантах використання ґрунтів залишається однаковим на рівні 5,9–6. У випадку визначення кислотності в розчині солі KCl ґрунтовий розчин більш кислий і ступінь кислотності дорівнює 4,9–5,2. Рівень обмінної кислотності визначається шляхом взаємодії кислого ґрунту з

розчином хлориду калію, в результаті обміну калію на водень проявляється соляна кислота, при цьому рівень кислотності вище за 4, в нашому випадку складає 1–3. Рівень азоту найвищий у ґрунті на луках – 0,8 %, а найменший був виявлений на рисових полях – 0,4 %. Найвищий рівень ємності катіонного обміну – кількість катіонів, що може бути утримана ґрунтом в обмінному стані, характерний ґрунтам на луках – 29,3 ме/100 г, наступні – ґрунти на рисових полях – 26,1 ме/100 г, найнижчий рівень ємності катіонного обміну у ґрунтів, що використовуються для звичайного рослинництва – 18,7 ме/100 г. Ступінь насиченості основами ґрунту показує кількість обмінних основ до загальної суми обмінних катіонів, що входять до складу ґрунтово-поглинального комплексу. В досліджуваних ґрунтах рівень насиченості основами найвищий на звичайних полях і становив 74,1 %, на рисових полях – 55,1 % і на луках – 41,8 % [18].

Характеристика біомів забрудненої території свідчить, що більшість земель на забрудненій території – ліс. Просторовий розподіл лісів і типів ґрунту наведено на рис. 1.4. Сумарна площа лісу в області, яку першочергово було визначено як сильно забруднену ($\geq$ ^{134,137}Cs 1000 кБк/м^2) або, у формулюванні, становила 428 км^2, тобто 66 % площі (646 км^2), 4 % лісів у префектурі Фукусіма, 0,17 % лісів Японії та 0,11 % від загальної площі Японії [139].

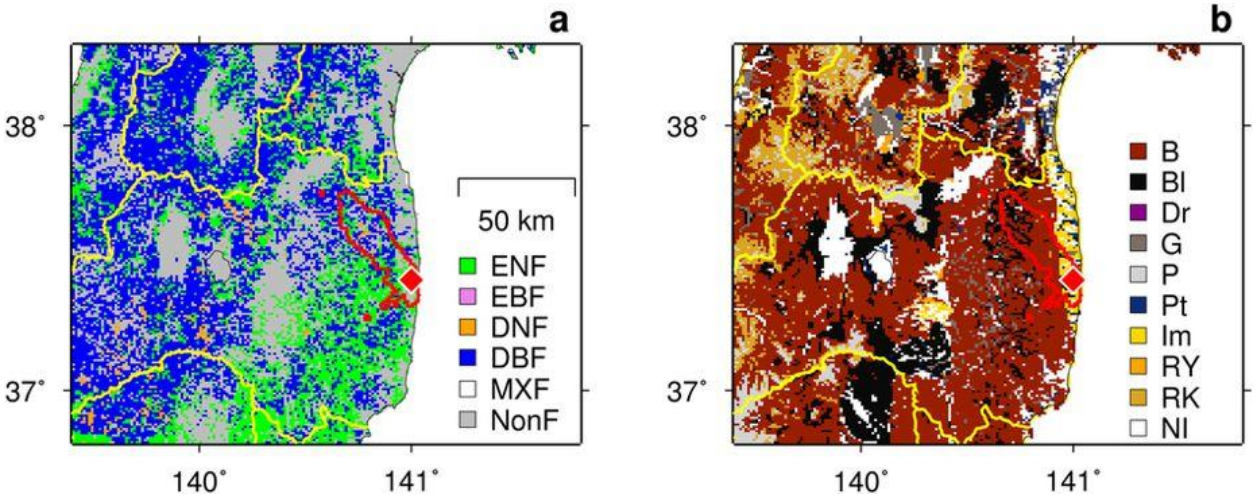


Рисунок 1.4. Характерисика екосистем у районі ФАЕС. Червоний алмаз – АЕС. Червона лінія – межа ЗВП ФАЕС. Жовті лінії – межі префектур. ENF: вічнозелені лісостепові ліси, EBF: вічнозелені широколистяні ліси, DNF: широколистяні лісові ліси, DBF: широколистяні ліси, MXF: змішані ліси, NonF: не ліс. B: бурі лісові ґрунти, Bl: чорні ґрунти, Dr: темно-червоні ґрунти, G: глейові ґрунти, P: підзолисті ґрунти, Pt: торф'яні ґрунти, Im: незрілі ґрунти, RY: червоні та жовті ґрунти, RK: скеля та сміття, NI: не класифіковано. *Джерело карти*: [150].

Домінуючими видами лісу були широколистяні ліси та вічнозелені лісові дерева. Широколистяні ліси були більш поширені в північній частині регіону, а вічнозелені лісові ліси – в південній частині. Існувала додаткова невелика площа листяних лісових лісів. Бурі лісові ґрунти (Cambisols і Andosols у класифікації Продовольчої і сільськогосподарської організації), найбільш поширений тип ґрунту в Японії, були найширше поширені в цій області, і бурий ґрунт (Andosols) і незрілий ґрунт (Regosols, Arenosols, Fluvisols і лептосолів). Чорний ґрунт поширений у північній частині області, а в південній частині – незрілі ґрунти.

Багато оцінок викидів радіонуклідів від аварії на ФАЕС було виконано з використанням установлених математичних моделей і методів і відповідних комп'ютерних кодів [124, 79, 324]. На ранній стадії аварії благородні гази ^{85}Kr і ^{133}Xe, з періодом напіврозпаду 10,76 року і 5,25 дня відповідно,

домінували в атмосферних викидах. Короткоживучий ^{131}I, з періодом напіврозпаду 8,02 дня, сприяв формуванню еквівалентних доз на щитоподібну залозу при потраплянні в організм або вдиханні. Довгоживучі ^{134}Cs і ^{137}Cs, з періодом напіврозпаду 2,06 року і 30,17 року відповідно, сприяли формуванню поглинутих доз через зовнішнє і внутрішнє опромінення. Хоча ^{131}I розпадається відносно швидко, він усе ж може призвести до відносно високих еквівалентних доз на щитоподібну залозу. У деяких районах ^{137}Cs мало мігрує і може продовжувати бути присутнім у навколишньому середовищі, і без деконтамінації може залишатися причиною формування високих ефективних доз для населення. Радіонукліди стронцію, рутенію і деяких актинідів (наприклад, плутонію) також вивільнялися в різних кількостях. Нейтрони були виявлені поблизу головних воріт АЕС (що знаходяться на відстані близько 1 км від 1–3 блоків), між 05:30 і 10:50 13 березня. Підраховано, що нейтрони походять від спонтанного ядерного поділу радіонуклідів, який міг би бути викликаний внаслідок пошкодження активної зони реактора. Таке явище було передбачуваним, і було зафіксовано наявність цих радіонуклідів на відносно низьких рівнях.

Благородні гази були значною частиною ранніх викидів з ФАЕС; за оцінками, було випущено близько 15,300 ПБк ^{133}Xe [256]. Середня активність ^{131}I, що вивільняється, становила близько 6.6×10^{-6}ПБк, а ^{137}Cs, за різними оцінками, від 12 ПБк [256] до 62,5 ПБк [313]. Викиди від аварії оцінюються приблизно як десята частина викидів від аварії 1986 року на ЧАЕС [311]. Більшість викидів були розсіяні по північній частині Тихого океану; як наслідок, кількість і ізотопний склад викиду неможливо підтвердити прямими замірами [86].

Для оцінки моделей диспергування радіонуклідів в атмосфері було використано багато теоретичних моделей. Проведено масштабні вимірювання концентрації активності ^{131}I, ^{134}Cs і ^{137}Cs у навколишньому

середовищі, у тому числі в повітрі, ґрунті, морській воді, донних відкладеннях і біоті, а також для оцінки дисперсії викидів. Напрямок транспортування радіоактивних викидів в атмосфері був переважно на схід і північ Японії, згідно з переважним напрямком вітру, а потім по всьому світу. Мережі високочутливого радіаційного моніторингу Європи та Північної Америки виявили надзвичайно низький рівень радіоактивності повітря, що пояснюється значними відстанями до джерела викиду. Однак вплив цих викидів на рівень глобальної екологічної фонової радіоактивності був незначний [160].

Схеми осадження радіонуклідів на територію суші (окремо від тих, що випали на акваторію океану) сильно варіювали, бо залежали від впливу дощу, снігопадів та інших місцевих або регіональних умов, таких як рельєф і тип землекористування. Іншими факторами, що вплинули на структуру осадження в наземному середовищі, були різні фізико-хімічні характеристики йоду та цезію. Найбільше ^{137}Cs було виявлено на північному заході від ФАЕС, де його загальне відкладення на поверхні суші Японії оцінювалося приблизно в 2–3 ПБк [160].

Щільність забруднення зменшується із часом через фізичний і розпад і перерозподіл радіонуклідів в екосистемі. Цезій відносно легко мігрує у навколишньому середовищі завдяки розчинності його сполук. Погодні ефекти, такі як вітер і дощ, та інші впливи на навколишнє середовище можуть змінювати концентрацію цезію в навколишньому середовищі у більший чи менший бік за час, коротший, ніж його період напіввиведення.

Найвищі рівні депонованого ^{131}I перевищували 3 МБк/м^2 безпосередньо після аварії, але внаслідок короткого періоду напіврозпаду цього радіонукліда рівні знижувалися швидко і більше не підлягали вимірюванню [160].

1.3 Роль мікроорганізмів в біотичних колообігах речовин

Десятиліття ядерної діяльності призвели до формування пулу радіонуклідного забруднення навколишнього середовища, що, зокрема, істотно змінило ставлення людей до середовища свого існування і поводження з відходами. Підвищені концентрації урану й інших радіонуклідів сформувалися у регіонах, де проводився виробіток урану, на ділянках, де відбувається його збагачення, а також у регіонах ядерних катастроф. Ця контамінація потенційно являє собою неконтрольоване джерело випромінювання, і тому важливим є вивчення джерел і можливостей контролю за їх розповсюдженням.

1.3.1 *Перерозподіл елементів ядерного палива*

Безперечно, найбільшу увагу дослідників привернула взаємодія мікроорганізмів з елементами ядерного палива. Одним з найперших відкриттів у цій галузі стало виділення екстремально-радіостійкого виду бактерій *Deinococcus radiodurans* [56], знайденого в уранових шахтах. За понад пів століття, що минули, опубліковано багато робіт, присвячених саме взаємодії мікроорганізмів з ураном та продуктами його розпаду.

Мікробні взаємодії з ураном та іншими радіонуклідами широко документовані [248, 208, 212, 210]. Більшість авторів приділяє увагу саме урану і продуктам його розпаду через надзвичайну важливість цього елемента і широке його використання в якості ядерного палива, а проблема поводження з продуктами його розпаду виявляється надзвичайно цікавою для дослідників. Значний інтерес викликає такий біотехнологічний метод, як використання мікробних механізмів «біовилуговування» для вилучення урану з низькосортних руд [273, 260]. Запобігання неконтрольованої дисперсії і перенесення радіонуклідів у підземних водах є головною метою реабілітації на багатьох ядерних об’єктах. Можливість за допомогою

мікроорганізмів перевести уран до нерозчинних у воді форм може забезпечити відносно недороге і нескладне у виконанні рішення як для економії радіонукліда, так і для запобігання забрудненню.

Біоредукція. При відсутності кисню, бактерії здатні використовувати різні електронно-акцепторні механізми для отримання енергії для обміну речовин. У міру розвитку аноксичного стану найбільш енергетично вигідна послідовність акцепторів електронів виглядає наступним чином: відновлення нітрату, потім протікає через Mn (IV), Fe (III) і сульфат, і, нарешті, розклад до діоксиду вуглецю і продукування метану. Маючи на увазі цю послідовність, що є типовою для нормальних умов навколишнього середовища, слід зазначити, що при певних ситуаціях, наприклад, при достатній кількості органічної речовини, відновлення нітрату і металів, а також металу у сульфідів потенційно можуть відбуватися одночасно [353].

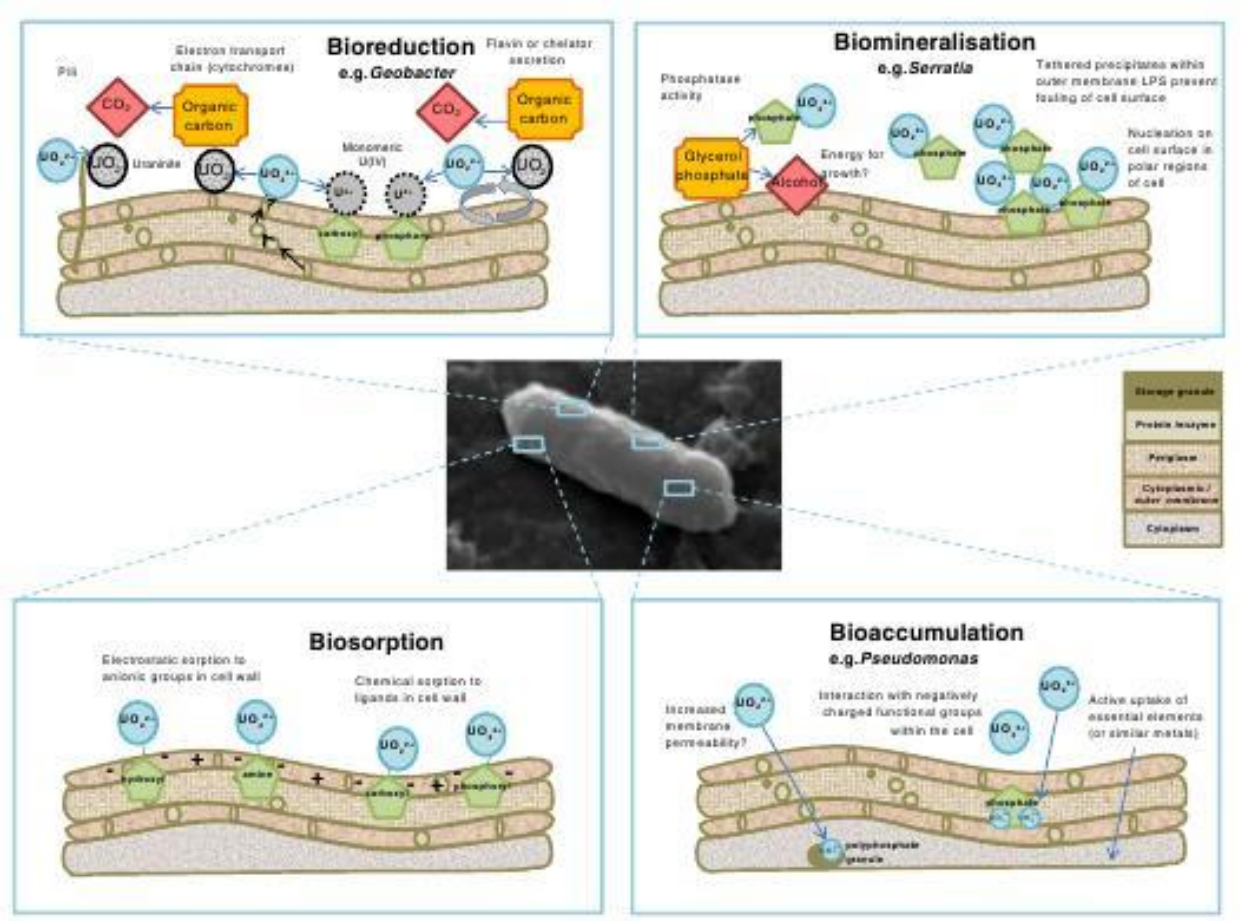


Рисунок 1.5. Механізми взаємодії урану з мікроорганізмами (цит. за [17]). Біоредукція [23, 24], біомінералізація [25], біосорпція [26], біоакумуляція [27]. При нейтральному pH U(VI) має аналогічну окислювально-відновну пару електронів, як і в Fe (III), і Fe (IV), отже, за відсутності ресурсів бактерії здатні використовувати U (VI) в якості альтернативного акцептора електронів, перетворюючи його в нерозчинний U (IV) [213]. Інші групи, здатні до біоредукції U (VI), включають у себе сульфатредукуючі бактерії [215], ферментативні бактерії [357], кислотно-толерантні бактерії [303]та ін.

Біоредукція урану була запропонована як технологія біоремедіації шляхом додавання донора електронів для сприяння ферментативного переведення водорозчинного U (VI) до нерозчинного U (IV). Це було продемонстровано в лабораторних експериментах [352, 200], а також *in situ* в США [359]. Як правило, вважається, що фінальною формою біоредукованого урану є ураніт [UO_2] [141], проте, останнім часом є свідчення і про інші форми U (IV) [248]. Більшість груп, що досліджують це питання,

зосередилася на видаленні водної фракції U (VI) з розчину, проте U (VI) може бути присутнім в твердій фазі або сорбованим з ґрунтових вод, що присутні на території уранових копалин. Потенційною проблемою, пов'язаною з використанням біоредукції як методу реабілітації водного середовища від залишків U (IV) або трансуранових елементів, є необхідність забезпечення стабільного виходу забруднених вод протягом тривалого часу, в тому числі запобігання змін умов навколишнього середовища, наприклад, збільшення окиснювального потенціалу території, де проводиться біоредукція [298].

Біомінералізація належить до процесу осадження металів з мікробіологічно генерованими лігандами, такими як сульфід або фосфат, або як карбонати, або гідроксиди, у відповідь на локальне створення лужних умов на поверхні клітини. Біомінералізація урану була показана з використанням одного виду *Citrobacter* [219], надалі класифікований як вид *Serratia*. При інкубації з фосфатом гліцерину у клітині розщеплюються фосфатази органічного фосфату з генерацією неорганічного фосфату, який осаджується з U(VI) в якості позаклітинної речовини в формі уранілу фосфатних мінералів [HUO_2PO_4]. Це також було продемонстровано з використанням ізоляту із сайту МЕ США Oak Ridge [69]. Мікробні клітини, які були повністю покриті ураніл фосфатними мінералами, спостерігаються в урановмісних ґрунтах. Це доводить, що біомінералізація урану може відбуватися і природним чином [240].

Простішим підходом було б додавання неорганічного фосфату безпосередньо до забруднених ураном ґрунтових вод, тим не менш, фосфат має дуже високу реакційну здатність, і, ймовірно, швидко випаде в осад при взаємодії зі звичайними металами, розчиненими у воді, що призведе до засмічення і обмеження розбавлення у навколишньому середовищі. Стимуляція бактеріальної активності фосфатази щодо звільнення фосфату в

контрольованих умовах обмежує надходження фосфату до системи на рівні швидкості бактеріального гідролізу фосфорорганічних сполук, що дозволить уникнути закупорки місця уприскування з фосфатних мінералів. Крім того, біомінералізація є зазвичай більш ефективною, ніж хімічне осадження в розведених розчинах, оскільки ліганди, зосереджені поблизу поверхні клітини, забезпечують структуротворення і потрібну для осадження концентрацію [209]. Потенційна проблема біомінералізації в тому, що швидке осадження металів навколо поверхні клітини в принципі може створити бар'єр для клітинного метаболізму, хоча це безпосередньо не спостерігається [209].

Біоакумуляція. Мікробні клітини також здатні накопичувати широкий спектр іонів металів через механізми «біоакумуляції». З деякими металами може статися випадкова акумуляція через те, що вони є аналогами до фізіологічно важливих, необхідних для функціонування клітин. Уран не має відомої біологічної функції, і було висловлено припущення, що проникнення урану може статися за рахунок підвищеної проникності мембрани через токсичність металу [316]. Майже в усіх опублікованих роботах уран у клітині спостерігався в ураніл фосфатів у видів *Pseudomonas* [179, 342], хоча в одній з робіт було виявлено біоакумуляцію урану в *Arthrobacter ilicis* [316]. Незважаючи на академічний інтерес, існує небагато свідчень того, що біоакумуляція урану буде життєздатним методом для біоремедіації забруднених земель чи вод.

Біосорбція описує пасивне поглинання урану на поверхнях живих або мертвих бактеріальних клітин. Грампозитивні і грамнегативні мембрани бактеріальної клітини мають електронегативний заряд, тому здатні залучити катіони металів, які сорбуються на поверхні [209]. Біосорбція найкраще підходить для обробки стічних вод з низькою концентрацією металів, оскільки зв'язування на клітинній стінці відбувається швидше, ніж

поглинання в клітину, і його легше видалити з поверхні клітин для регенерації біосорбенту [244].

Життя прокаріотів переважало більшу частину еволюційної історії нашої планети, еволюціонуючи, займаючи практично всі доступні екологічні ніші. Екстремофіли, особливо ті, що процвітають у різних крайнощах, представляють ключову область досліджень для багатьох дисциплін, починаючи від вивчення адаптації до суворих умов до біогеохімічного колообігу елементів. Дослідження екстремофілів також можуть бути корисними для пошуків походження життя та пошуку життя на інших планетарних та небесних тілах [234].

Вивчення біорізноманіття екосистем, що функціонують в екстремальних умовах, є надзвичайно важливою галуззю біологічної науки, адже дає змогу відкривати нові природні механізми захисту біоти від забруднення навколишнього середовища полютантами, підвищення резистентності живих організмів до уражуючих чинників. У цьому сенсі вивчення біорізноманіття антропогенно створеного об’єкта з надзвичайно високими дозами різних типів іонізуючого випромінювання дає змогу дослідити шляхи, якими біота може пристосовуватися до стресових умов, і, можливо, навіть адаптувати деякі з них для використання людиною з метою ремедіації забруднених радіонуклідами територій. Мікроорганізми виробляють механізми, що уможливлюють їх резистентність до підвищеної дії іонізуючого опромінення – в тому числі напрацьовують екзополімерні сполуки та змінюють малюнок синтезу білкових речовин [77, 382].

На теперішній час внутрішній простір ОУ ЧАЕС залишається мало дослідженим біологами, хоча вивчення фізичного і хімічного стану відбувалося доволі інтенсивно [2]. Через високі дози іонізуючого випромінювання, велику кількість бюрократичних перепон при доступі до ОУ, пов’язаних з небезпекою пересування всередині нього, лише двом

дослідницьким групам біологічного напряму, окрім колективу авторів, вдалося отримати зразки зсередини і вивчити їх біологічну компоненту. Так, на початку 1990-х група дослідників під керівництвом Н.М. Жданової вивчила мікоценоз ОУ, а згодом установила ефект стимуляції продукції меланіну у мікроскопічних грибів [47, 45, 118]. Також під керівництвом В. Б. Рибалки було продемонстровано здатність окремих представників виду *Bacillus* до акумуляції урану з ядерного палива [41]. Вивчення загального біорізноманіття бактеріальної мікрофлори досі не було проведено.

Водночас, за минуле десятиліття відбулося інтенсиве вивчення бактеріальної спільноти басейнів витримки відпрацьованого ядерного палива: дослідження спільнот проводилися у сховищах мокрого типу АЕС Кофрентес (Валенсія, Іспанія) [98], Селафілді [112], АЕС Медрас (Калпаккам, Індія) [171, 172], сховища в Саванна-Рівер (Саванна-Рівер, США) [293], АЕС Богуніце (Богуніце, Словаччина) [330]. Дослідники виділяють з колись чистої води, відібраної у сховищах, культури мікроорганізмів, здатних формувати біоплівки на сталевих поверхнях. Також деякі з культур [112, 330] показують здатність акумулювати радіоактивні цезій і кобальт з водних розчинів. Примітно, що ідентифіковані мікроорганізми не належать до якогось конкретного виду чи сімейства. Так, наприклад, у Селлафілді цезій-акумулюючі культури належать до виду *Serratia*, а в Богуніце – *Micrococcus*, *Kocuria* і *Pseudomonas*, що вказує на здатність бактеріальних штамів адаптуватися до умов навколишнього середовища, розвиваючи необхідні в поточній ситуації здатності.

Середовище, що сформувалося у внутрішніх приміщеннях ОУ, є унікальним внаслідок, з одного боку, екстремальних умов, що склалися всередині нього, а з іншого – невеликого з еволюційної точки зору проміжку часу, протягом якого могли формуватися екосистеми. Дослідження мікрофлори всередині зруйнованого енергоблока можуть дати і більш

практичні результати – так, наприклад, відомо, що корозійні мікроорганізми істотно прискорюють руйнування конструкцій з металу [78, 201], бетону [206, 390] і захисних оболонок конструкцій [386].

Маючи досить невеликий і нескладно організований геном, переважна кількість представників царства Бактерії мають дивовижну стійкість до впливу несприятливих факторів навколишнього середовища [274, 368, 110, 56]. У той же час мікробіом, як інтегральна сукупність індивідів, чутливо реагує на найменші зміни навколишнього середовища, зокрема зміна температури на один градус може викликати суттєві зрушення у видовій структурі угруповання [217], що дозволяє припустити, що такий потужний мутагенний фактор, як іонізуюче випромінювання, може мати істотний вплив на його стан.

Джерела випромінювання включають УФ-випромінювання, рентгенівські промені, гамма-промені та, загалом, космічні промені. Ці різні типи іонізуючого випромінювання, зокрема УФ- та гамма-промені, можуть впливати на мікробні клітини за допомогою прямих та непрямих (наприклад, утворення активних форм кисню) механізмів. Потім реактивні форми кисню можуть пошкодити ДНК, білки, ліпіди та РНК, окрім того, що ініціюють реакції типу Фентона всередині клітини через вивільнення Fe^{2+} з кластерів Fe–S [348]. Показано, що стійкі до радіації мікроорганізми протистоять до 30 кГр γ-випромінювання [77], у випадку термофільної бактерії *Thermococcus gammatolerans* EJ3 [169] та мезофільної бактерії *Deinococcus hohokamensis* [276] і 100–1000 Дж / м^2 UV254 у ксеротолерантній бактерії *Psychrobacter pacificensis* L0S3S-03b [196]. Один із перших виділених стійких до радіації мікроорганізмів – *Deinococcus radiodurans*, який був добре вивчений і розглядався як модельний організм для розуміння радіаційної толерантності [190]. Крім того, ці мікроорганізми часто є поліекстремофілами [137, 348].

Багато екосистем на Землі зазнають впливу певного типу випромінювання, до того ж найекстремальніші дози отримуються у техногенних радіоактивно забруднених місцях. Вони коливаються від 0,5 Бк / кг на Великих озерах, США [331], до 109 Бк / кг на місці Ханфорд, Річленд, Вашингтон, США [137]. Крім того, випромінювання можна виявити в підземних середовищах унаслідок радіоактивного розпаду радіогенних ізотопів (наприклад, ^{238}U, ^{232}Th та ^{40}K), який також може бути відповідальним за виробництво радіолітичного водню [121], потенційно підтримуючи мікробну продуктивність in situ. Дійсно, гіпертермофільний та толерантний до радіації археон був виділений (*Thermococcus gammatolerans* EJ3) із глибоководного гідротермального середовища, розташованого в східній частині Тихого океану, де відбувається природна радіоактивність (^{210}Pb, ^{210}Po, ^{222}Rn)[169]. Існує кілька ізольованих мікроорганізмів, які можуть пережити вплив екстремального випромінювання (kGy), включаючи вплив космічних умов протягом сотень днів [196]. УФ-випромінювання, ймовірно, впливало на еволюцію життя, особливо під час Архейського моря, коли озоновий шар ще не розвивався у верхніх шарах атмосфери через брак атмосферного O_2. У цей час також існували інтервали, в яких утворювалося органічно помутніння, яке виробляється фотохімічно, створюючи УФ-захист [60]. Таким чином, найдавніше життя мусило би боротися з періодами інтенсивного УФ-випромінювання, поки кисневі фототрофи після Великої події окиснення (приблизно 2,8–2,4 Гр) виробляли достатню кількість O_2. Якщо коротко, то через фотохімічні реакції довжини хвиль ультрафіолетового випромінювання (< 242 нм) можна встановити захисний шар озону, таким чином запобігаючи проникненню значної кількості випромінювання короткої довжини хвилі (< 290 нм) на поверхню [89, 267]. Імовірно, що мікроорганізми мали виробити необхідну стійкість як до УФ, так і до іонізуючого випромінювання. Дійсно, модельні експерименти

демонструють, що діапазон довжин хвиль 200–300 нм був на кілька порядків вищим приблизно на 4–3,5 Гр порівняно з нинішніми рівнями [99, 100], і, як згадувалося раніше, *T. gammatolerans* EJ3 був виділений із середовища з природною радіоактивністю [169]. Мікробні пристосування до випромінювання включають більше копій геному для надмірності геному [59], зміни функцій відновлення ДНК [190], конденсований нуклеоїд [59], використання менших амінокислот кислоти [300], накопичення Mn (II) [109], вироблення пігментів [238] та багато іншого, як описано в інших місцях [59, 276]. Ці пристосування видно на всьому мікробному дереві життя; наприклад, два мутанти *Halobacterium sp*. NRC-1, який може переносити екстремальні рівні радіації (LD50 > 11 кГр), мав підвищену регуляцію білкового комплексу, який, як відомо, бере участь у відновленні, реплікації та рекомбінації ДНК [116]. Цей комплекс тісно пов’язаний з археальним та еукаріотичним білками, відомими як RPA (реплікаційний білок А), та з бактеріальним білком SSB (одноланцюговий ДНК-зв’язувальний білок). Незважаючи на те що радіаційна стійкість спостерігалася в Археях, Бактеріях та Еукаріотах, походження та еволюція таких пристосувань до радіації ще не визначена.

1.3.2 *Міграція стронцію у природних забруднених екосистемах*

Кілька досліджень продемонстрували біомінералізацію стронцію за допомогою осадження карбонату стронцію або метаболізування кальциту мікроорганізмами, включаючи *Pseudomonas fluorescence* [57], епілітичні ціанобактерії [130], *Halomonas* [52], *Sporosarcina pasteurii* (раніше *Bacillus pasteurii*) [131], а також нативні ґрунтові бактерії [140]. У більшості випадків це відбувається за рахунок карбонатної редукції, пов’язаної з гідролізом сечовини уреолітичними бактеріями в присутності кальцію. Альтернативні

методи біоремедіації, запропоновані для стронцію, містять уловлювання таких металів, як барій, стронцій за допомогою зелених водоростей [189] шляхом включення в біогенний гідроксиапатит, створюваний *Serratia* sp [147]. Також для залишків Tc (VII), що використовується в терапії пухлин, застосовують біоремедіацію, що спричиняє підвищення рівня нітратів у ґрунтах через мікробіологічно викликане збільшення pH та лужності під час біоредукції [328, 329].

1.3.3 *Перерозподіл цезію в екосистемах*

Цезій є лужним металом зі слабкою здатністю до утворення комплексів із лігандами, але його хімічна схожість із біологічно важливим лужним катіоном K^+ уможливлює високий рівень внутрішньоклітинного накопичення метаболізм-залежними шляхами. Мікробне поглинання Cs^+ (K^+), як правило, пов'язане із транспортними системами, специфічними для моновалентних катіонів, розташованими на плазматичній мембрані. Ці системи сильно розрізняються за специфічністю для різних лужних катіонів, і тому для мікроорганізмів характерні великі відмінності у здатності до накопичення Cs^+. Є дані щодо того, що рівні транспортування іонів Cs^+ і K^+ схожі, інтенсивність транспортування першого у деяких мікроорганізмів іноді навіть більша [62]. На мікробне накопичення іонів цезію помітно впливає наявність зовнішніх катіонів, наприклад, K^+, Na^+, NH_4^+ і H^+, і, як правило, супроводжується приблизним стехіометричним обміном для внутрішньоклітинного K^+ [63, 203].

Стабільний ізотоп цезію (^{133}Cs) є найрідкіснішим з лужних металів [63, 203]. Природні концентрації цезію можуть значно відрізнятися в різних середовищах. Ґрунти і седименти зазвичай містять від 0,3 до 25 мкг цезію на 1 г, у той час як у водних екосистемах він знаходиться в більш розведеному стані – приблизно 0,01–1 мкг цезію на 1 мл для прісноводних водойм і

приблизно 0,5–2,0 мкг ^{137}Cs на 1 мл для морів та океанів [203]. Широке забруднення навколишнього середовища радіоізотопами цезію після випробувань ядерної зброї в 1950–1960-х, контрольовані й випадкові викиди, що досі мають місце, аварійні ситуації та аварії на атомних електростанціях викликають значний інтерес із приводу поведінки цього радіонукліда в біотичних та абіотичних компонентах навколишнього середовища [63, 62]. Такі особливості, як порівняно довгий період піврозпаду радіоізотопу ^{137}Cs (~30 років) і висока розчинність у воді, призводять до високого рівня доступності елемента для живих організмів протягом багатьох років після його надходження в навколишнє середовище [63, 203].

Початковий розподіл ^{137}Cs між наземними та водними екосистемами залежить насамперед від джерела викиду. Об'єми, накопичені океаном у результаті осадження радіонукліда атмосферними опадами, приблизно у два рази вищі, ніж накопичені на суходолі, хоча локальні рівні забруднення широко варіюють. Контрольовані викиди із підприємств атомної промисловості це, в основному, рідкі скиди (практично не призводять до надходження радіоактивних частинок у повітря), що скидаються прямо в море (характерно для АЕС, розташованих на узбережжі, як, наприклад, «Фукусіма-1») або в замкнуті водні екосистеми (наприклад, водойми-охолоджувачі), які найчастіше виступають у якості кінцевого «сховища» радіоактивних відходів [63, 203]. Значна частина ^{137}Cs у навколишньому середовищі, як правило, зв'язується компонентами ґрунту або седиментів [249, 11], решта його залишається в розчинній формі, що підвищує доступність для біоти. Накопичення радіоцезію вищими організмами істотно залежить від ряду факторів (pH ґрунтового розчину, наявність і концентрація K^+, кількість органічної речовини, дрібнодисперсних фракцій ґрунту та ін.). Накопичений ^{137}Cs може бути згодом переданий трофічними ланцюгами до людини [63, 203].

1.4 Радіостійкість мікроорганізмів

Уперше радіостійкі бактерії *Micrococcus radiodurans* були виділені в 1956 році із консервованого м'яса після стерилізації іонізуючим опроміненням [56]. Пізніше, при вивченні впливу γ-випромінювання (0,5–8,0 кГр) на мікрофлору тканин пікші (риба родини тріскових), було виділено коки, що утворюють помаранчово-коричневі колонії *Micrococcus radiopugnans* [110]. При опроміненні різних матеріалів високими дозами γ-радіації було ізольовано радіостійкі штами *Micrococcus* [259]. Крім того, було описано різні види радіостійких бактерій, виділених із природних біотопів: вивітреного граніту в Антарктиді [101], з радіоактивних гарячих джерел, із глибоководного термального морського джерела [119].

У 1981 році радіостійкі бактерії було вилучено із роду *Micrococcus* і *M. radiodurans* і перейменовано у *Deinococcus radiodurans*. У подальшому рід *Deinococcus* і родину *Deinococcaceae* було узаконено [82], як і види *D. radiodurans*, *D. radiophilus*, *D. proteolyticus*, *D. radiopugnans*.

Таким чином, вищенаведені дані свідчать, що радіостійкі бактерії було ізольовано або з місць з екстремальними умовами існування (підвищений рівень іонізуючої радіації, температури, відсутність вологи, висока концентрація солей), або після γ- і рентгенівського опромінювання природних субстратів [119, 259, 56].

Водночас є відомості, що в природних умовах у бактерій, які були під впливом іонізуючої радіації, може підвищуватися стійкість до опромінення [271]. Так, мікроорганізми, виділені з радонових мінеральних джерел більш стійкі до радіації, ніж представники тих же видів, котрі трапляються у нерадіоактивних екосистемах [цит. за 12]. Проте малоймовірно, що екстремальна радіостійкість виникла в бактерій як результат мутагенної дії природних стресових чинників, адже ступінь радіостійкості деяких бактерій

значно перевищує граничний рівень іонізуючої радіації, з яким вони зустрічаються в природі.

Бактерії роду *Deinococcus* вивчено найповніше. Аналіз нуклеотидних послідовностей 16S рРНК свідчить, що еволюційно деінобактерії вкрай віддалені як від інших, добре охарактеризованих мікрококів, так і від *Escherichia coli* і *Bacillus subtilis* [152]. Проведені хемотаксономічні і молекулярно-генетичні дослідження довели філогенетичну спорідненість родів *Deinococcusi Thermus*, що було згодом показано аналізом майже повного сиквенсу 16S рРНК. Пізніше для уточнення таксономічного положення радіостійких бактерій вивчали послідовності 16S рРНК у всіх описаних до цього часу видів роду *Deinococcus* (*D. erythromyxa, D. radiodurans, D. radiophilus, D. proteolyticus, D. radiopugnans*) і єдиного виду роду *Deinobacter* (*D. grandis*) [349, 275]. Було показано, що деінококи формують компактний філогенетичний кластер, споріднений з лінією *Thermus-Meiothermus*.

Екстремально радіорезистентну бактерію *Arthrobacter radiotolerans* було ізольовано з радонових радіоактивних гарячих джерел Японії. Згодом, у 1988 році на підставі ряду хемотаксономічних характеристик (унікальні розгалужені жирні кислоти) *Arthrobacter radiotolerans* було виділено у самостійний рід *Rubrobacter* і рекласифіковано як *Rubrobacter radiotoler ns.* Порогова доза γ-випромінювання для клітин *R. radiotolerans* у логарифмічній фазі росту – 6 кГр і летальна доза – 10 кГр. Загалом летальна доза γ-випромінювання для *R. radiotolerans* більш висока, ніж для інших бактерій (за винятком *Deinococcus*) [291].

Японські дослідники H. Ito та H. Iizuca виділили зі старого японського рису, неочищеного від плівки, штами радіорезистентних бактерій *Methylobacterium radiotolerans* (*Pseudomonas radiora*) 0−1 і 0−2, $ЛД_{90}$ для яких становила 2 кГр [365].

Певний інтерес викликає вивчення радіостійкості у колекційних штамів бактерій, які було ізольовано зі зразків, що попередньо не опромінювались, або із незабруднених радіонуклідами екосистем. Було показано, що при γ-опромінюванні колекційних штамів еубактерій *E. coli*, *Thermotoga maritima*, *Thermodesulfobacterium* $ЛД_{90}$ для них складала 0,2–0,5 кГр [16]. Порівнюючи результати γ-опромінення штамів екстремально галофільної бактерії *Halobacterium salinarium*, сіркоокислюючої бактерії *Thiobacillusintermedius* та *Escherichia coli* B/r, було встановлено, що $ЛД_{37}$ (радіочутливість клітин, визначається на експоненціальному відрізку кривої виживання як доза, при якій виживає 37 % клітин) становила для них: 0,39, 0,15, 0,09 кГр; при УФ-опроміненні $ЛД_{37}$ складала величину, відповідно, 212, 38 і 10 Дж/м^2 [301]. Під час дослідження стійкості до іонізуючого випромінювання деяких оліготрофних бактерій було встановлено, що $ЛД_{50}$ формувалась для *Pedodermatophilus halotolerans* при потужності дози 0,27 кГр/год; для *Flectobacillus major* – 0,173 кГр/год; для *Arcocella aquatica* – 0,21 кГр/год [283]. Високочутливими до іонізуючого випромінювання були еутрофи: *Pseudomonas fluorescens, E. coli* ($ЛД_{50}$ = 0,043 і 0,038 кГр/год відповідно). На жаль, у цій роботі було використано нестандартну розмірність доз опромінювання (замість поглинутої дози в кГр було використано потужність поглинутої дози в кГр/год), тому ці дані важко порівняти з іншими.

Для колекційних штамів архебактерій *Desulfurococcus amylolyticus* і *Thermococcus stetteri* (термофільні сіркозалежні анаероби) $ЛД_{90}$ і сублетальна доза γ-випромінювання становили 5–6 і 8–9 кГр відповідно [16].

Для порівняння наведемо дані щодо радіостійкості деяких видів мікроміцетів. Так, темнозабарвлені мікроскопічні гриби, що містять меланіновий пігмент, особливо стійкі до іонізуючої радіації, $ЛД_{90}$ різних штамів *Aureobasidium pullulans* становить 6–8 кГр, *Cladosporium* sp. – 5 кГр,

Dendriphium macrosporoides 7384 – близько 4 кГр [392]. Таку високу стійкість може бути порівняно тільки з резистентністю *D. radiodurans*.

Проведений аналіз даних літератури показав, що філогенетично і таксономічно радіостійкі бактерії не взаємопов'язані. Рід *Deinococcus* представлено радіостійкими бактеріями, що утворюють кластер, філогенетично близький до лінії *Thermus – Meiothermus*. Інші радіостійкі бактерії є представниками родів *Rubrobacter, Methylobacterium, Kocuria, Bacillus* і деяких архебактерій [57].

Найбільш вивчена серед них група деінококів є філогенетично чіткою лінією прадавнього походження, ці дані ґрунтуються на даних сиквенсу 16S рРНК. Як сказано вище, деякі колекційні штами архебактерій (*Desulfurococcus amylolyticus і Thermococcus stetteri*) також виявилися радіостійкими [365]. Проте навіть на ранньому етапі формування Землі не було таких високих доз іонізуючої радіації, що можуть витримувати радіорезистентні бактерії [355].

Аналіз властивостей радіорезистентних бактерій показує, що вони спроможні переживати й інші екстремальні умови навколишнього середовища. Зокрема, з певною мірою вірогідності можна говорити про взаємозв'язок у бактерій між гіпертермофілією й екстремальною радіостійкістю. Як сказано вище, було проведено хемотаксономічні і молекулярно-генетичні дослідження, що довели філогенетичну спорідненість родів *Deinococcus* і *Thermus* [355].

Для представників *Thermus*, за наявними нам даними, не досліджено стійкість до іонізуючої радіації. Проте є відомості про виняткову радіорезистентність екстремально термофільних архебактерій. Описано гіпертермофільний радіостійкий штам *Pyrococcus furiosus*, здатний рости при 70–103°С [392]. Більше того, хромосома *P. furiosus* (2 млн пар нуклеотидів), зруйнована γ-опромінюванням ^{60}Co (доза 2,5 кГр) на фрагменти від 500 до

30 тис. пар нуклеотидів, цілком відновлювалася при 95 °С. Наприклад, O. White et. al. [349] вважають, що у *P. furiosus* функціонує активний механізм рекомбінаційної репарації ДНК, а може бути важливим для виживання клітин за високих температур. Можливо, цей механізм подібний до репараційних механізмів *D. radiodurans,* що забезпечує виживання цієї бактерії в умовах потужного γ-опромінювання.

Інший вид *Pyrococcus abyssi*, гіпертермофільна глибоководна морська архебактерія, виживає після γ-опромінювання у дозі 11 кГр. Зі зразків, відібраних у каліфорнійській затоці та в середньому районі Атлантичного кряжу, було виділено культури анаеробних хемоорганотрофів, що ростуть за температури 85 °С. Шляхом сиквенування 16S рРНК встановлено їх належність до роду *Thermococcus*. З'ясувалося, що ці ізоляти більш стійкі до γ-опромінювання, ніж *Pyrococcus abyssi*, і три з них були близькі за радіостійкістю до *Deinococcus radiodurans* [349].

Однак два досліджуваних *штами* термофільних еубактерій *Thermodesulfobacterium* P1 та *Thermotoga maritima* 2706 (перший з них ріс за 74 °С, другий – за 86 °С) виявилися радіочутливими [16], тобто не всі термофільні бактерії однаковою мірою стійкі до іонізуючої радіації. Водночас відомо, що деякі радіорезистентні бактерії характеризуються екстремальною стійкістю до висушування.

1.5 Радіобіологічні аспекти формування мікробних угруповань у зонах радіоактивного забруднення

Іонізуюче випромінювання є одним із найпотужніших селективних факторів, що формують структуру мікробних угруповань у радіаційно забруднених екосистемах. Основні радіобіологічні ефекти на мікроорганізми включають пряме пошкодження ДНК, утворення активних форм кисню (АФК) та окисне пошкодження клітинних компонентів [381, 233].

1.5.1. Механізми радіорезистентності мікроорганізмів

Радіорезистентність мікроорганізмів визначається комплексом адаптивних механізмів, серед яких ключову роль відіграють:

Системи репарації ДНК. Радіорезистентні бактерії, зокрема представники роду *Deinococcus*, характеризуються надзвичайно ефективними системами репарації подвійних розривів ДНК. *D. Radiodurans* здатен витримувати дози опромінення до 15 000 Гр без втрати життєздатності завдяки унікальній системі RecA-залежної гомологічної рекомбінації та розширеному набору ферментів ексцизійної репарації [64]. Геномні дослідження виявили у радіорезистентних видів множинні копії генів *recA*, *uvrABC*, *polA*, що забезпечує швидку та точну репарацію радіаційних пошкоджень [190].

Антиоксидантний захист. Критичним фактором радіорезистентності є здатність нейтралізувати АФК, що утворюються при радіолізі води. Встановлено, що *Deinococcus* spp. накопичують високі концентрації Mn^{2+} (до 0.3 мМ на клітину), який формує комплекси з ортофосфатом та пептидами, забезпечуючи ефективний захист білків від окисного пошкодження [64]. Співвідношення Mn/Fe у радіорезистентних бактерій може перевищувати 300:1, тоді як у радіочутливих видів воно становить близько 0.2:1 [108].

Актинобактерії роду *Rubrobacter*, що також демонструють високу радіорезистентність (D_{10} = 1000-5000 Гр), використовують альтернативну стратегію захисту через синтез каротиноїдних пігментів та формування потовщеної клітинної стінки [51].

Компактизація нуклеоїду. Радіорезистентні бактерії характеризуються унікальною організацією нуклеоїду у вигляді тороїдальної структури, що мінімізує відстань між гомологічними ділянками ДНК та прискорює процес репарації [371, 387].

1.5.2. Вплив хронічного опромінення на структуру мікробних угруповань

Дослідження мікробіомів у зонах радіоактивного забруднення демонструють чіткі закономірності зміни таксономічної структури залежно від рівня радіації.

ЧЗВ. Метагеномні дослідження ґрунтів Чорнобильської зони відчуження свідчать, що радіонуклідне забруднення може бути пов'язане зі змінами структури прокаріотних угруповань, однак ці зміни не є наслідком лише дозового навантаження. Для траншеї Т22 показано, що склад прокаріотних угруповань модулювався як сумарною поглинутою дозою, так і вмістом органічної речовини; при цьому в забруднених траншейних ґрунтах різноманіття було вищим, ніж у ґрунтах поза траншеєю. Натомість у дослідженні Рудого лісу ефект опромінення на ґрунтовий мікробіом був мінімальним порівняно з властивостями ґрунту та історією екологічних порушень [326, 233].

ЗВП ФАЕС. У ґрунтах, забруднених ^{137}Cs після аварії на АЕС Фукусіма-1, показано нижчі показники альфа-різноманіття в найбільш забруднених зразках та підвищену відносну представленість таксонів, споріднених із радіостійкими бактеріями, зокрема *Geodermatophilus*. Водночас автори наголошують, що для коректного порівняння необхідно контролювати тип ґрунту, рослинність та історію землекористування. [317].

Уранові родовища. Мікробіоми природних уранових родовищ характеризуються екстремально високою часткою радіорезистентних таксонів. У відвалах уранових шахт Бразилії виявлено, що до 45% бактеріального угруповання представлено родами *Deinococcus*, *Truepera*, *Kineococcus* [81].

1.5.3. Функціональні адаптації мікробних угруповань

Метагеномний аналіз радіоактивно та метал-забруднених середовищ може виявляти збагачення функціональними ознаками, пов'язаними з

репарацією ДНК, антиоксидантним захистом, металорезистентністю, редокс-процесами та транспортом іонів. Однак такі функціональні зміни є контекст-залежними і мають інтерпретуватися з урахуванням хімічного складу субстрату, pH, вологості та складу домінантних таксонів [381, 384].

У літературі описано випадки стимуляції метаболічної активності окремих мікроорганізмів за умов низькодозового опромінення, однак для природних ґрунтових мікробіомів такі ефекти залишаються контекст-залежними і не можуть інтерпретуватися без урахування pH, вологості, поживного режиму та складу субстрату [146].

1.6 Підбір протоколів для виділення ДНК із субстратів, відібраних на об’єктах ядерно-паливного циклу

Станом на сьогоднішній день сучасна радіоекологія вважалась би неповною без залучення технік молекулярно-генетичного аналізу. Взявши до уваги, що попередні дослідження не дали повної та чіткої картини, дуже важливо застосовувати відповідні молекулярні методи для вивчення мікробних спільнот.

На етапі підготовки до молекулярно-генетичного аналізу, тобто виділення з досліджуваного субстрату ДНК, багато наукових праць стикаються з різною кількістю проблем [197]. Складність полягає у необхідності руйнування клітини з мінімальною втратою ДНК, необхідно слідкувати за стерильністю для запобігання контамінації. Автори проєкту провели підбір методів для вивчення змін різноманіття мікроорганізмів на об’єктах ЯПЦ. При дослідженні зміни мікробної спільноти були виявлені такі перешкоди:

- точки відбору мають високий рівень забруднення;
- субстрат з об’єктів ЯПЦ гетерогенний;

- порівняно з природним матимуть вихід нуклеїнової кислоти нижче.

Попри всю складність ще одним значним критерієм виступатиме кількість виділеної ДНК. На даний час є багато способів виділити ДНК та всі вони найчастіше розраховані на культуру клітин з високою кількістю популяції. Звідси дослідження метагеному з об'єктів ЯПЦ вимагає правильно сформульованого протоколу роботи. Також доцільно звернути увагу на правильність підготовки субстрату для метагеномного аналізу для отримання максимальної кількості ДНК.

1.6.1 Пробопідготовка

На початку експерименту з дослідження метагеному необхідно було чітко виділити рамки роботи з нуклеїновою кислотою. При необхідності роботи з великою кількостю ДНК для високопродуктивного секвенування чи клонування критичним був вихід.

Враховувався характер субстрату на показники дисперсності, вмісту вуглецю та гумінових сполук, наявність сорбуючих компонентів, важких металів та pH. Також враховувалися морфологічні особливості клітин (будова клітинної стінки) [211].

При роботі зі зразками з об'єктів ЯПЦ до представленої характеристики було приділено особливу увагу. В більшості випадків субстрат являв собою пісок, глину, бетонну крихту, слиз, іржу та протоґрунт. Для проведення молекулярно-генетичних досліджень подібні субстрати викликають масу неприємностей. Пісок матиме найменший рівень виходу ДНК при виділенні, глина-сорбент убиратиме в себе катіони й аніони, і саму ДНК, що буде в подальшому впливати на реакції. Бетонна крихта сильно підлужує середовище, тому буде впливати на рівень pH.

pH у розчині один з найважливіших факторів для виходу бажаного продукту, особливо при роботі з ферментами. Ензими за недостатнього pH втрачають здатність до лізису. Слиз та екзополісахариди у її складі знижують вихід ДНК підвищуючи вологість та сорбуючи її. У разі протоґрунту з домішком іржі хід роботи не такий критичний, як у зразках, що були згадані.

Таблиця 1.3. Порівняння протоколів виділення ДНК залежно від субстратів виділення

Пряма екстракція		**Непряма екстракція**	
1 лізис клітини in situ		1 вилучення мікроорганізмів з ґрунту	
Критичні точки	Рішення	Критичні точки	Рішення
•Неоднорідна структура ґрунту, наявність агрегатів •Лізис клітин	•Застосування розтирання з кульками, обробка детергентами та ензимами	•Неоднорідна структура ґрунту, наявність агрегатів •Адсорбція клітин мінералами	•Метод блендера Верінга • Обробка фосфатним буфером і ензимами
2 екстракція та очищення ДНК з ґрунту		2 лізис клітини ex situ	
Критичні точки	Рішення	Критичні точки	Рішення
•Адсорбція ДНК мінералами • Забруднення гуміновими кислотами	•Використання різних буферів •Преочищення ґрунту, SDS та CTAB-обробка, використання хроматографії або гель-електрофорезу для доочищення ДНК	Лізис клітин	•Обробка детергентами(SDS, CTAB, EDTA) та ензимами
		3 екстракція та очищення ДНК	
Загальні риси		**Загальні риси**	
ДНК мікрофлори ґрунту(розмір ДНК < 20 kb) Забруднення гуміновими кислотами Неспецифічна втрата генетичної інформації в ході процедури очищення		ДНК бактерій та архей ґрунту(розмір ДНК > 20 kb) Менше забруднень Втрата генетичної інформації під час екстракції	

Під час роботи з первинним матеріалом застосовуються дві стратегії. Перша стратегія, розглянута в табл. 1.3, що найчастіше використовується, полягає у прямій екстракції ДНК та лізисі клітин безпосередньо в зразку [253]. За допомогою другої стратегії, непрямої екстракції ДНК, клітини спочатку видаляють, а потім лізують [74, 168]. Цей метод відділяє бактеріальні клітини та архей від еукаріот за допомогою градієнта щільності

[75, 202, 102]. Звичайно цей підхід не найкращий, коли в дослідженні цікавлять еукаріотичні послідовності або взаємодія між еукраріотами і бактеріями чи археями. ДНК, виділені за допомогою непрямої екстракції, можуть бути корисними, коли необхідно вилучити еукаріоти або високоякісні фрагменти ДНК (наприклад, для побудови фосмидів і клонів космідів) [113]. Також непрямий метод слушно застосовувати у разі, якщо контамінуючий агент представлений у виді агрегатів з високою щільністю (частинок ядерного палива, споруд, бетонної крихти).

1.6.2 Екстракція ДНК

При виділенні ДНК з клітини процедура проходить згідно з такою послідовністю:

1. Клітинна стінка розбивається хімічно або механічно;
2. Білки та інші компоненти клітини осаджуються;
3. Осаджується нуклеїнова кислота і використовується для аналізу.

Руйнування клітини

В цей час існують три типи лізису клітин (або порушення мембрани) використовуються окремо або в комбінації: (1) фізичного, (2) хімічного та (3) руйнування за допомогою ензимів [281].

Фізичні методи обробки руйнують структуру субстрату, використовуються найчастіше, оскільки дають змогу аналізувати велику кількість бактеріальної спільноти, включаючи бактерії, котрі знаходяться глибоко всередині мікроагрегатів. Найпоширенішими методами фізичного руйнування є заморожування-розморожування або заморожування-кип’ятіння [111, 242] та гомогенізація з кульками [218, 309, 74, 168]. Під час тестування методу «розтирання з кульками», Bürgmann at. al. [88] було встановлено, що кількість ДНК зростає при збільшенні тривалості процесу,

збільшенні швидкості та зменшенні кількості буферу, але лише за рахунок перемішування ДНК.

Інші способи використовують розтирання в ступці [321], розтирання в ступці з рідким азотом [344, 369], ультразвукове дроблення [268, 270] та мікрохвильовий тепловий удар [258], котрі були описано в роботі Frostegard та співавторів [17]. Також було помічено, що сушка субстрату перед подрібненням значно покращує ефективність лізису. Взагалі фізичні методи показують ефективність для руйнування вегетативних форм, дрібних клітин і спор [242], але найчастіше призводять до значного перемішування ДНК [207, 305].

Хімічний лізис як поодинці, так і спільно з фізичними методами також широко використовується. Однією з найпоширеніших сполук для лізису є додецилсульфат натрію (SDS), що руйнує гідрофобні зв'язки у клітинних мембран. При роботі з додецилсульфат натрію слід урахувати той факт, що у випадку з грампозитивними бактеріями може виявитися недостатньо ефективним, і слід застосовувати сильніший агент. Поверхнево-активні речовини, детергенти з термічною обробкою та хелатуючими агентами, такими як ЕДТА, Chelex 100 [153, 168], а також різноманітні трис- і або натрієві фосфатні буфери часто використовуються для розчинення ліпідних структур клітин [191].

У ході роботи протоколів з ензимами для покращення лізису використовують ферменти. На сьогодні існує багато протоколів, що містять у собі ферментний лізис. Обробка клітин лізоцимом є одним з найпоширеніших [85, 282, 332, 218, 321]. Підвищення чистоти ДНК може бути результатом гідролітичної дії лізоциму на глікозидні зв'язки. Інший агент протеїназу К використовують для руйнування забруднюючих білків клітини [269, 218, 369].

При застосуванні представлених технік до інших субстратів (наприклад, бетонної крихти, субстратів з високим вмістом кварцу, гірських порід) та при низькому вмісті органічної речовини рівень нуклеїнових кислот, необхідних для аналізу, може бути недостатнім. У такому випадку в ході руйнування клітин необхідно застосовувати комбінацію з фізичними методами.

Після завершення робіт, що були пов’язані з руйнуванням компонентів клітини, наступний етап – осадження білків та залишків клітин. Низка робіт використовують класичну депротеінізацію в органічних розчинниках, тобто фенол, фенол-хлороформ, хлороформ-ізоаміловий спирт [333, 253]. Також білки можуть бути осаджені за допомогою методу висолювання насиченими розчинами солей, таких як хлорид натрію [297], ацетат амонію [360], ацетат калію [308] та ацетат натрію [156]. Далі білки осаджуються під час центрифугування за низької швидкості, а нуклеїнові кислоти залишаються в супернатанті.

Осадження ДНК, яке виконується для відділення екстракційного буфера та забруднюючих речовин, також є вирішальним етапом, що впливає на якість метагеномної ДНК. Після депротеінізації осадження ДНК досягається або ізопропанолом, етанолом, або їх сумішшю. Також широко використовується поліетиленгліколь (ПЕГ) для осадження ДНК [285, 224].

Використання спиртів для осадження сприяє випаданню в осад гумінових кислот разом з ДНК, тоді як ПЕГ значно зменшує їх кількість [362, 270]. Каллен та Хірш [106] порівнювали осадження метагеномної ДНК етанолом, ізопропанолом та PEG 8000. Було доведено, що осадження PEG 8000 або ізопропанолом сприяють більш чистому осадженню ДНК порівняно з етанолом. Аналогічно La Montagne та співавтори [198] підтвердили, що використання 10 % PEG 8000 замість ізопропанолу призводило до чотирикратного зменшення вмісту гумінових речовин без зниження виходу

ДНК. Проте PEG 8000 слід видаляти за допомогою фенолу, оскільки в подальшому він буде перешкоджати ПЛР.

Проаналізувавши вищезгадані рекомендації, наступним кроком буде підбір типу протоколів (табл. 1.4), котрі найкраще відповідатимуть необхідним вимогам для кращого ходу роботи. При підборі оптимальних методик, особливо під час аналізу послідовностей, увагу слід приділяти зменшенню рівня розбіжності зразків. Саме для рішення цього випадку біотехнологічні компанії представили комерційні набори для виділення ДНК. На сьогодні відомо багато наборів з уніфікованими розчинами для екстракції ДНК, котрі сертифіковані саме для метагеномних досліджень. Компанії, котрі постачають лабораторне обладнання, також пропонують різні види наборів широкого спектра застосування і з низьким рівнем розбіжності. Вони є універсальними, стандартизованими та виділяють ДНК майже з усіх видів ґрунту; є дуже легкими у використанні, але як завжди також не позбавлені недоліків. Головним недоліком багатьох таких наборів є лімітованість розміру проб. Вони є оптимальним рішенням для роботи з різноманітними видами субстрату, враховуючи, що планується працювати з невеликою кількістю проби. При використанні наборів FastDNA® SPIN ,UltraClean® Soil та PowerSoil® DNA компанії MO BIO в роботі Jörg D. Ettenauer на матеріалах для будівництва показали низький вихід ДНК порівняно з традиційними, але більш чистий та однорідний фінгерпрінт [125].

У випадку роботи з розміром проби, більшої за ліміт, краще підібрати один протокол, як було сказано вище, та в подальшому використовувати лише його.

Набори для виділення у своїй універсальності мають певну неоднорідність при виділенні ДНК з різних субстратів. У роботі Nagissa Mahmoudi 2013 року порівнювали набори від різних виробників (UltraClean Soil DNA Isolation kit, PowerSoil DNA Isolation kit, PowerMax Soil DNA

Isolation kit, and FastDNA SPIN kit) для отримання високоякісної ДНК з різних проб ґрунту, забруднених поліароматичними вуглеводнями. Вони виявили, що FastDNA SPIN забезпечував більшу кількість ДНК у всіх типах ґрунту; однак це також призвело до вищих рівнів забруднення гуміновими кислотами. Крім того, екстракція не виявила залишкових ПАУ, що свідчить про ефективність наборів для видалення забруднюючих речовин у процесі екстракції ДНК. Незважаючи на те що PowerSoil DNA Isolation kit давав відносно низький вихід ДНК, він забезпечував найвищу якість ДНК на основі успішної ампліфікації як бактеріальної, так і еукаріотичної ДНК. Крім того, серед усіх наборів він мав найменший рівень розбіжності серед повторів [221]. S. Knauth порівнював FastDNA® SPIN (FD), innuSPEED (INS) та NucleoSpin® (NSP) для виділення ДНК ґрунту з рисових полів. За кількістю та чистотою екстрагованої ДНК набор NucleoSpin виявився більш ефективним, ніж FastDNA® SPIN у той час, коли innuSPEED не виділили необхідної кількості ДНК. Фінгерпринти, отримані з продуктів ПЛР (FD, NSP), показали високий рівень подібності для ампліфікованих генів 16S рРНК метаногенних археїв (> 95 %) і бактерії (до 100 %) у кожному зразку [182]. Також є низка робіт, в яких Ultraclean soil DNA kit, PowerSoil DNA Isolation Kit from MOBIO, FastDNA SPIN Kit виявились менш ефективними з точки зору виходу ДНК, продуктивності ПЛР порівняно з лабораторними протоколами, тобто іноді їх застосування недоречне [325, 225, 93, 113].

Слушним буде згадати про контамінацію субстрату. Речовини, що виділяються разом з ДНК, у подальшому будуть заважати наступним аналітичним реакціям, таким як ферментативна модифікація ДНК, ПЛР-аналіз а також гібридизація ДНК [363]. Видалення гумінових речовин – критичний крок після виділення ДНК [278, 166, 277]. Проте згадується, що протеїназа К і додецилсульфат натрію (SDS) зменшують забруднення гуміновими кислотами [307]. Ароматичні сполуки, такі як гумінові речовини

та поліфеноли, можуть бути усунені за допомогою катіонообмінних смол та детергентів [167], гідроксиапатиту [284] і активованого вугілля [114]. Також цетилтриметилмамоній бромід (ЦТАБ) та полівінілполіпіролідон (ПВПП) [245, 191, 369] частково видаляють гумінові сполуки, але (на відміну від ЦТАВ) ПВПП призводить до втрати ДНК [369].

Таблиця 1.4. Розрахунок кількості реактивів для екстракції з використанням різних протоколів

	Реактиви	Tsai and Olson (1991)	Zhou et. al. 1996		van den Ende and de Hoog, 1999 (модифікований)		Sagova et. al. (2008)	Miller et. al. (1996)	Plassart et. al. (2012)	Kuske (1997)	Sert and Sterflinger (2010)
Буфер для лізису	NaCl	0,15 M	1,5 M	1,5 M	8,20 %	8,20 %	50 mM	50 mM	100 mM	0,1 M	150 mM
	EDTA / Na-EDTA	0,1 M	100 mM	100 mM	20 mM	200 mM			100 mM	20 mM	50 mM
	Трис / Tpic-HCl (mM)		100	100	100	200	500	500	100	50	50
	Гексадецилтриметиламоній бромід (CTAB)		1 %	2 %	2 %	2 %					
	SDS (додецилсульфат натрію)						5 %	5 %	2 %	1 %	0.3 %
	Фосфат натрію		100 mM	100 mM							
	β-меркаптоетанол				0,80 %	0,80 %					
	Натрій фосфатний буфер	120 mM					50 mM	50 mM			
Ензими	Лізоцим (mg/ml)	15									
	Протеїназа К (mg/ml)		10	10			10				
Компоненти для доочищення та осадження ДНК	SDS (додецилсульфат натрію)	10 %	20 %	20 %							
	ПВП (полівінілполіпіролідон)	Модифікації									
	Піридоксамін або тіамін										
	Chelex 100										
	Ацетат калію	Модифікації							3 M		
	Поліетиленгліколь										
	Ацетат амонію										
	Ацетат натрію										
	$AlNH_4(SO_4)_2$									0,1 M	
	NaCl	0,1 M								20 mM	
	EDTA / Na-EDTA									50 mM	
	Трис / Tpic-HCl	0,5 M									
	CTAB	Модифікації									
	$CaCl_2$										
	Фенол			25			25	25			25
	Хлороформ	24	24	24	24	24	24	24			24
	Ізоаміловий спирт	1	1	1	1	1	1	1			1
	Льодяний етанол	70 %	70 %	70 %	96 %	96 %					96 %
	Льодяний ізопропанол	0,6 % v/v	0,6 % v/v	0,6 % v/v					1 % v/v		

ЦТАБ утворює нерозчинні комплекси з денатурованими білками, полісахаридами та клітинним сміттям, що в подальшому усуваються за допомогою центрифугування [288]. У роботі Techer та співавтори [322] для усунення забруднення використовували суміш вітамінів з ЦТАБ. При забрудненні ґрунту важкими металами слушно застосовувати хелати, такі як ЕДТА та іонообмінні смоли.

Недоречним буде використання наборів при роботі з високоякісною геномною ДНК у сильно контамінованих ґрунтах та з високим рівнем органічних речовин (табл. 1.5). Вони мають значні обмеження при виділенні, а також будуть мати великі втрати метагеному [172].

Останнім та завершальним етапом є доочищення за допомогою геля чи комерційних сепараційних колонок, розроблених спеціально для такої задачі. Після чого нуклеїнова кислота долучається до аналізу [281].

При роботі з нетрадиційними видами субстарту та ґрунту для виділення ДНК оптимальним рішенням є підбір лабораторних протоколів для виділення. В основному для роботи з пробами з ЯПЦ краще застосовувати метод екстракції по Міллеру та Саговій. Бетонова крихта і зразки з високим рівнем іржі, наявність відповідно кількості ЕДТА та буферу зводитимуть майже до нуля ефект від іонів та підлуженості. Представлені протоколи мають широкий спектр модифікацій. У процесі роботи відносно легко можна керувати перебігом процедури. Також застосування додецилсульфат натрію (SDS) видалятиме гумінові кислоти та інші органічні забруднення. Для роботи з малоактивними пробами автори роботи рекомендують використовувати одну модифікацію на всіх видах зразків з ЯПЦ у разі необхідності отримання високих виходів ДНК.

Таблиця 1.5. Вихід ДНК при використанні різних методів екстракції

Метод	К-сть ДНК	A260/A280	A260/A230	Субстрат	Посилання
Tsai and Olson (1991)	3,74–20,17 мкг/г	2,10–2,26	1,69–1,89	Ґрунти з рисових полів	[165]
Zhou et. al. 1996	10,9–17,5 мкг/г	1,17–1,23	0,77–0,91	Лісний ґрунт	[222]
	6,94–18,65 мкг/г	1,73–2,05	1,62–1,72	Ґрунти з рисових полів	[165]
van den Ende and de Hoog, 1999 (modification)	$3,1\times10^5$ нг/г	1,38 ± 0,05		Цегла	[125]
	$4,3\times10^5$ нг/г	1,31 ± 0,1		Штукатурка	[125]
Sagova et. al. (2008)	2,2–20,8 мкг/г			Лісний ґрунт	[222]
	29,6–75,70 мкг/г	0,742–1,562	0,387–0,697	Забрудненій ґрунт (керосин)	[319]
Miller et. al. (1996)	35 мкг/г			Лісний ґрунт	[222]
	53 мкг/г			Осад	[235]
Plassart et. al. (2012) GnS-G2	40 мкг/г	1,552 ± 0,05	0,567 ± 0,05	Забруднений ґрунт (керосин)	[319]
	~6 мкг/г			Лісний ґрунт	[222]
Kuske's (1997)	3,18–11,36 мкг/г	1,69–1,80	1,47–1,60	Ґрунти з рисових полів	[165]
Sert and Sterflinger (2010)	$1,7\times10^6$ нг/г	1,5 ± 0,05		Цегла	[125]
	$1,2\times10^6$ нг/г	1,36 ± 0,03		Штукатурка	[125]
PowerSoil® DNA Isolation Kit	3,60–7,20 мкг/г			Ґрунт, забруднений ПАВ	[221]
	1,4–3,5 мкг/г			Лісний ґрунт	[222]
	$1,2\times10^3$ нг/г	1,63 ± 0,61		Цегла	[125]
	$2,4–3,7\times10^3$ нг/г	2,04 ± 0,87		Штукатурка	[125]
UltraClean® Soil DNA Isolation Kit from	<1 мкг/г			Ґрунт, забруднений ПАВ	[61]
	2×10^3 нг/г	2,3 ± 0,62		Цегла	[125]
	$3,8\times10^3$ нг/г	1,76 ± 0,26		Штукатурка	[125]
FastDNA® SPIN Kit for Soil	1,20–6,00 мкг/г			Ґрунт, забруднений ПАВ	[61]
	7×10^3 нг/г	1,74 ± 0,26		Цегла	[125]
	$7,5\times10^3$ нг/г	1,8 ± 0,1		Штукатурка	[125]
PowerMax Soil DNA Isolation kit	0,01–1 мкг/г			Ґрунт, забруднений ПАВ	[61]

На рахунок зразків з ділянок з високою активністю застосування протоколів мають велику вірогідність бути недопустимими. Згідно з технікою безпеки час проведення екстракції призведе до отримання високої дози опромінення. Іншими словами ще одним критерієм буде час проведення екстракції. Враховуючи, що було сказано вище та високий рівень розбіжності, автори роботи віддають перевагу набору для виділення компанії MO BIO. Додатковим критерієм вибору були можливості використовувати набір без великої кількості лабораторного обладнання. Проби, котрі мають високий рівень води, необхідно попередньо висушити, що не бажано для дослідження метагеному. Згадуючи вищесказане, комерційні набори не потребують попереднього висушування для проведення екстракцій.

1.7 Метагеномний проєкт і його етапи

Метагеноміка – це комплексна галузь, що використовує як і геномні технології, так і біоінформатичні інструменти для аналізу генетичного різноманіття угруповань мікроорганізмів. Галузь метагеноміки пропонує сучасний погляд на мікробну екологію, еволюцію та різноманіття. Визначення метагеноміки формулюється як прямий генетичний аналіз геномів, узятих зі зразків навколишнього середовища – ґрунт, вода, шлунково-кишковий тракт людини тощо. Метагеномний проєкт зазвичай починається із клонування ДНК зі зразка навколишнього середовища та подальшого її секвенування методом дробовика (shotgun sequencing) [336]. Такий підхід дозволив відкрити величезне різноманіття генів бактерій, зокрема метагеномні підходи до секвенування геномів дозволяють отримати генетичну інформацію про нові ензими, геномні взаємозв’язки між функцією і походженням некультивованих організмів та дослідити еволюційні аспекти бактеріальних угруповань та їх структури. Дані підходи комбінують з

методами метатранскриптоміки та метапротеоміки, щоб описати профіль експресії [373, 142].

У загальному вигляді метагеномний проєкт складається з таких послідовних етапів, як:

1 – дизайн експерименту,

2 – збір матеріалу (sampling),

3 – фракціонування зразка (sample fractionation),

4 – виділення ДНК,

5 – секвенування ДНК,

6 – збірка геному,

7 – біннінг (binning),

8 – анотація (annotation),

9 – статистичний аналіз даних,

10 – зберігання даних (data storage),

11 – розповсюдження даних (data sharing).

Відповідно на останніх 3-х етапах постає необхідність використання метаданих.

1.7.1 *Аналіз метагеномних даних*

Збір матеріалу (sampling). Процес збору зразка – це перший та найважливіший етап у будь-якому метагеномному проєкті. ДНК, що екстрагується зі зразка, має бути репрезентативною для всіх клітин присутніх у зразку, бути в достатній кількості та якості для генерування бібліотеки для секвенування й аналізу. Процесинг (processing) потребує специфічних протоколів для кожного типу зразка та досконалі методи виділення ДНК зі зразка [113]. Якщо бактеріальне угруповання асоційоване з господарем (host – наприклад, безхребетні або рослина), потрібно проводити **фракціонування**

або селективний лізис, щоб отримати достатню кількість генетичного матеріалу [261].

Секвенування. За останні роки технологія секвенування методом дробовика метагеномів змінилась з класичного типу секвенування за Сенгером на методи секвенування наступного покоління (next-generation sequencing – NGS). Але секвенування за Сенгером й досі є золотим стандартом секвенування, тому що має низький рівень помилок. Відомо два найпоширеніші методи секвенування наступного покоління: 454/Roche та Illumina/Solexa.

454/Roche застосовує емульсійну полімеразну ланцюгову реакцію (EPCR) в клональній ампліфікації випадкових фрагментів ДНК, які прикріплені до мікроскопічних ланцюжків (microscopic beads). Є два аспекти, що відіграють важливу роль у цьому процесі відносно секвенування метагеномної ДНК. По-перше, у EPCR було показано, що цей тип реакції продукує штучні повторні послідовності, які будуть впливати на будь-які оцінки різноманіття генної представленості. Розуміння кількості реплікованих послідовностей має вирішальне значення для якості даних та принципів застосування біоінформатичних інструментів [251]. По-друге, інтенсивність світла, що виникає при пробігах полімерази через гомополімер часто буває важко співвідносити з фактичним числом нуклеотидних позицій.

Технологія Illumina/Solexa дозволяє іммобілізувати випадкові ДНК-фрагменти на поверхні і потім виконати ПЛР-ампліфікацію на поверхні (solid-surface), в результаті чого формуються кластери ідентичних ДНК-фрагментів. Потім вони секвенуються зі зворотними термінаторами секвенуванням за допомогою синтезу (sequences-by-synthesis) [71].

Збірка метагеному (assembly). Якщо дослідження спрямоване на відображення геному організмів, що не культивуються, або отримання повних CDS для подальшої характеристики, а не на функціональний опис

угруповання, то використовують збірку коротких прочитань, щоб отримати довші геномні контіги (contigs). Зокрема є дві стратегії для збірки метагеномів – на основі референсу (reference-based) та *de novo* збірка. Reference-based збірка підходить у тому випадку, якщо метагеномна ДНК містить послідовності, що відповідають референсним послідовностям, доступним у базах даних. Тоді як *de novo* збірка відбувається повністю заново зі збереженням біологічного сенсу та потребує більших комп'ютерних ресурсів. Так, більшість асемблерів розроблено на основі графів де Брюйна (de Bruijin) для роботи з великою кількістю геномних даних [236].

Біннінг (binning) належить до процесу сортування ДНК-послідовностей в групи, які можуть являти собою індивідуальний геном або геном з близькоспоріднених організмів. В більшості випадків біннінг – це задача, для вирішення якої використовують алгоритми машинного навчання.

Метатранскриптоміка. Метагеномні підходи дають можливість реконструювати метаболічні шляхи бактеріальної спільноти. Але метагеномний аналіз на основі ДНК не дає можливості диференціювати між експресованими та неекспресованими генами і, отже, втрачається можливість точного аналізу функціонального різноманіття угруповань. Таким чином, метатранскриптоміка є дослідженням функції та активності повного набору транскриптів (RNA-seq) з проб навколишнього середовища [304].

Метапротеоміка. Протеомний аналіз змішаних мікробних угруповань є новою областю досліджень, які спрямовані на оцінку каталітичного потенціалу мікробного угруповання. Вільмес (Wilmes) і Бонд (Bond) ввели термін «metaproteomics» як синонім для великомасштабної характеристики всього білкового профілю мікробіоти в даний час. У цьому дослідженні білки, що синтезуються мікробним угрупованням з активного мулу, були проаналізовані за допомогою двомірного електрофорезу в поліакриламідному гелі і мас-спектрометрії. Білки з посиленою експресією,

такі як білок зовнішньої мембрани і ацетил-коензим А-ацилтрансферази, були ідентифіковані за допомогою цих підходів. Такі ензими, вірогідно, були виражені в некультивованому поліфосфат-акумулюючому штамі *Rhodocylus*, що домінував в активованому мулі [354].

Одне з найбільш повних метапротеомних досліджень було проведено Ram та ін. [279], які аналізували експресію генів, основні напрямки діяльності, а також метаболічні функції дренажу мікробної біоплівки (biofilm) за допомогою мас-спектрометрії. Таким чином, були ідентифіковані більше 2000 білків п’яти найпоширеніших мікроорганізмів. Додатково було виявлено 357 унікальних та 215 нових білків. Один з найбільш експресованих нових білків функціонально був зв’язаний з окисненням заліза.

1.7.2 *Секвенування метагеномів*

Ідентифікація мікробіому з використанням 16S rDNA варіабельної області стає все популярнішою за останнє десятиліття. Застосування у цих регіонах ампліконного секвенування наступного покоління дозволяє секвенувати мікробні угруповання набагато глибше, ніж попередніми методами, а також дозволяє ідентифікувати некультивовані або рідкісні організми в зразку. Раніше мікробна ідентифікація потребувала виділення організму в чистій культурі, а потім за допомогою комбінації морфологічних спостережень, фізіологічних і біохімічних тестів визначення певного штаму бактерій. Але дані підходи значно лімітовані у зв’язку з тим, що 99 % усіх мікроорганізмів не можуть бути культивованими, якщо застосовувати традиційні методи.

Серед найпопулярніших методів ідентифікації на основі ДНК секвенування є локус у гені 16s рибосомальної рРНК – SSU (small subunit ribosomal gene). Цей ген є еволюційним маркером, що дуже широко застосовується для філогенетичної класифікації бактерій. SSU присутній

майже в усіх відомих прокаріотичних організмах та складається з гомологічної частини розділенної 9-ма гіперваріабельними регіонами.



Рисунок 1.6. Схематична будова SSU (1–9 гіперваріабельні регіони)

Ці гіперваріабельні послідовності використовуються в якості філогенетичних ідентифікаторів бактерій. Висококонсервативні області використовуються в якості сайтів зв'язування праймерів для секвенування повних послідовностей генів рРНК.

1.7.3 *Біоінформатичний аналіз 16s rRNA метагеномних даних*

Біоінформатичний аналіз даних є принциповим компонентом у будь-якому метагеномному проєкті. Вибір біоінформатичного аналізу залежить від загальної мети проєкту та типу даних, які треба проаналізувати. Метагеномні підходи можуть базуватись на секвенуванні повних геномів або ж на так званому таргетному секвенуванні (targeted sequencing) [315]. Таргетне секвенування, зокрема, зосереджене на секвенуванні не всього метагеному, а лише його специфічних кластерів, наприклад, гену 16s рибосомальної рРНК – SSU.

Програмний пакет QIIME [91]. QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) є програмним пакетом з відкритим кодом, побудованим на основі PyCogent toolkit [315] для широкопрофільного аналізу сирих даних секвенування (raw data) до їх інтерпретації та депонування. QIIME доступний за посиланням (http://qiime.sourceforge.net/) підтримує велику кількість різних типів аналізу мікробіомів та візуалізації даних, що були задіяні у великих проєктах, присвячених аналізу мереж (network analysis), розрахунку різних типів різноманіття. QIIME також дає можливість візуалізувати дані та

інтерактивно з ними взаємодіяти. Використання QIIME для аналізу даних з мікробних спільнот складається з введення команд у вікно термінала (terminal window), варіювання параметрів задачі, а потім перегляду графічних і текстових висновків. Основним результатом з QIIME є OTU таблиці, які описують мікробні OTU кластери та їх ступінь представленості у базах даних (OTU abundance). Також QIIME має багато додаткових можливостей для екологічних досліджень, таких як: аналіз альфа-різноманіття, аналіз бета-різноманіття, ординація – principle coordinate analysis (PCoA) та ін. QIIME пропонує модульний підхід до різних стратегій аналізу даних секвенування та використовує такі алгоритми кластеризації (sequence clustering), як приклад UCLUST, CD-HIT[138], BLAST та ін.

Оцінка функціонального профілю мікробіомного угруповання відбувається завдяки комбінаціям різних алгоритмів. Наприклад, PICRUSt [199] (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) біоінформатичний пакет, алгоритми якого дозволяють передбачити біологічні функції спільноти на основі даних, що представлені у OTU таблицях – маркерні послідовності (найчастіше 16s кластери), супроводжуючі з відносним вмістом цих послідовностей у кожному зі зразків. Хоча стратегії секвенування маркерних генів і секвенування методом дробовика (shotgun sequencing) розрізняються за типом отриманої інформації, філогенія і біомолекулярна функція сильно корелюють. Як результат, PICRUSt генерує матрицю з геном та його функцією в клітині (functional-gene-count matrix), що відображає цифрове значення представленості кожної функції. Здатність PICRUSt оцінити функціональний профіль для даного зразка залежить від відомих секвенованих геномів. У початковій фазі обробки даних (preprocessing phase) PICRUSt будує довірчі інтервали і точку передбачень (predictions point) для числа копій кожного сімейства генів у кожного бактеріального штаму і архей у референсному дереві,

використовуючи організми із секвенованими геномами як еталон. Більш конкретно для кожної родини генів PICRUSt відображає число копій відомих генів (від повних секвенованих геномів) на референсному дереві (reference tree of life). Числа копій родин генів розглядаються як безперервні риси (continuous traits), тоді як еволюційна модель, побудована з урахуванням броунівського руху, або, можливо, також на основі статистичних моделей (Maximum Likelihood, Related Maximum Likelihood, Wagner Parsimony). Ці еволюційні моделі використовуються для прогнозування як точки оцінки (estimate point), так і довірчого інтервалу для числа копій мікроорганізмів без наявності для них даних секвенування.

Цей етап прогнозування геному продукує велику таблицю бактеріальних типів (OTUs – operational taxonomic units) навпроти копій родин генів. Важливо додати, що подібний тип методу передбачення не є єдиним, та існує можливість обрати Nearest Neighbor опціонально в PICRUSt для аналізу.

Сервіс PICTUSt використовує розширений алгоритм (ancestral-state reconstruction), щоб передбачити, які родини генів присутні, і потім комбінує їх для оцінки складеного метагеному (composite metagenome). Передбачення функцій у PICRUSt складається з 2-х кроків. На першому відбувається передбачення генного контенту (gene content inference), і PICRUSt розраховує його для кожного організму в референсному філогенетичному дереві. Це реконструює таблицю з представленими передбаченими родинами генів для кожного організму на основі 16s філогенії. Оскільки цей етап є незалежним від певного мікробного зразка, це рахується один раз. Наступний крок комбінує передбачений генний контент для всієї мікробіомної таксономії з відносною представленістю 16s рРНК генів в одному або більшій кількості зразків мікробних угруповань. На етапі реконструкції генного контенту PICRUSt передбачає, що гени, присутні в організмів, які ще не були секвеновані, є гомологами генів, знайдених на основі їх секвенованих

еволюційних родичів. Для цього PICRUSt використовує наявні анотації генного контенту та кількість копій 16s з референсних геномів бактерій, архей у IMG базі даних [223]. У PICRUSt можливі різні схеми аналізу, ґрунтовані на двох базах даних – KEGG Orthology (KOs) [170] та Clusters of Orthologs Groups (COGs) [170]. Передбачення мікробіомного генного контенту починається з останнього філогенетичного загального предка організму з одним або більше секвенованими геномами. Передбачення генів у кожному предку відбувається за загальним принципом (ancestral state reconstruction). Цей алгоритм прогнозує риси предкових організмів шляхом підгонки еволюційних моделей розподілу ознак, які спостерігаються в живих організмах, використовуючи такі критерії, як maximum likelihood або Bayesian posterior вирогідність. PICRSUt використовує розширений алгоритм для передбачення рис збережених організмів додатково до ancestral. Етап реконструкції метагеному полягає в тому, що користувачем пропонується OTU таблиця для кожного зразка з асоційованими до них ідентифікаторами Greengenes. По-перше, PICRUSt нормалізує OTU таблицю по числу копій 16s, так що кількість OTU більш точно відображає дійсну кількість основних видів. Метагеном передбачається з використанням обчисленого геномного контенту для кожної OTU, помножуючи нормалізовану поширеність OTU (OTU abundance) на кожну поширеність KO (KO abundance), сумуючи ці KO разом для кожного зразка. Як результат є OTU таблиця з представленістю функцій KO.

Функціональну реконструкцію метаболічних шляхів також дозволяє робити біоінформатичний пакет HUMAnN [192] (The HMP Unified Metabolic Analysis Network). HUMAnN (рис. 1.7) дає можливість аналізувати метаболічні шляхи без збірки метагеному та здійснити профілювання метаболічного потенціалу мікробного угруповання, що представлені родинами генів ортологів та характеристикою метаболічних шляхів (pathway

abundances). Методика обчислювання включає в себе серію генного і кількісного визначення рівня метаболічного шляху, зменшення шуму з метою визначення:

а) які шляхи присутні або відсутні в секвенованому метагеномному угрупованні;

б) їх відносну представленість (relative abundance).

Більшість метагеномних аналітичних методів сконцентровані на аналізі видового різноманіття угруповань [50]. Проте функціональні характеристики мікробіомного угруповання необхідно додатково визначити, щоб зрозуміти метаболізм та інші важливі характеристики. Сучасні метагеномні підходи до функціональної характеристики IMG/M [223], MG-RAST [143], MEGAN [237]. Кожна з них спирається на підхід “best-BLAST-hit”.

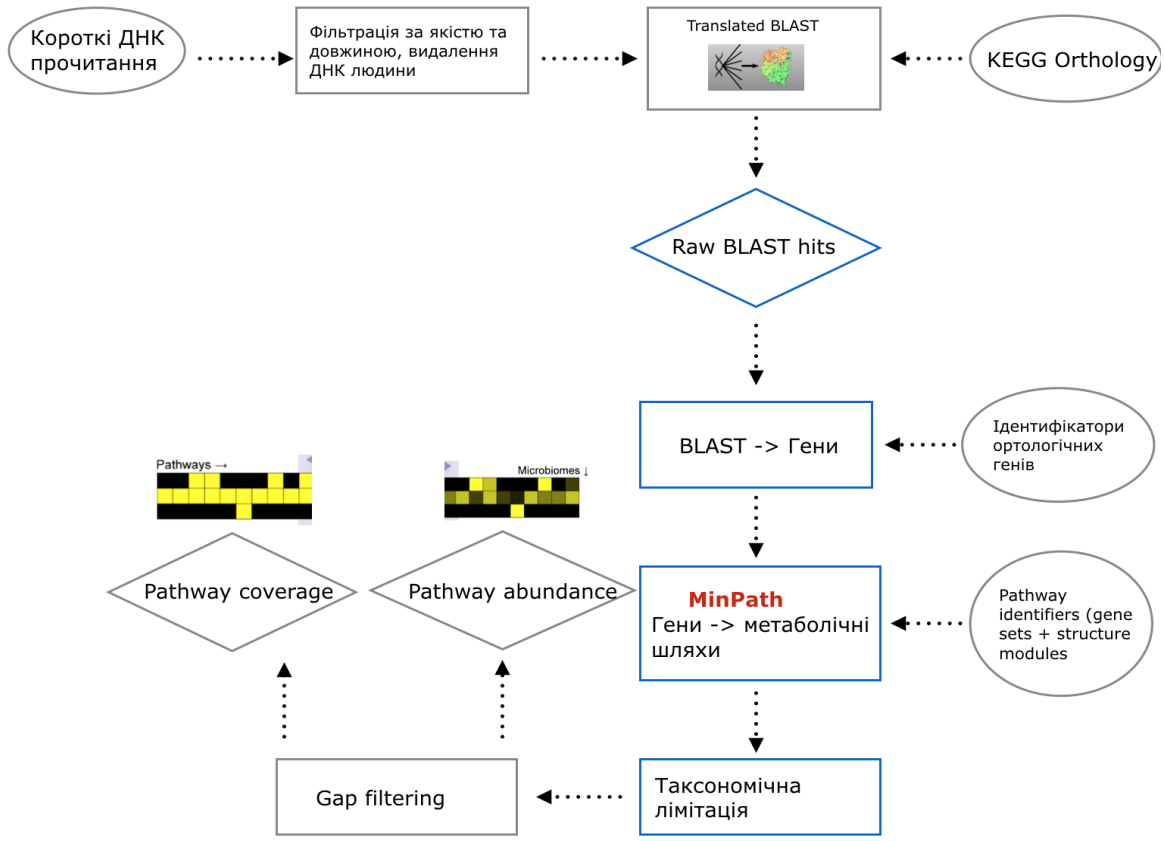


Рисунок 1.7. Схема аналізу HUMAnN

Щодо алгоритму роботи MinPath (Minimal set of Pathways) [361]. Однією з головних задач метагеномного аналізу є реконструкція біологічних шляхів, що зазвичай виконується *in silico* мапуванням (mapping) білок-кодуючих генів на сет референсних метаболічних шляхів, таких як KEGG або SEED, базуючись на гомології референсних генів з вже відомими функціями. Наприклад, KAAS – система анотації шляхів, що базується на базі даних KEGG [243]. На першому етапі KAAS анотує K (кожне число K відображає ортологічну групу генів та прямо зв'язує це число з об'єктом (біохімічний шлях у KEGG мапі метаболічних шляхів)) і потім реконструює метаболічні шляхи на визначені K.

За схожою схемою працює RAST сервер (та MG-RAST): спочатку відбувається анотація FIG родини і потім мапування ідентифікаторів на SEED субсистеми [65]. Головною задачею алгоритму MinPath є пошук мінімальної кількості метаболічних шляхів, що можуть пояснити всі функції. Алгоритм роботи зображений на рис. 1.8.

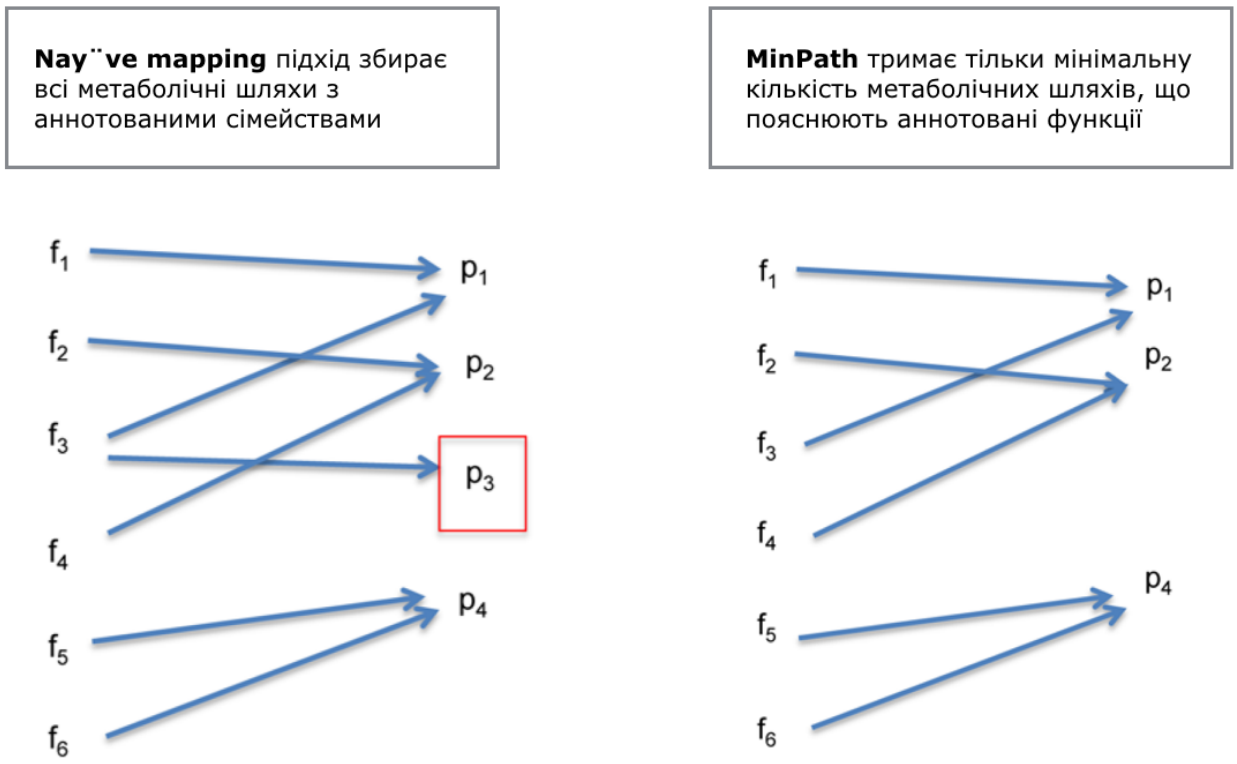


Рисунок 1.8. Схематична ілюстрація методу MinPath

Будемо вважати, що є 6 родин (або ортологічних груп, $f_1 \ldots f_6$), що ідентифіковані з певного набору генів (наприклад, з метагеномного зразка). Naïve mapping підхід (ліворуч) приведе до реконструкції 4-х шляхів, позначених як (p_1, p_2, p_3 та p_4). Через те що біологічні шляхи перекриваються – шлях p_3 зв'язує функцію f_3 зі шляхом p_2. Вважається, що тільки 3 метаболічні шляхи p_1, p_2 та p_3 достатні для пояснення існування 6-ти анотованих родин у наборі генів, та консервативна реконструкція метаболічних шляхів має мати тільки 3 шляхи (праворуч).

Подібна консервативна реконструкція (conservative estimation) за допомогою MinPath забезпечує більш надійну оцінку функціонального різноманіття зразка.

1.7.4 *Метадані у метагеномному аналізі та їх інтеграція*

Аналіз великої експоненційно зростаючої кількості доступних послідовностей ДНК є аналітично складною задачею. Крім того, аналіз ускладнюють складні метадані, пов'язані з метагеномними проєктами. Вони містять інформацію про географію досліджуваного зразка, особливості навколишнього середовища, фізичні дані, а також методику відбору проб [65]. Ця інформація необхідна для наближення аналізу до реальних умов та забезпечення відтворюваності експериментів. Важливим є представлення цієї інформації з використанням стандартизованих форматів даних і розвиток спеціалізованих баз даних, таких як Genomes OnLine Database (GOLD) [65]. Для інтеграції метаданих і даних про геномні послідовності були розроблені спеціалізовані сервіси. У 2007 році був створений доступний сервіс для аналізу даних метагеномного експерименту Metagenomics Rapid Annotation з використанням Subsystem Technology server (MG-RAST). До 2012 року в цю базу даних було завантажено близько 50 000 метагеномів [143].

Резюме до розділу 1

У цьому розділі за допомогою аналізу літературих джерел наведено загальну екологічну характеристику ЧЗВ, ЗВП навколо ФАЕС та стану справ всередині ОУ ЧАЕС.

Описано основні біохімічні механізми взаємодії цезію і урану з представниками мікрофлори: наведено шляхи акумуляції радіонуклідів, механізми їх захоплення з навколишнього середовища та точки локалізації всередині та ззовні бактеріальної клітини.

Викладено дані щодо радіостійкості представників мікробіоти в цілому та її окремих представників зокрема. Наведено дані для порівняння екстермофільних мікроорганізмів та таких, що є представниками нативної ґрунтової мікрофлори.

Описано основні протоколи виділення ДНК зі складних субстратів та обговорено оптимальні для субстратів, відібраних з ОУ, алгоритми дій для підвищення кількості і якості вихідного продукту.

Наведено основні етапи метагеномних та мікробіомних проєктів, описано складнощі, з якими стикаються дослідники при вивченні забруднених радіонуклідами ґрунтів та субстратів. Наведено шляхи вирішення питань, що постали.

Викладено біоінформатичні підходи до мікробіомних проєктів. Обговорено недоліки та переваги певного програмного забезпечення. Наведено обґрунтування для вибору авторкою програмного забезпечення.

Описано важливість коректного врахування метаданих у метагеномному проєкті.

На основі проаналізованих даних сформовано мету і завдання дослідження.

2 ОБ'ЄКТИ, УМОВИ ТА МЕТОДИ ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Відбір проб ґрунту та визначення його основних характеристик

2.1.1 Методи відбору проб ґрунту

Усю процедуру відбору зразків ґрунту можна умовно розділити на два етапи: перший – проведення гамма-зйомки, за результатами якої обрані оптимальні місця для відбору проб; другий – це етап, на якому і здійснювався відбір зразків у визначених для цього місцях і проводились дослідження.

Метою проведення гамма-зйомки було, з одного боку, отримання кількісних характеристик значень гамма-фону на площі конкретного майданчика (визначення наявності неоднорідності щільності забруднення на градієнтних ділянках), а з другого – докладні проміри площ, які досліджувались, і згодом дозволили вибрати оптимальні точки пробовідбору. Усі ці роботи реалізовувались за допомогою повірених та від градуйованих приладів з висоти 1 м від поверхні ґрунту.

На початковій стадії проведення досліджень виконувався збір та ретельний аналіз усієї інформації про досліджувану територію. Результати цього аналізу визначили наступну стратегію проведення робіт з уточнення радіаційної обстановки. На репрезентативних територіях, з яких інформація була представлена в достатньому обсязі та склалася об'єктивно відтворювана ситуація, яка проявилась в отриманні за експрес-методикою повторюваних результатів оцінки щільності забруднення майданчиків та гамма-спектрометрії контрольний пробовідбір у кількості 5 зразків, які після обробки та порівняння результатів з матеріалами, що були отримані раніше, могли служити основою для виконання чи невиконання подальших робіт з уточнення. Проби вібдиралися на початку і наприкінці літа протягом 2014–2016 років, після чого аналізувалися показники радіонуклідного забруднення в динаміці. На тих же майданчиках, по яких була представлена

інформація, що викликала сумніви, уточнення радіаційної обстановки проводилось в повному обсязі. Необхідно було також враховувати вертикальний розподіл радіонуклідів по профілю ґрунту та абсолютні значення щільності радіонуклідного забруднення майданчиків у динаміці.

Результати вимірювань реєстрували наступним чином: при незначних змінах показників приладу (не більше ніж на 30 %) значення гамма-фону наносились на план у конкретній точці через 5–10 м, якщо ж показники приладу при безперервному відстеженні відрізнялись від початкових більше ніж на 30 %, то ці точки наносили незалежно від відстані, яку подолано по маршруту. В цих місцях також виконували додаткові індикаційні заміри в радіусі приблизно 5–10 м з кроком 1 м з метою оцінки розмірів аномальної плями, яка, у свою чергу, наносилась на план.

Після проведення вказаних вище робіт обирали точки для відбору зразків з метою оцінки щільності поверхневого радіоактивного забруднення. За незначних коливань гамма-фону (не більше ніж на 30 %) кількість зразків, що відбирались, оцінювали, виходячи з розрахунку – 5 зразків з ділянки. Точки відбору зразків по можливості розташовували рівномірно в межах конкретного полігона на ділянках з найпоширенішими значеннями величин гамма-фону, а також з урахуванням мікроландшафтних характеристик конкретного майданчика. За наявності аномальної плями або кількох плям, площа яких перевищувала 10 % загальної площі ділянки, що обстежувалась, обов’язково виконували відбір зразка ґрунту в цьому місці. На місці відбору зразка попередньо вимірювали потужності дози на висоті 1 м і 0,03–0,04 м від поверхні ґрунту за допомогою приладу ДРГ-01Т та щільності потоку бета-часток за допомогою РКС-20.03 «Прип’ять» («Енергосила», Україна), який мав свідоцтво про державну повірку. Відібрані точки були придатні для відбору зразків у тому випадку, якщо результати вимірювань потужності

дози на зазначених вище висотах відрізнялися не більше ніж у 1,3 раза. Місцем для відбору зразка обирали рівнинну, однорідну та відкриту ділянку.

У випадку наявності тренда або просторової неоднорідності щільності радіоактивного забруднення території (вимірювання ПЕД перевищують 30 %) досліджуваний полігон розбивався на безградієнтні ділянки, в межах яких відносні зміни величини ПЕД не перевищували 30 %. На кожній такій ділянці проводився незалежний відбір проб ґрунту.

Відбір зразків ґрунту проводився спеціальними пробовідбірними пристроями (бурами [48]) діаметром 37 мм (площа пробовідбору 0,001075 м^2) на глибину 30 см [48]. На кожній ділянці проби відбирали у 5 точках методом «конверта» з кроком не менше 5 м. Змішаний зразок складався з п’яти індивідуальних, відібраних з площі обстежуваного майданчика загального об’єму близько 1000 см^3. Змішаний зразок клали в поліетиленовий пакет, який вкладався в поліетиленовий другий пакет. Між поліетиленовими пакетами розміщували паспорт зразка. Потім у лабораторних умовах ґрунт сушили, ретельно перемішували, просіювали через сито з розміром отворів 1 мм та зважували. Маса зразка фіксувалася в паспорті та в каталозі (відомості) пробовідбору. Після цього із проб відбирались навіски для вимірювання активності. Проби рослин відбиралися на тих же ділянках, що і проби ґрунтів.

2.1.2 *Точки відбору проб*

2.1.2.1 Відбір проб субстрату у внутрішніх приміщення ОУ

Для аналізу мікробного угруповання було відібрано 8 зразків субстрату на стандартних маршрутах Інституту проблем безпеки АЕС НАН України в приміщеннях ОУ ЧАЕС (рис. 2.1).

За технікою безпеки і можливістю доступу персоналу приміщення ОУ поділяються на три зони:

1 зона – зона суворого режиму (ЗСР) – необслуговувані приміщення, де розміщуються технологічне обладнання та комунікації, які є основними джерелами випромінювання та радіоактивного забруднення. Перебування персоналу в необслуговуваних приміщеннях при працюючому технологічному обладнанні не допускається;

2 зона – зона лімітованого доступу (ЗЛД) – приміщення, що періодично обслуговуються, – приміщення для проведення ремонту обладнання, інших робіт, пов’язаних з розкриттям технологічного обладнання, вузли завантаження та вивантаження радіоактивних матеріалів, тимчасового зберігання та видалення відходів;

3 зона – зона вільного доступу (ЗВД) – приміщення постійного перебування персоналу протягом усієї зміни.

Щоб уникнути можливості винесення забруднень із приміщень 2 зони у приміщення 3 зони, між ними обладнується санітарний шлюз [44].

Зразки було відібрано в жовтні 2015 р. Відбір зразків виконував співробітник, одягнутий у захисний костюм та дві пари гумових рукавичок, верхню пару з яких змінювали після відбору кожного зі зразків. Зразки з поверхонь було отримано шляхом зіскрібання у стерильні флакони ємністю 50 мл за допомогою одноразових пластикових шпателів, після чого протягом 24 годин зберігались у переносному холодильнику для відбору проб для транспортування і передані для аналізу.

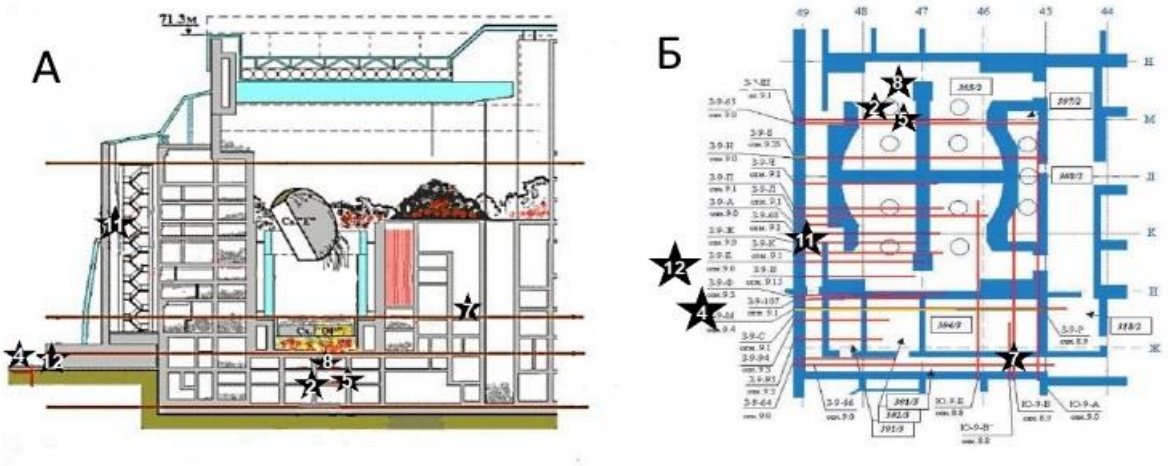


Рисунок 2.1. Схема точок відбору субстрату в ОУ ЧАЕС: А) вид збоку, Б) вид зверху [201]

Зразки R2, R5 і R8 були відібрані з приміщення під шахтою реактора, R4 та R12 – за межами ОУ і використовувалися в якості контролю, R11 та R7 – з внутрішніх виходів шахт системи моніторингу реактора «Фініш», R13 – з дренажної труби, що виходить з ОУ ЧАЕС [19].

Таблиця 2.1. Локалізація і візуальна характеристика точок відбору зразків

Код зразка	**Зона доступу персоналу**	**Характеристика точки відбору**	**Візуальна оцінка механічного складу зразка**
R2, скупчення ПВМ 305/2	ЗСР	Приміщення під шахтою зруйнованого реактора, з місця скупчення лавоподібних паливовмісних матеріалів (ПВМ)	Пісок, цементна крихта
R4, контроль	ЗВД	Проммайданчик поблизу входу до ОУ. Контрольний зразок	Пісок, глина, протоґрунт
R5, 305/2	ЗСР	Приміщення під шахтою зруйнованого реактора, в кутку	Пісок, цементна крихта
R7, шахта Ю-9-В	ЗЛД	Внутрішній вихід шахти Ю-9-В	Цементна крихта, слиз
R8, стеля, 30/2	ЗСР	Приміщення під шахтою зруйнованого реактора, в кутку, зразок зі стелі	Цементна крихта, вологий зразок
R11, шахта КЗ-9-К	ЗЛД	Шахта КЗ-9-К системи моніторингу реактора Фініш	Вологий зразок: іржа, слиз, пісок
R12, контроль	ЗВД	З-під стіни саркофага, відібрано з боку проммайданчика ОУ	Пісок, глина, протоґрунт

ч

2.1.2.2 Відбір проб ґрунту на території зони ЧЗВ

Для виділення тотальної ґрунтової ДНК та оцінки мікробіому використовували ґрунти зони відчуження ЧАЕС та ближніх територій. Відбори проб ґрунту здійснювались для моніторингу на початку та в кінці літа радіонуклідного забруднення протягом 2013–2016 років, відбір проб ґрунту для мікробіологічного аналізу було здійснено наприкінці літа 2016 року. Після відбору проб зразки зберігались у переносному холодильнику

для відбору проб для транспортування протягом 24 годин, після чого були передані для виділення ДНК і аналізу.

Для забезпечення точності відбору зразків проводилася координатна прив'язка точок відбору зразків за допомогою супутникових GPS-систем та прийомника GarmineTrexH (табл. 2.2) у системі WGS84 (World). Абсолютна похибка визначення координат складала менше за 6 м.

Таблиця 2.2. Координати точок відбору зразків у системі WGS84 (World) на території ЧЗВ

№ з/п	Місце відбору зразків	Рівень забруднення	Код зразка	Координата, північ	Координата, схід
1	Залісся, зона 30 км, ліс	Середній	C3	51°15'01.9"	30°09'01.5"
2	«Дитятки», КПП на виїзді із ЗВ, ліс	Низький, контроль	C5	51°06'59.8"	30°07'27.5"
3	Рудий ліс траншея Т22	Найвищий	C7	51°23'26.9"	30°04'15.9"
4	Рудий ліс поза траншеєю Т22	Високий	C4	51°22'42.5"	30°05'07.5"
5	Чистогалівка, зона10 км, ліс	Високий	C2	51°22'00.1"	30°01'06.3"

2.1.2.3 Відбір проб ґрунту на території ЗВП ФАЕС

Для виділення тотальної ґрунтової ДНК та оцінки мікробіому використовували ґрунти із ЗВП ФАЕС (табл. 2.3). Відбори проб ґрунту здійснювались протягом чотирьох сезонів 2014–2015 років. Після відбору проб зразки зберігались у переносному холодильнику для відбору проб для транспортування протягом 24 годин, після чого були передані для виділення ДНК і аналізу. Кожному зразку було присвоєно код точки відбору: J2, J3, H3 та інші, а також код сезону відбору: S – для літа, F – для осені, W – для зими та B – для проб, відібраних навесні 2015 року.

Таблиця 2.3. Координати точок відбору зразків у системі WGS84 (World) на території ЗВП ФАЕС

№ з/п	Код зразка	Рівень забруднення	Координата, північ	Координата, схід
1	J2	контроль	37°27'44.60"	140°53'29.84"
2	J3	середнє	37°27'29.25"	140°53'54.20"
3	M3	низьке	37°27'36.48"	140°53'57.69"
4	J5	середнє	37°27'50.28"	140°55'01.80"
5	H3	високе	37°27'56.13"	140°55'13.29"
	J7	найвище	37°28'16.28"	140°56'7.68"

2.1.3 *Визначення основних хімічних характеристик субстратів*

2.1.3.1 Внутрішні приміщення ОУ

Вибір тест-методів був обумовлений обмеженням у доступі до використання лабораторного обладнання, складністю його подальшої дезактивації і необхідністю скорочення часу обробки кожного зразка з метою зменшення дози опромінення дослідників. Тому було використано одноразову систему Hanna Express для хімічного аналізу і тест-смужки індикатора для визначення pH.

Зразки субстрату були розведені в стерилізованій очищеній воді (Milli-Q® Integral Water Purification System, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) в співвідношенні 1:10, після чого було проведено визначення pH і вмісту хімічних елементів в отриманому розчині.

pH оцінювали за допомогою Tri-box pH 0,5–13,0 (Macherey-Nagel GmbH & Co., Düren, Germany) тест-смужками з роздільною здатністю 0,5.

Для вимірювання концентрації фосфатів було використано Low Range HI713 (Hanna Instruments, Rhode Island, США) у діапазоні 0,00–2,50 мг/л, з роздільною здатністю 0,04 мг/л і точністю 4 %.

Концентрація амонію визначалася за допомогою Ammonia Medium Range Colorimeter HI715 (Hanna Instruments, Rhode Island, США) у діапазоні 0,0–9,99 мг/л як NH_3–N, з роздільною здатністю 0,01 мг/л, і точністю 5 %.

Вміст заліза був визначений методом колориметрії на приладі Colorimeter HI721 (Hanna Instruments, Rhode Island, США) у діапазоні 0,00–5,0 мг/л, з роздільною здатністю 0,01 мг/л, і точністю 2 %.

2.1.3.2 Ґрунти ЧЗВ

Вміст основних поживних елементів визначали на базі ДУ «Чернігівський обласний державний проектно-технологічний центр охорони родючості ґрунтів і якості продукції». Гумус визначали за методом Тюріна [5]. Метод заснований на окисленні органічної речовини хромовою кислотою до утворення двоокису вуглецю. Кількість кисню, який був використаний для окислення органічного вуглецю, визначається за різницею між кількістю хромової кислоти до реакції і її залишком після окислення. 0,2 М розчин $K_2Cr_2O_7$ у сірчаній кислоті використовували як окислювач. Залишок хромової кислоти титрували 0,2 М розчином солі Мора по дифеніламіну. Повнота окислення органічної речовини складає 85–90 % при сухому озоленні. Вміст гумусу виражається у відсотках до повітряно-сухого ґрунту (ДСТУ 4289:2004).

Кислотність водної витяжки ґрунту ($pH_{водн}$) визначали за стандартною агрохімічною методикою за допомогою pH-метра при співвідношенні ґрунт–дистильована вода1:2,5 для мінеральних ґрунтів (ДСТУ 4289:2004).

Визначення pH сольової витяжки засноване на заміщенні обмінного водню 1,0 N розчином KCl (pH розчину 5,6–6,0). Кислотність (pH) сольового екстракту визначали потенціометрично із застосуванням скляного електрода. Співвідношення ґрунт–розчин становить 1:2,5 для мінеральних ґрунтів і 1:25 для органічних (ДСТУ 4289:2004).

Визначення рухомого калію проводили за методом Кірсанова. Метод використовується для некарбонатних ґрунтів. Калій із ґрунту екстрагували 0,2 М розчином HCl. Співвідношення ґрунт–розчин дорівнює 1:5. 10 г повітряно-сухого ґрунту змішували із 50 мл 0,2 N розчину HCl (pH < 1), перемішували 1 хв, відстоювали 15 хв і фільтрували. 5 мл фільтрату використовували для визначення рухомого фосфору колориметричним способом. Вміст калію визначали за допомогою полум'яного фотометра (ДСТУ 4405:2005).

Визначення рухомого фосфору проводили за методом Кірсанова. Фосфор екстрагують 0,2 М розчином HCl. Співвідношення ґрунт–розчин становить 1:5. Екстрагуються всі фосфати кальцію, велика частина полуторних оксидів і фосфорапатиту. Кількісне визначення P_2O_5 проводили колориметрично за методом Денігера [15].

Легкогідралізований азот визначали за Корнфілдом. Метод ґрунтується на лужному гідролізі органічних азотовмісних сполук ґрунту під дією на нього 1-н розчину NaOH у термостаті при 28 °С у чашці Конвея з прошліфованою кришкою протягом двох діб. Це умовно імітує процес окислення і розчинення кореневою системою рослин ризосферної мікрофлори. Внаслідок цього азот обмінного амонію, вільного і ввібраного аміаку, амідів, частково моно амінокислот, аміносахарів та деяких інших сполук виділяється із ґрунту у вигляді NH_3, який завдяки дифузії потрапляє у внутрішнє відділення чашки і поглинається розчином H_3BO_3:

$$3\ NH_3 + H_3BO_3 = (NH_4)_3BO_3.$$

Після закінчення гідролізу аміак кількісно визначали титруванням 0,1 н розчином H_2SO_4:

$$2\ (NH_4)_3BO_3 + 3\ H_2SO_4 = 3\ (NH_4)_2S_4 + 2\ H_3BO_3.$$

За кількістю сірчаної кислоти, витраченої на титрування, визначали вміст азоту в розчині [15].

2.1.3.3 Ґрунти ЗВП ФАЕС

Вміст загального вуглецю, азоту, кисню та водню визначали за допомогою Elementar vario EL cube (Analysensysteme GmbH, Німеччина) за протоколом виробника: 0,25 г наважки просіяного повітряно-сухого зразка ґрунту пакували в алюмінієву фольгу, після чого вимірювали вміст перелічених вище елементів за допомогою спалювання зразка з подальшою сепарацією результуючої газової суміші.

Вміст загального органічного вуглецю та гумусу визначали за допомогою Total Organic Carbon Analyzer (Shimadzu Corporation, Японія) за протоколом виробника: 0,25 г наважки просіяного повітряно-сухого зразка ґрунту пакували в алюмінієву фольгу, після чого вимірювали вміст перелічених вище елементів за допомогою спалювання зразка за участі каталізатора з подальшою сепарацією результуючої газової суміші.

Вміст оксидів металів визначали за допомогою рентгенофлуоресцентного аналізу (Rigaku Corporation, Японія). 0,1 г наважки просіяного повітряно-сухого ґрунту розміщували в кюветах, які піддавали аналізу у приладі.

2.2 Вимірювання радіоактивності і дозових навантажень

2.3 Вимірювання вмісту радіонуклідів у забруднених радіонуклідами субстратах

2.3.1.1 Об'єкт «Укриття»

Для оцінки питомої активності γ-випромінюючих радіонуклідів зразки були розведені у поживному середовищі LB (Sigma-Aldrich) у співвідношенні 1:23 000 у пробірці об'ємом 15 мл і виміряні з використанням коаксіального детектора з високочистого германію (HPGe) (GC3020 з Multi Channel Analyzer Lynx системою; Canberra, Meriden, США). Ефективність підрахунку

напівпровідникового HPGe детектора була відкалібрована з використанням джерела об'єму 15 мл (MX033U8PP, Japan Radioisotope Association, Tokyo, Japan). Програмне забезпечення Genie 2000 було використано для аналізу відповідних піків в енергетичних спектрах 661,6 кеВ для ^{137}Cs, 59,6 кеВ для ^{241}Am, мінімально детектована активність для заданих умов складала 23 Бк для ^{137}Cs та1,5 Бк для ^{241}Am.

2.3.1.2 Ґрунти ЧЗВта ЗВП ФАЕС

Для оцінки питомої активності γ-випромінюючих радіонуклідів зразки ґрунту були доведені до повітряно-сухого стану, просіяні і переміщені в кювети місткістю 100 г і виміряні з використанням коаксіального детектора з високочистого германію (HPGe) (GC3020 з Multi Channel Analyzer Lynx системою; Canberra, Meriden, США). Для калібрування гамма-спектрометра використовували сертифіковані еталони з відповідною матрицею. Програмне забезпечення Genie 2000 було використано для аналізу відповідних піків в енергетичних спектрах 661,6 кеВ для ^{137}Cs, мінімально детектована активність для заданих умов складала 23 Бк.

2.3.2 *Характеристика сезонної зміни потужності дози експозиційного випромінювання на території ЗВП ФАЕС*

Для погодинної оцінки кумулятивних доз на території водозбору річки Такасі використовували дозиметри типу D-шаттл (Chiyoda Technol Corp., Японія). Ці дозиметри використовують напівпровідникову технологію з діодом Si-PIN (розміром 1,2 см на 1,4 см) в якості гамма-детектора і розташовуються у свинцевому колімованому щиті (завтовшки 3 см на верхній частині, 3 см збоку і 2 см знизу) з колімаційним вікном розміром 3,3 см у нижній стороні щита навпроти діода.



Рисунок 2.2. Дозиметри з індикацією поглинутої дози на момент встановлення (точки H3 та J7)

Ці пристрої фіксують початкові потужності дози всередині коліматора, які корелюють з потужністю дозового навантаження на поверхні ґрунту (з діаметром, приблизно рівним установленій висоті) безпосередньо під вікном колімації. Дозиметри типу D-шаттл були встановлені на висоті 10 см над поверхнею ґрунту; D-shuttle були встановлені на місцях S1 та S2 (водозбір річки Такасе) 19 жовтня 2015 року на висоті 10 см над поверхнею ґрунту. Слід зазначити, що показники потужності дози D-шаттла значно нижчі порівняно з потужністю дози у повітрі на висоті 1 м, виміряної з використанням PDR-111 для кишенькового обстеження ALOKA. Тим не менш, дані D- шаттла набагато чутливіші до змін у депонуванні і перерозподіленні радіоцезію безпосередньо під віконцем коліматора [186].

Потужність поглинутої дози в польових умовах вимірювали за допомогою системи, розробленої на базі SUREC [105], що обладнана NaI детектором та системою GPS-позиціонування.

2.3.3 *Розрахунок дозових навантажень на мікробіоми ґрунтів*

Поглинуті дози, отримані мікроорганізмами при умові існування у забруднених радіонуклідами ґрунтах, було обраховано на основі даних щодо питомої активності радіонуклідів у ґрунті. Для уможливлення обрахунків

було прийняте спрощення, згідно з яким ґрунт вважається гомогенним повітряно-сухим середовищем. Питома активність ^{137}Cs була отримана експериментально, дані щодо активності ^{90}Sr – одержано з бази даних УкрНДІ сільськогосподарської радіології НУБіП України [175].

Зовнішні поглинуті дози для мікроорганізмів були обраховані за допомогою пакета програм Biota DC [337], розрахунок проводився за методом часового інтегрального коефіцієнта активності для об'єктів прісноводної фауни вагою 10^{-6} кг та параметрами форми 0,1: 0,1 та рівноважними умовами в навколишньому середовищі для 365 днів (Табл. 2.4), та ERICA dose assessment tool [84] (обрахунок проводився для обєктів фітопланктона для прісноводних екосистем) із фактором невизначеності, що дорівнював 3 %.

Таблиця 2.4. Коєфіцієнти, використані для обрахунку зовнішніх поглинутих доз для радіонуклідів, обраховані за допомогою Biota DC [337], мкГр/г на Бк/кг

№ з/п	Радіонуклід	Дозовий коєфіцієнт
1	^{137}Cs	$4{,}08\times10^{-4}$
2	^{90}Sr	$5{,}42\times10^{-4}$
3	^{238}Pu	$1{,}04\times10^{-6}$
4	$^{239}Pu+^{240}Pu$	$1{,}06\times10^{-6}$
5	^{241}Am	$1{,}66\times10^{-5}$

2.4 Виділення і секвенування ДНК

Загальну геномну ДНК усіх зразків обробляли за уніфікованою методикою. ДНК виділяли за допомогою набору реактивів PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, США) відповідно до протоколу

виробника [289]. Зразки ДНК були упаковані в контейнер на льоду і доставлені в лабораторію для подальшого аналізу. Концентрація і якість екстрагованої ДНК було перевірено з використанням Qubit 2.0 Fluorimeter (Invitrogen Corporation, Carlsbad, США).

Зразки ДНК було ампліфіковано з праймерами для 16S рРНК, після чого просеквеновано високоваріабельні області V3 і V4 у Research and Testing Laboratory (Lubbock, Техас, США) на приладі Illumina MiSeq (Illumina Inc., США) з набором баркодів, рекомендованих виробником для 16S рРНК аналізів.

2.5 Біоінформатична обробка

Біоінформатичну обробку зразків проводили за підібраним та модифікованим (розд. 5.4) протоколом. У результаті секвенування описаних зразків по амплікону 16S рРНК були отримані 12 файлів за прямими і зворотними рідами при використанні платформи Illumina MiSeq. Отримані дані секвенування ДНК були представлені у FastQ форматі, та використовувались для аналізу зразки тільки прямих прочитань — *R1.

Таблиця 2.5. Технічна характеристика досліджуваних зразків з об'єкта «Укриття»

Код зразка	Назва файлу	Загальна кількість нуклеотидів, п. о.	Вміст ГЦ, %	Довжина сиквенсу
R4, контроль	4365-R4-MS357wF_R1.fastq	39 669	58	36–251
R5, 305/2	4365-R5-MS357wF_R1.fastq	53 364	57	35–251
R7, шахта Ю-9-В	4365-R7-MS357wF_R1.fastq	32 708	56	37–251
R11, шахта КЗ-9-К	4365-R11-MS357wF_R1.fastq	29 135	55	37–251

R12, контроль	4365-R12-MS357wF_R1.fastq	11 914	57	165–251
R13, дренажна труба	4365-R13-MS357wF_R1.fastq	33 404	57	38–251

У результаті секвенування амплікону 16S рРНК зі зразків ДНК з приміщень реактора (табл. 2.5) були отримані 12 файлів; зі зразків із зони відчуження ЧАЕС – 12 файлів (табл. 2.6); зі зразків, отриманих із ЗВП ФАЕС, – 30 файлів (табл. 2.7) у форматі fastq, прямі і зворотні ріди для кожного зразка. Контроль якості отриманих даних проводився з використанням FastQC з відкритим вихідним кодом. Для подальшого аналізу використовували тільки прямі ріди. Для обробки даних послуговувались запатентованою послідовністю дій (www.mrdnalab.com, MR DNA) спільно з біоінформатичним сценарієм QIIME з відкритим кодом (http://qiime.org/) [90].

Таблиця 2.6. Технічна характеристика досліджуваних зразків ґрунтів ЧЗВ

Місце відбору зразків	Код зразка	Назва файлу	Загальна кількість нуклеотидів п. о.	Вміст ГЦ, %	Довжина сиквенсу
Чистогалівка, 10-км зона, ліс	C2	20-EL5989_I20-24141552\	450	57	50–250
Залісся, 30-км зона, ліс	C3	21-EL5990_I21-24141553\	450	57	35–251
Рудий ліс поза траншеєю Т22	C4	22-EL5991_I22-24141554\	450	58	38–251
«Дитятки», КПП на виїзді із ЗВ, ліс	C5	23-EL5992_I23-24141555\	450	58	38–251
Рудий ліс траншея Т22	C7	24-EL5993_I24-24141556\	450	55	39–251

З урахуванням вилучення провайдером баркодів у цьому наборі даних етап попередньої обробки вихідних даних був виконаний

split_libraries_fastq.py із зазначенням відповідно “not-barcoded”. Етап вилучення химер був пропущений, адже мета цієї роботи – визначення біорізноманіття мікробіому, а не збірка геномів. Для того щоб побудувати .biom OTU таблицю був використаний скрипт pick_closed_reference_otus.py з QIIME [280]. Класифікацію OTU таблиць було виконано з 97 % збіжністю і, додатково, був виконаний de-novo аналіз за допомогою бази даних Greengenes v 13_5 [227]. Альфа-різноманіття було оцінено за допомогою alpha_diversity.py з QIIME [54].

Таблиця 2.7. Технічна характеристика досліджуваних зразків ґрунтів ЗВП ФАЕС

Назва файлу	**Код зразка**	**Загальна кількість нуклеотидів п. о.**	**Вміст ГЦ, %**	**Довжина сиквенсу**
1-EL5970_I1-24141533\	WH3, найвища доза, зима	450	58	36–251
2-EL5971_I2-24141534\	WM3 низька доза, зима	450	57	35–251
3-EL5972_I3-24141535\	WJ7 висока доза, зима	450	56	37–251
4-EL5973_I4-24141536\	WJ5 середня доза, зима	450	55	37–251
5-EL5974_I5-24141537\	WJ3 середня доза, зима	450	57	45–251
6-EL5975_I6-24141538\	WJ2 контроль, зима	450	57	38–251
7-EL5976_I7-24141539\	FH3 найвища доза, осінь	450	58	36–251
8-EL5977_I8-24141540\	FM3 низька доза, осінь	450	57	35–251
9-EL5978_I9-24141541\	FJ7 висока доза, осінь	450	56	37–251

10-EL5979_I10-24141542\	FJ5 середня доза, осінь	450	55	37–251
11-EL5980_I11-24141543\	FJ3 середня доза, осінь	450	57	50–251
12-EL5981_I12-24141544\	FJ2 контроль, осінь	450	57	38–251
13-EL5982_I13-24141545\	SH3 найвища доза, літо	450	58	36–251
14-EL5983_I14-24141546\	SM3 низька доза, літо	450	57	35–251
15-EL5984_I15-24141547\	SJ7 висока доза, літо	450	56	37–251
16-EL5985_I16-24141548\	SJ5 середня доза, літо	450	55	37–251
17-EL5986_I17-24141549\	SJ3 низька доза, літо	450	57	38–251
18-EL5987_I18-24141550\	SJ2 контроль, літо	450	57	38–251

2.5.1 *Візуалізація даних*

Отримані дані було оброблено та візуалізовано за допомогою наступних пакетів програм:

- мови програмування R [104, 296] з використанням пакетів Bioconductor [374] для побудови і візуалізації графіків принципових координат (PCoA) та vegan [255] для проведення аналізу дублювання (RDA);
- GraPhlAn для візуалізації функцій та метаданих мікробіомів [61];
- KRONA для інтерактивної візуалізації таксономічного складу мікробіомів [257].

2.5.2 *Статистична обробка результатів*

Статистичну значущість отриманих результатів було оцінено за за критерієм Фішера за допомогою пакета програм Microsoft Excel 2013 та

Origin 9.1. Гіпотезу про нормальний розподіл перевіряли за критерієм згоди Пірсона. Кореляцію оцінювали за Пірсоном, достовірність коефіцієнтів перевіряли за допомогою критерія Ст'юдента. Гіпотезу про рівність середніх у вибірках перевіряли однофакторним дисперсійним аналізом (ANOVA) [14].

Для аналізу бета-різноманітності використовували аналіз основних координат (PCoA), що перетворює залежні змінні у незалежні компоненти. Відмінності у вмісті основних нутрієнтів у зразках та кількості копій бактеріальних генів 16S рРНК серед місць відбору проб оцінювали за допомогою одностороннього ANOVA у програмному пакеті SPSS 19.0. Рівень статистичної значущості становив $p < 0{,}05$. Ґрунтуючись на таксономічній анотації, послідовності були згруповані на рівні порядку для побудови кривих розрідження та розрахунку індексів різноманітності, включаючи Chao1 та Shannon за допомогою пакета програм QIIME. Кореляції між структурою бактеріальної спільноти та факторами навколишнього середовища визначали за допомогою аналізу надлишковості - Redundancy Analysis, RDA - у надбудові XLSTAT для MS Excel. Аналіз надлишковості (RDA) був використаний для визначення зв'язку між вимірюваними змінними середовища та даними різноманіття бактеріального угруповання після первинного аналізу на наявність/відсутність лінійної залежності таксономічного складу від зміни незалежних змінних у середовищі. Значущість залежностей оцінювали за допомогою тесту ANOVA.

2.6 Методологічна схема інтеграції радіаційних, біогеохімічних і мікробіомних даних

Методологічна логіка роботи ґрунтується на порівняльному аналізі трьох типів радіонуклідно забруднених систем, які відрізняються за походженням, рівнем дозового навантаження, фізико-хімічними характеристиками субстрату та ступенем сформованості мікробних

угруповань, але об’єднані спільним чинником - хронічною дією радіонуклідного забруднення. Такий дизайн відповідає сучасному підходу до аналізу мікробіомів радіоактивно забруднених середовищ, у межах якого радіаційний чинник оцінюється разом із супутніми екологічними змінними, а не ізольовано від них [233, 381].

Ґрунти Чорнобильської зони відчуження розглядалися як модель тривало сформованої пост аварійної екосистеми з хронічним радіонуклідним забрудненням і відносно стабілізованими едафічними умовами. Ґрунти зон, які важко повернути у господарювання навколо АЕС Фукусіма, використовувалися як незалежна пост аварійна система з вираженою сезонною динамікою вологості, температури та міграції радіоцезію. Субстрати об’єкта “Укриття” ЧАЕС розглядалися як модель техногенної протоекосистеми з екстремальним дозовим навантаженням, лужним pH, дефіцитом поживних речовин і обмеженою сформованістю ґрунтового профілю. Доцільність такого порівняння підтверджується даними сучасних робіт, у яких показано, що мікробні угруповання радіоактивно забруднених ґрунтів і техногенних водних середовищ формуються під впливом поєднання радіаційного, хімічного, трофічного та матеріального чинників [162, 346, 385].

Таким чином, порівняння цих об’єктів не є простим зіставленням різнорідних мікробіомів, а становить градієнтний дизайн: від природних ґрунтових екосистем із хронічним низько- та середньодозовим впливом до техногенних субстратів з екстремальними умовами існування. У межах цього дизайну радіонуклідне забруднення і поглинута доза розглядалися як основний радіобіологічний фактор, а pH, азотовмісні сполуки, органічна речовина, вологість, сезонність і тип субстрату - як фактори-модифікатори біологічної відповіді мікробіому [389, 388, 391].

Інтеграція радіаційних, агрохімічних, фізико-хімічних і метагеномних даних здійснювалася за принципом послідовного зіставлення: 1) визначення радіонуклідного забруднення та розрахунок дозового навантаження; 2)

характеристика субстрату за показниками pH, органічної речовини, поживних елементів і вологості; 3) оцінка таксономічного складу та показників альфа- і бета-різноманіття; 4) інтерпретація функціонального потенціалу мікробіому; 5) аналіз зв’язків між мікробіомними показниками та радіаційно-біогеохімічними змінними. Такий підхід дає змогу уникнути редукції результатів до простого опису таксонів і перейти до оцінки екосистемної радіобіологічної відповіді мікробіому.

Таблиця 2.7. Методологічна роль досліджуваних об’єктів у порівняльному аналізі мікробіомів

Об’єкт	**Методологічна роль**	**Радіаційний фактор**	**Основні модифікатори**	**Очікувана відповідь мікробіому**
Ґрунти ЧЗВ	Хронічно забруднена поставарійна ґрунтова екосистема	^{137}Cs, ^{90}Sr, тривале дозове навантаження	гумус, азот, pH, вологість, тип ґрунту	стабілізована або частково адаптована структура; селекція стресостійких груп
Ґрунти ЗВП ФАЕС	Незалежна поставарійна система з сезонною динамікою	^{137}Cs, сезонна зміна потужності дози	вологість, температура, рельєф, азот, історія землекористування	перевірка повторюваності закономірностей у іншому кліматичному та ґрунтовому контексті
Субстрати ОУ ЧАЕС	Техногенна протоекосистема екстремального типу	високі локальні дози, радіоактивні субстрати	лужний pH, дефіцит органіки, бетон, пил, продукти корозії	домінування адаптованих або випадково занесених стресостійких угруповань; формування протоекосистем

3 МІКРОБІОМИ ПРИМІЩЕНЬ ОБ'ЄКТА УКРИТТЯ ЧАЕС

3.1 Характеристика внутрішніх умов ОУ

Залежно від розташування точок відбору, субстрат мав істотно різні фізико-хімічні характеристики [28, 25, 24]. Зразки, відібрані із ЗВД, контрольного варіанта (R4) та ЗСР (R5, середня доза), які були відібрані поблизу металевих конструкцій і містили значну кількість іржі, характеризувалися високим вмістом рухомих сполук заліза. Зразок, відібраний із ЗЛД, R12 із низькою поглинутою дозою, взято поблизу виходу з будівлі реакторного блока дренажної труби; він містив значну фракцію органіки. Проби були відібрані на початку жовтня 2015 р., коли температура повітря коливалась від –5 °С вночі до +15 °С вдень, а в приміщеннях ОУ, залежно від локалізації ПВМ, температура становила від +10–15 °С для R7 (ЗЛД, висока доза) і R11 (ЗЛД, середня доза) до +35–40 °С для проб № 2 і 5 (ЗСР, середня та ЗЛД, середня дози відповідно). Приміщення завжди затемнені, тому можна стверджувати, що умови для формування фототрофних мікроорганізмів збіднені.

У межах загальної методологічної схеми дисертації мікробіоми приміщень ОУ ЧАЕС розглядаються як модель формування мікробних угруповань у техногенному середовищі з екстремальним дозовим навантаженням, високою просторовою неоднорідністю субстрату та нетиповими для ґрунтів біогеохімічними умовами. Основним завданням цього етапу було не лише описати таксономічний склад мікробіому, а й визначити, чи зберігається здатність мікробних угруповань до формування структурованих спільнот за умов високого радіаційного, хімічного, лужного та трофічного стресу.

Такий підхід відповідає сучасним уявленням про мікробіологію техногенних радіоактивних середовищ, де життєздатність і активність

мікроорганізмів визначаються не лише дозовим навантаженням, а й pH, солоністю, температурою, доступністю води, наявністю органічних джерел енергії, металів, цементних матеріалів і продуктів корозії [385, 346, 383, 241].

Нижче у табл. 3.1 наведено агрохімічні показники та реакцію ґрунтового середовища субстратів ОУ. Вимірювання їхньої концентрації проводилося в 10 %-й водній витяжці, тому відсутність певного катіона у виміряному зразку необов'язково свідчить про його відсутність в оригінальному зразку. Всі зразки мають лужну реакцію. Це може свідчити про те, що основою для формування субстрату став не пил, занесений ззовні, – ЧАЕС побудована на дерново-підзолистих ґрунтах, які мають кислу реакцію, а цементна крихта залізобетонних конструкцій, котра має лужну реакцію [310].

Таблиця 3.1. Деякі фізико-хімічні і агрохімічні показники субстратів, відібраних в ОУ ЧАЕС

Код зразка	Зона доступу, рівень поглинутої дози	Точка відбору зразка	Реакція ґрунтового середовища, pH H_2O	Вміст		
				рухомих сполук фосфору, мг/кг	рухомих сполук заліза ($Fe^{2+,3+}$), мг/кг	амонійного азоту, NH_4^+, мг/кг
R4	ЗВД, контроль	проммайданчик	8,0	–	6,0±0,2	–
R5	ЗСР, середня	приміщення 305/2	8,5	4,0±0,5	–	–
R7	ЗЛД, висока	шахта Ю-9-В	7,5	–	39,3±5,0	13,0±2,1
R11,	ЗЛД, середня	шахта КЗ-9-К	8,5	5,0±1,0	12,4±0,3	–
R12	ЗВД, контроль	проммайданчик	7,5	–	–	18,0±3,2

Забезпеченість субстратів сполуками амонію в зразках, відібраних із зони лімітованого доступу, із високою дозою (шахта Ю-9-В, R7), характеризується як низька та показує їх заселення мікроорганізмами й активні хімічні і біологічні процеси з перетворення азотвмісних сполук. Високі концентрації рухомих сполук заліза в усіх зразках, за винятком R5

(відібраний із зони суворого режиму, середня поглинута доза) та контрольної ділянки (R12) є наслідком активних хіміко-біологічних процесів корозії металевих частин конструкцій.

Питома активність зразків також варіює доволі суттєво (табл. 3.2). Основнй дозоутворюючий радіонуклід – ^{137}Cs та ^{90}Sr. Також вагомий внесок у формування поглинутої дози в зонах суорого режиму та лімітованиго доступу виявляють ізотопи ^{239}Pu+^{240}Pu з великим періодом напіврозпаду. Зразок, відібраний із зони суворого режиму (R5, середня поглинута доза), і зразок, відібраний із зони лімітованого доступу (R7, середня поглинута доза), були взяті біля місць скупчення паливновмісних матеріалів (ПВМ), що зумовило наявність ізотопів ^{241}Am [19].

Таблиця 3.2. Питома активність радіонуклідів у зразках субстрату, відібраного з ОУ ЧАЕС, Бк/кг

Опис зразка	**Режим доступу персоналу**	**^{137}Cs**	***^{90}Sr**	***^{238}Pu**	***^{239}Pu+^{240}Pu**	**^{241}Am**
R4, контроль	ЗВД, контроль	$2{,}3\times10^{6}\pm 9\times10^{4}$	–	–	–	–
R5, 012/15	ЗСР, середня	$5{,}1\times10^{7}\pm 8\times10^{2}$	$6{,}4\times10^{7}\pm 1{,}5\times10^{6}$	$6{,}8\times10^{5}\pm 7{,}4\times10^{3}$	$1{,}4\times10^{6}\pm 5{,}8\times10^{4}$	$2{,}7\times10^{6}\pm 5{,}6\times10^{4}$
R7, шахта Ю-9-В	ЗЛД, висока	$7{,}4\times10^{7}\pm 1\times10^{5}$	$9{,}2\times10^{7}\pm 6{,}1\times10^{5}$	$9{,}9\times10^{5}\pm 2{,}3\times10^{3}$	$2{,}0\times10^{6}\pm 5{,}6\times10^{4}$	$3{,}9\times10^{6}\pm 4{,}5\times10^{4}$
R11, шахта КЗ-9-К	ЗЛД, середня	$3{,}3\times10^{8}\pm 3\times10^{6}$	–	–	–	–
R12, контроль	ЗВД, контроль	$1{,}6\times10^{7}\pm 3\times10^{6}$	–	–	–	–

* Питома активність радіонуклідів розрахована згідно зі співвідношенням активностей ^{90}Sr - ^{238}Pu - $^{239Pu+240}$Pu [20] та верифікована згідно з [19] та [173].

У зразках, відібраних із зони вільного доступу персоналу, з проммайданчика ОУ (R4 та R12), основними дозоформуючими радіонуклідами є ^{137}Cs, що цілком відображає ситуацію, що склалася поза

межами саркофага. Завдяки проведеним деконтамінаційним заходам, на цій ділянці реєструється майже повна відсутність альфа-випромінюючих ТУЕ, що суттєво знижує показники поглинутої дози і робить можливим перебування тут персоналу протягом усієї зміни.

Приміщення ОУ розподілено по зонах доступу для персоналу, що було зроблено, в тому числі, керуючись дозовими навантаженнями на персонал [19]. Примітно, тим не менш, що доза, сформована на місці відбору зразка R5, відібраного з зони суворого режиму, розташованої під шахтою зруйнованого реактора, менша, ніж у точці відбору зразка R7, відібраного з шахти системи «Фініш». Тим не менш, основними основний внесок в формування поглинутої дози формує ^{137}Cs, та ^{90}Sr та ТУЕ $^{238\text{-}240}$Pu і ^{241}Am, наслідком чого є найвищі значення поглинутої дози серед зразків, з яких вдалося виділити ДНК. Примітно, що в зразку R11, відібраного з системи контролю за сталом ОУ «Фініш», навіть попри відсутність ТУЕ, формуються високі значення поглинутої дози завдяки високій питомій активності ^{137}Cs.

Зразок із найвищим значеннями поглинутої дози (R7) був відібраний з шахт системи контролю за станом ОУ «Фініш», тому концентрації радіонуклідів, детектованих тут, вищі, ніж у зразках, відібраних із зони суворого режиму. Тим не менш, внесок ^{241}Am, ^{239}Pu + ^{240}Pu та ^{238}Pu тут також істотний і має характеристичну для ОУ конформацію.

Дозиметричний підхід, прийнятий Міжнародною комісією з радіологічного захисту (ICRP) для використання в охороні навколишнього середовища, був представлений у публікації ICRP 108 [161]. Відтоді подальший розвиток вимагав суттєвого перегляду. Було створено і розроблено програмне забезпечення для обрахування дозових коефіцієнтів (ДК), що представлено у [337]. ДК для зовнішнього опромінення наземної біоти були суттєво переглянуті та розширені. Поточні ДК застосовуються до організмів з масою тіла в діапазоні від 1 мг до 1000 кг, на висоті над

поверхнею землі від 0,1 до 500 м, для п’яти видів екосистем у ґрунті та навколишньому повітрі. Текст містить вказівки щодо того, як розробляти ДК шляхом інтерполяції опублікованих цінностей для життя стадії з масами від 1 мг до 1000 кг. Обчислювальна база постійного струму перейшла від даних викидів радіонуклідів у публікації 38 (ICRP, 1983) до сучасних наборів даних публікації 107 (ICRP, 2008a). Поглинені фракції та постійні струми для фотонів та електронів були розширені до максимальної енергії 10 МеВ для вирішення властивостей радіонуклідів у новій базі даних. На базі публікації було обраховано ДК для еталонних тварин і рослин (RAP). Дані сумісні з тими, що були опубліковані раніше, але перераховані з новими даними про викиди радіонуклідів та представлені в новому компонуванні на основі радіонуклідів, яке висвітлює міжвидові та міжресурсні мінливості ДК, що полегшує інтерполяцію ДК для практичної оцінки дози. Програмний інструмент BiotaDC, який призначений для оцінки ДК для визначених користувачем типів біоти, що зазнають дії будь-якого радіонукліда в поточній базі даних. Дані обраховували для клітин вагою 1 мг сферичної форми, для інтегральної дози, що могла б бути сформована з урахуванням констант розпаду радіонуклідів протягом року (табл. 3.3). Було обраховано ДК для зовнішнього опромінення, згідно з розробленими раніше моделями [144, 42, 34, 22], внутрішню дозу на бактеріальну клітину не обраховували.

Таблиця 3.3. Потужність поглинутої дози (D_{abs}) випромінювання в ОУ ЧАЕС

	ДК, мкГр/г на Бк/кг	Потужність D_{abs} на точках відбору проб, мГр/год				
Нукліди	**Зовнішня доза**	**R4, контроль**	**R5, 012/15**	**R7, шахта Ю-9-В**	**R11, шахта КЗ-9-К**	**R12, контроль**
^{137}Cs	$4{,}08\times10^{-4}$	$9{,}4\times10^{-1}$	21	30	135	6,4
^{90}Sr*	$5{,}42\times10^{-4}$	–	35	50	–	–
^{238}Pu*	$1{,}04\times10^{-6}$	–	$7{,}1\times10^{-4}$	$1{,}0\times10^{-3}$	–	–
^{239}Pu+ ^{240}Pu*	$1{,}06\times10^{-6}$	–	$1{,}5\times10^{-3}$	$2{,}2\times10^{-3}$	–	–
^{241}Am	$1{,}66\times10^{-5}$	–	$4{,}5\times10^{-2}$	$6{,}5\times10^{-2}$	–	–
Сумарна потужність дози, мкГр/год		1	56	80	135	7

* Питома активність радіонуклідів розрахована з урахуванням констант розпаду [20] та верифікована за [19] та [173].

Згідно з результатами, отримані потужності доз значно варіюють. Максимальні показники характерні не для проб, відібраних з зон суворого режиму, а для точки контролю в системі «Фініш», сформованій завдяки високій активності радіоактивного цезію, де показики досягають 80 мГр/год. В той же час, для проб, відібраних із зони суворого режиму, з підлоги в приміщенні 305/2 (R5), потужність поглинутої дози і складають 56 мГр/год, у той час як R4 та R12, відібрані з зони вільного доступу персоналу, на проммайданчику ОУ, з потужностями поглинутих доз 1 і 7 мГр відповідно, вважаємо контрольними.

Водночас для врахування біологічної дії іонізуючого випромінювання, виходячи з розрахункових даних щодо потужності поглинутої дози, було обраховано прижиттєві значення поглинутої дози (табл. 3.4). Середня тривалість життя однієї бактеріальної клітини складає 20 хвилин [3], отже,

виходячи із цих даних, було розраховано прижиттєву поглинуту дозу на бактеріальну клтину.

Таблиця 3.4. Середня розрахована прижиттєва поглинута доза на одну бактеріальну клітину, мГр

Опис зразка	**Режим доступу персоналу**	**Потужність поглинутої дози, мГр/год**	**Доза на клітину, мГр**
R4, контроль	ЗВД, контроль	1	0,3
R5, 012/15	ЗСР, середня	56	18,5
R7, шахта Ю-9-В	ЗЛД, висока	80	26,8
R11, шахта КЗ-9-К	ЗЛД, середня	135	4,5
R12, контроль	ЗВД, контроль	7	2,2

З результатів видно, що найбільшу прижиттєву дозу отримують бактеріальні клітини, відібрані на точці з зони лімітованого доступу, (R7) (шахта Ю-9-В), в той час як найменшу, або таку, яку можна вважати за умовний контроль, – на точках R4 та R12, що були відібрані з зони вільного доступу персоналу на проммайданчику ОУ.

3.2 Концентрація тотальної ДНК, виділеної зі зразків

Згідно з отриманими результатами, ДНК, виявлена у шести пробах, окрім відібраної із зони суворого режиму, на поверхні ПВМ (R2) та зі стелі приміщення 30/2 (R8), що дозволяє стверджувати про наявність живих організмів всередині ОУ.

Для подальшої роботи було використано шість зразків, у яких була присутня ДНК у достатній для секвенування кількості (табл. 3.5). Для оптимізації виходу пробукту ДНК було використано технологію, розроблену для виділення ДНК низьких титрів патогенних організмів [4, 287].

Таблиця 3.5. Концентрація виділеної тотальної ДНК

№ зразка	Режим доступу персоналу	Концентрація ДНК, нг/мл
R2, приміщення 305/2	ЗСР	–
R4, контроль	ЗВД	968±67
R5, приміщення 305/2	ЗСР	718±48
R7, шахта Ю-9-В	ЗЛД	258±25
R8, приміщення 30/2	ЗСР	–
R11, шахта КЗ-9-К	ЗЛД	804±69
R12, контроль	ЗВД	748±50

3.3 Оцінка якості даних секвенування за допомогою FastQC

На основі загальноприйнятої методології метагеномних досліджень та у зв'язку з гетерогенністю зразків, отриманих для дослідження, першочергово було перевірено якість даних результатів секвенування за допомогою програмного пакета FastQC. Результатом роботи програми є інтерактивні графіки якості за phred шкалою.

Як можна побачити на рис. 3.1, якість секвенування контрольного зразка з проммайданчика ОУ (R4) під кінець сіквенсу падає та лежить у межах від 10 до 20, що свідчить про низьку якість секвенування за шкалою phred і потребує додаткової фільтрації за якістю – quality filtering.

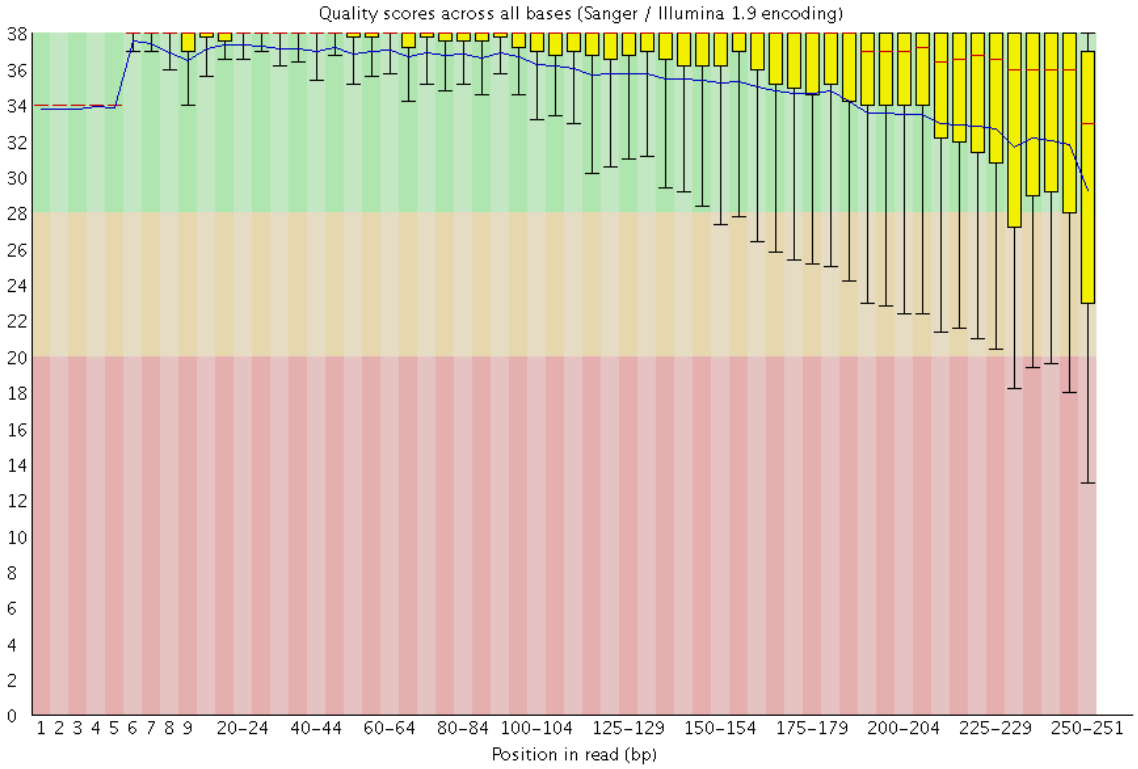


Рисунок 3.1. Графіки діапазону значень якості (за шкалою phred) усіх нуклеотидів у кожній позиції файлу R4, контроль

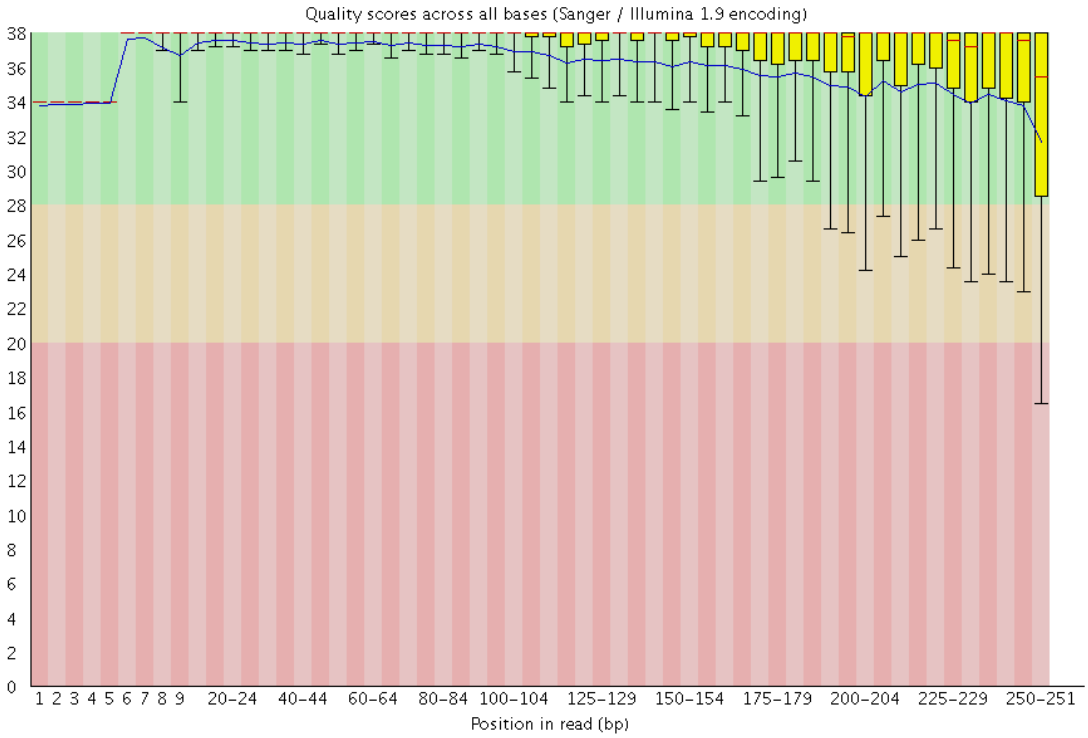


Рисунок 3.2. Графіки діапазону значень якості (за шкалою phred) усіх нуклеотидів у кожній позиції файлу R5, 012/15 (ББ-2)

Як можна побачити на рис. 3.2, якість секвенування зразка із зони суворого режиму, басейн-барботер 012/15 (R5), під кінець сіквенсу змінюється неістотно та лежить у межах від 10 до 30, що свідчить про достатню якість секвенування за шкалою phred і не потребує додаткової фільтрації за якістю.

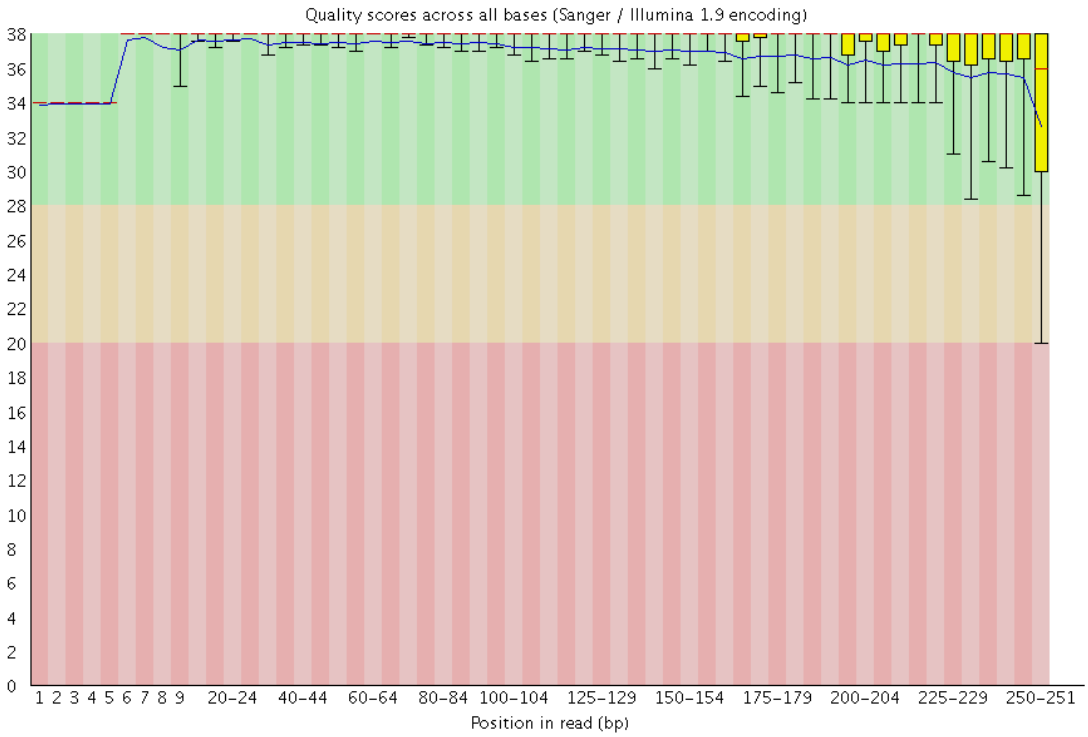


Рисунок 3.3. Графіки діапазону значень якості (за шкалою phred) усіх нуклеотидів у кожній позиції файлу R7, шахта Ю-9-В

Як можна побачити на рис. 3.3, якість секвенування зразка із зони лімітованого доступу, шахта Ю-9-В (R7), під кінець сіквенсу змінюється неістотно і лежить у межах від 10 до 30, що свідчить про достатню якість секвенування за шкалою phred і не потребує додаткової фільтрації за якістю.

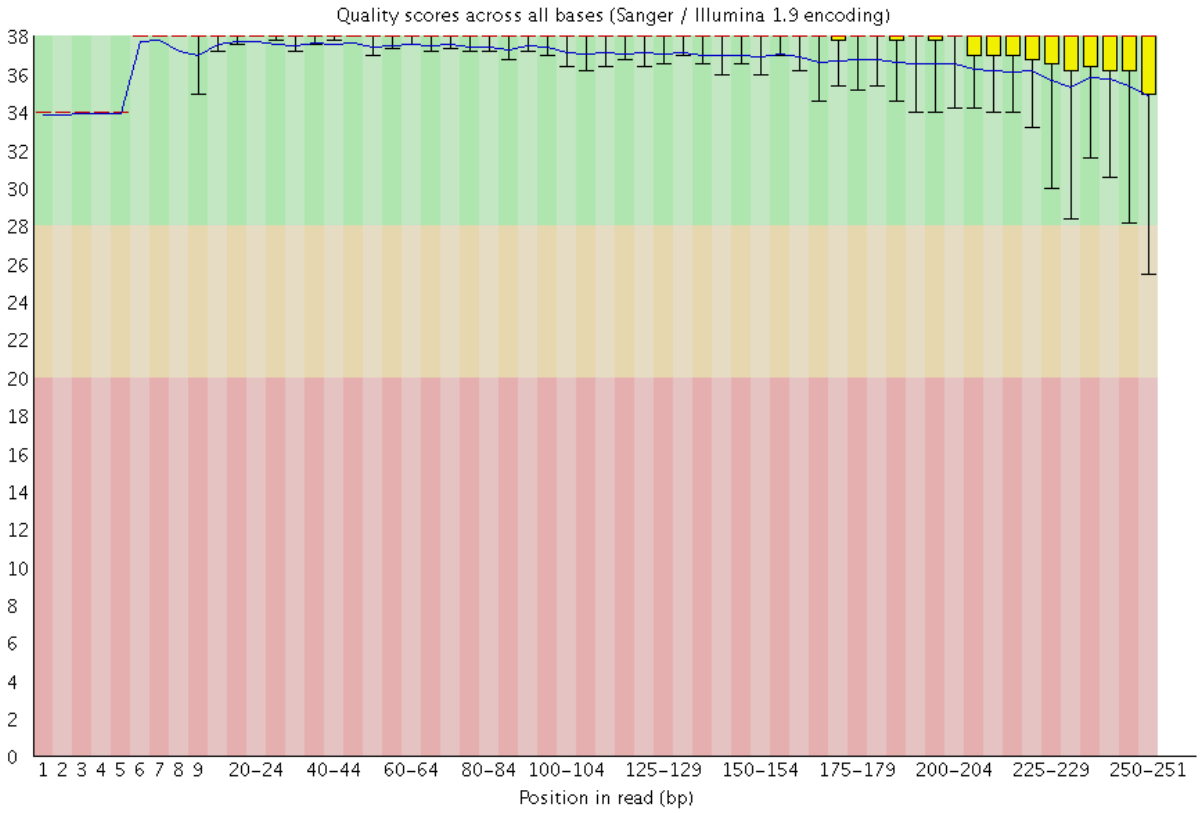


Рисунок 3.4. Графіки діапазону значень якості (за шкалою phred) усіх нуклеотидів у кожній позиції файлу R11, шахта Фініша КЗ-9-К

Як можна побачити на рис. 3.4, якість секвенування під кінець сіквенсу змінюється неістотно та лежить у межах від 10 до 30, що свідчить про достатню якість секвенування за шкалою phred і не потребує додаткової фільтрації за якістю.

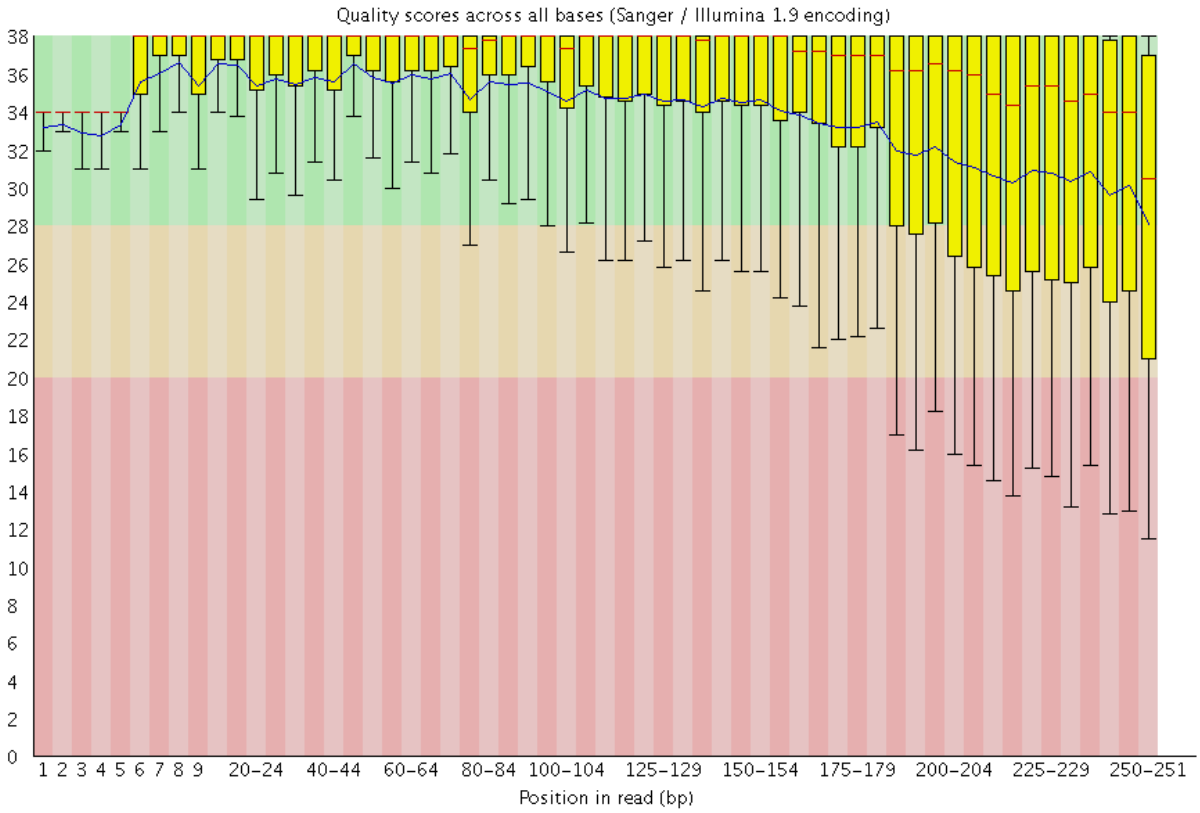


Рисунок 3.5. Графіки діапазону значень якості (за шкалою phred) усіх нуклеотидів у кожній позиції файлу R12, контроль на проммайданчику

Як можна побачити на рис. 3.5, якість секвенування зразка R12, контроль з проммайданчика під кінець сіквенсу істотно падає та лежить у межах від 10 до 20, що свідчить про низьку якість секвенування за шкалою phred і потребує додаткової фільтрації за якістю – quality filtering. Саме зразок R12 потребував найбільш прискіпливої уваги та найвищої якості фільтрації рідів.

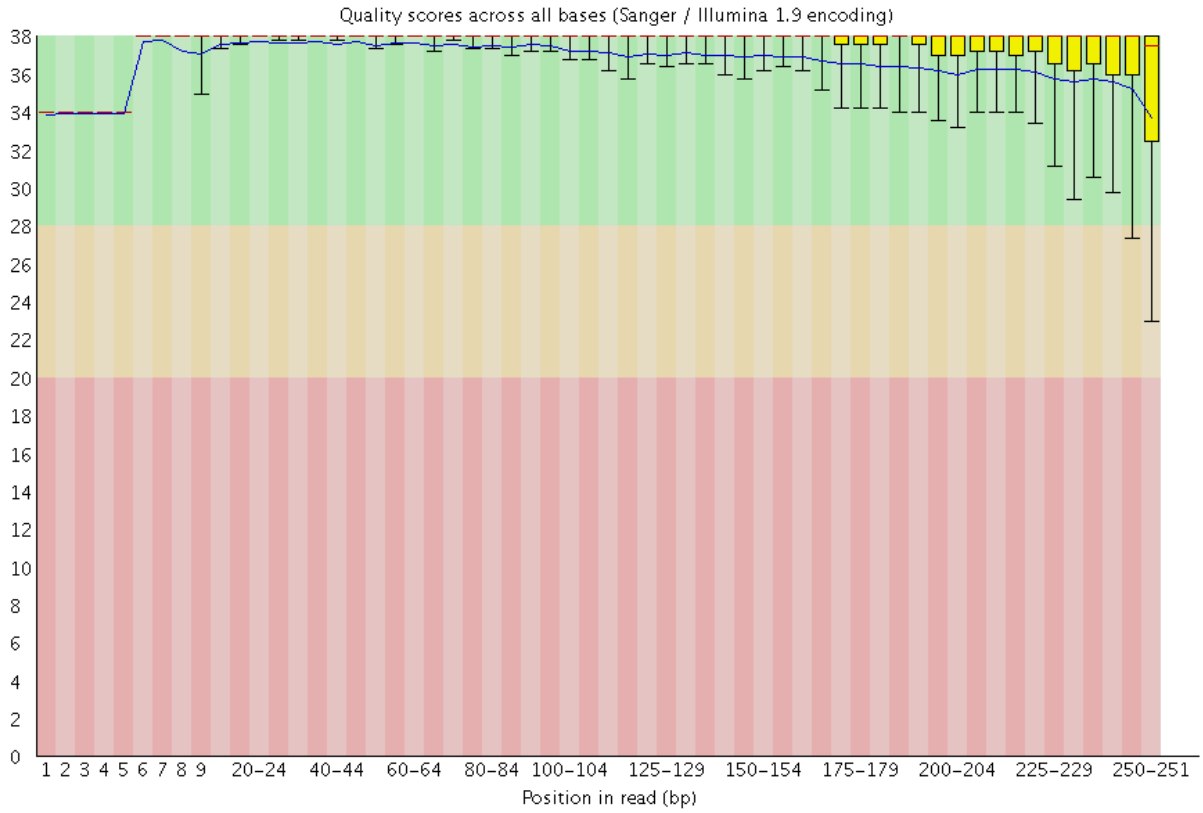


Рисунок 3.6. Графіки діапазону значень якості (за шкалою phred) усіх нуклеотидів у кожній позиції файлу R13, вихідна дренажна труба

Як можна побачити на рис. 3.6, якість секвенування під кінець сіквенсу змінюється неістотно та лежить у межах від 10 до 30, що свідчить про достатню якість секвенування за шкалою phred і не потребує додаткової фільтрації за якістю.

Після проведеної фільтрації та обробки даних за допомогою скрипта quality filtering усі отримані зразки виявились придатними до подальшої роботи й аналізу біорізноманіття зразків.

3.4 Біорізноманіття досліджуваних зразків

3.4.1 *Відсоток неідентифікованих видів у блочних пробах. Обмеження технології*

Маючи низку безперечних переваг, технологія секвенування нового покоління, а саме таксономічної ідентифікації за кодонами 16р РНК, має і

істотні обмеження. Принцип методу полягає у виділенні й ідентифікації відтинку геному, що відповідає за кодування білків, з яких складається велика субодиниця рибосоми, з наступним порівнянням отриманих послідовностей з базою даних (у нашій роботі використовували найбільшу бактеріальну БД GreenGenes [115, 67, 228]). Але щоб таке порівняння було ефективним, БД має містити всю необхідну інформацію. Дослідники-мікробіологи з усього світу працюють над розшифровкою геномів мікроорганізмів, виділяють їх у чисті культури та завантажують розшифровані геноми у бази даних. Звісно, бактерії, що зустрічаються найчастіше, а також важливі для індустрії, давно мають розшифровані геноми. Але екстремофіли, рідкісні мікроорганізми, бактерії з певною вибірковістю субстратів тощо ще не були виділені у чисту культуру, а отже, ідентифіковані, не маючи таким чином окремих записів у БД. Саме з таких мікроорганізмів і скаладається «темна матерія» мікробного світу [318], і вони, хоча і присутні у зразках, після порівняння з базами даних відображаються як «інші види».

Для проаналізованих нами зразків блочних субстратів відсоток неідентифікованих навіть на рівні Порядок мікроорганізмів коливався в межах від 11 % для контрольного зразка R4 до 3 % для зразка із зони лімітованого доступу R12 (рис. 3.7).

Таблиця 3.6. Обмеження методу таксономічного визначення за 16р РНК зразків, відібраних з ОУ

Показник	**R4, ЗВД**	**R5, ЗСР**	**R7, ЗЛД**	**R11, ЗЛД**	**R12, ЗВД**
Кількість OTU, всього	417±20	129±17	180±20	62±5	334±30
Ідентифіковано на рівні Порядок	373±52	120±16	165±21	59±9	309±37
Ідентифіковано на рівні Вид	181±18	77±12	94±14	37±2	164±25

Водночас при ідентифікації до Виду точність визначення суттєво знижується: так на найбільшу кількість мікроорганізмів ідентифіковано в умовно контрольних точках з низькою поглинутою дозою R4, та R12, та із зони лімітованого доступу на виході дренажної труби (R13) (табл. 3.6), що свідчить про присутність там звичайних, не екстремофільних мікроорганізмів, дослідження яких ведуться у всьому світі, а отже, геноми яких присутні в базах даних.

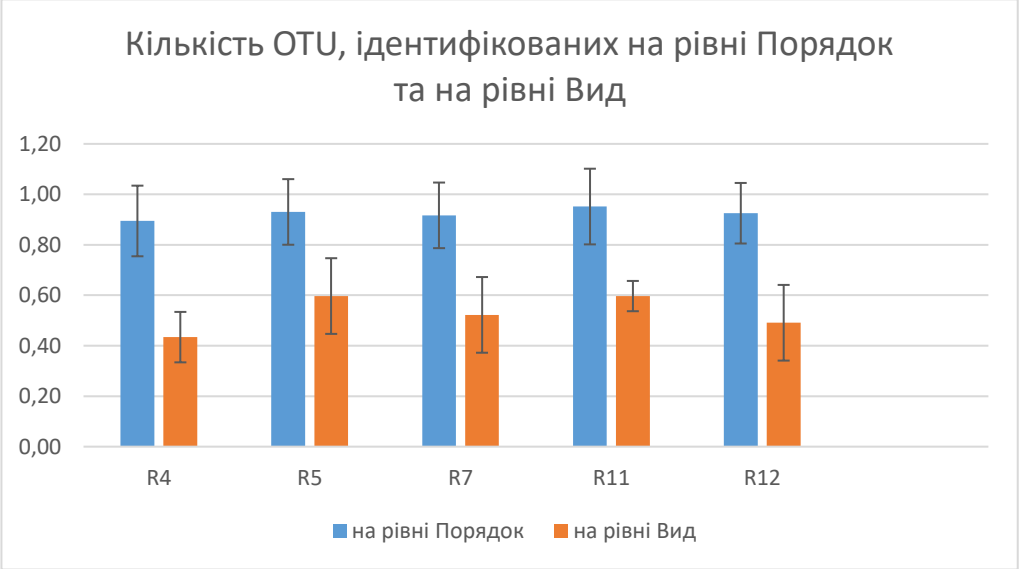


Рисунок 3.7. Частка OTU, ідентифікованих на рівні Порядок та на рівні Вид. R4 (ЗВД); R5 (ЗСР); R7 (ЗЛД); R11 (ЗЛД); R12 (ЗВД).

Утім під час аналізу бактеріального різноманіття субстратів важливо пам’ятати про обмеження, що несе із собою використання технології секвенування наступоного покоління, не зменшуючи важливості, репрезентативності й інформативності отриманих даних.

3.4.2 *Загальне бактеріальне різноманіття зразків субстрату, відібраних з ОУ*

Біорізноманіття екосистеми може бути визначено як повна генетична сукупність певного середовища, що складається зі всіх видів, що мешкають у ньому. Для збору видових назв, описів, ареалу розповсюдження і генетичної

інформації використовуються бази даних. Спеціалізоване програмне забезпечення застосовується для пошуку, візуалізації і аналізу інформації, і, що важливіше, її доступності іншим людям. Комп'ютерні симуляції моделюють такі речі, як популяційна динаміка, або обчислюють загальне генетичне здоров'я культури в агрономії. Один з найважливіших потенціалів цієї області полягає в аналізі послідовностей ДНК організмів або повних геномів цілих вимираючих видів, дозволяючи запам'ятати результати генетичного експерименту природи в комп'ютері і, можливо, використовувати знову в майбутньому, навіть якщо ці види повністю вимруть.

У результаті проведених аналізів було отримано файли з базою даних щодо загального біорізномніття ґрунтової мікрофлори. Для більш зручного відображення результати було проаналізовано, біорізноманіття скомпресовано на таксономічному рівні Порядок та відображено на рис. 3.7 [77, 28, 24].

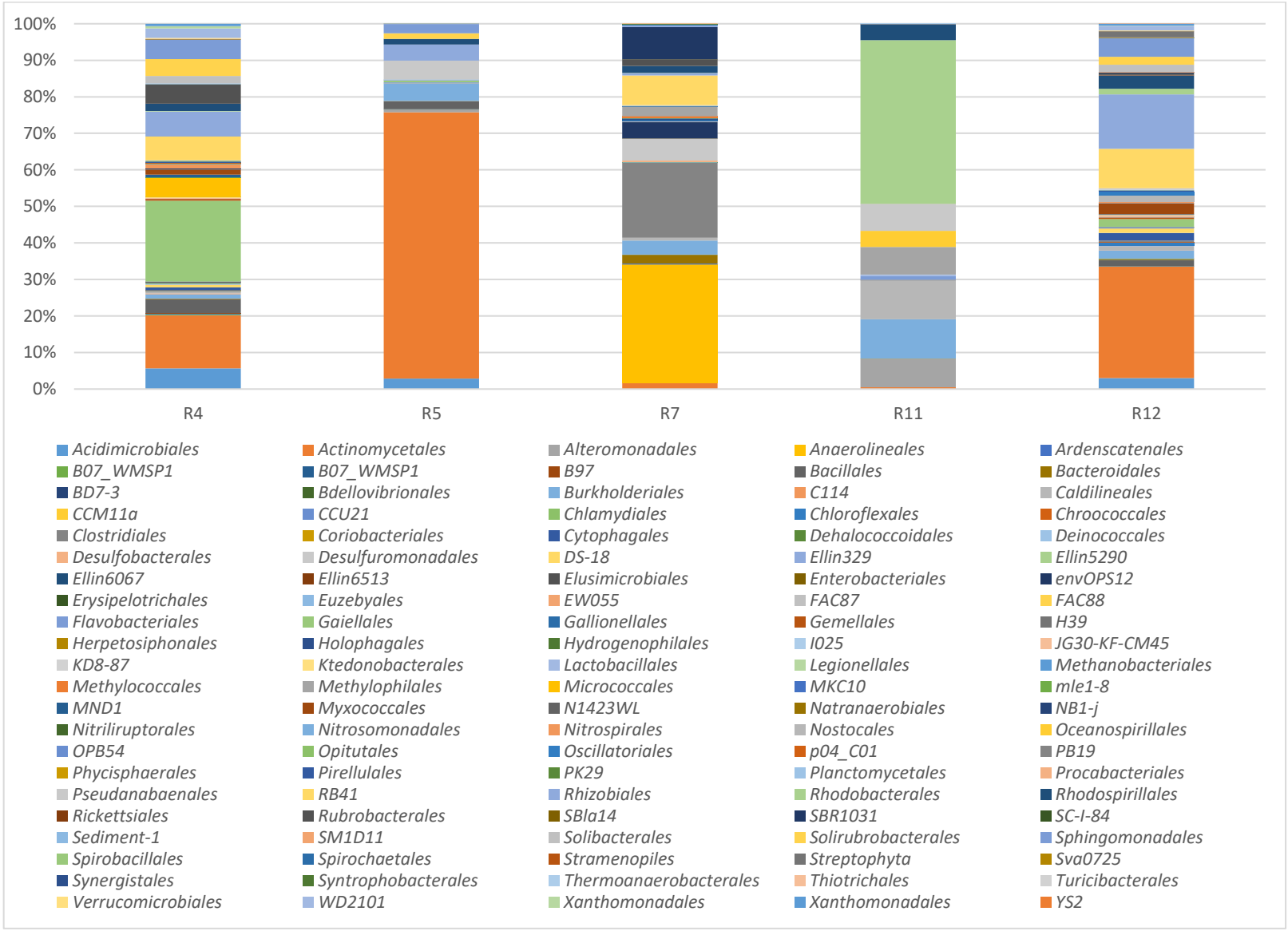


Рисунок 3.8. Загальне біорізноманіття мікрофлори у зразках субстрату, відібраних в ОУ ЧАЕС. R4 (ЗВД); R5 (ЗСР); R7 (ЗЛД); R11 (ЗЛД); R12 (ЗВД).

Інтерес до мікрофлори компонентів ЯПЦ виник досить давно, проте тільки недавно промислове використання бактерій як агентів ремедіації вийшло з галузі наукової фантастики і стало сприйматись як щось реалізоване. Більшість дослідницьких груп зосереджено на аналізі мікробного співтовариства басейнів витримки ядерного палива – як середовищ, найбільш доступних для мікроорганізмів. Дослідження спільнот проводилися у сховищах мокрого типу АЕС Кофрентес (Валенсія, Іспанія) [98], Селафілді [112], АЕС Медрас (Калпаккам, Індія) [171, 172], сховища в Саванна-Рівер (Саванна-Рівер, США)[293], АЕС Богуніце (Богуніце, Словаччина) [330]. Дослідники виділяють з колись чистої води, відібраної у сховищах, культури мікроорганізмів, здатних формувати біоплівки на сталевих поверхнях. Також деякі з культур [112, 330] показують здатність акумулювати радіоактивні цезій і кобальт з водних розчинів. Примітно, що ідентифіковані мікроорганізми не належать до якогось конкретного виду чи сімейства – так, наприклад, у Селлафілді цезій-акумулюючі культури належать до виду *Serratia*, а в Богуніце – *Micrococcus*, *Kocuria* і *Pseudomonas*, що вказує на здатність бактеріальних штамів адаптуватися до умов навколишнього середовища, розвиваючи необхідні в поточній ситуації здатності. У проаналізованих нами зразках присутні представники *Micrococcus* (R4 (ЗВД), R5 (ЗСР), R12 (ЗВД),) та *Pseudomonas* (всі, окрім R7 (ЗЛД), шахта Ю-9-В).

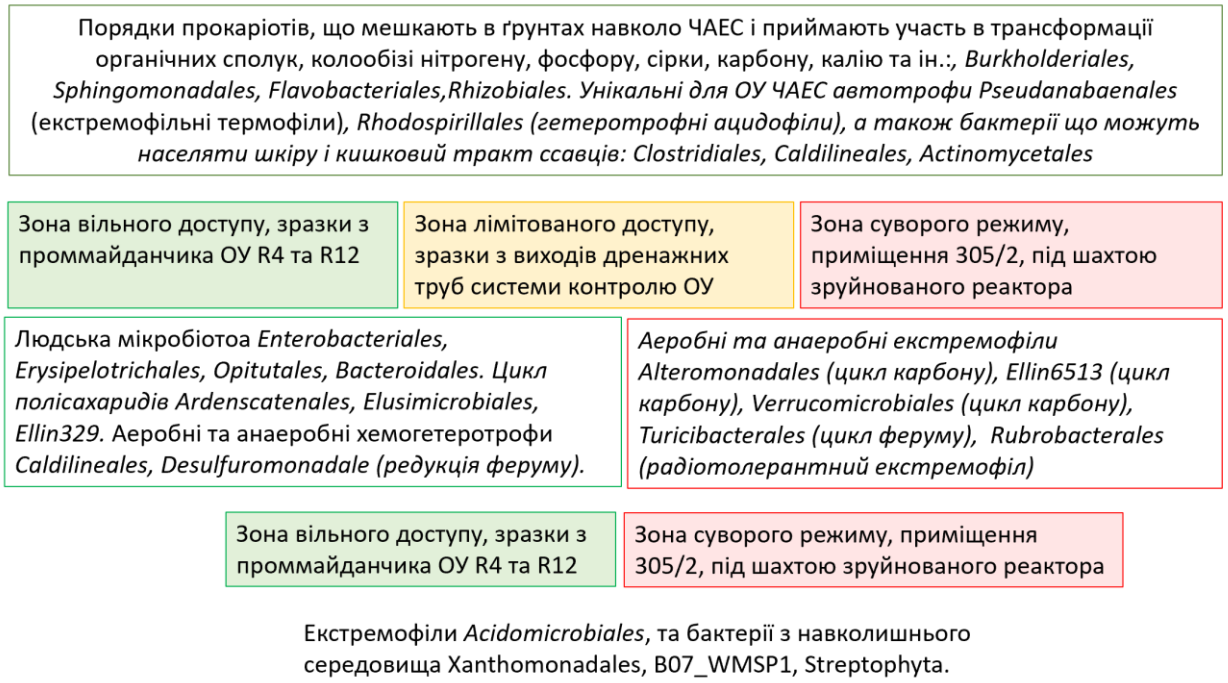


Рисунок 3.9. Порівняння мікробіомів з різних зон доступу персоналу ОУ

Порівняння мікробіомів зразків, відібраних з різних зон доступу персоналу з ОУ, показує подібність видового складу зразків із зони вільного та лімітованого доступу, що може свідчити про шляхи формування мікробіомів через занесення мікроорганізмів з навколишнього середовища. Мікробіоми зразків з усіх трьох зон включають у себе бактерії, що беруть участь у трансформації органічних сполук та колообігах основних мікроелементів, як і патогенну мікрофлору ссавців, що може свідчити про занесення цих мікроорганізмів на одязі і руках обслуговуючого персоналу. Разом з тим, мікробіом зразка, відібраного із зони суворого режиму, містить декілька унікальних представників, що не зустрічаються ніде більше, що показує унікальність функцій та спрямованості цієї спільноти мікроорганізмів.

3.5 Метрики для оцінки різноманітності всередині спільноти (альфа-різноманіття)

Метрики для оцінки різноманітності всередині угруповння (альфа-різноманіття) були запропоновані та десятиліттями вдосконалені **[351, 220]**. Для NGS дослідження даних бактеріального різноманіття широко використовуються три виміри альфа-різноманіття: криві розрідження, оціночні показники багатства (часто у поєднанні з кривими розрідження, вимірюються в OTU) та показники розмаїття угруповань. Для більш повного визначення структури угруповання зазвичай проводять оцінку всіх трьох метрик, однак слід зазначити, що велика кількість послідовностей 16s ампліконів може бути поганим показником відносної кількості бактерій **[55]**. Оцінки в межах структури та загального біорізноманіття угруповання, які покладаються на частоту детектування відповідної послідовності 16s амплікону, слід інтерпретувати з обережністю. Нещодавно був розроблений спосіб обліку копії генів 16s апліконів при оцінці вмісту бактерій **[55]**, що може допомогти підвищити точність вимірювань бактеріальної різноманітності на основі 16s-ампліконів.

Багатство угруповання оцінюють, визначаючи загальну кількість видів, присутніх у ньому. Індекс різноманітності (Chao1) зазвичай використовується, і він базується на кількості рідкісних класів (тобто OTU), знайденої у зразку **[96]**:

$$S_{est} = S_{obs} + \left(\frac{[(f]_1)^2}{2f_2}\right)$$

де S_{est} – приблизна кількість видів, S_{obs} – це кількість спостережуваних видів, f_1 – кількість одиночних таксонів (таксони, представлені єдиним рідом у цьому співтоваристві), а f_2 – кількість таксонів з подвійними точками. Якщо зразок містить багато рідів, то, ймовірно, існує більше невиявлених OTU, а

індекс Chao1 буде оцінювати більший видовий вміст, ніж для зразка без рідкісних OTU. Окрім метрики Chao1, QIIME включає в себе ще кілька інших оціночних видів багатства та загорнуту версію CatchAll, яка розраховує 12 різних оцінок і пропонує найкращу оцінку видового багатства (в запропонованій роботі авторами було обрано метрики сумарної довжини філогенетичних гілок (PD_whole_tree), індекси різноманітності (Шеннона і Сімпсона) та індекс домінування) разом з кількома іншими оцінками видового багатства.

Криві розрідження використовуються для визначення того, чи достатня глибина вибірки для точного визначення бактеріального угруповання, що вивчається. Щоб побудувати криві розрідження, кожне угруповання випадково підсилюється без заміни з різними інтервалами, і середня кількість OTU на кожному інтервалі складається з величини підбору **[145]**. Точка, в якій число OTU не збільшується, з подальшим відбором проб є точкою, в якій було зроблено достатньо зразків, щоб точно характеризувати угруповання. QIIME обчислюює криві розрідження для спостережуваного та оціночного багатства видів. QIIME буде додатково створювати графіки кривих розрідження, тоді як mothur виводить результати, які можна імпортувати в графічне програмне забезпечення.

Індекси біорізноманіття угруповань (рис. 3.10) поєднують видове багатство та достаток у єдине значення рівномірності. Угруповання, в яких чисельно переважає один чи декілька видів, демонструють низьку рівномірність, тоді як громади, де велика кількість розподіляється однаково серед видів, що мають високу рівномірність. Два з найбільш широко використовуваних показників – це індекс Шеннона **[302]** та індекс Сімпсона **[306]**.

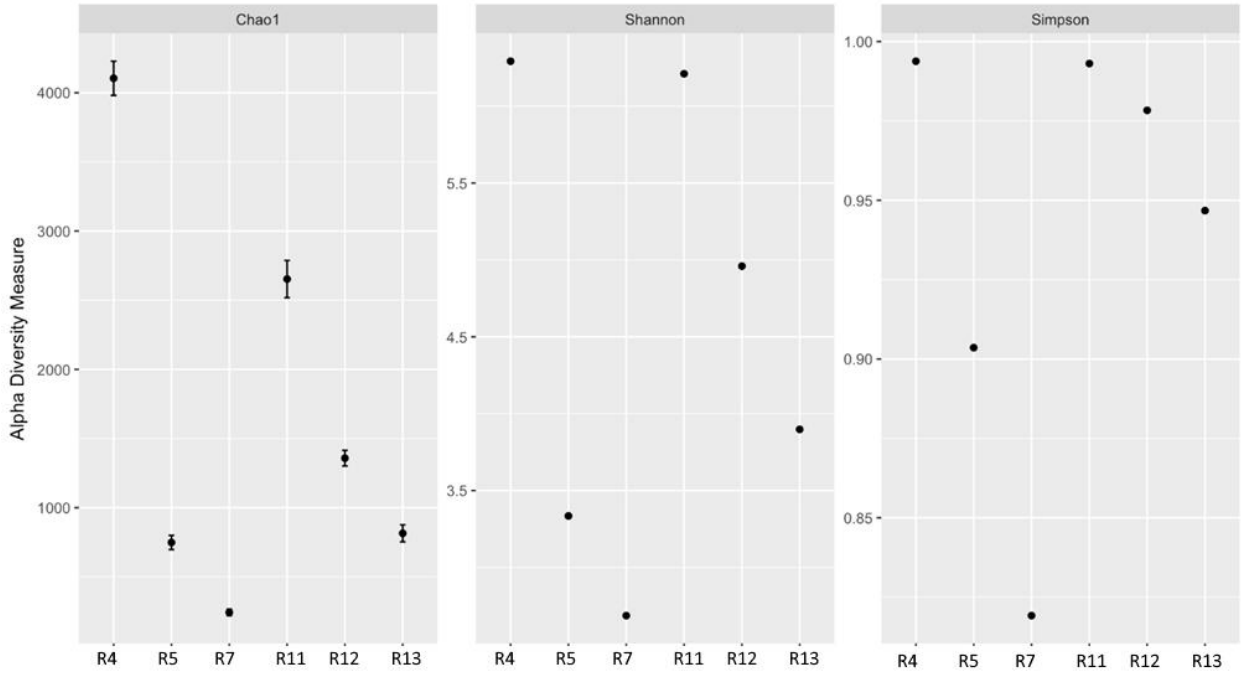


Рисунок 3.10. Індекси альфа-різноманіття зразків, відібраних з ОУ. R4 (ЗВД); R5 (ЗСР); R7 (ЗЛД); R11 (ЗЛД); R12 (ЗВД)

Непараметричні методи оцінки біорізноманіття є найбільш перспективними для мікробних досліджень. Ці показники адаптовані для оцінки величини популяцій тварин. Непараметричні оцінки на основі методів MRR враховують частку видів, які спостерігалися раніше (були обраховані в зразку раніше) по відношенню до тих, що спостерігаються лише раз. В угрупованні з великими показниками різноманітності ймовірність того, що вид спостерігатиметься більше ніж раз, буде низьким, і більшість видів буде представлено лише одним з них у вибірці. В угрупованні, що розвивається, ймовірність того, що вид буде спостерігатися більше разу, буде вища, і багато видів будуть спостерігатися кілька разів у зразку.

Критерій видового різноманіття Chao1 використовує це співвідношення для оцінювання багатства угруповання шляхом додавання корекційного коефіцієнта до кількості спостережуваних видів. Наприклад, Chao1 оцінює загальне видове багатство, як $S_{\mathrm{Chao1}} = S_{\mathrm{obs}} + \frac{n_1^2}{2n_2}$

де S_{obs} – це кількість спостережуваних видів, n_1 – кількість одиночних видів, а n_2 – кількість дублікатів (видів, зафіксованих двічі) [96]. Chao зазначив, що цей індекс особливо корисний для наборів даних, перекручених у класах низького достатку, як це, імовірно, стосується мікробів.

Непараметрична метрика PD_whole_tree – філогенетичне різноманіття видів, і базується на сумарній довжині гілок філогенетичнооого дерева, демонструючи ступінь еволюційної спорідненості всіх представників проаналізоаного мікробіому. Так ситуація, в якій мікробіом має високий індекс різномантіності, але низький показник сумарної довжини філогенетичного дерева, може свідчити про ізольовані умови формування угруповання і про істотний внесок еволюційних процесів у його формування.

Згідно з отриманими даними, мікробіоми зразків субстрату ОУ суттєво відрізняються. Так, під час аналізу на таксономічному рівні загальна кількість родин, що вдалося ідентифікувати, складала 378 найменувань, але в жодному зі зразків усі родини не представлено. Загальна кількість родин значно варіює – найбільше представлене царство бактерій у контрольному зразку, відібраному з проммайданчика ОУ, що є зоною вільного доступу (R4). В цьому зразку відсутні домінанти (з огляду на найнижче серед представлених зразків значення індекса домінування (I_D) [66]), а отже, він є найбільш збалансованим і наближеним за станом до мікробіому ґрунту природних екосистем, що оточують ЧАЕС. Найменша кількість родин характерна для зразка із зони лімітованого доступу, із шахти системи Фініш (R11), відібраного зсередини залізної труби, що використовується для моніторингу стану реактора. Цей зразок має найвищій I_D, що фактично означає присутність декількох домінуючих видів у зразку. І дійсно, 44,68 % сиквенсів тут належали представникам родини *Rhodobacteraceae*, що містить велику кількість хемогетеротрофних видів, зокрема таких, котрі використовують залізо для процесів хемосинтезу.

Для оцінки наявності рідкісних видів у досліджуваних мікробіомах використовували індекс різноманіття Чао (chao1) [96]. Загальну довжину гілок філогенетичного дерева (PD_whole_tree) [128] використовували як міру таксономічної спорідненості всередині кожного зразка. Індекс Шеннона (I_S) [302] і домінування I_D застосовували для визначення ступеня рівномірності розподілу родин у зразку та наявності явних домінантів відповідно. Отримані дані свідчать, що контрольні зразки, відібрані з проммайданчика (R4 та R12), є найбільш збалансованими і вирівняними: загальна кількість представлених родин (269 і 207 відповідно) дозволяє нормальне функціонування мікробіому, знижуючи внесок моноштамів у його формування (I_D складає 0,006 і 0,007 відповідно). Загальна довжина філогенетичного дерева свідчить про достатнє таксономічне різноманіття зразків. Це дозволяє зробити висновок про формування тут нової протоекосистеми.

Таблиця 3.7. Альфа-біорізноманіття мікробіомів досліджуваних зразків

№ зразка	Зони доступу персоналу	Загальна кількість представлених порядків	Загальна довжина філогенетичного дерева (PD_whole_tree)	Індекс різноманіття Чао (chao1)	Індекс різноманіття I_S (Шеннона)	Індекс домінування I_D
R4, ЗВД	ЗВД	269	112,6	4104,6	9,1	0,006
R5, ЗСР	ЗСР	70	22,9	748,5	4,8	0,096
R7, ЗЛД	ЗЛД	133	45,2	814,6	5,6	0,053
R11, ЗЛД	ЗЛД	41	13,1	242,8	3,9	0,181
R12, ЗВД	ЗВД	207	73,9	2652,9	8,9	0,007

Водночас важливо розглянути характеристики альфа-різноманіття для зразка з найбільшою потужністю дози, відібраного із зони суворого режиму (R5), з якого вдалося отримати генетичний матеріал, приміщення басейну-

барботера 012/15. Як уже було зазначено вище, тут представлена найменша кількість родин при найбільшій з усіх наявних мікробіомів кількості унікальних видів (chao1 = 242,8). Невелика довжина гілок філогенетичного дерева і високі значення генетичної спорідненості свідчать про формування моноекосистеми, основним завданням якої є формування середовища, що було б придатне для майбутнього існування більшого різноманіття мікроорганізмів [77, 28, 24].

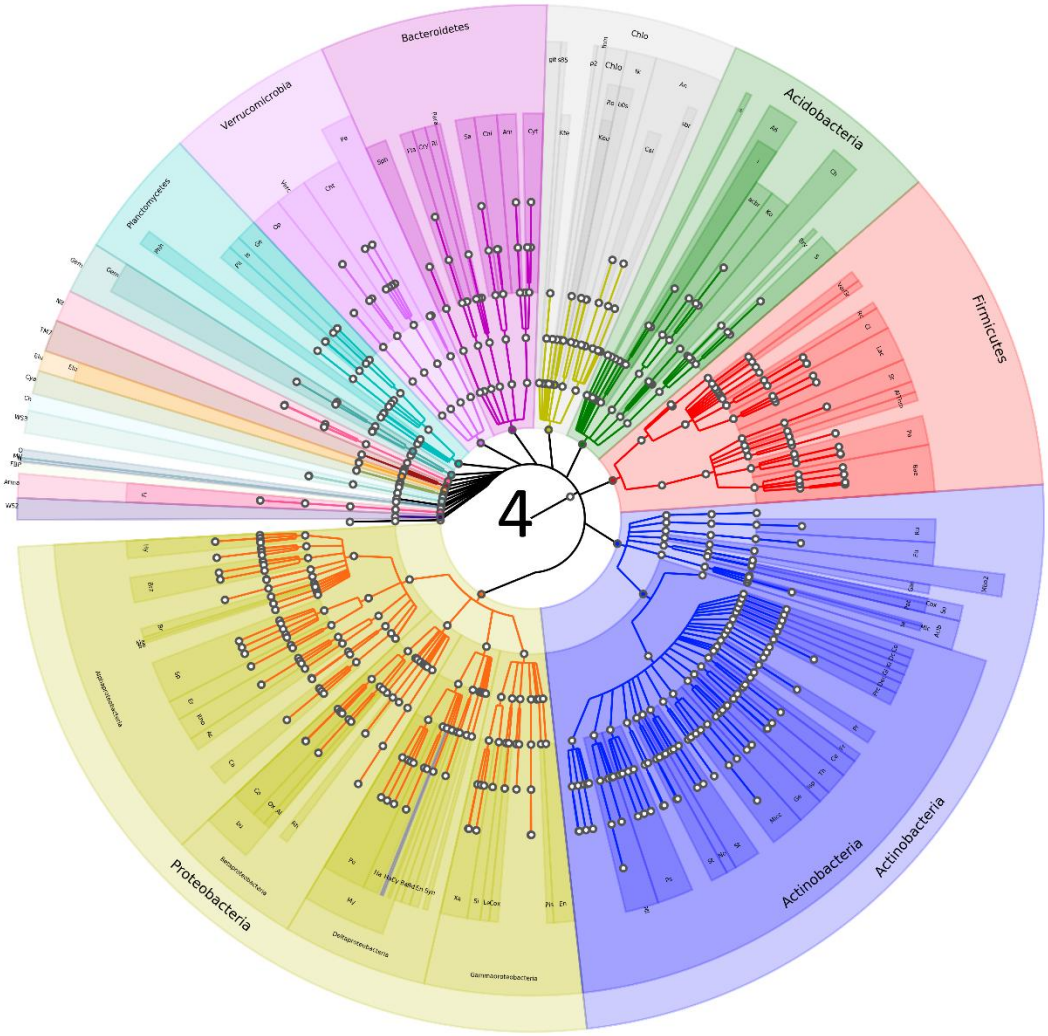


Рисунок 3.11. Структура філогенетичного дерева для контрольного зразка, відібраного із зони вільного досупу (R4)

В основному (рис. 3.9 – 3.10) біорізноманіття формують представники архей, протеобактерій, характерних для перших стадій формування біоплівки, яка, у свою чергу, є основою формування протоекосистеми, та хемогетеро- і автотрофи. Отже, беручи до уваги хімічний і механічний склад субстрату, можна припустити, що тут сформувалися корозійні біоплівки, які згодом можуть привести до формування більш збалансованого мікробіому (наприклад, такого, як у зразка з іншої шахти, Ю-9-В (R7)).

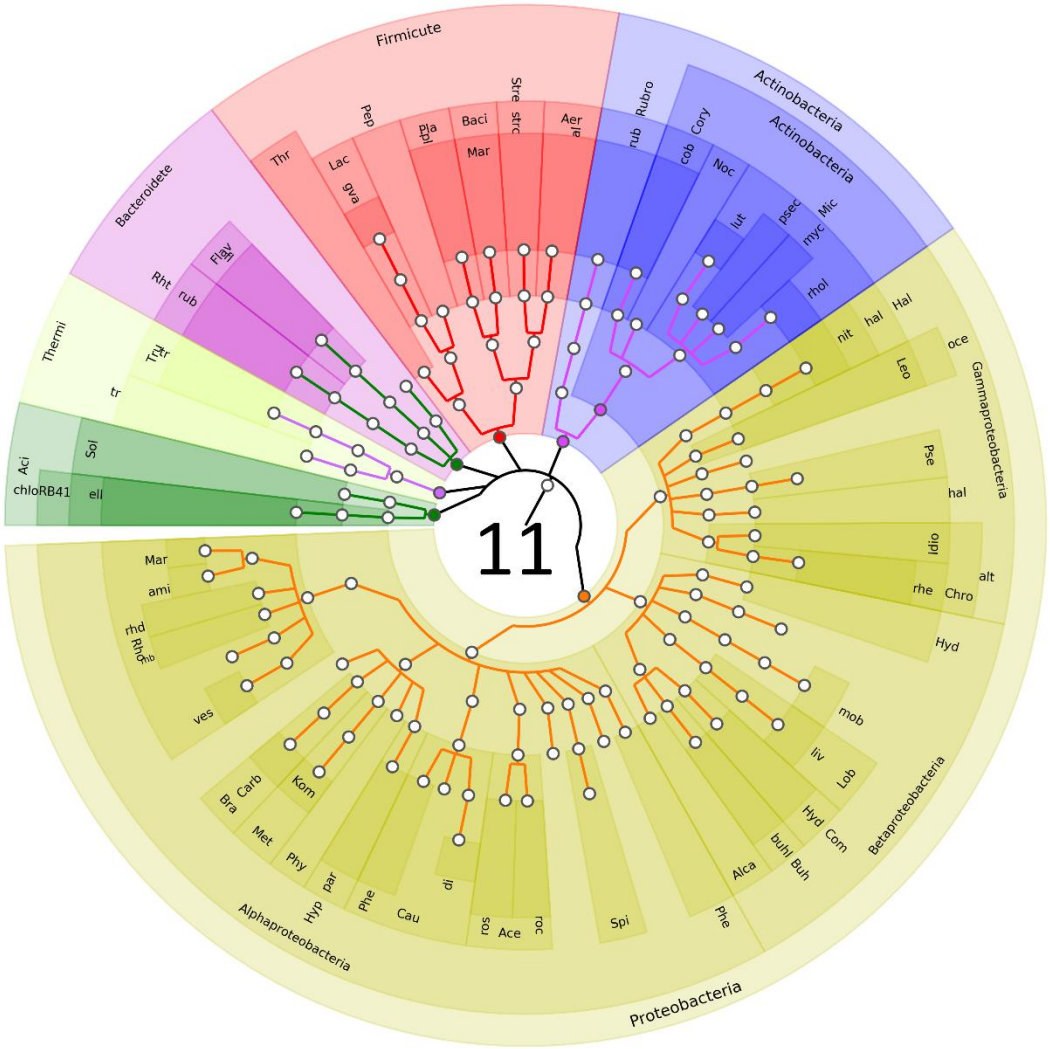


Рисунок 3.12. Структура філогенетичного дерева для зразка із зони лімітованого доступу, шахти КЗ-9-К (R11)

Для визначення залежності доза–ефект було обраховано коефіцієнти кореляції r між прижиттєвими поглинутими дозами та розрахованими показниками альфа-різноманіття і обраховано ступінь значущості коефіцієнта кореляції t_r, порівнюючи їх із табличним критичним значенням $t_{0,05,\,n-2}$.

Таблиця 3.8. Коефіцієнти кореляції між індексами біорізноманіття, домінування та прижиттєвими поглинутими дозами

Показник альфа-різноманіття	**Коефіцієнт кореляції** r	**Значущість** r t_r
Загальна кількість представлених родин	-0,88	−0,25
Індекс біорізноманіття (Чао) (chao1)	-0,85	−0,45
Загальна довжина філогенетичного дерева (PD_whole_tree)	-0,88	−0,48
Індекс біорізноманіття Шеннона (I_S)	-0,92	0,23
Індекс домінування (I_D)	0,92	0,75

Згідно з отриманими даними, не знайдено достовірно значущої кореляції між поглинутими мікроорганізмами дозами та показниками альфа різноманіття.

3.6 Функції мікроюіомів ОУ

Для передбачення фнкцій, що виконують бактерії у досліджених мікробіомах, використовували алгоритм PICRUSt [199]. Послуговуючись базою даних, що містить опис повногеномних сиквенсів до бібліотеки генів 16S рРНК, PICRUSt порівнює еталонні оперативні таксономічні одиниці

(OTU) з таблицями та отримує передбачувану таксономічну належність 16S рРНК та кількість копій генів для кожної такснонмічної групи. Частота кожного OTU ділиться на передбачувану кількість копій (якщо бактерія в базах даних має кілька копій 16S, її частота у даних 16S рРНК буде завищена), а потім множиться на кількість копій сімейства генів. Це дає прогноз щодо внеску кожного OTU у загальний вміст генів у зразку (метагеном). Нарешті, ці окремі внески підсумовуються разом, щоб отримати оцінку генів, присутніх у метагеномі.

Розробники [199, 122] перевірили точність цього етапу прогнозування геному, використовуючи наведені раніше набори даних, у яких однаковий біологічний зразок піддавали ампліфікації гена 16S рРНК та повного метагеному. У цих випадках результати сиквенсу повних метагеномів приймалися як репрезентація «справжньої» спільноти, а бібліотеки ампліконів гена 16S рРНК подавались у PICRUSt для спроби передбачити ці дані. Тестові набори даних включали зразки мікробіомів людини з проекту Human Microbiome Project [50], зразки ґрунту, різноманітні зразки ссавців. Розроблений нашою науковою групою підхід до аналізу функцій організмів було успішно апробовано також на рослинах для аналізу їх відповіді на фізіологічні стреси [163, 247, 286].

Для візуалізації отриманих даних було побудовано хітмеп (рис. 3.11), що репрезентує всі передбачені функції.

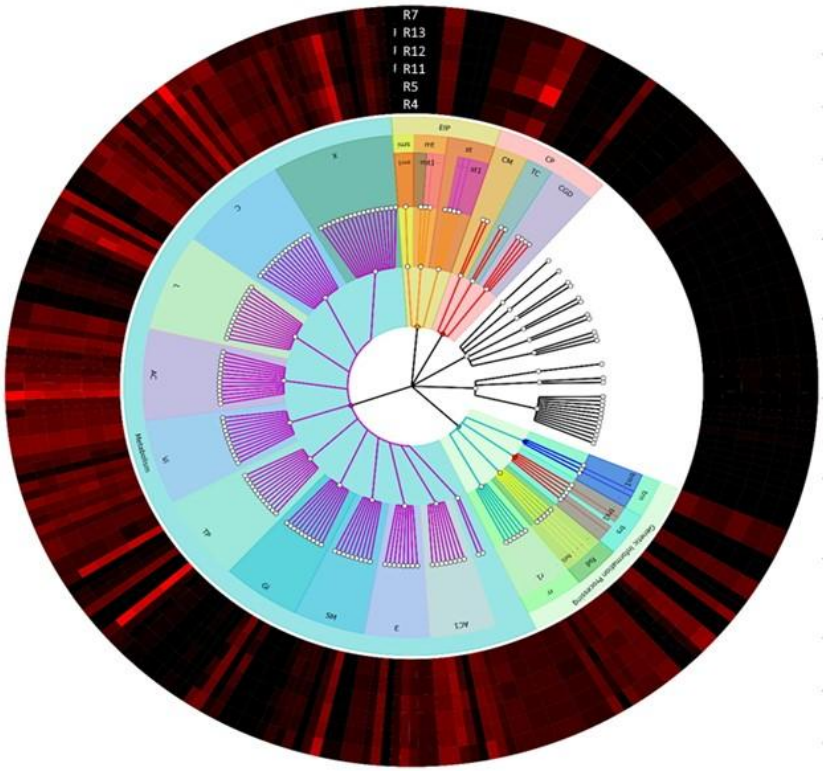
Функції було скомпресовано за групами, запропонованими [122], та обраховано внесок кожної до загального метаболічного потенціалу, який було взято за одиницю.

Таблиця 3.9. Відносний розподіл функцій мікробіомів

Група функцій	**R4, контроль**	**R5, 012/15 (ББ-2)**	**R7, шахта Ю-9-В**	**R11, шахта КЗ-9-К**	**R12, контроль**
Зона доступу персоналу	ЗВД	ЗСР	ЗЛД	ЗЛД	ЗВД
Метаболізм вуглеводів та ліпідів	0,12	0,1	0,11	0,11	0,12
Енергетичний обмін	0,12	0,1	0,12	0,12	0,12
Механізми обміну інформацією з навколишнім середовищем	0,23	0,3	0,26	0,26	0,23
Механізми реагування на екстремальні умови навколишнього середовища	0,04	0,08	0,03	0,04	0,04
Обробка генетичної інформації	0,17	0,12	0,17	0,16	0,17
Обмін нуклеїнових та амінокислот	0,24	0,25	0,23	0,23	0,24
Інвазійні механізми, характерні для патогенної мікрофлори	0,01	0	0,01	0,02	0,01
Невідома функція	0,07	0,05	0,07	0,07	0,07

Згідно з отриманими результатами, відсоток функцій, що не було розпізнано алгоритмом, коливався приблизно в однакових межах і складав 0,07 від загальної кількості функцій. Але найцікавішим видається різке зростання представленості функцій, що входять до групи механізмів реагування на екстремальні умови (0,08 на противагу до середнього показника, що коливався в межах 0,03–0,04 для решти зразків) та обміну

нуклеїновими кислотами (0,25 у порівнянні до 0,23–0,24 для решти зразків) для зразка, відібраного із зони суворого режиму, з басейну-барботера (R5), та супресія генів, що відповідають за функції, що входять до групи інвазійних механізмів патогенної мікрофлори й обробки генетичної інформації.



CP: Клітинні процеси	fsd1: Обробка білка в ендоплазматичній сітці	trs1: шлях спостереження за мРНК	Л: Ліпідний обмін
TC: Транспорт та катаболізм	fsd1: Експорт білка	EIP: Обробка екологічної інформації	E: Енергетичний метаболізм
CM: рухливість клітин	fsd1: Деградація РНК	mt: Мембранний транспорт	C: Метаболізм вуглеводів
CGD: Зростання та смерть клітин	fsd1: Сірчана релейна система	mt1: система фосфотрансферази PTS	AC: Метаболізм амінокислот
rr: Тиражування та відновлення	fsd1: Протеасома	mt1: Система секреції бактерій	Vi: Метаболізм кофакторів та вітамінів
r1: Негомологічне кінцеве з'єднання	trn: Транскрипція	mt1: транспортери ABC	SM: Біосинтез інших вторинних метаболітів
r1: Гомологічна рекомбінація	trn1: РНК-полімераза	st: Передача сигналу	TP: Метаболізм терпеноїдів та полікетидів
r1: Базовий висічний ремонт	trn1: сплайсосома	st1: Двокомпонентна система	X: Біодеградація і метаболізм ксенобіотиків
r1: реплікація ДНК	trn1: Базальні фактори транскрипції	st1: Сигнальний шлях їжака	AC1: Метаболізм інших амінокислот
r1: Виправлення невідповідностей	trs: Переклад	st1: Wnt сигнальний шлях	Gl: Біосинтез і метаболізм глікану
r1: Відсікання нуклеотидів	trs1: транспорт РНК	smi: Сигнальні молекули та взаємодія	mt: Мембранний транспорт
fsd: Сортування та деградація складання	trs1: Рибосома	smi1: Взаємодія рецепторів цитокінів з цитокінами	smi: Сигнальні молекули та взаємодія

Рисунок 3.13. Функції мікробіомів зразків, відібраних з ОУ. R4, контроль; R5, 012/15 (ББ-2); R7, шахта Ю-9-В; R11, шахта КЗ-9-К; R12, контроль; R13, дренажна труба.

3.7 Підготовка зразків до повногеномного аналізу

Для перевірки можливих невідповідностей і лімітування можливостей аналізу співвідношення доза-ефект у ОУ було вирішено провести повногеномне секвенування образних зразків. Такий вид аналізу дозволяє врахувати навіть ті види мікроорганізмів, відомостей про геном яких не існує в базах даних, але, за сукупністю показників, представників видів можна віднести до не-ідентифікованих раніше таксонів. Високий еволюційний тиск на угруповання дозволяє припустити формування нових таксонів в угрупованнях бактерій в ОУ, отже повногеномний аналіз, а, згодом, і аналіз функцій мікроорганізмів, дозволяє оцінити вплив підвищених доз іонізуючого опромінення на таксономічний склад угруповання, ідентифікуючи найбільш вразливі морфологічні шляхи.

Проведення повногеномного аналізу мікробіомів – складна і вартісна процедура. Для виконання повного метагеномного аналізу були взяті до уваги отримані раніше дані шодо 16s рРНК аналізу мікробіомів, на основі яких відібрано зразки із зони лімітованого доступу (R7) та контрольний зразок із зони вільного доступу (R12).

Для виконання якісного аналізу зразки повинні відповідати найвищим стандартам якості. І якщо для секвенування 16с рРНК достатньо невеликої кількості ДНК у вихідному зразку, то для проведення аналізу цілих геномів необхідна висока представленість усіх репрезентантів мікрофлори у високих концентраціях. Саме тому їй передує проведення багатьох перевірок зразків щодо їх первинної якості. Так, для перевірки якості зразків, відібраних у приміщеннях зруйнованого реактора, був проведений гель-електрофорез зразків у 1,2 % агарозному гелі (рис. 3.14).

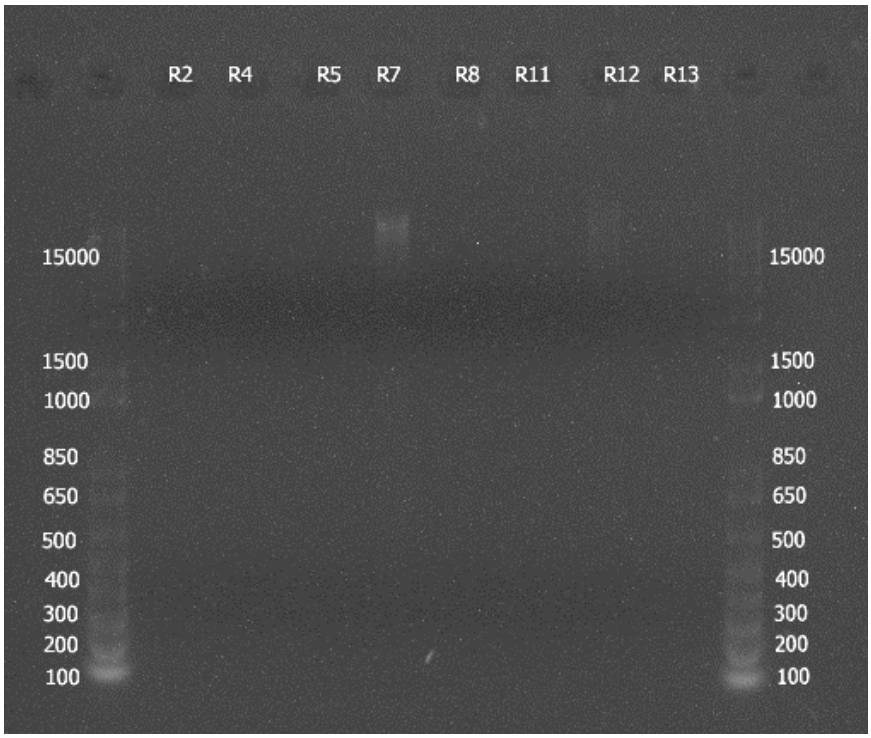


Рисунок 3.14. Гелевий профіль ДНК з використанням контрольного зразка 1 кб плюс ДНК (Invitrogen) 2 мкл зразка еДНК проводили на 1,2 % агарозному гелі (~ 3 В / см). R4 (ЗВД); R5 (ЗСР); R7 (ЗЛД); R11 (ЗЛД); R12 (ЗВД)

Згідно з отриманими результатами, в початкових зразках, ще не підданим ампліфікації з бактеріальними праймерами, концентрація ДНК, достатня для подальших аналізів, була присутня лише у зразків R7 контрольна шахта Ю-9-В та R12, точка з проммайданчика. Для підвищення якості зразків використали магнітні частинки AMpure beads.

Після концентрації та ампліфікації з бактеріальними праймерами було проведено повторний гель-електрофорез у 1,2 % агарозному гелі. Згідно з його результатами (рис. 3.15), більшість зразків не була придатною для проведення секвенування, але зразки R7 контрольна шахта Ю-9-В та R12, точка з проммайданчика показали гарні результати й були визнані як такі, що підійдуть для повногеномного секвенування.

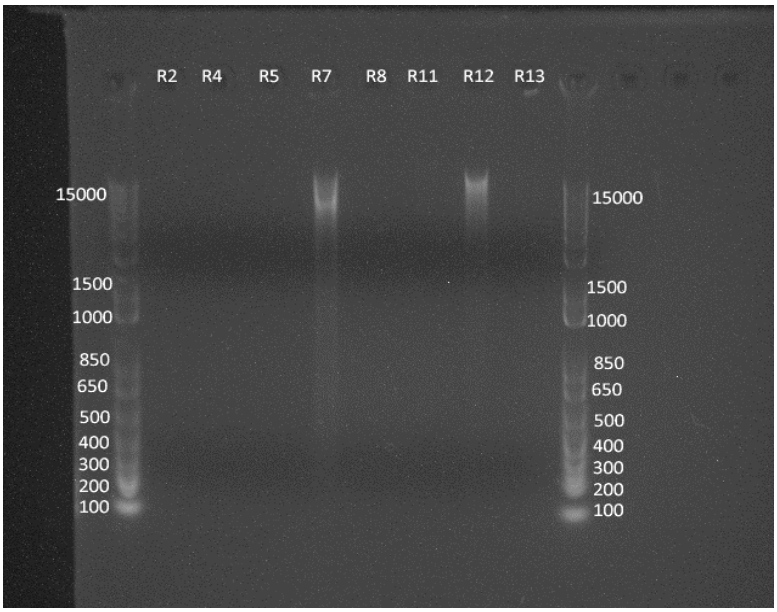


Рисунок 3.15. Гель-профіль очищеної та концентрованої еДНК за допомогою 1 кб плюс ДНК-сходів (Invitrogen) 2 мкл зразка проводили на 1,2 % агарозному гелі (~ 3В / см. R4 (ЗВД); R5 (ЗСР); R7 (ЗЛД); R11 (ЗЛД); R12 (ЗВД)

Після проведення ампліфікації і перед передачею зразків до підготовки бібліотеки було визначено концентрацію ДНК у зразках (табл. 3.10).

Таблиця 3.10. Концентрація ДНК у зразках для повногеномного секвенування

Зразок	**Зони доступу персоналу**	**Концентрація (ng/uL)**
R2, скупчення ПВМ 305/2	ЗСР	занизька
R4, проммайданчик ОУ	ЗВД	занизька
R5, 012/15 (ББ-2)	ЗСР	занизька
R7, шахта Ю-9-В	ЗЛД	8,12
R8, стеля, 305/2	ЗСР	занизька
R11, шахта КЗ-9-К	ЗЛД	0,160
R12, проммайданчик ОУ	ЗВД	4,30
R13, дренажна труба	ЗЛД	0,429

Отже, після проведення первинних гель-електрофорезних розділень було вирішено передати для подальшого секвенування лише зразки R7 та R12.

3.8 Повногеномний аналіз мікробіомів R7 та R12

Для повногеномного аналізу використовується тотальна ДНК, що секвенується повністю настільки, наскільки це можливо. Секвенувати можна або довгими, або короткими рідами. Для правильного вибору довжини ріда потрібно розуміти, що необхідно отримати в результаті проведеного дослідження. Результатом роботи з короткими (50–100 п. н.) рідами (наприклад, за допомогою секвенатора SOLiD) буде багато прочитань, і це буде дешево. Якщо використовувати довгі (близько 1000 п. н.) (секвенатори по Сенгер або 454) – вартість інформації буде набагато більшою – але і якість вищою. Ці послідовності можна використовувати з мінімальною біоінформатичною обробкою для:

- класифікації організмів: короткі ріди мають меншу достовірність, довгі класифікуються з високою точністю (визначення до виду);
- передбачення генів: короткі НЕ підходять, адже ген має велику довжину, з довгими рідамі можна знаходити гени і передбачати їхню активність і т. д.;
- ефективного використання вирівнювання на шаблонні (референсні) ДНК послідовності. Це підходить тільки для метагеномів, які вивчені культуральними методами. Накладаючи ріди на шаблон, можна очікувати, що ріди розподіляться рівномірно. Але фактично розподіл вийде по Пуассону;
- збірки de novo. Отримані ріди за допомогою програм Assembler-ів збираються у більші послідовності, з якими можна займатися всіма перерахованими вище завданнями. З короткими рідамі це виходить не дуже добре, для них є спеціальні асемблери, які об’єднують

шматки з невисокою якістю результуючого продукту. Довгі ріди збираються краще;

- функціонального аналізу після вирівнювання. Це можна робити з короткими і довгим рідами після того, як було проведено вирівнювання на референсному геномі;
- аналізу спектра k-мерів. Це перспективний спосіб аналізування, який не прив'язаний ні до функції, ні до таксономічного складу. При цьому ДНК розбивається на короткі пересічні послідовності, k-мери (k – позначає довжину фрагмента), спектри яких можна порівнювати в різних зразків.

Основним об'єктом повногеномного аналізу є мікробіота (мікробіом) ґрунту. Ці слова часто вживаються як синоніми, але є відмінності в значенні: мікробіота відображає таксономічний склад, мікробіом – генний потенціал. У кількох країнах стартували програми з вивчення мікробіоти навколишнього середовища і вже зроблено важливі відкриття щодо мікрофлори екстремальних середовищ.

Повногеномне секвенування дає змогу більш точно дізнатися таксономічний і функціональний потенціал мікробіому, що, в свою чергу, дозволить точніше передбачати функції досліджуваних середовищ, а отже, і впливати на їхні функції.

3.8.1 *Таксономічна оцінка мікробіомів R7 (ЗЛД) та R12 (ЗВД)*

У результаті проведення повногеномної оцінки було виявлено 3231 представник для зразка із зони лімітованого доступу, шахти Ю-9-В (R7), та 9467 представників для контрольного зразка, відібраного з проммайданчика (R12), царства Бактерії, ідентифіковані до таксономічного рівня Сімейство. Це на порядок більше, ніж при проведенні аналізу 16с мРНК: так для зразка R7 було ідентифіковано 133 представників Сімейств, а для R12 – 207. Отримані

результати свідчать про більш повне покриття таксономічного аналізу і дають потужний інструмент щодо передбачення функцій отриманих мікробіомів.

Важливо зазначити, що, окрім ідентифікованих видів, вдалося виділити також неідентифіковані окремі таксономічні одиниці (OTU) – 79 представників Сімейств для R7 та 43 – для R12. Це свідчить про потужний потенціал мікробіомів 4-го зруйнованого блока ЧАЕС для відкриття і характеристики нових видів мікроорганізмів. Вдалося також виділити низку мікроорганізмів, що є домінуючими (тобто такими, кількість яких становить більше 5 % у вибірці) у кожному зі зразків.

Так у R7, відібраного із шахти системи спостереження, домінували представники 4 родин *Methanomicrobia*, *Anaerolineae*, *Bacteroidia*, а також Клостридії (*Clostridia*).

Methanomicrobia – порядок архей. Виключно метаногени, відновлюють вуглекислий газ. Як відновники використовують водень або солі мурашиної кислоти. Абсолютне домінування (більше 15 % вибірки) таких мікроорганізмів у зразку свідчить про умови недостатньої забезпеченості киснем, проходження анаеробних процесів та формування біоплівки. Так само про анаеробні умови свідчить і велика частка *Anaerolineae* (також відомий як підтип *Chloroflexi*), що був визначений як одна з основних популяцій, і в більшості випадків домінуюча частка анаеробних травних систем; однак його роль в анаеробному процесі травлення залишається невизначеною через загальну відсутність геномів, що секвенуються. Згідно з даними літератури, виявляють мінімальну участь в основних шляхах гідролізу целюлози та подальшому метаногенезі в консорціумі термофільної ферментації целюлози (TCF).

Bacteroidia – найкраще вивчений рід граманаеробних паличкоподібних бактерій родини *Bacteroidaceae*. Бактероїди залучені в процеси зброджування вуглеводів, утилізації білків і біотрансформації жовчних кислот. Деякі види патогенні, здатні викликати так звані анаеробні інфекції у людини.

Хемоорганогетеротрофи, облігатні анаероби (в літературі є інформація, що *Bacteroides fragilis* здатний рости за низьких концентрацій кисню (до 500 нМ)). Основними продуктами бродіння є оцтова, ізовалеріанова і бурштинова кислоти. Основним джерелом енергії є полісахариди. Здатні відновлювати холестерин, гідролізувати мукополісахарид хондрін сульфат. Не утворюють індол, синтезують каталазу, гидролізують ескулін, зброджують різні вуглеводи. Грам+, паличкоподібні нерухомі бактерії, не утворюють спор, мають полісахаридну капсулу, що складається із двох полісахаридів. Геноми вивчених видів представлені кільцевими дволанцюжковими молекулами ДНК, частка Г + Ц пар становить 40–48 %.

У зразку наявні також представники сімейства Клостридії, що свідчить про присутність тварин на досліджених територіях – навіть усередині саркофага.

Зразок R12 в цілому має більше таксономічне багатство та вирівняність мікробіому. Так, тут немає чіткого домінента – кожна з описаних родин мала не більше 5 % від загальної кількості представників у вибірці. Так тут домінували *Nocardioidaceae*, *Micromonosporaceae*, *Chitinophagaceae*, *Sphingomonadaceae* та *Pseudonocardiaceae.*

Представники родини *Nocardioidaceae*, що входить до порядку *Propionibacteriales* в *Propionibacterinae*, охоплюють роди *Nocardioides*, *Marmoricola, Aeromicrobium, Kribbella, Actinopolymorpha, Thermasporomyces* та *Flindersiella*. Недавній аналіз послідовностей генів 16S рРНК (використовуючи різні алгоритми кластеризації) показує, що роди, які в зараз належать до сімейства *Nocardioidaceae*, утворюють щонайменше два окремі філогенетичні кластери. Два скупчення знаходяться приблизно на однаковій відстані один від одного, а також від родини *Propionibacteriaceae*. Угруповання посилюється також за морфологічними та хемотаксономічними ознаками. Вони є грампозитивними бактеріями. Молоді культури в родині демонструють різні

морфології, починаючи від розгалужених вегетативних гіф і плеоморфних форм до неправильних стрижнів і кокоїдних клітин. Хемоорганотрофні організми, у яких дихальний тип метаболізму, переважно мають позитивну каталазу. Їх пептидоглікан клітинної стінки містить LL-діамінопімелеву кислоту та гліцин як діагностичну амінокислоту (пептидоглікан A3γ). Їх основний компонент –менахінону – має частково насичений бічний ланцюг, що складається з 8, 9 або 10 ізопренових одиниць. Міколеві кислоти відсутні. Представники родини трапляються в різних середовищах (ґрунтах, воді, рослинах тощо); досі в родині не було описано жодних медично значущих штамів чи видів. Деякі представники родини активні в деградації складних хімікатів.

Micromonosporaceae, порядок *Micromonosporales*, тип *Actinobacteria*. Відповідно до філогенетичного розгалуження генового дерева RaxML 16S рРНК, члени сімейства, представлені всіма типами штамів, утворюють чітко визначені клади і належать до членів сімейства *Glycomicetaceae* та *Jiangellaceae*. В цей час сімейство містить 27 родів і включає мікроорганізми, що характеризуються трьома типами спорулюючих структур, а саме поодинокими спорами, споровими ланцюгами та спорангіями, які переносяться безпосередньо на гіфах субстрату. Спори можуть бути нерухливими або рухомими з пучками полярних джгутиків. Вони є аеробними, некислими швидкими та мезофільними мікроорганізмами. Багато штамів виробляють каротиноїдні міцеліальні пігменти, надаючи колоніям оранжево-червоний вигляд; проте також утворюються синьо-зелені, коричневі або фіолетові пігменти.

Більшість представників родини *Micromonosporaceae* характеризуються хіміотипом II типу клітинної стінки. Настінний пептидоглікан містить мезо- та / або 3-гідроксидіамінопімелеву кислоту і є типом A1α; l-лізин можна також знайти як діагностичну амінокислоту. За винятком видів пілімелії, які містять

ацетат, першою амінокислотою пептидного ланцюга є гліцин у всіх членів родини. Гідролізати цільних організмів багаті арабінозою, ксилозою та галактозою, з різною кількістю інших цукрів. Організми виробляють складні суміші насичених, ізо- та антитезожирних кислот. Фосфатидилетаноламін – це діагностичний фосфоліпід (фосфоліпід II типу).

Штами *Micromonosporaceae* були виділені з різних місць існування, включаючи ґрунт, відкладення, прісну та морську воду, ризосферу та тканини рослин. Багато видів деградують хітин, целюлозу, лігнін та пектин, і ці мікроорганізми відіграють важливу роль в обороті органічного рослинного матеріалу. Крім того, багато штамів продукують корисні вторинні метаболіти та ферменти. Вони застосовуються в промисловості, біотехнології та сільському господарстві.

Sphingomonadaceae – сімейство альфапротеобактерій. Важливою особливістю є наявність сфінголіпідів у зовнішній мембрані клітинної стінки. Клітини мають яйцеподібну або стрижневу форму. Інші також плеоморфні, тобто клітини змінюють форму з часом. Деякі види є фототрофними. *Sphingomonadaceae* відомі також завдяки здатності деяких видів розщеплювати деякі ароматичні сполуки. Це робить бактерії такими, що представляють інтерес для ремедіації.

3.8.2 *Альфа різноманіття мікробіомів зразків зон лімітованого та вільного доступу*

Для оцінки наявності рідкісних видів у досліджуваних мікробіомах використовували індекс Чао (chao1) [96]. Загальну довжину гілок філогенетичного дерева (PD_whole_tree) [128] використовували як міру таксономічної спорідненості всередині кожного зразка. Індекс Шеннона (I_S) [302] і домінування I_D застосовували для визначення ступеня рівномірності розподілу родин у зразку та наявності явних домінантів відповідно. Отримані

дані свідчать, що контрольний зразок R12, відібраний з проммайданчика, має набагато більше біорізноманіття. Цей зразок також має набагато більшу кількість родин, що, разом з показниками I_S та I_D, свідчить про збалансованість мікробіому, знижуючи внесок моноштамів у його формування (I_D складає 0,006 і 0,007 відповідно). Загальна довжина гілок філогенетичного дерева свідчить про достатнє таксономічне різноманіття обох зразків. Це дозволяє підтвердити озвучений раніше висновок про формування тут нової протоекосистеми.

Таблиця 3.11. Показники альфа-різноманіття для мікробіомів зон лімітованого та вільного доступу (R7, шахта Ю-9-В та R12, проммайданчик відопідно)

Код зразка	Зона доступу персоналу	Загальна кількість представлених родин	Індекс Чао (chao1)	Загальна довжина філогенетичного дерева (PD_whole_tree)	Індекс різноманіття Шеннона (I_S) [296][293][296] 295	Індекс домінування (I_D)
R7	ЗЛД	3231	5077	172	6,7	0,043
R12	ЗВД	9467	12669	316	10,7	0,002

3.8.3 *Функціональна характеристика мікробіомів R7 та R12*

За результатами секвенування можна визначити основні функції, що виконують досліджувані мікробіоми (табл. 3.12).

Таблиця 3.12. Відсотковий вміст функцій мікробіомів зон лімітованого (R7) та вільного (R12) доступу, % від загального функціонального навантаження

Функція	**Зона лімітованого доступу (R7), %**	**Зона вільного доступу (R12), %**
Деградація валіну, лейцину та ізолейцину	0,95	1,00
Метаболізм метану	0,94	1,01
Транскрипційна техніка	1,07	1,02
Піруват метаболізм	0,98	1,03
Гліколіз / глюконеогенез	1,02	1,04
Хромосома	1,06	1,05
Пропаноат метаболізму	1,01	1,05
Шляхи фіксації вуглецю у прокаріотів	1,03	1,06
Інші	1,10	1,07
Метаболізм бутаноата	1,02	1,13
Метаболізм аміноцукру та нуклеотиду	1,31	1,18
Амінокислотні ферменти	1,19	1,18
Метаболізм піримідину	1,20	1,19
Метаболізм аргініну та проліну	1,20	1,22
Фактори транскрипції	1,53	1,44
Система секреції	1,52	1,48
Функція невідома	1,54	1,50
Окислювальне фосфорилювання	1,58	1,52
Білки бактеріальної рухливості	1,55	1,53
Рибосома	1,63	1,61
Пептидази	1,77	1,63
Пуриновий обмін	1,85	1,83
Двокомпонентна система	2,12	2,08
Білки для відновлення та рекомбінації ДНК	2,29	2,24

Транспортники ABC	2,64	3,11
Прогнозування лише загальної функції	3,61	3,54
Транспортери	4,58	5,14

Так, з таблиці очевидно, що основними функціями тут є побудова білків-транспортерів, білків для рекомбінації і відновлення ДНК, батеріальної рухливості тощо. Основні відмінності в транспортних білках, що відповідають за адаптацію метаболізму, що свідчить про істотний вплив режиму живлення бактеріальних угруповань на їх структуру й роботу, в той час як дозові навантаження не показують істотних впливів (значення факторів транскрипції та транскрибційної техніки, що відповідають за репарацію структури ДНК, не перевищують 2 %).

Висновки до розділу 3

Резюме. Наведена в розділі характеристика бактеріального різноманіття всередині одного з найскладніших у світі техногенних обєктів, об’єкта «Укриття», свідчить про наявність бактеріального життя всередині нього. Аналіз біорізноманіття всередині зразків (альфа-різноманіття) та порівняння різноманіття зразків (бета-різноманіття) вказують на значну детермінованість за джерелами живлення спільнот мікроорганізмів кожного проаналізованого зразка субстрату. Статистично значуща відсутність кореляції між показниками поглиненої дози та бактеріальним різноманіттям свідчить про відсутність залежності доза–ефект для формування мікробіомів у техногенних об’єктах в інтервалі 1–14 мГр/год. Отже, за результатами проведеного дослідження, можна зробити висновок, що, для проаналізованих мікробіомів ОУ ЧАЕС, саме обмеження джерел живлення, а не високі дозові навантаження, є визначними для формування структури мікробіому.

1. Уперше проведено аналіз бактеріального різноманіття зразків, відібраних з об’єкта «Укриття» (ОУ) ЧАЕС. Дослідження мікробіомів об’єкта «Укриття», збудованого над 4-м енергоблоком ЧАЕС, вперше виявило значний таксономічний склад мікроорганізмів, що населяють зони з високими рівнями іонізуючого випромінювання. Результати показали, що найбільш стабільним і різноманітним є мікробіом контрольного зразка з проммайданчика (R4), де дози опромінення мінімальні, а умови наближені до природних. У той же час, у зразках із зони суворого (R5) і лімітованого доступу (R7) сформувалися угруповання з виразним домінуванням окремих видів мікроорганізмів. Це свідчить про їхню високу адаптивність до екстремальних умов, включаючи підвищені поглинуті дози іонізуючого опромінення та дефіцит поживних речовин. Подібні результати підтверджують можливість активних біологічних процесів навіть у середовищах з підвищеним радіаційним фоном.

2. Фізико-хімічні характеристики субстратів обумовлюють склад мікробіомів. Субстрати об’єкта «Укриття» демонструють чіткі фізико-хімічні відмінності, які визначають мікробну активність. Усі зразки мають лужну реакцію (pH 7,5–8,5) через вплив цементної крихти від залізобетонних конструкцій, що контрастує з кислими ґрунтами, на яких збудовано ЧАЕС. Високий вміст рухомих сполук заліза (Fe^{2+}, Fe^{3+}) і азотвмісних сполук (NH_4^+) свідчить про активну корозію металевих конструкцій та біологічну трансформацію азоту. Ці фактори створюють сприятливе середовище для колонізації специфічних мікроорганізмів, зокрема залізобактерій і хемоорганотрофів, які домінують у деяких зразках.

3. Розподіл радіонуклідів впливає на біорізноманіття мікробіомів. Основними дозоформуючими радіонуклідами в зразках є ^{137}Cs, ^{90}Sr, а також ізотопи плутонію ^{239}Pu, ^{240}Pu) і америцію ^{241}Am). Найвищі рівні поглинутої дози (135 мГр/год) спостерігалися у зразку з шахти Ю-9-В (R7), що вплинуло на формування мікробіомів із домінантними видами, зокрема археями

(*Methanomicrobia*). Водночас у контрольних зразках (R4, R12) з нижчими дозами сформувалися більш різноманітні угруповання, які відображають природний екологічний баланс. Розподіл радіонуклідів у приміщеннях також визначає різницю між умовами середовищ та адаптацією мікроорганізмів до радіації. Виділити ДНК зі зразків із зони суворого режиму у приміщеннях під шахтою реактора (R2, скупчення паливовмісних мас у приміщенні 305/2; та R8, зі стелі того самого приміщення 305/2) не вдалося, що може бути як наслідком формування високих поглинутих доз і загибелі мікроорганізмів, так і пов'язуватися з недосконалістю процесу виділення нуклеїнових кислот зі зразків подібного типу.

4. Секвенування 16S рРНК виявило специфічні особливості мікробіомів. Використання секвенування 16S рРНК дозволило отримати важливі дані про структуру бактеріальних спільнот у різних зонах ОУ. У зразках із зони лімітованого доступу (R7) домінують *Methanomicrobia*, *Anaerolineae*, та *Clostridia*, які адаптовані до анаеробних і стресових умов. У контрольних зразках (R4, R12) виявлено більш поширені види, як-от *Micrococcus* і *Pseudomonas*, які можуть бути принесені ззовні. Недоліком методу є неповнота баз даних, що ускладнює ідентифікацію екстремофільних видів, які залишаються неідентифікованими.

5. Аналіз функціонального потенціалу мікробіомів показав їхню адаптацію до екстремальних умов. Використання алгоритму PICRUSt для передбачення функцій мікроорганізмів показало, що угруповання з зон суворого режиму (R5) мають підвищену частку функцій, пов'язаних із реагуванням на екстремальні умови, зокрема до радіаційного стресу. У контрольних зразках (R4, R12) рівномірно представлені функції, пов'язані з енергетичним обміном, обробкою генетичної інформації та обміном амінокислот. Це свідчить про різну екологічну роль мікроорганізмів у різних середовищах.

6. Виявлено потенціал мікроорганізмів для промислового використання. Ідентифіковані мікроорганізми, як-от *Micrococcus* і *Pseudomonas*, мають унікальні властивості, зокрема здатність акумулювати радіонукліди (цезій і кобальт) і формувати захисні біоплівки. Ці властивості відкривають перспективи для використання таких бактерій у технологіях біоремедіації, спрямованих на очищення радіоактивно забруднених територій, а також для захисту конструкцій від корозії в екстремальних умовах. Отримані результати свідчать про значний потенціал мікробіомів ОУ ЧАЕС для відкриття нових видів екстремофільних мікроорганізмів. Повногеномне секвенування, проведене на контрольних (R12) і лімітованих (R7) зразках, дозволило ідентифікувати понад 3000 представників таксономічних одиниць. Подальші дослідження сприятимуть глибшому розумінню адаптивних механізмів мікроорганізмів, їхнього функціонального потенціалу та впливу на формування екологічної рівноваги в екстремальних середовищах.

7. Достовірно значимої кореляції між отриманими мікроорганізмами дозами та показниками альфа-різноманіття мікробіомів не знайдено.

Результати експериментальних досліджень цього розділу наведено в таких публікаціях:

[25] Паренюк, О. Ю., Іллєнко, В. В., Гудков, І. М. Мікрофлора забруднених радіонуклідами ґрунтів. Монографія: Київ: НУБіП України, 2018. 210 с.

[382] Boretska, M., Datsenko, I., Suslova, O. Pareniuk, O., et. al. Amino Acid Composition of Tightly Bound Exopolymeric Substances Produced by Corrosion-Related Bacteria in Presence of Mild Steel. *Advances in Microbiology*. 2014. Vol. 04, No. 12. P. 808–815.

[4] Галат, М. В., Шпирка, Н. Ф., Таран, М. В., Паренюк, О. Ю., та ін. Розробка нового методу діагностики токсоплазмозу на основі

фотолюмінесценції наночастинок оксиду цинку. *Наукові доповіді НУБіП України*. 2016. Т. 7, No. 64.

[7] Nesterova, N., Pareniuk, O., Illienko, V., et. al. Physiological Reactions in Cereals Family Avena Sativa L. and Avena Nuda L., Caused by Lowerature Stress Factors: 2019 IEEE 39th International Conference on Electronics and Nanotechnology, ELNANO 2019 - Proceedings, 19.

[163] Illienko, V., Nesterova, N., Pareniuk, O., та ін. Estimation of the effect of radionuclide contamination on Vicia sativa L. induction of chlorophyll fluorescence parameters using “Floratest” optical biosensor: Biophotonics—Riga 2017, SPIE, 07. December.17. P. 20.

[28] Паренюк, О. Ю., Шаванова, К. Є., Іллєнко, В. В., та ін. Різноманіття мікрофлори у зруйнованому четвертому енергоблоці ЧАЕС. *Ядерна фізика та енергетика.* 2017. Т. 18, No. 2. С. 179–187.

[287] Ruban, Y., Shpyrka, N., Pareniuk, O., et. al. BLV leucosis biosensor based on ZnO nanorods photoluminescence: 2017 IEEE 37th International Conference on Electronics and Nanotechnology, ELNANO 2017 - Proceedings, 17.

[24] Паренюк, Е. Ю., Шаванова, Е. Е., Ильенко, В. В., и др. Состояние микробиома в помещениях четвертого энергоблока Чернобыльской АЭС. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2018. Т. 58, No. 2. С. 195–204.

[247] Nesterova, N., Pareniuk, O., Illienko, V., et. al. Physiological Reactions in Cereals Family Avena Sativa L. and Avena Nuda L., Caused by Lowerature Stress Factors: 2019 IEEE 39th International Conference on Electronics and Nanotechnology, ELNANO 2019 - Proceedings, 19.

[77] Boretska, M., Shavanova, K. E., Ruban, Y. Pareniuk, O. Impact of γ-irradiation on biofilm-formation by corrosion-relevant heterotrophic bacteria. *Наукові доповіді НУБіП України*. 2020. Vol. 5, No. 5 (87).

4 ВИДОВИЙ СКЛАД МІКРООРГАНІЗМІВ НА ЗАБРУДНЕНИХ РАДІОНУКЛІДАМИ ТЕРИТОРІЯХ ЗОНИ ВІДЧУЖЕННЯ ЧОРНОБИЛЬСЬКОЇ АЕС

4.1 Основні агрохімічні показники відібраних ґрунтів

Локації відбору проб, що знаходяться на території ЗВ, були обрані за допомогою бази даних УкрНДІ сільськогосподарської радіології НУБіП України [41], що дало змогу виділити максимально подібні за ґрунтовими умовами біогеоценози (рис. 4.1).

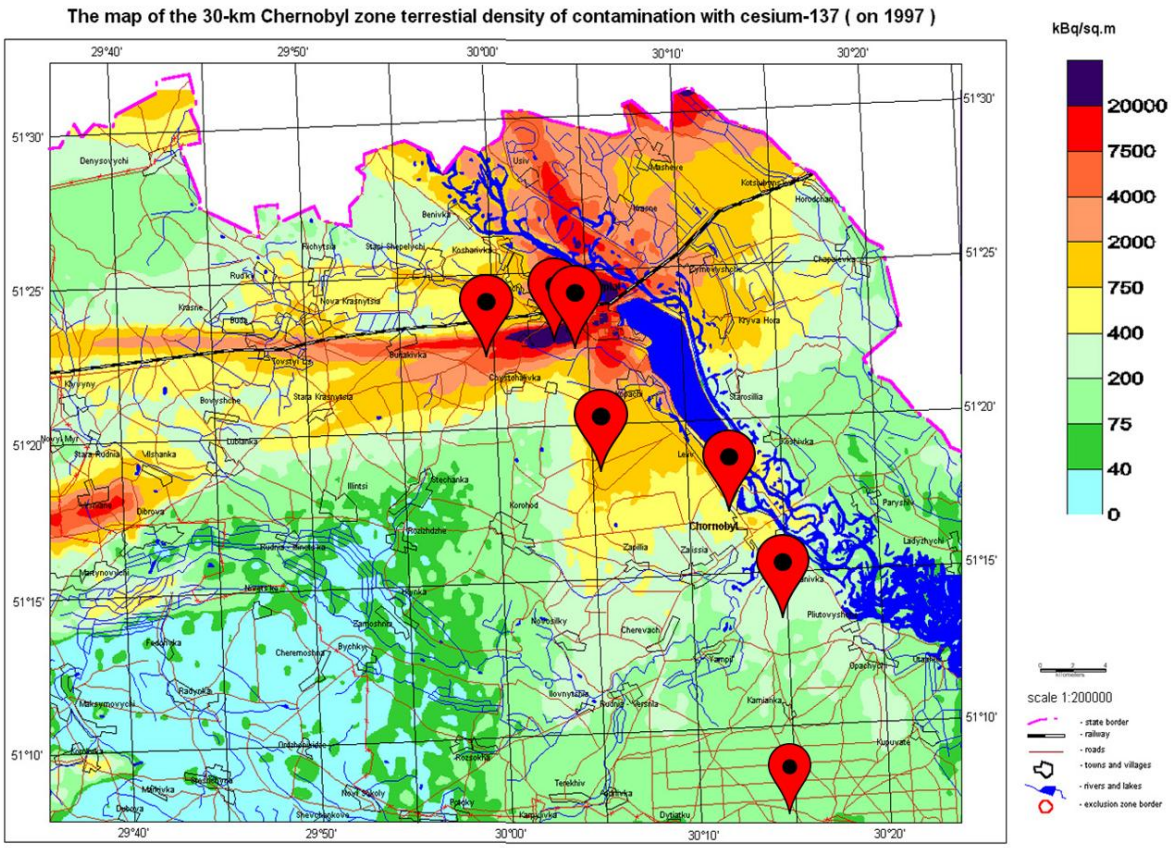


Рисунок 4.1. Локації відбору проб ґрунту, нанесені на карту забруднення ^{137}Cs української частини ЗВ ЧАЕС. Карту отримано у БД УкрНДІСГР [48].

Для підбору якнайбільш подібних ґрунтових умов для забезпечення найменшої варіації у вмісті основних поживних речовин, з кожної з локацій було відібрано по 5 проб ґрунту і проведено агрохімічний аналіз (див. табл. 4.1). Моніторинг радіонуклідного забруднення ґрунтів протягом трьох років

проводився спільно із Чорнобильським радіаційно-екологічним біосферним заповідником, описували ділянки співробітники ЧРЕБЗ. За результатами проведеного дослідження проби було передано для виділення тотальної ДНК ґрунту [264].

Ґрунти Чорнобильської зони відчуження в цій роботі розглядаються як модель хронічно забрудненої пост аварійної екосистеми, у якій мікробіоми протягом тривалого часу перебували під впливом радіонуклідного забруднення. На відміну від техногенних субстратів ОУ ЧАЕС, ці ґрунти мають сформований ґрунтовий профіль, що дає змогу оцінювати не лише дію поглинутої дози, а й її взаємодію з едафічними факторами - насамперед вмістом азоту, гумусу, pH і вологістю.

У сучасних польових дослідженнях Чорнобильської зони відчуження показано, що зв’язок між радіаційним навантаженням і структурою мікробіому не може бути інтерпретований без урахування властивостей ґрунту та історії екологічних порушень. Зокрема, високорадіаційні ділянки можуть одночасно характеризуватися кислішим pH, нижчою вологістю та іншими стресовими умовами, які самі по собі впливають на структуру мікробних угруповань [381]. Тому в цьому розділі мікробіом ЧЗВ аналізується як результат взаємодії хронічного радіаційного чинника з біогеохімічними властивостями ґрунту, а не як прямий і лінійний наслідок лише дозового навантаження.

4.1.1 *Характеристика дослідних полігонів на території ЧЗВ*

Точка С5, «Дитятки», КПП на виїзді із зони відчуження, ліс.

Ділянка розташована на вирівненій вододільній рівнині, має елювіальний ландшафт, повністю вкрита лісом. У зв’язку з тим, що ділянка розташована у свіжому грабово-дібровно-сосновому сугрудку, де є оптимальні умови для зростання багатьох видів ксерофітів, трав’яний покрив у лісонасадженні формує суцільні зарослі. Види рослин представлені на ділянці: кропива

дводомна (*Urtica dioica* L.), чистотіл великий (*Chelidonium majus*), конвалія травнева (*Convallaria majalis* L.), агалик-трава (*Jasione montana* L.), костяниця (*Rubus saxatilis*), орляк звичайний (*Pteridium aquilium*), сміянка поникла (*Silene nutans*), суниця лісова (*Fragaria vesca*), астрогал солодколистий (*Astragalus glycyphyllos* L.), перестріч дібровний (*Melampyrum nemorosum*).

Ґрунти на проаналізованій території дерново-слабопідзолисті оглинено-піщані, на тонкозернистих пісках. Агрохімічні характеристики ґрунту в динаміці варіюють незначно (табл. 4.1).

Точка С3, Залісся, 30-кілометрова зона, ліс.

Ділянка розташована на акумулятивно-денудаційній рівнині середнього рівня, має акумулятивно-елювіальний ландшафт, повністю вкрита лісом. Ліс на проаналізованій точці було визначено як свіжий дубово-сосновий субір. З трав'янистих рослин переважають мохи, плаун булавовидний (*Lycopodium clavatum* L.), куничник наземний (*Calamagrostis epigeios* (L.) Roth), щитник шартрський (*Dryopteris carthusiana* (Vill.), щитник чоловічий (*Dryopteris filix-*mas) та поодиноко – жовтозілля звичайне (*Senecio vulgaris* L.).

Має дерново-слабопідзолисті ґрунти та глинисто-піщані на водно-льодовиковому піску. Агрохімічні характеристики ґрунту в динаміці варіюють незначно (табл. 4.1).

Точка С2, Чистогалівка, 10-кілометрова зона, ліс.

Ділянка розташована на акумулятивно-денудаційній рівнині високого рівня, має транселювіальний ландшафт, повністю вкрита лісом, вологим дубово-сосновим субором. Трав'янистий покрив розріджений, переважають вівсяниця овеча (*Festuca ovina duriuscula*), калерія сиза (*Koeleria glauca*), куничник наземний (*Calamagrostis epigeios* (L.), перстач неблискучий (*Potentilla impolita* Wahlenb.), перестріч гайовий (*Melampyrum nemorosum* L.), костяниця (*Rubus saxatilis*), щавель горобиний (Rumex acetosella L.)

Має дерново-слабопідзолисті глинисто-піщані ґрунти на гляціоалювіальних пісках. Агрохімічні характеристики ґрунту в динаміці варіюють незначно (табл. 4.1).

Точка С4, поза траншеєю Т22, Рудий ліс, ліс.

Ділянка розташована на антропогенно зміненій території, де у 1987 році було проведено доекнтамінаційні заходи. Розташована на акумулятивно-денудаційній рівнині середнього рівня, має елювіальний ландшафт, повністю вкрита свіжим бором. Трав'янистий покрив розріджений, переважають біловус стиснутий (*Nardus stricta* L.), булавоносець сіруватий (*Corynephorus canescens*), гвоздика Борбаша (*Dianthus borbasii Vandas*), кипець сизий (*Koeleria glauca* (Spreng.) DC), куничник наземний (*Calamagrostis epigeios* (L.) Roth), Льонок дроколистий (*Linaria genistifolia* (L.) Mill).

Має дерново-підзолисті піщані ґрунти на тонкозернистих пісках. Агрохімічні характеристики ґрунту в динаміці варіюють незначно (табл. 4.1).

Точка С7, траншея Т22, Рудий ліс, ліс.

Ділянка розташована на антропогенно зміненій території, де у 1987 році було проведено доекнтамінаційні заходи. Розташована на акумулятивно-денудаційній рівнині середнього рівня, має транселювіальний ландшафт, повністю вкрита свіжим бором. Трав'янистий покрив розріджений, переважають біловус стиснутий (*Nardus stricta* L.), булавоносець сіруватий (*Corynephorus canescens*), гвоздика Борбаша (*Dianthus borbasii Vandas*), кипець сизий (*Koeleria glauca* (Spreng.) DC), куничник наземний (*Calamagrostis epigeios* (L.) Roth), дьонок дроколистий (*Linaria genistifolia* (L.) Mill).

Має дерново-підзолисті піщані ґрунти на тонкозернистих пісках. Агрохімічні характеристики ґрунту в динаміці варіюють незначно (табл. 4.1).

Таблиця 4.1. Динаміка основних агрохімічних показників точок відбору зразків

Місце відбору зразків	Рік відбору	Дата відбору	pH KCl	Вміст рухомих форм, мг/кг			Гумус, %
				фосфор	калій	азот	
«Дитятки», КПП на виїзді із ЗВ	2014	червень	2,8±0,2	20±3	30±5	60±8	1,5±0,3
		серпень	2,8±0,1	19±4	25±5	57±12	1,42±0,1
	2015	червень	3,5±0,2	25±4	32±8	57±5	1,4±0,1
		серпень	3,2±0,1	18±2	27±3	55±9	1,45±0,3
	2016	червень	3,4±0,2	16±3	30±6	55±5	1,61±0,1
		серпень	3,2±0,1	18±4	28±5	51±8	1,57±0,2
Залісся, 30-кілометрова зона	2014	червень	3,6±0,2	102±10	23±2	30±2	1,02±0,2
		серпень	3,5±0,2	80±12	22±3	26±4	0,92±0,2
	2015	червень	3,6±0,1	95±7	19±4	37±2	1,08±0,2
		серпень	3,8±0,1	90±16	23±3	45±5	0,95±0,1
	2016	червень	3,7±0,2	92±19	25±5	32±8	1,08±0,1
		серпень	3,8±0,1	98±5	23±6	34±2	0,95±0,1
Чистогалівка, 10-кілометрова зона	2014	червень	3,5±0,2	15±2	24±2	40±4	0,95±0,1
		серпень	3,7±0,1	18±4	21±2	38±2	0,84±0,1
	2015	червень	3,5±0,1	15±3	22±5	29±5	0,83±0,5
		серпень	3,6±0,2	10±2	21±3	27±4	0,88±0,2
	2016	червень	3,4±0,2	12±1	24±3	40±10	0,88±0,5
		серпень	3,6±0,2	13±2	23±2	38±4	0,84±0,5
Рудий ліс, поза траншеєю Т22	2014	червень	3,4±0,1	50±12	17±4	60±6	2,6±0,4
		серпень	3,4±0,2	42±4	15±2	55±5	2,53±0,2
	2015	червень	3,5±0,1	46±3	15±1	45±2	2,8±0,5
		серпень	3,5±0,1	45±11	13±1	42±6	2,04±0,2
	2016	червень	3,5±0,2	47±8	17±2	59±4	2,7±0,4
		серпень	3,5±0,2	47±1	16±2	56±4	2,52±0,2
Рудий ліс, траншея Т22	2014	червень	4,3±0,1	45±2	40±8	70±9	2,03±0,5
		серпень	4,8±0,1	47±8	35±5	67±8	1,84±0,4
	2015	червень	4,3±0,2	50±4	38±3	75±5	1,95±0,4

		серпень	4,5±0,2	48±8	36±3	80±5	1,82±0,2
	2016	червень	4,6±0,2	55±7	38±3	77±7	2,12±0,1
		серпень	4,5±0,2	52±3	37±3	74±12	1,98±0,2

Для оцінки впливу чинників навколишнього середовища на кількісний склад ґрунтової мікрофлори важливою є оцінка основних агрохімічних показників ґрунту, які представлені у табл. 4.2.

Як свідчать дані з табл. 4.1, pH ґрунту в семи з восьми досліджених точок коливалась у межах від 3,0 до 3,9. Така кисла реакція є типовою для дерново-підзолистих ґрунтів поліської зони України. Винятком стала точка з найвищим радіонуклідним забрудненням, відібрана з траншеї деконтамінованого ПТЛРВ Рудий ліс, де pH водної витяжки ґрунту склав 4,5, що відповідає групі кислих ґрунтів. Однак за цим показником ґрунти точок дослідження виявились достатньо однорідними.

Таблиця 4.2. Основні агрохімічні характеристики точок відбору зразків, відібраних для подальших досліджень

Місце відбору зразків	**Рівень забруднення**	**pH KCl**	**Вміст рухомих форм, мг/кг**			**Гумус, %**
			фосфор	**калій**	**азот**	
«Дитятки», КПП на виїзді із ЗВ	контроль	3,2±0,89	18±2	28±5	51±8	1,57±0,12
Залісся, 30-кілометрова зона	низький	3,8±0,14	98±5	23±6	34±10	0,95±0,08
Чистогалівка, 10-кілометрова зона	середній	3,6±0,1	13±2	23±2	37,8±4	0,84±0,12
Рудий ліс, поза траншеєю Т22	високий	3,5±0,12	47±1	16±2	56±7	2,52±0,15

Рудий ліс, траншея Т22	найвищий	4,5±0,62	52±3	37±3	74±5	1,98±0,15

Вміст гумусу коливався в межах від 0,84 % (дуже низький) на території біля с. Чистогалівка до 1,57 % (низький) на КПП «Дитятки». Такі показники вмісту гумусу є типовими для дерново-підзолистих ґрунтів, що характерні для Українського Полісся. Винятком можна вважати ґрунт на території Рудого лісу, де показники були середніми і складали 1,98 і 2,52 %, що є характерним для середньосуглинкових відмін дерново-підзолистих ґрунтів. Отже, можна зробити висновок, що за вмістом гумусу досліджувані ґрунти є типовими дерново-підзолистими з різним ступенем опідзолення.

Щодо забезпеченості основними елементами живлення, варто відмітити, що вміст азоту сполук, які легко гідролізуються, коливається від 33,6 мг/кг ґрунту у с. Залісся до 74,2 мг/кг ґрунту на території траншеї у Рудому лісі, що добре узгоджується з даними щодо вмісту гумусу. Рівень забезпеченості легкогідролізованим азотом (за Тюріним і Кононовою) характеризувався як дуже низький. Вміст рухомого фосфору (за методом Кірсанова) в досліджуваних ґрунтах коливався від 13 (Чистогалівка) до 98 мг/кг (Залісся), а забезпеченість коливалась від низької до середньої (Залісся і Рудий ліс), а обмінний калій у дерново-підзолистих ґрунтах усіх ділянок був низьким, що пов’язано з супіщаним і легкосуглинковим гранулометричним складом верхнього шару ґрунтів.

Таким чином, ґрунти точок дослідження виявились достатньо однорідними за основними агрохімічними показниками. Ці показники в цілому перебували в межах для типових показників дерново-підзолистих слабо- і середньоопідзолених суглинків, які широко розповсюджені в Поліссі України. Це дало змогу припустити, що відмінності в агрохімічних показниках ґрунтів будуть суттєво впливати на умови розвитку ґрунтової мікрофлори. З іншого

боку, такі умови будуть типовими для інших локальностей Українського Полісся.

4.2 Радіонуклідне забруднення точок відбору зразків

Характерною особливістю чорнобильських радіоактивних випадінь є присутність дрібнодиспергованого палива (паливної компоненти) та фракції, що утворилася в результаті летких високорухливих продуктів поділу, включаючи цезій, на поверхні різних носіїв (конденсаційна компонента). Ближня 5-кілометрова зона переважно забруднена паливними частинками, радіонукліди з яких характеризуються значно меншою мобільністю та біологічною доступністю порівняно з конденсаційною формою випадінь (як глобальних, так і чорнобильських). Водночас цезієві конденсаційні плями у дальній зоні сформувалися з допомогою випадінь ^{137}Cs разом з опадами [1], що зумовлює більшу мобільність і біологічну доступність. Точки відбору проб, проаналізовані в цій роботі, розташовані як у ближній 5-кілометровій зоні, так і на більших відстанях, що дозволяє оцінити динаміку виретикальної міграції ^{137}Cs у ґрунтових профілях з обох компонентів забруднення.

Проаналізовані були і показники радіонуклідного забруднення території (табл. 4.3). Виявилося, що найбільший вміст ^{137}Cs характерний для території, що не була піддана деконтамінації, біля с. Чистогалівка, і складає 1290±106 Бк/кг або (3,7±0,4)×10^8 кБк/м^2.

Таблиця 4.3. Основні показники радіоактивності точок відбору проб з території ЧЗВ

Місце відбору зразків	**Рівень забруднення**	**Питома активність ^{137}Cs, Бк/кг**	**Щільність поверхневого збаруднення ^{137}Cs, кБк/м^2**
«Дитятки», КПП на виїзді із ЗВ, ліс	контроль	24±8	(6,64±0,4)×10^6
Залісся, 30-кілометрова зона, ліс	низький	248±17	(7,45±0,5)×10^7

Чистогалівка, 10-кілометрова зона, ліс	середній	1290±106	$(3,65\times\pm0,4)\times10^{9}$
Рудий ліс, поза траншеєю Т22	високий	33 7210±3404	$(3,77\times\pm0,8)\times10^{8}$
Рудий ліс, траншея Т22	найвищий	86 663±8660	$(2,34\times\pm0,2)\times10^{10}$

За даними номограми для розрахунку кількості одиничних проб, необхідних для отримання середнього геометричного значення щільності забруднення ґрунту ^{137}Cs на рівномірно забрудненій ділянці із заданою відносною похибкою, з невизначеністю вимірювання активності радіонуклідів у пробах ґрунту Khomutinin et al. (2020), похибка середнього на досліджуваній території може коливатися в межах 30 % [181].

Такий вміст радіонукліда сформував поглинену дозу із потужністю у 4,02 μГр/год для мікроорганізмів, що населяють ґрунт (табл. 4.4). Водночас найменш забрудненим, навіть нижчим за забруднення зразка з контрольної точки, що розташована на КПП «Дитятки», є ґрунт, відібраний із зони з найнижчим забрудненням у с. Залісся, де питома активність ґрунту становить 24,2±8 Бк/кг, що формує поверхневу активність (6,64±0,4)×106 кБк/м^2. Потужність поглиненої дози, обумовлена цезієм, тут склала 0,01 μГр/год. Згідно з даними МАГАТЕ [339], скринінговими значеннями для ризику компонентів екосистеми є 40 μГр/год – показник, що не перевищується у жодному з досліджених зразків. З іншого боку, згідно з базою даних FREDERICA, найбільш консервативним є показник у 10 μГр/год [72], що перевищується для обох зразків з території Рудого лісу. Але, згідно з тим же джерелом, при таких значеннях потужностей доз ніяких ефектів для ґрунтової мікрофлори не очікується.

Звичайно, такі обрахунки дози є певною мірою приблизними, але високий рівень консервативності моделі, застосованої у пакеті програм The ERICA Tool, дозволяє бути впевненими в адекватності оцінки наведених потужностей дози.

Таблиця 4.4. Поглинуті дози для ґрунтових мікроорганізмів, сформованих на місцях відбору проб (обраховано ERICA tool)

Місце відбору зразків	**Рівень забруднення**	**Потужність дози, μГр/год**
«Дитятки», КПП на виїзді із ЗВ, ліс	контроль	0,1
Залісся, 30-кілометрова зона, ліс	низький	0,1
Чистогалівка, 10-кілометрова зона, ліс	середній	0,5
Рудий ліс, поза траншеєю Т22	вискоий	13,5
Рудий ліс, траншея Т22	найвищий	34,9

Утім розрахунок поглинутої дозі для кожного представника мікробоценозу виявляється дуже складним завданням, для вирішення якого необхідні як дані щодо загального видового складу мікробоценозу на окремій території, так і відомості щодо локалізації мікроорганізмів відносно ґрунтового колоїда. На жаль, даних щодо таких досліджень на разі знайдено не було.

Отже, за показниками радіонуклідного забруднення проаналізовані території дотепер відносяться до зони відчуження та зони безумовного (обов'язкового) відселення.

Очікувано найбільш забрудненою виявилась територія Рудого лісу. Так на траншеї активність ^{137}Cs становила 86±7 кБк/кг, що формує дозу потужністю 35 μГр/год, тоді як поза межами, де концентрація радіонуклідів була очікувано меншою і становила 34±3, кБк/кг потужність дози для ґрунтових мікроорганізмів коливалася в межах 14 μГр/год.

4.3 Концентрація виділеної загальної ДНК зразків

Для загальної оцінки біорізноманіття ґрунтової мікрофлори було проведено виділення тотальної ДНК, яка включала нуклеїнові кислоти від усієї біомаси ґрунту (табл. 4.5).

Таблиця 4.5. Концентрація тотальної ДНК, виділеної з відібраних зразків ґрунту ЧАЕС

Місце відбору зразків, село	**Рівень забруднення**	**Концентрація ДНК, µг/мл**
«Дитятки», КПП на виїзді із ЗВ, ліс	контроль	5,2±0,8
Залісся, 30-кілометрова зона, ліс	низький	5,4±0,4
Чистогалівка, 10-кілометрова зона, ліс	середній	6,9±0,5
Рудий ліс, поза траншеєю Т22	високий	4,8±0,3
Рудий ліс, траншея Т22	найвищий	9,0±0,8

Концентрація тотальної ДНК (рис. 4.2.) у досліджуваних зразках коливалася в межах від 4,80 (Рудий ліс, поза траншеєю) до 9,0 µг/мл (Рудий ліс, траншея). Концентрація ДНК має тенденцію до кореляції із вмістом азоту сполук, які легко гідролізуються $R^2 = 0{,}485$, рівняння має вигляд $y = e^{0{,}0337x}$, що свідчить про вагомий внесок азоту в формування біомаси організмів, які заселяють ґрунт. Більш тісний зв'язок було отримано між вмістом загального гумусу і тотальною ДНК, яка виділена з дерново-підзолистих ґрунтів $R^2 = 0{,}7491$, лінійне рівняння має вигляд $y = 0{,}442x$.

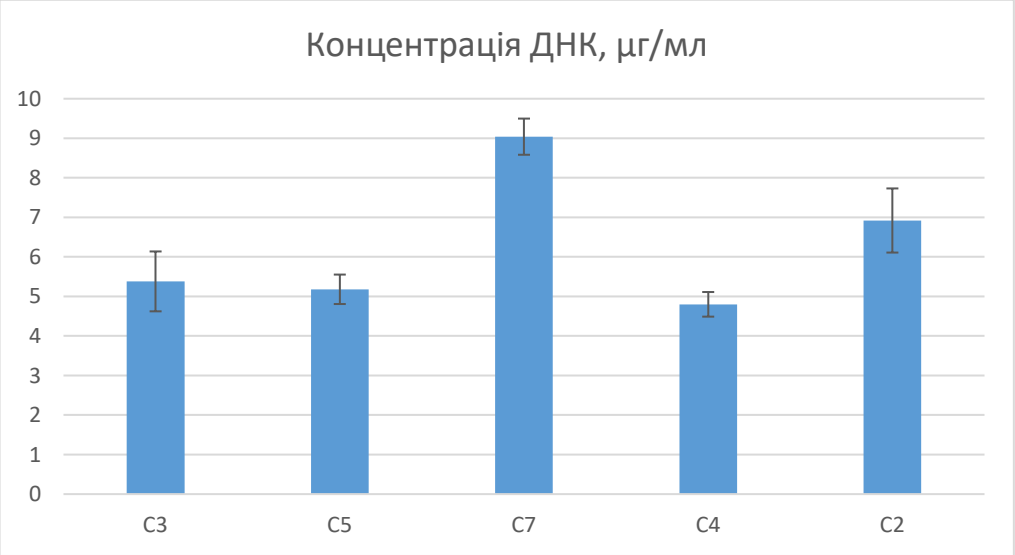


Рисунок 4.2. Концентрації тотальної ДНК, які виділені з відібраних зразків ґрунту ЧЗВ

Звичайно, для більш точної оцінки необхідними є подальші аналізи, в тому числі отримання результатів секвенування. Контроль – КПП «Дитятки»; низьке – с. Залісся, 30-кілометрова зона; середнє – Чистогалівка, 10-кілометрова зона, ліс; високе – Рудий ліс, поза траншеєю Т22, найвище – Рудий ліс, траншея Т22.

4.4 Препроцесінг метагеномних даних у програмному пакеті QIIME

Препроцесінг даних [127] – це етап підготовки даних секвенування до кластеризації та подальших етапів аналізу. А саме quality filtering – це видалення довгих нехарактерних послідовностей (sequence lengths), енд-тріммінг (end-trimming) та видалення всіх послідовностей, що відповідають низькій якості за шкалою phred (minimum quality score). В цьому випадку був застосований модуль QIIME split_libraries_fastq.py (http://qiime.org/scripts/split_libraries_fastq.html), що потребує вхідних даних у форматі *.fastq та має певні особливості щодо вибору фільтрів. А саме – (p), r, (n), (q), c.

```
(qiime1)./split_libraries_fastq.py -i *.fastq --sample_ids R* --
min_per_read_length_fraction 0.75 --phred_quality_threshold 19 --
barcode_type "not-barcoded" -o (output directory)
```

Для кожного *.fastq файлу виконується препроцесінг такою командою:

Відповідно, обираються параметри min_per_read_length_fraction зі значенням 0,75 та phred_quality_threshold зі значенням 19. Додатково, вибирається параметр barcode_type "not-barcoded", тому що баркоди (короткі послідовності, що служать для ідентифікації під час секвенування [272]) видаляються на попередніх етапах.

4.4.1 *Кластеризація метагеномних даних у QIIME*

Метою цього етапу є отримання OTU (operational taxonomic unit) таблиць, що містять кластеризовану інформацію щодо бактеріальної таксономії, базуючись на подібності послідовностей (sequence similarity) [76]. В 16s метагеномних підходах OTU є кластером варіантів подібних послідовностей 16s rDNA маркерних генів. Для генерування OTU таблиць, використовують модуль QIIME closed_reference.py (http://qiime.org/scripts/pick_closed_reference_otus.html). Особливістю цього етапу є те, що вирівнювання відбувається на базу даних послідовностей 16s "Greengenes" (http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi) за замовчуванням, але є можливість обрати іншу базу (наприклад, "SILVA"(https://www.arb-silva.de/)).

```
(qiime1)./pick_closed_reference_otus.py -i seqs.fna -o (otput directory)
```

Для кожного *.fastq файлу виконується кластеризація такою командою:

Як результат, генеруються OTUs таблиці у *.biom форматі [76] – The Biological Observation Matrix (http://biom-formet.org/).

4.5 Розрахунок альфа-різноманіття мікробіому

Альфа-різноманіття дає можливість оцінити біорізноманіття (number of taxa) у межах однієї спільноти та розрахувати кількість детектованої таксономії у конкретному зразку. Альфа-різноманіття має низку можливих метрик для оцінки різноманіття, а саме: chao1, shannon, simpson, dominance і т. д. (http://scikit-bio.org/docs/latest/generated/skbio.diversity.alpha.html).

Для розрахунку альфа-різноманіття застосовується модуль QIIME alpha_diversity.py (http://qiime.org/scripts/alpha_diversity.html), що потребує на

вхід *.biom таблиці та додаткову інформацію щодо кладистики в форматі *.tre. Для кожного зразка альфа-різноманіття розраховується такою командою:

```
(qiime1)./alpha_diversity.py -i otu_table.biom -m
chao1,PD_whole_tree,shannon,simpson,dominance -o (output directory)
```

Як видно з команди, для розрахунку обираються такі метричні параметри(m): chao1, PD_whole_tree, shannon, simpson, dominance.

Графіки для альфа-різноманіття будуються у пакеті R phyloseq [231] функцією plot_richness (otu,x="samples",measures=c ("Chao1","Shannon","Simpson")).

4.6 Розрахунок бета-різноманіття мікробіому

Бета-різноманіття дозволяє оцінити різноманіття між декількома спільнотами. Так як і альфа-різноманіття, бета-різноманіття має свої специфічні метричні параметри: bray_curtis, chisq, euclidean, kulczynski, binary_sorensen_dice та ін.

Для розрахунку бета-різноманіття застосовується модуль QIIME beta_diversity.py (http://qiime.org/scripts/beta_diversity.html), що потребує на вхід *.biom таблиці та вказані метричні параметри. Для розрахунку бета-різноманіття застосовується злита *.biom таблиця (merged), що містить *.biom таблиці всіх зразків. Розрахунок здійснюється такою командою:

```
(qiime1)./beta_diversity.py -i merged.biom -m bray_curtis, chisq, euclidean,
kulczynski, binary_sorensen_dice -o output directory
```

Як видно з команди, для аналізу обираються такі метричні параметри: bray_curtis, chisq, euclidean, kulczynski, binary_sorensen_dice.

Візуалізацію бета-різноманіття виконують за допомогою PCoA графіків і модуля QIIME principal_coordinates.py (http://qiime.org/scripts/principal_coordinates.html) та make_2d_plots.py

(qiime1)./principal_coordinates.py -i beta_diversity_outputs - output directiry

(qiime1)./make_2d_plots.py -i PCoA_output_directiry -m metafile.txt -o output directory

(http://qiime.org/scripts/make_2d_plots.html). Та виконується такими командами:

Отримані дані секвенування мікробіомів було проаналізовано на якість секвенування програмним пакетом FastQC та показано, що якість даних секвенування коливається у межах 10–48 за phred шкалою. Проведено препроцесінг даних секвенування у програмі QIIME та видалено послідовності, показник якості яких нижчий за 19 одиниць за phred шкалою. Проведено кластеризацію метагеномних даних на основі референсу у програмі QIIME та отримано OTU таблиці і результати кладистики для досліджуваних зразків. Підібрані методи аналізу метагеномних даних дозволяють отримувати достовірний опис складу та функцій мікробіому.

4.7 Функціональна реконструкція мікробіому

4.7.1 *Робота з PICRUSt*

Передбачення біологічних функцій проведено у програмі PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States, http://picrust.github.io/picrust/) – це біоінформатичний програмний пакет, розроблений для реконструкції метагеномного функціонального контенту, користуючись маркерними генами (16s rRNA) та працюючи на основі алгоритму ancestral state reconstruction [40]. PICRUSt існує у вільному доступі під ліцензією GPL та виконується з командного рядка. Програма містить 2

головні модулі, написані мовою програмування Python: normalize_by_copy_number.py (http://picrust.github.io/picrust/scripts/normalize_by_copy_number.html#normalize-by-copy-number) та predict_metagenomes.py (http://picrust.github.io/picrust/scripts/predict_metagenomes.html#predict-metagenomes).

Перший модуль (normalize_by_copy_number.py), відповідно, нормалізує OTU таблицю, поділивши кожний OTU на відоме значення копії 16s (known/predicted 16S copy number abdundance), користуючись базою даних 16s, що додатково завантажується під час установлення програми. Модуль виконується такою командою:

```
./normalize_by_copy_number.py -i closed_picked_otus.biom -o normalized_otus.biom
```

Наступним етапом є використання модулем predict_metagenomes.py. Цей модуль створює фінальне передбачення функцій метагеному множенням кожної нормалізованої OTU на кожну передбачену функціональну рису (functional trait abundance) та продукує таблицю функцій для кожного зразка. Модуль виконується такою командою:

```
./predict_metagenomes.py -i normalized_otus.biom -o predicted_metagenomes.biom
```

Як результат, таблиця з розрахованими функціями (function counts – KEGG KOs) для кожного зразка (sample id) – predicted KO abundances.

4.7.2 *Робота з HUMAnN*

Для реконструкції метаболічних шляхів застосовується програма HUMAnN (The HMP Unified Metabolic Analysis Network), що є програмним пакетом для ефективного і точного визначення наявності/відсутності і поширення (abundance) мікробних метаболічних шляхів у мікробній спільноті з метагеномних даних. HUMAnN використовує вхідні метагеномні дані секвенування, в цьому випадку попередньо конвертовані *.biom таблиці, що створюються у форматі PICRUSt у *.tsv, та генерує таку інформацію на виході:

1 – поширення ортологів кожної генної родини у бактеріальній спільноті – (the abundance of each orthologous gene family – KEGG orthology);

2 – відсутність/присутність кожного метаболічного шляху у бактеріальній спільноті. HUMAnN інтерпретує наявність або відсутність метаболічного шляху як покриття (coverage) й визначає метаболічний як набір 2-х або більше генів та використовує KEGG pathways за замовчуванням;

3 – поширення кожного метаболічного шляху (pathway abundance) у зразку, представленому як кількість копій шляху, що присутній. Запускається командою scons, знаходячись у директорії “humann” (https://bitbucket.org/biobakery/biobakery/wiki/humann):

(humann)$ scons

Ця команда буде виконувати HUMAnN для вхідних файлів у форматах *.tsv, *.csv, *.pcl, що знаходяться в input directory, і зберігати вихідні файли в каталог /humann/output/.

Відповідно отримані дані представлені 4-ма *.txt файлами для кожного зі зразків та додатковим анотаційним файлом для візуалізації у програмі GraPhlAn:

1- 04a-hit-keg-mpm-cop-nul-nve-nve-xpe.txt (relative abundances of all genes)

2- 04a-hit-keg-mpt-cop-nul-nve-nve-xpe.txt (coverages of all pathways)

3 - 04b-hit-keg-mpm-cop-nul-nve-nve.txt (relative abundances of all pathways)

4-04b-hit-keg-mpt-cop-nul-nve-nve.txt (relative abundances of all individual genes)

4.8 Візуалізація даних та побудова кладограм

GraPhlAn (https://huttenhower.sph.harvard.edu/graphlan) – це біоінформатична програма для візуалізації складних, високоякісних філогенетичних і кладистичних дерев з метагеномних даних у циркулярній формі. GraPhlAn складається з 2-х скриптів, що написані мовою програмування Python: 1 – graphlan.py, 2 – graphlan_annotate.py.

Відповідно перший скрипт візуалізує дерево у *.txt, Newic або PhyloXML форматах. Другий, відповідно, модифікує будь-яке дерево у будь-якому з вищенаведених форматів, а саме додає: різні кольори, стилі представлення таксономії, лейбли, тіні, хітмапи та ін. Для цієї модифікації GraPhlAn потребує окремого анотаційного файлу, який створюється власноруч користувачем з анотаційними параметрами (https://bitbucket.org/nsegata/graphlan/wiki/Home), що обираються залежно від мети дослідження.

GraPhlAn використовується для візуалізації даних реконструкції метаболічних шляхів, що генерує HUMAnN, та результатів OTU кластерізації QIIME, тобто таксономії.

Візуалізація метаболічних шляхів. Для того щоб GraPhlAn коректно працював з даними HUMAnN, їх треба модифікувати такими командами:

```
./ sed 's/,//g' 04b-hit-keg-mpm-cop-nul-nve-nve-graphlan_rings.txt > rings_new.txt
./ sed 's/(//g' rings_new.txt>rings_new1.txt
./ sed 's/)//g' rings_new1.txt>rings_new2.txt
```

Наступним кроком є візуалізація дерева модулями GraPhlAn такими командами:

```
./graphlan_annotate.py --annot 04b-*-graphlan_rings.txt 04b-*-mpt-*-graphlan_tree.txt output_filename.xml
./graphlan.py --dpi 400 output_filename.xml output_images/output_filename.png
```

Для візуалізації даних кластеризації QIIME застосовується наведений вище алгоритм дій.

Адекватність методів in silico аналізів поставленим задачам істотно впливає на точність та достовірність отриманих на виході даних, отже, важливим є не тільки правильне застосування програмного забезпечення, а і ретельний контроль над правильним введенням команд та викоистанням радикалів.

Підібрана колективом авторів методологія in silico аналізу дозволяє збільшити точність аналізу метагеномних даних та уникнути більшої частини помилок, що зазвичай знижують якість і достовірність даних, отриманих у результаті секвенування.

4.9 Оцінка якості даних секвенування за допомогою FastQC

З появою високопродуктивних ДНК-секвенаторів і можливістю отримувати мільярди метагеномних рідів за лічені дні виникла потреба в розробці ефективних засобів метагеномного аналізу, починаючи з початкових етапів (попередня обробка рідів, їх компонування в довгі фрагменти), включаючи визначення таксономічного та функціонального складу, і закінчуючи завершальним етапом (порівняльний статистичний аналіз, візуалізація), які повинні мати такі властивості:

- ефективність: обробка великих обсягів даних за короткий час;

- масштабованість: гнучкість до розширення обчислювальної бази;

- наочність в екстракції знань: отримання візуальних результатів, що дозволяють досліднику генерувати і перевіряти наукові гіпотези.

Надзвичайно важливою при роботі з даними 16S рРНК є попередня обробка – важлива перша фаза аналізу, що проводиться з метою поліпшення відношення «сигнал–шум» у даних.

Для деяких платформ довжина рідів не є фіксованою. В такому випадку доцільно проводити «жорстку» фільтрацію рідів по довжині, відкинувши всі ріди з довжиною, що нижча за фіксований поріг. Далі бали якості можна використовувати для фільтрації рідів декількома способами. По-перше, зазвичай проводиться відсіювання рідів із середнім балом якості, що нижче за пороговий. По-друге, з рідів можуть адаптивно видалятися позиції, що мають низький бал якості (наприклад, послідовно видаляються всі нуклеотиди з 5' до 3' кінця до тих пір, поки не зустрінеться позиція з балом якості, що перевищує фіксований поріг).

Крім рідів біологічної природи, результати секвенування можуть містити прочитання штучних послідовностей з огляду на те, що в ході підготовки бібліотеки секвенування проводиться хімічна модифікація вихідної ДНК, що включає, крім інших кроків, лігування допоміжних технічних ДНК-адаптерів.

Теоретично вони не повинні міститися в підсумкових прочитаннях, але на практиці невеликий відсоток рідів може містити такі послідовності. Щоб уникнути їх впливу на подальший аналіз, ріди, схожі за послідовністю з шаблонними (референсними) послідовностями адаптерів, відкидаються. Таким само способом проводять відсіювання сторонньої генетичної інформації в рідах, що має біологічне походження. До них належить як лабораторне забруднення, так і ДНК організму господаря – в разі, якщо секвенується мікробіота, асоційована з живим організмом.

Як і було зазначено вище, в поданому дослідженні використовувався пакет програм FastQC.

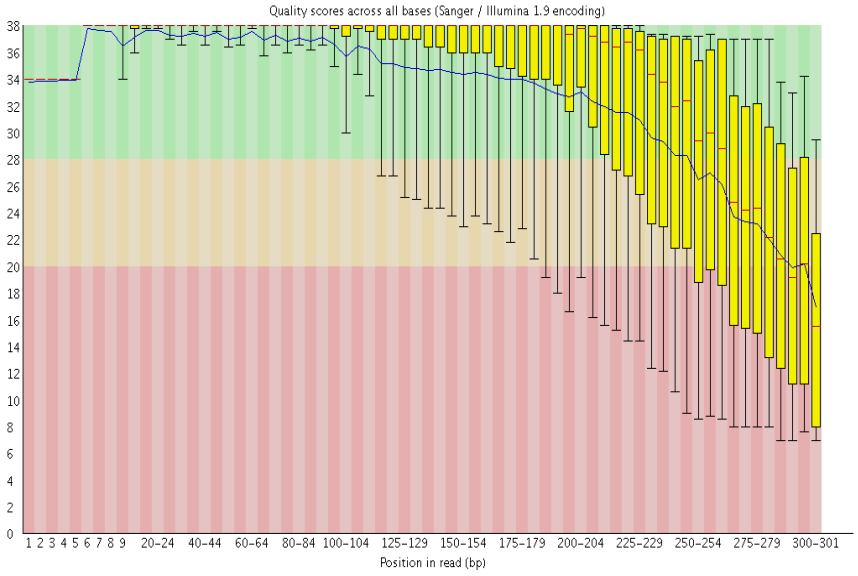


Рисунок 4.3. Загальна оцінка діапазону значень якості нуклеотидів, визначена в кожній з позицій файлу с. Залісся

Як свідчать дані, наведені на рис. 4.3, якість секвенування зразка, відібраного на території з низьким радіонуклідним забрудненням, з відселеного с. Залісся, різко знижується та розташовується в межах значень від 10 до 20, що свідчить про низьку якість секвенування за шкалою phred і потребує додаткової фільтрації за якістю quality filtering.

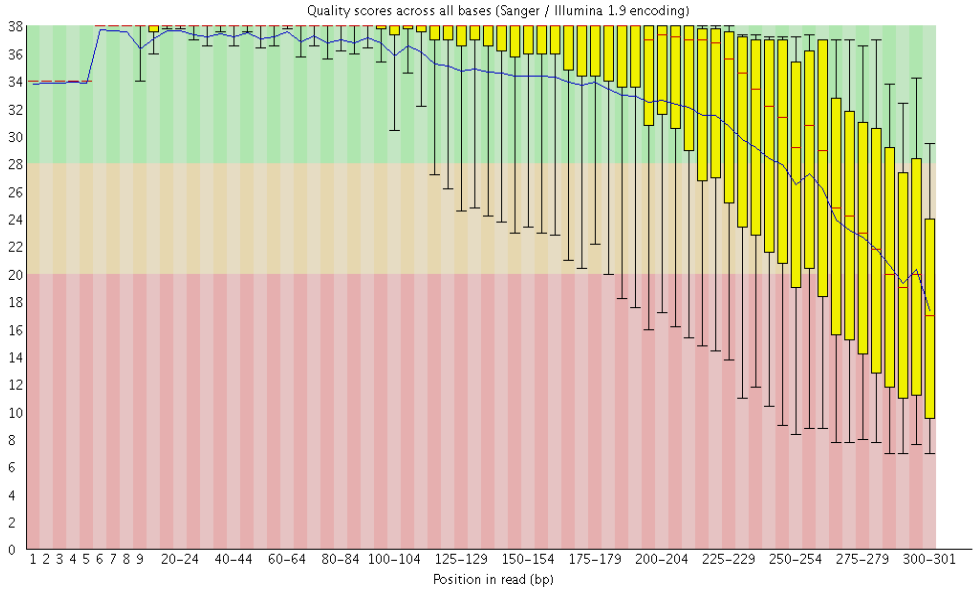


Рисунок 4.4. Загальна оцінка діапазону значень якості нуклеотидів, визначена в кожній з позицій файлу з контрольної точки з КПП «Дитятки»

Приблизно той самий висновок можна зробити за аналізом, який зображає рис. 4.4, якість секвенування зразка, відібраного з контрольної точки біля КПП «Дитятки», в межах значень від 10 до 20 і характеризується вона як низька за шкалою phred і потребує додаткової фільтрації з використанням quality filtering.

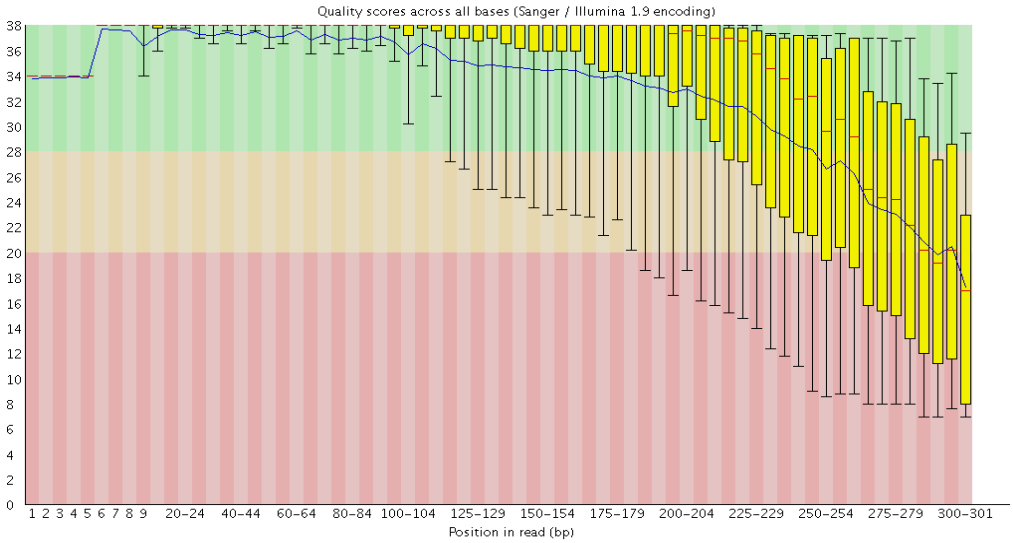


Рисунок 4.5. Загальна оцінка діапазону значень якості нуклеотидів, визначена в кожній з позицій файлу з території з найвищим забрудненням, Рудий ліс, траншея

Згідно з отриманими даними секвенування, 99 % рідів зразка, відібраного на території з траншеї, що у Рудому лісі (рис. 4.5) знаходяться вище за порогове значення якості у 20 % помилки, отже, отримані дані були визнані такими, що підходять для подальшої роботи.

Як можна побачити, якість секвенування зразка, відібраного на території с. Чистогалівка, також знаходиться в межах значень від 10 до 20, що свідчить про низьку якість секвенування за шкалою phred і потребує додаткової фільтрації за якістю – quality filtering.

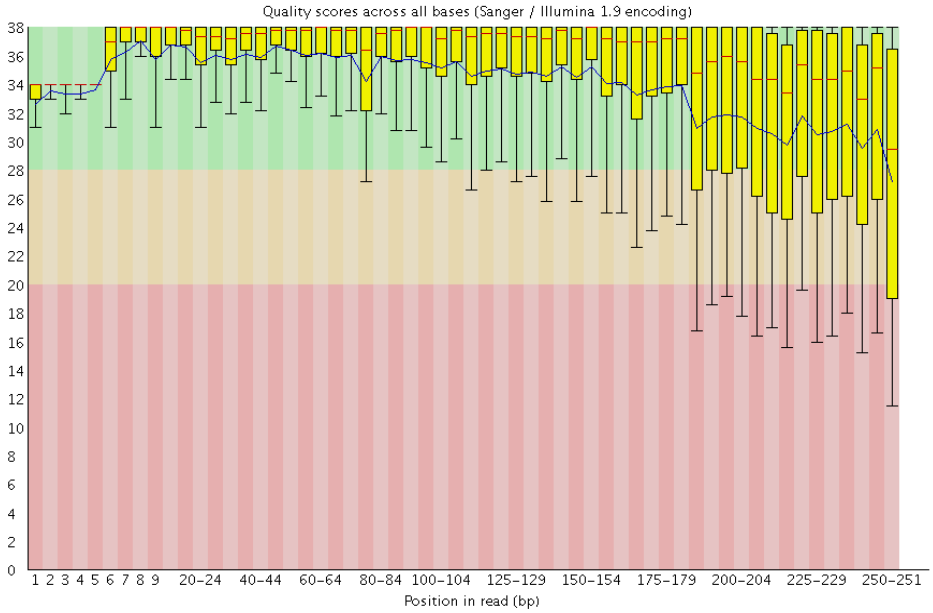


Рисунок 4.6. Загальна оцінка діапазону значень якості нуклеотидів, визначена в кожній з позицій файлу з треиторії із середнім забрудненням, с. Чистогалівка

Отже, за отриманими даними необхідно зробити висновок, що якість секвенування раніше ампліфікованої ДНК виявилась мало задовільною, тому потребувала додаткової обробки щодо фільтрації отриманих даних із використанням модифікованих нами скриптових послідовностей.

4.10 Загальна характеристика мікробіомів ґрунту ЧЗВ

4.10.1 *Обмеження використання методу секвенування нового покоління для зразків, відібраних з територій ЧЗВ*

Молекулярно-біологічне різноманіття ґрунтів ЧЗВхарактеризувалось в 3,1 раза більшим бактеріальним різноманіттям, порівняно зі зразками, які відібрані з ОУ ЧАЕС. Так, виявлено 5297 окремих таксономічних одиниць у дерново-підзолистих ґрунтах, які відібрані з траншеї в Рудому лісі порівняно з 1704 для зразка, що відібраний поза нею (табл. 4.6).

Таблиця 4.6. Обмеження методу таксономічного визначення за 16s рРНК зразків, відібраних з території зони відчуження ЧАЕС

Досліджуваний показник	Контроль, «Дитятки», КПП на виїзді із ЗВ, ліс	Низьке забруднення, Залісся, 30-кілометрова зона, ліс	Середнє забруднення, Чистогалівка, 10-кілометрова зона, ліс	Високе забруднення, Рудий ліс, поза траншеєю Т22	Найвище забруднення, Рудий ліс, траншея Т22
Кількість OTU	2610±463	3307±647	2059±268	1704±206	5297±335
Кількість порядків	2466±235	3086±262	1948±323	1589±301	4890±933
Кількість видів	770±45	986±54	598±11	438±8	1486±51

Різноманіття мікроорганізмів у навколишньому середовищі і досі залишається, певним чином, terra incognita для людей, адже неідентифікованими лишаються до 70 % бактеріальних видів у добре вивчених ґрунтах [183], і набагато більше для менш доступних дослідникам субстратів. Алгоритми кількісної мікробної екології дозволяють використовувати філогенетичні підходи для визначення загальної кількості видів – алгоритм бере до уваги генетичну відстань між двома записами і, в разі його достатності, виділяє запис в окрему таксономічну одиницю. Операційна таксономічна одиниця, або OTU, вважається основною одиницею, що використовується в числовій таксономії. Ці одиниці можуть стосуватися особини, виду, роду чи класу. У чисельних методах використовувані таксономічні одиниці не завжди можна порівняти з формальними таксономічними одиницями – і це, з одного

боку, спричинило нещодавню революцію в таксономії, коли за стандарт було вирішено приймати відмінності у 16s рРНК, а з іншого – дозволяє приблизну кількість видів у субстратах зі складним біорізноманіттям як, наприклад, ґрунт. Отже, використовуючи такий підхід, можна стверджувати, що кількість окремих таксономічних одиниць, кластеризованих QIIME, – це максимальна кількість видів мікроорганізмів (як описаних у геномних базах даних, так і поки що невідомих дослідникам), що можна детектувати в даному зразку. Звідси ми побудували припущення щодо співвідношення відомих і невідомих таксономічних одиниць у досліджуваних нами зразках із ЧЗВ.

Роздільна здатність на рівні Порядку і Виду була високою, але на рівні Порядок ідентифіковано від 92 до 95 % мікроорганізмів. Водночас видова ідентифікація була в 3 рази менш ефективною за визначення належності мікроорганізмів до певного порядку – 30 % усіх бактерій (рис. 4.7). Така різниця може бути пов'язана із суттєво більшими кількісними показниками різноманіття, ще більше підтверджується коректність вибору стратегії [217] нашої роботи з бактеріальним різноманіттям на рівні порядку. Але, на жаль, ми не культивуємо близько 60 % бактерій на селективних середовищах.

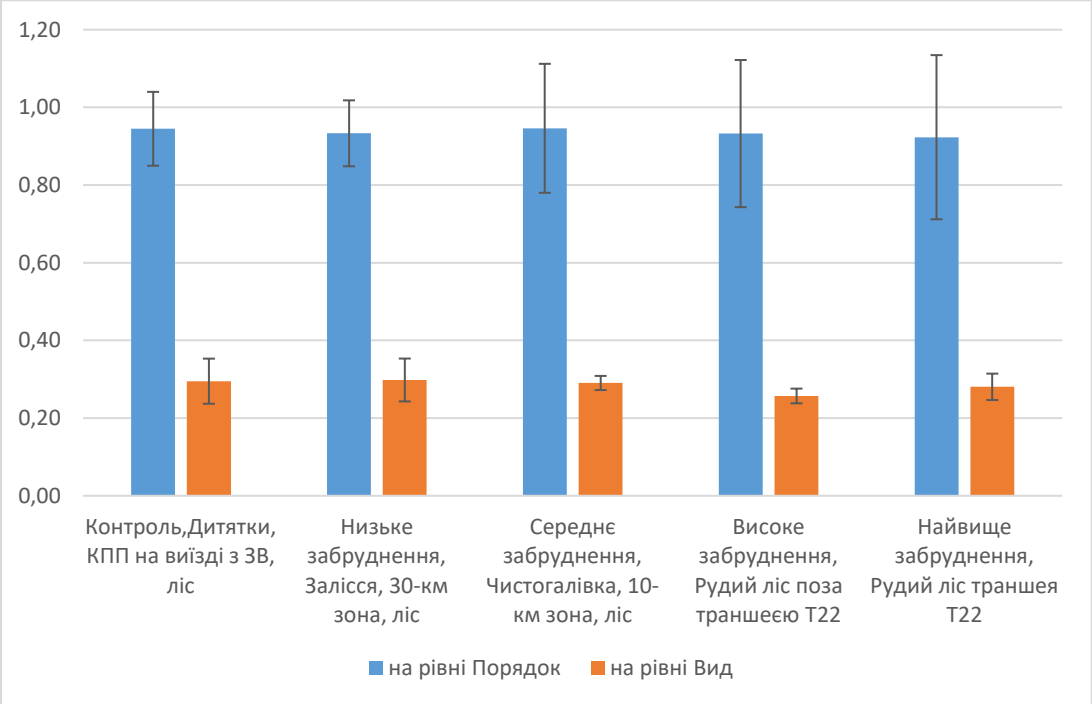


Рисунок 4.7. Загальна кількість окремих таксономічних одиниць, ідентифікованих на рівні Порядок і Вид. С3 – Залісся, низьке забруднення; С5 – КПП «Дитятки», контрольна точка;

С7 – найбільш забруднена точка, траншея Т22 в Рудому лісі; С4 – високе забруднення, Рудий ліс, поза траншеєю Т22; С2 – Чистогалівка, середнє забруднення

4.10.2 *Альфа-різноманіття ґрунтів ЧЗВ*

Основоположником учення про міграцію речовин у навколишньому середовищі та науки біогеохімії вважають В. І. Вернадського. Згідно з його ідеями, планета Земля має живу оболонку, так звану біосферу, в межах якої і відбувається переважна більшість важливих для життєдіяльності людини процесів [364]. За його визначенням, «біосфера – організована оболонка Земної кори, яка пов'язана з життям». Учений вважав, що взаємодія живої речовини з неорганічною є частиною великого механізму земної кори, завдяки якому відбуваються різноманітні геохімічні і біогенні процеси, міграції атомів, здійснюється їх участь у геологічних і біологічних циклах. В. І. Вернадський підкреслював, що біосфера є результатом геологічного і біологічного розвитку і, з одного боку, це середовище життя, а з іншого – результат життєдіяльності. Специфіка сучасної біосфери – це чітко спрямовані потоки енергії і біогенний (пов'язаний з діяльністю живих істот) колообіг речовин. Вернадський уперше показав, що хімічний стан зовнішньої кори нашої планети повністю перебуває під впливом життя і визначається живими організмами, з діяльністю яких пов'язаний великий планетарний процес – міграція хімічних елементів у біосфері. Еволюція видів, що призводить до створення форм життя, стійка в біосфері і повинна йти в напрямку збільшення біогенної міграції атомів.

Учений уявляв, що етапи розвитку біосфери нашої планети можна умовно поділити на наступні етапи:

- виникнення первинної біосфери з біотичним кругообігом (хімічна еволюція) приблизно 4,6–3,5 млрд років тому;
- ускладнення біоценозу як результат появи багатоклітинних організмів (органічна еволюція), починаючи приблизно з 3,5 млрд років тому;

- він вважав, що у майбутньому можна буде також виділити третій етап еволюції біосфери, формування ноосфери – тобто трансформація біосфери під впливом людської діяльності. Фактично перші кроки у цьому напрямку людство вже зробило, майже повністю трансформувавши екосистеми з природних в урбо-, техно-, агро- та інші типи екосистем, що для ефективного функціонування потребують людської турботи та уваги. На жаль, важко сказати, що діяльність сучасної людини має системний характер, який дозволить забезпечити сталий розвиток і процвітання середовища нашого життя – натепер вона схожа більше на розрізнені намагання досягти найкращих показників у певних напрямах людської діяльності. Саме відсутність системності, відсутність розуміння механізмів регуляції потоків речовин в екосистемах та їх впливові на продукування і редукування біогенної речовини і призводить до щорічного збільшення загальної ентропії планети, глобальних змін клімату, формування недосяжних депо життєво важливих мінералів, збої і міграції мікроелементів та накопиченні їх у певних ланках екосистем до токсичної концентрації тощо. У той же час протягом усього процесу еволюції і формування нашої планети формувалися природні механізми для регуляції і, певною мірою, підтримання стабільності біосфери – так, наприклад, фосфат-мобілізуючі мікроорганізми дозволяють знизити темп вимивання сполук фосфору в недоступні для рослин океанічні депо, азотфіксатори ґрунту регулюють вміст і доступність сполук азоту, ґрунтова біота редукує органічні рештки, переводячи поживні речовини у доступний для рослин стан. Фактично, прокаріоти з усією їх різноманітністю надають повний спектр механізмів для регулювання біогенних потоків речовин в екосистемах – і людина може застосовувати ці механізми у формуванні сталого, продуктивного і безпечного для себе довкілля. Але щоб їх використовувати, необхідно спочатку ретельно проінспектувати тулбокс, що його було сформовано природою. І саме тут

з’являється місце для наголошення актуальності вивчення як загального біорізноманіття екосистем – так і різноманіття прокаріотів у них.

Відомо, що найбільшим депо редукуючих прокаріотів в екосистемах є ґрунти та шлунково-кишкові тракти консументів – тобто локації, де протікає найбільше процесів розкладання складної органічної речовини до простих доступних форм. І якщо мікробіоми ШКТ консументів, до числа яких входить і людина, природно викликають більше інтересу в людей-дослідників, будучи в той же час доволі обмеженим за типами процесів і речовин, що потребують деструкції – то спільноти ґрунтових мікроорганізмів формуються для виконання набагато ширшого спектра функцій. Так, наприклад, такі речовини, як антибіотики, були вперше виділені з ескудату *Strepomyces* [367] – класичних ґрунтових мікроорганізмів. У принципі процеси деструкції забруднюючих речовин, таких як пластик або інші токсичні агенти, можливо виконувати за допомогою біореакторів [216, 341].

Але перед тим як використовувати можливості, надані мікроорганізмами, необхідно якомога ретельніше вивчити їх біорізноманіття, функції, взаємозв’язки та антагоністичні відносини між ними, а отже, визначення загального біорізноманіття видів на планеті є важливим передусім для коректної оцінки продуктивного потенціалу нашої планети.

Біорізноманіття екосистеми може бути визначено як повна генетична сукупність певного середовища, що складається зі всіх видів, що мешкають у ньому, чи це біоплівка в покинутій шахті, чи крапля морської води, чи жменя землі або вся біосфера планети Земля. Для зберігання інформації щодо видів, описів, ареалу розповсюдження, генетичної інформації та виконуваних функцій використовуються бази даних із хостингами переважно США [375]. Так, наприклад, найбільша у світі база даних NCBI, де розміщено інформацію про всі наразі секвеновані й розшифровані геноми живих організмів. Базою даних

GreenGenes [229], де зібрані повні геноми і дані щодо 16s р РНК, користуються у більшості досліджень мікробіому, зокрема і представлене тут дослідження.

Специфіка роботи із сучасними геномними даними полягає у великому об'ємі інформації, який важко проаналізувати тільки емпірично. Об'єми розшифрованих геномів, залежно від складності організації, вимірюються мегабайтами або навіть терабайтами текстових файлів. Для розуміння, подання та аналізу такої інформації дослідники потребують спеціального програмного забезпечення – зазвичай експериментального і з відкритим кодом. Воно застосовується для пошуку, візуалізації й аналізу інформації, і, що важливіше, представлення її у доступному вигляді іншим людям. Комп'ютерні симуляції моделюють такі речі, як популяційна динаміка, обчислюють загальне генетичне здоров'я культури, що вже тепер широко використовується в агрономії. Один з найважливіших потенціалів цієї області полягає в аналізі послідовностей ДНК організмів або повних геномів цілих вимираючих видів, дозволяючи запам'ятати результати генетичного експерименту природи у віртульних базах даних і можливості використовувати знову в майбутньому, навіть якщо ці види повністю вимруть.

Біорізноманіття мікрофлори може суттєво змінюватись залежно від умов навколишнього середовища – саме для більш ефективного включення нових речовин у біогенні колообіги та запобігання депонуванню цих речовин. І навіть незважаючи на те, що концентрація радіонуклідів, що може формувати відчутні для екосистем дози, і є щезаюче незначною, екосистема формує адекватну відповідь на їх привнесення, модифікуючи власні функції та процеси міграції поживних речовин. У той же час радіонуклідне забруднення формує підвищену дозу іонізуючого опромінення в екосистемі, вимушуючи представників усіх таксонів адаптуватися до нового навантаження – шляхом підвищення інтенсивності репараційних процесів: репопуляції – для одноклітинних істот та регенерації – для багатоклітинних. Зміна видового складу, що може відбутися

через привнесення нового забрудника у ґрунт, здатна істотно змінити таксономічну структуру біоценозу, тим самим змінюючи його функції та спрямування потоків речовин. Отже, відповідь на питання щодо впливу іонізуючої радіації на структуру ґрунтового мікроценозу дозволить як оцінити можливу небезпеку через зміщення точки клімаксу в екосистемі, так і сформувати гіпотезу щодо зміни функцій у кожному конкретному дослідженому угрупованні.

Дані щодо бактеріального різноманіття нативних дерново-підзолистих ґрунтів наводяться вперше. Раніше було опубліковано роботи щодо мікробіомів чорноземних сільськогосподарських ґрунтів [32, 33, 9]. Ці дані, доповнені предсталеними у цій роботі аналізами, роблять значущий внесок у характеристику бактеріального різноманіття ґрунтів України.

У результаті проведених аналізів було отримано файли з базою даних щодо загального біорізномніття ґрунтової мікрофлори. Для більш зручного відображення результати було проаналізовано, біорізноманіття скомпресовано на таксономічному рівні Порядок (табл. 4.7).

Таблиця 4.7. Мікробіом ЧЗВ, скомпресований на рівні Порядок

Назва Порядку	**Загальна кількість рідів для кожного представника рівня Порядок**				
	Контроль, «Дитятки», КПП на виїзді із ЗВ	**Низьке забруднення, Залісся, 30-кілометрова зона**	**Середнє забруднення, Чистогалівка, 10-кілометрова зона, ліс**	**Високе забруднення, Рудий ліс, поза траншеєю Т22**	**Найвище забруднення, Рудий ліс, траншея Т22**
[Chthoniobacterales]	903	817	856	565	4353
[Entotheonellales]	221	38	24	5	57
[Fimbriimonadales]	291	71	100	51	86
[Pedosphaerales]	649	737	831	558	2182
[Roseiflexales]	74	31	73	51	18
[Saprospirales]	602	707	771	529	2217

Acidimicrobiales	1477	1453	1638	1271	5234
Acidobacteriales	7998	7965	8127	5425	10589
Actinomycetales	7958	7959	8094	5407	10637
Bacillales	525	688	666	486	2168
Burkholderiales	353	615	595	381	2122
Caulobacterales	188	529	513	360	1750
Ellin329	1524	2037	1164	1030	6018
Gaiellales	64	526	18	66	2202
Gemmatales	2024	2666	1565	1368	6551
Myxococcales	212	565	68	182	3717
Nitrospirales	35	451	16	65	583
Opitutales	34	427	16	65	480
Other species	7375	6617	7377	4946	7372
Pirellulales	34	391	16	65	587
Planctomycetales	32	357	15	65	415
Rhizobiales	7455	7573	7398	4983	8591
Rhodobacterales	4728	4747	4743	3471	5367
Solibacterales	3213	3624	3390	2644	5244
Solirubrobacterales	92	263	29	72	2284
Sphingobacteriales	258	264	146	297	2349
Xanthomonadales	739	531	858	748	2475
Всього рідів	49058	52649	49107	35156	95648

У результаті проведених біоінформатичних досліджень до виду вдалося ідентифікувати 4300 представників ґрунтової мікрофлори. Але для спрощення розуміння загального біорізноманіття кількість рідів було нормалізовано на рівні Порядок та відображено на діаграмі (рис. 4.8).

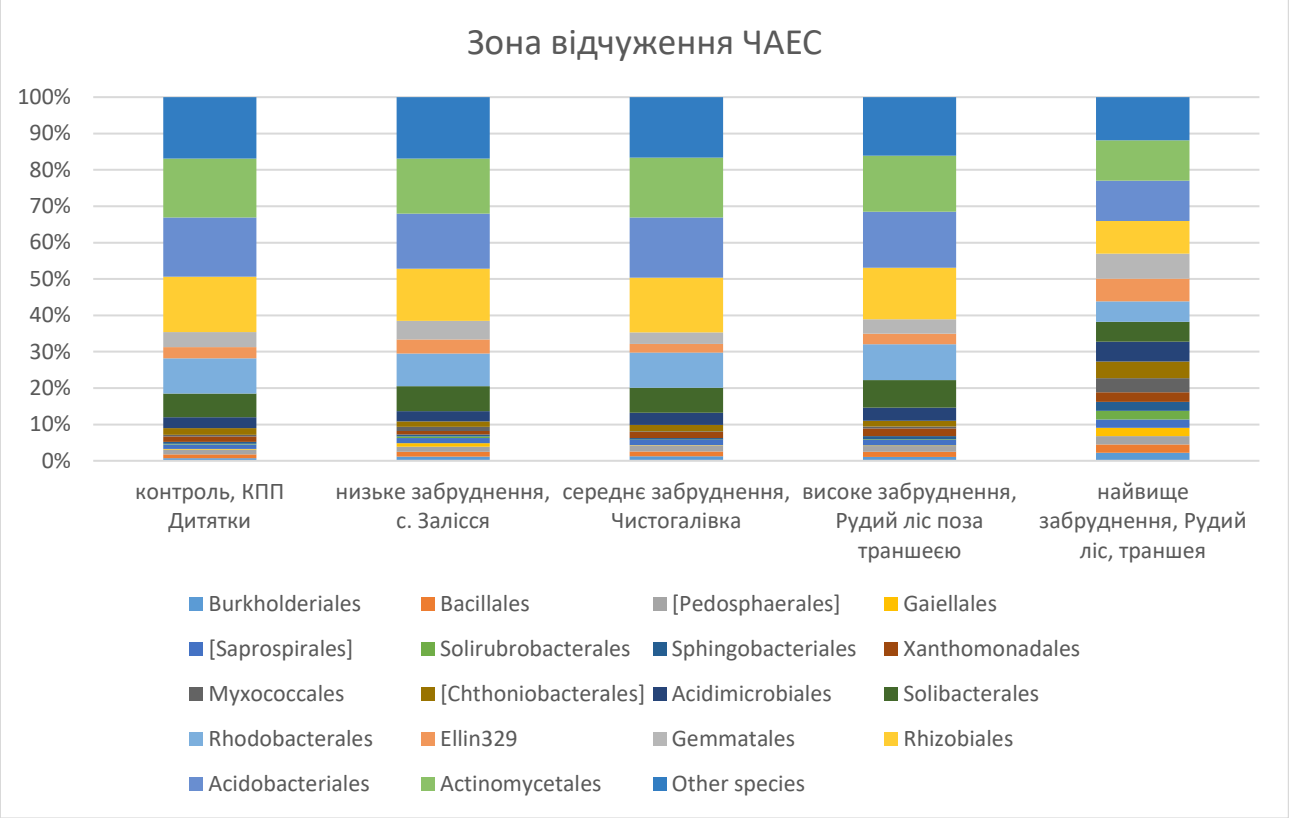


Рисунок 4.8. Біорізноманіття ґрунтової мікрофлори ґрунтів, відібраних з території зони відчуження ЧАЕС (на таксономічному рівні Порядок)

Мікробіологи намагаються класифікувати бактерії в групи, щоб зрозуміти взаємозв'язки між такими багатими та різноманітними формами життя. Для бактерій характерні морфологічні форми з різноманітними характеристиками. У минулому бактерії були класифіковані відповідно до їх фізичних характеристик, таких як форма, розмір або інші структурні особливості. У теперішній час з'явилася можливість організувати не тільки бактерії, а і майже всі живі істоти відповідно до їх подібності за рРНК. Це дає більш точне уявлення про еволюційні зв'язки між видами і вцілому бактеріальними видами [13, 40, 39, 26, 25, 27, 263, 29].

Отримані дані свідчать, що в усіх відібраних зразках, окрім тих, що були узяті з поверхні траншеї в Рудому лісі, частка Актинобактерій становить від 14 до 16 %. У зразку з високим забрудненням, відібраного біля траншеї в Рудому лісі, їх кількість становить 11 %. Згідно з опублікованими даними, Актинобактерії (*Actinobacteria*, застаріла назва – променисті грибки, або

актиноміцети – *Actinomycetes*) – грампозитивні бактерії, які характеризуються високим (більше 55 %) вмістом гуаніну і цитозину в ДНК та мають подібну грибам міцеліальну будову. Найбільша підгрупа – актиноміцети (*Actinomyceta*), далі вся інформація стосується цієї підгрупи.

Товщина міцелію актиноміцетів 0,5–1,0 мкм. При зростанні на щільних середовищах розрізняють субстратну і повітряну частини міцелію. Розмножуються вони фрагментами або спорами, що утворюються в різних видів на повітряному і/або субстратному міцелії. Спори і спороносці мають різноманітну форму. Зрідка забезпечені джгутиками і здатні до самостійного пересування.

Подібно до грибів актиноміцети здатні утворювати позаклітинні ферменти гідролази, які розкладають складні полімерні речовини (хітин, лігнін, гумусоподібні речовини). Поширені в ґрунті, мулі водоймищ, на рослинних залишках, основною екологічною роллю є розкладання органічної речовини. Є патогенні види (*Actinomyces israelii*), що спричиняють актиномікоз [66].

Актиноміцети є активними продуцентами антибіотиків та утворюють до половини відомих науці сполук, більшість з яких використовується у клінічній практиці. Актинобактерії населяють ґрунти, а також прісні і морські води. Вони грають важливу роль у розкладанні органічних речовин, таких як целюлоза і хітин, і таким чином беруть участь у кругообігу органічних речовин і вуглецевому циклі. Це поповнює запас поживних речовин у ґрунті, що важливо для формування перегною. Інші актинобактерії мешкають на рослинах і тваринах, зокрема деяких патогенних, таких як мікобактерії, стрептоміцети [350].

Другим за вмістом у ґрунтах ЧЗВє типовий порядок ґрунтових бактерій – Ацидобактерії. Їх вміст у досліджених пробах коливається в межах від 11 % для ґрунту з поверхні траншеї у Рудому лісі до 16±5 % для решти досліджених точок.

Порядок *Acidobacteriales* включає в себе ацидофільні, строго аеробні хемоорганотрофи, які формують великі капсули екзополісахаридного комплексу. Клітини цих ацидобактерій є грамнегативними, не-спороутворюючими паличками, які розмножуються поділом і перебувають у середовищі поодинці, парами або короткими ланцюгами. Рухомість клітин змінюється у різних видів. Колір колоній змінюється від білого до рожевого. Пігменти є каротиноїдними. Представники порядку зазвичай мають оксидазо-змінну і каталазо-позитивну реакцію. Сахароза є кращим субстратом росту. Члени цього порядку мають гідролітичні функції і розкладають різні полісахариди, окрім целюлози або хітину. Деякі види каталізують відновне розчинення мінералів тривалентного заліза при інкубації в мікроаеробних умовах. Мезофільний і злегка психотолерантний. Основна жирна кислота є iso-C15: 0. Клітини деяких видів містять також значну кількість 13,16-диметил октакозандиової кислоти. Зазвичай представників порядку можна знайти на кислих ґрунтах та водно-болотних угіддях, кислих мінеральних луках, там, де розпадається деревина, – саме такі характеристики мають ґрунти ЧЗВ. Вміст ДНК G + C (% основ): 51,7–60,0 [376].

Третіми за представленістю представниками мікробної спільноти є бактерії порядку *Rhizobiales*, які фіксують азот і є симбіотичними з корінням рослин. На поточний момент вважається, що цей порядок складається з 14 затверджених сімейств. Також ведуться активні дослідження щодо ідентифікації більшої кількості сімейств. Чотири сімейства – *Bradyrhizobiaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Phyllobacteriaceae* і *Rhizobiaceae* – містять щонайменше шість родів, що фіксують азот та є симбіонтами бобових рослин. Іншими важливими родами є патогени людини *Bartonella* і *Brucella*, а також *Agrobacterium* (основний мікроорганізм, що використовується для генної інженерії) [376].

Rhizobiales належить до класу *Alphaproteobacteria*, що представляє роди, пов'язані з ґрунтом і господарями рослин. *Rhizobium* охоплює найбільшу кількість видів у порядку. Таксономія в основному підтримується філогенетичними аналізами, що базуються на послідовностях 16S рРНК. Бактерії фенотипічно гетерогенні, переважно аеробні, грамнегативні та паличкоподібні. У багатьох видів представлені великими плазмідами, які містять велику частку генома, в основному включаючи гени, що беруть участь у взаємодії з конкретними господарями. Деякі члени порядку *Rhizobiales* характеризуються здатністю встановлювати симбіотичні асоціації з рослинами-господарями і розвивати процес біологічної азотфіксації. В той же час інші є патогенами рослин. Обидві характеристики можуть бути використані для прикладних цілей. Вибір ефективних штамів *Rhizobium* і *Ensifer*, призначених для інокуляції посівів, є одним з важливих завдань у сільськогосподарській мікробіології. Розглядаючи *Agrobacterium tumesfaciens*, можливість управління його природною здатністю до трансформації рослин спрямована на отримання цільових штамів і клонових векторів, що широко застосовуються у технології рекомбінантних ДНК і рослинній біотехнології. Нарешті, деякі роди родини *Rhizobiaceae* мають цікаві метаболізми, які дозволяють деградацію потенційно токсичних молекул і, таким чином, можуть застосовуватися як біомаркери або в біоремедіації [92].

Фактично представники названих трьох порядків домінують у кожному розглянутому зразку ґрунту, сумарно складаючи від 31 % (для зразка з найвищим забрудненням, Рудий ліс, траншея Т22) до 48 % (для зразка із середнім забрудненням, відібраного з с. Чистогалівка) представників. Виходячи з їхніх характеристик, можна стверджувати, що на всіх лісових територіях (зразки, відібрані з відселених сіл Чистогалівка, Залісся, Дитятки), а також на частині траншеї з нижчими значеннями експозиційної дози відбуваються збалансовані процеси гуміфікації, розкладання целюлози, азотфіксації, що

доволі характерно для кислих дерново-підзолистих ґрунтів. Водночас мікрофлора ґрунту, відібраного з поверхні траншеї, характеризується більш широким таксономічним варіюванням, що дає змогу стверджувати про відсутність клімаксної ситуації в дослідженому зразку та продовження процесів стабілізації мікробоценозу.

Істотним – від 15 до 18 % – є також вміст некласифікованих ґрунтових бактерій, тобто таких, розшифрованих сиквенсів яких досі немає в базі даних GreenGenes, та які не визначаються на селективному поживному середовищі. Зважаючи на те, що Порядок – таксономічно доволі високий рівень організації живих істот, можна очікувати наявності нових, ще досі не описаних видів мікроорганізмів саме у цьому пулі генетичної інформації. Цікаво, що найменший відсоток некласифікованих бактерій міститься у зразку, відібраному з траншеї у Рудому лісі, – що може свідчити як про більший інтерес дослідників-мікробіологів до екстремальних біомів (а отже, і більшої кількості розшифрованих сиквенсів, що містяться в базах даних), так і про збіднення нативної мікрофлори ґрунту під впливом різних чинників.

4.10.3 *Метрики біорізноманіття мікробіомів ЧЗВ*

Метрики для оцінки різноманітності всередині угруповання (альфа-різноманіття) були вже давно запропоновані та десятиліттями вдосконалені **[351, 220]**. Для NGS дослідження даних бактеріального різноманіття широко використовуються три виміри альфа-різноманіття: криві розрідження, оціночні показники багатства (часто у поєднанні з кривими розрідження, вимірюються в OTU) та показники розмаїття угруповань. Для більш повного визначення структури угруповання зазвичай проводять оцінку всіх трьох метрик, однак слід зазначити, що велика кількість послідовностей 16s ампліконів може бути поганим показником відносної кількості бактерій **[55]**. Оцінки в межах структури та загального біорізноманіття угруповання, які покладаються на

частоту детектування відповідної послідовності 16s амплікона, слід інтерпретувати з обережністю. Нещодавно був розроблений спосіб обліку копії генів 16s апліконів при оцінці вмісту бактерій **[55]**, що може допомогти підвищити точність вимірювань бактеріальної різноманітності на основі 16s-ампліконів.

Оцінки багатства видів оцінюють загальну кількість видів, присутніх в угрупованні. Зазвичай використовується індекс Chao1, і він базується на кількості рідкісних класів (тобто OTU), знайденої у зразку **[96]**:

$$S_{est} = S_{obs} + \left(\frac{(f_1)^2}{2f_2}\right),$$

де S_{est} – приблизна кількість видів, S_{obs} – кількість спостережуваних видів, f_1 – кількість одиночних таксонів (таксони, представлені єдиним рідом у цьому співтоваристві), а f_2 – кількість таксонів з подвійними точками. Якщо зразок містить багато рідів, то, ймовірно, існує більше невиявлених OTU, а індекс Chao1 буде оцінювати більший видовий вміст, ніж для зразка без рідкісних OTU. Окрім метрики Chao1, QIIME включає в себе ще кілька інших оціночних видів багатства й загорнуту версію CatchAll, яка розраховує 12 різних оцінок і пропонує найкращу оцінку видового багатства (в запропонованій роботі авторами було обрано метрики PD_whole_tree, індекс Шеннона, індекс Сімпсона, індекс домінування) разом з кількома іншими оцінками видового багатства.

Криві розрідження використовуються для визначення того, чи достатня глибина вибірки для точної оцінки бактеріального угруповання, що вивчається. Щоб побудувати криві розрідження, кожне угруповання випадково підсилюється без заміни з різними інтервалами, і середня кількість OTU на кожному інтервалі складається з величини підпробу **[145]**. Точка, в якій число OTU не збільшується, з подальшим відбором проб є точкою, в якій було

зроблено достатньо зразків, щоб точно характеризувати угруповання. QIIME обчислює криві розрідження для спостережуваного та оціночного багатства видів. QIIME буде додатково створювати графіки кривих розрідження, тоді як mothur виводить результати, які можна імпортувати в графічне програмне забезпечення.

Індекси біорізноманіття угруповань поєднують видове багатство та частоту зустрічань у єдине значення рівномірності. Угруповання, в яких чисельно переважає один чи декілька видів, демонструють низьку рівномірність, тоді як громади, де велика кількість розподіляється однаково серед видів, що мають високу рівномірність. Два з найширше використовуваних критеріїв – показник Шеннона **[302]** та індекс Сімпсона **[306]**.

Непараметричні методи оцінки біорізноманіття є найбільш перспективними для мікробних досліджень. Ці показники адаптовані для оцінки величини популяцій тварин. Непараметричні оцінки на основі методів математичної статистики враховують частку видів, які спостерігалися раніше (були обраховані в зразку раніше) по відношенню до тих, що спостерігаються лише один раз. В угрупованні з великими показниками різноманітності імовірність того, що вид спостерігатиметься більш ніж раз, буде низькою, і більшість видів буде представлено лише одним з них у вибірці. В угрупованні, що розвивається, ймовірність того, що вид спостерігатиметься більше одного разу, буде вища, і багато видів будуть спостерігатися кілька разів у зразку.

Оцінка Chao1 використовує це співвідношення для оцінювання багатства шляхом додавання корекційного коефіцієнта до кількості спостережуваних видів Наприклад, Chao1 оцінює загальне видове багатство, як

$$S_{\mathrm{Chao1}} = S_{\mathrm{obs}} + \frac{n_1^2}{2n_2}$$

де S_{obs} – кількість спостережуваних видів, n_1 – кількість одиниць, а n_2 – кількість дублікатів (видів, зафіксованих двічі) [96]. Chao зазначив, що цей індекс особливо корисний для наборів даних, складно організованих у класах низького достатку, як це, імовірно, стосується мікробів.

Непараметрична метрика PD_whole_tree – загальна довжина гілок філогенетичного дерева. Показник, що вказує на еволюційну подібність представників мікробіому.

Індекс різноманітності Сімпсона – це міра різноманітності. В екології він часто використовується для кількісного визначення біорізноманіття середовища існування. Він враховує кількість присутніх видів, а також велику кількість кожного виду.

Індекс Сімпсона (D) вимірює ймовірність того, що дві особини, обрані випадковим чином з вибірки, належать до того ж виду (або певної категорії, крім виду). За допомогою цього індексу 0 позначає нескінченну різноманітність і 1 – без різноманіття. Тобто що більша цінність D, то менша різноманітність.

Отже, згідно з отриманими метриками (табл. 4.8, рис. 4.9), зразком з найбільшим біорізноманіттям виявився ґрунт, відібраний з точки з найвищим забрудненням, з поверхні траншеї у Рудому лісі, з найнижчим індексом домінування, що є закономірним, адже екосистема тут усе ще нестабільна і знаходиться в процесі формування. Найменший індекс Chao1 і, відповідно, найбільший індекс домінування має ґрунт, відібраний також у Рудому лісі, але на території з високим забрудненням, поза траншеєю. Водночас довжина філогенетичних гілок (PD_whole_tree) тут найменша, що свідчить про близьку таксономічну спорідненість бактерій у зразку. Отже, можна зробити висновок про домінування певного процесу у ґрунті, що розташований поза траншеєю. Порівнюючи обидва зразки, відібрані з території Рудого лісу, можна спекулювати щодо наявності процесів формування екосистеми, що на них впливають високі експозиційні дози. Так, можна сказати, що поза межами

траншеї було сформовано екосистему і ґрунтова мікрофлора певним чином стабілізувала колообіг та метаболізм органічних речовин, у той час як ґрунти, відібрані з території траншеї, досі не змогли стабілізувати ці процеси. Отримані нами дані підтверджують роботу французьких дослідників щодо дослідження біорізноманіття шляхом 454 секвенування зразків, відібраних з поверхні та глибини траншеї Т22 [326, 97].

Таблиця 4.8. Основні показники альфа-різноманіття ґрунтів ЧЗВ

Місце відбору зразків	**Chao1**	**PD_whole_tree**	**Shannon**	**Simpson**	**Dominance**
Контроль, КПП «Дитятки»	3512,521	96,994	8,292	0,992	0,008
Низьке забруднення, с. Залісся	4446,854	121,450	8,875	0,994	0,006
Середнє забруднення, с. Чистогалівка	2795,952	79,261	7,923	0,989	0,011
Високе забруднення, Рудий ліс, поза траншеєю Т22	2448,286	72,493	6,967	0,960	0,040
Найвище забруднення, Рудий ліс, траншея Т22	6982,610	176,906	9,812	0,995	0,005

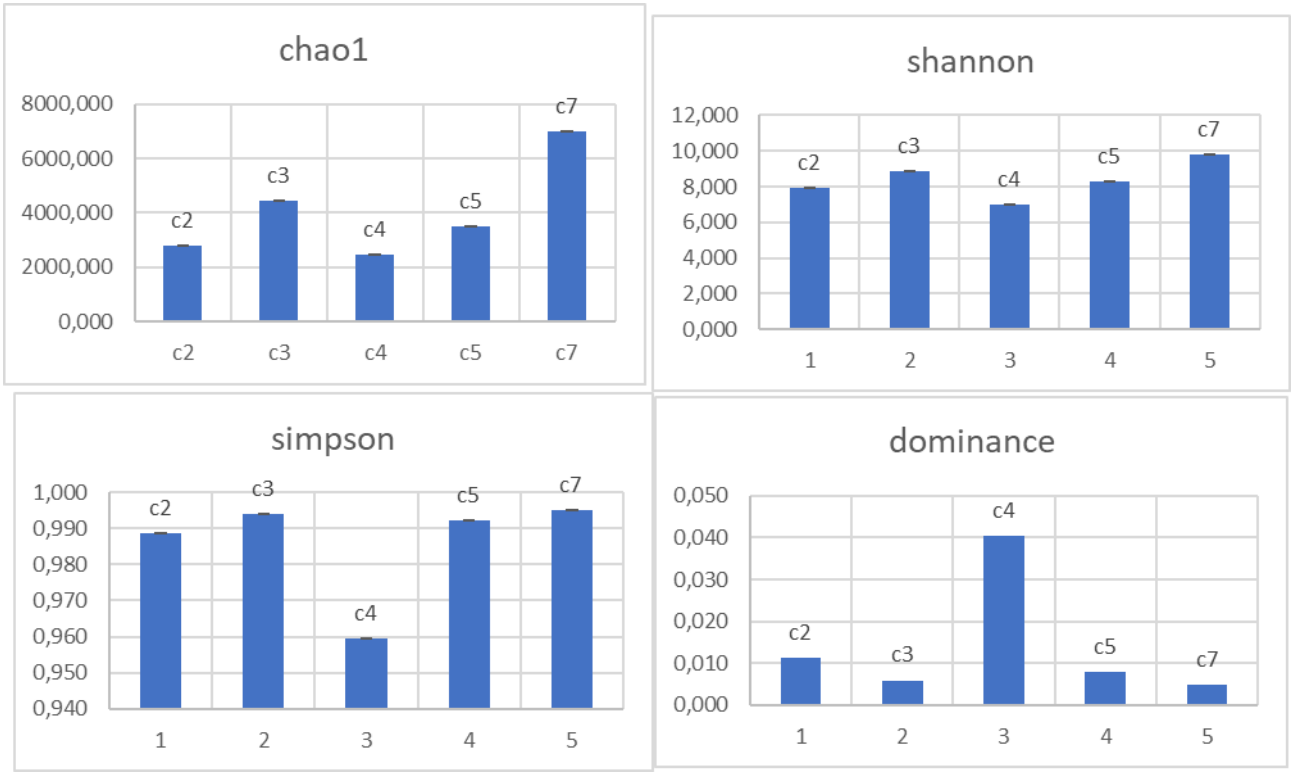


Рисунок 4.9. Показники альфа-різноманіття ґрунтів ЧЗВ. С3 – Залісся, 30-кілометрова зона; С5 – «Дитятки», КПП на виїзді із ЗВ, ліс; С7 – Рудий ліс, траншея Т22; С4 – Рудий ліс, поза траншеєю Т22; С2 – Чистогалівка, 10-кілометрова зона, ліс

Важливо провести загальне порівняння рівня мікробного різноманіття проб ґрунту не тільки між собою, а з ґрунтами поза межами ЧЗВ. Так, за показниками індексу Сімпсона (Simpson), можна стверджувати про загальну вирівняність цього вибірки: так для лучних ґрунтів він коливається в межах 0,7–0,8 [370, 312], для неконтамінованих лісових ґрунтів – 0,85–0,9 [120, 123]. Це свідчить про загальну вирівняність показників біорізноманіття у ЧЗВ, а також відсутність критичного впливу радіонуклідного забруднення або зняття антропогенного навантаження на таксономію ґрунтових бактерій. З іншого боку, можна стверджувати про неймовірну буферність і стабільність мікробного ценозу, а також його спроможність виробляти адекватні відповіді на будь-які забруднення.

4.10.4 *Бета-різноманіття мікробіомів ЧЗВ*

Бета-різноманіття (англ. beta-diversity) – показник, що вимірює ступінь диференційованості розподілу видів по градієнтах місць існування, тобто швидкість зміни таксономічної композиції спільноти уздовж просторових і екологічних градієнтів ландшафту. Подібно до альфа-різноманіття, бета-різноманіття зростає зі збільшенням часу еволюції за рахунок того ж процесу «упаковки» гіпероб'ємів популяцій, у гіперпросторі місць існування, тобто сукупності екологічних факторів ландшафту.

Що вище бета-різноманіття, то більше синтаксономічних одиниць можна виділити при класифікації рослинності досліджуваного ландшафту. Найбільш простою мірою для оцінки бета-різноманіття є відношення числа видів у всіх біоценозах до числа видів у середньому на один біоценоз. Бета-різноманіття може бути виміряне через число встановлених асоціацій одного рангу. Можливе використання і більш складних прийомів [134].

Для аналізу бета-різноманіття використовували метод аналізу основних координат (PCoA, = багатовимірне масштабування) – це метод для вивчення та візуалізації подібностей або невідповідностей даних [232, 133]. Він базується на побудові з матриці подібності або матриці відмінності (= матриця відстані) і призначає для кожного пункту розташування в маломірному просторі, наприклад як 3D-графік.

PCoA намагається знайти основні осі шляхом побудови матриці. Це свого роду аналіз, побудований на координатах, сформованих на базі наявних даних (іноді називають «розкладанням однозначного значення»), і обчислює серію власних значень та власних векторів. Кожне власне значення має власний вектор, і є стільки власних векторів та власних значень, скільки є рядків у початковій матриці.

Властивості зазвичай оцінюються від найвищого до найменшого. Перше власне значення часто називають «домінантним» або «провідним» власним

значенням. Використовуючи власні вектори, ми можемо візуалізувати основні осі через початкову матрицю відстані. Власні значення також часто називаються «прихованими значеннями».

Використовуючи PCoA, ми можемо візуалізувати окремі та / або групові відмінності. Індивідуальні відмінності можуть бути використані для демонстрації викидів. Цей метод – це набір методів аналізу даних, який показує структуру комплексних даних про відстань (матриця відмінності) у високорозмірному просторі без втрати інформації. Метою PCoA є правильно представити ці відстані у найкращій можливій просторовій розмірності. Графіки PCoA є тривимірними. Для коректного відображення отриманих даних відображено всі три згенеровані проекції.

Для побудови метрики основних координат з метою аналізу бета-різноманіття для мікробіомів ґрунтів, відібраних із ЧЗВ, були обрані такі координати: PC2 – радіонуклідне забруднення зразка, PC1 – таксономічна відстань всередині зразка та PC3 – кількість OTU в кожному зі зразків (рис. 4.10). Так, з отриманих даних видно, що зразки відібрані на території Рудого лісу, території, найбільш забрудненої радіонуклідами, вони знаходяться в одній площині, хоча і на порівняно великій відносній відстані одне від одного. Тут також видно, що ґрунти, відібрані з території траншеї у Рудому лісі, мають найбільше видове багатство і найбільшу філогенетичну відстань між представниками мікробіому.

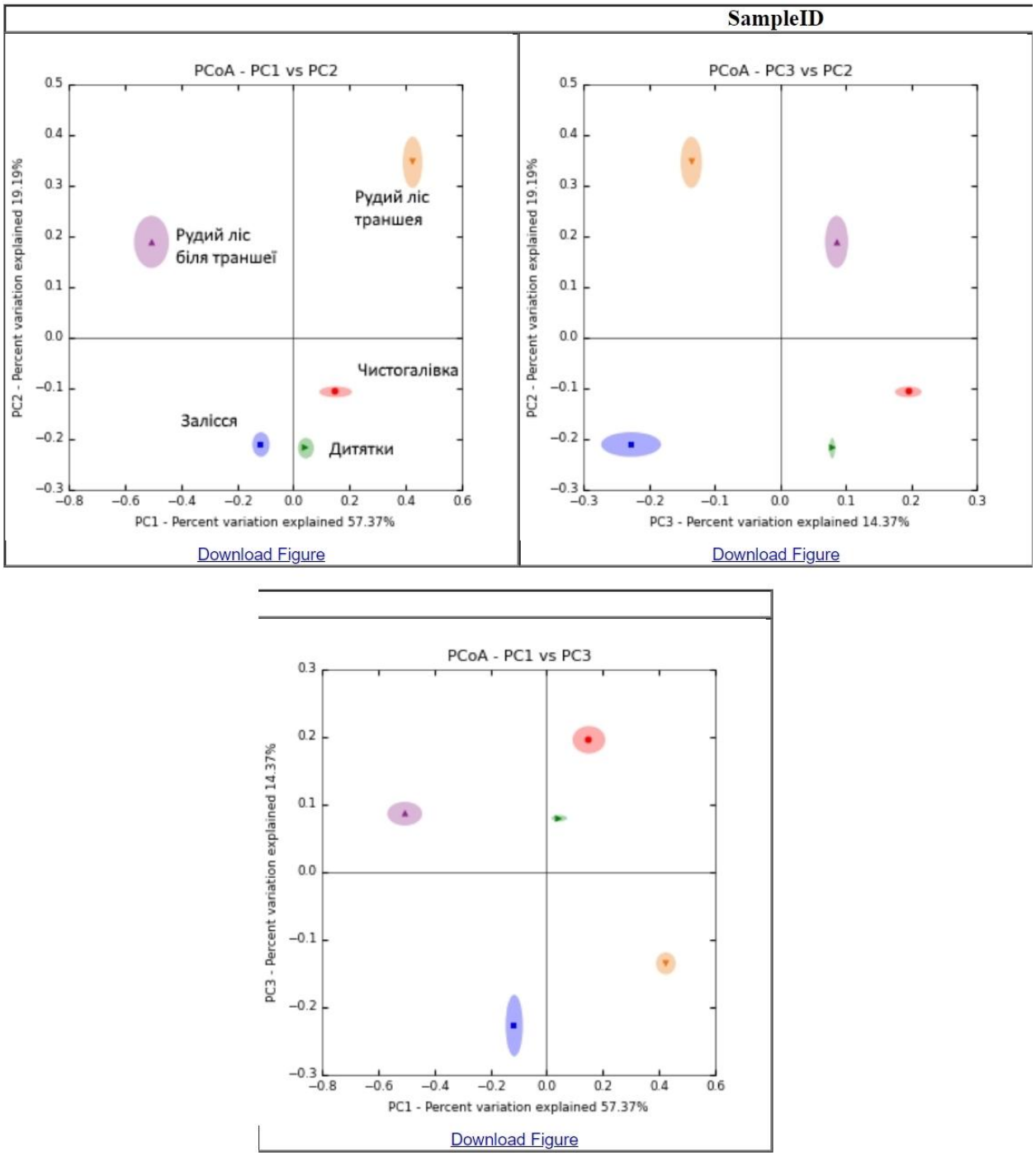


Рисунок 4.10. Матриця PCoA, сформована для мікробіомів ґрунтів, відібраних із ЧЗВ

З отриманих даних можна зробити висновок, що радіонуклідне забруднення у дозах, сформованих після аварії на ЧАЕС, не має істотного впливу на загальну структуру мікробіому ґрунту – хоча для уточнення деталей щодо структури і функціонального стану мікробіому потрібні подальші дослідження. В той же час існує низка факторів, які пов’язані з аварією на АЕС і можуть безпосередньо впливати на мікробіом [13, 40, 39, 26, 25, 27, 263].

Натомість, очевидною видається інша тенденція: мікробіоми Рудого лісу суттєво відрізняються від мікробіомів зразків, відібраних на територіях, що не були піддані антропогенним змінам. Рудий ліс – близько 10 км² території дерев, прилеглих до Чорнобильської АЕС, які взяли на себе найбільшу частку викиду радіоактивного пилу під час вибуху реактора в 1986 році. Висока доза поглинутої радіації призвела до загибелі дерев (переважно сосен) і забарвлення їх у буро-червоний колір. Рівні поглинутих доз (за розрахунками вчених) за зовнішнім гамма-опроміненням у 1986–1987 роках склали 8000–10 000 рад за максимальної потужності експозиційної дози 500 мР/год і більше. Площа цієї зони складає близько 4,5 тисячі га. У цій зоні надземні органи сосни загинули повністю, а хвоя набула кольору цегли. Весь ліс практично «згорів», акумулювавши на собі значні обсяги радіоактивних викидів. Сильна забрудненість мертвої деревини радіоактивними речовинами зумовила необхідність його подальшого захоронення. Під час робіт з дезактивації території ліс разом з поверхневим шаром ґрунту було знесено бульдозерами і поховано у траншеях на глибині 1,5–2 м, які були укриті шаром піску потужністю до 1 м. Для запобігання вітровій ерозії на території ділянки Рудий ліс було виконано першочергові заходи з відновлення лісу. На площі 500 га цієї території ліси відновлюються [30]. Водночас важко вважати процес формування екосистеми тут завершеним – наявність великої кількості відмерлої органічної речовини зумовлює переважання процесів деструкції і перерозподілу поживних речовин над процесами асиміляції рослинами. Таким чином, висновок щодо різниці у таксономічному та функціональному складі ґрунтових мікроорганізмів на досліджуваних територіях є закономірним – але питання щодо факторів, залучених у формування такої різниці, залишається відкритим.

4.11 Вплив факторів навколишнього середовища на мікробні спільноти ґрунтів, відібраних з територій ЧЗВ

Оцінка впливу радіонуклідного забруднення на мікроорганізми ґрунту видається неможливою без одночасної оцінки впливу решти факторів навколишнього середовища. Так, з огляду на викладені вище висновки щодо відсутності прямого зв'язку між дозами, сформованими поставарійними випадіннями радіонуклідів та таксономічним різноманіттям мікрофлори, необхідним є інтегральний аналіз впливу факторів навколишнього середовища на цей показник.

Екологічна статистика пропонує низку мультифакторних статистичних аналізів, що дають змогу дослідити подібні питання [262].

Для оцінки впливу метаданих та радіонуклідного забруднення було обрано наступну матрицю. З наявних метаданих шляхом простого кореляційного аналізу відібрано лише ті, що показали тенденцію до впливу на таксономічну структуру зразків. Для диференціації типу екосистем введено якісний показник типу екосистеми, де біоценози Рудого лісу вважалися антропогенно зміненими, в той час як решта ґрунтів – природними.

Таблиця 4.9. Матриця змінних для проведення мультифакторних аналізів

№ з/п	Фактор	Тип змінної	Клас змінної	Кількість рядків	Кількість стовпців
1	OTU, представники порядку	залежна	кількісна	5	18
2	Потужність поглинутої дози, мкГр/год	незалежна	кількісна	5	1
3	Вологість ґрунту, %	незалежна	кількісна	5	1
4	Вміст NH_4	незалежна	кількісна	5	1
5	Вміст гумусу	незалежна	кількісна	5	1
6	Тип екосистеми (ліс / антропогенно змінена траншея)	незалежна	якісна	5	1

В метагеномних дослідженнях вважається доцільним використовувати ординаційні методи для аналізу впливу зовнішніх компонентів екосистеми на

структуру популяції – такі методи можуть бути як однофакторними (PCoA, PCA та ін.), так і багатофакторними. Найбільш доцільним вважається [230] використання таких аналізів, як канонічний аналіз відповідності (canonical correspondence analysys, CoCA) та аналіз надлишковості (redundancy analysys, RDA).

Методи ординації – це група мультифакторних статистичних підходів, які намагаються упорядкувати об̣єкти на основі значень змінних, виміряних для цих об'єктів [262]. Ординаційні методи також часто називаються градієнтними методами, оскільки ці алгоритми демонструють основні градієнти варіації в багатовимірному просторі даних, а потім розміщують об'єкти в новій системі координат за кожним градієнтом, що візуалізується як вісі. Таким чином, велика матриця даних може бути відображена всього у 2 або 3 вимірах з відносним розташуванням об'єктів, що представляють відносини між змінними, виміряними в цих об'єктах. Це зменшення розмірності в поєднанні з простою інтерпретацією візуального розподілу об'єктів на рисунку (близькі об'єкти мають подібні значення змінних, віддалені об'єкти – різні) роблять ординаційні методи популярним вибором в екологічних дослідженнях.

Канонічний аналіз відповідності (CCA) є одним з багатьох методів, які дозволяють вивчити взаємозв'язок між двома наборами змінних. Цей метод широко використовують в екології, але він витісняється RDA (аналіз резервування). Фактично CCA був першим типом аналізу, що застосували у популяційній екології для демонстрації складних взаємозв'язків між біологічними та геохімічними показниками в екосистемі [262]. Основними вимогами для отримання валідних результатів CCA є незалежність та випадковість аналізованих змінних. Крім того, дані мають бути поділені на категорії, а незалежні змінні відібрані в межах сайту вибірки та не містити «missing data» – пустих клітинок. Саме остання вимога і унеможливлює валідний аналіз отриманих нами даних за методом CCA – адже у відібраних у

ЧЗВзразках не всі таксони представлено у кожному зразку. Аналіз же надлишковості є, фактично, ще одним різновидом мультифакторного статистичного аналізу, але з можливістю ігнорувати пропущені дані.

Аналіз надлишковості (RDA) був розроблений [356] як альтернатива канонічному кореляційному аналізу (CCA). RDA дозволяє вивчати взаємозв'язок між двома таблицями змінних *Y* і *X*. У RDA, на відміну від CCA, змінна *X* не має повністю корелювати зі змінними з таблиці *Y*. Також RDA дозволяє працювати з пустими клітинками у таблиці змінних *X*, що уможливлює отримання валідних аналізів для метагеномних даних.

Принципи RDA. Таблиця метаданих *Y* містить незалежні змінні з *n* (у випадку ЧЗВ– 5) спостереженнями та *p* (5) змінними (див. табл. 4.7). Ця таблиця може бути оцінена за допомогою аналізу основних компонентів рис. 4.11 для отримання одночасної карти спостережень і змінних у двох або трьох вимірах.

Таблиця *X* містить значення змінної, отримані для тих самих *n* спостережень з *q* кількісними та / або якісними змінними.

Аналіз надлишковості дозволяє отримати одночасне представлення спостережень змінних *Y* і *X* у двох або трьох вимірах, що є оптимальним для критерію коваріації.

Аналіз надлишковості можна розділити на дві частини: кількісний аналіз у просторі, число розмірностей якого дорівнює min ($n-1$, p, q). Ця частина є основною, оскільки вона відповідає аналізу відношення між двома таблицями; якісний аналіз, що відповідає аналізу залишків. Кількість розмірів для якісного RDA дорівнює min ($n-1$, p) [80, 377].

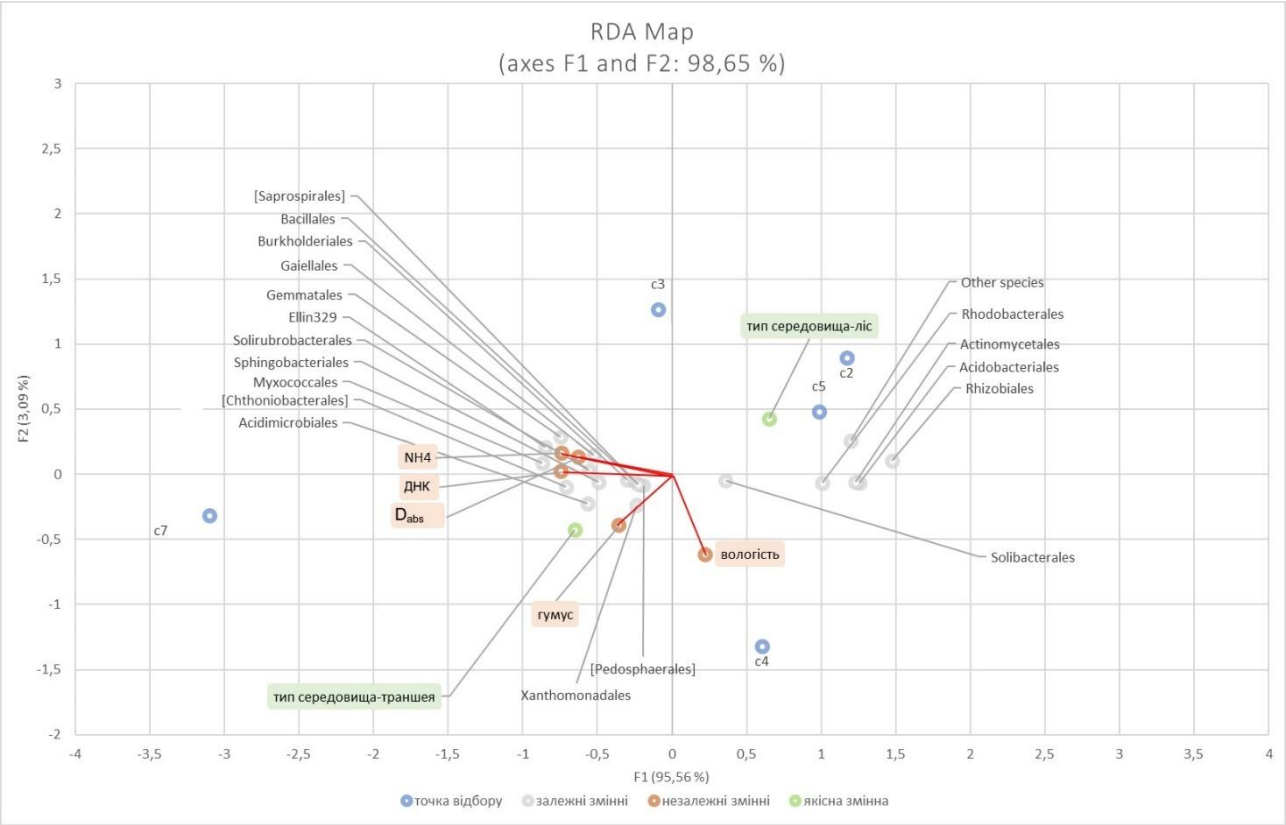


Рисунок 4.11 Матриця аналізу надлишковості для мікробіомів ЧЗВ, зорганізованих на рівні Порядок (достовірно при $p = 0,05$).). С2 – середнє забруднення, с. Чистогалівка; С3 – низьке забруднення, с. Залісся; С4 – високе забруднення, Т22; С5 – КПП «Дитятки», контроль; С7 – найвище забруднення, Рудий ліс, траншея Т22

Відстань між точкою відбору та представниками порядку на тривимірному графіку свідчить про чисельність представника даного порядку на цій ділянці, отже, чисельність представників порядку є максимальною, якщо точка відбору проби збігається з точкою порядку [262]. Відповідно, що далі точка представника порядку від точки відбору проби – то менше вірогідність знайти його на цій території. Таким чином, ми можемо зробити висновок, що представники порядків *Ellin329*, *Myxococciales*, *Gemmatailes* та *Xantomonadales* є доволі типовими для Рудого лісу, в той час як *Solibactereales Rhodobacteriales* більш характерні для Залісся, а *Rhizobiales*, *Acidobacteriales* та *Actinomycetales* – для Чистогалівки та Залісся.

Інтерпретацію кількісних екологічних змінних можна підсумувати так: «стрілка в напрямку максимальної зміни значення асоційованої змінної, а

довжина стрілки пропорційна максимальному рівню зміни змінної» [80, 262]. Таким чином, змінні «потужність дози (D_{abs})», «гумус», «вологість», «NH4», позначають рівень впливу факторів навколишнього середовища на кількість представників певного порядку, що узгоджується з напрямком стрілки. Виходячи з отриманих даних видно, що на кількість представників певних порядків майже в рівній мірі впливає вміст азоту та потужність поглинутої дози, що узгоджується з даними наших попередніх досліджень [29].

Відносне розташування якісної змінної «тип екосистеми» позначає розташування кожної точки відбору проб в антропогенно зміненій (Рудий ліс, С4 та С7) або нативній (Залісся, Дитятки, Чистогалівка, С2, С3, С5) і точок представників порядку вказує на розташування видів на цих точках. Так видно, що найбільше видове багатство характерне для антропогенно змінених екосистем Рудого лісу, що підтверджує гіпотезу про незавершені процеси формування екосистеми тут. Також можна стверджувати, що ця якісна змінна, а саме наявність / відсутність істотного людського втручання, є визначною для стуктури проаналізованих мікробоценозів, відібраних з території ЧЗВ.

Висновки до розділу 4

Резюме. Наведено характеристику бактеріального різноманіття забруднених радіонуклідами дерново-підзолистих ґрунтів Українського Полісся. Показники альфа- та бета-різноманіття свідчать про клімаксність та значну буферність ґрунтів у проаналізованих екосистемах та стабільність їх ґрунтової мікрофлори, що свідчить про збалансованість джерел живлення мікроорганізмів. Підібрано сучасні ординаційні мультифакторні статистичні підходи, що дозволяють комплексно проаналізувати вплив сукупності метаданих на структуру мікробних угруповань радіоактивно забруднених ґрунтів. Згідно з представленими у цій роботі розрахунками, прямої залежності доза–ефект для ґрунтів ЧЗВне існує, в той час як показано статистично значущу

сукупну залежність видового багатства від вмісту доступних форм азоту та потужності поглинутої дози.

1. Проведено оцінку радіонуклідного забруднення територій з різним рівнем впливу, включаючи контрольну точку (КПП «Дитятки»), території середнього забруднення (с. Чистогалівка), та ділянки Рудого лісу (з найвищим забрудненням). Встановлено, що основними радіонуклідами є ^{137}Cs, який має більшу мобільність у ґрунтових профілях у вигляді конденсаційних випадінь. Найвищий рівень забруднення зафіксовано у траншеї Т22 Рудого лісу, що спричиняє потужність поглинутої дози для мікроорганізмів до 34,9 μГр/год, що є вищим за консервативний показник FREDERICA у 10 μГр/год.

2. . Фізико-хімічні показники ґрунтів і їх вплив на мікробіоми. Всі досліджувані точки характеризуються кислим середовищем (pH 3,2–4,5), типовим для дерново-підзолистих ґрунтів Полісся. Вміст гумусу, азоту, фосфору і калію варіює залежно від ступеня забруднення. Ґрунти з Рудого лісу демонструють підвищений вміст гумусу (1,98–2,52%), що корелює зі збільшенням біомаси мікроорганізмів. Ці відмінності є критичними для розвитку мікробних угруповань у забруднених зонах.

3. Біорізноманіття мікробіомів зони відчуження. Виявлено, що рівень бактеріального різноманіття ґрунтів ЧЗВ перевищує аналогічні показники для об’єкта «Укриття». Зокрема, у Рудому лісі (траншея Т22) ідентифіковано 5297 окремих таксономічних одиниць, що є значно вищим порівняно з іншими ділянками. Проте видова ідентифікація була менш ефективною (30% бактерій залишаються невизначеними), що свідчить про потенціал для відкриття нових видів. Рівновага та відсутність явних домінантів у мікробіомі свідчить про буферність та стабільність мікробного ценозу ґрунтів ЧЗВ, а також про його здатність виробляти адекватну реакцію на будь-яке забруднення, включаючи радіонукліди.

4.

5. Вплив поглинутої дози на склад мікробіомів. Аналіз надлишковості показав чітку залежність видового складу мікробіому ґрунту від вмісту амонійного азоту та потужності поглинутої дози, обумовленої радіонуклідним забрудненням. Найвищий рівень радіонуклідного забруднення, зафіксований у траншеї Т22 Рудого лісу, корелює з найбільшою кількістю таксономічних одиниць (5297 OTU). Це свідчить про здатність мікроорганізмів адаптуватися до екстремальних умов через розвиток стійкості до іонізуючого випромінювання та активацію репараційних процесів ДНК. Висока концентрація амонійного азоту у зразках із найбільш забруднених ділянок також відіграє ключову роль, забезпечуючи мікроорганізми необхідними поживними речовинами для підтримання метаболічної активності в умовах стресу. У менш забруднених зонах (Чистогалівка, Залісся) спостерігається зниження видового різноманіття (2059–3307 OTU), що вказує на менший екологічний тиск. У контрольних зразках із найнижчим рівнем радіонуклідного забруднення (2610 OTU) видовий склад залишається обмеженим, що свідчить про відсутність стимулюючого впливу стресових факторів. Таким чином, результати підтверджують, що радіонуклідне забруднення та доступність амонійного азоту суттєво впливають на структуру і функції мікробних угруповань. Виявлені залежності підкреслюють важливість подальших комплексних досліджень у галузі радіаційної мікробіології для розкриття адаптаційних механізмів мікроорганізмів і оцінки їх екологічного потенціалу в умовах радіонуклідного забруднення.

Результати експериментальних досліджень цього розділу наведено в таких публікаціях:

[25] Паренюк, О. Ю., Іллєнко, В. В., Гудков, І. М. Мікрофлора забруднених радіонуклідами ґрунтів. Монографія: Київ: НУБіП України, 2018. 210 с.

[25]Паренюк, О. Ю., Мошинець, О. В., Титова, Л. В., et. al. Qualitative composition of dominating forms of microorganisms isolated from radionuclide contaminated soil and their ability to accumulate ^{137}Cs. *Мікробіологічний журнал*. 2013. Т. 75, No. 1. С. 33–40.

[25]Boretska, M., Datsenko, I., Suslova, O. Pareniuk, O., et. al. Amino Acid Composition of Tightly Bound Exopolymeric Substances Produced by Corrosion-Related Bacteria in Presence of Mild Steel. *Advances in Microbiology*. 2014. Vol. 04, No. 12. P. 808–815.

[27] Паренюк, О. Ю., Шаванова, Е. Е., Ильенко, В. В., и др. Влияние почвенной микрофлоры на переход ^{137}Cs в растения. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2015. Т. 55, No. 1.

[263] Pareniuk, O., Shavanova, K., Laceby, J. P., et. al. Modification of ^{137}Cs transfer to rape (Brassica napus L.) phytomass under the influence of soil microorganisms. Journal of Environmental Radioactivity. 2015. Vol. 149. P. 73–80.

[26] Паренюк, О. Ю., Сімутін, І. О., Самофалова, Д. О. Визначення основних метрик різноманіття мікробіомів забруднених радіонуклідами ґрунтів. *Біоресурси і природокористування*. 2018. Т. 10, No. 5–6.

[39] Рубан, Ю. В., Шаванова, К. Є., Іллєнко, В. В. Паренюк О.Ю., та ін. PLFA аналіз структури мікробної спільноти на пунктах тимчасової локалізації радіоактивних відходів зони відчуження ЧАЕС. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2020. Т. 26. С. 149–153.

[17] Корепанова, К. Д., Шаванова, К. Є., Іллєнко, В. В. Паренюк О.Ю., та ін. Розрахунок дозових навантажень на мікрофлору ґрунту, сформованих на пунктах зберігання радіоактивних відходів на території зони відчуження ЧАЕС. *Екологічні науки*. 2020. Т. 32. С. 164–168.

[13] Іллєнко, В. В., Шаванова, К. Є., Рубан, Ю. В. Паренюк О.Ю., та ін. Надходження ^{137}Cs у рослини зернових культур за впливу комплексних бактеріальних препаратів. *Вісник ХНУ імені В. Н. Каразіна серія «Екологія».* 2020. Т. 23. С. 139–149.

[40] Рубан, Ю. В., Шаванова, К. Є., Самофалова, Д. О. Паренюк О.Ю., та ін. Порівняння мікробіомів двох різних екотипів Чорнобильської зони відчуження: пунктів тимчасової локалізації радіоактивних відходів (ПТЛРВ) та забруднених екосистем. *Вісник проблем біології та медицини*. 2020. Т. 157, No. 3. С. 83–88.

[279] Pareniuk O. Chornobyl exclusion zone: current status and challenges / O. Pareniuk, N. Yasuda // https://doi.org/10.1177/01466453211028032. – 2021.

5 ВИДОВИЙ СКЛАД МІКРООРГАНІЗМІВ НА ЗАБРУДНЕНИХ РАДІОНУКЛІДАМИ ЗОН, ЯКІ ВАЖКО ПОВЕРНУТИ У ГОСПОДАРЮВАННЯ АЕС ФУКУСІМА

5.1 Основні агрохімічні характеристики зон, які важко повернути у господарювання АЕС Фукусіма

Ґрунти на території ЗВП ФАЕС належать до бурих лісових ґрунтів. Локації відбору проб, що містяться на території зони евакуації, були обрані на території з максимально подібними ґрунтовими умовами (рис. 1.2), але різною щільністю радіонуклідного забруднення (рис. 5.1), що дало змогу виділити максимально подібні за ґрунтовими умовами біогеоценози.

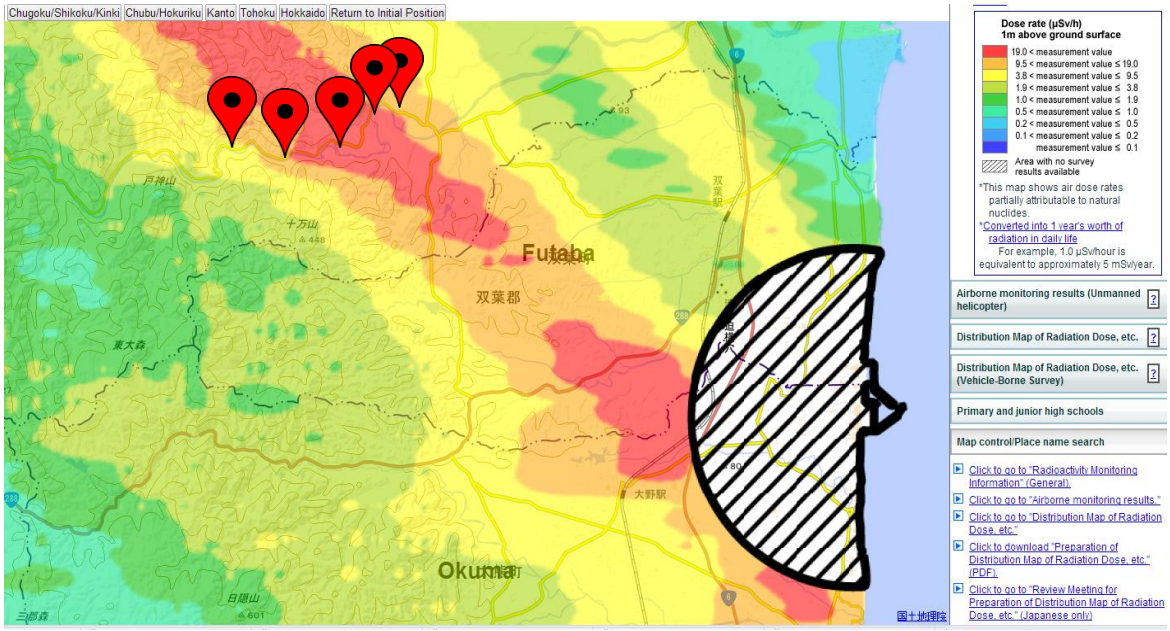


Рисунок 5.1. Локації відбору проб ґрунту, нанесені на карту забруднення ^{137}Cs зони ЗВП ФАЕС. *Джерело карти*: MEXT

Відбір проб розпочинали у червні 2014 року. Місце відбору проб та радіонуклідне забруднення попередньо оцінили згідно з даними аеральної розвідки MEXT [323] від травня 2014 року (рис. 5.1). Для підбору якнайбільш подібних ґрунтових умов з метою забезпечення найменшої варіації у вмісті основних поживних речовин, з кожної локації було відібрано по 5 проб ґрунту і

проведено агрохімічний аналіз. Після отримання результатів аналізу вмісту загального азоту, фосфору та калію було підібрано 2 точки відбору проб, що задовольняли вимогам однорідності метаданих та різнорідності забруднення за ^{137}Cs: точки H3 (високе попередньо оцінене забруднення, 3 точка відбору) та M3 (середнє забруднення, 3 точка відбору). Решта підібраних локацій не відповідала умовам уніфікованості.

У липні 2014-го, згідно з уточненими даними, було проведено другий відбір проб, протягом якого отримано зразки з точок H3 та M3, а також з нових точок J2, J3, J5 та J7. Отримані зразки ґрунту передано для аналізу агрохімічних показників та виділення тотальної ДНК. Пробам присвоєно ідентифікатор S – Summer.

Наступні відбори проб проводились, відповідно, у жовтні 2014 року (F – Fall), лютому 2015 року (W – Winter) та квітні 2015 року (V – Spring).

Під час відбору зразків вимірювали температуру повітря та температуру ґрунту, по льоду перевозили до лабораторії, де вимірювали вологість, PH, вміст загального азоту, вуглецю та водню (табл. 5.1).

Таблиця 5.1. Основні агрохімічні показники ґрунтів, які відібрані з дослідних ділянок ЗВП ФАЕС

Код зразка	**Дата**	**Вологість ґрунту, %**	**pH**	**N, мг/100г**	**C, мг/100г**	**H, мг/100г**	**Температура ґрунту, ˚C**
контроль, липень	30.07.2014	20±2	5,4±0,2	0,71±0,1	12,3±1,5	1,9±0,2	20,7±0,1
SJ3 низька доза, липень	30.07.2014	22±2	4,7±0,2	0,87±0,1	15,3±1,2	2,4±0,3	20,3±0,1
SM3 низька доза, липень	30.07.2014	25±4	6,4±0,3	0,82±0,1	20,8±2,3	2,7±0,7	19,3±0,1
SJ5 середня доза, липень	30.07.2014	16±3	5,1±0,6	0,77±0,1	15,2±0,9	2,3±0,3	21,4±0,1

SH3 найвища доза, липень	30.07.2014	26±4	5,8±0,3	0,41±0,2	9,0±0,8	1,4±0,3	19,4±0,1
SJ7 висока доза, липень	30.07.2014	14±2	5,1±0,5	0,68±0,1	9,7±1,1	1,5±0,2	19,8±0,2
FJ2 контроль, жовтень	02.10.2014	38±6	5,7±0,4	0,89±0,3	14,2±1,2	2,2±0,2	9,4±0,1
FJ3 середня доза, жовтень	02.10.2014	48±2	5,0±0,5	0,92±0,4	15,1±0,5	2,4±0,4	9,3±0,1
FM3 низька доза, жовтень	02.10.2014	50±5	4,3±0,4	0,93±0,3	22,4±0,9	3,0±0,5	10,8±0,1
FJ5 середня доза, жовтень	02.10.2014	35±2	5,6±0,3	1,04±0,4	18,5±0,8	2,8±0,5	10,7±0,2
FH3 найвища доза, жовтень	02.10.2014	37±3	5,8±0,3	0,59±0,1	12,5±0,7	1,9±0,2	10,0±0,1
FJ7 висока доза, жовтень	02.10.2014	32±3	6,2±0,5	0,60±0,1	8,1±0,8	1,33±0,3	10,5±0,3
WJ2 контроль, лютий	03.02.2015	42±4	6,1±0,4	0,81±0,1	13,4±0,2	2,1±0,2	2,6±0,1
WJ3 середня доза, лютий	03.02.2015	46±8	5,2±0,5	0,90±0,2	15,10,7	2,3±0,3	2,8±0,1
WM3 низька доза, лютий	03.02.2015	63±2	4,1±0,4	1,48±0,3	35,1±0,5	4,2±0,5	3,6±0,1
WJ5 середня доза, лютий	03.02.2015	36±3	5,7±0,3	0,54±0,1	8,1±0,5	1,6±0,7	4,1±0,1
WH3 найвища доза, лютий	03.02.2015	40±7	5,3±0,5	0,65±0,1	12,5±0,5	1,8±0,5	2,4±0,1
WJ7	03.02.2015	33±6	6,4±0,6	0,44±0,1	6,4±0,7	1,1±0,4	4,4±0,1

висока доза, лютий							
ВЈ2 контроль, квітень	10.04.2015	34±4	5,4±0,6	0,62±0,2	10,3±0,5	1,7±0,3	8,2±0,1
ВЈ3 середня доза, квітень	10.04.2015	42±3	4,7±0,4	0,95±0,2	16,8±0,2	2,5±0,7	9,0±0,1
ВМ3 низька доза, квітень	10.04.2015	35±5	6,4±0,7	0,91±0,3	20,4±0,3	2,7±0,6	9,0±0,1
ВЈ5 середня доза, квітень	10.04.2015	23±2	5,1±0,5	0,69±0,2	11,3±0,2	1,9±0,4	9,7±0,1
ВН3 найвища доза, квітень	10.04.2015	25±2	5,8±0,5	0,83±0,1	15,6±0,6	2,3±0,3	9,2±0,1
ВЈ7 висока доза, квітень	10.04.2015	39±1	5,1±0,2	0,44±0,1	7,1±0,5	1,1±0,2	9,0±0,1

Згідно з отриманими результатами (рис. 5.2), температура ґрунту очікувано має сезонні коливання з мінімумом узимку та максимумом (+30 °С, що майже досягає оптимуму для розвитку патогенних мікроорганізмів) улітку. Різниця у температурі ґрунту влітку може бути пояснена різною затіненістю точок відбору проб, а отже, і різним ступенем нагріву поверхні.

Внаслідок значної протяжності Японії з півночі на південь (від 45° до 22° пн. ш.) у межах її території існують великі кліматичні відмінності. У цілому клімат Японії вологий, морський [205].

Низовини Кюсю, Сікоку, південних і східних узбереж Хонсю аж до рівнини Канто характеризуються субтропічним кліматом, тимчасом як у горах більш прохолодно. Низовинам північного Хонсю і Хоккайдо притаманні більш контрастні кліматичні умови з холодною зимою і коротким літом. В інших частинах країни простежуються різні варіації клімату залежно від особливостей

рельєфу, передусім експозиції схилів. Клімат південних гірських районів зіставимо з кліматом північних рівнин. Вегетаційний період триває 250 днів на рівнинах південного Кюсю, 215 – на рівнині Канто і в горах Кюсю, 175 – на берегах Хонсю, 155 – в Японських Альпах і на західному узбережжі Хоккайдо і 125 – на північному узбережжі Хоккайдо [254].

Загальна річна кількість опадів коливається від трохи менше 1000 мм на сході Хоккайдо до 3800 мм на деяких хребтах центрального Хонсю. Кількість днів з рідкими опадами варіює від 130 у деяких місцевостях південної Японії до 235 на північному заході Хонсю. Снігопади бувають на всій території Японії, але на півдні – всього кілька днів, а на північному заході країни – протягом 95 днів. За цей час формується сніговий покрив потужністю до 4,5 м [254].

Узимку Японія перебуває під впливом східних мусонів – потоків холодного континентального повітря із сильними штормами, що переміщаються на схід. Влітку проявляється вплив слабших північно-західних мусонів – потоків теплого тихоокеанського повітря. Найвища температура, зафіксована в Токіо, +38,7 °С; максимальна температура для Японії, зареєстрована в Ямагаті, +40,8 °С. Літня погода багато в чому залежить від зони високого тиску в північній частині Тихого океану, тому, незважаючи на те, що влітку в Японії дуже волого, сонце – постійний гість, а дощі йдуть відносно рідко. Тропічні зони низького тиску (тропічні циклони) утворюються в тропічній частині Тихого океану. Літні шторми зазвичай не дуже сильні і вражають тільки північну Японію, але тайфуни проносяться над тихоокеанським узбережжям Хонсю, Сікоку і Кюсю і влітку, і восени. Послаблення повітряних мас північної частини Тихого океану, що регулюють погоду літа, у свою чергу породжує зони високого тиску і зони помірного низького тиску, викликаючи осінню мінливу погоду. Під час дощового сезону (бай-у) із середини червня до середини липня нерідко випадає більша частина

річної норми рідких опадів у багатьох районах південної Японії, тимчасом як для Хонсю і Хоккайдо характерні зимові дощі і снігопади [204].

У Фукусімі літо тепле, туманне, мокре і переважно хмарне, а зима дуже холодна, вітряна та мінлива. Протягом року температура зазвичай коливається від –5 °C до +29 °C і рідко буває нижче –9 °C або вище +34 °C [116].

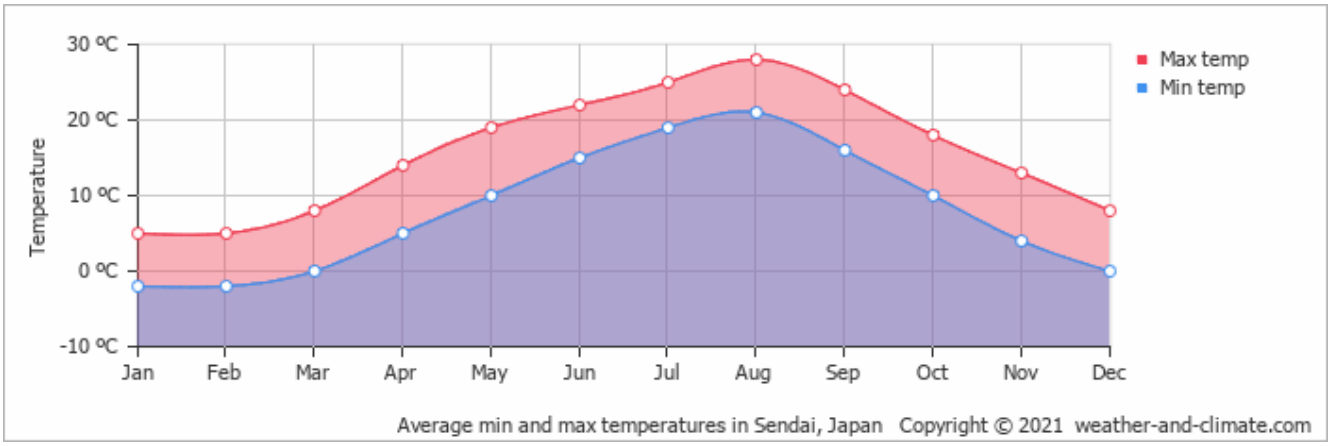


Рисунок 5.2. Середні межі сезонних коливань температури повітря у провінції Фукусіма [253]

Іншим важливим для оцінки стану ґрунтової мікрофлори показником є його вологість. Так вона суттєво коливається в межах кожного сезону, що може бути причиною поверхневого змиву ґрунту разом з дозоформуючими радіонуклідами (рис. 5.3). Саме ці дані стали передумовою проведення детальної гамма-зйомки території, розташованої вище точок відбору проб (рис. 5.7) та проведення сезонного трекінгу експозиційної дози (рис. 5.9).

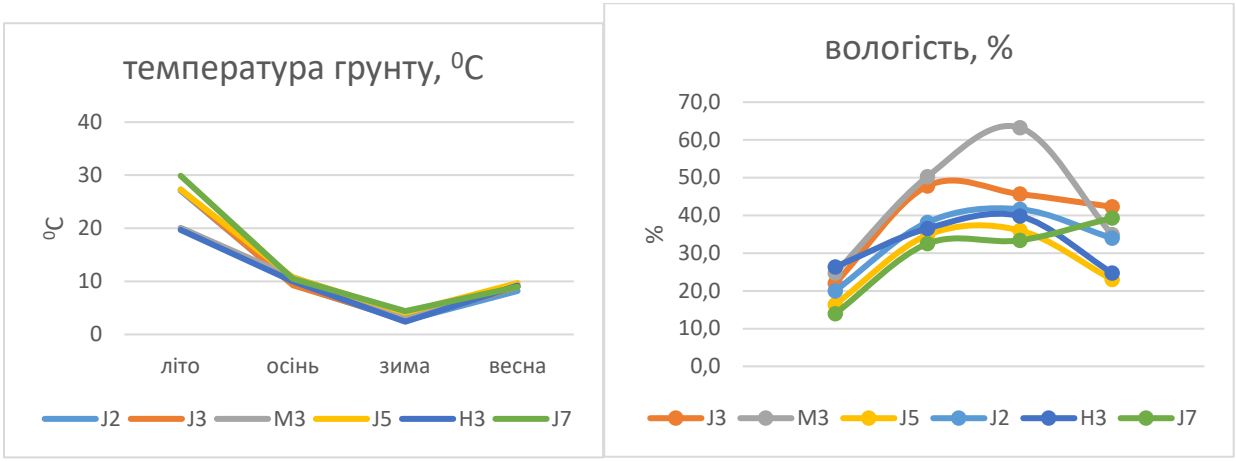


Рисунок 5.3. Сезонна зміна вологості і температури ґрунтів, відібраних з дослідних ділянок ЗВП ФАЕС. J2 – контроль; J3 – середня доза; M3 – низька доза; J5 – середня доза; H3 – найвища доза; J7 – висока доза

Кислотність ґрунту в точках відбору проб коливалася в межах нормальної реакції, від 4,1 до 6,4. Така часом близька до нейтральної реакція є типовою для бурих лісових ґрунтів гірських регіонів Японії, де превалюючим фактором формування екосистеми є японський кедр. Отож, за цим показником ґрунти точок дослідження виявились достатньо однорідними.

Щодо забезпеченості основними елементами живлення, варто відмітити, що вміст азоту коливається від 0,41 мг/100 г ґрунту для зразка SH3 найвища доза, липень до 1,48 мг/100 г ґрунту WM3 низька доза, лютий, що добре узгоджується з даними щодо кількості органічної рослинності. Хоча кількісні показники вмісту азоту відрізняються, однак усі вони належать до групи низької забезпеченості, що є доволі типовим для гірських ґрунтів Японії, хоча і не типовим для її лісових ґрунтів, адже потужність органогенного горизонту тут дуже велика.

За вмістом вуглецю представлена широка варіація ґрунтів. Так, проби WJ7 висока доза, лютий (6,35 мг/100 г ґрунту), BJ7 висока доза, квітень (7,05 мг/100 г ґрунту) та FJ7 висока доза, жовтень (8,11 мг/100 г ґрунту) відносяться до ґрунтів з низьким вмістом вуглецю, а проби FM3 низька доза, жовтень (22,41 мг/100 г ґрунту) та WM3 низька доза, лютий (35,13 мг/100 г ґрунту) – до групи з високим вмістом вуглецю в ґрунтах.

Варто звернути увагу (рис. 5.4) на сезонні коливання вмісту азоту і вуглецю, як інтегрального показника кількості біомаси в ґрунті. Так, видно, що максимальне значення як одного, так і іншого показника має проба WM3 низька доза, лютий, відібрана взимку, що добре збігається з даними щодо вологості. Отже, можна припустити, що взимку 2014-го в точці WM3 низька доза, лютий мав місце інтенсивний змив органічної речовини.

Таким чином, ґрунти точок дослідження виявились достатньо однорідними за основними агрохімічними показниками. Ці показники в цілому перебували в межах для типових показників бурих лісових ґрунтів, які широко розповсюджені в гірських регіонах Японії. Це дало змогу припустити, що відмінності в агрохімічних показниках ґрунтів не будуть суттєво впливати на умови розвитку ґрунтової мікрофлори.

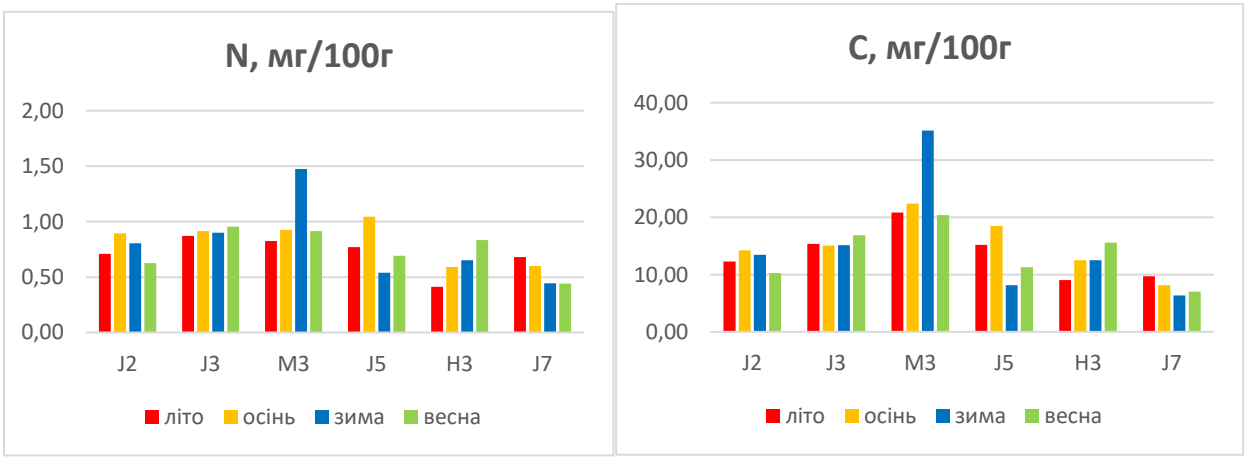


Рисунок 5.4. Сезонна зміна вмісту загального азоту та вуглецю ґрунтів, відібраних з дослідних ділянок ЗВП ФАЕС. J2 – контроль; J3 – середня доза; M3 – низька доза; J5 – середня доза; H3 – найвища доза; J7 – висока доза.

Зони, які важко повернути у господарювання навколо АЕС Фукусіма, використано як незалежну пост аварійну систему для перевірки закономірностей, виявлених у Чорнобильській зоні відчуження, за інших кліматичних, ґрунтових і гідрологічних умов. Особливе значення цього об’єкта полягає у можливості простежити, як сезонна динаміка вологості, температури

та перерозподілу радіоцезію модифікує зв’язок між дозовим навантаженням і структурою мікробіому.

Дані сучасних досліджень ґрунтів, забруднених радіоцезієм після аварії на АЕС Фукусіма-1, свідчать, що найбільш коректним є порівняння мікробних угруповань за умов контролю типу ґрунту, рослинності та історії землекористування. У таких умовах виявлені зміни альфа-різноманіття та представленості окремих радіостійких таксонів можуть інтерпретуватися як імовірна відповідь мікробіому на радіоцезієве забруднення, однак із обов’язковим урахуванням ґрунтово-екологічного контексту [162, 381].

5.2 Радіонуклідне забруднення точок відбору зразків

Проаналізовані були і показники радіонуклідного забруднення території. Виявилося, що найбільший вміст ^{137}Cs загалом характерний для точки H3 найвища доза, що не була піддана деконтамінації (наприклад, проби FH3 найвища доза, жовтень, $3{,}76\times10^{5}\pm662$ Бк/кг, SH3 найвища доза, липень, 4,11×105±1570 Бк/кг та BH3 найвища доза, квітень, $9{,}85\times10^{5}\pm4042$ Бк/кг), тимчасом як найменший – для точки M3 низька доза – SM3 низька доза, липень ($8{,}20\times10^{3}\pm109$ Бк/кг) та FM3 низька доза, жовтень ($1{,}01\times10^{4}\pm24$ Бк/кг)

Таблиця 5.2. Основні показники радіоактивності точок відбору проб ЗВП ФАЕС

Код зразка	**Питома активність зразка, Бк/кг**			
	літо, S	**осінь, F**	**зима, W**	**весна, V**
J2 контроль	$1{,}54\times10^{4}\pm78$	$4{,}03\times10^{4}\pm172$	$4{,}13\times10^{4}\pm169$	$2{,}9\times10^{3}\pm225$
M3 низька доза	$8{,}20\times10^{3}\pm109$	$1{,}01\times10^{4}\pm24$	$2{,}17\times10^{4}\pm199$	$1{,}86\times10^{4}\pm136$
J3 середня доза	$2{,}39\times10^{4}\pm123$	$2{,}88\times10^{4}\pm127$	$3{,}59\times10^{4}\pm131$	$1{,}63\times10^{4}\pm185$
J5 середня доза	$3{,}77\times10^{4}\pm177$	$2{,}57\times10^{5}\pm387$	$1{,}02\times10^{5}\pm267$	$1{,}33\times10^{5}\pm524$

J7 висока доза	$4{,}64\times10^{4}\pm246$	$3{,}20\times10^{5}\pm116$	$2{,}35\times10^{5}\pm463$	$3{,}65\times10^{5}\pm790$
H3 найвища доза	$4{,}11\times10^{5}\pm1570$	$3{,}76\times10^{5}\pm662$	$1{,}45\times10^{5}\pm293$	$9{,}85\times10^{5}\pm4042$

Такий вміст радіонукліда сформував дози із потужністю 121,46 μГр/год для FH3 найвища доза, жовтень, 132,61 μГр/год для SH3 найвища доза, липень та 317,71 μГр/год для BH3 найвища доза, квітень для мікроорганізмів, що населяють ґрунт (табл. 5.3). Водночас найменші дози сформувалися в пробах ґрунту, відібраного на виїзді з радіоактивної плями, SM3 низька доза, липень. Потужність дози, обумовлена цезієм, тут склала 2,65 μГр/год.

Згідно з базою даних FREDERICA [72], дози в межах від 0 до 100 μГр/год не мають задокументованого впливу на ґрунтові мікроорганізми. Водночас дози в межах від 100 до 200 μГр/год (FJ7 висока доза, жовтень, BJ7 висока доза, квітень, FH3 найвища доза, жовтень, SH3 найвища доза, липень) можуть затримувати відновлення ґрунтової фауни, а ті, що перебувають у межах до 400 μГр/год (BH3 найвища доза, квітень) знижували різноманіття ґрунтової мікрофлори.

Такі обрахунки дози є певною мірою приблизними, але високий рівень консервативності моделі, застосованої у пакеті програм ERICA Tool та BiotaDC, дозволяють бути впевненими в адекватності оцінки наведених потужностей дози.

Проте розрахунок поглинутої дози для кожного представника мікробоценозу виявляється складним завданням, для вирішення якого необхідні як дані щодо загального видового складу мікробоценозу на окремій території, так і відомості щодо локалізації мікроорганізмів відносно ґрунтового колоїда. На жаль, даних щодо таких досліджень на разі знайдено не було [17].

Таблиця 5.3. Поглинуті дози для ґрунтових мікроорганізмів, сформованих на місцях відбору проб (обраховано за допомогою Biota DC [206])

Код зразка	Потужність поглинутої дози, μГр/год			
	липень 2014, S	жовтень 2014, F	лютий 2015, W	квітень 2015, V
J2 контроль	6,3	16,5	16,9	11,6
M3 низька доза	3,3	3,26	8,8	7,6
J3 середня доза	9,7	11,8	14,7	6,7
J5 середня доза	15,4	104,8	41,7	54,5
J7 висока доза	18,9	130,4	96,1	148,8
H3 найвища доза	167,7	153,6	59,3	401,7

За даними нормограми для розрахунку кількості одиничних проб, необхідних для отримання середнього геометричного значення щільності забруднення ґрунту ^{137}Cs на рівномірно забрудненій ділянці із заданою відносною похибкою, з невизначеністю вимірювання активності радіонуклідів у пробах ґрунту Khomutinin at. al. (2020), похибка середнього на досліджуваній території може коливатися в межах 30 % [181].

Отже, за показниками радіонуклідного забруднення проаналізовані території дотепер відносяться до зони відселення, хоча біля SJ7 висока доза, липень та SJ2 контроль, липень і ведуться інтенсивні деконтамінаційні роботи, що дозволяє в найближчому майбутньому очікувати повернення цих територій у господарське використання.

Для візуалізації просторового розподілення експозиційної дози (рис. 5.5) взимку 2015 року було проведено дослідження за допомогою переносного портативного спектрометра [204]. Отримані дані загалом підтверджують коректність аеральної оцінки, проведеної урядом Японії (рис. 1.1),згідно з яким забруднений слід перетинає повіт Наміє та конкретну трасу 459, а також адекватність оцінки дозового навантаження на особин мікробіому та екосистему в цілому.



Рисунок 5.5. Потужність експозиційної дози, виміряна на точках відбору проб з території ЗВП ФАЕС. J2 – контроль; J3 – середня доза; M3 – низька доза; J5 – середня доза; H3 – найвища доза; J7 – висока доза

Так, точками з найвищим значенням потужності експозиційної дози є H3, J5 та J7. Водночас точки H3 та J5 показують найбільшу флуктуацію за вмістом цезію у сезонній динаміці (рис. 5.6).

Саме наявність такої флуктуації як зі вмістом поживних речовин, так і за вмістом радіонуклідів спонукала припустити горизонтальний перенос підстилки за вищих ділянок на досліджуваних територіях до нижчих, що, в свою чергу, зумовило доцільність проведення спектрометричних досліджень цих (розташованих вище за схилом) територій.

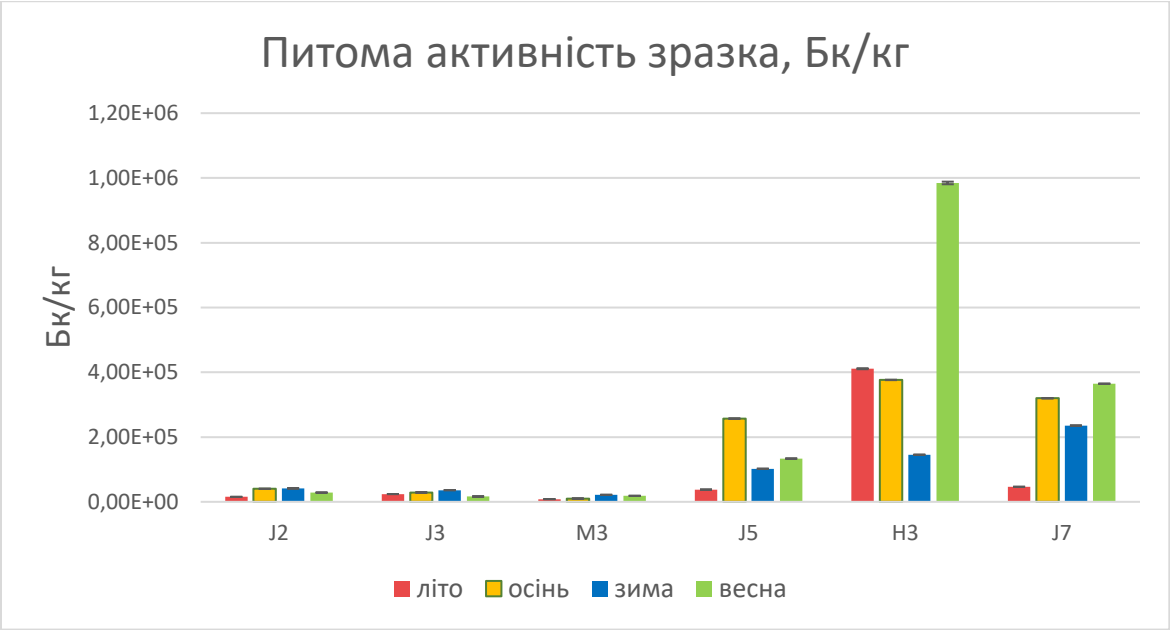


Рисунок 5.6. Сезонна динаміка вмісту ^{137}Cs у ґрунтах, відібраних з дослідних ділянок ЗВП ФАЕС. J2 – контроль; J3 – середня доза; M3 – низька доза; J5 – середня доза; H3 – найвища доза; J7 –висока доза

5.2.1 *Просторова динаміка дозового навантаження*

Базисом для будь-якого дослідження в галузі радіоекології екосистем є визначення експозиційної дози та щільності забруднення на досліджуваній території. В умовах, що сформувалися на території України після аварії на ЧАЕС, зазвичай, достатнім є проведення зйомки невеликої території навколо точки інтересу і згодом рівні забруднення змінюватимуться переважно через поверхневий змив, міграцію радіонуклідів вглиб ґрунту, винос з та розпад радіонуклідів [380, 36]. Але саме через особливості рельєфу зони відчуження Чорнобильської АЕС внесок цих процесів мінімальний і, вимірявши щільність забруднення одного разу, можна очікувати, що через 3–6 місяців істотних змін не відбудеться. Працюючи ж у зоні евакуації ФАЕС, наша команда зіткнулася з абсолютно іншою ситуацією. Відбір проб проводився з проміжком у три місяці, методика і цілі дослідження, що проводилося, передбачали роботу з точковим зразком, тобто ґрунт, відібраний з конкретної точки, не був гомогенізований зі зразками, відібраними з інших точок. Утім дані щодо щільності забруднення істотно відрізняються, в деяких випадках навіть на декілька порядків (табл.

5.2). Очевидно було, що основною причиною таких невідповідностей є особливості рельєфу [58] – основна частина зони відселення дуже гориста, пересічена стрімкими гірськими ріками. Також для Японії характерні істотні сезонні опади – протягом кожного із сезонів тайфунів (у червні та вересні) кількість опадів може сягати декількох сотень міліметрів за день [126]. Саме тому було вирішено побудувати карту розподілу експозиційної дози не тільки навколо точок відбору проб, але і більш детально охарактеризувати навколишню територію, що може дати змогу передбачати основні патерни міграції і перерозподілу радіонуклідів у досліджуваній екосистемі.

Територію, де проводилася гамма-зйомка, було підібрано так, щоб отримати дані для різних форм рельєфу (рис. 5.7): рівнина (A), на якій розташовано колишнє пасовище, крутий схил (B), пологий схил (C), водні потоки, розташовані у невеликих каньйонах, – повноводна річка Такасі (R2) та гірський потік, що формується після інтенсивних опадів (R1).

Картографічні зображення і матеріали були отримані за допомогою пакетів програм GoogleEarth та ArcGis.

Точки відбору зразків були відібрані так, щоб якомога репрезентативніше представляти щільності забруднення зони відчуження, при цьому зберігаючи подібність фізико-хімічних характеритик ґрунту та залишаючись у межах однієї екосистеми.

Потужність експозиційної дози в польових умовах вимірювали за допомогою системи, розробленої на базі SUREC [105], що обладнана NaI-детектором та системою GPS-позиціонування.

Питома активнсть ґрунту була визначена за допомогою гамма-спектрометрії з використанням HPGe GC-4020 (Canberra) та Lynx Digital Sygnal Analyzer в 100 мл посудинах U-8 (AS-ONE, Японія) ефективність спектрометра при 661,6 keV становила 1,74 %. Похибка калібрування не перевищувала 2 %.

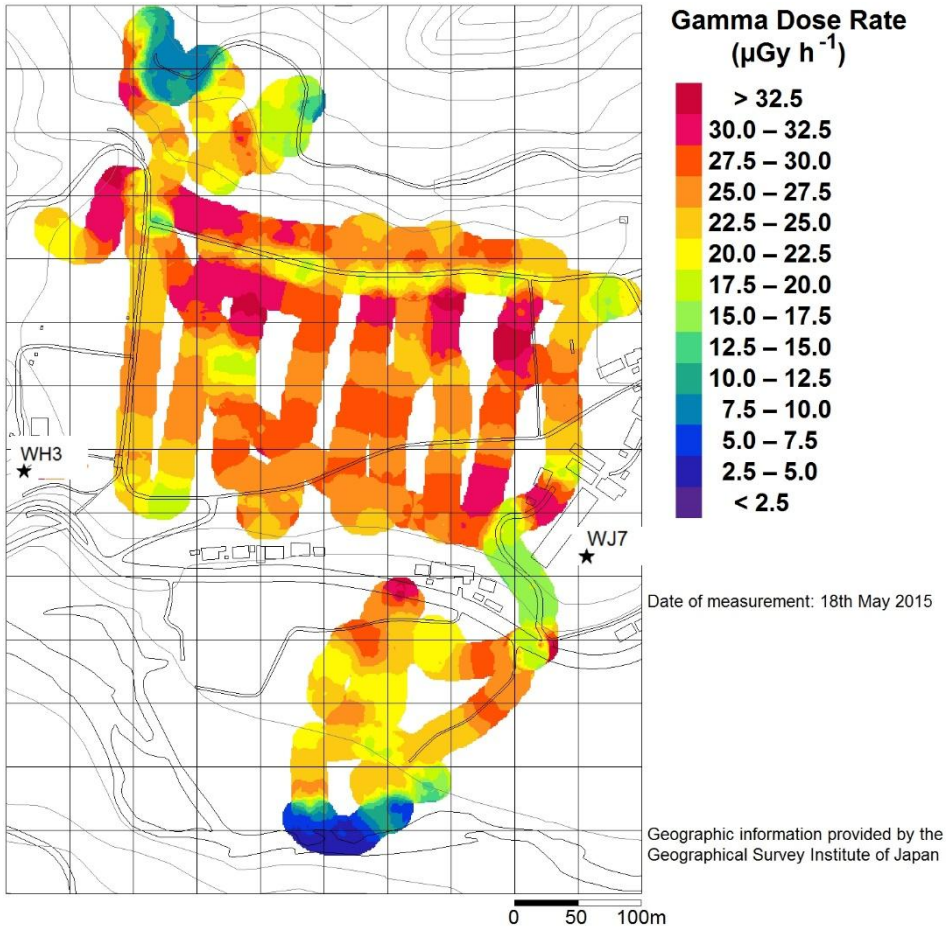


Рисунок 5.7. Супутникова карта місцевості, де була проведена гамма-зйомка. Зображення отримане за допомогою GoogleEarth©. Форми рельєфу на досліджуваній території: А – пласка рівнина, колишнє пасовище; В – схил зі значним перепадом висот; С – колишнє пасовище

Після попереднього планування експерименту було підібрано шість точок, де заплановано сезонний відбір проб ґрунту для генетичних досліджень (рис. 5.7). Точки були підібрані так, щоб представляти якомога більшу варіацію питомої активності ґрунту. Але аналіз проб показав істотну варіабельність питомої активності (рис. 5.8) та відсутність логічного пояснення таких змін. Так, наприклад, можна було б очікувати поступове зниження радіоактивності ґрунту з кожної точки, а особливо восени після літнього сезону тайфунів, але в точках H3 і J7, висока доза, вона підвищувалась навесні, тимчасом як у точці J5, середня доза, найвищою була влітку. Саме тому постала необхідність більш детальної характеристики території відбору, в тому числі для розуміння ролі рельєфу у горизонтальному переміщенні радіонуклідного забруднення.

Для цього було вирішено провести дозиметричну зйомку території поміж двома найбільш забрудненими точками – H3, найвища доза та J7, висока доза. Це територія залишеної ферми, де раніше проводився випас корів, і тому тут є як ділянки, вкриті трав’яною рослинністю, де за 5 років відбулася сукцесія і

екосистема відновилася до альпійського різнотрав'я, так і лісові ділянки, що



раніше використовувалися в якості захисту від вітру. Також ми провели зйомку у низинах, біля водних потоків (рис. 5.8).

Рисунок 5.8. Зміни дозового навантаження залежно від особливостей рельєфу

Дані, отримані в результаті гамма-зйомки [38], дозволили зробити припущення щодо причин флуктуації забруднення на точках відбору проб. Так, з відсутності накопичення радіоактивних речовин у долинах річок можна припустити високу сезонну інтенсивність водних потоків, які і виносять забруднення в океан. Водночас найбільш стабільно забрудненою виявилась найпласкіша територія, вкрита трав'яною рослинністю, а не вкритий лісом схил, як можна було б припустити, виходячи з чорнобильських даних. Разом з тим колишнє пасовище з незначним ухилом забруднено менше, ніж зазначена вище пласка територія. Саме тому можливим є висновок щодо затримання

радіоактивно забруднених частинок на пласких територіях й інтенсивного змиву під час тайфунів, у тому числі з винесенням мертвої біомаси, з точок з хоча б невеличким ухилом.

Для подальшого відстеження змін експозиційної дози на точках відбору проб нами були встановлені дозиметри, що дозволяють відстежувати зміни дози з часом. Можливо, саме дані з цих приладів дозволять детальніше охарактеризувати динаміку зміни забруднення на гірській території ЗВП ФАЕС.

Отже, можна стверджувати, що особливості рельєфу мають визначальний вплив на розподіл радіонуклідного забруднення на території ЗВП ФАЕС. Поверхневий змив і горизонтальний перенос значною мірою впливають на перерозподіл забруднення, отже, для отримання валідних результатів у довгострокових радіоекологічних дослідженнях абсолютно необхідним пунктом є визначення динаміки і передбачення шляхів міграції радіонуклідів [185, 38].

5.2.2 *Сезонна динаміка дозового навантаження*

Окрім оцінки просторового перерозподілу радіонуклідів, доцільним було визнано проведення сезонного моніторингу зміни потужності дози в зимовий період – період інтенсивних опадів тощо [185].

На рис. 5.9 показано динаміку колімітованої поглинутої дози, що формувалася на поверхні ґрунту на двох ділянках (H3, найвища доза і J7, висока доза) на найзабрудненіших дослідних ділянках. Потужність дози в обох випадках зменшувалася швидше, ніж тільки внаслідок радіоактивного розпаду. Швидше зниження потужності дози пояснюється природними процесами, такими як ерозія верхнього шару ґрунту, вертикальний перенос радіонуклідів у ґрунті та поверхневий змив [184].

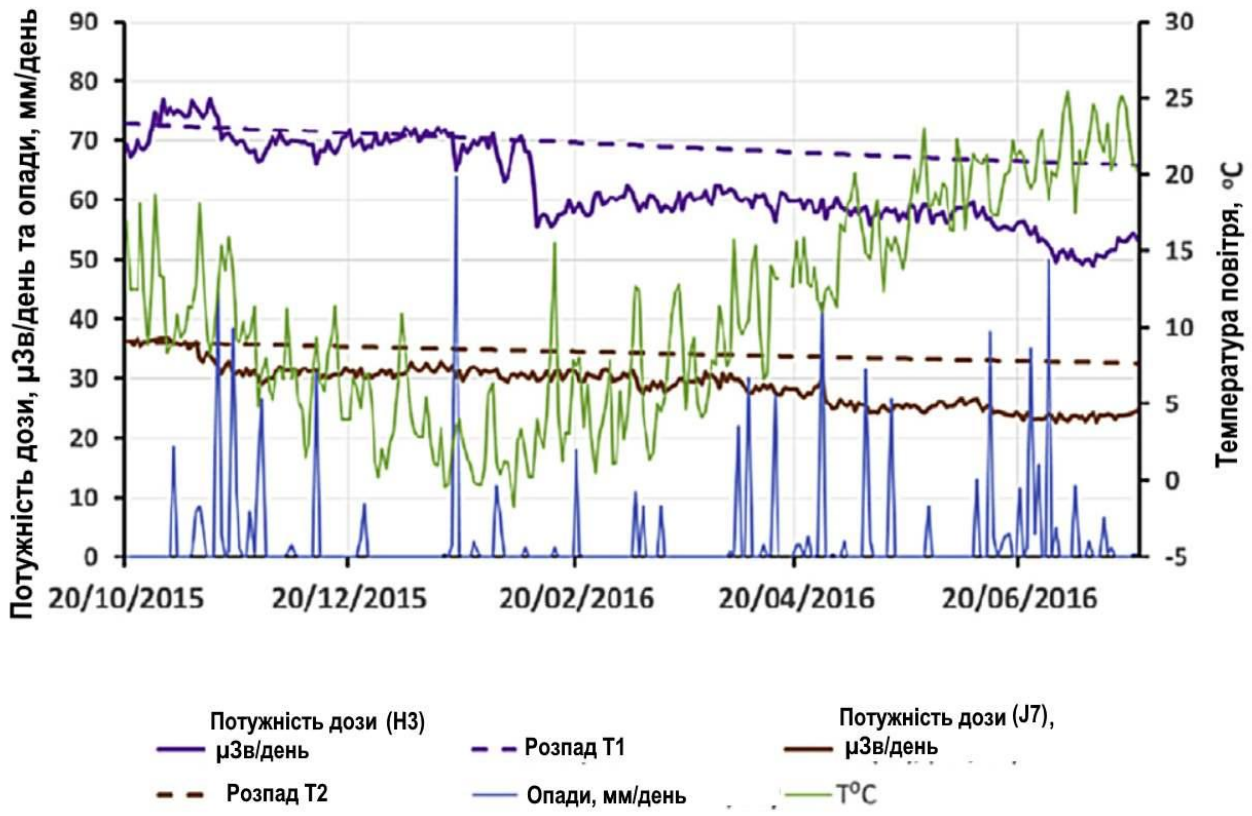


Рисунок 5.9. Сезонна динаміка потужності поглинутої дози, виміряна на точках з найбільшою флуктуацією забруднення ^{137}Cs протягом восьми місяців разом з даними щодо опадів (мм / день) і температури повітря (°C)

На додаток до спостережуваної залежності частоти доз на рис. 5.9 показано гіпотетичне скорочення потужності дози виключно за рахунок радіоактивного розпаду ^{137}Cs ($T_{1/2}$ – 30,17 року) і ^{134}Cs ($T_{1/2}$ – 22,06 року), яке не залежало б від будь-якої міграції, а зміна потужності дози була б викликана лише ним. У цьому випадку, нехтуючи радіаційним фоном на ділянках і припускаючи, що в 2014–2016 роках спостережувана потужність дози може бути пов’язана виключно з ^{134}Cs і ^{137}Cs, початкове співвідношення ізотопів ^{134}Cs/^{137}Cs у випаданнях збігається з таким, що було досліджено одразу після аварії, і дорівнює 1 [155], потужність дози в динаміці можна апроксимувати рівнянням нижче [364]:

$$DR(t) = DR\ (t_0) \times \frac{e^{-\lambda_{137}*t} + \alpha_{\frac{134}{137}} * e^{-\lambda_{134}*t}}{e^{-\lambda_{137}*t_0} + \alpha_{\frac{134}{137}} * e^{-\lambda_{134}*t_0}}, (1)$$

де t – поточний час після аварії; t_0 – час після аварії на дату встановлення D-шаттла дозиметра; DR (t) – поточна потужність дози, DR (t_0) – потужність дози на дату встановлення дозиметра; λ^{137} і λ^{134} – константи швидкості радіоактивного розпаду для ^{137}Cs і ^{134}Cs відповідно; $\alpha_{134/137}$ – співвідношення ^{134}Cs і ^{137}Cs гамма керма = 2,687 [364].

Дані, наведені на рис. 5.9, свідчать про істотне зниження потужності дози протягом періодів сильних опадів у листопаді і з кінця травня по червень. Крім того, значне і різке зниження у точці з найвищим забрудненням H3 відбувалося під час танення снігу і результуючого поверхневого стоку в лютому, коли спостерігалося різке підвищення температури повітря.

Крім процесів змиву радіонуклідів через вертикальну і латеральну міграцію, флуктуація добової потужності дози протягом періоду спостереження викликана розпадом радіонуклідів, а також стохастичним характером вимірюваної величини, змінами в поглинаючих властивостях ґрунту (вміст вологи), помилками приладу тощо. У той же час аналіз часової залежності відношення вимірюваної потужності дози від розрахункового, заснований на радіоактивному розпаді (рівняння (1)), показує, що і для спостережного майданчика з найвищим забрудненням (H3), і для точки з високим забрудненням (J7) можна виявити, коли зменшення потужності дози визначалося в першу чергу розпадом, з незначними варіаціями середньодобової потужності дози. Для ділянки H3 нормалізована потужність дози склала 1,03 ± 0,01 за період з 28 жовтня по 14 листопада, потім зменшилася до 0,98 ± 0,03 за 15 листопада до 7 лютого, а потім до 0,86 ± 0,02 за 8 лютого по 21 червня. Для J7 відповідні значення дорівнювали 1,00 ± 0,01 за період 20 жовтня – 08 листопада; 0,87 ± 0,03 за 9 листопада – 27 квітня і 0,74 ± 0,03 за 8 лютого – 22 липня. У всіх випадках відмінності між нормованими потужностями доз, виміряними в наступні періоди, були значними (t-test p <0,00001). Таким чином, два різких скорочення виміряних потужностей доз у кожній з точок

спостереження були пов’язані з фактором, відмінним від радіоактивного розпаду, і не можуть бути викликані вищезазначеними факторами, зокрема коливанням середньоденних значень. Вважаємо, що ці різкі скорочення доз в обох випадках викликані нахилом, що, в свою чергу, медіює ерозійні процеси, пов’язані зі зливами в листопаді і таненням снігу в лютому [185].

5.3 Концентрація виділеної загальної ДНК зразків

Для загальної оцінки біорізноманіття ґрунтової мікрофлори було проведено виділення тотальної ДНК, яка включала нуклеїнові кислоти від усієї біомаси ґрунту (табл. 5.4).

Концентрація тотальної ДНК у досліджуваних зразках коливалася в межах від 2,3 (точка SJ5) до 14,4 μг/мл (точка SJ5). Слід зазначити, що концентрація ДНК достовірно ($p > 0,05$) корелює із загальним вмістом азоту, що свідчить про вагомий внесок азоту в формування біомаси організмів, що заселяють ґрунт. Водночас концентрація ДНК не показала залежностей від сезону відбору, що може слугувати доказом активного життя флори та фауни без залежності від сезону в умовах помірного мусонного клімату Японії.

Таблиця 5.4. Концентрація тотальної ДНК, виділеної з відібраних зразків ґрунту ЗВП ФАЕС

Код зразка	Концентрація ДНК, нг/μл			
	літо, S	осінь, F	зима, W	весна, V
J2, контроль	6,1	3,0	5,4	6,2
M3, низьке забруднення	14,4	3,9	7,3	8,5
J3, середнє забруднення	6,9	8,4	12,1	20,1
J5, середнє забруднення	2,3	3,5	9,4	3,3
J7, високе забруднення	12,5	3,2	5,6	4,5
H3, найвище забруднення	7,4	4,1	4,3	5,6

5.4 Підбір методології для біоінформатичної обробки результатів секвенування ДНК, із забруднених радіонуклідами ґрунтів

5.4.1 *Загальна схема аналізів*

Використовуючи загальноприйняту методологію метагеномних досліджень, першочергово необхідно перевірити якість даних результатів секвенування, за допомогою програмного пакета FastQC (http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc) [295]. Більшість секвенаторів генерує так званий QC (quality control) звіт як необхідну частину схеми аналізу, але цей звіт, як правило, фокусовано на ідентифікації проблем, які генеруються самим секвенатором. Програмний пакет FastQC забезпечує QC звіт (наприклад, див. рис. 4.3), що дає можливість визначити проблеми, які генеруються безпосередньо секвенатором або матеріалами стартової бібліотеки. Наступним етапом є демультиплікація даних секвенування за допомогою біоінформатичного програмного пакета QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) [194] модулем *split_libraries_fastq.py*.

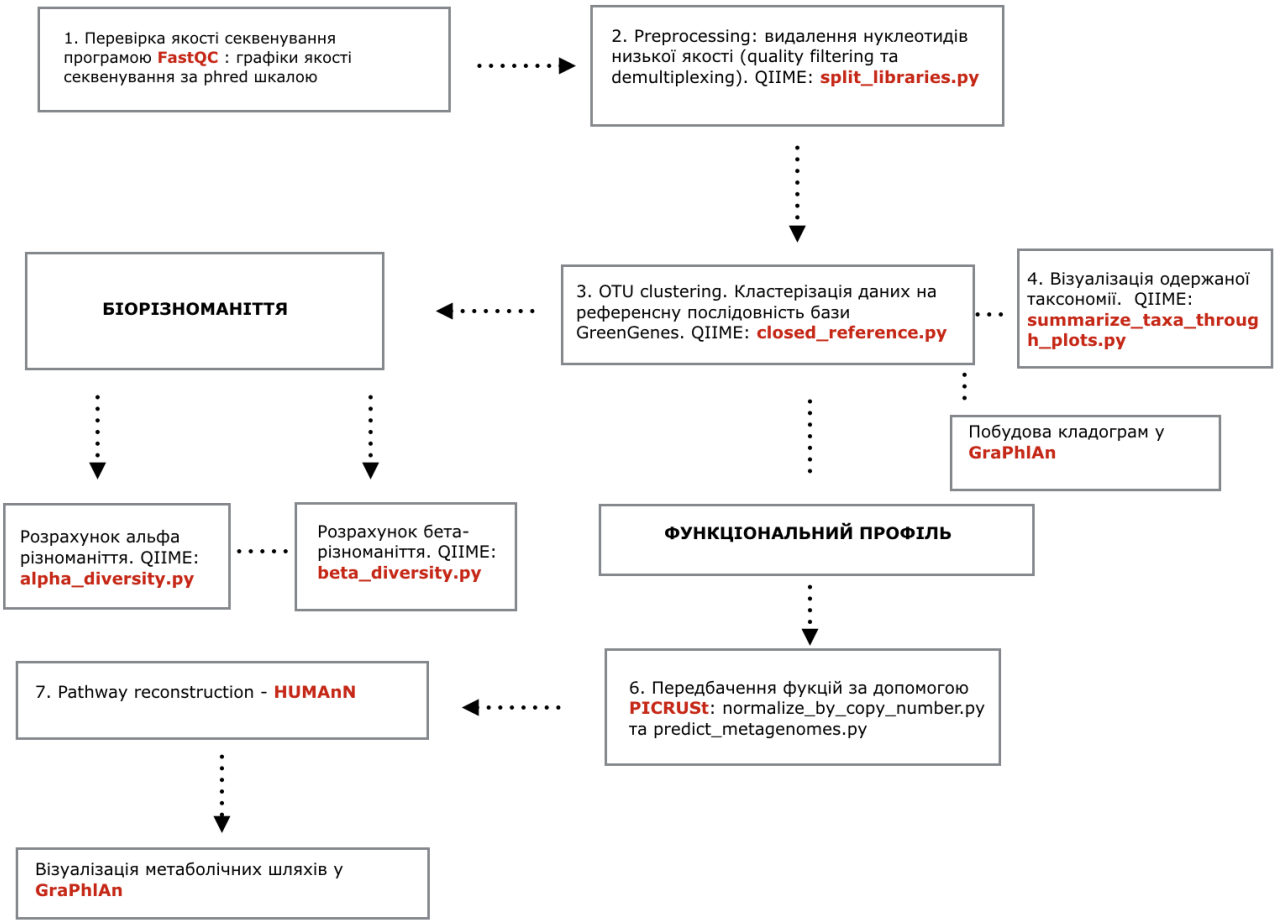


Рисунок 5.10. Загальна схема біоінформатичного аналізу

QIIME – це набір функціонально різних модулей з відкритим кодом, що написані за допомогою мови програмування Python та спеціально розроблених для аналізу метагеномних даних секвенування. Модулі QIIME виконуються тільки з командного рядка та не мають графічного інтерфейсу. Головними можливостями QIIME є демультиплекс та фільтрування якості даних (demultiplexing, quality filtering), кластерізація (OTU picking), таксономічне розподілення (taxonomic assigmnent), філогенетична реконструкція (phylogenetic reconstruction), аналіз різноманіття та візуалізація. Далі відфільтровані сіквенси за якістю кластеризуються на референсну послідовність (у цьому випадку база даних 16s РНК послідовностей – Greengenes) модулем closed_reference.py. Одержані OTU таблиці візуалізуються за допомогою модуля summarize_taxa_though_plots.py. Додатково будуються кладограми у програмі GraPhlAn [61].

Аналіз біорізноманіття розраховується модулями QIIME alpha_diversity.py – для альфа-різноманіття, та beta_diversity.py для бета-різноманіття відповідно.

Наступним кроком є передбачення біологічних функцій та реконструкція метаболічних шляхів у програмах PICRUSt [199] та HUMANn. Одержані дані метаболічних шляхів візуалізуються за допомогою програми GraPhlAn. Такий підхід було також використано групою для аналізу функціональних зв'язків патогенних мікроорганізмів [4, 287].

5.5 Оцінка якості даних секвенування за допомогою FastQC

Яксіть зразків, отриманих із ЗВП ФАЕС, коливалась навіть більше. Так, ще на етапі підготовки бібліотеки до секвенування було виявлено недостатню якість ампліфікації зразків з низьми вмістом ДНК – зимні зразки з точок із середнім забрудненням (WJ5 (рис. 5.11), WJ3) та осінньої точки із середнім забрудненням (FJ3). Це привело до необхідності повторного виділення ДНК зі зразків та проведення повторного циклу аналізів.

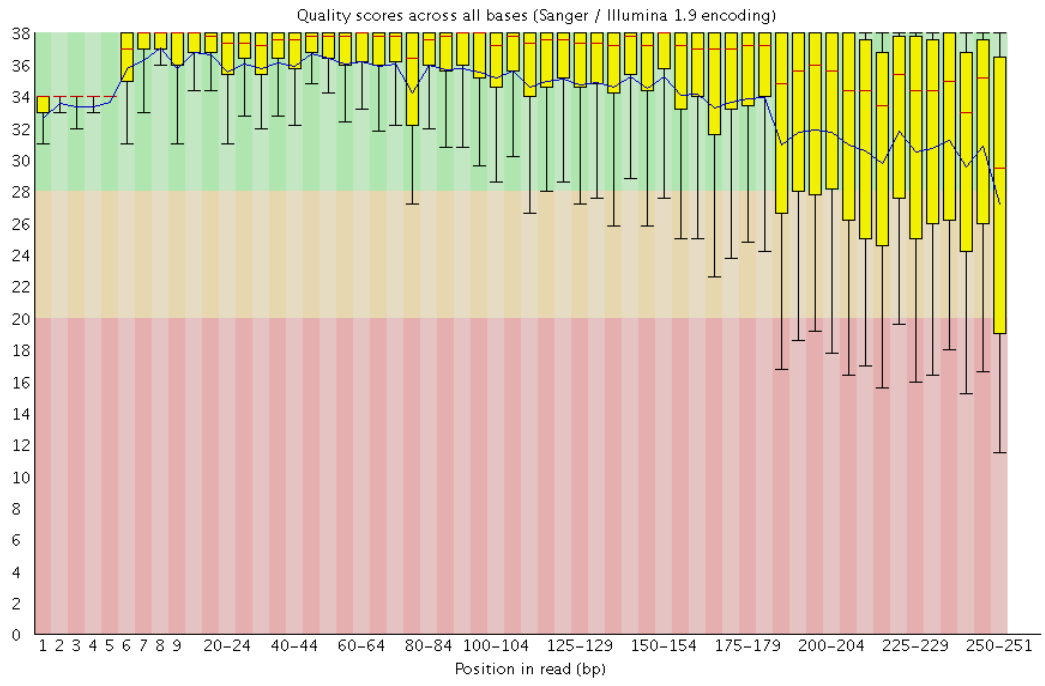


Рисунок 5.11. Загальна оцінка діапазону значень якості нуклеотидів, визначена в кожній з позицій файлу зі зразка, відібраного взимку з точки із середнім забрудненням (WJ5) – перше секвенування.

Загалом кількість рідів, що перевищували показник якості у 95 %, коливалася в межах половини від усіх отриманих даних. Це високий [295] показник, що було отримано в результаті коректної підготовки бібліотеки ампліконів та наступного ощищення зразків.

В результаті повторного секвенування разом із весняними зразками, вдалося отримати високу якість кожного fastq файла (рис. 5.12)

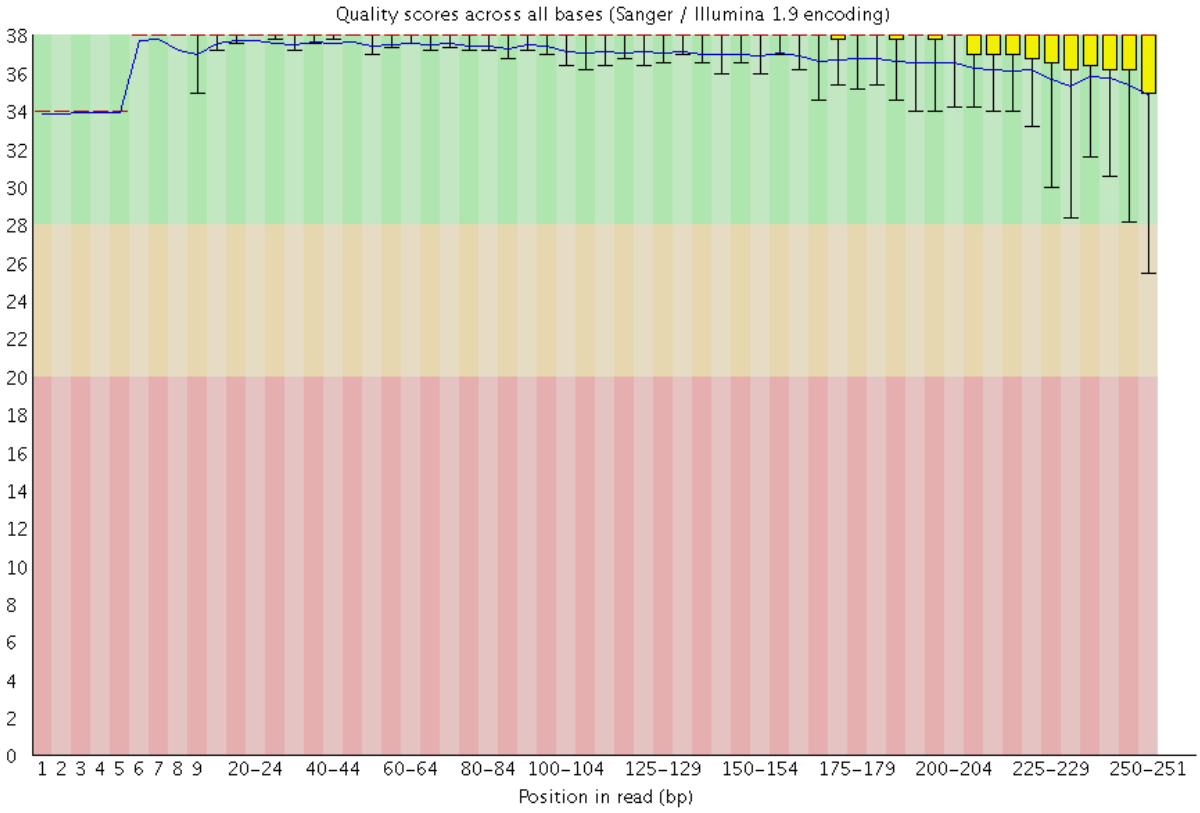


Рисунок 5.12. Загальна оцінка діапазону значень якості нуклеотидів, визначена в кожній з позицій файлу зі зразка, відібраного взимку з точки із середнім забрудненням (WJ5) – повторне секвенування

5.6 Загальна характеристика мікробіомів ґрунту ЗВП ФАЕС

5.6.1 *Обмеження технології NGS для зразків, відібраних з території ЗВП ФАЕС*

Як мікробіоми найбагатших з розглянутих у представленому дослідженні ґрунтів, кількість ідентифікованих окремих таксономічних одиниць тут, окрім

зимового сезону (табл. 5.5), значно перевищує названу кількість як для зразків ЧЗВ, так і для зразків, відібраних з ОУ.

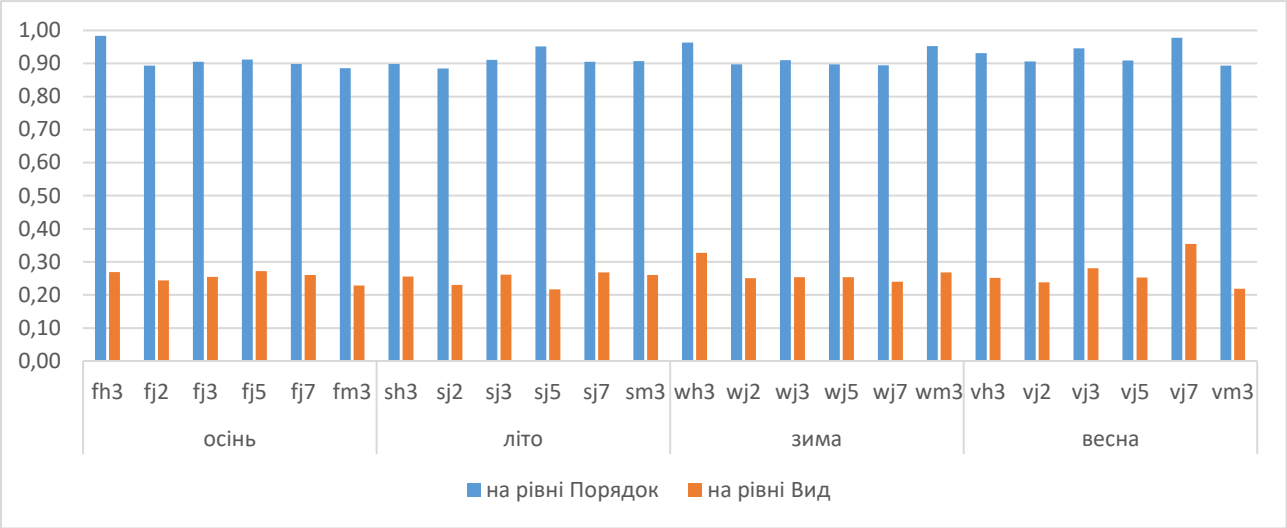


Рисунок 5.13. Загальна частка бактерій, ідентифікованих на рівні Порядок та на рівні Виду. J2 контроль; M3 низька доза; J3 середня доза; J5 середня доза; J7 висока доза; H3 найвища доза.

В той же час, співвідношення між кількістю окремих таксономічних одиниць, ідентифікованих до Виду та до Порядку, зберігається таким самим, як і для зразків відібраних із ЧЗВ, а також співвідноситься з літературними даними [195, 103, 135].

5.6.2 *Альфа-різноманіття ґрунтів ЗВП ФАЕС*

Вивчення мікробіомів ґрунтів ЗВП ФАЕС проводили, спостерігаючи сезонну динаміку як у показниках радіонуклідного забруднення та показників вмісту поживних речовин у ґрунті, так і стуктури мікробіому. Істотний вплив на комплексність аналізів мала різниця у типах ґрунтів між Українським Поліссям, де більшість лісових екосистем представлено бідними дерново-підзолистими ґрунтами під моноценозами сосни та північно-сіхдним берегом о. Кюсю, де домінують багаті і фертильні бурі лісові ґрунти.

Як і для представлених вище даних щодо мікробіомів ЧЗВ, дані щодо ЗВП ФАЕС було скомпресовано на рівні Порядок для покращення сприйняття.

Загальна кількість ідентифікованих видів суттєво більша порівняно з ЧЗВ– навіть у зимові місяці (табл. 5.5).

Таблиця 5.5. Загальна кількість окремих таксономічних одиниць, ідентифікованих у ґрунтах ЗВП ФАЕС

Рівень забруднення	Код точки відбору	Загальна кількість окремих таксономічних одиниць (OTU)			
		літо, S	осінь, F	зима, W	весна, V
контроль	J2	2442	6646	55	3458
низька доза	M3	5343	4937	2242	4968
середня доза	J5	4385	5695	1417	3947
висока доза	J7	2765	3521	272	3289
найвища доза	H3	5730	7239	1187	4725

З отриманих даних видно, що загальна кількість ідентифікованих OTU коливається від 7239 для зразка, відібраного восени на точці з найвищим забрудненням H3, до 55 для зразка, відібраного взимку на контрольній точці J2.

З цих даних видно також сезонну зміну кількості окремих таксономічних одиниць (рис. 5.13): зразки ґрунту, відібрані взимку, демонструють найменше видове багатство, тимчасом як осінні зразки є найрізноманітнішими. Отриманий результат є очікуваним і добре корелює з даними щодо температури і вологості ґрунту (див. рис. 5.3). Важливо зазначити, що аналіз 16s рРНК дає змогу детектувати бактерії, кількість яких більша за певнну мінімальну кількість, адже все, що менше, відсіюється на етапі біоінформатичної обробки та поліпшення якості рідів. Саме тому можна стверджувати, що осінь є найбільш сприятливим сезоном для розвитку ґрунтових мікроорганізмів. За сучасним баченням ґрунтової мікрофлори, згідно з яким «усе є всюди – але умови визначають активне різноманіття» [94] – решту часу частина

представлених восени бактерій проводить у цистах, очікуючи появи субстрату й умов, що будуть сприятливими для розмноження.

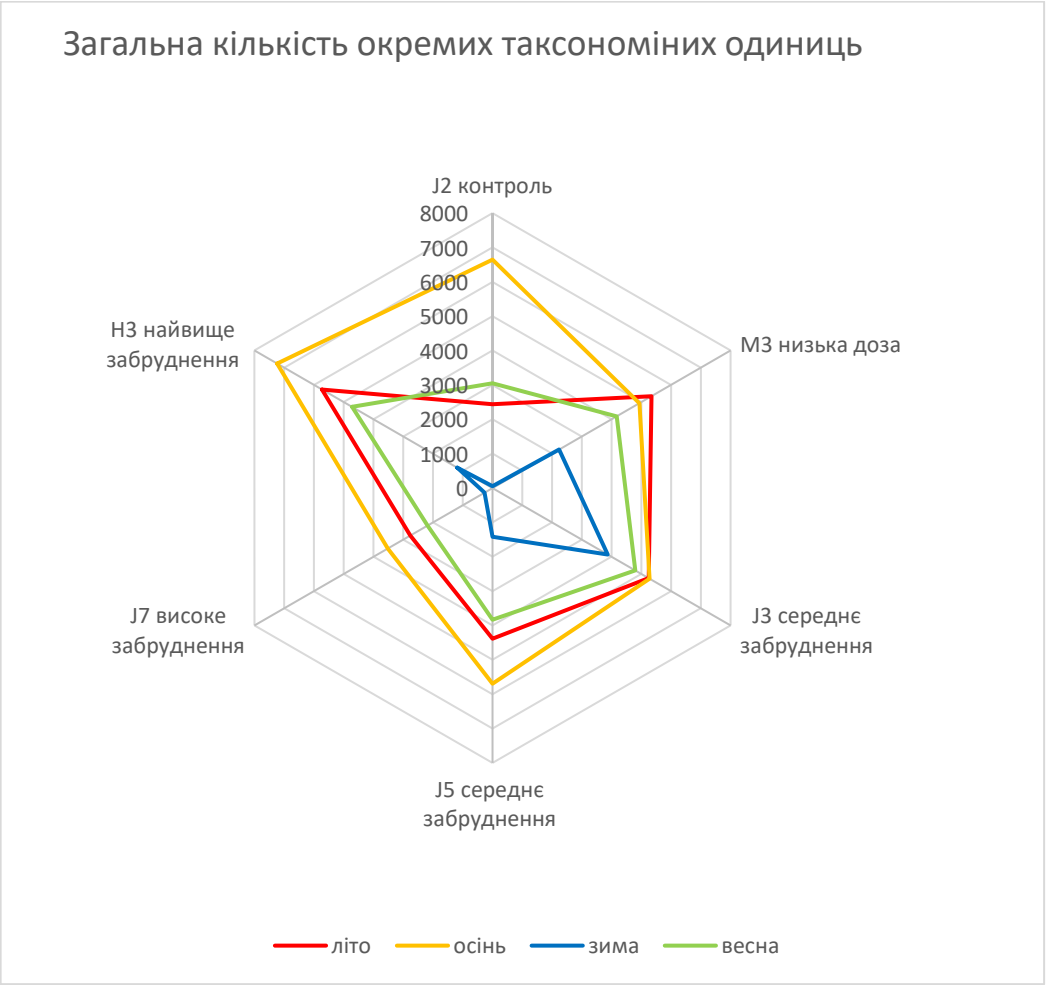


Рисунок 5.14. Сезонна динаміка кількості окремих таксономічних одиниць, ідентифікованих у ґрунтах, відібраних із ЗВП ФАЕС

Беручи до уваги значення температури і вологості, можна стверджувати, що літній період після сезону дощів є доволі сухим, що не сприяє розвитку мікроорганізмів. Водночас низька температура гальмує процеси розвитку мікрофлори узимку. А восени параметри вологості ґрунту, температури, вмісту поживних речовин і, очевидно, наявності субстрату є ідеальними.

Важливим є порівняння видового багатства представників мікрофлори у різні сезони (рис. 5.14 – 5.17).



Рисунок 5.15. Біорізноманіття ґрунтової мікрофлори ґрунтів, відібраних із ЗВП ФАЕС влітку

У зразках, відібраних влітку, домінували представники порядків *Actinomycetales*, *Acidobacteriales*, *Ellin329*, *Rhizobiales* та *Solibacterales.*

Актиноміцети (*Actinomycetales*) — порядок бактерій класу Актинобактерії (*Actinobacteria*). Це грампозитивні бактерії. Порядок містить різноманітні за формою бактерії та включає багато підгруп. Мають кислотостійкий тип клітинної стінки, яка забарвлюється за Грамом як грампозитивна, однак за структурою ближче до грамнегативних. Характеризуються високим (60–75 %) вмістом ГЦ пар у ДНК.

Actinobacteria, застаріла назва – променисті грибки, або актиноміцети – *Actinomycetes*), – грампозитивні бактерії, які характеризуються високим (більше за 55 %) вмістом гуаніну і цитозину в ДНК та мають подібну грибам міцеліальну будову. Найбільша підгрупа – актиноміцети (*Actinomyceta*), далі вся інформація стосується цієї підгрупи. Товщина міцелію актиноміцетів – 0,5–

1,0 мкм. При зростанні на щільних середовищах розрізняють субстратну і повітряну частини міцелію. Розмножуються вони фрагментами або спорами, що утворюються у різних видів на повітряному і/або субстратному міцелії. Спори і спороносці мають різноманітну форму. Зрідка забезпечені джгутиками і здатні до самостійного пересування[66].

Актиноміцети є активними продуцентами антибіотиків, утворюючи до половини відомих науці. Актинобактерії населяють ґрунти, а також прісні і морські води, що робить закономірним високу їх частку у ґрунтах Японії. Вони грають важливу роль у розкладанні органічних речовин, таких як целюлоза і хітин, і таким чином беруть участь у колообігу органічних речовин і вуглецевому циклі. Це поповнює запас поживних речовин у ґрунті, що важливо для формування перегною. Інші актинобактерії мешкають на рослинах і тваринах, включаючи деяких патогенних, таких як мікобактерії, стрептоміцети [350].

Отже, можна зробити висновок, що в усіх проаналізованих зразках ґрунтів відбуваються інтенсивні процеси розкладення органічних речовини – як легкодоступних форм, так і целюлози [26, 38].

Acidobacteria – недавно визначений порядок бактерій. Як указує назва, відомі види типу ацидофільні. Попри те що тип вивчений дуже мало, він – важлива складова багатьох екосистем, особливо ґрунтів. Часто, тобто більш ніж 30 % або навіть 50 % послідовностей мікроорганізмів у зразках ґрунту, згідно з аналізом їх 16S рРНК, належали до цього типу. Вони домінували в молекулярних аналізах вологих ґрунтів і в ризосфері масляних культурних рослин. Окремі послідовності представників *Acidobacteria* також було виявлено в прісноводних середовищах, мікробних матах гарячих джерел, густій багнюці стічних вод, біореакторах очищення стічних вод та інших середовищах.

Хоча тепер порядок *Acidobacteria* містить тільки три описані види: *Acidobacterium capsulatum*, *Geothrix fermentans* і *Holophaga foetida*, та декілька

нещодавно ідентифікованих ізолятів, більшість *Acidobacteria* ще не була культивована і відома тільки за своїми послідовностями 16S рРНК. Фізіологічні дані про цю групу дуже обмежені. Окрім деяких фенотипових рис трьох описаних видів, цей тип поки що тільки відомий одним геном і його відповідною послідовністю в суспільних базах даних (ендо-1-4-бета-ксиланаза бактерії *A. capsulatum*). Засновуючись на філогенетичному аналізі 16S рРНК, *Acidobacteria* може бути розділеним на шість головних груп, які відрізняються до 22 % своїми генами 16S рРНК. Розповсюдженість і велика кількість цих мікроорганізмів піднімає питання їх екологічної ролі і метаболічних процесів, в яких вони беруть участь, особливо в ґрунтових середовищах. Засновуючись на різноманітності їх філогенезу й екологічному розповсюдженні, очікується, що *Acidobacteria* метаболічно і генетично являють собою дуже різноманітну групу, порівняну з такими групами, як Протеобактерії або грампозитивні бактерії.

Представники порядку *Ellin 329* були лише нещодавно ідентифіковані і віднесені до окремої таксономічної групи [148]. Згідно з описом, ізоляти мають фізіологічні ознаки представників класу альфапротеобактерій. Функціональний аналіз указує, що бактерії цього порядку можуть бути залучені до гідролізу полісахаридів, дісахаридів і моносахаридів. Аналізи мікробіомів ґрунту показують, що *Ellin 329* є третім найбільш поширеним порядком і є найпоширенішим поблизу поверхневих шарів, де відбувається розкладання рослинних решток. Загалом члени *Ellin 329*, ймовірно, відіграють важливу роль у розкладанні органічних речовин, у південних апалачських торфовищах і повинні бути вивчені далі в інших торфовищах і типах екосистем.

Багато з представників *Ellin 329* є кислотостійкими облігатними анаеробами. Культури містять грамнегативні, вигнуті палички (діаметр 0,25 мкм і довжину 0,3 мкм). Оптимум розвитку, зазвичай, знаходиться поміж pH 5 і 6,8; за температури 15 °C і 35 °C і менше 100 мМ NaCl [148].

Дані щодо високого вмісту *Ellin 329* підтверджують зроблений раніше висновок щодо інтенсивних процесів розкладання рослинних решток. Фактично можна стверджувати про сформовану в мікробіомі спільноту, спрямовану на розкладання рослинних решток.

Бактерії порядку *Rhizobiales* уже було розглянуто раніше. Його представники відповідають за фіксацію атмосферного азоту і можуть вважатися більше асиміляторами, ніж, на відміну від попередньо описаних порядків, дисиміляторами в описаній спільноті.

Представники порядку *Solibacterales* виділяються, в основному, з територій пасовищ та луків [378]. Як правило, бактерії, що формують названий порядок, мають надзвичайно великий геном. Вважається, що множинні події горизонтального переносу генів пояснюють величину розміру генома, яка характерна для них, і також вважають, що вони сприяють здатності зберігатися в середовищі і розвиватися з плином часу. Це забезпечує конкурентну перевагу, дозволяючи бактеріям використовувати різні екологічні ресурси тощо [95].

Мікроорганізми продукують ферменти для руйнування органічного вуглецю, доступного в навколишньому середовищі, і беруть участь у дисиміляції нітратів і нітритів. Це призводить до певної гетерогенності у відкаданні в субстратах [290].

Форма клітин мікроорганізмів, як правило, філаментна у ґрунті, тоді як і рідкій культурі мікроорагнізми формують шароподібні колонії [290]. У природі бактерії цього порядку, як правило, продукують біоплівку з органічної полісахаридної матриці (екзополісахариди, ЕПС). ЕПС розташовується між ґрунтовими агрегатами і бере участь в обміні іонами з навколишнім середовищем. Продукування біоплівки цими бактеріями може виступати як інженером екосистем у ґрунті, дозволяючи їм формувати свою екологічну нішу, одночасно оптимізуючи вологість і вміст поживних речовин у ґрунтовому середовищі у стресових умовах. Оптимум pH для *Solibacterales* становить

3,5–6,5, вони є факультативними аеробами із хемоорганотрофним вуглецевим типом живлення. Мають повільний метаболізм і зберігаються в середовищі за рахунок продукування біоплівки [290]. Характеризуються великою кількістю аніонно-катіонних симпортерів, що вважається вигідним для організмів, які живуть у середовищі з низьким вмістом поживних речовин [290]. Порівняно з іншими близькоспорідненими *Acidiobacteria*, цей порядок має в 2–4 рази більше транспортерів. Також мають велику кількість вторинних носіїв для транспортування різних інших субстратів, таких як амінокислоти, метали, жирні кислоти, білки [290].

Виробництво целюлози *Solibacterales* сприяє виробництву біоплівки, що підвищує їх життєздатність в умовах екологічного стресу, сприяючи утриманню вологи і забезпеченню аерації ґрунту [266]. Також, згідно з нещодавніми дослідженнями, представниками *Solibacterales* було виявлено синтез целюлази, що сприяє здатності біоплівки формуватися і утримуватися в середовищах, багатих субстратами на основі тривалентного заліза.

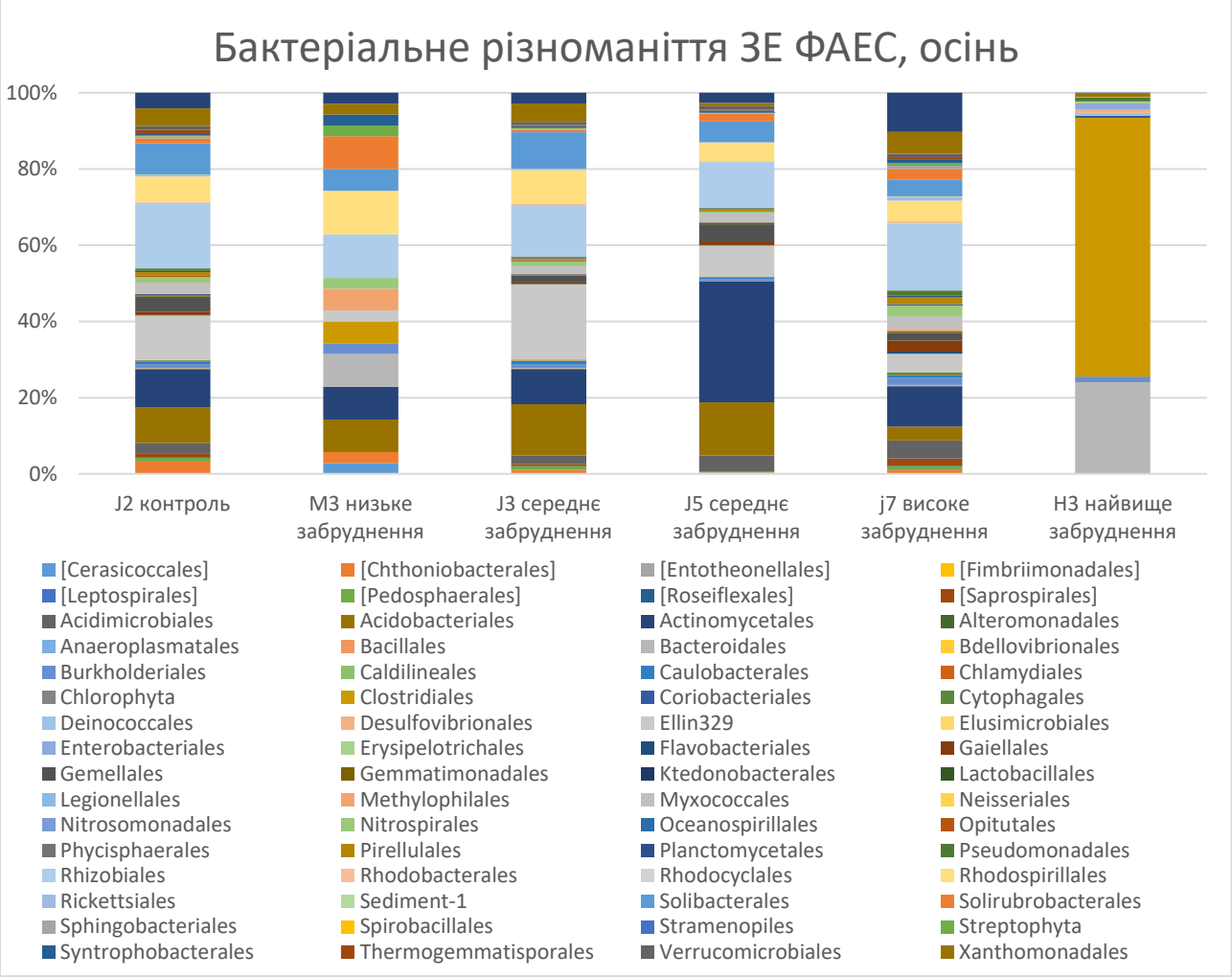


Рисунок 5.16. Біорізноманіття ґрунтової мікрофлори ґрунтів, відібраних із ЗВП ФАЕС восени

Отримані дані свідчать, що восени біорізноманіття ґрунтів ЗВП ФАЕС набагато вище порівняно з дерново-підзолистими ґрунтами Полісся. Хоча тут і присутні загальнохарактерні для ґрунтів порядки бактерій (Актинобактерії, Актиноміцети, Ризобії), зустрічаються і такі, що не властиві ЧЗВ, – Планктоміцети, бактерії порядку Легіонел та ін. Мікробіом ґрунту тут більш вирівняний та збалансований, що свідчить про сприятливіші умови розвитку ґрунту в північній частині Японії порівняно з північною частиною Полісся. В усіх відібраних зразках превалюють Клостридії та Ризобії. Згідно з опублікованими даними, Клостридії – це дуже поліфілетичний порядок *Firmicutes*, включаючи *Clostridium* та інші подібні роди. Вони відрізняються від *Bacilli* тим, що не мають аеробного дихання. Вони є обов'язковими анаеробами,

і кисень є токсичним для них. Види класу *Clostridia* часто, але не завжди грампозитивні і мають здатність утворювати спори. Дослідження показують, що вони не є монофілетичною групою, і їх взаємини не цілком певні. В цей час більшість з них розміщується в одному порядку, що називається *Clostridiales*, але не є природною групою, і, ймовірно, їх буде перевизначено в майбутньому. Оскільки вони зазвичай зустрічаються в ґрунтах і мікробобіоті людей і тварин, індуковані *Clostridia* рани та інфекції можуть бути характерними для всього світу. Хоча організм не має достатньої захищеності, цей мікроб може бути контрольований за допомогою антибіотиків, таких як пеніцилін, і дебридмент тканини для важчих випадків.

Більшість видів роду *Clostridium* є сапрофітними організмами, що зустрічаються в багатьох місцях навколишнього середовища, особливо ґрунтів. Токсини, вироблені деякими членами роду *Clostridium*, є одними з найнебезпечніших відомих. Фактично можна стверджувати про те, що наявність *Clostridium* є індикатором присутності тварин на досліджуваній території.

Планктоміцети (лат. *Planctomycetes*) – тип грамнегативних бактерій, що відрізняються унікальною клітинною структурою, а саме наявністю складної системи замкнутих мембран. Зокрема у деяких представників нуклеоїд знаходиться в ядерному тільці, оточеному подвійною мембраною. Деякі види здійснюють анаеробне окислення амонію – процес анаеробного окислення аміаку, в ході якого утворюється елементарний азот. Порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей 16S рРНК показує, що тип має високий рівень гомології з трьома іншими типами – *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae* і *Lentisphaerae*, утворюючи надтип. Вивчення геномів представників типу *Planctomycetes* дозволяє пролити світло на походження метаногенезу і метілотрофів. Унікальною особливістю геномів представників типу *Planctomycetes* є відсутність оперон структури генів деяких важливих

метаболічних шляхів, що також не характерно для прокаріотів. Порівняння нуклеотидних послідовностей деяких генів показує більший рівень гомології з такими в еукаріотів: наприклад, один ген *Gemmata obscuriglobus* проявляє великий рівень гомології з геном, що кодує білок інтегрин альфа-V, який грає велику роль у трансмембранній передачі сигналу в еукаріотів. Представники *Planctomycetes* мешкають у прісних і солоних водах, є важливими членами ґрунтових угруповань мікроорганізмів. Крім того, вони виявляються в торф'яних сфагнових болотах, мешкають також в анаеробних джерелах, багатих сполуками сірки.

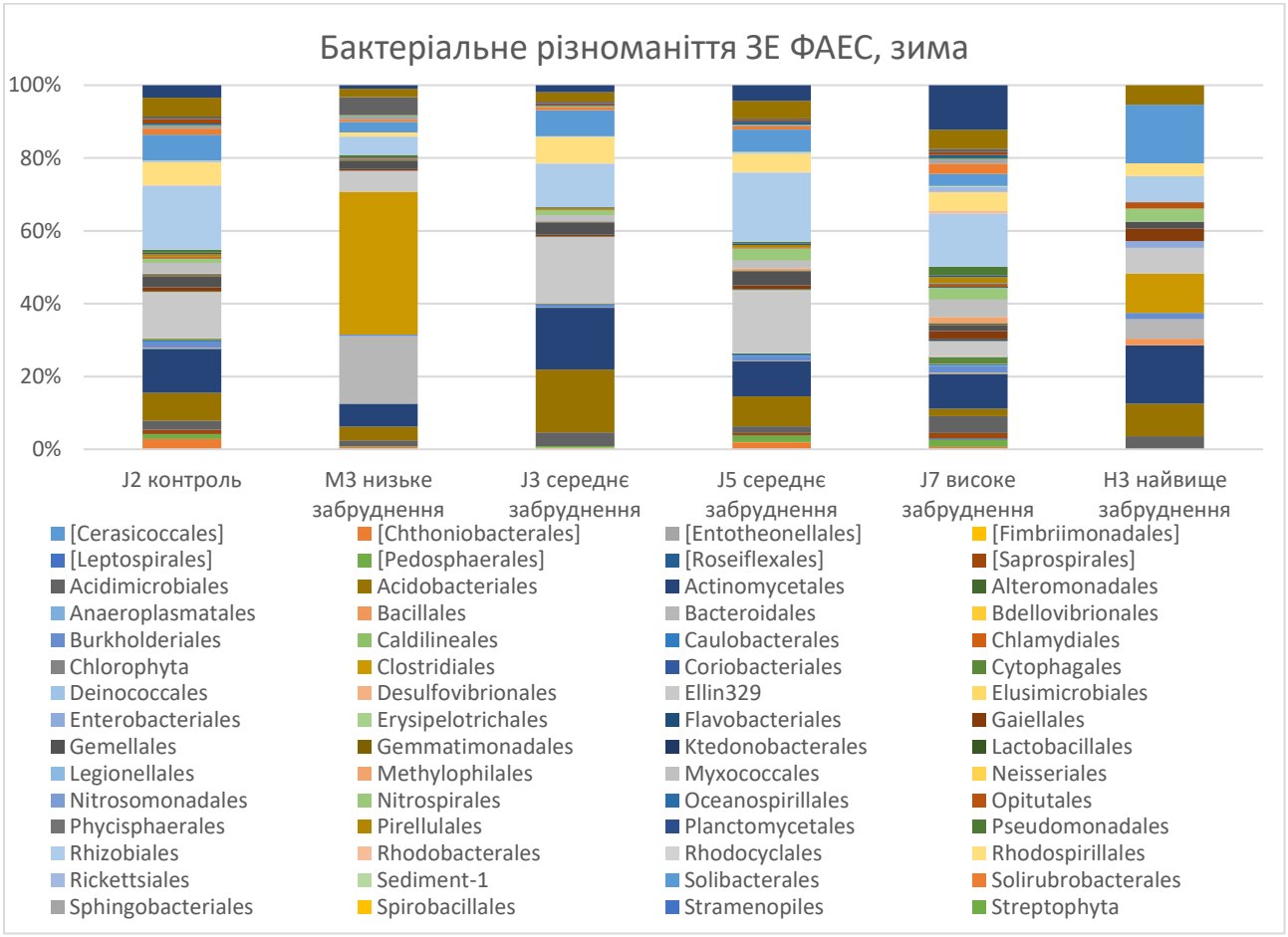


Рисунок 5.17. Біорізноманіття ґрунтової мікрофлори ґрунтів, відібраних із ЗВП ФАЕС узимку (на таксономічному рівні Порядок)

Xanthomonadales є бактеріальним порядком у межах *Gammaproteobacteria*. Вони є однією з найбільших груп бактеріальних фітопатогенів, що містять такі види, як *Xanthomonas citri*, *Xanthomonas*

euvesicatoria, *Xanthomonas oryzae* і *Xylella fastidiosa* [299, 236, 382]. Ці бактерії впливають на важливі для сільського господарства рослини, зокрема помідори, банани, цитрусові рослини, рис і каву. Багато видів усередині Порядку також є патогенами людини. Види в межах роду *Stenotrophomonas* є мультирезистентними опортуністичними патогенами, які відповідають за внутрішньолікарняні інфекції в імунодефіцитних пацієнтів. Ксантомонас є джгутикоподібною кліткою, що має форму палички, яка дозволяє бактерії рухатися по всій інфікованій рослині. Ксантомонас залежить від системи секреції білка типу III, яка спирається на транспортні білки, секретуючи кілька білків гіперчутливої реакції і зовнішні білки, що викликає взаємодію з рослиною [340].

5.7 Метрики альфа біорізноманіття мікробіомів ЗВП ФАЕС

Детальний опис метрик альфа-різноманіття був наданий у розд. 3.5. Альфа-різноманітність використовується для вимірювання різноманітності у вибірці і відповідає на питання «скільки?». Це дозволяє розглянути кількість різних таксонів у кожному зразку окремо. Якщо зразок має велику альфа-різноманітність, він містить багато організмів. Існує кілька методів, за допомогою яких можна розглянути та зрозуміти альфа-різноманітність.

Говорячи про альфа-різноманітність, ми розглядаємо дві речі:

Багатство видів – підрахунок кількості різних видів, присутніх у зразку. Він не враховує чисельності видів або їх відносного розподілу. Найкращими індексами для такої оцінки є індекс Шеннона, індекс Сімпсона та PD_whole tree – загальний показник довжини гілок філогенетичного дерева.

Вирівняність розподілу видів – міра відносної чисельності різних видів, що складають багатство. Для оцінки цього показника були розраховані індекси домінування та chao1.

Філогенетичне різноманіття (PD) – це показник біорізноманіття, заснований на філогенезі (дереві життя). Faith [129] визначив філогенетичне різноманіття сукупності видів як рівну сумі довжин усіх тих гілок на дереві, які охоплюють представники вибірки. Довжини гілок на дереві інформативні, оскільки вони враховують відносну кількість нових ознак, що виникають уздовж цієї частини дерева (табл. 5.6). Це означає, що PD вказує на «різноманітність ознак» та «значення опції».

Таблиця 5.6. Сезонна динаміка довжини гілок філогенетичного дерева, розрахована для мікробіомів ґрунтів, відібраних з території ЗВП ФАЕС

Довжина гілок філогенетичного дерева	**Літо**	**Осінь**	**Зима**	**Весна**
J2, контроль	213	126	10	116
M3, низьке забруднення	188	177	151	172
J3, середнє забруднення	186	183	199	190
J5, середнє забруднення	27	183	188	133
J7, високе забруднення	106	8	25	46
H3, найвище забруднення	203	243	242	229

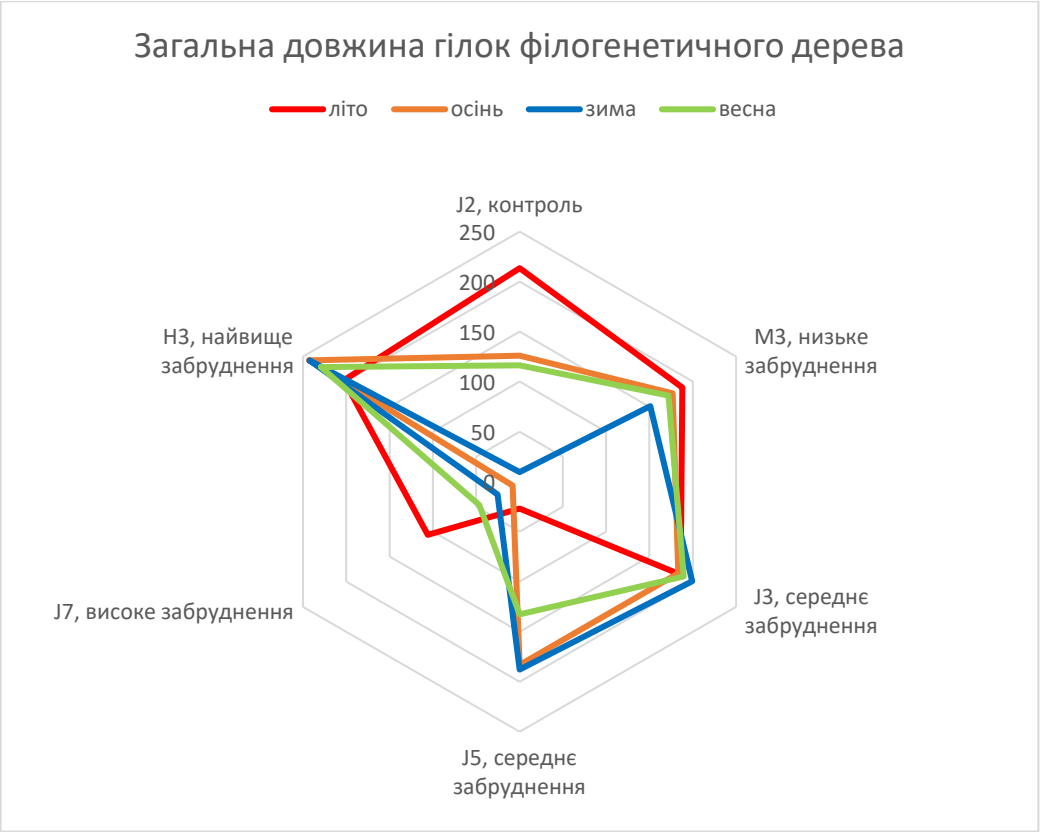


Рисунок 5.18. Сезонна динаміка довжини гілок філогенетичного дерева, розрахована для мікробіомів ґрунтів, відібраних з території ЗВП ФАЕС

Показник PD_whole_tree (довжина гілок філогенетичного дерева) показує довжину гілок таксономічного дерева, що було згенероване в результаті аналізу з-поміж цілого аналізованого мікробіому. З отриманих даних також можна зробити висновок (рис. 5.18), що індекс таксономічної віддаленості ґрунтів ЗВП ФАЕС коливається в істотних рамках: від 229 умовних одиниць навесні в точці низька доза (M3) до лише 8 в точці з високим забрудненням (J7). Істотну варіацію тут показують діаметральні точки з контрольним (J2) і високим забрудненням (J7). Так надзвичайно мала довжина гілок дерева у зразку J7 свідчить про значну таксономічну спорідненість усіх представників мікробіоти взимку.

Порівняно з ґрунтами ЧЗВ, можна сказати, що таксономічне різноманіття відібраних в Японії зразків ґрунту є істотно вищим.

Для узагальненої оцінки сезонної динаміки різноманіття популяцій використовували індекс різноманіття Шеннона. Цей індекс узагальнює різноманітність популяції, припускаючи, що у кожній вибірці представлені всі види і розподілені вони за нормальним розподілом. Індекс Шеннона збільшується в міру зростання як багатства, так і рівномірності спільноти. При розрахунках ентропії за Шенноном вважається, що кожна проба – випадкова вибірка із сукупностей, а співвідношення відів у зонді відображає їх реальне співвідношення в природі.

Таблиця 5.7. Сезонна динаміка індексу різноманітності Шеннона, розрахована для мікробіомів ґрунтів, відібраних з території ЗВП ФАЕС

Індекс різноманіття Шенона	Липень	Жовтень	Лютий	Квітень
J2, контроль	10,2	7,4	5,8	7,80
M3, низьке забруднення	9,8	9,5	9,0	9,40
J3, середнє забруднення	9,9	9,8	9,9	9,87
J5, середнє забруднення	8,2	9,6	9,6	9,12
j7, високе забруднення	8,5	5,1	7,4	7,02
H3, найвище забруднення	9,8	10,5	10,8	10,39

У представлених даних індекси Шеннона найбільш істотно коливаються в точці з високим забрудненням (J7) та на контролі (J2) (табл. 5.7), будучи приблизно однаковими на решті точок. З таких даних можна зробити висновок про схожі рівні мікробіологічного різноманіття популяцій на точках з низьким забрудненням (M3), середнім забрудненням (J3 та J5) та найбільшому забрудненому зразку (H3), коливаючись у межах від 9,1 до 9,9 незалежно від сезону. Водночас варіації видового багатства на точці з найбільшою поглинутою дозою (J7) становлять від 5,1 до 8,5, а на контрольній точці (J2) контроль навіть більше – 5,8 узимку і 10,2 влітку (див. рис. 5.17). Для детальнішого розгляду внеску окремих видів у різноманіття було обраховано індекс Сімпсона (рис. 5.19, табл. 5.8).

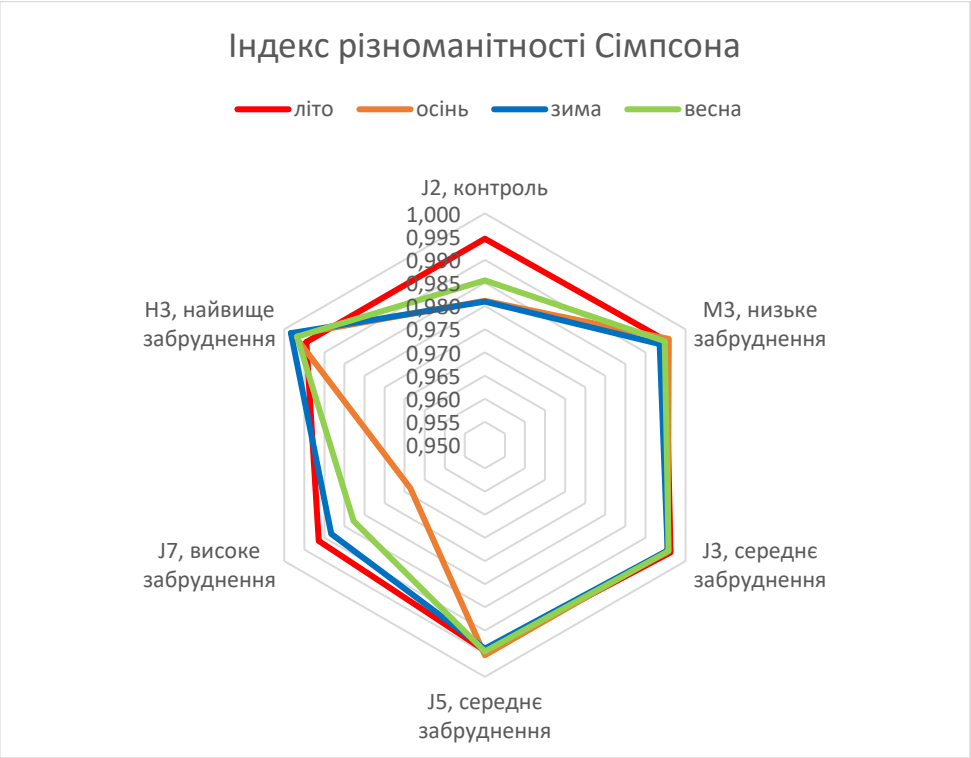


Рисунок 5.19. Сезонна динаміка індексу різноманітності Шеннона, розрахована для мікробіомів ґрунтів, відібраних із території ЗВП ФАЕС

Індекс різноманітності Сімпсона використовується для обчислення міри різноманітності з урахуванням кількості таксонів, а також чисельності кожного таксону у вибірці. Індекс Сімпсона надає більшу вагу звичайним або домінантним видам, що означає, що кілька рідкісних видів з лише кількома представниками не вплинуть на різноманітність вибірки.

Таблиця 5.8. Сезонна динаміка індексу Сімпсона, розрахована для мікробіомів ґрунтів, відібраних із території ЗВП ФАЕС

Індекс різноманітності Сімпсона	Літо	Осінь	Зима	Весна
J2, контроль	0,995	0,981	0,981	0,99
M3, низьке забруднення	0,995	0,996	0,994	0,99
J3, середнє забруднення	0,996	0,996	0,996	1,00
J5, середнє забруднення	0,994	0,995	0,994	0,99
J7 високе забруднення	0,991	0,969	0,988	0,98
H3 найвище забруднення	0,994	0,998	0,998	1,00

Індекс Сімпсона коливається незначно – у межах від 0,99 до 1,0, що свідчить про те, що видове багатство, як і частота спостереження окремих видів в усіх аналізованих мікробіомах, знаходиться приблизно на однаковому високому рівні. Водночас підтверджуючи розраховані за індексом Шеннона дані, різноманіття мікроорганізмів на точках J7 і J2 варіюється. Втім варіація складає від 0,969 до 0,991 для J7 та від 0,982 до 0,995 для J2, що не дає підстави для твердження про істотні варіації у вирівняності вибірки.

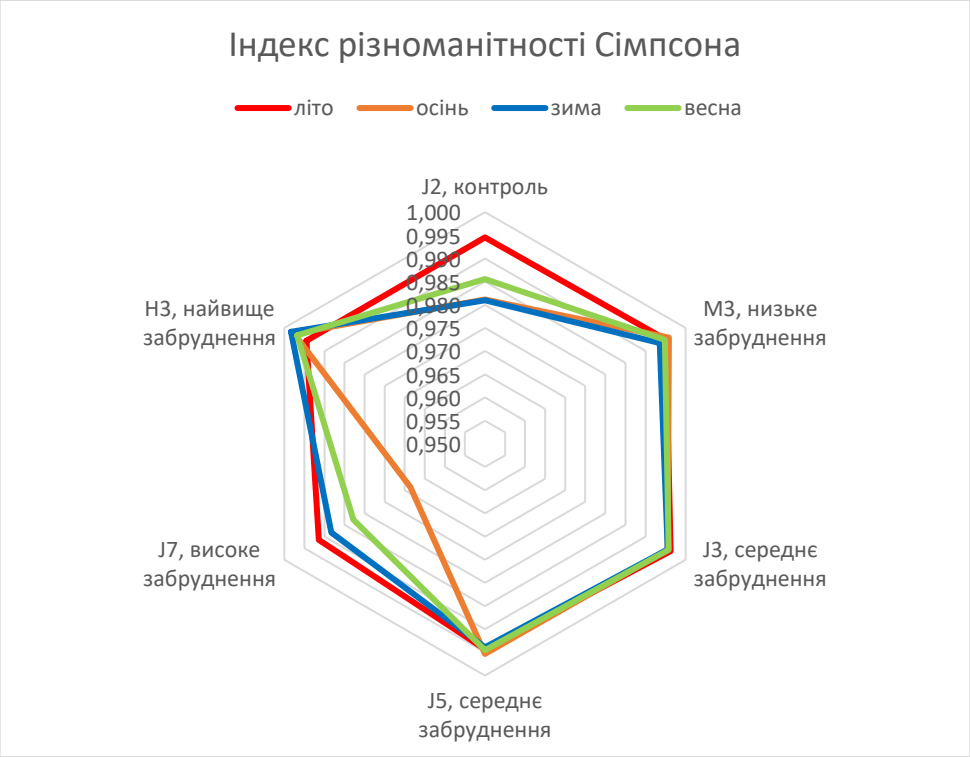


Рисунок 5.20. Сезонна динаміка індексу Сімпсона, розрахована для мікробіомів ґрунтів, відібраних із території ЗВП ФАЕС.

У відповідь на потреби сучасної мікробної екології, що оперує великими обсягами даних, у 2001 році було розроблено новий індекс, що є чутливішим до представленості рідкісних видів, а отже, і загальної вирівняності досліджуваної популяції. Chao1[159] – це індекс для оцінки різноманіття, що більш чутливо враховує наявність рідкісних, малочисельних видів у вибірці.

Таблиця 5.9. Сезонна динаміка індексу chao1, розрахована для мікробіомів ґрунтів, відібраних з території ЗВП ФАЕС

chao1	Літо	Осінь	Зима	Весна
J2, контроль	8105	4257	387	4249
M3, низьке забруднення	6723	6770	7663	7052
J3, середнє забруднення	6916	6392	5588	6299
J5, середнє забруднення	924	7289	7032	5081
J7, високе забруднення	7552	9084	9117	8584
H3, найвище забруднення	3733	596	846	1725

Таким чином, сезонна динаміка chao1 у пробах ґрунтів, відібраних у ЗВП ФАЕС (рис. 5.20, табл. 5.9.), має трохи яскравіше виражену структуру. Попри те що загальна тенденція зберігається – J2 контроль та J7 висока доза мають істотні варіації в індексі – ми бачимо трохи промовистіші варіації у решті точок. Так J3 середня доза і M3 низька доза тут показують більш відчутні сезонні коливання. Для прояснення картини було вирішено використати індекс домінування.

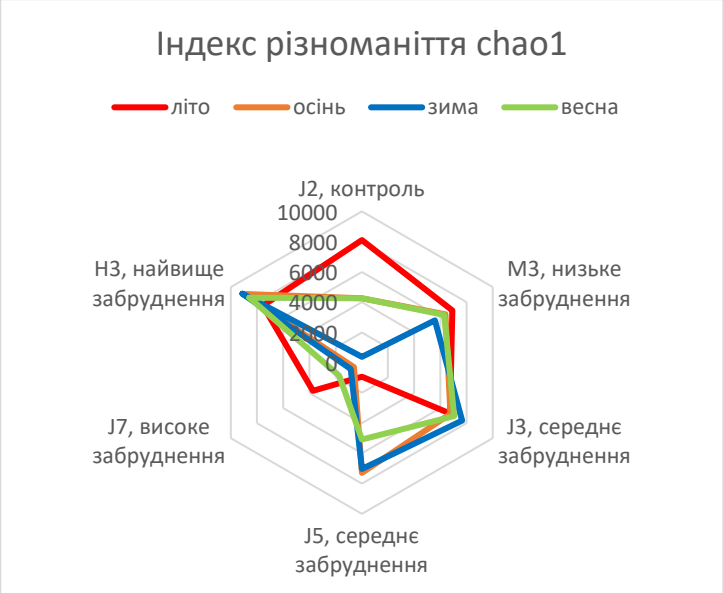


Рисунок 5.21. Сезонна динаміка індексу chao1, розрахована для мікробіомів ґрунтів, відібраних із території ЗВП ФАЕС

Як і можна було очікувати, показники I_D мають доволі виражену сезонну структуру (рис. 5.21, табл. 5.10) – найнижчі показники характерні для зразків, відібраних улітку – що свідчить про вирівняність і буферність спільнот у цих зразках, тимчасом як для J2 та J7 показники істотно вищі. Це добре співвідноситься з отриманими вище даними і свідчить про тенденцію до наявності домінуючих представників у точці J7 восени та в точці J2 восени та взимку.

Таблиця 5.10. Сезонна динаміка індексу домінування I_D, розрахована для мікробіомів ґрунтів, відібраних із території ЗВП ФАЕС

Індекс домінування I_D	**Літо**	**Осінь**	**Зима**	**Весна**
J2, контроль	0,005	0,019	0,019	0,014
M3, низьке забруднення	0,005	0,004	0,006	0,005
J3, середнє забруднення	0,004	0,004	0,004	0,004
J5, середнє забруднення	0,006	0,005	0,006	0,005
J7, високе забруднення	0,009	0,031	0,012	0,017
H3, найвище забруднення	0,006	0,002	0,002	0,003

Утім абсолютні значення I_D не перевищують 0,031 (рис. 5.22), що є суттєво нижче за 0,5 умовних одиниць, що вважаються порогом для ствердження про наявності домінантів у спільноті.

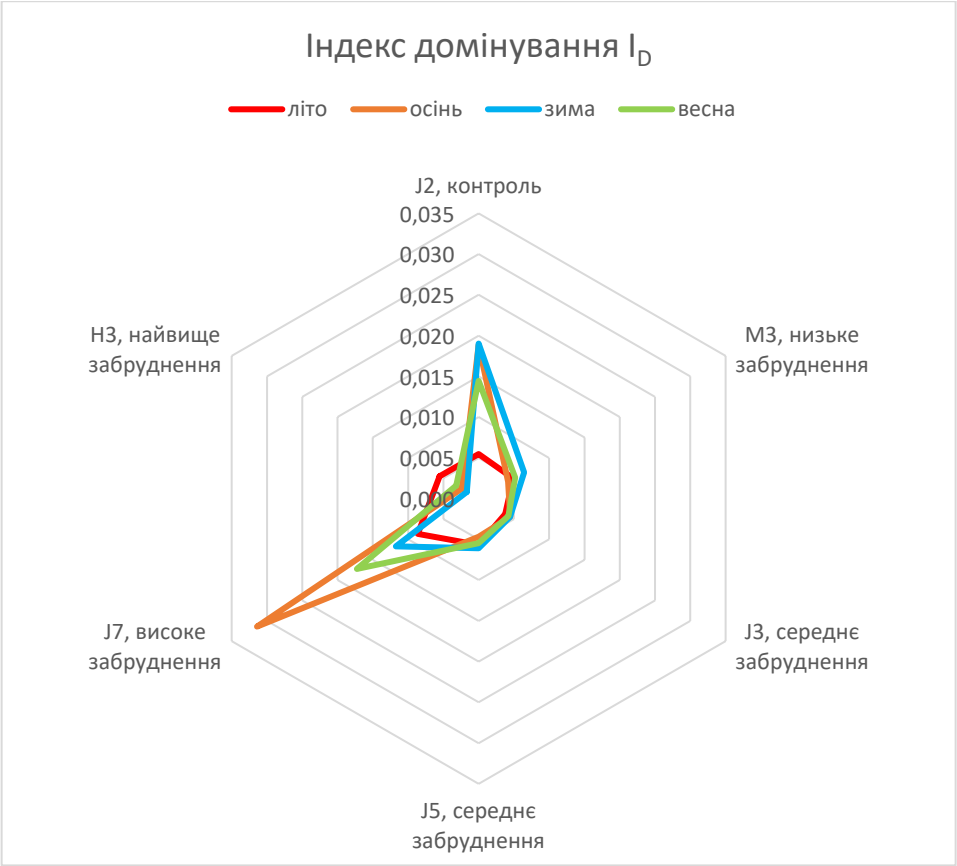


Рисунок 5.22. Сезонна динаміка індексу домінування I_D, розрахована для мікробіомів ґрунтів, відібраних із території ЗВП ФАЕС

Таким чином, згідно з результатами аналізу метрик альфа-різноманіття ґрунтів ЗВП ФАЕС, мікробіоми досліджених зразків виявилися значною мірою стабільними та рівномірними.

5.8 Метрики бета-різноманіття мікробіомів ґрунтів ЗВП ФАЕС

Подібно до альфа-різноманіття, бета-різноманіття зростає зі збільшенням часу еволюції за рахунок того ж процесу «упаковки» гіпероб'ємів популяцій, у гіперпросторі місць існування, тобто сукупності екологічних факторів ландшафту.

Що вище бета-різноманіття, то більше синтаксономічних одиниць можна виділити при класифікації рослинності досліджуваного ландшафту. Найпростішою мірою для оцінки бета-різноманіття є відношення числа видів у всіх біоценозах до числа видів у середньому на один біоценоз. Бета-

різноманіття може бути виміряне через число встановлених асоціацій одного рангу. Можливе використання і складніших прийомів [134].

Для аналізу бета-різноманіття використовували метод аналізу основних координат (PCoA, = багатовимірне масштабування) – це метод для вивчення та візуалізації подібностей або невідповідностей даних [232, 133]. Він базується на побудові з матриці подібності або матриці відмінності (= матриця відстані) і призначає для кожного пункту розташування в маломірному просторі, наприклад як 3D-графік.

PCoA намагається знайти основні осі шляхом побудови матриці. Це свого роду аналіз, який побудовано на координатах, сформованих на базі наявних даних (іноді називають «розкладанням однозначного значення»), і який обчислює серію власних значень та власних векторів. Кожне власне значення має власний вектор, і є стільки власних векторів та власних значень, скільки є рядків у початковій матриці.

Властивості зазвичай оцінюються від найвищого до найменшого. Перше власне значення часто називають «домінантним» або «провідним» власним значенням. Використовуючи власні вектори, ми можемо візуалізувати основні осі через початкову матрицю відстані. Власні значення також часто називаються «прихованими значеннями».

Використовуючи PCoA, ми можемо візуалізувати окремі та / або групові відмінності. Індивідуальні відмінності можуть бути використані для демонстрації викидів. Цей метод – набір методів аналізу даних, який показує структуру комплексних даних про відстань (матриця відмінності) у високорозмірному просторі без втрати інформації. Мета PCoA – правильно представити ці відстані в найкращій можливій просторовій розмірності. Графіки PCoA є тривимірними. Для коректного відображення отриманих даних відображено всі три згенеровані проекції.

Для побудови метрики основних координат з метою аналізу бета-різноманіття для мікробіомів ґрунтів, відібраних із ЗВП ФАЕС, було взято такі координати – PC2 – радіонуклідне забруднення зразка, PC1 – таксономічна відстань усередині зразка та PC3 – кількість OTU в кожному зі зразків (рис. 5.23). Так з отриманих даних видно, що: зразки відібрано на найбільш забрудненій радіонуклідами території; зразки відібрано в кожен з досліджених сезонів – SH3, FH3, FJ7 – знаходяться в одній площині, хоч і на порівняно великій відносній відстані один від одного. Тут також видно, що ґрунти, відібрані з точки з найвищим забрудненням (H3), майже в кожний сезон мають найбільше видове багатство і найбільшу філогенетичну відстань між представниками мікробіому.

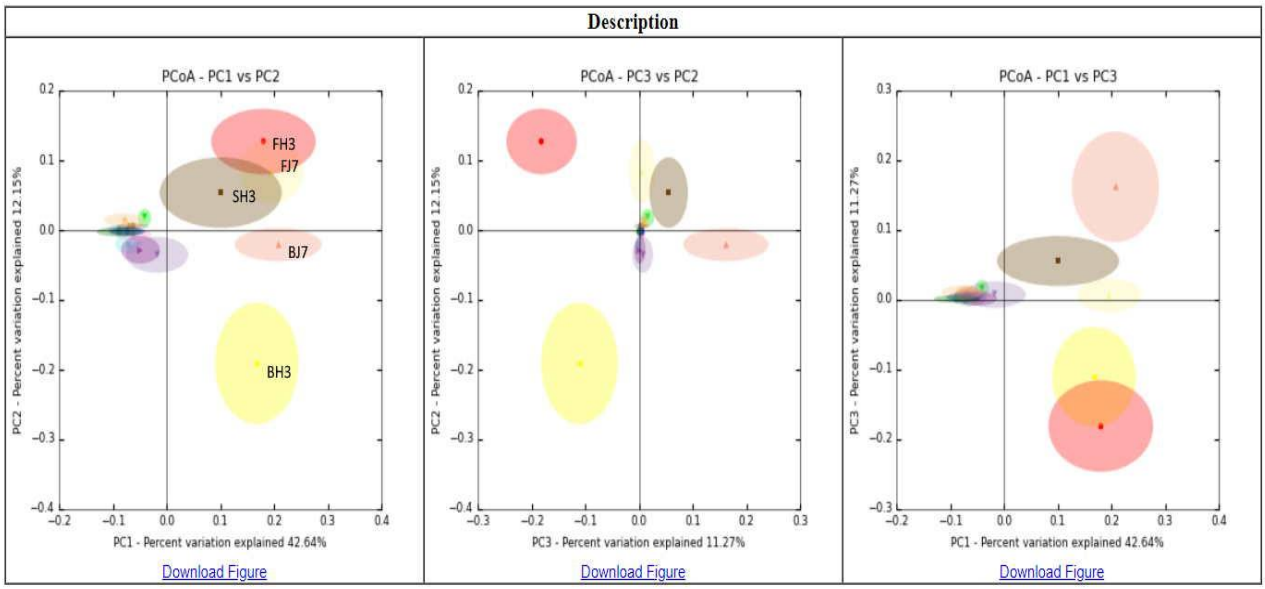


Рисунок 5.23. Бета-різноманіття ґрунтів зони відчуження ЗВП ФАЕС

З отриманих даних можна зробити висновок, що радіонуклідне забруднення у дозах, сформованих після аварії на ЗВП ФАЕС, не має істотного впливу на загальну структуру мікробіому ґрунту – хоча для уточнення деталей щодо структури і функціонального стану мікробіому потрібні подальші дослідження. Водночас існує низка факторів, пов’язаних з аварією на АЕС, які і можуть безпосередньо впливати на мікробіом.

Натомість очевидною видається інша тенденція: мікробіоми ґрунтів Японії значною мірою вирівняні всередині між собою, хоч і мають істотну сезонну різницю. Таким чином, висновок щодо різниці в таксономічному та функціональному складі ґрунтових мікроорганізмів на досліджуваних територіях є закономірним – але питання щодо факторів, залучених у формування такої різниці, залишається відкритим.

5.9 Вплив факторів навколишнього середовища на мікробні спільноти ґрунтів, відібраних із територій ЗВП ФАЕС

Але найважливішим для описуваного дослідження була перевірка гіпотези щодо наявності залежності бактеріального різноманіття від вмісту азоту й потужності поглинутої дози. Аналіз надлишковості проведений на значно більшій вибірці (24 зразки замість 6 із ЧЗВ), з набагато більшою кількістю залежних змінних (у зразках із ЗВП ФАЕС на таксономіному рівні Порядок було ідентифіковано 65 представників ґрунтової мікрофлори порівняно із 17 для ЧЗВ) а також більшою вирівняністю показників незалежних змінних (навіть беручи до уваги сезонні коливання у вмісті поживних речовин, проби із ЗВП ФАЕС були більш вирівняними).

Оцінка впливу радіонуклідного забруднення на мікроорганізми ґрунту видається неможливою без одночасної оцінки впливу решти факторів навколишнього середовища. Так, з огляду на викладені вище висновки щодо відсутності прямого зв’язку між дозами, сформованими поставарійними випадіннями радіонуклідів та таксономічним різноманіттям мікрофлори, необхідним є інтегральний аналіз впливу факторів навколишнього середовища на цей показник.

Екологічна статистика пропонує низку мультифакторних статистичних аналізів, що дають змогу дослідити подібні питання [262].

Для оцінки впливу метаданих та радіонуклідного забруднення було обрано наступну матрицю (табл. 5.11). З наявних метаданих шляхом простого

кореляційного аналізу відібрано лише ті, що показали тенденцію до впливу на таксономічну структуру зразків. Для диференціації типу екосистем введено якісний показник типу екосистеми, де біоценози Рудого лісу вважалися антропогенно зміненими, тимчасом як решта ґрунтів – природними.

Таблиця 5.11. Матриця змінних для проведення мультифакторних аналізів ЗВП ФАЕС

№ з/п	Фактор	Тип змінної	Клас змінної	Кількість рядків	Кількість стовпців
1	OTU, представники порядку	залежна	кількісна	24	65
2	Потужність поглинутої дози, мкГр/год	незалежна	кількісна	24	1
3	Вологість, %	незалежна	кількісна	24	1
4	Вміст NH_4	незалежна	кількісна	24	1
5	Вміст гумусу	незалежна	кількісна	24	1
6	Тип екосистеми (ліс / антропогенно змінена траншея)	незалежна	якісна	24	1

В метагеномних дослідженнях вважається доцільним використовувати ординаційні методи для аналізу впливу зовнішніх компонентів екосистеми на структуру популяції – такі методи можуть бути як однофакторними (PCoA,

PCA та ін.), так і багатофакторними. Найдоцільнішим вважається використання таких аналізів, як канонічний аналіз відповідності (canonical correspondence analysys, CoCA) та аналіз надлишковості (redundancy analysys, RDA).

Методи ординації – це група мультифакторних статистичних підходів, які намагаються упорядкувати об'єкти на основі значень змінних, виміряних для цих об'єктів [262]. Ординаційні методи також часто називаються градієнтними методами, оскільки ці алгоритми демонструють основні градієнти варіації в багатовимірному просторі даних, а потім розміщують об'єкти в новій системі координат за кожним градієнтом, що візуалізується як осі. Таким чином, велика матриця даних може бути відображена всього у 2 або 3 вимірах з відносним розташуванням об'єктів, що представляють відносини між змінними, виміряними в цих об'єктах. Це зменшення розмірності в поєднанні з простою інтерпретацією візуального розподілу об'єктів на рисунку (близькі об'єкти мають подібні значення змінних, віддалені об'єкти – різні) роблять ординаційні методи популярним вибором в екологічних дослідженнях.

Канонічний аналіз відповідності (CCA) є одним з багатьох методів, які дозволяють вивчити взаємозв'язок між двома наборами змінних. Цей метод широко використовують в екології, але він витісняється RDA (аналіз резервування). Фактично CCA був першим типом аналізу, що був застосований у популяційній екології для демонстрації складних взаємозв'язків між біологічними та геохімічними показниками в екосистемі [262]. Основними вимогами для отримання валідних результатів CCA є незалежність та випадковість аналізованих змінних. Крім того, дані мають бути поділені на категорії, а незалежні змінні бути відібрані в межах сайту вибірки та не містити «missing data» – пустих клітинок. Саме остання вимога унеможливлює валідний аналіз отриманих нами даних за методом CCA – у відібраних у ЧЗВзразках представлено не всі таксони. А аналіз надлишковості є фактично ще одним

різновидом мультифакторного статистичного аналізу, але з можливістю ігнорувати пропущені дані.

Аналіз надлишковості (RDA) був розроблений [356] як альтернатива канонічному кореляційному аналізу (CCA). RDA дозволяє вивчати взаємозв'язок між двома таблицями змінних *Y* і *X*. У RDA, на відміну від CCA, змінна *X* не має повністю корелювати зі змінними з таблиці *Y*. Також RDA дозволяє працювати з пустими клітинками у таблиці змінних *X*, що уможливлює отримання валідних аналізів для метагеномних даних.

Принципи RDA. Таблиця метаданих *Y* містить незалежні змінні з *n* (у випадку ЧЗВ– 5,) спостереженнями та *p* (5) змінними (табл. 5.11). Ця таблиця може бути проаналізована за допомогою аналізу основних компонентів для отримання одночасної карти спостережень і змінних у двох або трьох вимірах.

Таблиця *X* містить значення змінної, отримані для тих самих *n* спостережень з *q* кількісними та / або якісними змінними.

Аналіз надлишковості дозволяє отримати одночасне представлення спостережень змінних *Y* і змінних *X* у двох або трьох вимірах, що є оптимальним для критерію коваріації.

Аналіз надлишковості можна розділити на дві частини: кількісний аналіз у просторі, число розмірностей якого дорівнює min ($n-1$, p, q). Ця частина є основною, оскільки вона відповідає аналізу відношення між двома таблицями; якісний аналіз, що відповідає аналізу залишків. Кількість розмірів для якісного RDA дорівнює min ($n-1$, p) [80, 377].

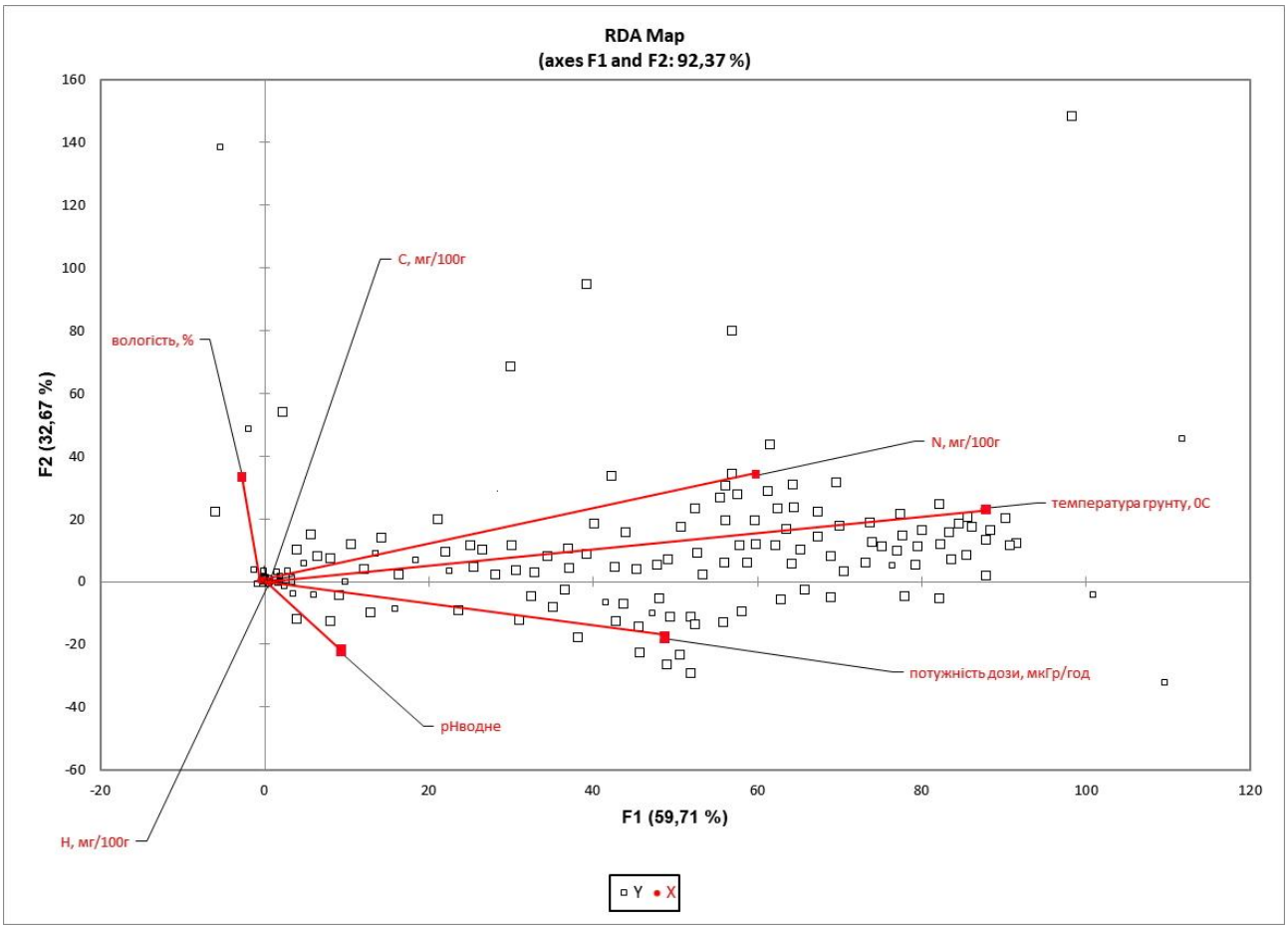


Рисунок 5.24. Матриця аналізу надлишковості для мікробіомів ЗВП ФАЕС, зорганізованих на рівні Порядок (достовірно при $p = 0,05$)

Відстань між точкою відбору та представниками порядку на тривимірному графіку свідчить про чисельність представника цього порядку на цій ділянці, отже, чисельність представників порядку є максимальною, якщо точка відбору проби збігається з точкою порядку [262]. Відповідно що далі точка представника порядку від точки відбору проби – то менше вірогідність знайти його на цій території.

Таблиця 5.12. Значення обрахованих коефіцієнтів канонічності для описової статистики аналізу надлишковості мікробіомів ЗВП ФАЕС

Незалежна змінна	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Вологість, %	0,499	0,708	0,263	0,533	1,074	−0,160	0,274	0,120
pH водне	0,121	0,427	0,797	−0,402	1,049	0,279	0,154	−0,310

N, мг/100г	−1,379	1,639	2,968	−1,366	2,718	2,780	−2,118	−1,070
C, мг/100г	−5,592	−0,516	1,646	0,165	−2,001	−0,728	−1,552	−2,835
H, мг/100г	8,069	−1,121	−4,057	0,972	−0,404	−2,018	3,456	4,125
Температура ґрунту, °C	0,107	0,713	0,445	0,151	1,393	−0,025	−0,044	−0,013
Концентрація ДНК	1,502	0,077	−0,205	0,226	0,395	−0,254	0,234	0,174
Потужність дози, мкГр/год	0,3725	0,7542	-0,988	0,383	−0,954	−1,074	−0,035	0,312

Інтерпретацію кількісних екологічних змінних можна підсумувати так: «стрілка в напрямку максимальної зміни значення асоційованої змінної, а довжина стрілки пропорційна максимальному рівню зміни змінної» [80, 262]. Таким чином, змінні «потужність дози», «C», «вологість», «N», «температура ґрунту» позначають рівень впливу факторів навколишнього середовища на кількість представників певного порядку, що узгоджується з напрямком стрілки. Виходячи з отриманих даних видно, що на кількість представників певних порядків майже в рівній мірі впливають вміст азоту та потужність поглинутої дози, що узгоджується з даними наших попередніх досліджень [29]. Відносне розташування змінної «температура ґрунту» використовується нами для кількісної диференціації сезонної динаміки – ранжири температур ґрунту протягом проаналізованих сезонів (літо, осінь, зима, весна) – достовірно відрязняються одне від одного і можуть бути використані в такій якості. Розташування точок представників порядку вказує на розташування видів на цих точках. Так видно чітку тенденцію до залежності представленості мікробоценозу від температури ґрунту. Водночас достовірно показано тенденцію до залежності таксономічного складу мікробоценозів від вмісту азоту у ґрунті та потужності поглинутої дози.

Висновки до розділу 5

Резюме. Вперше наведено характеристику бактеріального різноманіття бурих лісових ґрунтів північної частини японського острова Хонсю. Кількість представлених таксонів свідчить про складність та усталеність процесів, що відбуваються в досліджених ґрунтах, а показники альфа- та бета-різноманіття – про їх клімаксність та буферність. Показано значну сезонну динаміку в усіх метриках видового багатства, а відсутність домінантів свідчить про врівноваженість процесів. Аналіз надлишковості, проведений з урахуванням сезонної динаміки, підтверджує гіпотезу щодо сумісного впливу вмісту доступного азоту та потужності поглинутої дози в ґрунті на структуру мікроценозу, але демонструє чітку сезонну детермінованість спільнот.

1. Агрохімічні характеристики ґрунтів ЗВП ФАЕС. Ґрунти досліджених ділянок належать до бурих лісових ґрунтів із кислотністю, що варіює від слабокислої (pH 4,1) до майже нейтральної (pH 6,4). Вміст азоту становить від 0,41 до 1,48 мг/100 г ґрунту, що свідчить про низький рівень забезпеченості поживними речовинами. Вміст вуглецю варіює від 6,35 мг/100 г у високо забруднених зразках до 35,13 мг/100 г у зразках із низьким рівнем забруднення, що відображає неоднорідність органічної біомаси. Загалом ґрунти характеризуються типовими для бурих лісових ґрунтів властивостями, що мінімізує вплив агрохімічних відмінностей на мікробні угруповання.

2. Просторово-сезонна динаміка радіонуклідів і їхній вплив на структуру мікробіому. Рельєф і сезонність відіграють ключову роль у просторовому перерозподілі радіонуклідів. На рівнинних територіях спостерігалося накопичення забруднювачів, тоді як у регіонах зі схилами радіонукліди переносилися горизонтально й вертикально через інтенсивний поверхневий стік, особливо під час сезонних дощів і танення снігу. Максимальне біорізноманіття зафіксовано восени, коли вологість і температура ґрунту є найбільш сприятливими для розвитку мікроорганізмів. Зимовий період

характеризується мінімальною активністю мікробіому через низькі температури. Загальна кількість ідентифікованих таксономічних одиниць (OTU) варіює від 55 (контрольна точка J2, зима) до 7239 (точка H3, найвища доза, осінь). На ділянках із високим забрудненням спостерігається зростання видового багатства восени, зокрема через активізацію таких груп, як *Actinomycetales*, *Rhizobiales* та *Acidobacteriales*, які забезпечують розклад органічних речовин і підтримання стійкості спільнот до стресових умов.

3. За результатами аналізу альфа-різноманітності виявлено значну стійкість і консервативність мікробіомів досліджуваних зразків: варіювання в індексі Шеннона та індексі Сімпсона в усіх точках, окрім J2 контроль та J7 висока доза, були лише незначними, тимчасом як навіть відчутні сезонні варіювання цих індексів у зразках J2 контроль та J7 висока доза свідчать про динамічність їх бактеріального складу. Аналіз довжини гілок філогенетичного дерева свідчить про істотну таксономічну варіабельність мікробіомів усіх відібраних зразків. Цей показник також демонструє сезонну динаміку, маючи аномально низький показник (8 умовних одиниць) у зразку J2 контроль, відібраному взимку. Розрахунок індексу домінування для всіх зразків показав тенденцію до оформлення домінантного порядку бактерій лише у зразку J7 висока доза, відібраному восени (I_D = 0,035, тимчасом як домінантним вважається вид, що має $I_D \geq 0,5$). Значення індексу домінування для решти відібраних зразків не перевищувало 0,02, що свідчить про збалансованість спільноти і відсутність чітких домінантів.

4. Аналіз надлишковості з урахуванням сезонної динаміки. Аналіз надлишковості підтвердив гіпотезу щодо спільного впливу вмісту азоту та потужності поглинутої дози на структуру мікроценозів. Зокрема, встановлено, що на рівень видового багатства значно впливає не лише радіонуклідне забруднення, але й доступність азоту як поживної речовини. У той же час спільноти демонструють чітку сезонну детермінованість: найбільше

різноманіття спостерігається восени, тоді як у зимовий період активність мікробіому значно знижується. Це підтверджує ключову роль зовнішніх факторів у формуванні структури мікроорганізмів

5. Порівняння мікробіомів ЧЗВ та ЗВП ФАЕС. Бактерії, що превалюють у ґрунтах ЧЗВ, – це переважно представники *Actinobacteria* та *Alphaproteobacteria*. Ці угруповання мають унікальну здатність до адаптації в умовах радіонуклідного забруднення завдяки активним метаболічним шляхам, спрямованим на утилізацію органічних сполук та стійкість до стресових факторів, таких як іонізуюче випромінювання. У той же час, у ґрунтах ЗВП ФАЕС домінують представники *Clostridia* та *Actinobacteria*. Ця різниця в домінуванні бактерій відображає як екологічні особливості кожного регіону, так і вплив антропогенних факторів. Зокрема, високий рівень присутності Клостридій у зоні ЗВП ФАЕС вказує на більшу роль анаеробних процесів у формуванні мікробних спільнот, що, ймовірно, пов’язано із меншою тривалістю впливу радіонуклідів, значними змивами забруднень через рельєф та гідрологічні умови. У той же час, присутність Актинобактерій у ґрунтах обох зон свідчить про їхню універсальну роль у переробці органічної речовини, адаптації до стресу та регуляції екосистемних процесів. Відмінності у складі мікробіомів також відображають інтенсивність антропогенного навантаження. У зоні Фукусіми ґрунти зазнали впливу більш короткочасного, але інтенсивного забруднення, що спричинило формування специфічних анаеробних угруповань. Натомість у ЧЗВ радіонуклідне забруднення триває вже понад 35 років, створивши умови для поступового відбору стійких до радіації та екстремальних умов видів. Це підкреслює не лише унікальні особливості мікрофлори кожного регіону, але й необхідність врахування довгострокових екологічних та антропогенних факторів при оцінці впливу радіонуклідного забруднення на мікробні екосистеми.

Результати експериментальних досліджень цього розділу наведено в таких публікаціях:

[185] Konoplev, A., Golosov, V., Wakiyama, Y. Pareniuk, O., et. al. Natural attenuation of Fukushima-derived radiocesium in soils due to its vertical and lateral migration / 2017.

[287] Ruban, Y., Shpyrka, N., Pareniuk, O., et. al. BLV leucosis biosensor based on ZnO nanorods photoluminescence: 2017 IEEE 37th International Conference on Electronics and Nanotechnology, ELNANO 2017 - Proceedings, 17.

[26] Паренюк, О. Ю., Сімутін, І. О., Самофалова, Д. О. Визначення основних метрик різноманіття мікробіомів забруднених радіонуклідами ґрунтів. *Біоресурси і природокористування*. 2018. Т. 10, No. 5–6.

[38] Рубан, Ю. В., Нестерова, Н. Г., Шаванова, К. Є. Паренюк, О. Ю., та ін. Вплив рельєфу на формування дозового навантаження на рослини внаслідок радіонуклідного забруднення після аварії на АЕС «Фукусіма-1». *Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки*. 2020. Т. 2, No. 390.

6 МОДЕЛЮВАННЯ ПОГЛИНУТОЇ ДОЗИ ДЛЯ ҐРУНТОВИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

Оцінка потенційного радіаційного впливу забруднення навколишнього середовища радіонуклідами для запобігання або зменшення радіаційного впливу серед живих організмів вимагає оцінки доз радіації. Оцінка дозової залежності між представниками флори або фауни та дози опромінення, яке випромінюється різними радіонуклідами та поглинається об’єктом, що цікавить, є наріжним каменем радіобіології, що забезпечує вченим та радіаційним фахівцям точний і цінний інструмент для оцінки впливу. Для забезпечення правильної оцінки дози щодо різних форм тіла, локалізації та вмісту вивільнення радіонуклідів часто використовують моделі доз, створені на основі серії розрахунків та експериментального підтвердження. Вони є важливими інструментами для використання у регуляторному контролі рутинних, а також аварійних скидів у навколишнє середовище та для планування майбутніх контрзаходів у разі випадкових викидів; моделі підтверджених доз також використовуються для прогнозування впливу викидів, які можуть відбутися далеко в майбутньому, наприклад, з підземних сховищ радіоактивних відходів. Важливо перевірити надійність прогнозів таких моделей шляхом порівняння з виміряними значеннями в навколишньому середовищі або шляхом порівняння з прогнозами інших моделей [161]. Правильні дозиметричні моделі для всієї екосистеми і для кожного окремого її компонента є дуже затребуваними в атомній та медичній промисловості, а також у військовій галузі.

З моменту заснування Міжнародна комісія з радіаційного захисту (ICRP) була зосереджена на оцінці наслідків опромінення для людини і змінила погляд на «екологічну орієнтацію» лише на початку 2000-х [161]. Різноманітність флори та фауни щодо середовищ існування, способу життя, форми тіла й маси, годівлі, обміну речовин та умов опромінення створює особливу проблему при розробці та застосуванні дозиметричних моделей для оцінки впливу тварин і рослин від радіоактивності в навколишньому середовищі. Намагаючись

розібратися з різноманітністю біоти, ICRP розробила концепцію референтних тварин та рослин (RAP) [314], надала великі набори коефіцієнтів дози для цих контрольних об’єктів [337].

Мікроорганізми, такі як бактерії та гриби, відіграють ключову роль у розкладанні органічної речовини ґрунту, значною мірою визначаючи доступність поживних речовин для рослин, а отже, і для тварин [246]. Як це було чудово сформульовано в гіпотезі Бааса Бекінга як «все є скрізь, але середовище вирішує»; ґрунтові бактеріальні спільноти надзвичайно лабільні [70]. Ось чому введення нових речовин (таких як радіонукліди) у стабільний мікробіом може призвести до значних змін у структурі мікробіому, щоб створити механізм боротьби та введення цього нового агента в життєвий цикл екосистеми.

Відомо, що бактерії мають величезну радіостійкість [365, 107, 118], яка, однак, може відрізнятися від виду до виду. Збільшення потужності дози в середовищі існування бактерій за рахунок введення радіонукліда в екосистему може призвести до переваг для більш радіостійких бактерій, одночасно пригнічуючи ріст і розвиток радіочутливих. Залежно від функції, яку виконують ці бактерії, це може спричинити лавину наслідків для всієї екосистеми, змінивши ґрунтовий обмін. Отже, від них залежить доступність поживних речовин для рослин і тварин і, таким чином, зміна всієї структури екосистеми.

ICRP приділяє детальну увагу верифікації, виправленню моделей, враховуючи всі фактори. Відповідно до проєктної документації до BIOTA DC [337], розширена дозиметрична система покращує сумісність між лікуванням внутрішнього та зовнішнього опромінення наземних організмів, забезпечуючи коефіцієнти дози для одного і того самого діапазону маси тіла: від 10^{-3} до 10^{6} г та форми тіла, й реалізує техніку, засновану на наборі обчислювальних доз для сферичних форм у водному середовищі й аналітичний метод їх масштабування до сферичних та еліпсоїдних форм. Клітина бактерій має діапазон маси від 10^{-6} до 10^{-9} г, а також коефіцієнт заповнення може сильно змінюватися залежно від

місця проживання та розташування до джерела опромінення (наприклад, бактерії, розташовані за ґрунтовим композитом, можуть отримати набагато меншу дозу порівняно з дозою, розташованою поблизу радіонуклідного зерна), можна використовувати стандартні підходи для оцінки дози, але їх потрібно перевірити на відповідність розширеному діапазону розмірів. Через мікроскопічні розміри мікроорганізмів та специфіку середовища існування, ні RAP, розроблені у 2003 році [314], ні дозові коефіцієнти (DC), розраховані у 2017 році [337], не забезпечують надійної дозиметричної моделі для ґрунтових бактерій, залишаючи нас абсолютно сліпими при оцінці наслідків забруднення радіонуклідами для редуцентного елемента екосистеми.

Радіонукліди в навколишньому середовищі можуть спричинити зовнішнє та внутрішнє опромінення рослин і тварин іонізуючим випромінюванням. Внутрішній вплив спричинений поглинанням радіонуклідів організмами через трофічні ланцюги. Зовнішнє опромінення залежить від різних факторів, включаючи концентрацію радіонуклідів у навколишньому середовищі, геометричну залежність між джерелом випромінювання та організмом, розмірами організму, захисними властивостями середовища та фізичними властивостями наявних радіонуклідів [193]. Поглинута доза у всіх сучасних підходах для оцінки опромінення людини не визначається як кількість енергії, що поглинається на одиницю маси тканини органа чи організму, дана в одиницях сірого [188]. Коефіцієнти перетворення дози (DCC) використовують для незваженої потужності поглиненої дози до концентрації активності в організмі або середовищі [338].

Міжнародне агентство з атомної енергії (МАГАТЕ) та ICRP створили міжнародний консорціум для розробки, збору, перевірки, надання експериментальних даних та об’єднання дозиметричних моделей для оцінки доз навколишнього середовища [161]. З 2002 по 2007 рік МАГАТЕ організувало програму під назвою «Екологічне моделювання для радіаційної безпеки» (EMRAS) з метою розробки, підтримки та перевірки моделей для оцінки дози біоти, що не є людиною. Зведенням проєкту є Звіт TEDOC [161]. У

цьому звіті вичерпно описуються переваги та недоліки всіх моделей оцінки дози, що не стосуються біоти, для двох сценаріїв (один прісноводний та один наземний), в яких прогнози моделей порівнювались з наявними польовими вимірами. Після обговорень з колегами було обрано чотири найпоширеніші моделі радіобіологічного суспільства, щоб перевірити відповідність їхніх параметрів для оцінки дози бактерій: інструмент ERICA [83], RESRAD-BIOTA [366], DosDiMEco, EDEN 2 [343] та найновіші BIOTA DC [337] і дозиметрична модель для ґрунтової мезофауни [34, 22].

Використовуючи підходи МАГАТЕ, оцінка дозового навантаження на мікроорганізми видається складною. На нашу думку, одним з найбільш близьких підходів, натомість, буде використання моделей, розроблених для медичних цілей – наприклад, для оцінки дозового навантаження на компоненти крові від радіонуклідів, що містяться в потоці кров [43, 21].

Для побудови моделі вважатимемо, що бактеріальні клітини мають витягнуту еліпсоїдну форму.

Будемо вважати, що ефективна енергія складається із двох компонентів: β- і γ- складових [187], де E_β і E_γ відповідно складові $E_{еф}$ (формула (6.1))

$$E_{еф} = E_\beta + E_\gamma \qquad (6.1)\ [43]$$

Використовуючи дані з [43], обрахуємо вираз для бета-розпаду ^{137}Cs (формула (2)).

$$E_\beta = 0{,}33 \times E_{\beta i} \times f \times \left(1 - \frac{Z^{0,5}}{50}\right) \times \left(1 + \frac{E\beta i^{\frac{0,5}{\beta i}}}{4}\right), \qquad (6.2)\ [43]$$

де $E_{\beta i}$ – гранична енергія β-спектра, МеВ; f – частка розпадів даного типу; Z – атомний номер радіонукліда.

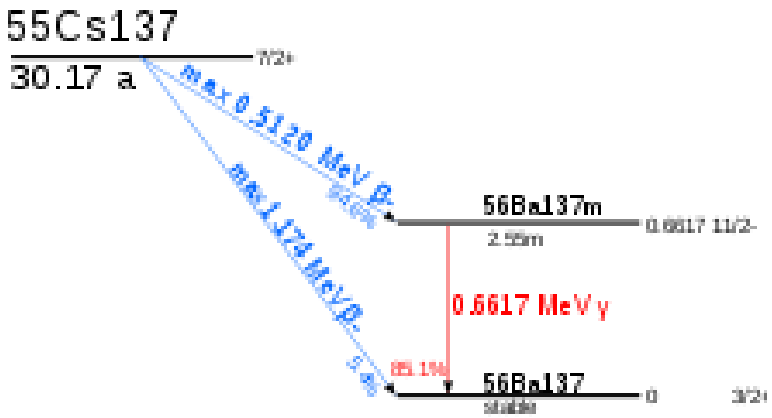


Рисунок 6.1. Характеристики розпаду ^{137}Cs **[379]**, всі енергії в МеВ

Таблиця 6.1. Параметри для розрахунку β-складової ефективної енергії

$E_{\beta i}$	Z	Період 1	Період 2	Період 3	$E_{\beta i}$	%
0,512	55	0,16896	0,854398	1,178885	0,170183	94,6
1,174	55	0,38742	0,854398	1,270878	0,420674	5,4
Сумарна енергія співударянь $E\beta$ (MeV)					0,183709	

Значення, надані таблицею ізотопів [379] (табл. 6.1), складають 174,32 кеВ (94,5%) та 416,26 кеВ (5,3%), отже, вони збігаються зі значеннями з нашої таблиці (170 кеВ та 420 кеВ відповідно).

Вважаючи, що енергія β-частинок повністю поглинається в середовищі існування бактерій, значення E_β розраховуємо за формулою (6.2).

Внесок γ-складової ефективної енергії можна оцінити так: (формули (6.3), (4)). Вважаючи, що бактерії в ґрунтах розподілені достатньо рівномірно, розраховуємо E_γ для м^3 грунту:

$$E_\gamma = E_{\gamma i} \times f \times [1 - \exp(-\mu X)], \qquad (6.3)$$

де $E_{\gamma i}$ – енергія γ-квантів, i-ї лінії, МеВ; μ – лінійний коефіцієнт передачі енергії, см$^{-1}$; X – ефективний радіус клітини, що містить радіонуклід.

Для розрахунку внеску гамма-складової для бактеріальних клітин визначаємо $E_{\gamma к}$ за формулою:

$$E_{\gamma к} = V_b \times E_\gamma, \qquad (6.4)$$

де V_b – об’єм бактерій на 1 м^3 ґрунту, E_γ – внесок гамма-складової в ефективну енергію.

Загальний об’єм бактерій у кубічному метрі ґрунту розраховуємо з таких вихідних даних:

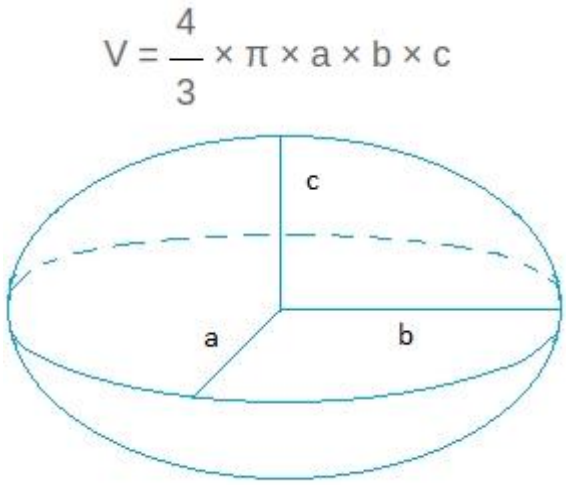


Рисунок 6.2. Виміри еліпсоїда обертання, використаного як модель бактеріальної клітини

$$V = 4/3 \times \pi \times a \times b \times c, \qquad (6.5)$$

де *a, b, c* – висота, ширина та довжина бактерії відповідно (рис. 6.2).

Для бактерій розміром 1 × 0,5 × 0,5 мкм *V* дорівнює 1,0472 ×10^{-18} м^3.

Приймемо ймовірність потрапляння β-випромінювання у бактеріальну клітину (у першому наближенні) рівною об’ємному співвідношенню бактерій у ґрунті (табл. 6.2).

$$V_b = D_S \times \rho_S \times \text{ф}. \qquad (6.6)$$

Таблиця 6.2. Параметри мікроорганізмів у ґрунті, використані для розрахунку моделі

Назва параметра	**Числове значення**	**Одиниці вимірювання**
Глибина шару ґрунту, D_S	0,3	м
Пористість ґрунту [320], ρ_S	0,36	
Виміри бактерії *a*	1	м$^{-6}$
b	0,5	м$^{-6}$
c	0,5	м$^{-6}$
Об’єм однієї бактерії, *V*	1,05×10^{-18}	м^3
Об’єм бактерій на м^3 ґрунту, V_b	0,0108	м^3
Об’ємна частка бактерій у ґрунті, ф [320]	0,1	
Кількість бактерій на м^3 ґрунту [320]	1×10^{16}	

За формулами (6.1), (6.2) і (6.3) обрахуємо (табл. 6.3) E_γ.

Таблиця 6.3. Параметри для розрахунку поглинутої енергії [350]

Назва параметра	**Числове значення**	**Одиниці вимірювання**		**Числове значення**	**Одиниці вимірювання**
Лінійна передача енергії гамма-випромінювання	14	$см^{-1}$			
Радіонукліди					
^{137}Cs					
β	кеВ	%	γ	кеВ	%
	174,32	94,7		661,66	85,1
	416,26	5,3		32,19	3,67
Сумарна енергія співударянь E_γ (МеВ)	0,18714282			0,564254	

Концентрація радіонуклідів у ґрунтовому розчині, в межах тривалості життя однієї бактеріальної клітини, є стабільною величиною.

Використовуючи формулу (6.7), розрахуємо ймовірність влучення гамма-кванту в бактеріальну клітину P:

$$P = \left(\frac{D_S}{V}\right) \times V_b. \qquad (6.7)$$

За формулами (2) і (3) розрахуємо енергію бета-складової і гамма-складової дози відповідно, після чого за формулою (6.1) обрахуємо сумарну дозу на одну бактеріальну клітину у ґрунті.

Таблиця 6.4. Обраховані параметри ефективної дози на одну бактеріальну клітину

Назва параметра	**Числове значення**	**Одиниці вимірювання**
Ймовірність одного влучання β-кванта	$3{,}49\times10^{-18}$	
Сумарна ймовірність одного влучання β-квантів P	$3{,}49\times10^{-2}$	3,49 %
E_β (одне влучання)	$6{,}53\times10^{-19}$	МеВ
E_β	$6{,}53\times10^{-3}$	МеВ

Доза, сформована β-компонентою	$9{,}03E\times10^{-17}$	Гр
Співвідношення між поглинутими і непоглинутими γ-квантами [43]	$8{,}83\times10^{-1}$	
E_γ (одне влучання)	$1{,}52\times10^{-18}$	МеВ
E_γ	$1{,}52\times10^{-2}$	МеВ
Доза, сформована γ-компонентою	$2{,}11E^{-16}$	Гр
Сума		
$E_{еф}$ (одне влучання)	$2{,}18\times10^{-18}$	МеВ
$E_{еф}$	$2{,}18\times10^{-2}$	МеВ
Сумарна доза, сформована ^{137}Cs активністю 1 Бк/м^2	**$3{,}01\times10^{-16}$**	**Гр**

Отже, доза, сформована ^{137}Cs активністю 1 Бк/м^2 на 1 бактеріальну клітину, складатиме $3{,}01\times10^{-16}$ Гр.

За допомогою отриманої моделі було обраховано дози для представників мікробіомів, відібраних з території ЗВП ФАЕС (літо) (табл. 6.5), що добре співвідносяться з обрахованими раніше за допомогою BiotaDC.

Таблиця 6.5. Обраховані дози для окремих представників мікробіомів, відібраних з території ЗВП ФАЕС (літо)

Код зразка	**Питома активність зразка, Бк/м^3**	**Розрахована ефективна доза, Гр**
J2	$1{,}54\times10^4$	$6{,}3\times10^{-12}$
J3	$2{,}39\times10^4$	$3{,}3\times10^{-12}$
M3	$8{,}20\times10^3$	$9{,}7\times10^{-12}$
J5	$3{,}77\times10^4$	$1{,}5\times10^{-11}$
H3	$4{,}11\times10^5$	$1{,}8\times10^{-10}$
J7	$4{,}64\times10^4$	$1{,}6\times10^{-10}$

Отже, доза, сформована ^{137}Cs активністю 1 Бк/м^2 на 1 бактеріальну клітину, складатиме $3{,}01\times10^{-16}$ Гр.

На цьому етапі важливо окремо наголосити, що розроблена модель є свідомо спрощеною. Вона не враховує мікролокальну неоднорідність розподілу

радіонуклідів у ґрунті, просторове положення клітини відносно ґрунтового колоїду, порового простору, органічної речовини, біоплівок чи мінеральних поверхонь. Так само вона не враховує морфологічного різноманіття бактерій, їхнього фізіологічного стану та потенційної різниці в радіочутливості окремих таксонів. Проте саме така спрощеність і є її методичною силою на першому етапі: модель дозволяє звести складну систему до кількісно описуваного стану і тим самим створити основу для подальших, більш деталізованих досліджень. Іншими словами, ця модель не є фінальним рішенням задачі мікродозиметрії ґрунтових мікроорганізмів, але є працездатним і науково обґрунтованим підґрунтям для її розвитку.

Після побудови моделі її було застосовано до реальних даних щодо питомої активності радіонуклідів у ґрунті. Питома активність ^{137}Cs була отримана експериментально, тоді як дані щодо активності ^{90}Sr - залучені з бази даних УкрНДІ сільськогосподарської радіології НУБіП України . Це дозволило поєднати авторський модельний підхід із реальним станом забруднення досліджуваних територій, а не обмежуватися умовними сценаріями.

Для додаткового зіставлення порядку величин зовнішні поглинуті дози для мікроорганізмів було також обраховано за допомогою пакета програм Biota DC . Розрахунок проводився за методом часового інтегрального коефіцієнта активності для об’єктів прісноводної фауни масою 10^-6 кг з параметрами форми 0,1 : 0,1 та рівноважними умовами у навколишньому середовищі на 365 днів. Паралельно використовувався ERICA dose assessment tool , де обрахунок проводили для об’єктів фітопланктону прісноводних екосистем з фактором невизначеності 3 %. У даному випадку ці пакети виконували роль інструментів перевірки порядку величин і зіставлення результатів із усталеними екологічними підходами, а не роль основної авторської моделі. Це важливо підкреслити, щоб не розмити власний методичний внесок дисертації.

Результати застосування моделі до ґрунтів Чорнобильської зони відчуження показали чіткий просторовий градієнт дозового навантаження на мікроорганізми. Для контрольного зразка, відібраного на КПП «Дитятки»,

потужність поглинутої дози становила 0,1 μГр/год. Для зразка із Залісся з низьким рівнем забруднення цей показник також дорівнював 0,1 μГр/год. Для зразка із середнім рівнем забруднення з території Чистогалівки було отримано значення 0,5 μГр/год. Для ґрунту Рудого лісу поза траншеєю Т22 потужність поглинутої дози становила 13,5 μГр/год, а для ґрунту Рудого лісу в межах траншеї Т22 — 34,9 μГр/год. Ці дані наведено в табл. 4.4. Таким чином, навіть у межах одного регіону модель дозволила виявити різницю в кілька порядків між умовно контрольними та найбільш забрудненими ділянками.

Отримані для Чорнобильської зони значення було зіставлено з референтними орієнтирами, наведеними в базі даних FREDERICA . З одного боку, найбільш консервативний орієнтир у 10 μГр/год перевищувався для обох зразків із території Рудого лісу. З іншого боку, згідно з тим самим джерелом, за таких значень потужності дози жодних очікуваних ефектів для ґрунтової мікрофлори прямо не вказано. Це означає, що сам факт перевищення консервативного орієнтира не є автоматичним доказом порушення мікробіому, але однозначно вказує на те, що радіаційний чинник у цих екотопах повинен розглядатися як екологічно значущий. Саме в цьому сенсі модель виконує важливу інтерпретаційну функцію: вона не проголошує ефект, а обґрунтовує рівень навантаження, при якому такий ефект стає науково доцільним для подальшого аналізу.

Ще більш показовими виявилися результати застосування моделі до ґрунтів зон, які важко повернути у господарювання навколо АЕС Фукусіма. На відміну від Чорнобильської зони, де провідним виявився просторовий градієнт, для фукусімських зразків модель виявила виражену сезонну динаміку дозового навантаження. Для контрольного зразка J2 потужність поглинутої дози становила 6,3 μГр/год у липні 2014 року, 16,5 μГр/год у жовтні 2014 року, 16,9 μГр/год у лютому 2015 року та 11,6 μГр/год у квітні 2015 року. Для зразка M3 з низьким рівнем забруднення відповідні значення дорівнювали 3,3; 3,26; 8,8; 7,6 μГр/год. Для зразка J3 із середнім рівнем забруднення — 9,7; 11,8; 14,7; 6,7 μГр/год. Для зразка J5 — 15,4; 104,8; 41,7; 54,5 μГр/год. Для зразка J7 з високим

рівнем забруднення — 18,9; 130,4; 96,1; 148,8 μГр/год. Для зразка H3 з найвищим рівнем забруднення — 167,7; 153,6; 59,3; 401,7 μГр/год. Ці дані наведено в табл. 5.3.

Виявлена сезонна мінливість є одним із найбільш значущих результатів моделювання. Вона свідчить, що для ЗВП ФАЕС величина дозового навантаження визначається не лише абсолютною активністю радіонуклідів у ґрунті, а й рельєфом, особливостями водного режиму, сезонною зміною вологості, вертикальною і латеральною міграцією ^{137}Cs та, ймовірно, процесами перерозподілу радіонуклідів у профілі. Саме тому одна і та сама ділянка в різні сезони могла демонструвати принципово відмінні величини дози. У цьому сенсі модель виявила не просто рівень навантаження, а часову динаміку радіаційних умов існування мікробіомів.

Згідно з базою FREDERICA, дози в межах від 0 до 100 μГр/год не мають задокументованого впливу на ґрунтові мікроорганізми. Водночас дози в межах від 100 до 200 μГр/год - а саме для зразків FJ7 (висока доза, жовтень), BJ7 (висока доза, квітень), FH3 (найвища доза, жовтень), SH3 (найвища доза, липень) — можуть затримувати відновлення ґрунтової фауни, тоді як значення, що наближаються до 400 μГр/год, як для BH3 (найвища доза, квітень), асоціюються зі зниженням різноманіття ґрунтової мікрофлори. Знову ж таки, ці інтервали не повинні тлумачитися як жорсткі бактеріальні пороги. Вони створюють важливий екотоксикологічний контекст, у якому результати моделі можна інтерпретувати як потенційно значущі для структури мікробіому, але не як прямий і остаточний доказ причинно-наслідкового зв’язку.

Безумовно, такі обрахунки дози є певною мірою приблизними. Однак високий рівень консервативності підходів, застосованих у ERICA Tool та Biota DC, а також внутрішня послідовність авторської моделі дають підстави вважати наведені оцінки адекватними для порівняльного радіоекологічного аналізу. Головне полягає в тому, що модель дозволяє кількісно зіставити різні екотопи і пов’язати мікробіомні особливості з конкретними рівнями дозового

навантаження, а не лише з абстрактним фактом наявності радіонуклідного забруднення.

Проте розрахунок поглинутої дози для кожного окремого представника мікробоценозу залишається вкрай складним завданням. Для його повноцінного вирішення необхідні як дані щодо загального видового складу мікробоценозу на окремій території, так і відомості про локалізацію мікроорганізмів відносно ґрунтового колоїду, порового простору, органічної речовини та мікролокальних зон накопичення радіонуклідів. Як зазначено в роботі, на момент виконання дисертації даних такого рівня деталізації практично не було (Корепанова et al., 2020). Саме тому розроблена модель повинна розглядатися як свідомо спрощене, але коректне перше наближення до задачі мікродозиметрії ґрунтової мікрофлори.

Отже, розроблена в межах цієї дисертації модель поглинутої дози для ґрунтових мікроорганізмів є авторською адаптацією підходів медичної дозиметрії малих біологічних об’єктів до задач радіаційної мікробіології та радіоекології ґрунту. Її головна наукова цінність полягає в тому, що вона дозволяє кількісно пов’язати радіонуклідне забруднення ґрунту з потенційним дозовим навантаженням на бактеріальні клітини, тобто перевести радіохімічний опис середовища у біологічно інтерпретований параметр. Попри спрощений характер, модель продемонструвала методичну працездатність, дала змогу виявити просторову неоднорідність дозового навантаження в ЧЗВ та сезонну динаміку в ЗВП ФАЕС і може розглядатися як важливе підґрунтя для подальшого розвитку детальніших і біологічно специфічних моделей оцінки дози для мікроорганізмів у забруднених радіонуклідами ґрунтах.

ВИСНОВКИ

Узагальнення: У дисертаційній роботі проведено комплексну оцінку таксономічної структури та функціонального потенціалу мікробіомів радіонуклідно забруднених ґрунтів і техногенних субстратів об’єкта «Укриття» ЧАЕС, Чорнобильської зони відчуження та зон, які важко повернути у господарювання навколо АЕС Фукусіма-1. За результатами метагеномного аналізу, визначення фізико-хімічних характеристик середовища, оцінки дозового навантаження та багатофакторного статистичного аналізу встановлено відмінності таксономічної структури й функціональних характеристик мікробних угруповань досліджених систем. Для ґрунтових мікробіомів не виявлено прямої залежності показників альфа-різноманіття від потужності поглинутої дози в досліджених діапазонах. Водночас встановлено зв’язок таксономічної структури мікробних угруповань із поєднаною дією дозового навантаження та біогеохімічних характеристик ґрунтів, зокрема вмісту доступних сполук азоту. Для техногенних субстратів ОУ ЧАЕС визначено особливості таксономічного складу та функціонального потенціалу мікробіомів за умов високого дозового навантаження й специфічних фізико-хімічних властивостей середовища.

1. Визначено характеристики досліджених радіонуклідно забруднених ґрунтів і техногенних субстратів. Масив досліджень охоплював 35 зразків: 6 зразків субстратів об’єкта «Укриття» ЧАЕС, 5 зразків ґрунтів Чорнобильської зони відчуження та 24 зразки ґрунтів зон, які важко повернути у господарювання навколо АЕС Фукусіма-1, відібрані впродовж чотирьох сезонів. Потужність поглинутої дози становила 1-135 мГр/год для субстратів ОУ ЧАЕС, 0,1-35 мкГр/год для ґрунтів ЧЗВ та 3-402 мкГр/год для ґрунтів ЗВП ФАЕС. Ґрунти ЧЗВ характеризувалися вмістом гумусу 0,84-2,52 % та легкогідролізованого азоту 34-74 мг/кг; ґрунти ЗВП ФАЕС мали вищу забезпеченість азотом. Субстрати ОУ ЧАЕС не мали генетичних ознак

сформованого ґрунту, характеризувалися лужною реакцією середовища (pH 7,5–8,5) і вмістом рухомих сполук заліза до 39 мг/кг.

2. Адаптовано методичні підходи до метагеномного аналізу мікробіомів радіонуклідно забруднених ґрунтів і техногенних субстратів. Оптимізовано процедури виділення сукупної ДНК, підготовки бібліотек для ампліконного секвенування гена 16S рРНК, контролю якості та фільтрації даних секвенування. Адаптовано послідовність біоінформатичної обробки з використанням QIIME, PICRUSt, HUMAnN та FastQC. Для повногеномного секвенування відібрано два зразки: R7 - із внутрішнього виходу шахти Ю-9-В системи моніторингу «Фініш» у зоні лімітованого доступу об’єкта «Укриття» ЧАЕС; R12 - контрольний зразок із-під зовнішньої стіни саркофага з боку проммайданчика ЧАЕС, за межами ОУ. Із двох зразків зони суворого режиму ОУ ЧАЕС (R2 та R8) виділити ДНК не вдалося.

3. Встановлено відмінності таксономічного складу та показників біорізноманіття мікробних угруповань внутрішнього техногенного субстрату ОУ ЧАЕС та контрольного зразка з прилеглого проммайданчика. За результатами ампліконного секвенування гена 16S рРНК у зразку з шахти Ю-9-В (R7) ідентифіковано 133 бактеріальні родини, тоді як у контрольному зразку, відібраному із зовнішнього боку стіни саркофага (R12) - 207 родин. Повногеномний аналіз виявив ширший спектр таксономічних одиниць в обох зразках порівняно з ампліконним секвенуванням. Для контрольного зразка встановлено вищі показники таксономічного багатства та вирівняності мікробного угруповання. Виявлені відмінності характеризують мікробіоми субстратів, сформованих за різних радіаційних, фізико-хімічних і техногенних умов.

4. Визначено функціональний потенціал мікробних угруповань субстрату з шахти Ю-9-В об’єкта «Укриття» ЧАЕС та контрольного зразка з проммайданчика. За результатами повногеномного аналізу частка білків, пов’язаних із репарацією та рекомбінацією ДНК, становила 2,29 % для внутрішнього техногенного субстрату (R7) та 2,24 % для зовнішнього

контрольного зразка (R12). Частка ABC-транспортерів становила відповідно 2,64 та 3,11 %. Виявлено функціональні категорії, пов'язані з транспортом речовин, підтриманням клітинної стійкості та окисно-відновними процесами. Отримані результати характеризують функціональний потенціал мікробіомів за різних умов формування субстратів, однак не дозволяють відокремити внесок дозового навантаження від впливу їхніх фізико-хімічних властивостей.

5. Встановлено таксономічний склад і показники біорізноманіття мікробіомів ґрунтів Чорнобильської зони відчуження. У досліджених ґрунтах ідентифіковано понад 4300 видів мікроорганізмів із переважанням представників *Actinomycetales* (14–16 %), *Acidobacteriales* (11–16 %) та *Rhizobiales*. Найвищий показник видового багатства серед досліджених зразків встановлено для ґрунту траншеї Т22 Рудого лісу (5297 OTU), для якого також визначено найнижчий індекс домінування (ID = 0,005). Виявлено відмінності структури мікробних угруповань між ґрунтами ділянок із різним характером антропогенного порушення та рівнем радіонуклідного забруднення.

6. Охарактеризовано таксономічну структуру та сезонну мінливість мікробіомів ґрунтів зон, які важко повернути у господарювання навколо АЕС Фукусіма-1. У досліджених ґрунтах ідентифіковано понад 7000 видів мікроорганізмів, серед яких переважали представники *Clostridia* та *Actinobacteria*. Встановлено сезонні відмінності показників альфа-різноманіття: максимальне видове багатство (до 7239 OTU) зафіксовано восени, мінімальне (від 55 OTU) - узимку. Показано відмінності таксономічного складу мікробіомів ЧЗВ та ЗВП ФАЕС, зокрема за співвідношенням домінантних таксономічних груп. Сезонна мінливість мікробіомів ЗВП ФАЕС розглядалася з урахуванням температури, вологості, поживного режиму ґрунтів і змін радіаційних умов.

7. Встановлено зв'язки між характеристиками мікробіомів, дозовим навантаженням та біогеохімічними показниками ґрунтів. Для ґрунтів ЧЗВ виявлено зв'язок концентрації тотальної ДНК із вмістом легкогідролізованого азоту (R^2 = 0,48) та гумусу (R^2 = 0,75). Для ґрунтів ЗВП ФАЕС встановлено

статистично значущий зв’язок концентрації ДНК із загальним вмістом азоту ($p < 0,05$). Аналіз надлишковості (RDA) виявив зв’язок таксономічної структури мікробних угруповань із поєднанням потужності поглинутої дози, зумовленої ^{137}Cs, та вмісту амонійного азоту; для ґрунтів ЧЗВ отримано граничний рівень статистичної значущості ($p = 0,05$). У ЗВП ФАЕС характер цих зв’язків залежав від сезону відбору зразків. Прямої кореляції між потужністю поглинутої дози та показниками альфа-різноманіття досліджених ґрунтових мікробіомів не встановлено.

8. Розроблено та застосовано модель оцінки поглинутої дози для ґрунтових мікроорганізмів. На основі геометричного представлення бактеріальної клітини й характеристик β- та γ-випромінювання ^{137}Cs виконано розрахунки поглинутої енергії та дозового навантаження для модельної бактеріальної клітини. Результати зіставлено з оцінками, отриманими за допомогою Biota DC та ERICA Tool. Для досліджених ґрунтів ЧЗВ визначено просторові відмінності потужності поглинутої дози від 0,1 до 34,9 мкГр/год; для ґрунтів ЗВП ФАЕС встановлено сезонні відмінності з максимальними значеннями до 401,7 мкГр/год. Модель дозволила зіставити характеристики радіонуклідного забруднення середовища з розрахунковими дозовими характеристиками мікроорганізмів. За результатами порівняльного аналізу встановлено, що в межах досліджених умов відмінності структури мікробіомів не можуть бути однозначно пояснені лише величиною поглинутої дози без урахування фізико-хімічних властивостей і походження субстратів.

Список використаної літератури

1. Бондарьков, Д. М., Вишневский, И. Н., Желтоножский, В. А., Желтоножская, М. В., & Музалев, П. Н. (2016). Изучение поведения радионуклидов на сильнозагрязненных полигонах 5-километровой зоны ЧАЭС. Ядерна фізика та енергетика, 17(4), 381–387.

2. Alexakhin, R., Anspaugh, L., Balonov, M., et al. (2006). Environmental consequences of the Chernobyl accident and their remediation: Twenty years of experience. International Atomic Energy Agency.

3. Tate, R. L. (2020). Soil microbiology. John Wiley & Sons.

4. Галат, М. В., Шпирка, Н. Ф., Таран, М. В., et al. (2016). Розробка нового методу діагностики токсоплазмозу на основі фотолюмінесценції наночастинок оксиду цинку.Наукові доповіді НУБіП України.. Вип. 7. № 64.

5. Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A., & Krieg, N. R. (Eds.). (1994). Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology.

6. Григор’єва, Л. В., Корчак, Г. І., & Єрусалимська, Л. Ф. (1999). Вплив різних рівнів радіаційного забруднення ґрунту на індикаторні та патогенні мікроорганізми. Довкілля та здоров’я, (1), 53–56.

7. Гудков, І. М. (2001). Сучасна радіаційна ситуація в Україні та деякі проблеми радіологічної освіти в аграрних навчальних закладах. Аграрна наука і освіта, 2(3–4), 5–14.

8. Гудков, І. М., & Вінничук, М. М. (2003). Сільськогосподарська радіобіологія. ДАУ.

9. Думова, В. А., Патика, М. В., Круглов, Ю. В., et al. (2009). Studying biodiversity of the procariotic microorganisms complex of podsolic soils. Microbiology&Biotechnology...).102504, 0(2(6)), 60–65. https://doi.org/10.18524/2307-4663.2009.2(6

10. Ерусалимская, Л. Ф., & Корчак, Г. И. (1999). Особенности микробных ценозов почвы в условиях длительного хронического загрязнения радионуклидами. Гигиена населенных мест, 2(1), 125–136.

11. Ерусалимская, Л. Ф., & Корчак, Г. И. (1999). Особенности микробных ценозов почвы в условиях длительного хронического загрязнения радионуклидами. Гигиена населенных мест, 2(1), 125–136.

12. Зинкевич, Л. И., & Осколков, Б. Я. (2016). Радиоактивные отходы в Чернобыльской зоне отчуждения. У зб. 30 років Чорнобильської катастрофи (огляди): Збірник інформаційно-аналітичних доповідей (с. 74–94). Київ: КіМ.

13. Іллєнко, В. В., Шаванова, К. Є., Рубан, Ю. В., et al. (2020). Надходження 137Cs у рослини зернових культур за впливу комплексних бактеріальних препаратів. Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна серія «Екологія», (23), 139–148. https://doi.org/10.26565/1992-4259-2020-23-12

14. Карташов, М. В. (2008). Теорія ймовірностей і математична статистика / Probability theory and mathematical statistics. Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет».

15. Кашпаров, В. А., Лундин, С. М., Хомутинин, Ю. В., et al. (1999). Радиоактивное загрязнение 30-км зоны ЧАЭС.

16. Daly, M. J. (2009). A new perspective on radiation resistance based on Deinococcus radiodurans. Nature Reviews Microbiology, 7(3), 237–245. https://doi.org/10.1038/nrmicro2073

17. Корепанова, К. Д., Шаванова, К. Є., Іллєнко, В. В., et al. (2020). Розрахунок дозових навантажень на мікрофлору грунту, сформованих на пунктах зберігання радіоактивних відходів на території зони відчуження ЧАЕС. Екологічні Науки. 32, 164–168.

18. Котенко, П. (2014). Опис та характеристика Andosol префектури Фукусіма. [Рукопис / неопубліковані матеріали].

19. Краснов, В. О., Носовський, А. В., Рудько, В. М., et al. (2016). Об’єкт «Укриття»: 30 років після аварії. Інститут проблем безпеки АЕС НАН України.

20. Левчук, С. Є. (2016). Довідник по основних методах визначання активності радіонуклідів. Національний університет біоресурсів і природокористування України.

21. Липська, А. І., & Дрозд, І. П. (2008). Особливості дозоутворення та методи розрахунку доз при внутрішньому надходженні 137Cs до організму лабораторних щурів. Ядерна фізика та енергетика, 1(23), 78–87.

22. Brown, J. E., Alfonso, B., Avila, R., et al. (2008). The ERICA Tool. Journal of Environmental Radioactivity, 99(9), 1371–1383. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2008.01.008

23. Верховна Рада України. (1991). Про правовий режим території, що зазнала радіоактивного забруднення внаслідок Чорнобильської катастрофи: Закон України № 795-XII. https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/791%D0%B0-12

24. Паренюк, О. Ю., Шаванова, К. Є., Іллєнко, В. В., et al. (2017). Різноманіття мікрофлори у зруйнованому четвертому енергоблоці ЧАЕС. Ядерна фізика та енергетика, 18(2), 179–187. https://doi.org/10.15407/jnpae2017.02.179

25. Паренюк, О. Ю., Іллєнко, В. В., & Гудков, І. М. (2018). Мікрофлора забруднених радіонуклідами ґрунтів: Монографія. Київ: НУБіП України. 210 с.

26. Паренюк, О. Ю., Сімутін, І. О., Самофалова, Д. О., Рубан, Ю. В., Іллєнко, В. В., Нестерова, Н. Г., & Гудков, І. М. (2018). Визначення основних метрик різноманіття мікробіомів забруднених радіонуклідами ґрунтів. Біоресурси і природокористування, 10(5–6), 77–81. https://doi.org/10.31548/bio2018.05.010

27. Паренюк, О. Ю., Шаванова, Е. Е., Ильенко, В. В., et al. (2015). Влияние почвенной микрофлоры на переход 137Cs в растения. Радиационная биология. Радиоэкология, 55(1), 51–56.

28. Паренюк, О. Ю., Шаванова, К. Є., Іллєнко, В. В., et al. (2017). Різноманіття мікрофлори у зруйнованому четвертому енергоблоці ЧАЕС.

Ядерна фізика та енергетика. 18(2), 179–187. https://doi.org/10.15407/jnpae2017.02.179

29. Паренюк, О. Ю., Мошинець, О. В., Титова, Л. В., et al. (2013). Qualitative composition of dominating forms of microorganisms isolated from radionuclide contaminated soil and their ability to accumulate 137Cs. Мікробіологічний журнал, 75(1), 33–40.

30. Паскевич, С. (n.d.). Рыжий лес – уникальная экосистема возле ЧАЭС. Чернобыль, Припять, зона отчуждения ЧАЭС. Retrieved May 14, 2019, from http://chornobyl.in.ua/red-forest.html

31. Паскевич, С. А., & Петров, М. Ф. (2004). Биогенные потоки радионуклидов в травянистых биоценозах Чернобыльской зоны отчуждения. Проблеми безпеки атомних електростанцій і Чорнобиля, 1(1), 154–160.

32. Патика, М. В., Москалевська, Ю. П. (2014). Мікробні процеси трансформації вуглецю в ризосфері буряка цукрового чорнозему типового. Вісник Полтавської державної аграрної академії, (2), 34–39. https://doi.org/10.31210/visnyk2014.02.04

33. Патика, М. В., Танчик, С. П., Колодяжний, О. Ю., et al. (2012). Формування біорізноманіття та філотипової структури еубактеріального комплексу чорнозему типового при вирощуванні пшениці озимої. Доповіді Національної академії наук України, 11, 163–171.

34. Brown, J. E., Alfonso, B., Avila, R., et al. (2016). A new version of the ERICA Tool to facilitate impact assessments of radioactivity on wild plants and animals. Journal of Environmental Radioactivity, 153, 141–148. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2015.12.011

35. Петрук, В. В. (2016). 30 років Чорнобильської катастрофи (огляди): Збірник інформаційно-аналітичних доповідей. КіМ.

36. Konoplev, A., Golosov, V., Laptev, G., et al. (2016). Behavior of accidentally released radiocesium in soil–water environment: Looking at Fukushima

from a Chernobyl perspective. Journal of Environmental Radioactivity, 151, 568–578. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2015.06.019

37. Рокитко, П. В. (2003). Склад бактерій в 10-км зоні ЧАЕС і їх стійкість до γ-випромінювання та інших стресових факторів [Дисертація кандидата біологічних наук, Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України].

38. Рубан, Ю. В., Нестерова, Н. Г., Шаванова, К. Є., Паренюк, О. Ю., Іллєнко, В. В., & Гудков, І. М. (2020). Вплив рельєфу на формування дозового навантаження на Cryptomeria japonica, сформованого внаслідок аварії на АЕС Фукусіма-1. Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки: Серія: Біологічні науки, 2(390), 45–49.

39. Рубан, Ю. В., Шаванова, К. Є., Іллєнко, В. В., et al. (2020). PLFA аналіз структури мікробної спільноти на пунктах тимчасової локалізації радіоактивних відходів зони відчуження ЧАЕС. Фактори експериментальної еволюції організмів. 26, 149–153.

40. Рубан, Ю. В., Шаванова, К. Є., Самофалова, Д. О., et al. (2020). Порівняння мікробіомів двох різних екотипів Чорнобильської зони відчуження: пунктів тимчасової локалізації радіоактивних відходів (ПТЛРВ) та забруднених екосистем. Вісник проблем біології та медицини, 157(3), 83–88.

41. Рыбалка, В. Б., Смирнова, Г. Ф., Петелин, Г. И., Канцева, И. Н., Сербинович, В. В., & Краснов, В. А. (2005). Микробный фактор, топливосодержащие материалы и образование субмикронных частиц в объекте «Укрытие». Проблемы безопасности атомных электростанций и Чернобыля, (3), 87–97.

42. Giller, K. E., Witter, E., & McGrath, S. P. (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. Soil Biology and Biochemistry, 30(10–11), 1389–1414. https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00270-8

43. Сова, О. А., & Дрозд, І. П. (2014). Дозоутворення та гематологічні ефекти за тривалого внутрішнього опромінення щурів ізотопом 131I. Ядерна фізика та енергетика, 15(4), 359–369.

44. Совместное предприятие НОВАРКА. (2012). План осуществления мероприятий (ПОМ): Новый безопасный конфайнмент. Контракт на проектирование, строительство и ввод в эксплуатацию № SIP08-1-001. Государственное специализированное предприятие «Чернобыльская АЭС».

45. Тугай, Т. И., Жданова, Н. Н., Желтоножский, В. А., et al. (2005). Ответные реакции грибов, выделенных из различных по уровню радиоактивного загрязнения помещений объекта «Укрытие», на действие ионизирующего излучения. Збірник наукових праць Інституту ядерних досліджень, 1(14), 128–136.

46. Тугай, Т. І., Желтоножский, В. А., Садовников, Л. В. (2011). Вплив різних типів іонізуючого опромінення на жирнокислотний склад клітинних ліпідів мікроскопічних грибів з радіоадаптивними властивостями. Мікробіол. журн, 73(2), 26–32.

47. Тугай, Т. І., Тугай, А. В., Желтоножська, М. В., et al. (2012). Закономірності впливу низьких доз опромінення на мікроскопічні гриби. Ядерна фізика та енергетика, (13, № 4), 396–402.

48. Хомутинин, Ю. В., Кашпаров, В. А., & Жебровская, Е. И. (2001). Оптимизация отбора и измерений проб при радиоэкологическом мониторинге. ВІПОЛ.

49. Hall, E. J., & Giaccia, A. J. (2019). Radiobiology for the radiologist (8th ed.). Wolters Kluwer.

50. Abubucker, S., Segata, N., Goll, J., et al. (2012). Metabolic reconstruction for metagenomic data and its application to the human microbiome. PLoS Computational Biology, 8(6), e1002358. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002358

51. Albuquerque, L., França, L., Rainey, F. A., et al. (2011). Gaiella occulta gen. nov., sp. nov., a novel representative of a deep branching phylogenetic lineage within the class Actinobacteria and proposal of Gaiellaceae fam. nov. and Gaiellales ord. nov. Systematic and Applied Microbiology, 34(8), 595–599. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.07.001

52. Alessi, D. S., Uster, B., Veeramani, H., et al. (2012). Quantitative separation of monomeric U(IV) from UO2 in products of U(VI) reduction. Environmental science & technology, 46(11), 6150–7. https://doi.org/10.1021/es204123z

53. Alexakhin, R., Anspaugh, L., Balonov, M., et al. (2006). Environmental consequences of the Chernobyl accident and their remediation: Twenty years of experience. International Atomic Energy Agency,. 166 c.

54. Algina, J., Olejnik, S. (2003). Conducting power analyses for ANOVA and ANCOVA in between-subjects designs. Evaluation & the health professions, 26(3), 288–314.

55. Amend, A. S., Seifert, K. A., & Bruns, T. D. (2010). Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? Molecular Ecology, 19(24), 5555–5565. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04898.x

56. Anderson, A. W., Nordan, H. C., Cain, R. F., et al. (1956). Studies on a radio-resistant micrococcus.I. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. Food Technol, 10(1), 575–577.

57. Anderson, S., Appanna, V. D. (1994). Microbial formation of crystalline strontium carbonate. FEMS Microbiology Letters, 116(1), 43–48.

58. Andoh, M., Nakahara, Y., Tsuda, S., et al. (2014). Measurement of air dose rates over a wide area around the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant through a series of car-borne surveys. Journal of environmental radioactivity. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2014.05.014

59. Anitori, R. (2012). Poole: Caister Academic Press. Extremophiles: Microbiology and Biotechnology. Retrieved 23.05.2021, from https://www.caister.com/extremophiles

60. Arney, G., Domagal-Goldman, S. D., Meadows, V. S., et al. (2016). The Pale Orange Dot: The Spectrum and Habitability of Hazy Archean Earth. Astrobiology, 16(11), 873–899. https://doi.org/10.1089/ast.2015.1422

61. Asnicar, F., Weingart, G., Tickle, T. L., et al. (2015). Compact graphical representation of phylogenetic data and metadata with GraPhlAn. PeerJ, 3, e1029. https://doi.org/10.7717/peerj.1029

62. Avery, S. V. (1995). Caesium accumulation by microorganisms: uptake mechanisms, cation competition, compartmentalization and toxicity. Journal of Industrial Microbiology, 14(2), 76–84. https://doi.org/10.1007/BF01569888

63. Avery, S. V. (1996). Fate of caesium in the environment: Distribution between the abiotic and biotic components of aquatic and terrestrial ecosystems. Journal of Environmental Radioactivity...)89276-9, 30(2), 139–171. https://doi.org/10.1016/0265-931X(96

64. Axente, M., Lin P.-S, Pugachev, A., et al. (2011). Bacterial and archaeal resistance to ionizing radiation. Journal of Physics: Conference Series, 261(1), 012005. https://doi.org/10.1088/1742-6596/261/1/012005

65. Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., et al. (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. BMC Genomics, 9(1), 75. https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75

66. Balogh, J. (1958). Lebensgemeinschaften der Landtiere: ihre Erforschung unter besonderer Beruecksichtigung der Zoozoenologischen Arbeitsmethoden. Akademie Verlag. Retrieved 27.01.2017, from http://library.wur.nl/WebQuery/clc/112733

67. Balvočiūtė, M., & Huson, D. H. (2017). SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT — how do these taxonomies compare? BMC Genomics, 18(S2), 114. https://doi.org/10.1186/s12864-017-3501-4

68. Bay, I. A., & Oughton, D. H. (2005). Social and economic effects. In J. T. Smith & N. A. Beresford (Eds.), Chernobyl: Catastrophe and consequences (pp. 239–266). Springer.

69. Beazley, M. J., Martinez, R. J., Webb, S. M., et al. (2011). The effect of pH and natural microbial phosphatase activity on the speciation of uranium in subsurface soils. Geochimica et Cosmochimica Acta, 75(19), 5648–5663. https://doi.org/10.1016/j.gca.2011.07.006

70. Becking, L. B. (1934). Geobiologie of inleiding tot de milieukunde. W.

71. Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., et al. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. Nature, 456(7218), 53–59. https://doi.org/10.1038/nature07517

72. Beresford, N. A., Barnett, C. L., Howard, B. J., et al. (2008). Derivation of transfer parameters for use within the ERICA Tool and the default concentration ratios for terrestrial biota. Journal of Environmental Radioactivity, 99(9), 1393–1407. https://doi.org/10.1016/J.JENVRAD.2008.01.020

73. Beresford, N. A., & Smith, J. T. (2005). Application of countermeasures. In J. T. Smith & N. A. Beresford (Eds.), Chernobyl: Catastrophe and consequences (pp. 191–215). Springer.

74. Berry, A. E., Chiocchini, C., Selby, T., Sosio, M., & Wellington, E. M. H. (2003). Isolation of high molecular weight DNA from soil for cloning into BAC vectors. FEMS Microbiology Letters, 223(1), 15–20. https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00248-9

75. Bertrand, H., Poly, F., Van, V. T., et al. (2005). High molecular weight DNA recovery from soils prerequisite for biotechnological metagenomic library construction. Journal of Microbiological Methods, 62(1), 1–11. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.01.003

76. Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., et al. (2005). Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. Philosophical Transactions of the Royal

Society B: Biological Sciences, 360(1462), 1935–1943. https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1725

77. Boretska, M., Shavanova, K. E., Ruban Yu, et al. (2020). Impact of γ-irradiation on biofilm-formation by corrosion-relevant heterotrophic bacteria.Наукові доповіді НУБіП України.. Вип. 5. № 5 (87). https://doi.org/10.31548/dopovidi2020.05.002

78. Boretska, M. O., & Kozlova, I. A. (2010). Biofilms on a metal surface as microbial corrosion factor. Microbiological Journal, 72(4), 50–63.

79. Bowyer, T. W., Biegalski, S. R., Cooper, M., et al. (2011). Elevated radioxenon detected remotely following the Fukushima nuclear accident. Journal of Environmental Radioactivity, 102(7), 681–687. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2011.04.009

80. Braak C. J. F. ter Canonical Correspondence Analysis:, A. (1986). New Eigenvector Technique for Multivariate Direct Gradient Analysis. Ecology, 67(5), 1167–1179. https://doi.org/10.2307/1938672

81. Brito, E. M. S., Piñón-Castillo, H. A., Guyoneaud, R., et al. (2013). Bacterial biodiversity from anthropogenic extreme environments: a hyper-alkaline and hyper-saline industrial residue contaminated by chromium and iron. Applied microbiology and biotechnology, 97(1), 369–378. https://doi.org/10.1007/S00253-012-3923-5

82. Brooks, B. W., Murray, R. G. E. (1981). Nomenclature for ’Micrococcus radiodurans" and Other Radiation-Resistant Cocci: Deinococcaceae fam. nov. and Deinococcus gen. nov., Including Five Species. International Journal of Systematic Bacteriology, 31(3), 353–360. https://doi.org/10.1099/00207713-31-3-353

83. Brown, J. E., Alfonso, B., Avila, R., et al. (2016). A new version of the ERICA tool to facilitate impact assessments of radioactivity on wild plants and animals. Journal of environmental radioactivity, 153, 141–8. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2015.12.011

84. Brown, J. E., Alfonso, B., Avila, R., et al. (2008). The ERICA Tool. Journal of Environmental Radioactivity, 99(9), 1371–1383. https://doi.org/10.1016/J.JENVRAD.2008.01.008

85. Bruce, K. D., Hiorns, W. D., Hobman, J. L., et al. (1992). Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. Applied and environmental microbiology, 58(10), 3413–6.

86. Buesseler, K., Aoyama, M., Fukasawa, M. (2011). Impacts of the Fukushima Nuclear Power Plants on Marine Radioactivity. Environmental Science & Technology, 45(23), 9931–9935. https://doi.org/10.1021/es202816c

87. Buldakov, L. A., & Gus'kova, A. K. (2002). 15 years after the accident at the Chernobyl Nuclear Power Plant. Radiatsionnaia biologiia, radioecologiia, 42(2), 228–233.

88. Bürgmann, H., Pesaro, M., Widmer, F., et al. (2001). A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil. Journal of Microbiological Methods...)00213-5, 45(1), 7–20. https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01

89. Caldwell, M. M., Teramura, A. H., Tevini, M. (1989). The changing solar ultraviolet climate and the ecological consequences for higher plants. Trends in Ecology and Evolution...)90100-6, 4(12), 363–367. https://doi.org/10.1016/0169-5347(89

90. Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature Methods, 7(5), 335–336. https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303

91. Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature methods, 7(5), 335–336.

92. Carareto Alves, L. M., Souza J. A. M. de, Varani A. de, M., et al. (2014). The Family Rhizobiaceae. The Prokaryotes. 419–437. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_297

93. Carrigg, C., Rice, O., Kavanagh, S., et al. (2007). DNA extraction method affects microbial community profiles from soils and sediment. Applied Microbiology and Biotechnology, 77(4), 955–964. https://doi.org/10.1007/s00253-007-1219-y

94. Chaffron, S., Rehrauer, H., Pernthaler, J., et al. (2010). A global network of coexisting microbes from environmental and whole-genome sequence data. Genome research, 20(7), 947–59. https://doi.org/10.1101/gr.104521.109

95. Challacombe, J. F., Eichorst, S. A., Hauser, L., et al. (2011). Biological Consequences of Ancient Gene Acquisition and Duplication in the Large Genome of Candidatus Solibacter usitatus Ellin6076. PLoS ONE, 6(9), e24882. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024882

96. Chao, A. (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. Scandinavian Journal of Statistics, 11(4), 265–270.

97. Chapon, V., Piette, L., Vesvres M.-H, et al. (2012). Microbial diversity in contaminated soils along the T22 trench of the Chernobyl experimental platform. Applied Geochemistry, 27(7), 1375–1383. https://doi.org/10.1016/J.APGEOCHEM.2011.08.011

98. Chicote, E., García, A. M., Moreno, D. A., et al. (2005). Isolation and identification of bacteria from spent nuclear fuel pools. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 32(4), 155–162. https://doi.org/10.1007/s10295-005-0216-3

99. Cnossen, I., Sanz-Forcada, J., Favata, F., et al. (2007). Habitat of early life: Solar X-ray and UV radiation at Earth's surface 4-3.5 billion years ago. Journal of Geophysical Research E: Planets, 112(2), 2008. https://doi.org/10.1029/2006JE002784

100. Cockell, C. S., Raven, J. A. (2007). Ozone and life on the Archaean Earth. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 365(1856), 1889–1901. https://doi.org/10.1098/rsta.2007.2049

101. Counsell, T. J., Murray, R. G. E. (1986). Polar lipid profiles of the genus Deinococcus. International Journal of Systematic Bacteriology, 36(2), 202–206. https://doi.org/10.1099/00207713-36-2-202

102. Courtois, S., Frostegård, A., Göransson, P., et al. (2001). Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. Environmental microbiology, 3(7), 431–9.

103. Cozzolino, V., Di Meo, V., Monda, H., et al. (2015). The molecular characteristics of compost affect plant growth, arbuscular mycorrhizal fungi, and soil microbial community composition. Biology and Fertility of Soils, 52(1), 15–29. https://doi.org/10.1007/s00374-015-1046-8

104. Crawley M. J. The, R. (2012). book. John Wiley & Sons.

105. Cresswell, A. J., Sanderson, D. C. W., Harrold, M., et al. (2013). Demonstration of lightweight gamma spectrometry systems in urban environments. Journal of Environmental Radioactivity, 124, 22–28. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2013.03.006

106. Cullen, D. W., Hirsch P. R. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for, PCR. (1998). Soil Biology and Biochemistry...)00001-7. 30(8–9), 983–993. https://doi.org/10.1016/S0038-0717(98

107. Dadachova, E., Casadevall, A. (2008). Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin. Current Opinion in Microbiology, 11(6), 525–531. https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.013

108. Daly, M. J. A. (2009). new perspective on radiation resistance based on Deinococcus radiodurans.Nature Reviews Microbiology 7:3. 2009, 7(3), 237–245. https://doi.org/10.1038/nrmicro2073

109. Daly, M. J., Gaidamakova, E. K., Matrosova, V. Y., et al. (2004). Accumulation of Mn(II) in Deinicoccus radiodurans facilitates gamma-radiation resistance. Science, 306(5698), 1025–1028. https://doi.org/10.1126/science.1103185

110. Davis, N. S., Silverman, G. J., Msurovsky, E. B. (1963). Radiation-resistant, pigmented coccus isolated from haddock tissue. Journal of bacteriology, 86, 294–8.

111. Degrange, V., Bardin R. Detection and counting of Nitrobacter populations in soil by, PCR. (1995). Applied and environmental microbiology. 61(6), 2093–8.

112. Dekker, L., Osborne, T. H., Santini, J. M. (2014). Isolation and identification of cobalt- and caesium-resistant bacteria from a nuclear fuel storage pond. FEMS Microbiology Letters, 359(1), 81–84. https://doi.org/10.1111/1574-6968.12562

113. Delmont, T. O., Robe, P., Clark, I., et al. (2011). Metagenomic comparison of direct and indirect soil DNA extraction approaches. Journal of Microbiological Methods, 86(3), 397–400. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.013

114. Desai, C., Madamwar D. Extraction of inhibitor-free metagenomic, DNA. (2007). from polluted sediments, compatible with molecular diversity analysis using adsorption and ion-exchange treatments. Bioresource technology, 98(4), 761–8. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.04.004

115. DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., et al. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. Applied and Environmental Microbiology. 72(7), 5069–5072. https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05

116. DeVeaux, L. C., Müller, J. A., Smith, J., et al. (2007). Extremely radiation-resistant mutants of a halophilic archaeon with increased single-stranded DNA-binding protein (RPA) gene expression. Radiation Research, 168(4), 507–514. https://doi.org/10.1667/RR0935.1

117. Dhal, P. K., Islam, E., Kazy, S. K., et al. (2011). Culture-independent molecular analysis of bacterial diversity in uranium-ore/-mine waste-contaminated and non-contaminated sites from uranium mines. 3 Biotech, 1(4), 261–272. https://doi.org/10.1007/s13205-011-0034-4

118. Dighton, J., Tugay, T., Zhdanova, N. (2008). Fungi and ionizing radiation from radionuclides. FEMS Microbiology Letters, 281(2), 109–120. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01076.x

119. DiRuggiero, J., Santangelo, N., Nackerdien, Z., et al. (1997). Repair of extensive ionizing-radiation DNA damage at 95 degrees C in the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus. Journal of bacteriology, 179(14), 4643–5.

120. Dong, X., Lv, L., Wang, W., et al. (2019). Differences in Distribution of Potassium-Solubilizing Bacteria in Forest and Plantation Soils in Myanmar. International Journal of Environmental Research and Public Health, 16(5), 700. https://doi.org/10.3390/ijerph16050700

121. Dzaugis, M., Spivack, A. J., D'Hondt, S. (2018). Radiolytic H2 production in martian environments. Astrobiology, 18(9), 1137–1146. https://doi.org/10.1089/ast.2017.1654

122. Edgar, R. C. (2017). Accuracy of microbial community diversity estimated by closed- and open-reference OTUs. PeerJ, 2017(10), e3889. https://doi.org/10.7717/peerj.3889

123. Epelde, L., Lanzén, A., Martín, I., et al. (2019). The microbiota of technosols resembles that of a nearby forest soil three years after their establishment. Chemosphere, 220, 600–610. https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2018.12.164

124. Eslinger, P. W., Biegalski, S. R., Bowyer, T. W., et al. (2014). Source term estimation of radioxenon released from the Fukushima Dai-ichi nuclear reactors using measured air concentrations and atmospheric transport modeling. Journal of Environmental Radioactivity, 127, 127–132. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2013.10.013

125. Ettenauer, J. D., Piñar, G., Lopandic, K., et al. (2012). Microbes on building materials - Evaluation of DNA extraction protocols as common basis for molecular analysis. Science of the Total Environment, 439, 44–53. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.005

126. Evrard, O., Laceby, J. P., Lepage, H., et al. (2015). Radiocesium transfer from hillslopes to the Pacific Ocean after the Fukushima Nuclear Power Plant accident: A review. Journal of environmental radioactivity, 148, 92–110. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2015.06.018

127. Ewing, B., Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred.II. Error probabilities. Genome research, 8(3), 186–94.

128. Faith, D. P., Baker, A. M. (2007). Phylogenetic diversity (PD) and biodiversity conservation: some bioinformatics challenges. Evolutionary bioinformatics online, 2, 121–8.

129. Faith, D., Pavoine, S., et al. (2018). Indicators for the expected loss of phylogenetic diversity. Phylogenetic Diversity: Applications and Challenges in Biodiversity Science.. C. 73–91., Veron S. https://doi.org/10.1007/978-3-319-93145-6_4

130. Ferris, F. G., Fratton, C. M., Gerits, J. P., et al. (1995). Microbial precipitation of a strontium calcite phase at a groundwater discharge zone near rock Creek, British Columbia, Canada. Geomicrobiology Journal, 13(1), 57–67. https://doi.org/10.1080/01490459509378004

131. Ferris, F. G., Phoenix, V., Fujita, Y., & Smith, R. W. (2004). Kinetics of calcite precipitation induced by ureolytic bacteria at 10 to 20°C in artificial groundwater. Geochimica et Cosmochimica Acta, 68(8), 1701–1710. https://doi.org/10.1016/S0016-7037(03)00503-9

132. Fierer, N., Jackson, J. A., Vilgalys, R., et al. (2005). Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. Applied and environmental microbiology, 71(7), 4117–20. https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4117-4120.2005

133. Fierer, N., Lauber, C. L., Ramirez, K. S., et al. (2012). Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. The ISME journal, 6(5), 1007–17. https://doi.org/10.1038/ismej.2011.159

134. Fierer, N., Leff, J. W., Adams, B. J., et al. (2012). Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(52), 21390–5. https://doi.org/10.1073/pnas.1215210110

135. Flynn, R. M., Deakin, J., Archbold, M., et al. (2016). Using microbiological tracers to assess the impact of winter land use restrictions on the quality of stream headwaters in a small catchment. The Science of the total environment, 541, 949–56. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.071

136. Francis, A. J. (1990). Microbial dissolution and stabilization of toxic metals and radionuclides in mixed wastes. Experientia, 46(8), 840–851. https://doi.org/10.1007/BF01935535

137. Fredrickson, J. K., Li, S. M. W., Gaidamakova, E. K., et al. (2008). Protein oxidation: Key to bacterial desiccation resistance? ISME Journal. 2(4), 393–403. https://doi.org/10.1038/ismej.2007.116

138. Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., et al. (2012). CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. Bioinformatics, 28(23), 3150–3152. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts565

139. Fujii, H., Mori, S., Matsumoto, Y., Sasaki, Y., Ito, C., Nakagawa, S., et al. (2021). Tohoku Region. In R. Hatano, H. Shinjo, & Y. Takata (Eds.), The Soils of Japan (pp. 185–244). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-8229-5_6

140. Fujita, Y., Taylor, J. L., Wendt, L. M., et al. (2010). Evaluating the Potential of Native Ureolytic Microbes To Remediate a 90 Sr Contaminated Environment. Environmental Science & Technology, 44(19), 7652–7658. https://doi.org/10.1021/es101752p

141. Gadd, G. M. (2009). Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 84(1), 13–28. https://doi.org/10.1002/jctb.1999

142. Gilbert, J. A., Field, D., Huang, Y., et al. (2008). Detection of Large Numbers of Novel Sequences in the Metatranscriptomes of Complex Marine Microbial Communities. PLoS ONE, 3(8), e3042. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003042

143. Glass, E. M., Meyer F. The Metagenomics RAST Server:, A. (2011). Public Resource for the Automatic Phylogenetic and Functional Analysis of Metagenomes. Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches. 325–331. https://doi.org/10.1002/9781118010518.ch37

144. Goossens, O., Vanhavere, F., Leys, N., et al. (2006). Radiation dosimetry for microbial experiments in the International Space Station using different etched track and luminescent detectors. Radiation Protection Dosimetry, 120(1–4), 433–437. https://doi.org/10.1093/rpd/nci652

145. Gotelli, N. J., Colwell, R. K. (2001). Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. Ecology Letters, 4(4), 379–391. https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2001.00230.x

146. Gudkov, S. V., Grinberg, M. A., Sukhov, V., et al. (2019). Effect of ionizing radiation on physiological and molecular processes in plants. Journal of Environmental Radioactivity, 202, 8–24. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2019.02.001

147. Handley-Sidhu, S., Renshaw, J. C., Yong, P., et al. (2011). Nano-crystalline hydroxyapatite bio-mineral for the treatment of strontium from aqueous solutions. Biotechnology Letters, 33(1), 79–87. https://doi.org/10.1007/s10529-010-0391-9

148. Harbison, A. B., Carson, M. A., Lamit, L. J., et al. (2016). A novel isolate and widespread abundance of the candidate alphaproteobacterial order (Ellin 329), in

southern Appalachian peatlands. FEMS Microbiology Letters, 363(15), fnw151. https://doi.org/10.1093/femsle/fnw151

149. Hashimoto, S., Ugawa, S., Nanko, K., et al. (2012). The total amounts of radioactively contaminated materials in forests in Fukushima, Japan. Scientific Reports, 2(1), 416. https://doi.org/10.1038/srep00416

150. Hashimoto, S., Ugawa, S., Nanko, K., et al. (2012). The total amounts of radioactively contaminated materials in forests in Fukushima, Japan. Scientific reports, 2, 416. https://doi.org/10.1038/srep00416

151. Hatano, R., Shinjo, H., Takata, Y. (2021). The Soils of Japan. https://doi.org/10.1007/978-981-15-8229-5

152. Hensel, R., Demharter, W., Kandler, O., et al. (1986). Chemotaxonomic and molecular-genetic studies of the genus thermus: evidence for a phylogenetic relationship of Thermus aquaticus and Thermus ruber to the genus Deinococcus. International Journal of Systematic Bacteriology, 36(3), 444–453. https://doi.org/10.1099/00207713-36-3-444

153. Herron, P. R., Wellington, E. M. (1990). New method for extraction of streptomycete spores from soil and application to the study of lysogeny in sterile amended and nonsterile soil. Applied and environmental microbiology, 56(5), 1406–12.

154. Hirano, M., Yonomoto, T., Ishigaki, M., et al. (2012). Insights from review and analysis of the Fukushima Dai-ichi accident. Journal of Nuclear Science and Technology, 49(1), 1–17. https://doi.org/10.1080/18811248.2011.636538

155. Hirose, K. (2011). Fukushima Dai-ichi nuclear power plant accident: summary of regional radioactive deposition monitoring results.Journal of Environmental Radioactivity. 2012, 111, 13–17. https://doi.org/10.1016/J.JENVRAD.2011.09.003

156. Holben, W. E., Jansson, J. K., Chelm, B. K., et al. (1988). DNA Probe Method for the Detection of Specific Microorganisms in the Soil Bacterial Community. Applied and environmental microbiology, 54(3), 703–711.

157. Holiaka, D. M., Levchuk, S. E., Kashparov, V. A., et al. (2020). Vertical distribution of90sr in soil profiles and its uptake by scots pine (Pinus sylvestris l.) wood growing within the chernobyl exclusion zone. Nuclear Physics and Atomic Energy, 21(2), 157–165. https://doi.org/10.15407/JNPAE2020.02.157

158. Hu, N., Ding, D., Li, S., et al. (2016). Bioreduction of U(VI) and stability of immobilized uranium under suboxic conditions. Journal of Environmental Radioactivity, 154, 60–67. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2016.01.020

159. Hughes, J. B., Hellmann, J. J., Ricketts, T. H., et al. (2001). Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. Applied and Environmental Microbiology, 67(10), 4399–4406. https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4399-4406.2001

160. International Atomic Energy Agency. (2015). The Fukushima Daiichi accident (STI/PUB/1710). IAEA.

161. International Atomic Energy Agency. (2008). Modelling radiation exposure and radionuclide transfer for non-human species: Report of the Biota Working Group of EMRAS Theme 3. IAEA.

162. Ihara, H., Kumagai, A., Hori, T., et al. (2021). Direct comparison of bacterial communities in soils contaminated with different levels of radioactive cesium from the first Fukushima nuclear power plant accident. Science of The Total Environment, 756, 143844. https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.143844

163. Illienko, V., Nesterova, N., Pareniuk, O., et al. (2017). Estimation of the effect of radionuclide contamination on Vicia sativa L. induction of chlorophyll fluorescence parameters using «Floratest» optical biosensor. Biophotonics–Riga. 2017. 10592, 20. https://doi.org/10.1117/12.2297563

164. International Atomic Energy Agency. (2006). Applicability of monitored natural attenuation at radioactively contaminated sites (Technical Reports Series No. 445). IAEA.

165. Islam, M. R., Sultana, T., Melvin Joe, M., et al. (2012). Comparisons of direct extraction methods of microbial DNA from different paddy soils. Saudi Journal of Biological Sciences, 19(3), 337–342. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.001

166. Jackson, C. R., Harper, J. P., Willoughby, D., et al. (1997). A simple, efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples. Applied and environmental microbiology, 63(12), 4993–5.

167. Jacobsen, C. S., Rasmussen O. F. Development and application of a new method to extract bacterial, DNA. (1992). from soil based on separation of bacteria from soil with cation-exchange resin. Applied and environmental microbiology, 58(8), 2458–62.

168. Jacobsen, C. S., & Rasmussen, O. F. (1992). Development and application of a new method to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacteria from soil with cation-exchange resin. Applied and Environmental Microbiology, 58(8), 2458–2462.

169. Jolivet, E., L'Haridon, S., Corre, E., et al. (2003). Thermococcus gammatolerans sp. nov., a hyperthermophilic archeon from a deep-sea hydrothermal vent that resists ionizing radiation. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53(3), 847–851. https://doi.org/10.1099/ijs.0.02503-0

170. Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., et al. (2012). KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. Nucleic Acids Research, 40(D1), D109–14. https://doi.org/10.1093/nar/gkr988

171. Karley, D., Shukla, S. K., Rao, T. S. (2019). Microbiota of spent nuclear fuel pool water with emphasis on their biofilm forming ability on stainless steel (SS-304L). Journal of biosciences, 44(5), 1–9. https://doi.org/10.1007/s12038-019-9937-8

172. Karley, D., Shukla, S. K., Rao, T. S. (2018). Isolation and characterization of culturable bacteria present in the spent nuclear fuel pool water. Environmental Science and Pollution Research, 25(21), 20518–20526. https://doi.org/10.1007/s11356-017-0376-5

173. Kashparov, V., Levchuk, S., Zhurba, M., et al. (1987). Spatial radionuclide deposition data from the 60 km radial area around the Chernobyl Nuclear Power Plant: Results from a sampling survey in. Earth System Science Data. 2020, 12(3), 1861–1875. https://doi.org/10.5194/ESSD-12-1861-2020

174. Kashparov, V. A., Ahamdach, N., Zvarich, S. I., et al. (2004). Kinetics of dissolution of Chernobyl fuel particles in soil in natural conditions. Journal of Environmental Radioactivity, 72(3), 335–353. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2003.08.002

175. Kashparov, V. A., Lundin, S. M., Khomutinin, Y. V., et al. (2001). Radioactive contamination of 30-km zone of ChNPP.

176. Kashparov, V. A., Lundin, S. M., Khomutinin, Y. V., et al. (2001). Soil contamination with 90Sr in the near zone of the Chernobyl accident. Journal of environmental radioactivity, 56(3), 285–98.

177. Kashparov, V. A., Lundin, S. M., Zvarych, S. I., et al. (2003). Territory contamination with the radionuclides representing the fuel component of Chernobyl fallout. Science of The Total Environment...)00336-X, 317(1), 105–119. https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03

178. Kashparov, V. A., Oughton, D. H., Zvarich, S. I., et al. (1999). Kinetics of fuel particle weathering and 90Sr mobility in the Chernobyl 30-km exclusion zone. Health physics, 76(3), 251–9.

179. Kazy, S. K., D'Souza, S. F., Sar, P. (2009). Uranium and thorium sequestration by a Pseudomonas sp.: Mechanism and chemical characterization. Journal of Hazardous Materials, 163(1), 65–72. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.076

180. Keiblinger, K. M., Wilhartitz, I. C., Schneider, T., et al. (2012). Soil metaproteomics - Comparative evaluation of protein extraction protocols. Soil biology & biochemistry, 54(15–10), 14–24. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.05.014

181. Khomutinin, Y., Fesenko, S., Levchuk, S., et al. (2020). Optimising sampling strategies for emergency response: Soil sampling. Journal of Environmental Radioactivity, 222, 106344. https://doi.org/10.1016/J.JENVRAD.2020.106344

182. Knauth, S., Schmidt, H., Tippkötter R. Comparison of commercial kits for the extraction of, DNA. (2013). from paddy soils. Letters in Applied Microbiology, 56(3), 222–228. https://doi.org/10.1111/lam.12038

183. Köninger, J., Panagos, P., Jones, A., et al. (2022). In defence of soil biodiversity: Towards an inclusive protection in the European Union. Biological Conservation, 268, 109475. https://doi.org/10.1016/J.BIOCON.2022.109475

184. Konoplev, A., Golosov, V., Laptev, G., et al. (2016). Behavior of accidentally released radiocesium in soil–water environment: Looking at Fukushima from a Chernobyl perspective. Journal of Environmental Radioactivity, 151, 568–578. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2015.06.019

185. Konoplev, A., Golosov, V., Wakiyama, Y., et al. (2018). Natural attenuation of Fukushima-derived radiocesium in soils due to its vertical and lateral migration. Journal of Environmental Radioactivity, 186, 23–33. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2017.06.019

186. Konoplev, A., Golosov, V., Wakiyama, Y., et al. (2018). Natural attenuation of Fukushima-derived radiocesium in soils due to its vertical and lateral migration. Journal of Environmental Radioactivity, 186, 23–33. https://doi.org/10.1016/J.JENVRAD.2017.06.019

187. International Atomic Energy Agency. (2014). Radiation protection and safety of radiation sources: International basic safety standards (IAEA Safety Standards Series No. GSR Part 3). IAEA. https://doi.org/10.61092/iaea.u2pu-60vm

188. Krane, K. S. (1987). Introductory Nuclear Physics, 3rd Edition. John Wiley and Sons Inc. Retrieved 12.10.2020, from https://www.wiley.com/en-us/Introductory+Nuclear+Physics%2C+3rd+Edition-p-9780471805533

189. Krejci, M. R., Finney, L., Vogt, S., et al. (2011). Selective Sequestration of Strontium in Desmid Green Algae by Biogenic Co-precipitation with Barite. ChemSusChem, 4(4), 470–473. https://doi.org/10.1002/cssc.201000448

190. Krisko, A., Radman, M. (2013). Biology of extreme radiation resistance: The way of Deinococcus radiodurans.Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.. Вип. 5. № 7. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012765

191. Krsek, M., Wellington, E. M. (1999). Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. Journal of microbiological methods, 39(1), 1–16.

192. Kryshev, I. I., Sazykina, T. G., & Beresford, N. A. (2006). Effects on wildlife. In Chernobyl – Catastrophe and Consequences (pp. 267–287). Springer. https://doi.org/10.1007/3-540-28079-0_8

193. Kryshev, I. I., Sazykina, T. G., Beresford, N. A. (2006). Effects on wildlife. Chernobyl – Catastrophe and Consequences. 267–287. https://doi.org/10.1007/3-540-28079-0_8

194. Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W. A., et al. (2011). Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. Current protocols in bioinformatics / editoral board, Andreas D. Baxevanis.. [et al.]...5, Chapter 10, Unit 1E. https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01e05s27

195. Kuntal, B. K., & Mande, S. S. (2019). Visual exploration of microbiome data. Journal of Biosciences, 44, Article 119. https://doi.org/10.1007/s12038-019-9933-z

196. La Duc, M. T., Benardini, J. N., Kempf, M. J., et al. (2007). Microbial diversity of indian ocean hydrothermal vent plumes: Microbes tolerant of desiccation, peroxide exposure, and ultraviolet and γ-irradiation. Astrobiology, 7(2), 416–431. https://doi.org/10.1089/ast.2006.0060

197. Lakay, F. M., Botha, A., Prior B. A. Comparative analysis of environmental, DNA. (2007). extraction and purification methods from different

humic acid-rich soils. Journal of Applied Microbiology, 102(1), 265–273. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03052.x

198. LaMontagne, M. G., Michel, F. C., Holden, P. A., et al. (2002). Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. Journal of microbiological methods, 49(3), 255–64.

199. Langille, M. G. I. M., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., et al. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. Nature biotechnology, 31(9), 814–21. https://doi.org/10.1038/nbt.2676

200. Law, G. T. W., Geissler, A., Burke, I. T., et al. (2011). Uranium Redox Cycling in Sediment and Biomineral Systems. Geomicrobiology Journal, 28(5–6), 497–506. https://doi.org/10.1080/01490451.2010.512033

201. Lee, A. K., Newman, D. K. (2003). Microbial iron respiration: impacts on corrosion processes. Applied microbiology and biotechnology, 62(2–3), 134–9. https://doi.org/10.1007/s00253-003-1314-7

202. Lefevre, F., Robe, P., Jarrin, C., et al. (2008). Drugs from hidden bugs: their discovery via untapped resources. Research in Microbiology, 159(3), 153–161. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.12.011

203. Lerman, M. I., Spirin, A. S., Gavrilova, L. P., et al. (1966). Studies on the structure of ribosomes: II. Stepwise dissociation of protein from ribosomes by caesium chloride and the re-assembly of ribosome-like particles. Journal of Molecular Biology...)80226-7, 15(1), 268–IN8. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(66

204. Li, Q., Wang, T., Wang, F., et al. (2021). Dynamical downscaling simulation of the East Asian summer monsoon in a regional Climate-Weather Research and Forecasting model. International Journal of Climatology, 41(S1), E1700–E1716. https://doi.org/10.1002/joc.6800

205. Liang, X. Z., Xu, M., Yuan, X., et al. (2012). Regional climate-weather research and forecasting model. Bulletin of the American Meteorological Society, 93(9), 1363–1387. https://doi.org/10.1175/BAMS-D-11-00180.1

206. Liengen, T., Basseguy, R., Feron, D., Beech, I. B., & Birrien, V. (Eds.). (2014). Understanding biocorrosion: Fundamentals and applications. Woodhead Publishing.

207. Liesack, W., Weyland, H., Stackebrandt E. Potential risks of gene amplification by, PCR. (1991). as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. Microbial Ecology, 21(1), 191–198. https://doi.org/10.1007/BF02539153

208. Lloyd, J. R., Gadd, G. M. (2011). The Geomicrobiology of Radionuclides. Geomicrobiology Journal, 28(5–6), 383–386. https://doi.org/10.1080/01490451.2010.547551

209. Lloyd, J. R., Macaskie L. E. Bioremediation of Radionuclide-Containing Wastewaters. Environmental Microbe-M, et al. (2000). Interactions. 277–327. https://doi.org/10.1128/9781555818098.ch13

210. Lloyd, J. R., Renshaw J. C. Microbial transformations of radionuclides: fundamental mechanisms and biogeochemical implications., M., et al. (2005). ions in biological systems. 44, 205–40.

211. Lombard, N., Prestat, E., Elsas J. D. van, et al. (2011). Soil-specific limitations for access and analysis of soil microbial communities by metagenomics. FEMS Microbiology Ecology, 78(1), 31–49. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01140.x

212. Lovley, D. R., Lovley, D. R., Lovley, D. R., et al. (2011). Live wires: direct extracellular electron exchange for bioenergy and the bioremediation of energy-related contamination. Energy & Environmental Science, 4(12), 4896. https://doi.org/10.1039/c1ee02229f

213. Lovley, D. R., Nevin, K. P. A. (2011). shift in the current: New applications and concepts for microbe-electrode electron exchange. Current Opinion in Biotechnology, 22(3), 441–448. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.01.009

214. Lovley, D. R., Phillips, E. J. (1992). Reduction of uranium by Desulfovibrio desulfuricans. Applied and environmental microbiology, 58(3), 850–6.

215. Lovley, D. R., Phillips, E. J. (1992). Reduction of uranium by Desulfovibrio desulfuricans. Applied and environmental microbiology, 58(3), 850–6.

216. Lu, B., Wang G.-X, Huang, D., et al. (2018). Comparison of PCL degradation in different aquatic environments: Effects of bacteria and inorganic salts. Polymer Degradation and Stability, 150, 133–139. https://doi.org/10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2018.02.002

217. Luo, C., Rodriguez-R, L. M., Johnston, E. R., et al. (2014). Soil microbial community responses to a decade of warming as revealed by comparative metagenomics. Applied and environmental microbiology, 80(5), 1777–86. https://doi.org/10.1128/AEM.03712-13

218. Maarit Niemi, R., Heiskanen, I., Wallenius, K., et al. (2001). Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. Journal of Microbiological Methods...)00253-6, 45(3), 155–165. https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01

219. Macaskie, L. E., Empson, R. M., Cheetham, A. K., et al. (1992). Uranium bioaccumulation by a Citrobacter sp. as a result of enzymically mediated growth of polycrystalline HUO2PO4. Science (New York, N.Y.), 257(5071), 782–4.

220. Magurran, A. E. (2004). Measuring biological diversity. Blackwell Pub.

221. Mahmoudi, N., Slater, G. F., & Fulthorpe, R. R. (2011). Comparison of commercial DNA extraction kits for isolation and purification of bacterial and eukaryotic DNA from PAH-contaminated soils. Canadian Journal of Microbiology, 57(8), 623–628. https://doi.org/10.1139/W11-049

222. Sagova-Mareckova, M., Cermak, L., Novotna, J., Plhackova, K., Forstova, J., & Kopecky, J. (2008). Innovative methods for soil DNA purification

tested in soils with widely differing characteristics. Applied and Environmental Microbiology, 74(9), 2902–2907. https://doi.org/10.1128/AEM.02161-07

223. Markowitz, V. M., Chen I.-M., M. A., Palaniappan, K., et al. (2012). IMG: The integrated microbial genomes database and comparative analysis system. Nucleic Acids Research, 40(D1), D115–22. https://doi.org/10.1093/nar/gkr1044

224. Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., et al. (2001). DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. Applied and environmental microbiology, 67(5), 2354–9. https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2354-2359.2001

225. Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., et al. (2001). DNA Extraction from Soils: Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods. Applied and Environmental Microbiology, 67(5), 2354–2359. https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2354-2359.2001

226. McCabe, A. (1990). The potential significance of microbial activity in radioactive waste disposal. Experientia, 46(8), 779–787. https://doi.org/10.1007/BF01935524

227. McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., et al. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. The ISME Journal, 6(3), 610–618. https://doi.org/10.1038/ismej.2011.139

228. McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., et al. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. ISME Journal, 6(3), 610–618. https://doi.org/10.1038/ismej.2011.139

229. McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., et al. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. The ISME Journal, 6(3), 610–618. https://doi.org/10.1038/ismej.2011.139

230. McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., et al. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea.. Вип. 6. № 3. https://doi.org/10.1038/ismej.2011.139

231. McMurdie, P. J., Holmes, S., Kindt, R., et al. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLoS ONE, 8(4), e61217. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217

232. McMurdie, P. J., Holmes, S., Kindt, R., et al. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLoS ONE, 8(4), e61217. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217

233. Menezes A. B. de, Gashchak, S., Wood, M. D., et al. (2024). Relationships between radiation, wildfire and the soil microbial communities in the Chornobyl Exclusion Zone. Science of The Total Environment, 950, 175381. https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2024.175381

234. Merino, N., Aronson, H. S., Bojanova, D. P., et al. (2019). Living at the extremes: Extremophiles and the limits of life in a planetary context. Frontiers in Microbiology, 10(MAR), 780. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00780

235. Miller, D. N., Bryant, J. E., Madsen, E. L., et al. (1999). Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. Applied and environmental microbiology, 65(11), 4715–24.

236. Miller, J. R., Koren, S., Sutton, G. (2010). Assembly algorithms for next-generation sequencing data. Genomics, 95(6), 315–27. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.03.001

237. Mitra, S., Rupek, P., Richter, D. C., et al. (2011). Functional analysis of metagenomes and metatranscriptomes using SEED and KEGG. BMC Bioinformatics. 12(Suppl 1), S21. https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-S1-S21

238. Mojib, N., Farhoomand, A., Andersen, D. T., et al. (2013). UV and cold tolerance of a pigment-producing Antarctic Janthinobacterium sp.Ant5-2. Extremophiles, 17(3), 367–378. https://doi.org/10.1007/s00792-013-0525-9

239. Mondani, L., Benzerara, K., Carrière, M., et al. (2011). Influence of Uranium on Bacterial Communities: A Comparison of Natural Uranium-Rich Soils with Controls. PloS one, 6(10), e25771. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025771

240. Mondani, L., Benzerara, K., Carrière, M., et al. (2011). Influence of Uranium on Bacterial Communities: A Comparison of Natural Uranium-Rich Soils with Controls. PloS one, 6(10), e25771. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025771

241. Morales-Hidalgo, M., Povedano-Priego, C., Martinez-Moreno, M. F., et al. (2026). Assessing the combined effect of gamma radiation and sulfate-reducing bacteria on copper corrosion for deep nuclear waste storage. Corrosion Science, 258, 113443. https://doi.org/10.1016/j.corsci.2025.113443

242. Moré, M. I., Herrick, J. B., Silva, M. C., et al. (1994). Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. Applied and environmental microbiology, 60(5), 1572–80.

243. Moriya, Y., Itoh, M., Okuda, S., et al. (2007). KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. Nucleic Acids Research, 35(Web Server), W182–W185. https://doi.org/10.1093/nar/gkm321

244. Mudhoo, A., Garg, V. K., Wang, S. (2012). Removal of heavy metals by biosorption. Environmental Chemistry Letters, 10(2), 109–117. https://doi.org/10.1007/s10311-011-0342-2

245. Nalin, R., Normand, P., Simonet, P., et al. (1999). Polymerase chain reaction and hybridization on DNA extracted from soil as a tool for Frankia spp. population distribution studies in soil. Canadian Journal of Botany, 77(9), 1239–1247. https://doi.org/10.1139/b99-065

246. Nannipieri, P., & Ascher, J. (2003). Microbial diversity and soil functions. European Journal of Soil Science, 54(4), 655–670. https://doi.org/10.1046/j.1365-2389.2003.00556.x

247. Nesterova, N., Pareniuk, O., Illienko, V., et al. (2019). Physiological Reactions in Cereals Family Avena Sativa L. and Avena Nuda L., Caused by Lowerature Stress Factors. IEEE 39th International Conference on Electronics and

Nanotechnology, ELNANO 2019 - Proceedings. 2019. https://doi.org/10.1109/ELNANO.2019.8783870

248. Newsome, L., Morris, K., Lloyd, J. R. (2014). The biogeochemistry and bioremediation of uranium and other priority radionuclides. Chemical Geology, 363, 164–184. https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2013.10.034

249. Niedrée, B., Berns, A. E., Vereecken, H., et al. (2013). Do Chernobyl-like contaminations with 137Cs and 90Sr affect the microbial community, the fungal biomass and the composition of soil organic matter in soil? Journal of Environmental Radioactivity. 118, 21–29. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2012.11.007

250. Ministry of the Environment, Government of Japan. (2019). Environmental remediation in affected areas in Japan: March 2019. Ministry of the Environment, Government of Japan. http://josen.env.go.jp/en/pdf/environmental_remediation_1903.pdf

251. Niu, B., Fu, L., Sun, S., et al. (2010). Artificial and natural duplicates in pyrosequencing reads of metagenomic data. BMC Bioinformatics, 11(1), 187. https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-187

252. Norio, O., Ye, T., Kajitani, Y., et al. (2011). The eastern Japan great earthquake disaster: Overview and comments.International Journal of Disaster Risk Science. 2011, 2(1), 34–42. https://doi.org/10.1007/S13753-011-0004-9/METRICS

253. Ogram, A., Sayler, G. S., Barkay T. The extraction and purification of microbial, DNA. (1987). from sediments. Journal of Microbiological Methods...)90025-X, 7(2), 57–66. https://doi.org/10.1016/0167-7012(87

254. Ohba, M., Sugimoto, S. (2020). Impacts of climate change on heavy wet snowfall in Japan. Climate Dynamics, 54(5–6), 3151–3164. https://doi.org/10.1007/s00382-020-05163-z

255. Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., et al. (2019). vegan: Community Ecology Package (R package version 2.5-6). https://CRAN.R-project.org/package=vegan

256. Onda, Y., Taniguchi, K., Yoshimura, K., et al. (2020). Radionuclides from the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant in terrestrial systems.Nature Reviews Earth & Environment 1:12. 2020, 1(12), 644–660. https://doi.org/10.1038/s43017-020-0099-x

257. Ondov, B. D., Bergman, N. H., Phillippy, A. M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. BMC Bioinformatics, 12(1), 385. https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-385

258. Orsini, M., Romano-Spica, V. A. (2001). microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples. Letters in Applied Microbiology, 33(1), 17–20. https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00938.x

259. Oyaizu, H., Stackebrandt, E., Schleifer, K. H., et al. (1987). A Radiation-resistant rod-shaped bacterium, Deinobacter grandis gen. nov., sp. nov., with peptidoglycan containing ornithine. International Journal of Systematic Bacteriology, 37(1), 62–67. https://doi.org/10.1099/00207713-37-1-62

260. Pal, S., Pradhan, D., Das, T., et al. (2010). Bioleaching of low-grade uranium ore using Acidithiobacillus ferrooxidans. Indian journal of microbiology, 50(1), 70–5. https://doi.org/10.1007/s12088-010-0015-z

261. Palenik, B., Ren, Q., Tai, V., et al. (2009). Coastal Synechococcus metagenome reveals major roles for horizontal gene transfer and plasmids in population diversity. Environmental Microbiology, 11(2), 349–359. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01772.x

262. Paliy, O., Shankar, V. (2016). Application of multivariate statistical techniques in microbial ecology. Molecular ecology, 25(5), 1032–57. https://doi.org/10.1111/mec.13536

263. Pareniuk, O., Shavanova, K., Laceby, J. P., et al. (2015). Modification of 137Cs transfer to rape (Brassica napus L.) phytomass under the influence of soil microorganisms. Journal of Environmental Radioactivity, 149, 73–80. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2015.07.003

264. Pareniuk, O., Yasuda, N. (2021). Chornobyl exclusion zone: current status and challenges. ICRP, 50(suppl 1), 201–208. https://doi.org/10.1177/01466453211028032

265. Pareniuk, O. Y., Shavanova, K. E., Illienko, V. V., et al. (2017). Diversity of microflora at the fourth destroyed unit of the ChNPP. Nuclear Physics and Atomic Energy. 18(2), 179–187.

266. Paulsen, I. T., Sliwinski, M. K., Saier, M. H. (1998). Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities 1 1Edited by G. Von Heijne. Journal of Molecular Biology, 277(3), 573–592. https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1609

267. Phoenix, V. R., Bennett, P. C., Engel, A. S., et al. (2006). Chilean high-altitude hot-spring sinters: A model system for UV screening mechanisms by early Precambrian cyanobacteria. Geobiology, 4(1), 15–28. https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2006.00063.x

268. Picard, C., Ponsonnet, C., Paget, E., et al. (1992). Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. Applied and environmental microbiology, 58(9), 2717–22.

269. Porteous, L. A., Armstrong J. L. Recovery of bulk, DNA. (1991). from soil by a rapid, small-scale extraction method. Current Microbiology, 22(6), 345–348. https://doi.org/10.1007/BF02092152

270. Porteous, L. A., Seidler, R. J., Watrud L. S. An improved method for purifying, DNA. (1997). from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications. Molecular Ecology, 6(8), 787–791. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1997.00241.x

271. Pro, H., Iizuka, H. (1980). Characterization of radiation-resistant species of Pseudomonas radiora and patterns of catalase activities. Agricultural and Biological Chemistry, 44(6), 1315–1320. https://doi.org/10.1080/00021369.1980.10864135

272. Puente-Sánchez, F., Aguirre, J., Parro, V. A. (2016). novel conceptual approach to read-filtering in high-throughput amplicon sequencing studies. Nucleic acids research, 44(4), e40. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1113

273. Qiu, G., Li, Q., Yu, R., et al. (2011). Column bioleaching of uranium embedded in granite porphyry by a mesophilic acidophilic consortium. Bioresource Technology, 102(7), 4697–4702. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.038

274. Ragon, M., Restoux, G., Moreira, D., et al. (2011). Sunlight-exposed biofilm microbial communities are naturally resistant to chernobyl ionizing-radiation levels. PloS one, 6(7), e21764. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021764

275. Rainey, F. A., Nobre, M. F., Schumann, P., et al. (1997). Phylogenetic diversity of the deinococci as determined by 16S ribosomal DNA sequence comparison. International journal of systematic bacteriology, 47(2), 510–4. https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-510

276. Rainey, F. A., Ray, K., Ferreira, M., et al. (2005). Extensive diversity of ionizing-radiation-resistant bacteria recovered from Sonoran Desert soil and description of nine new species of the genus Deinococcus obtained from a single soil sample. Applied and Environmental Microbiology, 71(9), 5225–5235. https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5225-5235.2005

277. Manjula, A., Sathyavathi, S., Gunasekaran, P., & Rajendhran, J. (2011). Comparison of seven methods of DNA extraction from termitarium for functional metagenomic DNA library construction. Journal of Scientific & Industrial Research, 70(11), 945–951.

278. Rajendhran, J., Gunasekaran, P. (2008). Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. Biotechnology advances, 26(6), 576–90. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.08.002

279. Ram, R. J., Verberkmoes, N. C., Thelen, M. P., et al. (2005). Community proteomics of a natural microbial biofilm. Science (New York, N.Y.)... 1109070, 308(5730), 1915–20. https://doi.org/10.1126/science

280. Rideout, J. R., He, Y., Navas-Molina, J. A., et al. (2014). Subsampled open-reference clustering creates consistent, comprehensive OTU definitions and scales to billions of sequences. PeerJ, 2, e545. https://doi.org/10.7717/peerj.545

281. Robe, P., Nalin, R., Capellano, C., et al. (2003). Extraction of DNA from soil. European Journal of Soil Biology...)00033-5, 39(4), 183–190. https://doi.org/10.1016/S1164-5563(03

282. Rochelle, P. A., Fry, J. C., John Parkes, R., et al. (1992). DNA extraction for 16S rRNA gene analysis to determine genetic diversity in deep sediment communities. FEMS Microbiology Letters, 100(1–3), 59–65. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05682.x

283. Roger, A. S., Wolfram, S., Graham, C. W., et al. (2006). DNA Repair and Mutagenesis, Second Edition. American Society of Microbiology. https://doi.org/10.1128/9781555816704

284. Roh, C., Villatte, F., Kim B.-G, et al. (2006). Comparative Study of Methods for Extraction and Purification of Environmental DNA From Soil and Sludge Samples. Applied Biochemistry and Biotechnology, 134(2), 97–112. https://doi.org/10.1385/ABAB:134:2:97

285. Rondon, M. R., August, P. R., Bettermann, A. D., Brady, S. F., Grossman, T. H., Liles, M. R., et al. (2000). Cloning the soil metagenome: A strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. Applied and Environmental Microbiology, 66(6), 2541–2547. https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2541-2547.2000

286. Ruban, Y., Illienko, V., Nesterova, N., et al. (2017). Estimation of the effect of radionuclide contamination on Vicia sativa L. induction of chlorophyll fluorescence parameters using «floratest» optical biosensor. Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE.. Вип. 10592. https://doi.org/10.1117/12.2297563

287. Ruban, Y., Shpyrka, N., Pareniuk, O., et al. (2017). BLV leucosis biosensor based on ZnO nanorods photoluminescence. IEEE 37th International

Conference on Electronics and Nanotechnology, ELNANO 2017 - Proceedings. 2017. https://doi.org/10.1109/ELNANO.2017.7939779

288. Saano, A., Tas, E., Pippola, S., et al. (1995). Extraction and Analysis of Microbial DNA from Soil. Nucleic Acids in the Environment. 49–67. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79050-8_4

289. Sagova-Mareckova, M., Cermak, L., Novotna, J., et al. (2008). Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics. Applied and environmental microbiology, 74(9), 2902–7. https://doi.org/10.1128/AEM.02161-07

290. Sait, M., Davis, K. E. R., Janssen, P. H. (2006). Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum Acidobacteria occurring in soil. Applied and environmental microbiology, 72(3), 1852–7. https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1852-1857.2006

291. Saito, T., Terato, H., Yamamoto, O. (1994). Pigments of Rubrobacter radiotolerans. Archives of Microbiology, 162(6), 414–421. https://doi.org/10.1007/BF00282106

292. Saji, G. A. (2014). Post Accident Safety Analysis Report of the Fukushima Accident – Future Direction of Evacuation: Lessons Learned.International Conference on Nuclear Engineering, Proceedings, ICONE.. Вип. 3. https://doi.org/10.1115/ICONE21-16526

293. Santo Domingo, J. W., Berry, C. J., Summer, M., et al. (1998). Microbiology of spent nuclear fuel storage basins. Current Microbiology, 37(6), 387–394. https://doi.org/10.1007/s002849900398

294. Sanzharova, N. I., Fesenko, S. V., Alexakhin, R. M., et al. (1994). Changes in the forms of 137Cs and its availability for plants as dependent on properties of fallout after the Chernobyl nuclear power plant accident. Science of The Total Environment...)90609-2, 154(1), 9–22. https://doi.org/10.1016/0048-9697(94

295. Schmieder, R., Edwards R. Schmieder, R, & Edwards, R (2011). ().Quality control and preprocessing of metagenomic datasets.Bioinformatics, 27(6),

863–864. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026Quality control and preprocessing of metagenomic datasets.Bioinformatics. 2011, 27(6), 863–864. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026

296. Seefeld, K., & Linder, E. (2007). Statistics using R with biological examples. University of New Hampshire.

297. Selenska, S., Klingmüller, W. DNA. (1991). recovery and direct detection of Tn5 sequences from soil. Letters in Applied Microbiology, 13(1), 21–24. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1991.tb00559.x

298. Senko, J. M., Mohamed, Y., Dewers, T. A., & Krumholz, L. R. (2005). Role for Fe(III) minerals in nitrate-dependent microbial U(IV) oxidation. Environmental Science & Technology, 39(8), 2529–2536. https://doi.org/10.1021/es048906i

299. Sessitsch, A., Weilharter, A., Gerzabek, M. H., et al. (2001). Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. Applied and environmental microbiology, 67(9), 4215–24. https://doi.org/10.1128/AEM.67.9.4215-4224.2001

300. Sghaier, H., Thorvaldsen, S., Saied, N. M. (2013). There are more small amino acids and fewer aromatic rings in proteins of ionizing radiation-resistant bacteria. Annals of Microbiology, 63(4), 1483–1491. https://doi.org/10.1007/s13213-013-0612-2

301. Shahmohammadi, H. R., Asgarani, E., Terato, H., et al. (1997). Effects of 60Co gamma-rays, ultraviolet light, and mitomycin C on Halobacterium salinarium and Thiobacillus intermedius. Journal of radiation research, 38(1), 37–43. https://doi.org/10.1269/JRR.38.37

302. Shannon, C. E. A. (1948). Mathematical Theory of Communication. Bell System Technical Journal, 27(3), 379–423. https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x

303. Shelobolina, E. S., Coppi, M. V., Korenevsky, A. A., et al. (2007). Importance of c-Type cytochromes for U(VI) reduction by Geobacter sulfurreducens. BMC microbiology, 7, 16. https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-16

304. Simon, C., Daniel, R. (2011). Metagenomic analyses: past and future trends. Applied and environmental microbiology, 77(4), 1153–61. https://doi.org/10.1128/AEM.02345-10

305. Simonet, P., Grosjean, M. C., Misra, A. K., et al. (1991). Frankia genus-specific characterization by polymerase chain reaction. Applied and environmental microbiology, 57(11), 3278–86.

306. Simpson, E. H. (1949). Measurement of Diversity. Nature, 163, 688.

307. Singh, S. P., Sagar, K., & Konwar, B. K. (2013). Strategy in metagenomic DNA isolation and computational studies of humic acid. Current Research in Microbiology and Biotechnology, 1(1), 9–11.

308. Smalla, K., Cresswell, N., Mendonca-Hagler, L. C., et al. (1993). Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. Journal of Applied Bacteriology, 74(1), 78–85. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02999.x

309. Steffan, R. J., Goksøyr, J., Bej, A. K., et al. (1988). Recovery of DNA from soils and sediments. Applied and environmental microbiology, 54(12), 2908–15.

310. Stegemann, J. A., Buenfeld N. R. Prediction of leachate pH for cement paste containing pure m, et al. (2002). compounds. Journal of Hazardous Materials...)00338-7, 90(2), 169–188. https://doi.org/10.1016/S0304-3894(01

311. Steinhauser, G., Brandl, A., Johnson T. E. Comparison of the Chernobyl and Fukushima nuclear accidents:, A. (2014). review of the environmental impacts. Science of The Total Environment, 470–471, 800–817. https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2013.10.029

312. Stephan, A., Meyer, A. H., Schmid, B. (2000). Plant diversity affects culturable soil bacteria in experimental grassland communities. Journal of Ecology, 88(6), 988–998. https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2000.00510.x

313. Stohl, A., Seibert, P., Wotawa, G., et al. (2012). Xenon-133 and caesium-137 releases into the atmosphere from the Fukushima Dai-ichi nuclear power plant: Determination of the source term, atmospheric dispersion, and deposition. Atmospheric Chemistry and Physics, 12(5), 2313–2343. https://doi.org/10.5194/ACP-12-2313-2012

314. Strand, Copplestone, D., et al. (2009). Environmental Protection: Transfer Parameters for Reference Animals and Plants.ICRP Publication 114. ICRP,, Beresford N. https://doi.org/10.1177/ANIB_39_6

315. Suenaga, H. (2012). Targeted metagenomics: a high-resolution metagenomics approach for specific gene clusters in complex microbial communities. Environmental Microbiology, 14(1), 13–22. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02438.x

316. Suzuki, Y., Banfield, J. F. (1999). Geomicrobiology of uranium.Reviews in Mineralogy and Geochemistry.. Вип. 38. № 1.

317. Suzuki, Y., Banfield, J. F. (2004). Resistance to, and accumulation of, uranium by bacteria from a uranium-contaminated site. Geomicrobiology Journal, 21(2), 113–121. https://doi.org/10.1080/01490450490266361

318. Sysoev, M., Grötzinger, S. W., Renn, D., et al. (2021). Bioprospecting of Novel Extremozymes From Prokaryotes–The Advent of Culture-Independent Methods. Frontiers in Microbiology, 12, 196. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630013

319. Tanase A.-M, Mereuta, I., Chiciudean, I., et al. (2015). Comparison of Total DNA Extraction Methods for Microbial Community Form Polluted Soil. Agriculture and Agricultural Science Procedia, 6, 616–622. https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2015.08.102

320. Tate, R. L. (2020). Soil microbiology. John Wiley & Sons. Retrieved 10.08.2021, from https://books.google.com/books/about/Soil_Microbiology.html?id=7A0CEAAAQBAJ

321. Tebbe, C. C., Vahjen W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant, DNA. (1993). from bacteria and a yeast. Applied and environmental microbiology, 59(8), 2657–65.

322. Técher, D., Martinez-Chois, C., D'Innocenzo, M., et al. (2010). Novel perspectives to purify genomic DNA from high humic acid content and contaminated soils. Separation and Purification Technology, 75(1), 81–86. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2010.07.014

323. Technology J. M. of, E. C. S. S. (2018). and Detailed Distribution Map of Radiation Dose. Retrieved 29.03.2019, from https://ramap.jmc.or.jp/map/eng/#lat=37.28458799999977&lon=140.5831109999977&z=9&b=std&t=air&s=0,0,0,0&c=20181115_dr

324. Terada, H., Katata, G., Chino, M., et al. (2012). Atmospheric discharge and dispersion of radionuclides during the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant accident.Part II: verification of the source term and analysis of regional-scale atmospheric dispersion. Journal of Environmental Radioactivity, 112, 141–154. https://doi.org/10.1016/J.JENVRAD.2012.05.023

325. Terrat, S., Plassart, P., Bourgeois, E., et al. (2015). Meta-barcoded evaluation of the ISO standard 11063 DNA extraction procedure to characterize soil bacterial and fungal community diversity and composition. Microbial Biotechnology, 8(1), 131–142. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12162

326. Theodorakopoulos, N., Février, L., Barakat, M., et al. (2017). Soil prokaryotic communities in Chernobyl waste disposal trench T22 are modulated by organic matter and radionuclide contamination.FEMS Microbiology Ecology.. Вип. 93. № 8. https://doi.org/10.1093/femsec/fix079

327. Thomas, T., Gilbert, J., Meyer, F. (2012). Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. Microbial Informatics and Experimentation, 2, 3. https://doi.org/10.1186/2042-5783-2-3

328. Thorpe, C. L., Law, G. T. W., Boothman, C., et al. (2012). The Synergistic Effects of High Nitrate Concentrations on Sediment Bioreduction. Geomicrobiology Journal, 29(5), 484–493. https://doi.org/10.1080/01490451.2011.581332

329. Thorpe, C. L., Lloyd, J. R., Law, G. T. W., et al. (2012). Strontium sorption and precipitation behaviour during bioreduction in nitrate impacted sediments. Chemical Geology, 306, 114–122. https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2012.03.001

330. Tišáková, L., Pipíška, M., Godány, A., et al. (2013). Bioaccumulation of 137Cs and 60Co by bacteria isolated from spent nuclear fuel pools. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 295(1), 737–748. https://doi.org/10.1007/s10967-012-1932-6

331. Health and Welfare Canada. (1983). Environmental radioactivity in Canada, 1983. Health and Welfare Canada. 292 p.

332. Tsai, Y. L., Olson B. H. Rapid method for separation of bacterial, DNA. (1992). from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. Applied and environmental microbiology, 58(7), 2292–5.

333. Tsai, Y. L., Olson B. H. Rapid method for direct extraction of, DNA. (1991). from soil and sediments. Applied and environmental microbiology, 57(4), 1070–4.

334. Tugay, T. I., Zheltonozhskaya, M. V., Sadovnikov, L. V., et al. (2011). EFFECTS OF IONIZING RADIATION ON THE ANTIOXIDANT SYSTEM OF MICROSCOPIC FUNGI WITH RADIOADAPTIVE PROPERTIES FOUND IN THE CHERNOBYL EXCLUSION ZONE. Health Physics. 101(4), 375–382. https://doi.org/10.1097/HP.0b013e3181f56bf8

335. Turbat, B., Yoshida, K., El-Hameed, A. A., et al. (2022). Verification of historical radiation monitoring data at residential areas for nuclear emergency occurred in a neighboring country. Journal of Nuclear Science and Technology, 59(2), 188–197. https://doi.org/10.1080/00223131.2021.1961637

336. Tyson, G. W., Chapman, J., Hugenholtz, P., et al. (2004). Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. Nature, 428(6978), 37–43. https://doi.org/10.1038/nature02340

337. Ulanovsky, A., Copplestone, D., Vives i Batlle, J. (2017). Dose coefficients for nonhuman biota environmentally exposed to radiation.ICRP Publication 136.Ann.ICR. 139 c. www.icrp.org (дата звернення: 06.10.2020).

338. Ulanovsky, A., Pröhl, G. A. (2006). practical method for assessment of dose conversion coefficients for aquatic biota. Radiation and Environmental Biophysics, 45(3), 203–214. https://doi.org/10.1007/s00411-006-0061-4

339. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (1996). SOURCES AND EFFECTS OF IONIZING RADIATION. UNSCEAR,. 89 c.

340. Upadhyay, A., Mooyottu, S., Yin, H., et al. (2015). Inhibiting Microbial Toxins Using Plant-Derived Compounds and Plant Extracts. Medicines, 2(3), 186–211. https://doi.org/10.3390/medicines2030186

341. Urbanek, A. K., Rymowicz, W., Mirończuk, A. M. (2018). Degradation of plastics and plastic-degrading bacteria in cold marine habitats. Applied Microbiology and Biotechnology, 102(18), 7669–7678. https://doi.org/10.1007/s00253-018-9195-y

342. VanEngelen, M. R., Field, E. K., Gerlach, R., et al. (2010). UO 2 2+ speciation determines uranium toxicity and bioaccumulation in an environmental Pseudomonas sp. isolate. Environmental Toxicology and Chemistry, 29(4), 763–769. https://doi.org/10.1002/etc.126

343. Vives I Batlle, J., Beaugelin-Seiller, K., Beresford, N. A., et al. (2011). The estimation of absorbed dose rates for non-human biota: An extended

intercomparison. Radiation and Environmental Biophysics, 50(2), 231–251. https://doi.org/10.1007/s00411-010-0346-5

344. Volossiouk, T., Robb, E. J., Nazar R. N. Direct, DNA. (1995). extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. Applied and environmental microbiology, 61(11), 3972–6.

345. Vysotskii, V. I., & Kornilova, A. A. (2015). Microbial transmutation of Cs-137 and LENR in growing biological systems. Current Science, 108(4), 636–640.

346. Warashina, T., Sato, A., Hinai, H., et al. (2024). Microbiome analysis of the restricted bacteria in radioactive element-containing water at the Fukushima Daiichi Nuclear Power Station. Applied and Environmental Microbiology, 90(4), e02113–23. https://doi.org/10.1128/aem.02113-23

347. Watanabe, N., Yonomoto, T., Tamaki, H., et al. (2015). Review of five investigation committees reports on the Fukushima Dai-ichi nuclear power plant severe accident: Focusing on accident progression and causes. Journal of Nuclear Science and Technology, 52(1), 41–56. https://doi.org/10.1080/00223131.2014.927808

348. Webb, K. M., DiRuggiero, J. (2013). Radiation Resistance in Extremophiles: Fending Off Multiple Attacks. 249–267. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6488-0_10

349. White, O., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., et al. (1999). Genome sequence of the radioresistant bacterium Deinococcus radiodurans R1. Science (New York, N.Y.), 286(5444), 1571–7.

350. Trujillo, M. E., Dedysh, S., DeVos, P., Hedlund, B., Kämpfer, P., Rainey, F. A., & Whitman, W. B. (Eds.). (2015). Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons. https://doi.org/10.1002/9781118960608

351. Whittaker, R. H. (1972). Evolution and Measurement of Species Diversity. Taxon, 21(2/3), 213. https://doi.org/10.2307/1218190

352. Wilkins, M. J., Livens, F. R., Vaughan, D. J., et al. (2007). The influence of microbial redox cycling on radionuclide mobility in the subsurface at a low-level

radioactive waste storage site. Geobiology, 5(3), 293–301. https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2007.00101.x

353. Williams, K. H., Kemna, A., Wilkins, M. J., et al. (2009). Geophysical Monitoring of Coupled Microbial and Geochemical Processes During Stimulated Subsurface Bioremediation. Environmental Science & Technology, 43(17), 6717–6723. https://doi.org/10.1021/es900855j

354. Wilmes, P., Bond, P. L. (2004). The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms. Environmental Microbiology, 6(9), 911–920. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00687.x

355. Wise, M. G., McArthur, J. V., & Shimkets, L. J. (1996). 16S rRNA gene probes for Deinococcus species. Systematic and Applied Microbiology, 19(3), 365–369. https://doi.org/10.1016/S0723-2020(96)80064-6

356. Van den Wollenberg, A. L. (1977). Redundancy analysis: An alternative for canonical correlation analysis. Psychometrika, 42(2), 207–219. https://doi.org/10.1007/BF02294050

357. Wu W.-M, Carley, J., Green, S. J., et al. (2010). Effects of Nitrate on the Stability of Uranium in a Bioreduced Region of the Subsurface. Environmental Science & Technology, 44(13), 5104–5111. https://doi.org/10.1021/es1000837

358. Wu W.-M, Carley, J., Luo, J., et al. (2007). In Situ Bioreduction of Uranium (VI) to Submicromolar Levels and Reoxidation by Dissolved Oxygen. https://doi.org/10.1021/ES062657B

359. Wu W.-M, Carley, J., Luo, J., et al. (2007). In Situ Bioreduction of Uranium (VI) to Submicromolar Levels and Reoxidation by Dissolved Oxygen. https://doi.org/10.1021/ES062657B

360. Xia, X., Bollinger, J., Ogram, A. (1995). Molecular genetic analysis of the response of three soil microbial communities to the application of 2,4-D. Molecular ecology. 4(1), 17–28.

361. Ye, Y., Doak, T. G. A. (2009). Parsimony Approach to Biological Pathway Reconstruction/Inference for Genomes and Metagenomes. PLoS Computational Biology, 5(8), e1000465. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000465

362. Yeates, C., Gillings, M. R., Davison, A. D., et al. (1997). PCR amplification of crude microbial DNA extracted from soil. Letters in applied microbiology, 25(4), 303–7.

363. Yeates, C., Gillings, M. R., Davison, A. D., et al. (1998). Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. Biological procedures online, 1, 40–47. https://doi.org/10.1251/bpo6

364. Yoschenko, V., Nanba, K., Yoshida, S., et al. (2016). Morphological abnormalities in Japanese red pine (Pinus densiflora) at the territories contaminated as a result of the accident at Fukushima Dai-Ichi Nuclear Power Plant. Journal of Environmental Radioactivity, 165, 60–67. https://doi.org/10.1016/J.JENVRAD.2016.09.006

365. Yoshinaka, T., Yano, K., Yamaguchi, H. (1973). Isolation of Highly Radioresistant Bacterium, Arthrobacter radiotolerans nov. sp. Agricultural and Biological Chemistry, 37(10), 2269–2275. https://doi.org/10.1271/bbb1961.37.2269

366. Yu, C., Cheng, J. J., Kamboj, S. (2013). Effects of the new wildlife transfer factors on RESRAD-BIOTA's screening Biota Concentration Guides and previous model comparison studies. Journal of Environmental Radioactivity, 126, 338–351. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2013.01.004

367. Zaffiri, L., Gardner, J., Toledo-Pereyra, L. H. (2012). History of Antibiotics.From Salvarsan to Cephalosporins. Journal of Investigative Surgery, 25(2), 67–77. https://doi.org/10.3109/08941939.2012.664099

368. Zavilgelsky, G. B., Abilev, S. K., Sukhodolets, V. V., & Ahmad, S. I. (1998). Isolation and analysis of UV and radio-resistant bacteria from Chernobyl. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 43(2), 152–157. https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00099-2

369. Zhou, J., Bruns, M. A., Tiedje, J. M. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. Applied and environmental microbiology, 62(2), 316–22.

370. Zhou, Z., Gao, T., Zwieten L. Van, et al. (2019). Soil Microbial Community Structure Shifts Induced by Biochar and Biochar-Based Fertilizer Amendment to Karst Calcareous Soil. Soil Science Society of America Journal, 83(2), 398. https://doi.org/10.2136/sssaj2018.08.0297

371. Zimmerman, J. M., Battista, J. R. A. (2005). ring-like nucleoid is not necessary for radioresistance in the Deinococcaceae. BMC Microbiology, 5, 17. https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-17

372. Міністерство України з питань надзвичайних ситуацій та у справах захисту населення від наслідків Чорнобильської катастрофи; Адміністрація зони відчуження і зони безумовного (обов'язкового) відселення. (2001). Бюлетень екологічного стану зони відчуження і зони безумовного (обов'язкового) відселення. Чорнобиль.

373. Wilmes, P., & Bond, P. L. (2006). Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems. Trends in Microbiology, 14(2), 92–97. https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.12.006

374. International Atomic Energy Agency. (1991). The International Chernobyl Project: Technical report: Assessment of radiological consequences and evaluation of protective measures. IAEA.

375. National Center for Biotechnology Information. (n.d.). National Center for Biotechnology Information. Retrieved April 25, 2019, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/

376. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. (2012). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62(1), 1–4. https://doi.org/10.1099/ijs.0.039487-0

377. XLSTAT. (n.d.). Multiblock data analysis. Retrieved May 21, 2019, from https://www.kovcomp.co.uk/xlstat/ada/index.html#rda

378. Joint Genome Institute. (n.d.). JGI GOLD project. Retrieved May 29, 2019, from https://gold.jgi.doe.gov/project?id=Gp0000276

379. International Atomic Energy Agency. (2017). IAEA Isotope Browser app now available in multiple languages. Retrieved August 10, 2021, from https://www.iaea.org/newscenter/news/iaea-isotope-browser-app-now-available-in-multiple-languages

380. Anspaugh, L. R., Simon, S. L., Gordeev, K. I., et al. (2002). Movement of radionuclides in terrestrial ecosystems by physical processes. Health Physics, 82(5), 669–679.

381. Belykh, E., Maystrenko, T., Velegzhaninov, I., et al. (2024). Taxonomic Diversity and Functional Traits of Soil Bacterial Communities under Radioactive Contamination: A Review. Microorganisms, 12(4), 733. https://doi.org/10.3390/microorganisms12040733

382. Boretska, M., Datsenko, I., Suslova, O., et al. (2014). Amino Acid Composition of Tightly Bound Exopolymeric Substances Produced by Corrosion-Related Bacteria in Presence of Mild Steel. Advances in Microbiology, 04(12), 808–815. https://doi.org/10.4236/aim.2014.412089

383. Byrd, N., Singh, A., Bassil, N. M., et al. (2025). Microbial degradation of citrate mediates sealing of cement cracks under anaerobic conditions relevant to radioactive waste disposal. npj Materials Degradation. 9(1), 147. https://doi.org/10.1038/s41529-025-00686-4

384. Chen, X., Wang, J., Pan, C., et al. (2022). Metagenomic analysis reveals the response of microbial community in river sediment to accidental antimony contamination. The Science of the Total Environment, 813, 152484. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152484

385. Gregory, S. P., Mackie, J. R. M., Barnett, M. J. (2024). Radioactive waste microbiology: predicting microbial survival and activity in changing extreme environments. FEMS Microbiology Reviews, 48(1), fuae001. https://doi.org/10.1093/femsre/fuae001

386. Kopteva, Z. P., Zanina, V. V., & Kozlova, I. A. (2004). Microbial corrosion of protective coatings. Surface Engineering, 20(4), 275–280. https://doi.org/10.1179/026708404225016463

387. Levin-Zaidman, S., Englander, J., Shimoni, E., et al. (2003). Ringlike structure of the Deinococcus radiodurans genome: a key to radioresistance? Science. 299(5604), 254–256. https://doi.org/10.1126/science.1077865

388. Li, K., Lin, H., Han, M., & Yang, L. (2024). Soil metagenomics reveals the effect of nitrogen on soil microbial communities and nitrogen-cycle functional genes in the rhizosphere of Panax ginseng. Frontiers in Plant Science, 15, 1411073. https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1411073

389. Osburn, E. D., McBride, S. G., Bahram, M., et al. (2024). Global patterns in the growth potential of soil bacterial communities. Nature Communications, 15(1), 6881. https://doi.org/10.1038/s41467-024-50382-1

390. Rendon Diaz Miron, L. E., Lara Magaña, M. E., Lara, M. R. (2015). Microorganisms Concrete Interactions. MRS Proceedings, 1768, imrc2014–6d–006. https://doi.org/10.1557/opl.2015.319

391. Zaman, F., Li, Z., Fu, X., et al. (2025). Soil pH modulates microbial nitrogen cycling under integrated soil-crop system management across agroecosystems. Soil Ecology Letters, 7(4), 250360. https://doi.org/10.1007/s42832-025-0360-9

392. Zhdanova, N. N., Zakharchenko, V. A., Vember, V. V., et al. (2000). Fungi from Chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor. Mycological Research, 104(12), 1421–1426. https://doi.org/10.1017/S0953756200002756

Додаток 1. Акти впровадження результатів дисертаційної роботи.

ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ БЕЗПЕКИ АТОМНИХ ЕЛЕКТРОСТАНЦІЙ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(ІПБ АЕС НАН України)

АКТ

впровадження результатів дисертаційного дослідження

м. Чорнобиль «10» 03 2026 р.

Комісія у складі:
Голова комісії: т.в.о. заступника директора з наукової роботи, КРАСНОВ Віктор.
Члени комісії:
- завідувач відділу радіаційного моніторингу, ХАН Валерій;
- завідувач відділу радіаційної безпеки, якості та охорони праці, ЛЕВЧЕНКО Андрій;

склала цей акт про те, що результати дисертаційного дослідження Паренюк Олени Юріївни на тему «Комплексна оцінка мікробіомів забруднених радіонуклідами ґрунтів і субстратів антропогенних систем», поданого на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.01 – радіобіологія, впроваджено в наукову та науково-методичну діяльність ІПБ АЕС НАН України.

1. Підстава для впровадження

Підставою для впровадження є результати дисертаційного дослідження, присвяченого комплексній оцінці мікробіомів ґрунтів забруднених радіонуклідами і техногенних субстратів, зокрема субстратів із об'єкта «Укриття» Чорнобильської АЕС, а також розроблені в межах роботи підходи до аналізу бактеріального різноманіття, інтерпретації метагеномних даних та моделювання поглинутої дози для ґрунтових мікроорганізмів.

2. Зміст упроваджених результатів

У науковій і науково-методичній діяльності ІПБ АЕС НАН України використано такі положення та результати дисертаційного дослідження:

– методичні підходи до відбору, опису та порівняльного аналізу техногенних субстратів і ґрунтів, відібраних у різних ізодозових умовах поблизу об'єктів ядерно-паливного циклу;

– підходи до оцінки структури бактеріальних угруповань у субстратах об'єкта «Укриття» ЧАЕС та в ґрунтах радіонуклідно забруднених територій, зокрема з використанням метагеномного та ампліконного аналізу;
– результати щодо особливостей формування мікробіомів у субстратах з різним рівнем радіаційного навантаження та різними фізико-хімічними характеристиками;
– підходи до інтерпретації ризиків біокорозії та наукового обґрунтування ролі мікроорганізмів у техногенно змінених радіаційно небезпечних середовищах;
– модельні підходи до оцінки поглинутої дози для ґрунтових мікроорганізмів як інструмент зіставлення мікробіологічних та радіоекологічних характеристик досліджених об'єктів.

3. Форми використання результатів

Результати дисертаційної роботи використані в ІПБ АЕС НАН України при виконанні НДР «Моделювання умов і впливу випромінювання на матеріали та біологічні об'єкти всередині Нового безпечного конфайменту», №7/7/9-15, що виконується протягом 2024-2026 рр., у процесі наукового супроводу досліджень техногенних субстратів об'єкта «Укриття», підготовки аналітичних та науково-методичних матеріалів, а також для уточнення підходів до інтерпретації мікробіологічних процесів у радіаційно небезпечних середовищах та оцінки можливих біодеструктивних і біокорозійних ризиків.

4. Практичне значення впровадження

Впровадження результатів дисертаційного дослідження сприяє розширенню науково-методичної бази ІПБ АЕС НАН України щодо вивчення мікробіологічних аспектів безпеки об'єктів ядерно-паливного циклу, підвищує якість аналізу біологічних процесів у радіаційно забруднених субстратах, а також дозволяє використовувати результати дисертації для наукового обґрунтування подальших досліджень у сфері ядерної та радіаційної безпеки, радіоекології та геоекологічного моніторингу.

Окремі положення роботи можуть бути використані при підготовці рекомендацій, наукових висновків, обґрунтуванні напрямів подальших досліджень та формуванні внутрішніх методичних матеріалів Інституту щодо оцінки стану техногенних середовищ, пов'язаних з об'єктом «Укриття» ЧАЕС та іншими об'єктами ядерно-паливного циклу.

5. Висновок

Комісія ІПБ АЕС НАН України дійшла висновку, що результати дисертаційного дослідження Паренюк Олени Юріївни мають наукову та практичну цінність для ІПБ АЕС НАН України і можуть вважатися впровадженими в діяльність Інституту в частині науково-методичного забезпечення досліджень радіонуклідно забруднених ґрунтів і техногенних субстратів, аналізу мікробіомів радіаційно небезпечних середовищ та

інтерпретації мікробіологічних процесів, релевантних для ядерної та радіаційної безпеки.

Голова комісії:
Т.в.о. заступника директора
З наукової роботи — Віктор КРАСНОВ

Члени комісії:
завідувач відділу радіаційного моніторингу — Валерій ХАН

завідувач відділу радіаційної безпеки, якості та охорони праці — Андрій ЛЕВЧЕНКО

BTU

ТОВ "ТД "БТУ-ЦЕНТР"
тел./факс: (044) 594-38-83
e-mail: info@btu-center.com
сайт: btu-center.com

вул. Академіка Амосова, буд. 1/34

с. Софіївська Борщагівка,
Бучанський район, Київська
область, Україна 08138

Код ЄДРПОУ
38010942
ІПН
380109410133

Вих. № 87/26 від 28.04.2026 р.

АКТ
про впровадження результатів дисертаційного дослідження

Цим актом засвідчується, що результати дисертаційного дослідження Паренюк Олени Юріївни на тему «Комплексна оцінка мікробіомів забруднених радіонуклідами ґрунтів і субстратів антропогенних систем», поданого на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.01 – радіобіологія, 091 – біологія, впроваджено у відділі науково-експертної підтримки Департаменту агропромислового комплексу ТОВ «ТД «БТУ-ЦЕНТР»

У межах впровадження використано такі результати дисертаційної роботи:

– методичні підходи до комплексної оцінки структури і стану ґрунтових мікробіомів у ґрунтах, що зазнають антропогенного або техногенного навантаження, з урахуванням агрохімічних параметрів субстрату;

– підходи до виділення сукупної бактеріальної ДНК, підготовки зразків до 16S рРНК- та метагеномного аналізу, а також біоінформатичної інтерпретації даних для оцінки таксономічної структури і функціонального потенціалу мікробних угруповань;

– науково-методичні положення щодо зв'язку мікробної біомаси, різноманіття мікробіомів та поживного режиму ґрунту, а також результати щодо можливостей використання бактеріальних препаратів для модифікації стану ґрунтового середовища і підтримання його біологічної активності.

Зазначені результати були впроваджені з метою посилення науково-методичного забезпечення досліджень і випробувань мікробних та ферментних препаратів для рослинництва, відновлення ґрунтів і підтримання їх біологічної родючості.

Форма впровадження: науково-методичні матеріали, аналітичний супровід досліджень, використання у роботі Відділу науково-експертної підтримки Департаменту агропромислового комплексу ТОВ «ТД «БТУ-ЦЕНТР».

Практичний ефект від впровадження полягає у розширенні аналітичних можливостей під час оцінки ґрунтового мікробіологічного стану, підвищенні обґрунтованості підбору мікробних рішень для різних типів ґрунтів, а також у покращенні наукового супроводу досліджень, пов'язаних із біологізацією землеробства та відновленням ґрунтів.

Акт складено для подання за місцем вимоги як підтвердження практичного використання результатів дисертаційного дослідження.

Комерційний директор
ТОВ «ТД «БТУ-ЦЕНТР» Тетяна ХОМЕНКО

ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ «ЗАХІДНИЙ БУГ»

АКТ

про впровадження результатів дисертаційного дослідження

с.Павлів «_26» _серпня___ 2025_ р. № ____

Цим актом засвідчується, що результати дисертаційного дослідження Паренюк Олени Юріївни на тему «Комплексна оцінка мікробіомів забруднених радіонуклідами ґрунтів і субстратів антропогенних систем», поданого на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.01 – радіобіологія, 091 – біологія, впроваджено у ТОВ «Західний Буг»/ Центр аграрного розвитку.

У межах впровадження використано такі результати дисертаційної роботи:

– результати дисертаційного дослідження щодо зв'язку між агрохімічними показниками ґрунту, вмістом органічної речовини, азотним режимом та станом ґрунтового мікробіому, використані під час інтерпретації даних агрохімічного і мікробіологічного обстеження земель;

– методичні підходи до оцінки ґрунтових мікробіомів у ґрунтах, що зазнають антропогенного навантаження, а також результати щодо застосування бактеріальних препаратів і біологізації землеробства для підтримання біологічної активності ґрунту;

– аналітичні положення щодо доцільності поглибленої діагностики ґрунтів, відбору ділянок для додаткового мікробіологічного контролю, а також використання результатів у підготовці внутрішніх рекомендацій для підвищення якості управлінських рішень у рослинництві.

Зазначені результати були впроваджені з метою посилення науково-методичного забезпечення агрономічних рішень, пов'язаних із оцінкою стану ґрунтів, підтриманням їх біологічної родючості, елементами біологізації технологій та плануванням додаткових діагностичних заходів.

Форма впровадження: аналітичні матеріали, рекомендації для виробничих підрозділів, використання у системі внутрішнього агросупроводу та оцінки земель.

Місце впровадження: ТОВ «Західний Буг» (Львівська обл., Золочівський р-ну, с. Гаї-Суходільські)

Практичний ефект від впровадження полягає у покращенні якості агрономічної діагностики, підвищенні обґрунтованості вибору ділянок для

додаткового аналізу ґрунтів, розширенні можливостей використання біологічних підходів у землеробстві та посиленні наукового супроводу рішень щодо управління ґрунтовими ресурсами.

Акт складено для подання за місцем вимоги як підтвердження практичного використання результатів дисертаційного дослідження.

Директор

Коцупир В.В.

Керівник структурного підрозділу

Кисельов Д.О.

М.П.

ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ "ЗАХІДНИЙ БУГ" 32478033 УКРАЇНА