

О. Ю. Паренюк^{1,2}, К. Є. Шаванова¹, В. В. Ілленко¹, І. О. Сімутін³, Д. О. Самофалова⁴,
В. Б. Рибалка⁵, К. Нанба², Т. Такасі², І. М. Гудков^{1,*}

¹ Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, Україна

² Інститут радіоактивності навколишнього середовища Університету Фукусіма, Фукусіма, Японія

³ Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

⁴ ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ, Україна

⁵ Інститут проблем безпеки АЕС НАН України, Чорнобиль, Україна

*Відповідальний автор: ingudkov@ukr.net

РІЗНОМАНІТТЯ МІКРОФЛОРИ У ЗРУЙНОВАНОМУ ЧЕТВЕРТОМУ ЕНЕРГОБЛОЦІ ЧАЕС

За допомогою методики секвенування ДНК нового покоління проаналізовано ДНК мікробіому субстрату у шести точках 4-го аварійного енергоблока ЧАЕС, в якому потужність дози на мікроорганізми коливається від 0,007 до 0,12 Гр/год. Установлено, що найбільш різноманітним і стабільним виявився мікробіом зразка, що був розташований за межами об'єкта «Укриття» на території промайданчика (умовний контроль). У ньому відсутні домінанти, тобто він є найбільш збалансованим і наближеним за станом до мікробіому ґрунту екосистем, що оточують ЧАЕС. Для зразка, потужність обрахованої дози на місці відбору якого була найвищою, загальна кількість представлених видів була у 8 разів меншою, проте індекс домінування був найвищим, що свідчить про формування мікробіому з чітко вираженими домінантами.

Ключові слова: Чорнобильська АЕС, четвертий енергоблок, радіонуклідне забруднення, секвенування ДНК, мікробіом.

Вступ

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 полутантами, 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.

На теперішній час внутрішній простір зруйнованого 4-го енергоблока ЧАЕС залишається малодослідженим біологами, хоча вивчення фізичного і хімічного стану проходило доволі інтенсивно [1]. Через високі дози іонізуючого випромінювання і бюрократичні перепони при доступі до об'єкта «Укриття», пов'язані з небезпекою пересування всередині нього, лише двом дослідницьким групам біологічного напрямку, окрім колективу авторів, вдалося отримати зразки зсередини і вивчити їхню біологічну компоненту. Так, на початку 1990-х років групою дослідників під керівництвом Н. М. Жданової

було вивчено мікоценоз об'єкта «Укриття», а згодом встановлено ефект стимуляції продукції меланіну в мікроскопічних грибах [2 - 4]. Також під керівництвом В. Б. Рибалки була показана здатність окремих представників виду *Bacillus* до акумуляції урану з ядерного палива [5]. Вивчення загального біорізноманіття бактеріальної мікрофлори досі не було проведено.

Середовище, що сформувалося у внутрішніх приміщеннях об'єкта «Укриття», є унікальним в силу, 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 [6, 7], бетону [8, 9] і захисних оболонок конструкцій [10].

Нещодавно став доступним новий підхід до аналізу мікробних угруповань, що істотно підвищив точність і достовірність одержуваних даних, – секвенування нового покоління (Next Generation Sequencing, NGS) [11]. Ця технологія дає можливість оцінити біорізноманіття мікроорганізмів у субстраті шляхом аналізу виділеної з нього ДНК усієї сукупності мікроорганізмів й отримати повну таксономічну [12] і функціональну [13] карту мікробіому.

© О. Ю. Паренюк, К. Є. Шаванова, В. В. Ілленко, І. О. Сімутін, Д. О. Самофалова, В. Б. Рибалка, К. Нанба, Т. Такасі, І. М. Гудков, 2017

Маючи досить невеликий і нескладно організований геном, переважна кількість представників царства бактерій мають дивовижну стійкість до впливу несприятливих факторів навколишнього середовища [14 - 17]. 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 [18], що дозволяє припустити, що такий потужний мутагенний чинник, як іонізуюче випромінювання, може мати істотний вплив на його стан.

Матеріали та методи

Опис точок відбору проб

Для аналізу мікробної спільноти було відібрано 8 зразків субстрату на стандартних маршрутах Інституту проблем безпеки АЕС НАН України у приміщеннях зруйнованого 4-го енергоблока ЧАЕС (рис. 1). Відбір зразків виконувався співробітником, який був захищений спеціальним костюмом та двома парами гумових рукавичок, верхню пару з яких змінювали після відбору кожного зі зразків. Зразки було відібрано у стерильні 50-мл флакони за допомогою одноразових пластикових шпательів, після чого передано для аналізу. Відбір зразків був здійснений на початку жовтня 2015 р.

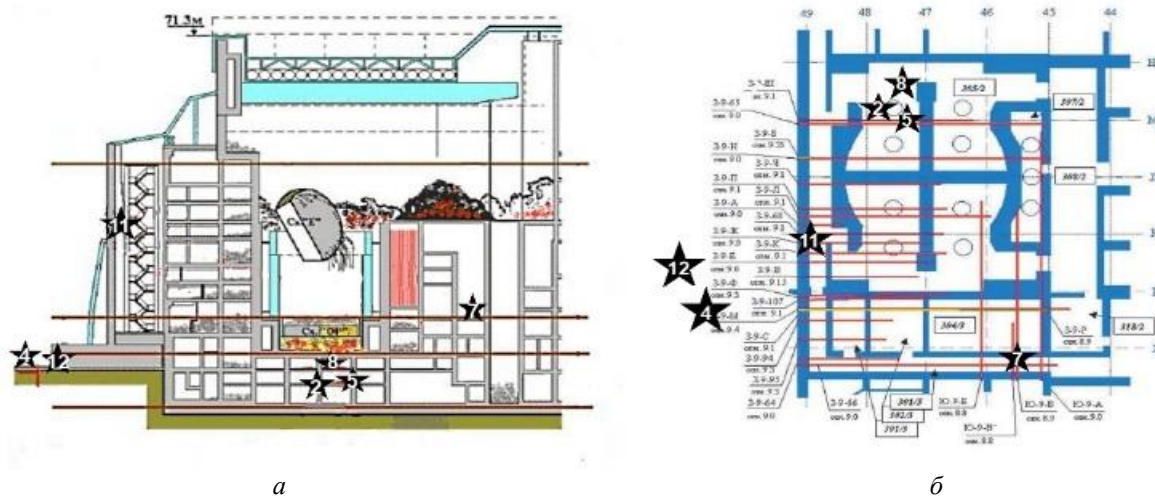


Рис. 1. Схема точок відбору субстрату у зруйнованому 4-му енергоблоці ЧАЕС: а - вид збоку; б - вид зверху [1].

Зразки 2, 5 та 8 були відібрані із приміщення під шахтою реактора, 4 та 12 – за межами об’єкта «Укриття» й використовувалися як контроль, 11

та 7 – із внутрішніх виходів шахт системи моніторингу реактора «Фініш», 13 – із дренажної труби, що виходить з об’єкта «Укриття» (табл. 1).

Таблиця 1. Локалізація та візуальна характеристика точок відбору зразків

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

Аналіз хімічного складу зразків

Вибір тест-методів був обумовлений обмеженням у доступі до використання лабораторного обладнання, складністю його подальшої деза-

ктивації та необхідністю скорочення часу обробки кожного зразка з метою зменшення дози опромінення дослідників. Тому було використано одноразову систему Hanna Express для хіміч-

ного аналізу та тест-смужки індикатора для визначення рН.

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

рН 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 $\text{NH}_3\text{-N}$, 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 %.

Визначення питомої радіоактивності зразків та доз опромінення

Для оцінки питомої активності гамма-випромінюючих радіонуклідів зразки були розведені в поживному середовищі LB (Sigma-Aldrich) у співвідношенні 1 : 23000 і були 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 стандартного об'єму (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 та 186,2 кеВ для ^{226}Ra .

Потужності дози для мікробіоти було розраховано на ERICA Assessment Tool [19], використовуючи режим наземної екосистеми і детрит як еталонні організми.

Виділення і секвенування ДНК

Загальну геномну ДНК виділяли за допомогою набору реактивів PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, США) відповідно до протоколу виробника [20]. Зразки ДНК було упаковано в контейнер на льоду й доставлено в лабораторію для подальшого аналізу.

Концентрацію 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 просеквенувано високоваріабельні області V3 і V4 у Research and Testing Laboratory (Lubbock, Texas, США) на приладі Illumina MiSeq (Illumina Inc., США) з набором баркодів, рекомендованих виробником для 16S рРНК аналізів.

Біоінформатична обробка

У результаті секвенування амплікону 16S рРНК було отримано 12 файлів у форматі fastq, прямі й 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 використовували запатентовану послідовність дій (www.mrdnalab.com, MR DNA) спільно з біоінформатичним сценарієм QIIME з відкритим кодом (<http://qiime.org/>) [21]. З урахуванням вилучення провайдером баркодів у даному 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 даної роботи – визначення біорізноманіття мікробіому, а не збірка геномів. Для того щоб побудувати .biom OTU таблицю, було використано скрипт pick_closed_reference_otus.py з QIIME [22]. Класифікацію OTU таблиці, було виконано з 97 %-ною збіжністю і додатково було виконано de-novo аналіз за допомогою бази даних Greengenes v 13_5 [23]. Альфа-різноманіття було оцінено за допомогою alpha_diversity.py з QIIME [24].

Результати

Характеристика внутрішніх умов об'єкта «Укриття»

Залежно від розташування точки відбору субстрат мав істотно різні фізико-хімічні характеристики. Так, зразки 4, 7 і 8 було відібрано поблизу металевих конструкцій, тому вони містили велику кількість іржі і, відповідно, катіона заліза. Зразок 13 був відібраний поблизу виходу з будівлі реакторного блока дренажної труби й містив велику фракцію органіки. Проби були відібрані на початку жовтня, коли температура повітря коливалася від -5 вночі до +15 °С удень, а у приміщеннях об'єкта «Укриття», залежно від локалізації ПВМ: від +35 - 40 °С для приміщень, де були відібрані проби 2, 5 і 8; +10 - 15 °С для 7 і 11 та температури навколишнього середовища

для проб, відібраних за межами «Укриття» (4, 12 і 13). Приміщення завжди затемнені, тому можна стверджувати, що умови для формування фототрофних мікроорганізмів збіднені.

Таблиця 2. Деякі фізико-хімічні показники відібраних зразків

№ зразка	pH	P ⁵⁺ , мг/л	Fe ^{2,3+} , мг/л	NH ₄ ⁺ , мг/л
2	9,0	14,0 ± 2,0	1,7 ± 0,1	8,0 ± 1,1
4	8,0	–	6,0 ± 0,2	–
5	8,5	4,0 ± 0,5	–	–
7	7,5	–	39,3 ± 5,0	13,0 ± 2,1
8	6,5	1,0 ± 0,1	8,1 ± 3,0	–
11	8,5	5,0 ± 1,0	12,4 ± 0,3	–
12	7,5	–	–	18,0 ± 3,2
13	6,5	1,0 ± 0,1	4,1 ± 1,0	29,0 ± 7,0

Зміст деяких катіонів у відібраних пробах характеризує табл. 2. Вимірювання їхньої концентрації проводилося в 10 %-ній водній витяжці, тому відсутність певного катіона у вимірному зразку не обов'язково свідчить про його відсут-

ність в оригінальному зразку. Усі зразки мають лужну реакцією. 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, що має лужну реакцію [25].

Вміст іонів амонію у зразках 2, 7, 12 та 13 свідчить про активні хімічні та біологічні процеси з перетворення азотвмісних сполук, що проходять у зразках. Високі концентрації іонів заліза в усіх зразках, окрім 5 та 12, є наслідком активних хіміко-біологічних процесів корозії металевих частин конструкцій.

Питома активність зразків також варіює досить суттєво (табл. 3). В силу високої розчинності та летючості ¹³⁷Cs, представлений у кожній проаналізованій пробі, є основним дозоутворюючим радіонуклідом. Зразки 5 і 7 були відібрані біля місць скупчення ПВМ, а зразок 2 – безпосередньо з поверхні купи ПВМ, що зумовило наявність ізотопів америцію. Зразки 8, 12 і 13 були відібрані на першому поверсі будівлі зруйнованого реактора, найближче до поверхні ґрунту, і ймовірно тому в них був виявлений розчинений ²²⁶Ra.

Таблиця 3. Дозові характеристики та питома активність радіонуклідів у зразках субстрату

№ зразка	Середня розрахункова потужність дози, Гр/год	Максимальна розрахункова потужність дози, Гр/год	Питома активність радіонукліда, Бк/г		
			¹³⁷ Cs	²⁴¹ Am	²²⁶ Ra
2	0,37	1,38	1,9 · 10 ³ ± 2,8 · 10 ²	1,1 · 10 ⁵ ± 1,2 · 10 ³	–
4	0,007	0,008	2,3 · 10 ³ ± 89,4	–	–
5	0,02	0,05	5,1 · 10 ⁴ ± 7,9 · 10 ³	2,7 · 10 ³ ± 2,5 · 10 ²	–
7	0,03	0,06	7,4 · 10 ⁴ ± 1,2 · 10 ³	3,9 · 10 ³ ± 3,6 · 10 ²	–
8	0,09	0,12	5,1 · 10 ⁴ ± 9,8 · 10 ²	–	1,1 · 10 ⁴ ± 3,1 · 10 ³
11	0,11	0,12	3,3 · 10 ⁵ ± 2,8 · 10 ³	–	–
12	0,02	0,03	1,6 · 10 ⁴ ± 46,4	–	2,7 · 10 ³ ± 2,8 · 10 ²
13	0,02	0,02	1,1 · 10 ³ ± 33,1	–	2,5 · 10 ³ ± 24,6

Біорізноманіття мікроорганізмів у 4-му блоці ЧАЕС

Згідно з отриманими результатами ДНК виявлена у шести пробах, окрім 2 та 8, що дає змогу стверджувати про наявність живих організмів всередині об'єкта «Укриття». Загальновідомо, що високі дози призводять до стерилізації субстрату, отже відсутність (або низька концентрація) ДНК може бути пов'язана з руйнуванням клітин унаслідок високих поглинутих доз (для зразка 2 максимальна розрахункова потужність поглинутої дози 1,38 Гр/год).

Для подальшої роботи було використано шість зразків, в яких була присутня ДНК у достатній для секвенування кількості.

Концентрація виділеної тотальної ДНК у зразках, нг/мл

2	–
4	9,68 · 10 ²
5	7,18 · 10 ²
7	2,58 · 10 ³
8	–
11	8,04 · 10 ²
12	7,48 · 10 ³
13	1,07 · 10 ³

Біорізноманіття досліджуваних зразків

Згідно з отриманими даними мікробіоми зразків субстрату суттєво відрізняються. Так, при аналізі на таксономічному рівні загальна кількість

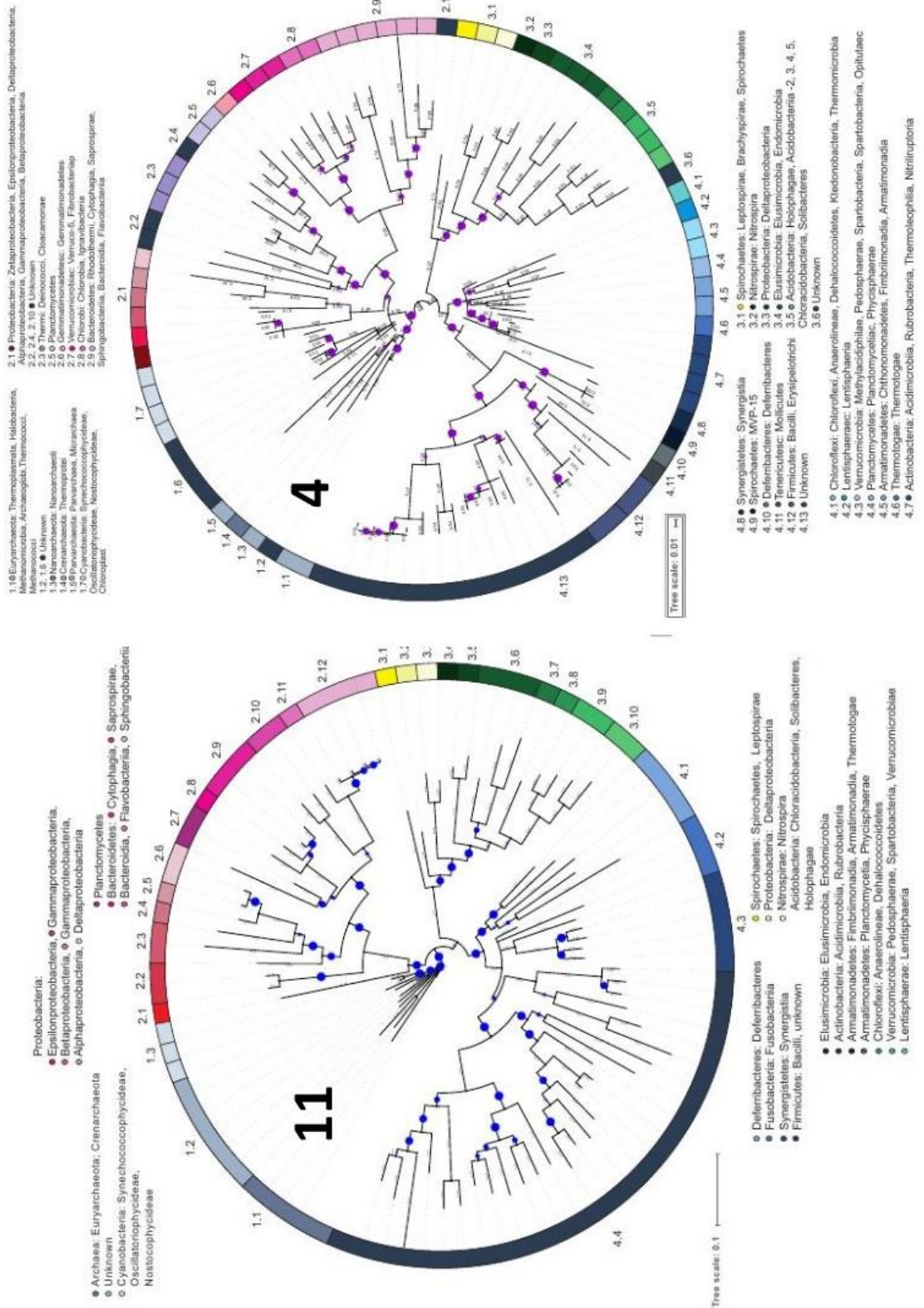


Рис. 2. Структура філогенетичних дерев для зразків 4 та 11. (Див. кольоровий рисунок на сайті журналу)

родин, які вдалося ідентифікувати, становила 378 найменувань, але в жодному зі зразків всі родини не представлено. Загальна кількість родин значно варіює – найбільше представлено царство бактерій у зразку 4, який може вважатись контрольним, адже був відібраний ззовні об'єкта «Укриття». У цьому зразку відсутні доміанти (з огляду на найнижче серед представлених зразків значення індексу домінування (I_D) [26], а, отже, він є найбільш збалансованим і наближеним за станом до мікробіому ґрунту природних екосистем, що оточують ЧАЕС. Найменша кількість родин характерна для зразка 11, відібраного з середини залізної труби, що використовується для моніторингу стану реактора. Цей зразок має найвищий I_D , що фактично означає присутність декількох домінуючих видів у зразку. І дійсно, 44,68 % сиквенсів тут належали представниками родини *Rhodobacteraceae*, що включає велику кількість хемогетеротрофних видів у тому числі

таких, які використовують залізо як субстрат.

Для оцінки наявності рідкісних видів у досліджуваних мікробіомах використовували індекс Чао ($chao1$) [27]. Загальну довжину гілок філогенетичного дерева (PD_whole_tree) [28] використовували як міру таксономічної спорідненості всередині кожного зразка. Індекс Шеннона (I_S) [29] і домінування I_D застосовували для визначення ступеня рівномірності розподілу родин у зразку та наявності явних домінантів відповідно. Отримані дані свідчать (табл. 4), що зразки 4 та 12 є найбільш збалансованими й вирівняними: загальна кількість представлених родин (269 і 207 відповідно) дозволяє нормальне функціонування мікробіому, знижуючи вклад моноштамів у його формування (I_D становить 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 4. Альфа-біорізноманіття мікробіомів досліджуваних зразків

№ зразка	Загальна кількість представлених родин	Індекс Чао ($chao1$)	Загальна довжина філогенетичного дерева (PD_whole_tree)	Індекс Шеннона (I_S) [29]	Індекс домінування (I_D) [26]
4	269	4104,6	112,6	9,1	0,006
5	70	748,5	22,9	4,8	0,096
7	133	814,6	45,2	5,6	0,053
11	41	242,8	13,1	3,9	0,181
12	207	2652,9	73,9	8,9	0,007
13	136	1358,0	48,3	7,2	0,022

У той же час важливо розглянути характеристики альфа-різноманіття для зразку з найбільшою потужністю дози, з якого вдалося отримати генетичний матеріал. Як уже було зазначено вище, тут представлено найменшу кількість родин при найбільшій з усіх представлених мікробіомів кількості унікальних видів ($chao1 = 242,8$). Невелика довжина гілок філогенетичного дерева та високі значення генетичної спорідненості свідчать про формування моноекосистеми, основним завданням якої є формування середовища, що було б придатне для майбутнього існування більшого різноманіття мікроорганізмів. В основному (рис. 2) 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 зразку 7).

Висновки

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

Потужність поглинутої дози в місцях відбору зразків субстрату коливається в межах від 0,007 до 0,37 Гр/год. Максимальна розрахункова становить 1,38 Гр/год. Основними дозоформуючими радіонуклідами є ^{137}Cs , ^{241}Am та ^{226}Ra .

Усі проаналізовані зразки мали лужну реакцію, що свідчить про те, що джерелом формування субстрату стала цементна крихта залізобетону.

тонних конструкцій, а не пил ззовні, створюваний навколишніми кислими дерново-підзолистими ґрунтами.

Згідно з отриманими результатами можна стверджувати про наявність мікроорганізмів та формування протоекосистем у зразках 4, 5, 7, 11,

12 та 13. Виділити ДНК із зразків 2 та 8 не вдалося, що може бути як наслідком формування високих доз опромінення і загибелі мікроорганізмів, так і бути пов'язане з недосконалістю процесу виділення нуклеїнових кислот із зразків подібного типу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. А.А. Боровой. Работы Курчатовского института по ликвидации последствий аварии: к 25-летию аварии на Чернобыльской АЭС (НИЦ “Курчатовский ин-т”, 2011) 83 с.
2. Т.І. Тугай та ін. Закономірності впливу низьких доз опромінення на мікроскопічні гриби. *Ядерна фізика та енергетика* 13(4) (2012) 396.
3. Т.И. Тугай та ін. Ответные реакции грибов, выделенных из различных по уровню радиоактивного загрязнения помещений объекта “Укрытие”, на действие ионизирующего излучения. 36. науч. праць Ін-ту ядерних дослідж. 1(14) (2005) 128.
4. J. Dighton, T. Tugay, N. Zhdanova. Fungi and ionizing radiation from radionuclides. *FEMS Microbiology Letters* 281(2) (2008) 109.
5. В.Б. Рыбалка и др. Микробный фактор, топливосодержащие материалы и образование субмикронных частиц в объекте “Укрытие”. *Проблеми безпеки атомних електростанцій і Чорнобиля* 3 (2005) 87.
6. М.О. Boretska, I.A. Kozlova. Biofilms on a metal surface as microbial corrosion factor. *Microbiol. Zhurn.* 72(3) (2010) 57.
7. A.K. Lee, D.K. Newman. Microbial iron respiration: impacts on corrosion processes. *Applied microbiology and biotechnology* 62(2-3) (2003) 134.
8. *Understanding biocorrosion. Fundamentals and applications.* Eds. T. Liengen et al. (Woodhead Publishing, 2014) 447 p.
9. L.E. Rendon Diaz Miron, M.E. Lara Magaña, M.R. Lara. Microorganisms concrete interactions. *MRS Proceedings* 1768 (2015).
10. Z.P. Kopteva, V.V. Zanina, I.A. Kozlova. Microbial corrosion of protective coatings. *Surface Engineering* 20(4) (2004) 275.
11. S.C. Schuster. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature Methods* 5(1) (2008) 16.
12. J. Kuczynski et al. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. *Current Protocols in Bioinformatics* 36 (2011) 10.7.
13. K.M. Keiblinger et al. Soil metaproteomics - comparative evaluation of protein extraction protocols. *Soil Biology & Biochemistry* 54 (2012) 14.
14. M. Ragon et al. Sunlight-exposed biofilm microbial communities are naturally resistant to Chernobyl ionizing-radiation levels. *PLoS One* 6(7) (2011) e21764.
15. G.B. Zavilgelsky et al. Isolation and analysis of UV and radio-resistant bacteria from Chernobyl. *Journal of Photochemistry and Photobiology. Photobiology B: Biology* 43(2) (1998) 152.
16. N.S. Davis, G.J. Silverman, E.B. Msurovsky. Radiation-resistant, pigmented coccus isolated from haddock tissue. *Journal of Bacteriology* 86 (1963) 294.
17. A.W. Anderson et al. Studies on a radio-resistant micrococcus. I. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. *Food Technol.* 10(1) (1956) 575.
18. C. Luo et al. Soil microbial community responses to a decade of warming as revealed by comparative metagenomics. *Applied and Environmental Microbiology* 80(5) (2014) 1777.
19. J.E. Brown et al. A new version of the erica tool to facilitate impact assessments of radioactivity on wild plants and animals. *Journal of Environmental Radioactivity* 153 (2016) 141.
20. M. Sagova-Mareckova et al. Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics. *Applied and Environmental Microbiology* 74(9) (2008) 2902.
21. J.G. Caporaso et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7(5) (2010) 335.
22. J.R. Rideout et al. Subsampled open-reference clustering creates consistent, comprehensive OTU definitions and scales to billions of sequences. *PeerJ* 2 (2014) e545.
23. D. McDonald et al. An improved greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *The ISME Journal* 6(3) (2012) 610.
24. J. Algina, S. Olejnik. Conducting power analyses for anova and ancova in between-subjects designs. *Evaluation & the Health Professions* 26(3) (2003) 288.
25. J. Stegemann, N. Buenfeld. Prediction of leachate PH for cement paste containing pure metal compounds. *Journal of Hazardous Materials* 90(2) (2002) 169.
26. J. Balogh. *Lebensgemeinschaften der landtiere: ihre erforschung unter besonderer beruecksichtigung der zoozoenologischen arbeitsmethoden* (Berlin: Akademie Verlag, 1958) 560 p.
27. A. Chao. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics* 11(4) (1984) 265.
28. D.P. Faith, A.M. Baker. Phylogenetic diversity (pd) and biodiversity conservation: some bioinformatics challenges. *Evolutionary Bioinformatics* 2 (2006) 121.
29. C.E. Shannon. A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal* 27(3) (1948) 379.

**Е. Ю. Паренюк^{1,2}, Е. Е. Шаванова¹, В. В. Ильенко¹, И. О. Симутин³, Д. А. Самофалова⁴,
В. Б. Рыбалка⁵, К. Нанба², Т. Такаси², И. Н. Гудков^{1,*}**

¹ *Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, Украина*

² *Институт радиоактивности окружающей среды Университета Фукусимы, Фукусима, Япония*

³ *Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина*

⁴ *ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», Киев, Украина*

⁵ *Институт проблем безопасности АЭС НАН Украины, Чернобыль, Украина*

*Ответственный автор: ingudkov@ukr.net

РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОФЛОРЫ В РАЗРУШЕННОМ ЧЕТВЕРТОМ ЭНЕРГОБЛОКЕ ЧАЭС

С помощью методики секвенирования ДНК нового поколения проанализирована ДНК микробиома субстрата в шести точках 4-го аварийного энергоблока ЧАЭС, в котором рассчитанная мощность дозы на микроорганизмы колеблется от 0,007 до 0,12 Гр/ч. Показано, что наиболее разнообразным и стабильным оказался микробиом образца, взятый за пределами объекта «Укрытие» на территории промплощадки (условный контроль). В нем отсутствуют доминанты, т. е. он является наиболее сбалансированным и приближенным по состоянию к микробиому почвы экосистем, окружающих ЧАЭС. Для образца, мощность дозы на месте отбора которого была самой высокой, общее количество представленных видов было в 8 раз меньшим, но индекс доминирования был самым высоким, что свидетельствует о формировании микробиома с четко выраженными доминантами.

Ключевые слова: ЧАЭС, четвертый энергоблок, радионуклидное загрязнение, секвенирование ДНК, микробиом.

**O. Yu. Pareniuk^{1,2}, K. E. Shavanova¹, V. V. Illienko¹, I. O. Simutin³, D. O. Samofalova⁴,
V. B. Rybalka⁵, K. Nanba², T. Takasi², I. M. Gudkov^{1,*}**

¹ *National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine*

² *Institute of Environmental Radioactivity of Fukushima University, Fukushima, Japan*

³ *Kyiv Taras Shevchenko National University, Kyiv, Ukraine*

⁴ *SI "Institute of Food Biotechnology and Genomics of National Academy of Sciences of Ukraine", Kyiv, Ukraine*

⁵ *Institute for Safety Problems of NPP, National Academy of Sciences of Ukraine, Chornobyl, Ukraine*

*Corresponding author: ingudkov@ukr.net

DIVERSITY OF MICROFLORA AT THE FOURTH DESTROYED UNIT OF THE ChNPP

DNA of the substrate, sampled from six points in the destroyed 4-th power unit of ChNPP, where the dose rate on the microorganisms ranges from 0.008 to 0.12 Gy/h, was analyzed by New Generation Sequencing technology. It was found that the most diverse and stable microbiome occurs in sample, located outside of the "Ukryttya" object on the industrial site (conditional control). There are no dominants in it, which means that it is the most balanced and approximate to the general state of the soil microbiome of ecosystems surrounding the ChNPP. As for the sample, taken from the spot, where the dose rate was the highest, total number of species represented appeared eight times smaller, but dominance index was the highest, which indicates the formation of distinct microbiome dominants.

Keywords: ChNPP, the fourth unit, radionuclide contamination, DNA sequencing, microflora.

REFERENCES

1. A.A. Borovoj. Kurchatov Institute works on liquidation of consequences of the accident. 25-th anniversary of the Chernobyl Nuclear Power Plant accident (Research Center "Kurchatovskij institut", 2011) 83 p.
2. T.I. Tugay et al. Principles of the low doses irradiation influence on microscopic fungi. *Yaderna Fizyka ta Energetyka (Nucl. Phys. At. Energy)* 13(4) (2012) 396. (Ukr)
3. T.I. Tugay et al. Response reactions of the fungi, isolated from inner locations of "Ukryttya", which have different levels of radioactivity. *Zbirnyk naukovykh prats' Instytutu yadernykh doslidzhen'* 1(14) (2005) 128. (Ukr)
4. J. Dighton, T. Tugay, N. Zhdanova. Fungi and ionizing radiation from radionuclides. *FEMS Microbiology Letters* 281(2) (2008) 109.
5. V.B. Rybalka et al. The microbic factor, fuel-containing materials and submicronic particles formation in object "Ukryttya". *Problemy Bezpeky Atomnykh Electrostantsij i Chornobylya* 3 (2005) 87. (Rus)
6. M.O. Boretska, I.A. Kozlova. Biofilms on a metal surface as microbial corrosion factor. *Microbiol. Zhurn.* 72(3) (2010) 57.
7. A.K. Lee, D.K. Newman. Microbial iron respiration: impacts on corrosion processes. *Applied microbiology and biotechnology* 62(2-3) (2003) 134.
8. *Understanding biocorrosion. Fundamentals and*

- applications*. Eds. T. Liengen et al. (Woodhead Publishing, 2014) 447 p.
9. L.E. Rendon Diaz Miron, M.E. Lara Magaña, M.R. Lara. Microorganisms concrete interactions. *MRS Proceedings* 1768 (2015).
 10. Z.P. Kopteva, V.V. Zanina, I.A. Kozlova. Microbial corrosion of protective coatings. *Surface Engineering* 20(4) (2004) 275.
 11. S.C. Schuster. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature Methods* 5(1) (2008) 16.
 12. J. Kuczynski et al. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. *Current Protocols in Bioinformatics* 36 (2011) 10.7.
 13. K.M. Keiblinger et al. Soil metaproteomics - comparative evaluation of protein extraction protocols. *Soil Biology & Biochemistry* 54 (2012) 14.
 14. M. Ragon et al. Sunlight-exposed biofilm microbial communities are naturally resistant to Chernobyl ionizing-radiation levels. *PloS One* 6(7) (2011) e21764.
 15. G.B. Zavilgelsky et al. Isolation and analysis of UV and radio-resistant bacteria from Chernobyl. *Journal of Photochemistry and Photobiology. Photobiology B: Biology* 43(2) (1998) 152.
 16. N.S. Davis, G.J. Silverman, E.B. Msurovsky. Radiation-resistant, pigmented coccus isolated from haddock tissue. *Journal of Bacteriology* 86 (1963) 294.
 17. A.W. Anderson et al. Studies on a radio-resistant micrococcus. I. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. *Food Technol.* 10(1) (1956) 575.
 18. C. Luo et al. Soil microbial community responses to a decade of warming as revealed by comparative metagenomics. *Applied and Environmental Microbiology* 80(5) (2014) 1777.
 19. J.E. Brown et al. A new version of the erica tool to facilitate impact assessments of radioactivity on wild plants and animals. *Journal of Environmental Radioactivity* 153 (2016) 141.
 20. M. Sagova-Mareckova et al. Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics. *Applied and Environmental Microbiology* 74(9) (2008) 2902.
 21. J.G. Caporaso et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7(5) (2010) 335.
 22. J.R. Rideout et al. Subsampled open-reference clustering creates consistent, comprehensive OTU definitions and scales to billions of sequences. *PeerJ* 2 (2014) e545.
 23. D. McDonald et al. An improved greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *The ISME Journal* 6(3) (2012) 610.
 24. J. Algina, S. Olejnik. Conducting power analyses for anova and ancova in between-subjects designs. *Evaluation & the Health Professions* 26(3) (2003) 288.
 25. J. Stegemann, N. Buenfeld. Prediction of leachate PH for cement paste containing pure metal compounds. *Journal of Hazardous Materials* 90(2) (2002) 169.
 26. J. Balogh. *Lebensgemeinschaften der landtiere: ihre erforschung unter besonderer beruecksichtigung der zoozoenologischen arbeitsmethoden* (Berlin: Akademie Verlag, 1958) 560 p.
 27. A. Chao. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics* 11(4) (1984) 265.
 28. D.P. Faith, A.M. Baker. Phylogenetic diversity (pd) and biodiversity conservation: some bioinformatics challenges. *Evolutionary Bioinformatics* 2 (2006) 121.
 29. C.E. Shannon. A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal* 27(3) (1948) 379.

Надійшла 14.02.2017

Received 14.02.2017