НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Вплив радіонуклідного забруднення зони відчуження Чорнобильської АЕС на біорізноманіття бактерій і молекулярну фізіологію рослин

ПАРЕНЮК
Олена Юріївна

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

ДАНЧЕНКО
Максим Миколайович

науково-технічний співробітник
Інституту вірусології
Біомедичного дослідницького центру
Словацької академії наук

Київ - 2017

Актуальність роботи

Накопичення радіонуклідів рослинами, їх відповідь на стрес

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

Накопичення радіонуклідів рослинами значною мірою впливає на їх стресостійкість і здатність до адаптації до змінених умов довкілля

Відповідь екосистеми на привнесення новітніх забрудників?

Видовий склад і біологічна активність ґрунтових мікроорганізмів

Рухомість і біологічна доступність радіонуклідів в ґрунті

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

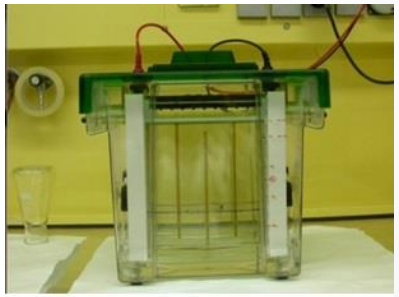
Мета і завдання роботи

Метою роботи було оцінити відповідь малорухомих компонентів екосистем (бактеріальних і рослинних угруповань) на радіонуклідне забруднення ґрунту та виявлення особливостей переходу ^{137}Cs з ґрунту в різні види сільськогосподарських рослин, за допомогою сучасних методів аналізу.

Поставлена мета зумовила необхідність вирішення таких завдань:

- Визначити кількісний і видовий склад ґрунтового мікробоценозу забруднених радіонуклідами ґрунтів зони відчуження та зони безумовного (обов'язкового) відселення та оцінити сезонну динаміку кількості еколого-трофічних груп мікроорганізмів на досліджуваних територіях;
- Ідентифікувати домінуючі види ґрунтових бактерій та сформувати колекцію;
- Провести порівняльний аналіз здатності до акумуляції ^{137}Cs мікроорганізмами, виділеними із забруднених радіонуклідами ґрунтів, та культур із колекції Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України;
- Визначити вплив обраних мікроорганізмів на надходження ^{137}Cs у рослини;
- Оцінити загальний фізіологічний стан насіння хронічно опромінених рослин, шляхом порівняння морфометричних вимірювань;
- Системно проаналізувати функціональні зміни протеому рослин, внаслідок зростання у середовищі поблизу Чорнобильської АЕС;
- Інтегрувати отриману інформацію молекулярних змін у концептуальні моделі реакцій сої та льону, виявивши потенційно критичні для виживання в умовах шкідливого впливу хронічного опромінення білки, а також створити модель змін протеому за дії хронічного опромінення, підкресливши універсальні та видоспецифічні реакції.
- Охарактеризувати динамічні тренди протеому протягом різних фаз розвитку насіння другого покоління в умовах чорнобильської зони відчуження;
- Розробити концепцію інтегрального вивчення екосистем зони відчуження Чорнобильської АЕС, за допомогою сучасних метагеномних та протеомних підходів.

Методи досліджень



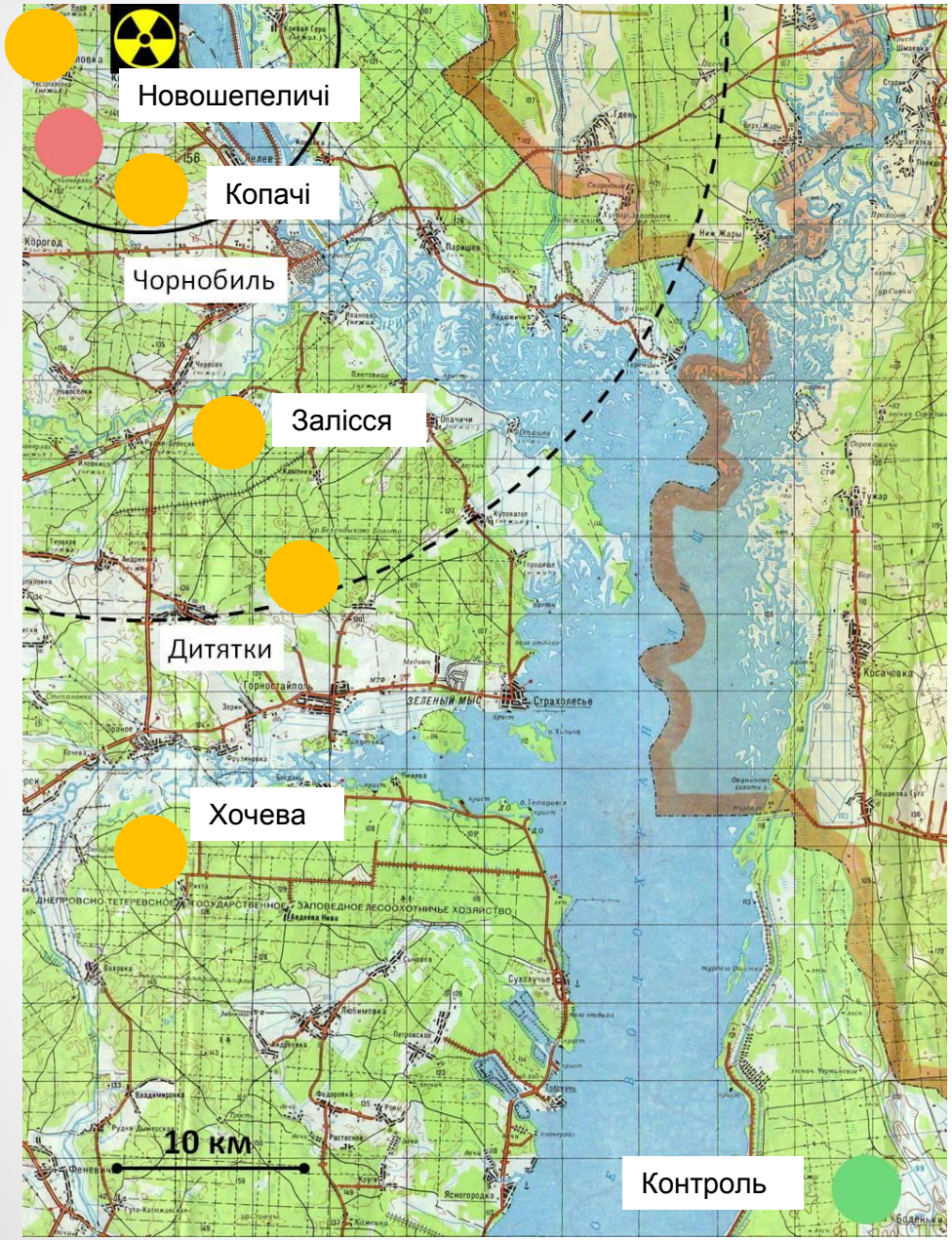
- Загально-мікробіологічні методики – висіву ґрунтової суспензії у різних розведеннях на селективні і елективні поживні середовища, експозиція тест-систем у ґрунті протягом вегетаційного періоду.

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

- Дослідження протеому рослин за допомогою двовимірного гель електрофорезу й ультрависокоефективної рідинної хроматографії поєднаної з тандемною мас-спектрометрією

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

Розміщення дослідних ділянок



Атомна електростанція

Забруднені ділянки для відбору проб рослин

Контрольні ділянки для відбору проб рослин

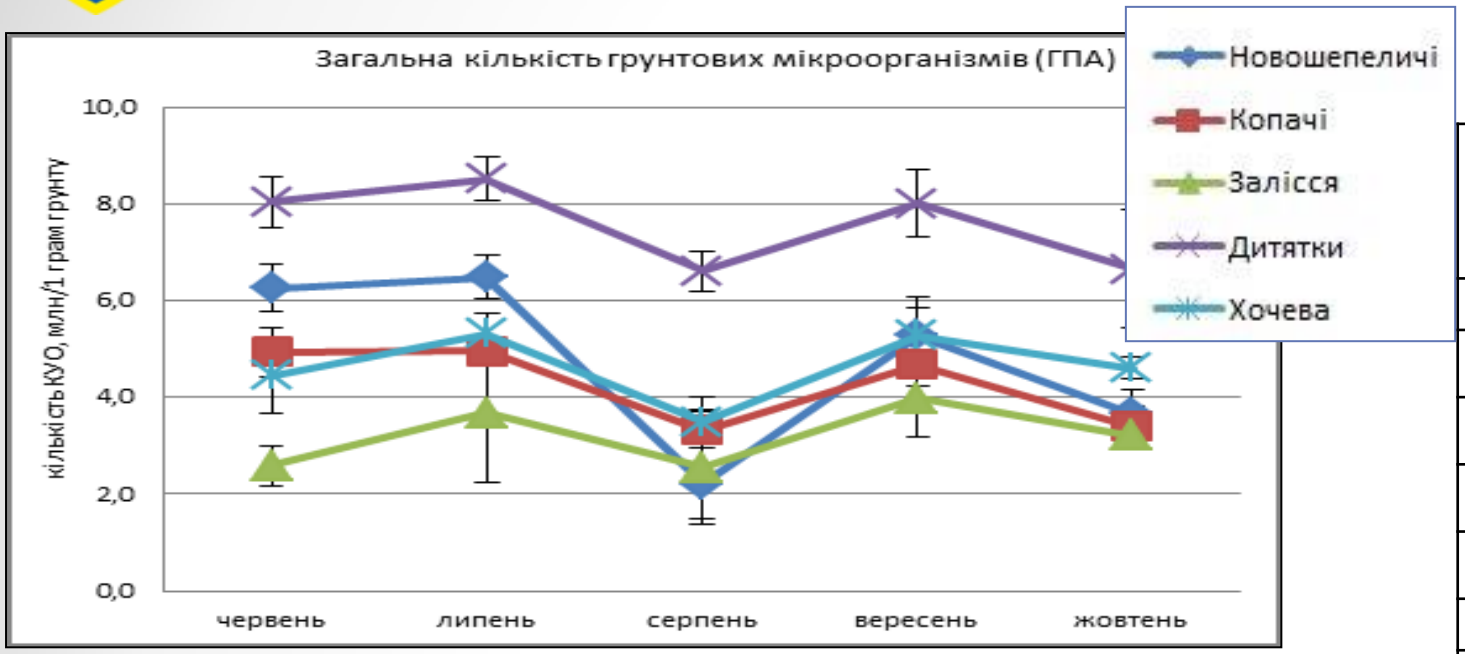
Дослідні ділянки для відбору проб мікрофлори ґрунту та експозиції тест-систем

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

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

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

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

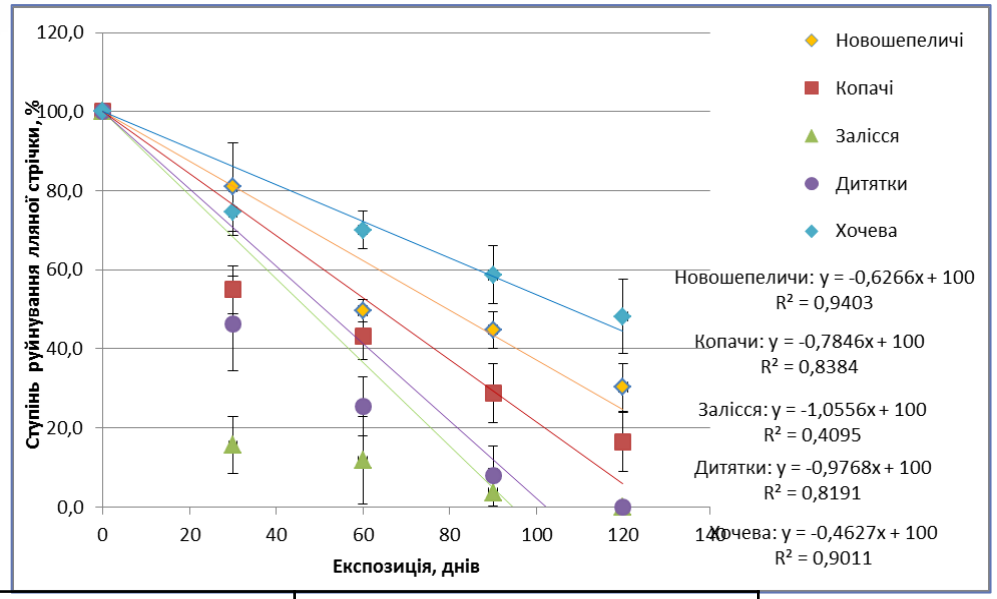


№ з/п	Час відбору проби	Місце відбору проб, село				
		Новошепеличі	Копачі	Залісся	Дитятки	Хочева
Коефіцієнт мінералізації ($К_{мін}$)						
1	червень	0,64	0,59	0,33	1,38	0,19
2	липень	0,80	0,61	0,48	2,02	0,26
3	серпень	0,73	0,68	0,34	3,10	0,15
4	вересень	0,43	0,56	0,28	2,30	0,19
5	жовтень	0,34	0,52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

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

Целюлазна активність ґрунту

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

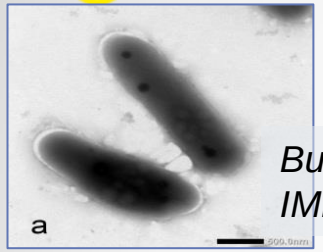


№ з/п	Точка відбору зразків, село	Кут нахилу прямої апроксимації, градус
1	Новошепеличі	32,1˚
2	Копачі	38,1˚
3	Залісся	46,5˚
4	Дитятки	44,3˚
5	Хочева	24,8˚

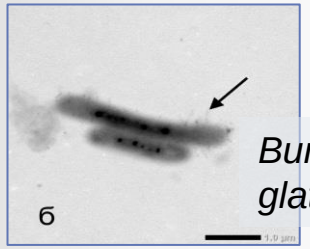
Загальний вигляд системи для визначення целюлозної активності після експозиції у ґрунті протягом 90 діб

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

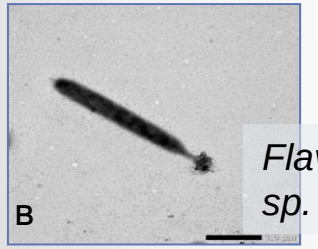
Здатність представників ґрунтової мікрофлори до акумуляції ^{137}Cs



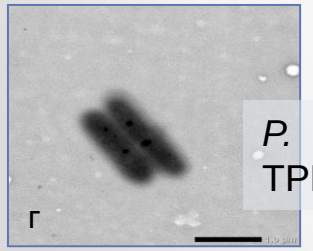
Burkholderia sp. IMER-B1



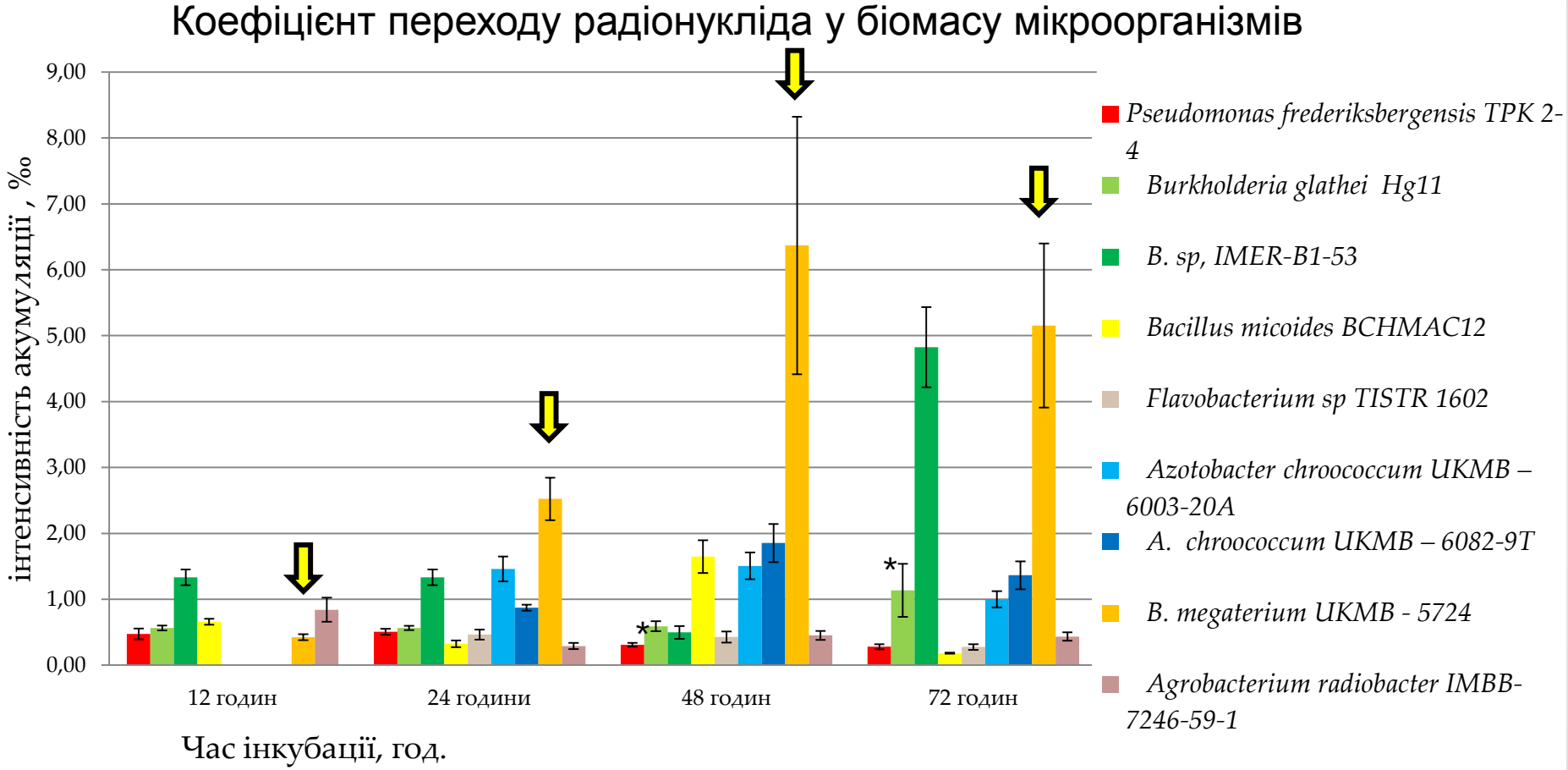
Burkholderia glathei Hg11



Flavobacterium sp. TISTR 1602

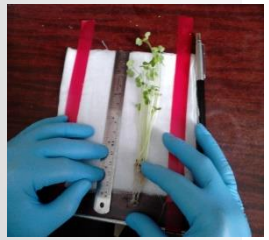


P. frederiksbergensis ТРК 2-4

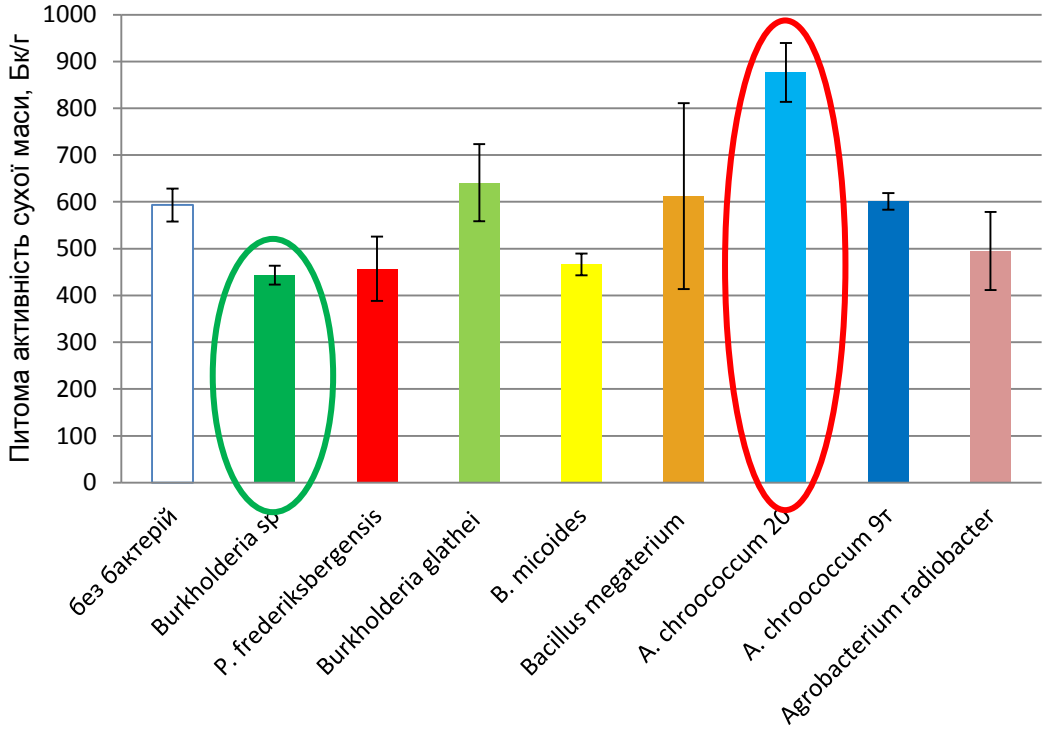


- Встановлено, що штам *Bacilus megaterium* УКМ В-5724 із колекції Інституту мікробіології та вірусології НАН України, порівняно з мікроорганізмами-компонентами біоценозів забруднених радіонуклідами ґрунтів, має підвищену здатність до накопичення ^{137}Cs

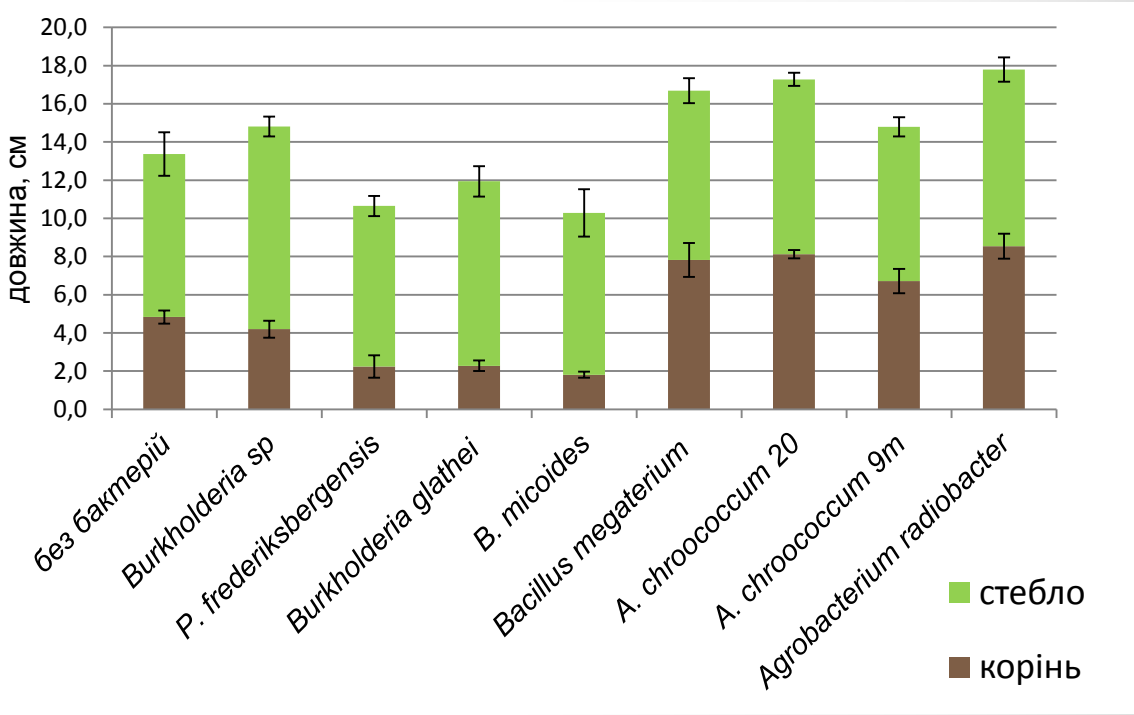
Зміна біологічної доступності ^{137}Cs під впливом мікрофлори ґрунтів



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



Морфометрія рослин ріпаку після пророщування з інтродукованими в ризосферу мікроорганізмами



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

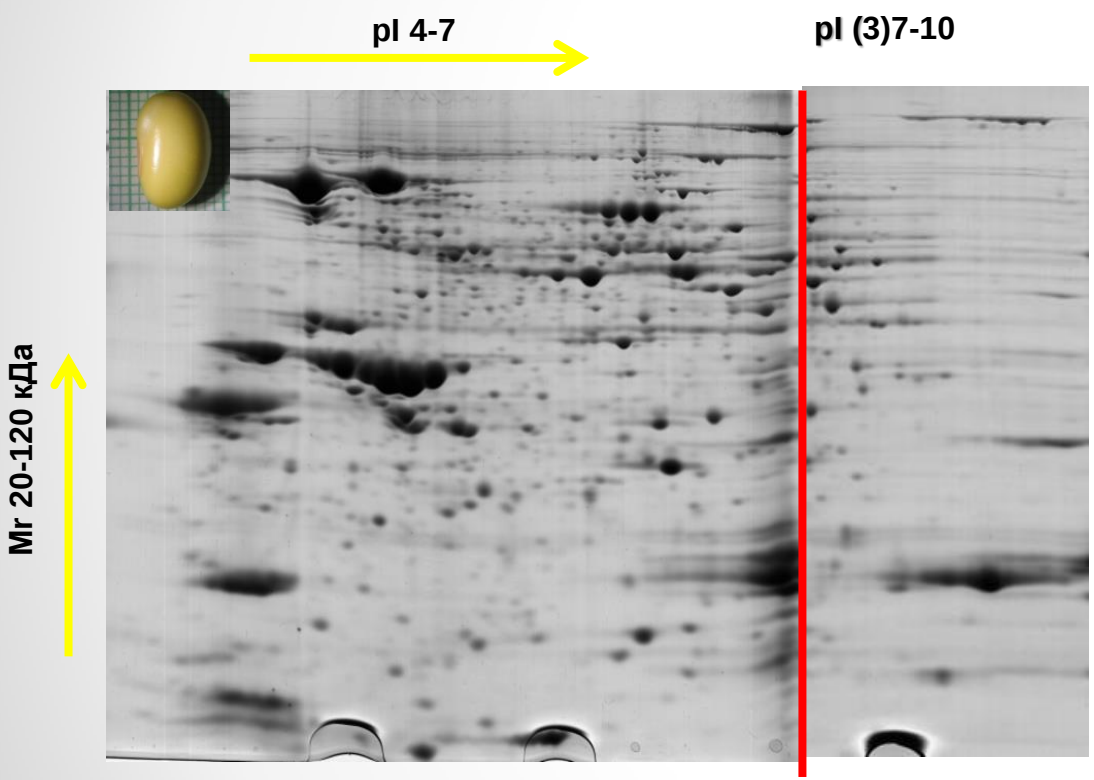
Білкові карти зрілого насіння сої та льону

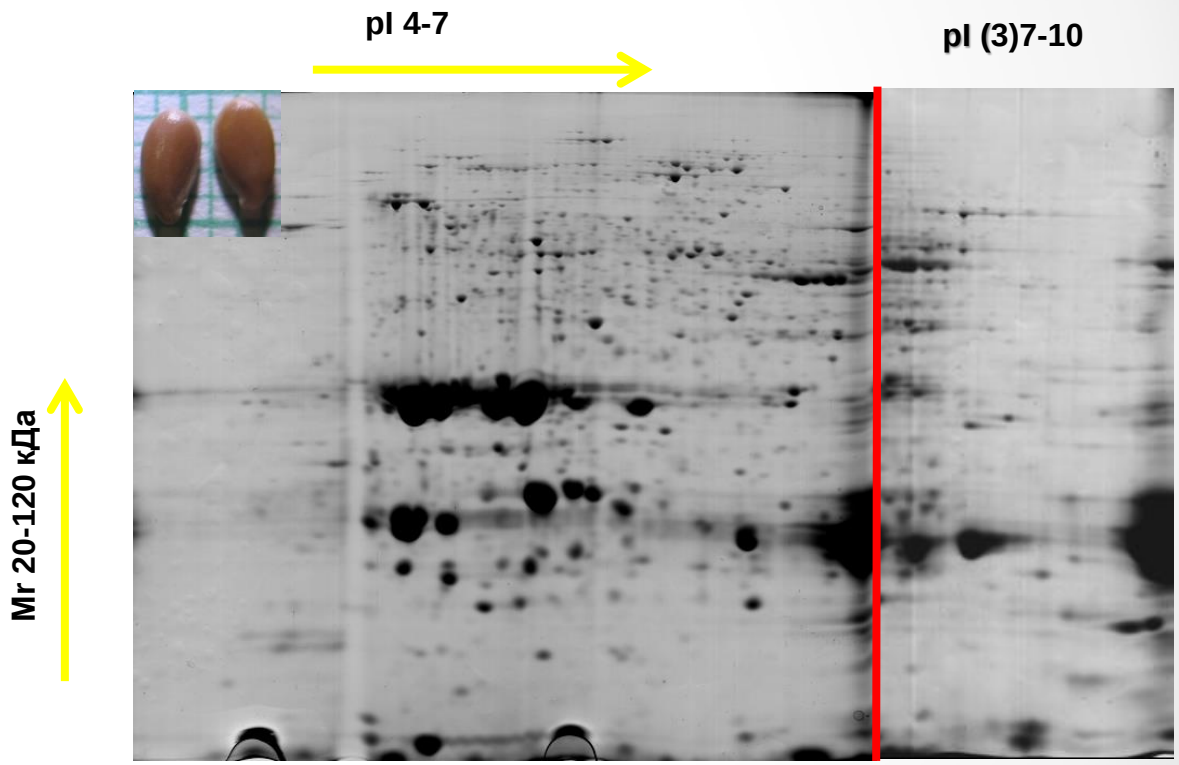
Соя:

698 розділених плям;
64 різної кількості;
26 ідентифікованих білків

Льон:

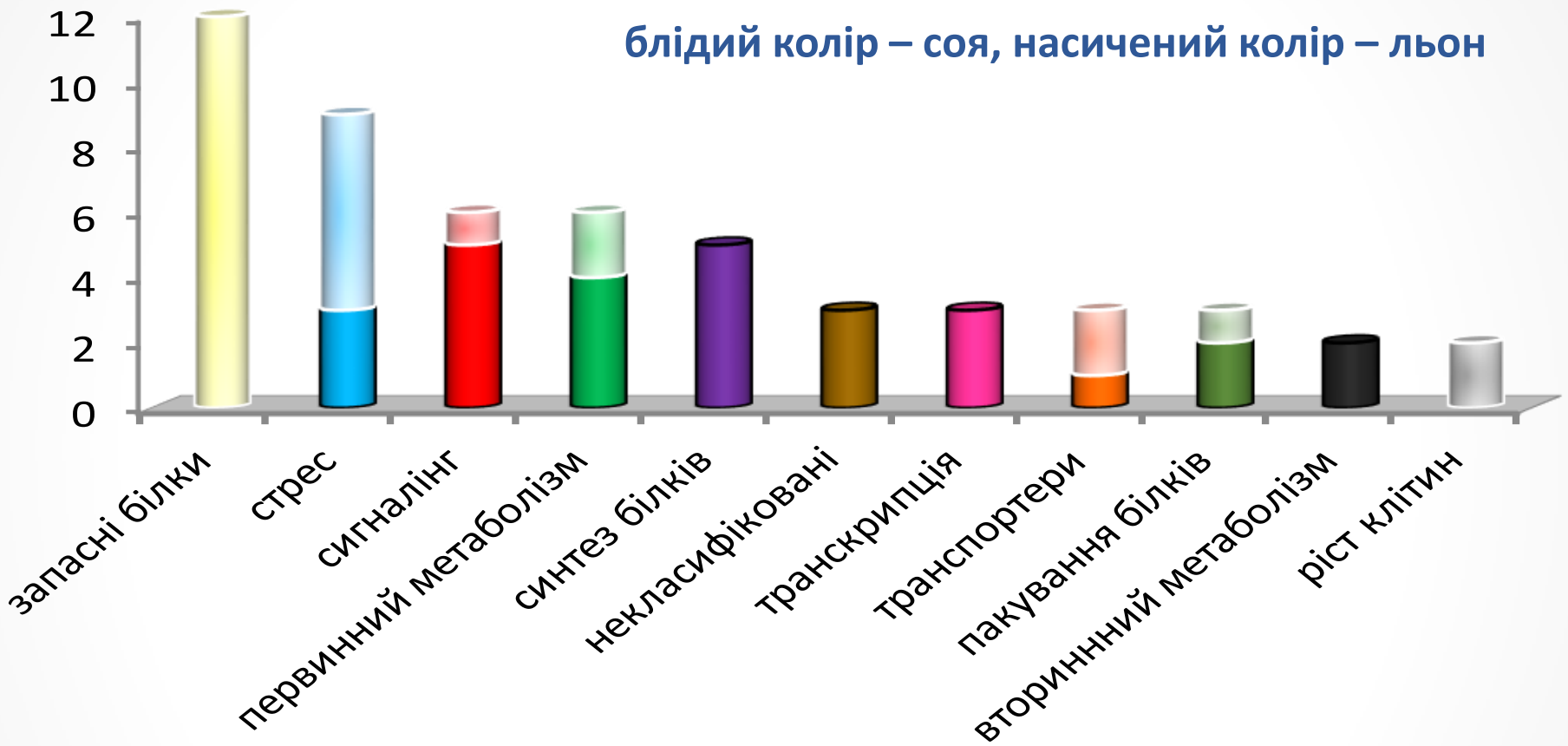
720 розділених плям;
35 різної кількості;
28 ідентифікованих білків





- Використовуючи двовимірний гель електрофорез із стрічками pH градієнту вузького діапазону, було вперше розділено і кількісно проаналізовано зміни кількох сотень білків зрілого насіння сої та льону в умовах радіонуклідного забруднення; виявилось, що зростання у середовищі чорнобильської зони спричинило помітні зміни протеому досліджених рослин – 9,2% білків сої та 4,9% білків льону.

Функціональна класифікація білків сої та льону



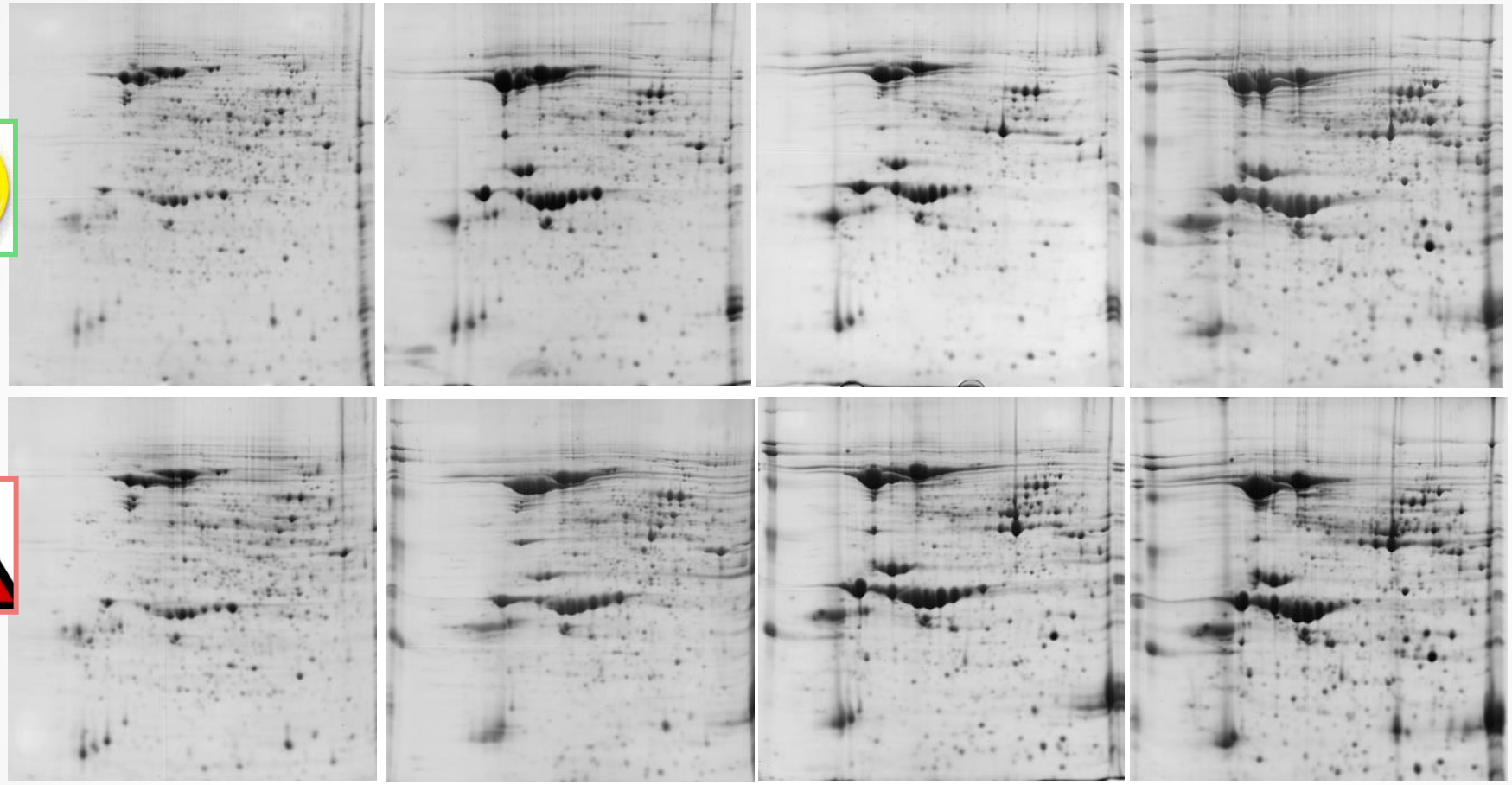
- Внаслідок зростання та розвитку на забрудненій радіонуклідами ділянці, змін зазнали наступні функціональні групи білків зрілого насіння сої: запасні білки, ріст клітин, стресові, первинний метаболізм, транспортери, сигналінг та пакування білків. У льону аналогічний ефект спостерігався для: сигналінг (зокрема ліпоксигеназа та молекулярний адаптер), первинний метаболізм (гліколіз), транспортери, транскрипція, синтез білків, пакування білків (шаперони), стресові, вторинний метаболізм та некласифіковані.

Мережа взаємодії біохімічних шляхів

Зелений шрифт – накопичення в контролі, червоний – за дії радіонуклідного забруднення, синий різнонаправлені зміни ізоформ

- Побудована концепція показала, що специфічними для сої були зміни запасних білків, опосередковані транспортерами, а унікальними для льону – підлаштований сигналінг із впливом на алармони та зворотне фосфорилювання.
- З іншого боку, універсальні реакції включали: 1) підвищену активність експресії генів із наслідками на синтез і пакування білків, 2) перенаправлення первинного метаболізму (завдяки мультифункціональним ензимам гліколізу) на синтез гліцин бетаїну, фітохелатинів і дегідринів.

Білкові мапи – другий сезон розвиток насіння сої



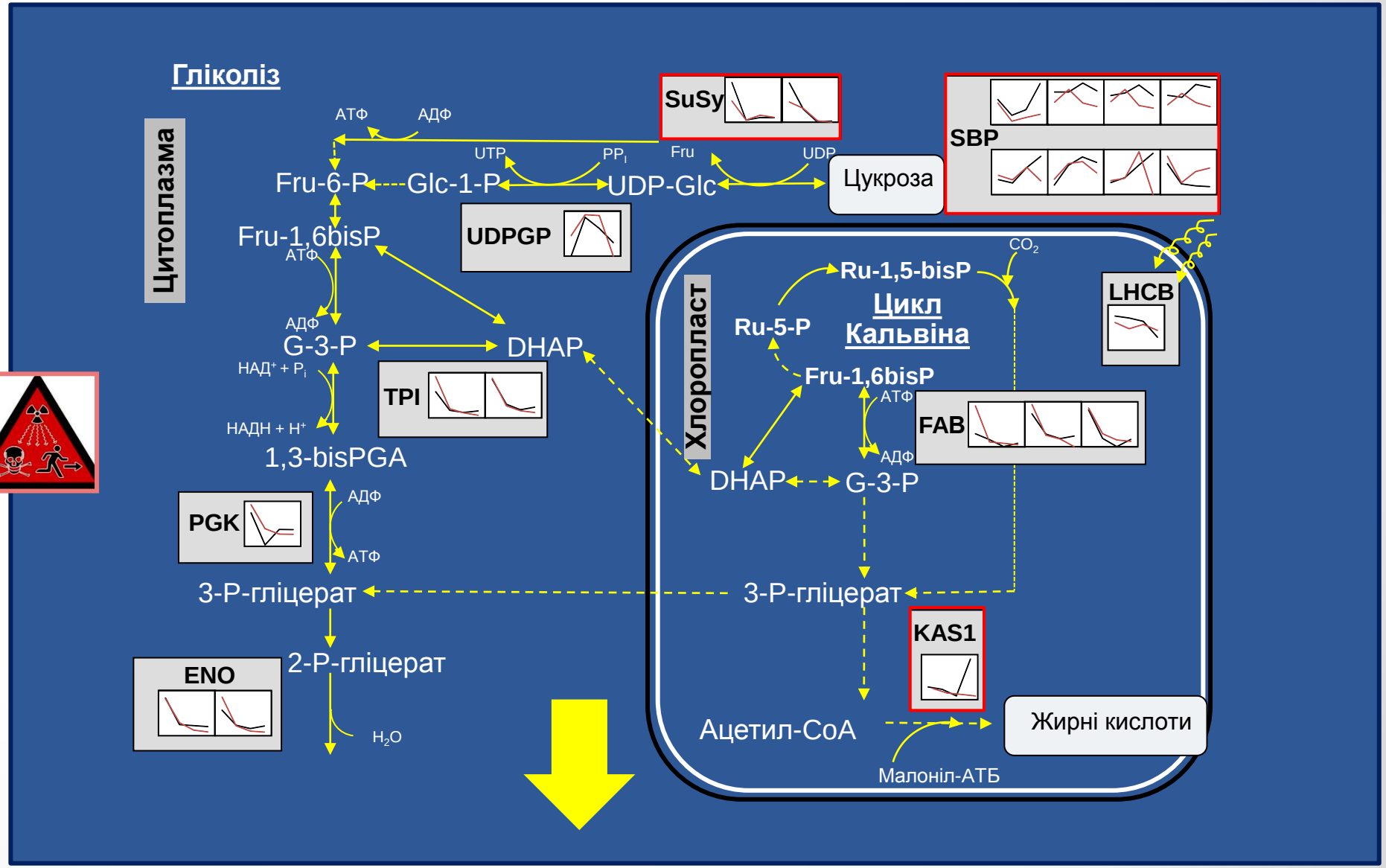
- Вперше отримано інформацію динаміки змін 211 білків сої та 79 білків льону протягом дозрівання насіння другого покоління за впливу хронічного опромінення.

Змінені біохімічні шляхи другого покоління – соя

Перенаправлений метаболізм вуглецю в цитоплазмі /хлоропластах

Чорні графіки показують відносний об'єм білкових плям контролю, червоні – забруднених зразків.

Ключові зміни: кетоацил синтаза (KAS1), цукрозо синтаза (SuSy), цукрозо-зв'язуючий білок (SBP),



Змінені біохімічні шляхи другого покоління – соя

Активація циклу трикарбонових кислот у мітохондріях

Чорні графіки показують відносний об'єм білкових плям контролю, червоні – забруднених зразків.

Ключові зміни: фосфоенолпіруват карбоксилаза (PEPC), складові комплексу декарбоксилювання гліцину (E3-L/T/P).

Фосфоенолпіруват

Регуляція

GS1

14-3-3

АДФ

АТФ

PEPC

Реасиміляція азоту

Піруват

NH_3

Гліоксалатний шунт

T

GDH1

Піруват

E3

L

Система декарбоксилювання гліцину

Пероксисома

Фотодихання

Гліцин

Мітохондрія

P

ATPSy

ATP

CoA

Ацетил-CoA

Цитрат

Ланцюг переносу електронів

Оксалоацетат

Цикл трикарбонових кислот

Сукцинат

MDH

SDH

Малат

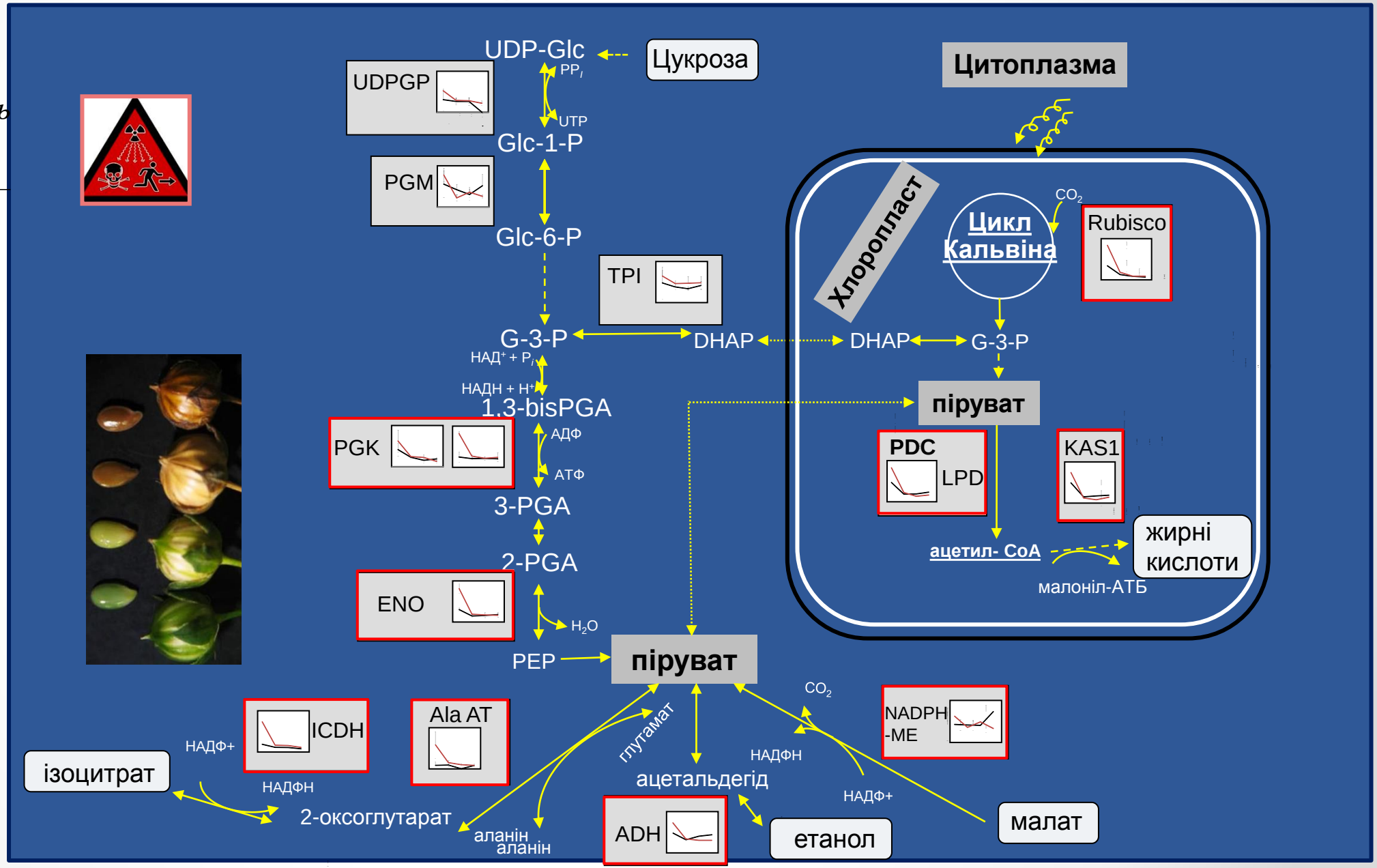
Фумарат

Змінені біохімічні шляхи другого покоління – льон

Потік енергії на накопичення олії

Чорні графіки показують відносний об'єм білкових плям контролю, червоні – забруднених зразків.

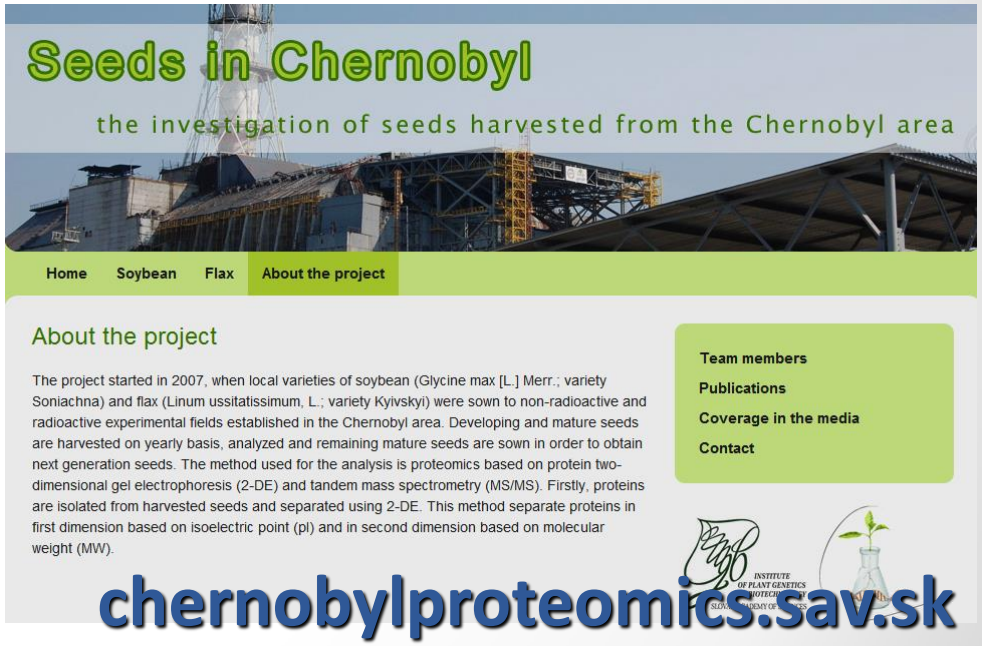
Ключові зміни: кетоацил синтаза (KAS1), енолаза (ENO), фосфогліцерат кіназа (PGK), аланін амінотрансфераза (AlaAT), ізоцитрат дегідрогеназа (ICDH), алкоголь дегідрогеназа (ADH), нікотинамід динуклеотид фосфат залежна малат синтаза (NADPH-ME), рибулозо біфосфат карбоксилаза оксигеназа (RUBISCO), піруват декарбоксилаза / ліпід дегідрогеназа (PDC/LPD)



- Вивчення інтегральної відповіді екосистеми на забруднення радіонуклідами потребує застосування новітніх метагеномних та протеомних методів, що дозволяють оцінити вплив хронічного опромінення на молекулярному і клітинному рівнях. Такий підхід дозволить більш точно оцінити необхідність проведення контрзаходів на забруднених радіонуклідами ділянках і дасть змогу точніше адаптувати їх, для використання у конкретних екосистемах.

ДОСЛІДЖЕННЯ ПІДТРИМАНЕ:
Персональний грант НАН України для молодих учених II-15-11 "Дистанційний моніторинг та молекулярно-генетична оцінка адаптації рослин в умовах чорнобильської зони відчуження" (2011-2012)
Конкурсні стажування Національної стипендійної програми Словаччини вересень 2011 – травень 2012 і листопад – грудень 2015.
Стипендія CNRS для короткого стажування (Laboratoire de Chimie Nucléaire Analytique et Bioenvironnementale, Бордо, Франція) листопад – грудень 2010.

Результатати дослідження розміщені на сторінці проекту



Дякуємо за увагу!