

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біології та
біоінформатики Олексій Юрійович Нипорко
Протокол №____ засідання
кафедри від “ ____ ” _____ 20 ____ р.

**Внутрішній простір об’єкту «Укриття» Чорнобильської АЕС
як середовище існування мікробіоти**

Випускна кваліфікаційна робота магістра
студента спеціальності 091 Біологія
ОП «Біоінформатика та структурна біологія»
Скуловатова Олександра Вікторівича

Науковий керівник від кафедри
доцент кафедри біоінформатики
та структурної біології к.ф.-м.н.
Войтешенко Іван Сергійович

Робота виконана у
Інституті проблем безпеки АЕС НАН
під керівництвом к.б.н. **О.Ю. Паренюк**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2024 р.

Анотація

Скуловатов О.В. Внутрішній простір об'єкту «Укриття» Чорнобильської АЕС як середовище існування мікробіоти. Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 091 Біологія, ОП «Біоінформатика та структурна біологія». У цій роботі представлені результати дослідження впливу фізико-хімічних властивостей поверхонь внутрішніх приміщень об'єкту «Укриття» Чорнобильської АЕС як середовища існування для мікроорганізмів за різної дози поглинутого іонізуючого випромінювання. Показано і охарактеризовано склад та функції мікробіоти, що локалізується в різних частинах саркофагу Чорнобильської АЕС.

Ключові слова: мікробіом, поглинута доза іонізуючого випромінювання, екстремальні умови існування, об'єкт «Укриття» ЧАЕС, біорізноманіття, субстрат, середовище існування.

Annotation

Skulovatov O.V. Inner premises of the Chornobyl NPP "Shelter" facility as a microbiome habitat. Master's thesis for the specialty 091 Biology, EP "Bioinformatics and Structural Biology". This thesis presents the research on the impact of physical and chemical characteristics of the surfaces of the interior of the Chernobyl NPP Shelter as a habitat for microorganisms at different ionizing radiation absorbed doses. The study is focused on the abundance and functions Chornobyl NPP Sarcophagus micorbime habitats.

Keywords: microbiome, absorbed dose of ionizing radiation, extreme habitat conditions, ChNPP Shelter, biodiversity, substrate, habitat.

ВСТУП

Мета роботи: Дослідити внутрішні та зовнішні приміщення об'єкту «Укриття» Чорнобильської АЕС як середовища для формування мікробіомів

Для вирішення поставленої мети потрібно виконати такі **завдання**:

1. Оцінити фізико-хімічні характеристики середовища в об'єкті «Укриття» ЧАЕС.
2. Оцінити вплив фізико-хімічних характеристик на структуру мікробіома.
3. Проаналізувати можливість колонізувати поверхні мікроорганізмами у внутрішньому просторі об'єкту «Укриття» ЧАЕС.
4. Проаналізувати особливості складу мікроценозів об'єкту «Укриття» ЧАЕС та передбачити їх функції.

Об'єктом дослідження: є зовнішні і внутрішні приміщення внутрішнє середовище об'єкту «Укриття» ЧАЕС.

Предмет дослідження: мікробіота субстратів в об'єкті «Укриття» ЧАЕС, її біорізноманіття та функції.

Методи дослідження: біоінформатичний аналіз метагеномних даних для встановлення біорізноманіття та функцій мікробіомів.

Зміст

Вступ.....	3
Перелік умовних позначень.....	5
Розділ 1. Середовище існування та бактерії стійкі до радіації.....	6
1.1 Проблема радіоактивного забруднення.....	6
1.2 Актуальний стан проблеми аварії на ЧАЕС.....	6
1.3 Радіація та мікробіота.....	8
1.4 Стійка до дії радіації мікробіота та її середовище існування.....	9
Розділ 2. Методи.....	15
2.1 Відбір проб. Визначення властивостей субстрату.....	15
2.2 Виділення бактеріальної ДНК та аналіз нуклеотидної послідовності.....	18
2.3 Біоінформатичні методи аналізу даних.....	18
Розділ 3. Експериментальна частина.....	20
3.1 Фізичні та хімічні характеристики внутрішнього середовища саркофагу ЧАЕС.....	20 3.2
Аналіз виділеної ДНК.....	24
3.3 Біорізноманіття колонізуючих субстрат мікроорганізмів.....	24
3.4 Функції мікробіому.....	34
Висновки.....	37
Список використаних джерел.....	38

Перелік умовних позначень

ДНК - дезоксирибонуклеїнова кислота

РНК - рибонуклеїнова кислота

ЧАЕС - Чорнобильська атомна електростанція

OUT - операційна таксономічна одиниця (англ. Operational Taxonomic Unit)

ДК – дозовий коефіцієнт

Розділ 1

1. Середовище існування та бактерії стійкі до радіації

1.1 Проблема радіоактивного забруднення

З розвитком сфер практичного застосування ядерних перетворень та корисного застосування іонізуючого випромінення на нашій планеті все більше з'являється місць з різним ступенем радіоактивного забруднення. Так менше, ніж за останні сто років, було проведено, понад 2000 ядерних випробувань по всьому світу, бойове застосування ядерної зброї у Хіросімі та Нагасакі, затонуло 9 підводних ядерних човнів, інциденти на виробництві та аварії на АЕС, які є лідерами по радіаційному забрудненню. Відомо, що найбільша ядерна катастрофа - це аварія в Чорнобилі та Фукусімі-1 [1]. Проте, імовірність повторення ядерних катастроф в світі лишається висока, а тому нам необхідно досліджувати вплив сильного іонізуючого випромінення на живі організми, адже краще розуміючи механізми адаптації та еволюцію в новому середовищі існування, ми стаємо на крок ближче не лише до розробки засобів ліквідації наслідків подібних катастроф, а і до кращого розуміння життя в цілому, як складної системи пристосувань до несприятливих умов існування. Фундаментальність цих знань навіть дозволяє моделювати вплив космічної радіації на живі організми поза межами нашої планети. Та дає розвиток новій науці - космічній радіобіології [2]. Отже, резюмуючи все вище зазначене, складно переоцінити важливість дослідження в сфері радіобіології, особливо в країні, яка є жертвою ядерної катастрофи з 1986 року.

1.2 Актуальний стан проблеми аварії на ЧАЕС

Зона відчуження Чорнобильської АЕС станом на теперішній час лишається дуже забрудненою радіонуклідами територією. Домінуючим джерелом радіації є ізотоп Цезію-137, який випромінює гамма-промені, що характеризуються високою проникною здатністю. Хоча зараз спостерігається суттєве покращення радіаційної ситуації, порівняно з часом одразу після вибуху на четвертому енергоблоці ЧАЕС - так потужність дози над поверхнею ґрунту зменшилась загалом на два порядки, а в місцях де проводились ліквідаційні заходи-зменшення місцями сягнуло трьох порядків [3]. З аналітичних джерел відомо, що в зоні відчуження Чорнобильської АЕС сумарна радіоактивність ізотопів становить 220 кКі, а Стронцію-90 та Цезію-137 70-80 кКі та 96-158 кКі відповідно. З моменту аварії сумарна питома активність цих двох ізотопів зменшилась понад 40 % [4].

Якщо розглядати середовища існування, то зараз найчистішим є повітря, навіть для проммайданчика Чорнобильської АЕС його забруднення складає $0,3-16 \text{ мБк/м}^3$. Загалом, варто вважати дуже забрудненим верхній шар ґрунтових покривів, а водне середовище, як і біомаса організмів, є вже наступною ланкою міграції радіонуклідів. [5, 6]. Так в десятикілометровій зоні відчуження ЧАЕС показники забруднення ґрунтових покривів можуть коливатись в межах $20-4000 \text{ кБк/м}^2$ [7]. Локалізованим простором з найвищим рівнем радіаційного забруднення є саркофаг зруйнованого вибухом реактора ЧАЕС, де по Стронцію-90 та Цезію-137 сумарна активність сягає 20 МКі, а ізотопи з альфа типом розпаду становлять 270 кКі [7]. Отже, для дослідження великих доз випромінення на живі об'єкти найбільш цікавими середовищами є ґрунт і об'єкт «Укриття», але варто зважати, що в ґрунті є значна кількість як органічних так і мінеральних речовин, на відміну від об'єкту «Укриття» ЧАЕС дуже бідного штучного середовища. Тому най екстремальніші умови є характерні для саркофагу ЧАЕС, а отже процеси мутації, виникнення та розвитку пристосувань, адаптації і навіть видоутворення мають протікати найінтенсивніше.

1.3 Радіація та мікробіота

Довгий час вважалось, що іонізуюче випромінення високої інтенсивності виключає можливість життя, навіть активно розроблялись методи стерилізації медичного обладнання та продуктів харчування опроміненням. Але саме так і був відкритий один з найбільш радіаційно резистентних мікроорганізмів *Deinococcus radiodurans* [8]. Цей вид здатний зберігати життєздатність при 5000 Гр гамма-випромінення, що обумовлено винятковою активністю репарації ДНК. Проте, автори статті Valerie Mattimore і John R. Battista переконані, що такі властивості не є адаптацією, адже немає в природніх умовах такого радіаційного опромінення, а отже радіорезистентність не є конкурентним селективним фактором відбору [9]. Відомо, що *Deinococcus radiodurans* здатен поглинати Уран та може бути використаний як стартовий організм для розробки методів очищення стічних вод [10]. Вчена спільнота давно приділяє увагу дослідженню мікробіому уранових шахт, адже це середовище асоціюється з певною радіоактивністю. Так, в свіжій публікації показано відносну чисельність OTU визначених за допомогою сиквенування 16S р-РНК метагеному, відібраного з уранових шахт Індії. Загалом домінантним філотипом є *Proteobacteria*, що складає 38%, *Acidobacteria* 21%, *Firmicutes* 8 %, *Bacteroidetes* 8 % та 17% є неідентифікованими базою даних GenBank [11].

Екстремально радіорезистентну бактерію *Arthrobacter radiotolerans* було виділено з радонових гарячих джерел гейзерів. На основі хемотаксономічних характеристик, цей вид було перекласифіковано як *Rubrobacter radiotolerans*. Порогова доза гамма-променів для клітин *Rubrobacter radiotolerans* у логарифмічній фазі росту становить 6000 Гр, а летальна доза – 10000 Гр. Ця доза значно вища, ніж у більшості бактерій (окрім *Deinococcus*) [12].

Вчені Н. Ito та Н. Iizuka виділили зі старого рису штами радіорезистентних бактерій *Methylobacterium radiotolerans*, для яких ЛД90 становила 2000 Гр [13].

Порівнюючи результати впливу гамма-променів на штами *Halobacterium salinarium*, *Thiobacillus intermedius* та *E. coli* В/г, було визначено, що Д37 становила: 390, 150, 90 Гр, відповідно; при УФ-опроміненні Д37 складала 212, 38 і 10 Дж/м² [14].

При дослідженні стійкості деяких оліготрофних бактерій до іонізуючого випромінювання було встановлено, що ЛД50 для *Pedodermatophilus halotolerans*, *Flectobacillus major* та *Arcocella aquatica* складала 270 Гр/год, 173 Гр/год та 210 Гр/год відповідно [15].

Екстремально термофільна бактерія *Pyrococcus abyssi*, яка мешкає в глибоководних морських умовах, здатна вижити після опромінення гамма-променями в дозі 1100 Гр. Зразки, взяті з каліфорнійської затоки та середньоатлантичного кряжу, показали наявність культур анаеробних хемоорганотрофів, які ростуть при 85°C. На основі секвенування 16S рРНК було визначено, що вони належать до роду *Thermococcus*. Ці ізоляти виявилися більш стійкими до γ -опромінення, ніж *Pyrococcus abyssi*, і деякі з них за радіостійкістю наближалися до *Deinococcus radiodurans* [16].

Отже, наукова спільнота веде активне дослідження мікроорганізмів з високою стійкістю до радіації.

1.4 Стійка до дії радіації мікробіота та її середовище існування

Історія еволюції нашої планети значною мірою належить прокаріотам, які, еволюціонуючи, заселили майже всі доступні екологічні ніші.

Екстремофіли, особливо ті, що процвітають у крайніх умовах, є ключовим об'єктом досліджень у багатьох наукових дисциплінах – від вивчення адаптацій до суворих умов до біогеохімічних циклів елементів. Дослідження екстремофілів також важливі для пошуків походження життя і його слідів на інших планетах та небесних тілах [17].

Дослідження біорізноманіття екосистем, що функціонують у екстремальних умовах, є надзвичайно важливим напрямом біологічної науки. Це дозволяє відкривати нові природні механізми захисту біоти від забруднення навколишнього середовища поллютантами та підвищувати стійкість живих організмів до уражуючих чинників. У цьому контексті вивчення біорізноманіття антропогенно створених об'єктів з високими дозами різних типів іонізуючого випромінювання дозволяє досліджувати механізми, за допомогою яких біота адаптується до стресових умов. Можливо, деякі з цих механізмів можна буде використовувати для ремедіації територій, забруднених радіонуклідами.

На даний момент внутрішній простір зруйнованого четвертого енергоблоку ЧАЕС залишається недостатньо дослідженим біологами, хоча фізичний і хімічний стан вивчався досить інтенсивно. Через високі дози іонізуючого випромінювання, численні бюрократичні перепони при доступі до об'єкта «Укриття» ЧАЕС та небезпеку пересування всередині нього, лише двом дослідницьким групам біологічного напрямку, окрім колективу авторів, вдалося отримати зразки зсередини і вивчити їх біологічну компоненту. На початку 1990-х років групою дослідників під керівництвом Н.М. Жданової було вивчено мікоценоз об'єкта «Укриття» ЧАЕС, і пізніше встановлено ефект стимуляції продукції меланіну у мікроскопічних грибів [18, 19, 20]. Також під керівництвом В.Б. Рибалки було показано здатність окремих представників виду *Bacillus* акумулювати уран з ядерного палива [21]. Дослідження загального біорізноманіття бактеріальної мікрофлори досі не було проведено.

Водночас, протягом останнього десятиліття активно досліджується бактеріальна спільнота басейнів витримки відпрацьованого ядерного палива. Дослідження проводилися у сховищах мокрого типу на АЕС Кофрентес (Валенсія, Іспанія) [22], Селафілді [23], АЕС Медрас (Калпаккам, Індія) [24, 25], сховище в Саванна-Рівер (США) [26] та АЕС Богуніце (Словаччина) [27]. Дослідники виділили з води, відібраної зі сховищ, культури мікроорганізмів, здатних формувати біоплівки на сталевих поверхнях. Деякі з цих культур [23, 27] також показали здатність акумулювати радіоактивні цезій та кобальт з водних розчинів. Примітно, що ідентифіковані мікроорганізми не належать до якогось конкретного виду чи родини. Наприклад, у Селафілді цезій-акумулюючі культури належать до роду *Serratia*, а в Богуніце – до родів *Micrococcus*, *Kocuria* та *Pseudomonas*, що свідчить про здатність бактеріальних штамів адаптуватися до умов навколишнього середовища, розвиваючи необхідні в поточній ситуації властивості.

Середовище, яке утворилося у внутрішніх приміщеннях об'єкту «Укриття», є унікальним через екстремальні умови, що склалися всередині нього, та обмежений проміжок часу, протягом якого могли формуватися екосистеми. Дослідження мікрофлори всередині зруйнованого енергоблоку можуть мати і практичні результати. Наприклад, відомо, що корозійні мікроорганізми значно прискорюють руйнування металевих конструкцій [28, 29], бетону [30, 31] та захисних оболонок конструкцій [32].

Представники царства Бактерії, маючи досить невеликі та нескладно організовані геноми, демонструють дивовижну стійкість до впливу несприятливих факторів навколишнього середовища [33, 34, 35, 36]. Водночас мікробіом, як інтегральна сукупність індивідів, чутливо реагує на найменші зміни середовища. Зокрема, зміна температури на один градус може викликати значні зміни у видовій структурі угруповання [37], що дозволяє припустити, що такий потужний мутагенний фактор, як іонізуюче випромінювання, може мати значний вплив на його стан.

Джерела випромінювання включають ультрафіолетове випромінювання, рентгенівські промені, гамма-промені та космічні промені загалом. Ці різні види іонізуючого випромінювання, зокрема ультрафіолетове та гамма-випромінювання, можуть впливати на мікробні клітини через прямі та непрямі механізми, такі як утворення активних форм кисню. Ці активні форми кисню можуть пошкоджувати ДНК, білки, ліпіди та РНК, а також ініціювати реакції типу Фентона всередині клітини через вивільнення Fe^{2+} з кластерів Fe-S [38]. Дослідження показали, що стійкі до радіації мікроорганізми здатні витримувати до 30 кГр γ -випромінювання у випадку термофільної бактерії *Thermococcus gammatolerans* EJ3 [39] та мезофільної бактерії *Deinococcus hohokamensis* [40], а також 100–1000 Дж/м² UV254 у ксеротолерантній бактерії *Psychrobacter pacificensis* L0S3S-03b [41]. Одним з перших виявлених стійких до радіації мікроорганізмів був *Deinococcus radiodurans*, який став добре вивченим модельним організмом для розуміння радіаційної толерантності [42]. Крім того, ці мікроорганізми часто є поліекстремофілами [38, 43].

Численні екосистеми на Землі піддаються впливу різних типів випромінювання, причому найекстремальніші дози випромінюються з техногенно забруднених радіоактивних місць. Рівні випромінювання варіюються від 0,5 Бк/кг у Великих озерах, США [44] до 109 Бк/кг на місці Ханфорд, Річленд, Вашингтон, США [45]. Крім того, випромінювання можна виявити в підземних середовищах внаслідок радіоактивного розпаду радіогенних ізотопів, таких як ²³⁸U, ²³²Th і ⁴⁰K, що також можуть бути відповідальні за виробництво радіолітичного водню [46], потенційно підтримуючи мікробну продуктивність *in situ*. Дійсно, гіпертермофільний і стійкий до радіації археон *Thermococcus gammatolerans* EJ3 був виділений із глибоководного гідротермального середовища, розташованого у східній частині Тихого океану, де природна радіоактивність включає ²¹⁰Pb, ²¹⁰Po та ²²²Rn [39]. Існує кілька ізольованих мікроорганізмів, які можуть

витримувати вплив екстремального випромінювання (kGy), включаючи космічні умови протягом сотень днів [41].

Ультрафіолетове випромінювання, ймовірно, впливало на еволюцію життя, особливо під час Архейського еону, коли озоновий шар ще не розвивався у верхніх шарах атмосфери через брак атмосферного O₂. У цей період також були інтервали, під час яких утворювався фотохімічно зумовлений органічний помутніння, що створювало захист від УФ-випромінювання [47]. Таким чином, найдавніші форми життя мусили би боротися з періодами інтенсивного ультрафіолетового випромінювання, поки кисневі фототрофи після Великої події окиснення (приблизно 2,8–2,4 Гр) не виробили достатню кількість O₂. Завдяки фотохімічним реакціям ультрафіолетового випромінювання з довжиною хвилі менше ніж 242 нм, можна було встановити захисний озоновий шар, запобігаючи проникненню значної кількості випромінювання короткої довжини хвилі (менше ніж 290 нм) на поверхню [48, 49]. Ймовірно, що мікроорганізми виробили необхідну стійкість до ультрафіолетового та іонізуючого випромінювання.

Дійсно, модельні моделювання демонструють, що діапазон довжин хвиль 200–300 нм був на кілька порядків вищим приблизно 4–3,5 мільярда років тому порівняно з нинішніми рівнями [50, 51], і, як згадувалося раніше, *T. gammatolerans* EJ3 був виділений із середовища з природною радіоактивністю [39]. Мікробні адаптації до випромінювання включають збільшену кількість копій геному для надмірності [52], зміни у функціях відновлення ДНК [42], конденсацію нуклеїду [52], використання менших амінокислот [53], накопичення Mn (II) [54], вироблення пігментів [55] та багато іншого, як описано в інших місцях [40, 52]. Ці адаптації помітні на всьому мікробному дереві життя; наприклад, два мутанти *Halobacterium sp.* NRC-1, які можуть переносити екстремальні рівні радіації (LD₅₀ > 11 кГр), мали підвищену регуляцію білкового комплексу, який бере участь у відновленні, реплікації та рекомбінації ДНК [56]. Цей комплекс тісно пов'язаний з археальними та еукаріотичними білками, відомими як RPA

(реплікаційний білок A), та з бактеріальним білком SSB (одноланцюговий ДНК-зв'язуючий білок). Незважаючи на те, що радіаційна стійкість спостерігалася в Археях, Бактеріях та Еукаріотах, походження та еволюція таких адаптацій до радіації ще не визначена.

Розділ 2

Методи

2.1 Відбір проб. Визначення властивостей субстрату

Всі етапи роботи, що передбачають наявність сертифікації на роботу з радіоактивними речовинами здійснювали виключно кваліфіковані співробітники Інституту проблем безпеки АЕС НАН. В середині об'єкту «Укриття» ЧАЕС є спеціально розроблений маршрут обходу для спостереження, отже, місця відбору мають бути суворо в межах траєкторії цього руху. Відбір здійснював працівник Інституту проблем безпеки АЕС НАН з відповідним рівнем доступу та кваліфікацією. Процедура передбачає суворе дотримання правил техніки безпеки, серед яких використання двох пар захисних гумових рукавиць з умовою зміни однієї пари після отримання проби з кожної локальної ділянки. Відбір зразків проводився в пластикові флакони за допомогою одноразових шпателів, вони розпаковувались з порушенням стерильності лише безпосередньо в момент відбору зразків.

Таким чином нам вдалось відібрати 8 зразків для подальшого виділення ДНК.

Таблиця 2.1 Точки відбору зразків

№	Назва зразка (варіанту)	Локалізація місця відбору зразків	Тип субстрату
1	К1 (Контроль 1)	Територія поблизу об'єкту «Укриття»	Пісок, пил, ґрунт
2	К2 (Контроль 2)	Під зведенням об'єкту «Укриття» зовні	Пісок, глина
3	Т1	Простір під реактором,	Пісок, бетон,

		місце нагромадження залишків паливних матеріалів у вигляді лави	бетонний пил
4	T2	Кут приміщення під реактором	Пісок, бетон, бетонний пил
5	T3	Початок шахти Ю-9-В	Бетонний пил, слиз
6	T4	Кут приміщення під реактором (стеля)	Іржа, пісок, слиз, конденсат
7	T5	Шахта КЗ-9-К СМР «Фініш»	Іржа, слиз, пісок, конденсат
8	T6	Дренажний відвід об'єкту «Укриття» ЧАЕС	Мул, пісок, вода

Як наведено в таблиці 2.1 або зображено на малюнку 1 ми маємо два контрольні варіанти та шість варіантів точок відбору з характеристикою їх локалізації та візуальною оцінкою субстрату.

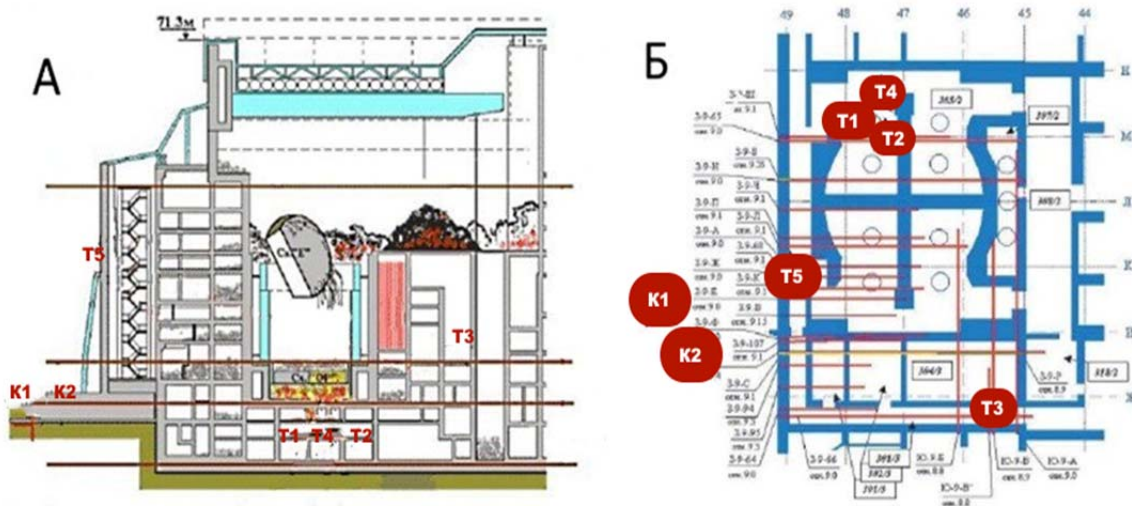


Рисунок 1. Схема розміщення точок відбору проб біля та в об'єкті «Укриття» ЧАЕС. А) бокова проекція, Б) вид зверху.

Вибір методів тестування був зумовлений обмеженим доступом до лабораторного обладнання, складністю його дезактивації та необхідністю скорочення часу обробки зразків для зменшення дози опромінення дослідників. Для хімічного аналізу використовували одноразову систему Hanna Express та тест-смужки індикатора для визначення рН.

Зразки субстрату розводили в стерилізованій очищеній воді (Milli-Q® Integral Water Purification System, Merck Millipore, Дармштадт, Німеччина) у співвідношенні 1:10. Після цього визначали рН та вміст хімічних елементів у отриманому розчині.

рН вимірювали за допомогою тест-смужок Tri-box рН 0,5–13,0 (Macherey-Nagel GmbH & Co., Дюрен, Німеччина) з роздільною здатністю 0,5.

Концентрацію фосфатів визначали за допомогою Low Range HI713 (Hanna Instruments, Род-Айленд, США) у діапазоні 0,00–2,50 мг/л з роздільною здатністю 0,04 мг/л та точністю 4%.

Концентрацію амонію вимірювали за допомогою Ammonia Medium Range Colorimeter HI715 (Hanna Instruments, Род-Айленд, США) у діапазоні 0,0–9,99 мг/л як $\text{NH}_3\text{-N}$ з роздільною здатністю 0,01 мг/л та точністю 5%.

Вміст заліза визначали методом колориметрії на приладі Colorimeter HI721 (Hanna Instruments, Род-Айленд, США) у діапазоні 0,00–5,0 мг/л з роздільною здатністю 0,01 мг/л та точністю 2%.

Питома активність ізотопів, що випромінюють гамма-промені у відібраних зразках визначалась датчиком HPGe (GC3020 з Multi Channel Analyzer Lynx sistem; Canberra, Meriden, USA). Перед аналізом проби були розведені поживним середовищем LB (Sigma-Aldrich) в 23 тисячі разів. Для аналізу отриманих піків в енергетичних спектрах було застосовано Genie2000. Розрахунок доз радіаційного опромінення бактерій обраховувалось ERICA dose assessment tool та Biota DC (фактор невизначеності 3%).

2.2 Виділення бактеріальної ДНК та аналіз нуклеотидної послідовності.

Метагеномну ДНК виділяли відповідно до рекомендацій виробника спеціалізованого набору PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, USA) [57]. Якісний та кількісний показники екстрагованої ДНК визначались за допомогою Qubit 2.0 Fluorimeter (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA). ДНК яке вдалось отримати було ліофільно висушено для транспортування. Отримані зразки ампліфікували використовуючи затравку для 16S р-РНК та визначали нуклеотидну послідовність методом секвенування високоваріабельних у різних видів бактерій ділянок V3-V4 за допомогою MiSeq Illumina (Illumina Inc., USA) в Research and Testing Laboratory (Техас, USA).

2.3 Біоінформатичні методи аналізу даних.

Після секвенування ампліконів ми отримали дані у форматі FastaQ, для подальшого аналізу зворотні зчитування не використовувались. Якість отриманих даних ми перевіряли за допомогою сервісу з відкритим вхідним кодом FastaQC. Наступним етапом ми застосували запатентовану послідовність дій (www.mrdnalab.com, MR DNA) спільно з біоінформатичним конвеєром QIIME з відкритим кодом (<http://qiime.org/>) [58].

Для передбачення функцій, що виконують мікроорганізми у ценозі ми застосовували алгоритм PICRUSt [59]. Він використовує базу даних, яка містить опис повногеномних збірок до генів, що дозволяє за допомогою

порівняння з референсними OUT визначати таксономічну належність 16S-рРНК та кількість копій гену в кожній пробі. Таким чином, можна оцінити присутність певних генів в метагеномі як в одному цілому організмі.

Розділ 3.

Експериментальна частина

3.1 Фізичні та хімічні характеристики внутрішнього середовища саркофагу ЧАЕС

Простір об'єкту укриття є досить різноманітним з точки зору фізичних показників та динаміки їх змін (див. таблицю 3.1), спільною рисою є дуже низький рівень освітленості, особливо після побудови захисного саркофагу. Що дуже зменшує ймовірність існування облігатно фототрофних мікроорганізмів.

Таблиця 3.1 Фізико-хімічні властивості середовища відбору зразків

Варіант відбору	рН Н ₂ О	Водневий показник,	Вміст рухомих сполук фосфору, мг/кг	Вміст рухомих сполук заліза, мг/кг	Вміст амонійного азоту, мг/кг	Значуща наявність органічних речовин	Середньодобова температура повітря в день відбору, °С
К1	8,0	-	-	6,0±0,2	-	-	5
К2	7,5	-	-	-	18,0±3,2	-	5
Т1	9,0	14,0±2,0	1,7±0,1	8,0±1,1	-	-	37
Т2	8,5	4,0±0,5	4,0±0,5	-	-	-	37
Т3	7,5	-	39,3±5,0	13,0±2,1	-	-	12
Т4	6,5	1,0±0,1	8,1±3,0	-	-	-	37
Т5	8,5	5,0±1,0	12,4±0,3	-	-	-	12
Т6	6,5	-	-	18,0±3,2	+	-	12
Оптимальні значення	6,5-7,5	15-20			10-20		37 (для мезофільних бактерії)

Аналізуючи дані наведені в таблиці 3.1 можна зробити висновки:

- водневий показник зразків відібраних в середині об'єкту «Укриття» ЧАЕС має лужну реакцію, а це свідчить про те, що основною формування субстрату був не ґрунт занесений з зони відчуження, адже дерново-підзолисті ґрунти мають кислу реакцію, а крихта бетону для якого характерна певна лужність [60];
- вміст амонійного азоту у варіантах Т1, Т3, Т6 та К2 є достатнім, хоча в інших варіантах взагалі не визначається, а вміст рухомих форм фосфору у всіх варіантах не досягає оптимальних значень, що може бути лімітуючим фактором популяції. Отже, середовище загалом варто характеризувати як бідне, а мікроорганізми які можуть в ньому жити - оліготрофами;
- наявність рухомих форм заліза може свідчити про активні процеси мікробної корозії металоконструкцій;
- наявність органічних речовин у варіанті Т6 дає нам підстави припустити, що в умовах не останньої освітленості є хемотрофами;
- в точках відбору Т1,Т2 та Т4 в період відбору проб середньодобова температура повітря становить 37 °С, а це значення є оптимальним для більшості мезофільних бактерій [61], тому такі умови варто оцінювати як дуже сприятливі, принаймні в цей період року (відбір відбувався у жовтні).

В контексті наших досліджень важливо правильно оцінити та інтерпретувати прижиттєву дозу на одну бактеріальну клітину як найбільш значущий показник оцінки впливу іонізуючого випромінення на живі об'єкти. Дозиметричний підхід, запропонований Міжнародною комісією з радіологічного захисту (ICRP) для охорони навколишнього середовища, було презентовано у публікації ICRP 108 [62]. З тих пір відбулися значні зміни та вдосконалення. Було створено та розроблено програмне забезпечення для обчислення дозових коефіцієнтів (ДК), яке описане в [63]. ДК для

зовнішнього опромінення наземної біоти були суттєво оновлені та розширені. Сучасні ДК охоплюють організми з масою тіла від 1 мг до 1000 кг на висотах від 0,1 до 500 м над землею для п'яти типів екосистем у ґрунті та повітрі. Текст надає рекомендації щодо розробки ДК шляхом інтерполяції опублікованих значень для життєвих стадій з масами від 1 мг до 1000 кг. Обчислювальна база даних перейшла від даних про викиди радіонуклідів у Публікації 38 (ICRP, 1983) до сучасних наборів даних у Публікації 107 (ICRP, 2008a). Поглинені фракції та постійні струми для фотонів та електронів було розширено до максимальної енергії 10 MeV для врахування характеристик радіонуклідів у новій базі даних. На основі цих даних було обчислено ДК для еталонних тварин і рослин (RAP). Хоча нові дані сумісні з попередніми, вони були перераховані з урахуванням сучасних даних про викиди радіонуклідів і представлені в новому форматі, що підкреслює міжвидові та міжресурсні варіації ДК, що полегшує інтерполяцію ДК для практичної оцінки дози. Програмний інструмент BiotaDC призначений для оцінки ДК для користувачами визначених типів біоти, які зазнають впливу будь-якого радіонукліду з поточної бази даних. Розрахунки проводилися для клітин вагою 1 мг кулястої форми (таблиця 3.2). За допомогою цих розрахунків було визначено потужність отриманої мікроорганізмами дози, а потім підраховано сумарні показники. Внутрішню дозу на бактеріальну клітину не враховували відповідно до раніше розроблених моделей [64].

Таблиця 3.2 Значення потужності доз субстрату

	ДК, мкГр/г на Бк/кг	Потужність дози відібраних субстратів, Гр/год					
		K1	K2	T1	T2	T3	T5
Ізотопи	Доза отримана поверхнею						
Церій-144*	$2,26 \times 10^{-4}$	-	-	585,34	598,9	203,4	275,72
Цезій-137	$3,38 \times 10^{-4}$	23,529	23,529	1,849	18,928	7,098	13,182
Рутеній-106*	$8,54 \times 10^{-4}$	-	-	2,408	31,854	7,942	47,824

Стронцій-90*	$5,09 \times 10^{-5}$	2,952	2,952	5,497	5,192	2,850	2,734
Плутоній-238*	$1,04 \times 10^{-5}$	-	-	0,0009	0,0009	0,0008	0,0005
Плутоній-239+240*	$9,94 \times 10^{-7}$	0,003	0,003	0,002	0,02	0,0004	0,0009
Америцій-241	$1,65 \times 10^{-5}$	-	-	0,005	0,008	0,004	0,002
Сумарна потужність дози, кГр/год		0,02	0,02	0,64	0,60	0,22	0,34

*-дані з бази Інституту проблем безпеки атомних електростанцій НАН та з відкритих джерел [65]

Відповідно до отриманих результатів, потужності доз знаходяться в широкому діапазоні. Максимальні показники характерні для зразків Т1 (найвища доза) та Т2 (висока доза) і складають відповідно 0,64 та 0,6 кГр/год. У варіанті Т1 не було виявлено достатніх для аналізу концентрацій ДНК (таблиця 3.3), тому в цій роботі будемо вважати зразок Т2 (висока доза) точкою з найвищим дозовим навантаженням, тоді як зразки К1 та К2, відібрані зовні, були вірно обрані як контрольний варіант (контроль).

Середня тривалість життя однієї бактеріальної клітини складає орієнтовно 20 хв. Виходячи з цих даних, було розраховано прижиттєву поглинуту дозу на бактеріальну клітину.

Таблиця 3.3 Середні значення дозового навантаження на одну бактерію

Зразок	Потужність дози, Гр/год	Доза на клітину, Гр
К1	30	8,8
К2	30	8,8
Т1	640	-
Т2	650	218,3
Т3	220	73,8
Т4	600	-

T5	340	113,2
----	-----	-------

Результати наведені в таблиці 3.3 свідчать, що найбільшу прижиттєву дозу отримують бактеріальні клітини, відібрані в точці T2, що варто вважати високою дозою. Найменшу дозу, або таку, яку можна вважати за умовний контроль, отримують клітини з точок K1 та K2, які були відібрані зовні об'єкта «Укриття» ЧАЕС.

Отже, резюмуємо: потужність поглинутої дози іонізуючого випромінювання в досліджених приміщеннях об'єкту «Укриття» ЧАЕС варіює в межах 220 - 650 Гр/год, що формує поглинуті дози на одну клітину в межах 73,8 - 218,3 Гр. Вміст поживних речовин неодноманітний і може характеризуватися як бідний, але температурний режим сприятливий для колонізації поверхонь мікроорганізмами.

3.2 Аналіз виділеної ДНК

Згідно з отриманими результатами, ДНК було виявлено у шести пробах, за винятком зразків T1 та T4, що дозволяє стверджувати про наявність живих організмів всередині об'єкту «Укриття» ЧАЕС. Відомо, що високі дози радіації призводять до стерилізації субстрату, тому відсутність (або низька концентрація) ДНК може бути пов'язана з руйнуванням клітин через високі поглинуті дози. Наприклад, для субстрату з точки відбору T1 максимальна розрахункова потужність поглинутої дози складає 600 Гр/год. Тому для подальшої роботи ми використали шість зразків, у яких ДНК була присутня в достатній для подальшого аналізу концентрації (Таблиця 3.4).

Таблиця 3.4 Концентрація виділеної ДНК.

Зразок	Концентрація ДНК, нг/мл
--------	-------------------------

K1	$9,68 \times 10^2$
K2	$7,48 \times 10^3$
T1	-
T2	$7,18 \times 10^2$
T3	$2,58 \times 10^3$
T4	-
T5	$8,04 \times 10^2$
T6	$1,07 \times 10^3$

3.3 Біорізноманіття колонізуючих субстрат мікроорганізмів.

Відповідно до загальноприйнятої методології метагеномних досліджень та, враховуючи гетерогенність отриманих зразків, першочергово було перевірено якість даних секвенування за допомогою програмного пакету FastQC.

Наприкінці секвенування якість всіх зчитувань залишалась стабільною, коливаючись у межах від 10 до 30 за шкалою Phred, що вказує на достатню якість і відсутність потреби в додатковій фільтрації. Після фільтрації та обробки даних за допомогою скрипта quality filtering всі отримані зразки були придатними для подальшого аналізу та дослідження біорізноманіття.

Технологія секвенування нового покоління для таксономічної ідентифікації за кодонами 16S-rРНК має значні переваги, але й суттєві обмеження. Метод ґрунтується на виділенні та ідентифікації ділянки геному, відповідальної за кодування білків великої субодиниці рибосоми, з подальшим порівнянням отриманих послідовностей з базою даних. У нашій роботі використовувалася найбільша бактеріальна база даних GreenGenes [66-68]. Для ефективного порівняння база даних повинна містити всю

необхідну інформацію. Вчені з усього світу розшифровують геноми мікроорганізмів, виділяють їх у чисті культури та завантажують дані в бази даних. Поширені бактерії та важливі для індустрії мікроорганізми давно мають розшифровані геноми. Проте екстремофіли, рідкісні мікроорганізми, а бактерії з особливими вимогами до субстратів не виділені в чисту культуру і як наслідок рідко відображаються в базах. Ще велика частка мікроорганізмів є неідентифікованою [69] і після порівняння з базами даних позначаються як "інші види".

Для проаналізованих нами зразків блочних субстратів відсоток неідентифікованих мікроорганізмів на рівні Порядку коливався від 11% для зразка К1 до 3% для зразка Т6, це можна пояснити тим, що бактерії для яких притаманне водне середовище більш досліджені на відміну від колонізаторів менш зволжених поверхонь.

Таблиця 3.5 Обмеження методу визначення біорізноманіття в зразках субстрату

Кількість	К1	К2	Т2	Т3	Т5	Т6
Загальна OTU	417	334	129	180	62	269
Визначено на рівні Порядок	373	309	120	165	59	260
Визначено на рівні Вид	181	164	77	94	37	168
Інші OTU	44	25	9	15	3	9

Водночас, при ідентифікації до рівня виду, точність значно знижується. Найбільшу кількість мікроорганізмів було ідентифіковано в умовно контрольних точках з низькою поглинутою дозою: К1 (контроль), К2 (контроль) та Т6 (дуже вологий зразок) (таблиця). Це свідчить про присутність звичайних, не екстремофільних мікроорганізмів, дослідження яких ведеться по всьому світу, і, відповідно, їхні геноми присутні в базах даних.

Проте, аналізуючи бактеріальне різноманіття субстратів, важливо пам'ятати про обмеження, які супроводжують використання технології секвенування наступного покоління. Це не зменшує значущості, репрезентативності та інформативності отриманих даних.

Біорізноманіття екосистеми визначається як повна генетична сукупність певного середовища, яка включає всі види, що в ньому мешкають. Для збору назв видів, описів, ареалів поширення та генетичної інформації використовуються бази даних. Спеціалізоване програмне забезпечення допомагає шукати, візуалізувати й аналізувати цю інформацію, а також робити її доступною для інших. Комп'ютерні моделювання дозволяють досліджувати динаміку популяцій або оцінювати загальне генетичне здоров'я культур в агрономії. Важливим потенціалом цієї галузі є аналіз послідовностей ДНК або повних геномів вимираючих видів, що дозволяє зберегти результати природних генетичних експериментів і, можливо, використовувати їх у майбутньому навіть після вимирання цих видів.

Результати проведених аналізів надали файли з базою даних щодо загального біорізноманіття ґрунтової мікрофлори. Для зручного відображення результати було проаналізовано, біорізноманіття та представлене у вигляді колових діаграм (рисунок 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5).

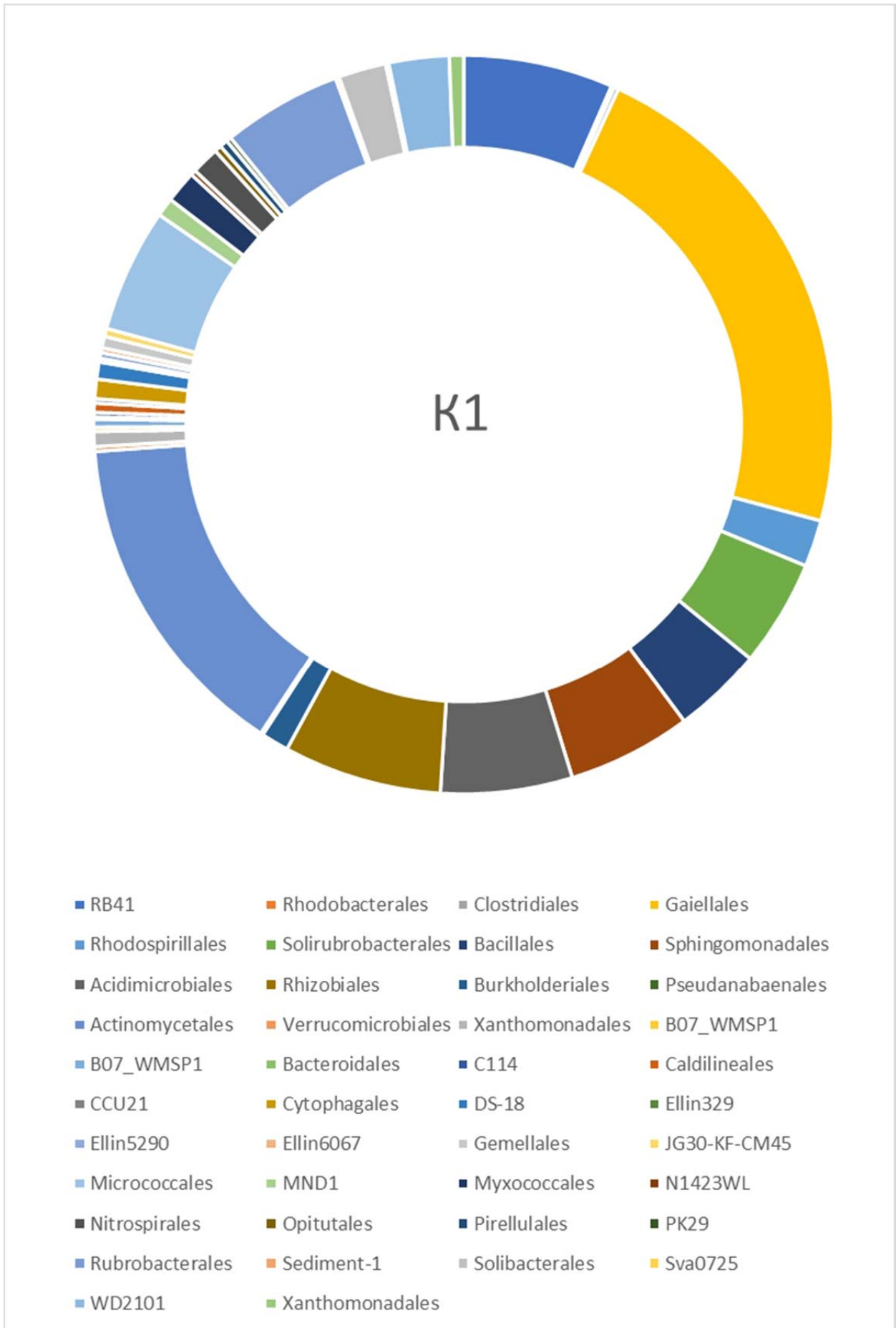


Рисунок 3.1 Видове різноманіття точки відбору K1

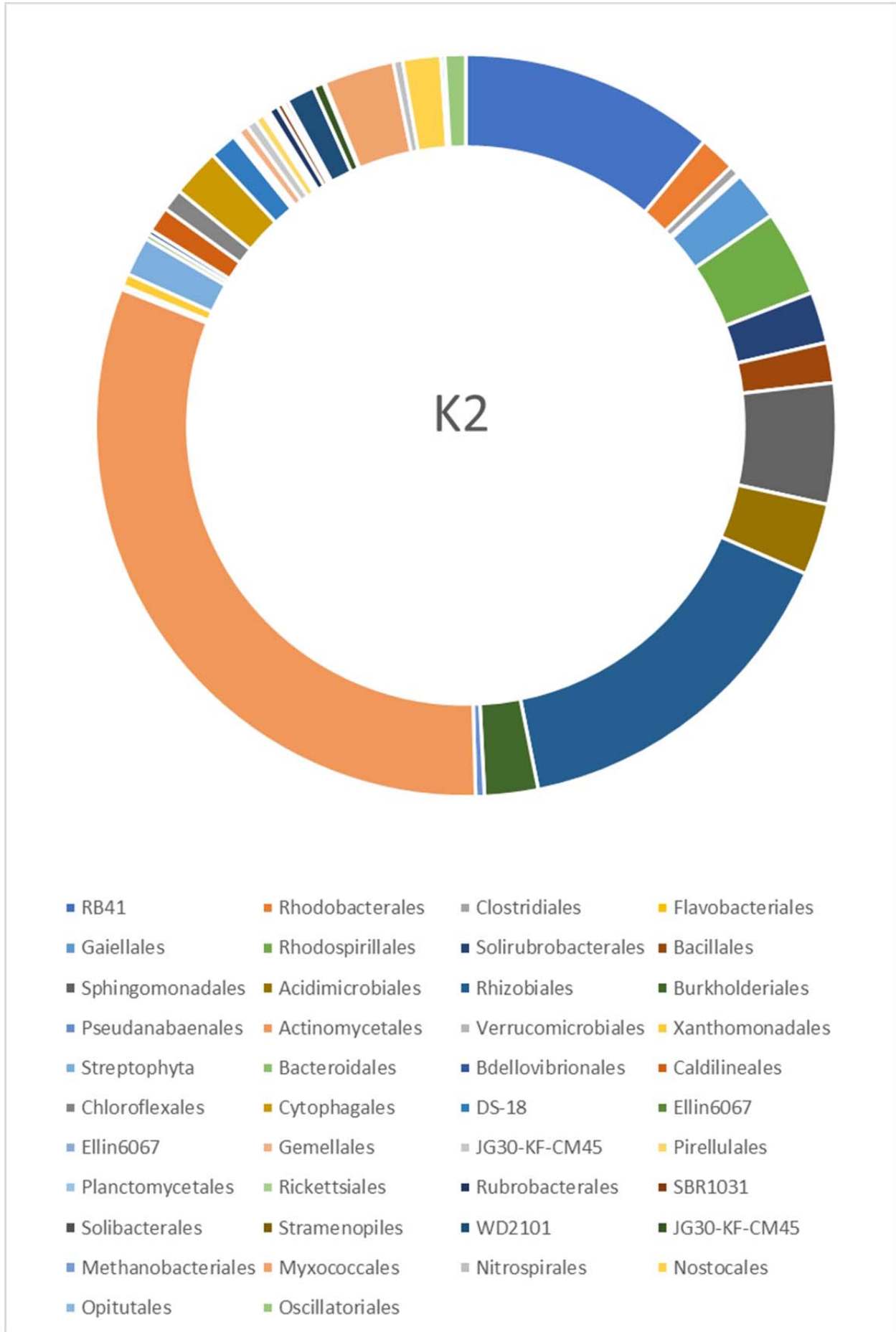


Рисунок 3.2 Видове різноманіття точки відбору K2

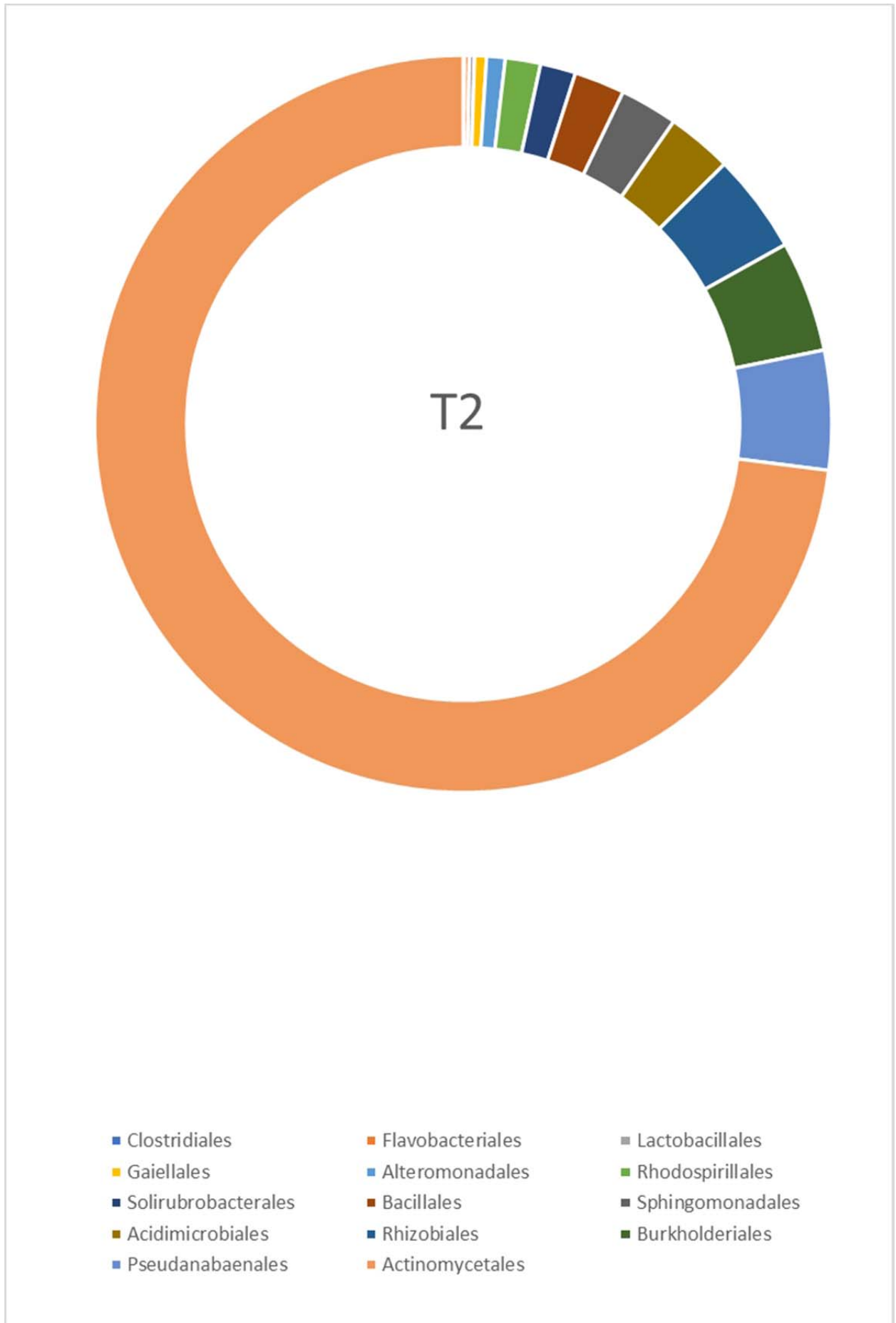


Рисунок 3.3 Видове різноманіття точки відбору T2

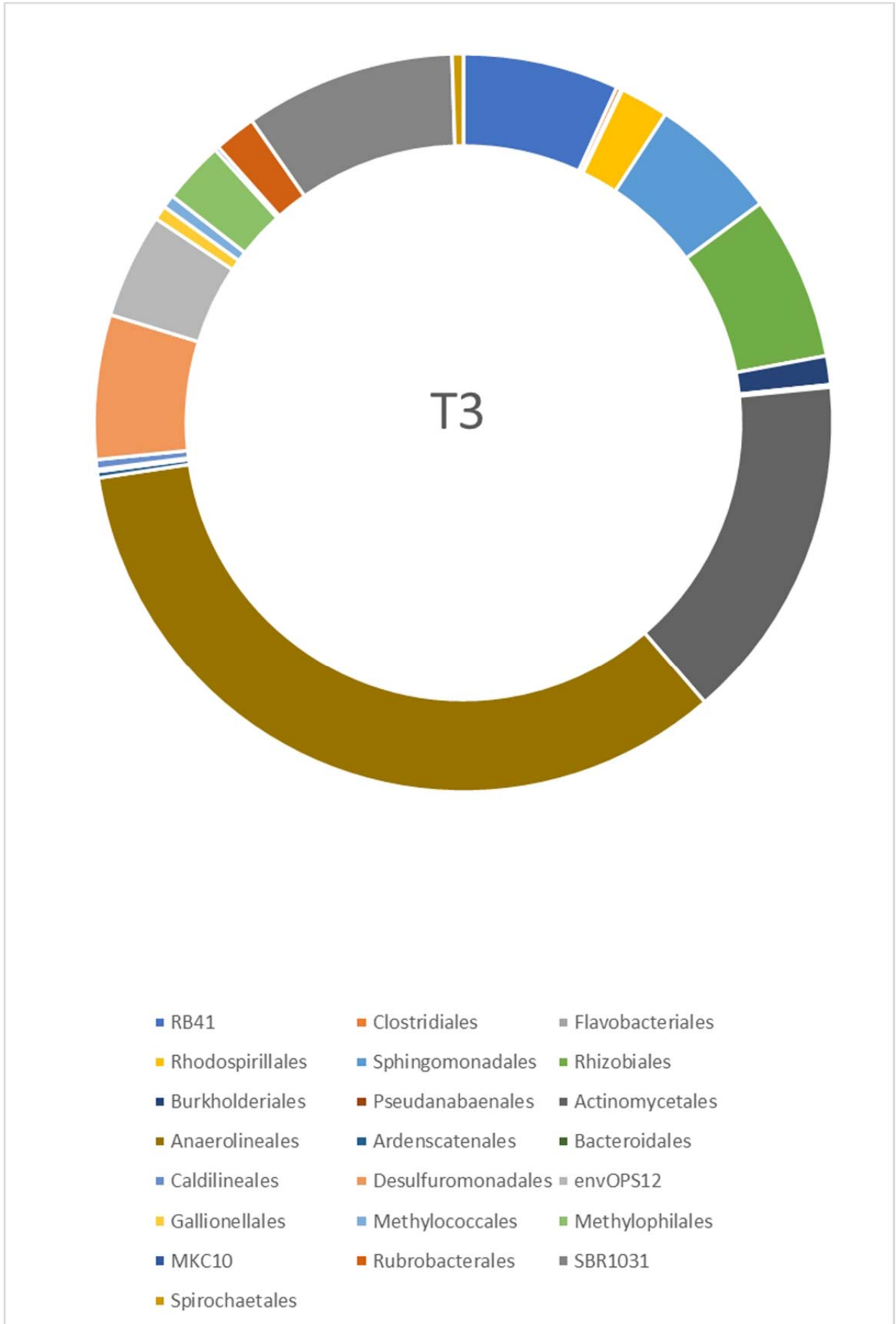


Рисунок 3.4 Видове різноманіття точки відбору T3

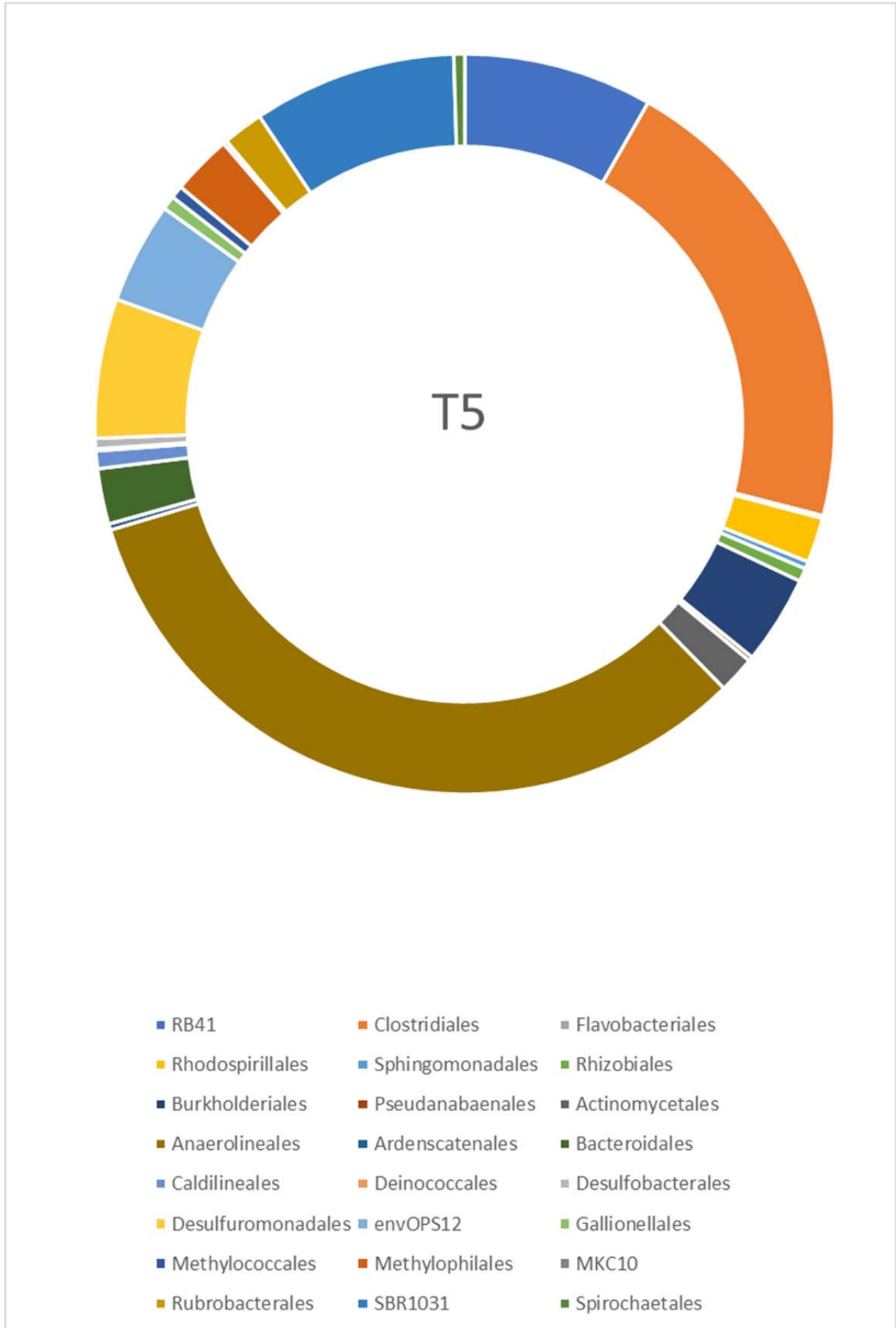


Рисунок 3.5 Видове різноманіття точки відбору T5

Інтерес до мікрофлори компонентів ядерного паливного циклу виник давно, але лише нещодавно промислове використання бактерій як агентів ремедіації стало реальністю. Більшість дослідницьких груп зосереджено на аналізі мікробних угруповань басейнів витримки ядерного палива – як найбільш доступних середовищ для мікроорганізмів. Дослідження проводилися в таких місцях, як сховища АЕС Кофрентес (Валенсія, Іспанія) [22], Селафілд [23], АЕС Медрас (Калпаккам, Індія) [24, 25], Саванна-Ривер (США) [26], АЕС Богуніце (Словаччина) [27]. Дослідники виділяли культури мікроорганізмів із колись чистої води у сховищах, здатних формувати біоплівки на сталевих поверхнях. Деякі з цих культур [23, 27] демонструють здатність акумулювати радіоактивні цезій і кобальт з водних розчинів. Важливо, що визначені мікроорганізми не належать до конкретного виду чи сімейства. Наприклад, у Селафілді Cs-акумулюючі культури належать до виду *Serratia*, а в Богуніце – до *Micrococcus*, *Kocuria* і *Pseudomonas*, що свідчить про здатність бактеріальних штамів адаптуватися до умов навколишнього середовища, розвиваючи необхідні здатності. У проаналізованих нами зразках присутні представники *Micrococcus* (К1, К2 – контроль, Т2 – басейн-барботер, Т6 – вихід дренажної труби) та *Pseudomonas* (усі, окрім Т3).

У всіх зразках, відібраних всередині об'єкту «Укриття», спостерігається наявність рухомих сполук заліза, що свідчить про корозію металевих конструкцій. Бактерії-хемотрофи, які безпосередньо беруть участь у цьому процесі, називаються сульфатредуючими. Найвідоміші представники цієї фізіологічної групи мають назви роду, що починаються на «Desulf», щоб підкреслити їх властивості. Ми можемо спостерігати, що у всіх зразках субстрату, де є йони заліза, присутні представники сульфатредуючих бактерій (*Desulfobacterales*, *Desulfuromonadales*) [70]. Таким чином, ми можемо стверджувати, що це саме біокорозія металів, а

металеві конструкції реактора є субстратом для цих мікроорганізмів у відповідних точках відбору.

Отже, в об'єкті «Укриття» ЧАЕС зустрічаються представники роду *Micrococcus*, для яких характерна висока радіаційна резистентність. Однак про більшість представників мікробіоти немає згадок у літературі щодо таких властивостей, тому ми можемо вважати, що вони набули їх в умовах існування в даному середовищі.

3.4 Функції мікробіому

Для прогнозування функцій бактерій у досліджених мікробіомах було використано алгоритм PICRUSt [71]. Цей алгоритм порівнює еталонні оперативні таксономічні одиниці (OTU) з бібліотекою генів 16S рРНК, щоб визначити передбачувану таксономічну належність та кількість копій генів для кожної групи. Частота кожного OTU ділиться на передбачувану кількість копій, потім множиться на кількість копій генів, даючи прогноз щодо внеску кожного OTU у загальний вміст генів у зразку (метагеном). Потім ці внески підсумовуються, щоб отримати оцінку генів у метагеномі.

Точність прогнозування геному було перевірено розробниками [71,72] за допомогою наборів даних, де один і той самий біологічний зразок піддавався ампліфікації гена 16S рРНК та повного метагеному. Результати секвенування повних метагеномів вважалися репрезентацією "справжньої" спільноти, тоді як бібліотеки ампліконів гена 16S рРНК вводилися в PICRUSt для прогнозування цих даних. Тестові набори включали зразки мікробіомів людини з проекту Human Microbiome Project [73], зразки ґрунту та різноманітні зразки ссавців.

Для візуалізації отриманих даних було побудовано хітмеп, який відображає всі передбачені функції. Функції були згруповані за категоріями,

запропонованими [74], і обчислено внесок кожної групи до загального метаболічного потенціалу, який було прийнято за одиницю (таблиця 3.6).

Таблиця 3.6 Відносний розподіл функцій мікробіомів з відібраних зразків

Функції	K1	K2	T2	T3	T5	T6
Метаболізм вуглеводів та ліпідів	0,12	0,12	0,1	0,11	0,11	0,12
Енергетичний обмін	0,12	0,12	0,1	0,12	0,12	0,12
Механізми обміну інформацією з навколишнім середовищем	0,23	0,23	0,3	0,26	0,26	0,24
Механізми реагування на екстремальні умови навколишнього середовища	0,04	0,04	0,08	0,03	0,04	0,05
Обробка генетичної інформації	0,17	0,17	0,12	0,17	0,16	0,16
Обмін нуклеїнових та амінокислот	0,24	0,24	0,25	0,23	0,23	0,24
Інвазійні механізми, характерні для патогенної мікрофлори	0,01	0,01	0	0,01	0,02	0,01

Невідома функція	0,07	0,07	0,5	0,07	0,07	0,07
------------------	------	------	-----	------	------	------

Згідно з отриманими результатами, частка функцій, які не були розпізнані алгоритмом, залишалася приблизно стабільною і складала 0,07 від загальної кількості функцій. Проте, спостерігалось різке зростання функцій, пов'язаних з механізмами реагування на екстремальні умови (0,08 порівняно з середнім показником 0,03-0,04 для інших зразків) та обміну нуклеїновими кислотами (0,25 порівняно з 0,23-0,24 для інших зразків) у зразку з найвищою потужністю поглинутої дози T2. Також спостерігалася супресія генів, відповідальних за функції інвазійних механізмів патогенних мікроорганізмів та обробки генетичної інформації.

Висновки

1. Потужність поглинутої дози іонізуючого випромінювання в досліджених приміщеннях об'єкту «Укриття» ЧАЕС варіює в межах 220 - 650 Гр/год, що формує поглинуті дози на одну клітину в межах 73,8 - 218,3 Гр. Вміст поживних речовин неодноманітний і може характеризуватися як бідний, але температурний режим сприятливий для колонізації поверхонь мікроорганізмами.
2. Кореляції між окремими умовами середовища та кількістю виділеної ДНК не виявлено. Такий ефект може бути пояснений, тим що можливість колонізації субстрату визначається сумарним впливом чинників, а не окремими фізико-хімічними характеристиками самотійно.
3. Загальна таксономічна характеристика зразків відібраних з приміщень об'єкту «Укриття» ЧАЕС свідчить про високу субстратоспецифічність сформованих мікробіомів.
4. В об'єкті «Укриття» ЧАЕС зустрічаються представники роду *Micrococcus*, для яких характерна висока радіаційна резистентність, але про більшість представників мікробіоти немає згадок в літературі щодо таких властивостей, отже, ми можемо вважати їх набутими в умовах існування в даному середовищі. У варіанті з максимальною потужністю дози радіації спостерігається збільшення функції мікробіоти для реагування на екстремальні умови, механізми обміну інформацією та обміну нуклеїнових кислот.

Список використаних джерел

1. Imanaka, T., Hayashi, G. and Endo, S. (2015) ‘Comparison of the accident process, radioactivity release and ground contamination between Chernobyl and Fukushima-1’, *Journal of Radiation Research*, 56(suppl 1), pp. i56–i61. doi:10.1093/jrr/rrv074.
2. ‘Transcriptome of the *Arabidopsis thaliana* Chernobyl ecotype seedlings: Simulating of the space radiation action and microgravity’ (2021) *Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (PlantGen2021)*. doi: 10.18699/plantgen2021-090.
3. Kashparov, V. ., Lundin, S. ., Zvarych, S. ., та ін. Territory contamination with the radionuclides representing the fuel component of Chernobyl fallout. *Science of The Total Environment*. 2003. Vol. 317, No. 1. С. 105–119.
4. Григор’єва, Л. В., Корчак, Г. И., Єрусалимска Л. Ф., Б. Т. І. Вплив різних рівнів радіаційного забруднення ґрунту на індикаторні та патогенні мікроорганізми. *Довкілля та здоров’я*. 1999. No. 1. С. 53–56.
5. Alexakhin, R., Ansbaugh, L., Balonov, M., та ін. Environmental consequences of the Chernobyl accident and their remediation: Twenty years of experience. Report of the Chernobyl Forum Expert group “Environment” / Vienna: International Atomic Energy Agency, 2006.
6. Buldakov, L. A., Gus’kova, A. K. 15 years after the accident at the Chernobyl Nuclear Power Plant. *Radiatsionnaia biologiiia, radioecologiiia*. 1997. Vol. 42, No. 2. С. 228–33.
7. Гудков, І. М., Вінничук, М. М. Сільськогосподарська радіобіологія: Житомир: ДАУ, 2003. 472с.
8. DUGGAN, D.E. et al. (1959) ‘Ultraviolet exposure studies on a gamma radiation resistant *Micrococcus* isolated from fooda,b,c,’ *Journal of Food Science*, 24(4), pp. 376–382. doi:10.1111/j.1365-2621.1959.tb17287.x.

9. Mattimore, V. and Battista, J.R. (1996) 'Radioresistance of *Deinococcus Radiodurans*: Functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation', *Journal of Bacteriology*, 178(3), pp. 633–637. doi:10.1128/jb.178.3.633-637.1996.
10. Nie, X. et al. (2021) 'Bonding behavior and mechanism of U(VI) by chemically modified *Deinococcus Radiodurans*', *Minerals*, 11(10), p. 1108. doi:10.3390/min11101108.
11. Sar, P. et al. (2007) 'Molecular assessment of microbial diversity and community structure at uranium mines of Jaduguda, India', *Advanced Materials Research*, 20–21, pp. 413–416. doi:10.4028/www.scientific.net/amr.20-21.413.
12. Saito, T., Terato, H., Yamamoto, O. Pigments of *Rubrobacter radiotolerans*. *Archives of Microbiology*. 1994. Vol. 162, No. 6. C. 414–42.
13. Yoshinaka, T., Yano, K., Yamaguchi, H. Isolation of Highly Radioresistant Bacterium, *Arthrobacter radiotolerans* nov. sp. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1973. Vol. 37, No. 10. C. 2269–2275.
14. Shahmohammadi, H. R., Asgarani, E., Terato, H., та ін. Effects of ^{60}Co gamma-rays, ultraviolet light, and mitomycin C on *Halobacterium salinarium* and *Thiobacillus intermedius*. *Journal of radiation research*. 1997. Vol. 38, No. 1. C. 37–43.
15. Roger, A. S., Wolfram, S., Graham, C. W., та ін. *DNA Repair and Mutagenesis*, Second Edition: American Society of Microbiology, 2006.
16. White, O., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., та ін. Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science (New York, N.Y.)*. 1999. Vol. 286, No. 5444. C. 1571–7.
17. Merino, N., Aronson, H. S., Bojanova, D. P., та ін. *Living at the extremes: Extremophiles and the limits of life in a planetary context*. *Frontiers in Microbiology*. 2019. Vol. 10, No. MAR. C. 780.

18. Тугай, Т. І., Тугай, А. В., Желтоножська, М. В., та ін. Закономірності впливу низьких доз опромінення на мікроскопічні гриби. *Ядерна фізика та енергетика*. 2012. No. 13, № 4. С. 396–402.
19. Тугай, Т. И., Жданова, Н. Н., Желтоножский, В. А., та ін. Ответные реакции грибов, выделенных из различных по уровню радиоактивного загрязнения помещений объекта "Укрытие", на действие ионизирующего излучения. *Збірник наукових праць інститут ядерних досліджень*. 2005. С. 128–136.
20. Dighton, J., Tugay, T., Zhdanova, N. Fungi and ionizing radiation from radionuclides. *FEMS Microbiology Letters*. 2008. Vol. 281, No. 2. С. 109–120.
21. Merino, N., Aronson, H. S., Bojanova, D. P., та ін. Living at the extremes: Extremophiles and the limits of life in a planetary context. *Frontiers in Microbiology*. 2019. Vol. 10, No. MAR. С. 780.
22. Chicote, E., García, A. M., Moreno, D. A., та ін. Isolation and identification of bacteria from spent nuclear fuel pools. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2005. Vol. 32, No. 4. С. 155–162.
23. Dekker, L., Osborne, T. H., Santini, J. M. Isolation and identification of cobalt- and caesium-resistant bacteria from a nuclear fuel storage pond / Blackwell Publishing Ltd, 2014. 81–84 p.
24. Karley, D., Shukla, S. K., Rao, T. S. Microbiota of spent nuclear fuel pool water with emphasis on their biofilm forming ability on stainless steel (SS-304L). *Journal of biosciences*. 2019. Vol. 44, No. 5. С. 1–9.
25. Karley, D., Shukla, S. K., Rao, T. S. Isolation and characterization of culturable bacteria present in the spent nuclear fuel pool water. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018. Vol. 25, No. 21. С. 20518–20526.
26. Santo Domingo, J. W., Berry, C. J., Summer, M., та ін. Microbiology of spent nuclear fuel storage basins. *Current Microbiology*. 1998. Vol. 37, No. 6. С. 387–394.

27. Tišáková, L., Pipiška, M., Godány, A., та ін. Bioaccumulation of ^{137}Cs and ^{60}Co by bacteria isolated from spent nuclear fuel pools. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2013. Vol. 295, No. 1. C. 737–748.
28. Boretska, M. O., Kozlova, I. A. Biofilms on a metal surface as microbial corrosion factor. *Microbiol. Zurn*. 2010. Vol. 72, No. 4. C. 50–63.
29. Lee, A. K., Newman, D. K. Microbial iron respiration: impacts on corrosion processes. *Applied microbiology and biotechnology*. 2003. Vol. 62, No. 2–3. C. 134–9.
30. Liengen, T., Basseguy, R., Feron, D., та ін. *Understanding Biocorrosion: Fundamentals and Applications*: 2014. 447с.
31. Rendon Diaz Miron, L. E., Lara Magaña, M. E., Lara, M. R. *Microorganisms Concrete Interactions*. *MRS Proceedings*. 2015. Vol. 1768. C. imrc2014-6d – 006.
32. Kopteva, Z. P., Zanina, V. V., Kozlova, I. A. Microbial Corrosion of Protective Coatings. *Surface Engineering*. 2005. Vol. 20, No. 4. C. 275–280.
33. Anderson, A. W., Nordan, H. C., Cain, R. F., та ін. Studies on a radio-resistant micrococcus. I. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. *Food Technol*. 1956. Vol. 10, No. 1. C. 575–577.
34. Davis, N. S., Silverman, G. J., Msurovsky, E. B. Radiation-resistant, pigmented coccus isolated from haddock tissue. *Journal of bacteriology*. 1963. Vol. 86. C. 294–8.
35. Ragon, M., Restoux, G., Moreira, D., та ін. Sunlight-exposed biofilm microbial communities are naturally resistant to chernobyl ionizing-radiation levels. *PloS one*. 2011. Vol. 6, No. 7. C. e21764.
36. Zavilgelsky, G. B., Abilev, S. K., Sukhodolets, V. V., та ін. Isolation and analysis of UV and radio-resistant bacteria from Chernobyl. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*. 1998. Vol. 43, No. 2. C. 152–7.

37. Luo, C., Rodriguez-R, L. M., Johnston, E. R., та ін. Soil microbial community responses to a decade of warming as revealed by comparative metagenomics. *Applied and environmental microbiology*. 2014. Vol. 80, No. 5. C. 1777–86.
38. Webb, K. M., DiRuggiero, J. *Radiation Resistance in Extremophiles: Fending Off Multiple Attacks*: Springer, Dordrecht, 2013.
39. Jolivet, E., L'Haridon, S., Corre, E., та ін. *Thermococcus gammatolerans* sp. nov., a hyperthermophilic archeon from a deep-sea hydrothermal vent that resists ionizing radiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003. Vol. 53, No. 3. C. 847–851.
40. Rainey, F. A., Ray, K., Ferreira, M., та ін. 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*. 2005. Vol. 71, No. 9. C. 5225–5235.
41. Duc, M. T. La, Benardini, J. N., Kempf, M. J., та ін. Microbial diversity of indian ocean hydrothermal vent plumes: Microbes tolerant of desiccation, peroxide exposure, and ultraviolet and γ -irradiation. *Astrobiology*. 2007. Vol. 7, No. 2. C. 416–431.
42. Krisko, A., Radman, M. *Biology of extreme radiation resistance: The way of Deinococcus radiodurans*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013. Vol. 5, No. 7.
43. Fredrickson, J. K., Li, S. M. W., Gaidamakova, E. K., та ін. Protein oxidation: Key to bacterial desiccation resistance? *ISME Journal*. 2008. Vol. 2, No. 4. C. 393–403.
44. Trapeznikov, A. *ENVIRONMENTAL RADIOACTIVITY IN CANADA / 1983*.
45. Fredrickson, J. K., Li, S. M. W., Gaidamakova, E. K., та ін. Protein oxidation: Key to bacterial desiccation resistance? *ISME Journal*. 2008. Vol. 2, No. 4. C. 393–403.

46. Dzaugis, M., Spivack, A. J., D'Hondt, S. Radiolytic H₂ production in martian environments. *Astrobiology*. 2018. Vol. 18, No. 9. C. 1137–1146.
47. Arney, G., Domagal-Goldman, S. D., Meadows, V. S., та ін. The Pale Orange Dot: The Spectrum and Habitability of Hazy Archean Earth. *Astrobiology*. 2016. Vol. 16, No. 11. C. 873–899.
48. Caldwell, M. M., Teramura, A. H., Tevini, M. The changing solar ultraviolet climate and the ecological consequences for higher plants. *Trends in Ecology and Evolution*. 1989. Vol. 4, No. 12. C. 363–367.
49. Phoenix, V. R., Bennett, P. C., Engel, A. S., та ін. Chilean high-altitude hot-spring sinters: A model system for UV screening mechanisms by early Precambrian cyanobacteria. *Geobiology*. 2006. Vol. 4, No. 1. C. 15–28.
50. Cnossen, I., Sanz-Forcada, J., Favata, F., та ін. 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*. 2007. Vol. 112, No. 2. C. 2008.
51. Cockell, C. S., Raven, J. A. Ozone and life on the Archaean Earth. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 2007. Vol. 365, No. 1856. C. 1889–1901.
52. Anitori, R. P. *Extremophiles: Microbiology and Biotechnology*: Poole: Caister Academic Press., 2012. 358c.
53. Sghaier, H., Thorvaldsen, S., Saied, N. M. There are more small amino acids and fewer aromatic rings in proteins of ionizing radiation-resistant bacteria. *Annals of Microbiology*. 2013. Vol. 63, No. 4. C. 1483–1491.
54. Daly, M. J., Gaidamakova, E. K., Matrosova, V. Y., та ін. Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. *Science*. 2004. Vol. 306, No. 5698. C. 1025–1028.
55. Mojib, N., Farhoomand, A., Andersen, D. T., та ін. UV and cold tolerance of a pigment-producing Antarctic *Janthinobacterium* sp. Ant5-2. *Extremophiles*. 2013. Vol. 17, No. 3. C. 367–378.
56. DeVeaux, L. C., Müller, J. A., Smith, J., та ін. Extremely radiation-resistant mutants of a halophilic archaeon with increased single-stranded DNA-

- binding protein (RPA) gene expression. *Radiation Research*. 2007. Vol. 168, No. 4. С. 507–514.
57. Григор'єва, Л. В., Корчак, Г. И., Єрусалимска Л. Ф., Б. Т. І. Вплив різних рівнів радіаційного забруднення ґрунту на індикаторні та патогенні мікроорганізми. *Довкілля та здоров'я*. 1999. No. 1. С. 53–56.
 58. Kashparov, V. A., Lundin, S. M., Khomutinin, Y. V., та ін. Radioactive contamination of 30-km zone of ChNPP / Ukrainian Institute of Agricultural Radiology (UIAR), 2001.
 59. Langille, M. G. I. M., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., та ін. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature biotechnology*. 2013. Vol. 31, No. 9. С. 814–21.
 60. Stegemann, J. ., Buenfeld, N. . Prediction of leachate pH for cement paste containing pure metal compounds. *Journal of Hazardous Materials*. 2002. Vol. 90, No. 2. С. 169–188.
 61. Mira, P. et al. (2022) 'Evolution of antibiotic resistance impacts optimal temperature and growth rate in escherichia coli and Staphylococcus epidermidis', *Journal of Applied Microbiology*, 133(4), pp. 2655–2667. doi:10.1111/jam.15736.
 62. IAEA. Modelling Radiation Exposure and Radionuclide Transfer for Non-human Species Report of the Biota Working Group of EMRAS Theme 3 Environmental Modelling for Radiation Safety (EMRAS) Programme / Vienna: 2008.
 63. Ulanovsky, A., Copplestone, D., Vives i Batlle, J. Dose coefficients for nonhuman biota environmentally exposed to radiation. ICRP Publication 136. *Ann. ICRP* / 2017.
 64. Goossens, O., Vanhavere, F., Leys, N., та ін. Radiation dosimetry for microbial experiments in the International Space Station using different etched track and luminescent detectors. *Radiation Protection Dosimetry*. 2006. Vol. 120, No. 1–4. С. 433–437.

65. Краснов, В. О., Носовський, А. В., Рудько, В. М., та ін. Об'єкт “Укриття”: 30 років після аварії. Монографія: Чорнобиль: НАН України, Ін-т проблем безпеки АЕС, 2016. 512с.
66. DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., та ін. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006. Vol. 72, No. 7. С. 5069–5072.
67. Balvočiute, M., Huson, D. H. SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT - how do these taxonomies compare? *BMC Genomics*. 2017. Vol. 18, No. 2. С. 114.
68. McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., та ін. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME Journal*. 2012. Vol. 6, No. 3. С. 610–618.
69. Sysoev, M., Grötzinger, S. W., Renn, D., та ін. Bioprospecting of Novel Extremozymes From Prokaryotes—The Advent of Culture-Independent Methods / *Frontiers Media S.A.*, 2021. 196 p.
70. Guan, F. et al. (2016) ‘Influence of sulfate-reducing bacteria on the corrosion behavior of high strength steel EQ70 under Cathodic polarization’, *PLOS ONE*, 11(9). doi:10.1371/journal.pone.0162315.
71. Abubucker, S., Segata, N., Goll, J., та ін. Metabolic reconstruction for metagenomic data and its application to the human microbiome. *PLoS Computational Biology*. 2012. Vol. 8, No. 6. С. e1002358.
72. Edgar, R. C. Accuracy of microbial community diversity estimated by closed- and open-reference OTUs. *PeerJ*. 2017. Vol. 2017, No. 10. С. e3889.