

**Государственное бюджетное общеобразовательное учреждение города
Москвы «Школа №962»**

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБИОТЫ ОБЩЕСТВЕННОГО ТРАНСПОРТА

Ученица 10 «Б» класса школы №962,

Бакланова Вера Владимировна.

Руководители работы: преподаватель

биологии в школе №962,

Утюж Галина Александровна;

преподаватель химии в школе №962,

Белодед Ирина Васильевна.

Консультант работы: сотрудник института
биоорганической химии им. Академиков М.М.

Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, к.б.н.

Лукьянова Анна Александровна.

г. Москва, 2023 год.

Оглавление

1. Введение	3
1.1. Цель работы	5
1.2. Задачи работы	5
1.3. Гипотеза	6
2. Материалы и методы	7
2.1. Материалы	7
2.2. Отбор проб	7
2.3. Культивирование микроорганизмов	9
2.4. Определение Общего Микробного Числа и визуальная регистрация результатов	10
2.5. Приготовление микропрепаратов методом раздавленной капли	10
2.6. Приготовление фиксированных препаратов бактерий и окрашивание по Граму.	11
2.7. Световая микроскопия в светлом поле	11
2.8. Выделение ДНК из бактерий	12
2.9. Проведение ПЦР	12
2.10. Проведение горизонтального электрофореза в агарозном геле	14
2.11. Проведение капиллярного электрофореза	14
2.12. Секвенирование 16S последовательности рРНК	15
2.13. Анализ результатов секвенирования	15
2.14. Место и сроки выполнения работы	15
3. Результаты и обсуждение	16
3.1. Исследование морфологического разнообразия микроорганизмов	16
3.2. Исследование генетического разнообразия микроорганизмов	23
3.3. Исследование численности микроорганизмов на различных поверхностях	28
Выводы	30
Список научной литературы	30

1. Введение

К настоящему времени в микробиологии, паразитологии, молекулярной биологии и эпидемиологии накоплены обширные данные о бактериях, а точнее о/об:

- их путях передачи
- бактериях, общих для человека, животных и растений
- их образе жизни
- заболеваниях, которые они вызывают.

Изучение разнообразия микроорганизмов как в воздухе, так и на различных поверхностях с каждым годом приобретает все большее значение и является важнейшей задачей, которая направлена на обеспечение здоровья людей. С развитием мегаполисов состав окружающей его микробиоты стал меняться, изменилась и интенсивность контактов с ними. Именно поэтому в современном мире высок риск передачи инфекционных заболеваний через общественный транспорт. Городской транспорт – одновременно и источник, и приемник загрязнения. Согласно данным с Единого Транспортного портала [<https://transport.mos.ru/>] ежедневно миллионы людей пользуются общественным транспортом. Наиболее предпочтительные виды транспорта – это метро и наземный транспорт (автобусы, маршрутки, трамваи и т.д.) (рисунок 1).

СРЕДНЕСУТОЧНЫЙ ПАССАЖИРОПОТОК ОБЩЕСТВЕННОГО ТРАНСПОРТА МОСКВЫ В РАБОЧИЙ ДЕНЬ, МЛН ПОЕЗДОК

■ Метро и МЦК ■ МЦД ■ НГПТ ■ Такси ■ Каршеринг

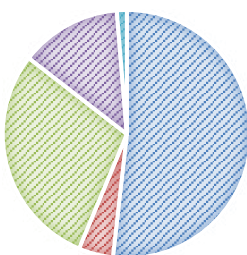


Рисунок 1. Среднесуточный пассажиропоток общественного транспорта Москвы в рабочий день.

Через грязные руки, при кашле и чихании на поручни, сиденья, стёкла и прочие поверхности попадают многочисленные микробиоты человека.

Некоторые внешние микроорганизмы способны нанести вред здоровью людей, а другие, напротив, важны для развития иммунной системы. Поэтому мнение, что все бактерии – зло, от которых нужно избавляться, ошибочно. Огромное количество бактерий необходимо человеку.
[<https://www.atlasclinic.ru/microbiota-test/>] Микробиота влияет на:

- иммунитет
- синтез витаминов группы В и К
- состояние ЖКТ
- расщепление лактозы и глютенa
- уровень воспаления
- настроение

Вопросы эпидемиологической безопасности рассматриваются только в некоторых санитарных правилах. Например в Постановлении Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 16.10.2020 №

31, нормируются воздушные показатели среды в железнодорожных вагонах, в салонах самолётов и на водном транспорте. Для автобусов и прочих наземных маршрутов бактериологические показатели не нормируются.

Ранее данное исследование проводилось российскими учёными из Университета ИТМО совместно с американскими коллегами [Klimenko и др., 2020]. Наиболее распространённые виды бактерий в Москве – это *Dietzia*, *Brevundimonas*, *Pseudomonas*, *Arsenicicoccus*, *Stenotrophomonas*. При анализе не были обнаружены патогены — из 10 болезнетворных бактерий, ДНК которых мог выявить использованный метод, достоверно не было найдено ни одной. Но это не значит, что их там нет. Исследование не было направлено на обнаружение патогенных микробов. Применяемый способ анализа не чувствителен к вирусам, грибам и простейшим. Также подобное исследование проводили российские учёные “Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи” в декабре 2021 года. Наиболее распространенные роды были представлены *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* и *Ralstonia*, которые широко распространены в окружающей среде и являются симбионтами с кожей человека. [Pochtovyi и др., 2022].

1.1. Цель работы

Исследовать микробиоту общественного транспорта (метро, автобусы и маршрутка) на наличие потенциальных возбудителей инфекций.

1.2. Задачи работы

- 1) Исследовать научную литературу на данную тему.
- 2) Сделать посев микробиоты на специальные питательные среды (LB, МакКонки).
- 3) Произвести визуальный анализ полученных культур.
- 4) Под руководством кандидата биологических наук сделать микропрепараты из полученных культур.

- 5) Провести микроскопирование полученных микропрепаратов.
- 6) Провести анализ результатов микроскопирования.
- 7) В лаборатории выделить ДНК и провести ПЦР, электрофорез, 16S секвенирование.

1.3. Гипотеза

В общественном транспорте могут содержаться микроорганизмы, вызывающие у людей различные заболевания.

2. Материалы и методы

2.1. Материалы

Оборудование:

- Колба
- Стерильные чашки Петри
- Электронные весы
- Спиртовка
- Мазок из общественного транспорта
- Разлитые питательные среды
- Чашки Петри с выращенными культурами
- Лупа
- Чистое сухое предметное стекло
- Вода
- Микробиологические иглы
- Покровное стекло
- Пипетка
- Бактериальная петля
- Бинокулярный микроскоп Микромед 3 вар 2-20

Реактивы:

- Спирт (96%)
- Раствор генциан-виолета
- Раствор Люголя
- Фуксин

2.2. Отбор проб

Для исследования микробиоты пробы отбирали в трех наиболее популярных видах транспорта: автобусе, маршрутном такси и метро. Анализ

проводили в автобусах маршрутов 98, т73, маршрутном такси 895, а также поездах Калужско-Рижской и Люблинско-Дмитровской линий метро. В каждом виде транспорта проводили оценку обсеменённости утром и вечером, пробы брали с различных поверхностей (металлические и пластиковые поручни, стекло, ткань посадочных мест).

Также была взята проба с поверхности металлических поручней после обработки поезда в депо утром.

Пробы отбирали при помощи одноразовых стерильных зондов с ватным тампоном с площади приблизительно 20 см² в двух повторностях в январе 2023.

Полный перечень взятых проб представлен в Таблице 1.

Таблица 1. Список исследованных в работе поверхностей

№	Вид Транспорта	Поверхность	Время суток
1	Автобус	Металлические поручни	Утро
2			Вечер
3		Пластиковая спинка стула	Утро
4			Вечер
5		Стекло	Утро
6			Вечер
7	Маршрутное такси	Ткань посадочных мест	Вечер
8	Метро. Смыв после дезинфекции вагонов	Металлические поручни	Утро
9	Метро	Металлические поручни	Вечер

10		Стекло	Вечер
11		Металлические поручни	Утро
12		Стекло	Утро

2.3. Культивирование микроорганизмов

Отобранные пробы высевали на две питательные среды: LB г/л (триптон – 10, дрожжевой экстракт – 5, NaCl – 10, Агар - 15) для подсчета общего микробного числа (ОМЧ) и агар МакКонки г/л (NaCl – 5, Лактоза – 10 г, Соли желчных кислот – 1,5 г, Панкреатический гидролизат желатина 17 г, Нейтральный красный – 0,03, Пептоновая смесь (мясной и казеиновый) – 3, Кристаллический фиолетовый – 0,001, Агар – 13,5) для селективного определения энтеробактерий и грамотрицательных микроорганизмов.

Стерильную питательную среду разливали по стерильным чашкам Петри над спиртовкой (рабочее место предварительно протерли спиртом, работали в перчатках, соблюдая асептическую технику).

Для контроля возможного наличия бактериального заражения чашки предварительно инкубировали 3-4 дня при комнатной температуре, убеждаясь, что признаки роста отсутствуют.

Посев производили методом штриха по схеме, показанной на Рисунке 1.

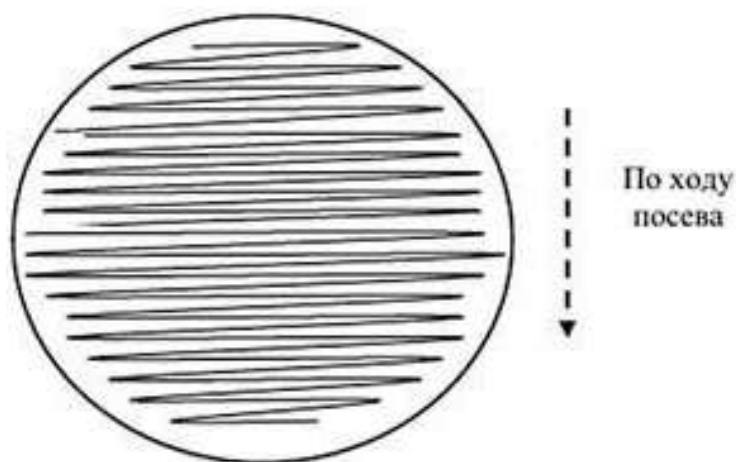


Рисунок 2. Посев бактерий методом штриха

После осуществления посева чашки Петри инкубировали в термостате при 25°C до появления колоний. Подсчёт колоний и регистрацию результатов проводили на 13 сутки.

2.4. Определение Общего Микробного Числа и визуальная регистрация результатов

После инкубации засеянных чашек Петри производили визуальное исследование выращенных культур: с помощью лупы определяли размер, форму, рельеф, поверхность, цвет колоний. Дополнительно проводили подсчет колоний на чашках Петри.

Обсемененность исследованных поверхностей вычисляли исходя из количества выросших колоний и площади взятого мазка.

2.5. Приготовление микропрепаратов методом раздавленной капли

Для приготовления микропрепаратов плесневых грибов использовали метод раздавленной капли. Для этого на чистое сухое предметное стекло пипеткой наносили каплю воды, с помощью бактериальных иголок собирали

небольшое количество исследуемой культуры, вносили её в каплю воды и осторожно распределяли в жидкости для получения однородной взвеси. Приготовленную каплю накрывали покровным стеклом, избегая образования пузырьков воздуха. Если часть жидкости выступала за края покровного стекла, излишек среды убирали узкой полоской фильтровальной бумаги [Нетрусов и др., 2005].

2.6. Приготовление фиксированных препаратов бактерий и окрашивание по Граму.

Предметное стекло прогревали над пламенем спиртовки и давали остыть. Далее на предметное стекло нанесли каплю воды. Бактериологической петлёй набрали небольшое количество культуры и сделали мазок на предметном стекле. Мазок оставили просохнуть на воздухе и зафиксировали пламенем. Далее окрашивали мазок раствором генцианвиолета в течение 1-2 минуты. Следом на мазок наносили раствор люголя и выдерживали 1-2 минуты до почернения мазка. Сливали раствор люголя и промывали мазок спиртом до его осветления. Дополнительно окрашивали препарат фуксином в течении 2 минут. Препарат промывали водой, просушивали и микроскопировали [Нетрусов и др., 2005].

2.7. Световая микроскопия в светлом поле

Для проведения микроскопии использовали световой микроскоп Микромед 3 вар 2-20.

Приготовленный препарат помещали на предметный столик, при этом нужный для исследования участок препарата устанавливали в центре поля зрения. Фокусировку начинали с объектива, дающего наименьшее увеличение. Для этого объектив 8× опустили с помощью макрометрического винта так, чтобы расстояние до препарата было около 8 мм. Глядя в окуляр, медленно вращали

макрометрический винт, поднимая тубус до появления контуров препарата. Осторожно вращая микрометрический винт, осуществляли тонкую фокусировку изображения. Просматривали несколько полей зрения. Затем поднимали тубус и, вращая револьвер, заменяли объектив с увеличением 8× на 40×. Наблюдая сбоку, с помощью макрометрического винта опустили тубус с объективом почти до соприкосновения с препаратом. Глядя в окуляр, медленно поднимали тубус до появления контуров препарата, а микрометрическим винтом уточнили фокус.

Для просмотра микропрепаратов грибов использовали объектив 40×. Для бактериальных культур использовали объектив 100× с иммерсионным маслом.

Увеличение окуляра во всех случаях было 10×.

2.8. Выделение ДНК из бактерий

Для выделения неочищенной ДНК из бактерий использовали экспресс-метод. Готовили бактериальные суспензии плотностью 10^8 КОЕ/мл ($OD_{600} \approx 0.3$) в стерильной воде MilliQ, инкубировали 10 минут при 98°C, после чего переносили на -80°C на 30 минут. Размораживали, центрифугировали при 11 000 g и переносили супернатант, содержащий неочищенную ДНК, в чистую пробирку.

Количество и чистоту полученных образцов оценивали, используя спектрофотометр NanoProteometer N60 (NanoProteometer, Германия).

2.9. Проведение ПЦР

Геномный фингерпринтинг осуществляли методом BOX ПЦР [Lee, Wong, 2009]. Для этого проводили ПЦР с праймером BOXa1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'). Метод позволяет группировать и дифференцировать сходные штаммы на основе полученного паттерна полос

ПЦР продукта. Для проведения фингерпринтинга, для каждого образца ставили ВОХ ПЦР в двух повторностях. Каждая реакция содержала компоненты, перечисленные в Таблице 2. Условия термоциклирования были следующие: 95°C - 10 минут, далее 34 цикла 95°C - 1 минута, 52°C - 1 минута, 72°C - 2 минуты. После 72°C - 10 минут и хранение при 12°C.

Таблица 2. Состав реакционной смеси для ВОХ ПЦР (на одну реакцию)

Компонент	Объем на реакцию
qPCR Mix (Евроген, Россия)	5 мкл
dNTP Mix	0,7 мкл
Праймер ВОХа1R (10 мМ)	1,4 мкл
Вода (Milli-Q)	17 мкл
ДНК (20 нг)	1 мкл
ОБЪЕМ	25 мкл

Для секвенирования 16S рРНК проводили реакцию с праймерами 27F (5'-AGAGTTTGATCCCTGGCTCAG) и 1492R (5'-GGCTACTTGTACGACTT) [Chen и др., 2015]. Каждая реакция содержала компоненты, перечисленные в Таблице 3. Условия термоциклирования были следующие: 95°C - 5 минут, далее 34 цикла 95°C - 20 секунд, 52°C - 20 секунд, 72°C - 1 минута. После 72°C - 5 минут и хранение при 12°C.

Таблица 3. Состав реакционной смеси ПЦР-продукта для секвенирования 16S рРНК.

Компонент	на 1 реакцию
-----------	--------------

5xScreenMix (Евроген, Россия)	3,5 мкл
Праймер 27F (10 мМ)	0,7 мкл
Праймер 1492R (10 мМ)	0,7 мкл
ДНК (20 нг)	1 мкл
Вода (Milli-Q)	25,7 мкл
ОБЪЕМ	35 мкл

2.10. Проведение горизонтального электрофореза в агарозном геле

Полученные ПЦР продукты разделяли с помощью электрофорез проводили в 1% агарозном геле с напряжением 14 В/см геля и визуализировали добавлением в гель бромистого этидия.

Для приготовления геля использовали ТАЕ буфер. Для проведения электрофореза использовали камеру BioRad (США).

2.11. Проведение капиллярного электрофореза

Капиллярный электрофорез проводили с помощью системы для проведения капиллярного электрофореза в автоматическом режиме QIAxcel Advanced, Qiagen (Германия). Для проведения анализа использовали набор QIAxcel DNA High Resolution Kit согласно рекомендациям производителя.

Анализ и визуализацию результатов проводили при помощи встроенного ПО.

2.12. Секвенирование 16S последовательности рРНК

Секвенирование по Сэнгеру [Sanger, 1981] выполняли на заказ в ООО “Синтол”.

2.13. Анализ результатов секвенирования

Поиск сходных последовательностей был выполнен в NSBI BLAST.

2.14. Место и сроки выполнения работы

Место:

1. Школьная лаборатория (ГБОУ школа №962)
2. Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. Лаборатория молекулярной биоинженерии. Отдел молекулярной биологии и биотехнологии растений.

Сроки выполнения работы:

11 января 2023 года – 31 января 2023 года

3. Результаты и обсуждение

3.1. Исследование морфологического разнообразия микроорганизмов

В результате сделанного посева микробиоты общественного транспорта, наблюдали рост микробных колоний различного морфотипа. Посредством визуального исследования были выделены следующие морфотипы микроорганизмов, представленные в Таблице 3.

Таблица 3. Морфология колоний микроорганизмов

№	Морфология колоний	Комментарий
1	Гладкие, бежевого оттенка, край неровный	Гриб
2	Гладкие, бежевого оттенка, край неровный	Бактерии. Грамположительные бациллы со спорами
5	Гладкие, жёлто-зелёного цвета, край ровный	Бактерии. Грамположительные кокки
6	Гладкие, светло-бежевого оттенка, край ровный	Бактерии. Грамположительные сарцины
7	Гладкие, оранжевого оттенка, край ровный	Гриб
8	Шероховатые, красно- розового цвета, край ровный	Гриб
14	Гладкие, желтоватого оттенка, край ровный	Бактерии. Грамположительные сарцины
19	Гладкие, зеленоватого оттенка, край неровный	Бактерии. Грамотрицательные кокки
20	Шероховатые, красно- розового цвета, край ровный	Бактерии. Грамположительные кокки

В общей сложности было обнаружено 9 морфотипов колоний, среди которых 3 были образованы плесневыми грибами и 6 бактериями.

В большинстве случаев рост колоний наблюдался только на среде LB. На среде МакКонки не было показано роста энтеробактерий, из чего можно сделать вывод, что санитарно значимые микроорганизмы (кишечная палочка, клебсиеллы, сальмонеллы и т.д.) в высеваемых пробах отсутствовали.

В контрольных чашках, на которые не производили высев микроорганизмов, признаков роста обнаружено не было, что подтверждает аккуратность стерильной работы.

Разнообразие наблюдаемых колоний показано на рисунке 2.

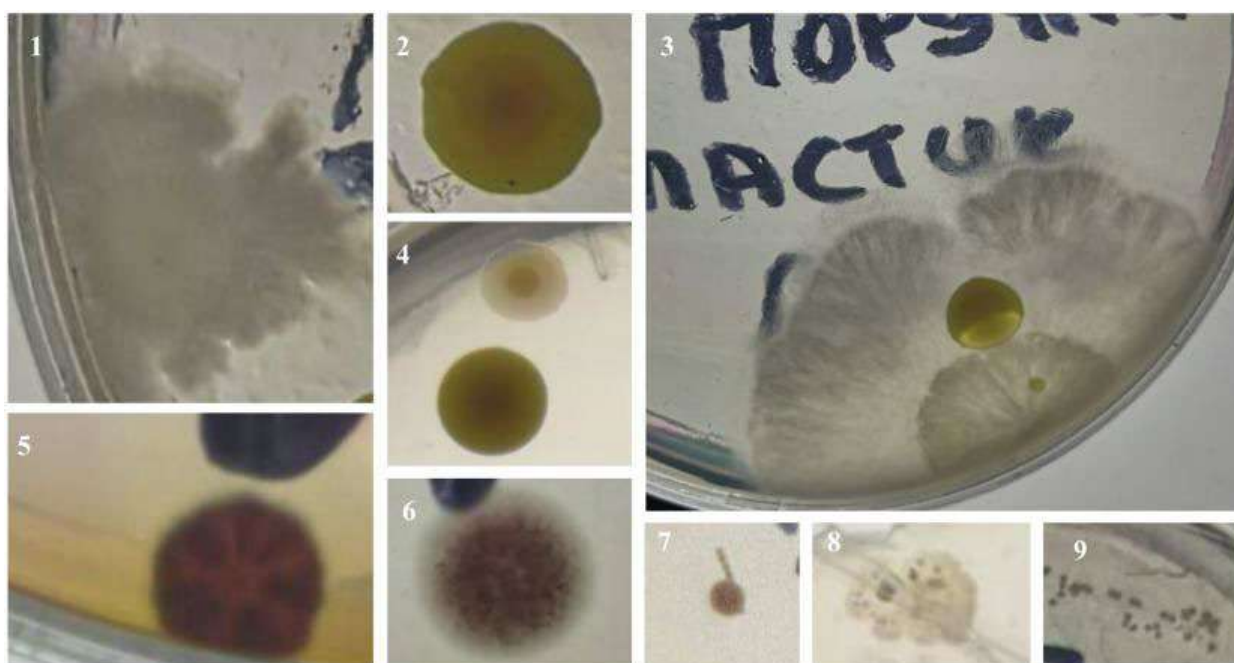


Рисунок 3. Морфологическое разнообразие выросших колоний.

1 - Колонии гладкие, среднего размера, бежевого цвета, цвет распределён равномерно, край неровный, несимметричные. 2 - Колонии гладкие, среднего размера, жёлто-зелёного цвета, цвет распределён равномерно край ровный, симметричные. 3 - 1) Колонии гладкие, большого размера, белого цвета, цвет распределён равномерно, край неровный, беловатые по краям, несимметричные, клочковатые. 2) Колонии гладкие, среднего размера, жёлто-зелёного цвета, цвет распределён равномерно, край ровный, симметричные. 4 - Колонии гладкие, среднего размера, светло-бежевого цвета по краям и светло-жёлтые в сердцевине, край ровный, симметричные. 5 - Колонии

шероховатые, среднего размера, красно-розового цвета, край ровный, симметричные. 6 - Колонии шероховатые, среднего размера, красно-розового цвета, край ровный, симметричные. 7 - Колонии гладкие, мелкие, оранжевого цвета, край ровный, несимметричные. 8 - Колонии гладкие, среднего размера, беловатого оттенка, край неровный, несимметричные. 9 - Колонии гладкие, мелкие, беловатого оттенка, края ровные, симметричные.

Наиболее часто встречаемыми морфотипами колоний были гладкие, среднего размера, жёлто-зелёного цвета, цвет распределён равномерно край ровный, симметричные колонии.

С морфологической точки зрения большинство выросших бактерий были грамположительными (Рисунок 3) и представляли из себя либо сарцины, либо спорообразующие палочки со спорами разной степени зрелости (Рисунок 4). Среди грамотрицательных морфотипов в основном встречались мелкие палочки.

Соотношение грамположительных и грамотрицательных бактерий

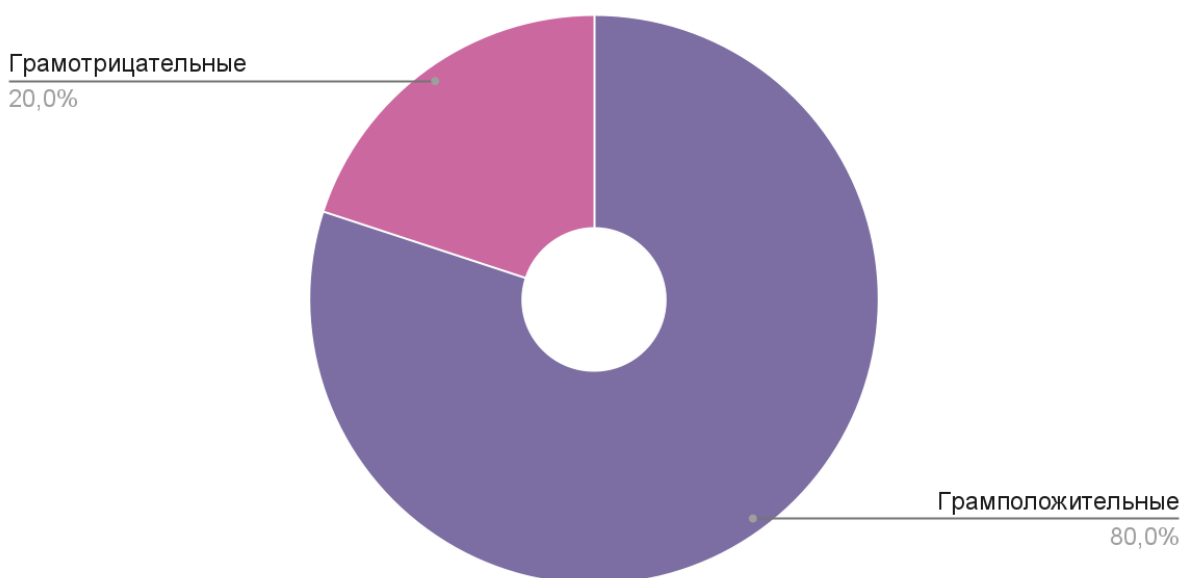


Рисунок 4. Соотношение грамположительных и грамотрицательных бактерий.

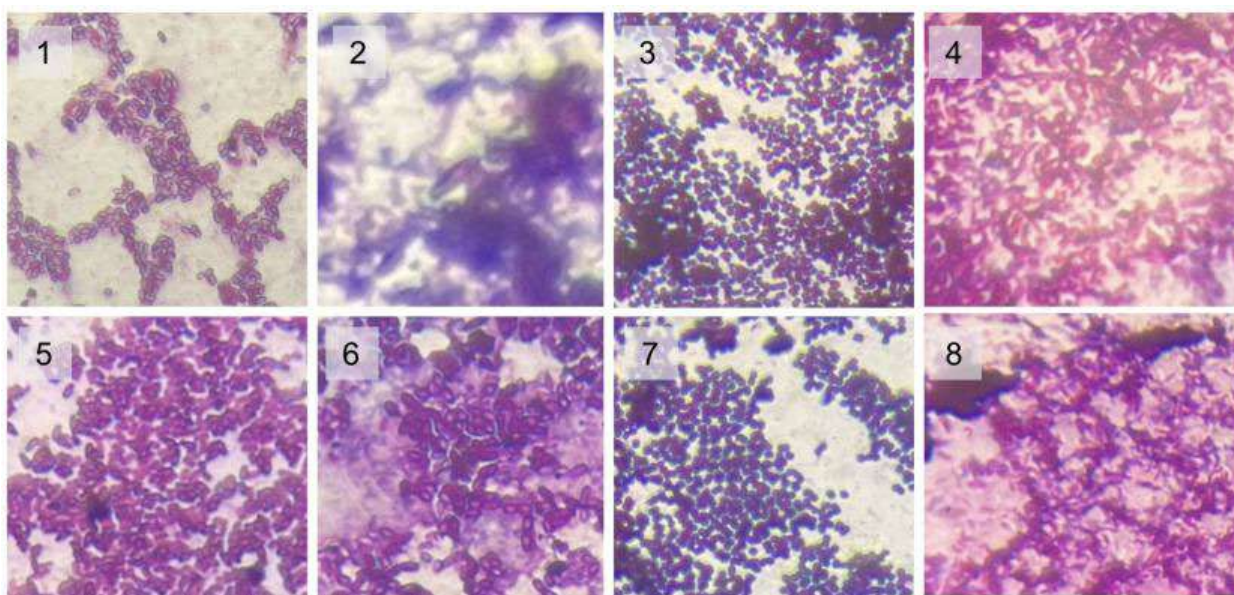


Рисунок 5. Разнообразие морфотипов обнаруженных бактерий. 1, 2, 5, 6 - спорообразующие формы. 3, 7 - грамположительные кокки. 4,8 - грамотрицательные палочки

Согласно данным литературы, видовой состав микробиоты автобусов, исследованных в 2021 году в Нижнем Новгороде, в основном был представлен бактериями родов *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea* [Белова и др., 2021]. Кроме того, существуют так же публикации, посвященные анализу микробиоты московского метро. Так, в исследовании 2020 года говорится, что наиболее представленными были представители родов *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Dietzia*, *Brevundimonas*, *Staphylococcus*, *Rhodococcus*, *Erwinia*. В этом исследовании авторы приходят к выводу, что основными источниками бактерий в транспорте являются почва и человеческая кожа и, чем выше пассажиропоток, тем выше и микробное разнообразие. Кроме того, авторы отмечают, что в данном исследовании не было выявлено присутствия серьезных патогенных микроорганизмов [Klimenko и др., 2020]. В исследовании 2022 года говорится, что авторам удалось установить 15 наиболее встречаемых вне зависимости от времени года и пассажиропотока родов бактерий, встречаемых в московском

метрополитене. Среди этих родов *Cutibacterium*, *Arthrobacter*, *Psychrobacter*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Metylobacterium*, *Azotobacter*, *Delftia*, *Flavobacterium*, *Rheinheimera* и другие [Pochtovyі и др., 2022].

Среди обнаруженных в этой работе бактерий наблюдали множество спорообразующих форм, которые могут быть представителями рода *Bacillus*. Это разнообразная группа бактерий, для которой характерна способность к образованию эндоспор, расположенных в клетке по центру, среди которых существуют как патогенные представители, такие как возбудитель сибирской язвы *Bacillus anthracis*, так и совершенно безобидные почвенные представители такие как типовой вид, *Bacillus subtilis* (сенная палочка) [Harwood, 1989].

Грамположительные кокки могут относиться к характерным для микробиоты кожи человека родам *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Microbacterium* и другим. Для более точной идентификации требуется более детальное изучение выделенных штаммов.

Среди плесневых грибов в основном были обнаружены представители с хорошо развитым мицелием, но плохо выраженным спороношением, что затрудняет их морфологическую идентификацию (Рисунок 5).

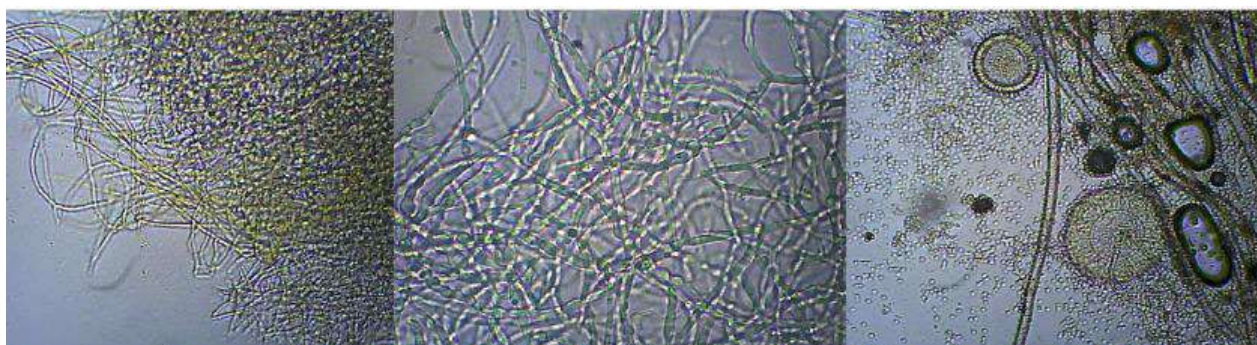


Рисунок 6. Разнообразие морфотипов обнаруженных грибов.

Соотношение грибов и бактерий

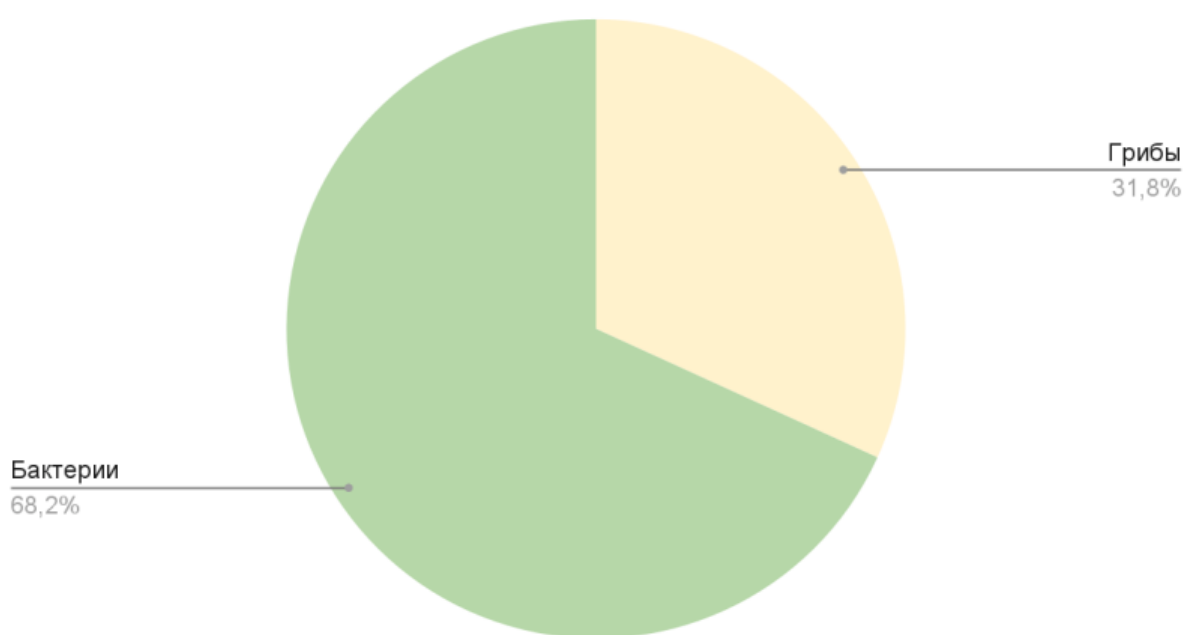


Рисунок 7. Соотношение грибов и бактерий.

Эти данные согласуются с исследованием, опубликованным Российскими авторами в 2018 году, так же отметившими, что в пробах воздуха, отобранных в общественном транспорте Москвы, преобладали сапротрофные бактерии, а грибы составляли лишь малую часть [Тихонов, Николаева, Пильгун, 2018].

В одной из проб был обнаружен микромицет со спороношением, характерным для грибов рода *Aspergillus*.



Рисунок 8. Микромицет со спороношением. *Aspergillus*.

С медицинской точки зрения стоит отметить, что не смотря на то, что представители рода *Aspergillus* - обычные почвенные обитатели, которые также активно используются в биотехнологии, в ряде случаев они могут быть опасны [Scott, 2007]. В частности, *Aspergillus* могут вызывать болезнь легких, аспергиллез. Это особенно часто встречается у пациентов с сопутствующими заболеваниями дыхательных путей, такими как муковисцидоз, астма, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) и бронхоэктазы [Al-Alawi и др., 2005]. Кроме того, развиваясь на продуктах питания и зерне, аспергилла могут выделять опасные для человека токсины, такие как охротоксины и афлатоксины, являющиеся гепатоканцерогенами [Scott, 2007].

3.2. Исследование генетического разнообразия микроорганизмов

Поскольку визуально идентифицировать бактерии невозможно, дальнейшее исследование решено было провести молекулярно-биологическими методами.

Для этого в первую очередь было решено провести типирование с помощью молекулярного фингерпринтинга для разбиения штаммов на группы в

соответствии с полученными “отпечатками пальцев”. Молекулярный фингерпринтинг - это группа методов, направленная на то, чтобы типировать живые организмы по последовательности их ДНК не прибегая к секвенированию (непосредственному прочтению последовательности ДНК) . В этой работе был использован метод BOX ПЦР [Belkum, Hermans, 2001], основанный на амплификации BOX-повторов, повторяющихся регуляторных консервативных участков. У разных видов и даже штаммов бактерий они могут располагаться слегка по-разному, а поэтому длина и набор ПЦР-продуктов, которые возможно получить для амплификации этих участков будут уникальны для разных бактерий, что позволяет косвенно оценить разнообразие этих бактерий.

Результаты проведенного фингерпринтинга представлены на рисунке 5. Как видно из приведенного рисунка, несмотря на относительно однообразную морфологию выросших колоний (преобладание 2-3 основных типов) и морфотипов микробных клеток (преобладание грамположительных спорообразующих форм и сарцин, а также грамотрицательных палочек), с генетической точки зрения наблюдается высокое разнообразие обнаруженных штаммов.

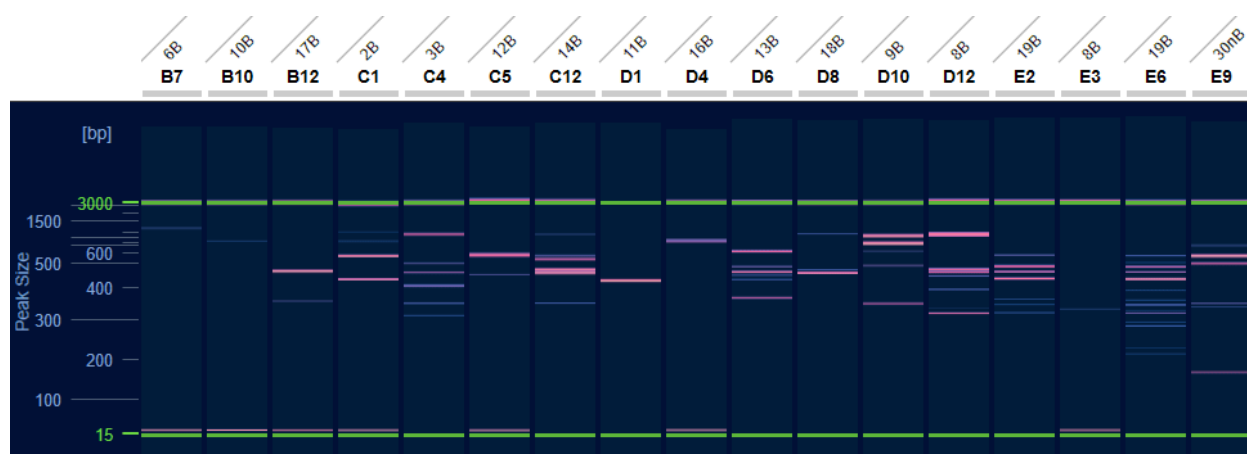


Рисунок 9. Геномные фингерпринты исследованных бактерий

По суммарным результатам морфологического анализа и фингерпринтинга, было выбрано 4 образца, отличающихся как морфологически, так и по полученному фингерпринту.

Для всех образцов была проведена амплификация участка 16S рРНК, визуализация в агарозном геле подтвердила, что для каждого штамма был успешно получен фрагмент ожидаемой длины.

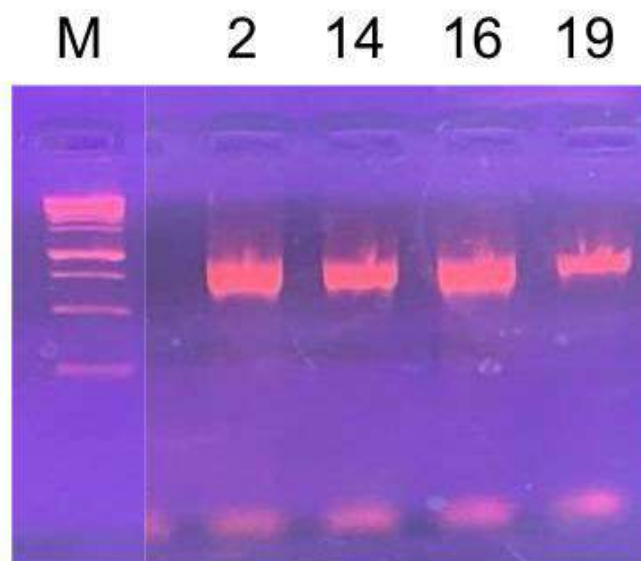


Рисунок 10. Электрофорез в 1% агарозном геле участков 16S рРНК выбранных штаммов. М - маркер (Evrogen kb Ladder). 2, 14, 16, 19 - номера образцов.

В таблице 4 указаны характеристики выбранных штаммов и результаты проведенного анализа последовательностей 16S рРНК.

Таблица 4. Характеристики штаммов бактерий и результаты анализа последовательностей 16S рРНК.

	Морфология колоний	Морфология клеток	Результат поиска сходства 16S рРНК в NCBI BLAST
2	Гладкие, среднего размера, бежевого	Грамположительные спорообразующие	<i>Kurthia zophii/Bacillus</i>

	оттенка, край неровный	палочки со спорой, смещенной от центра	<i>thermophilus</i>
14	Гладкие, среднего размера, желтоватого оттенка, край ровный	Грамположительные сарцины	<i>Micrococcus luteus</i>
16	Гладкие, среднего размера, светло- бежевого оттенка, край ровный	Грамположительные спорообразующие палочки со спорой по центру	<i>Bacillus megatherius</i>
19	Гладкие, маленького размера, зеленоватого оттенка, край неровный	Грамположительные кокки	<i>Agrococcus</i>

Ниже приведены наиболее сходные последовательности, согласно анализу полученных последовательностей в базе банных NCBI BLAST.

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Agrococcus jenensis strain OAct930 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Agrococcus jenensis	1184	1184	99%	0.0	93.49%	1488	MG661754.1
✓	Uncultured bacterium clone Ph.sp-F-DM-HN-5-39 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bacterium	1184	1184	99%	0.0	93.49%	1445	HQ639428.1
✓	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone 12TC1N357	uncultured bacterium	1184	1184	99%	0.0	93.49%	1354	AB637283.1
✓	Uncultured bacterium clone ncd2763g04c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bacterium	1184	1184	99%	0.0	93.49%	1344	JF238003.1
✓	Uncultured bacterium clone nby649d04c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bacterium	1184	1184	99%	0.0	93.49%	1344	HM845218.1
✓	Agrococcus sp. MDT2-22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Agrococcus sp. MDT2-22	1175	1175	96%	0.0	94.05%	1373	JX949730.1
✓	Uncultured bacterium clone ncd2751d04c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bacterium	1173	1173	99%	0.0	93.24%	1344	JF237189.1
✓	Agrococcus jenensis strain c5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Agrococcus jenensis	1171	1171	98%	0.0	93.62%	1399	MK696230.1
✓	Agrococcus jenensis strain CEMTC_6540 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Agrococcus jenensis	1171	1171	99%	0.0	93.24%	898	QP648122.1
✓	Agrococcus jenensis strain CB-281539 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Agrococcus jenensis	1171	1171	97%	0.0	93.83%	991	JX841074.1
✓	Corynebacterium cf. aquaticum V4.B0.26 partial 16S rRNA gene, marine isolate	Corynebacterium cf. aquaticum V4...	1171	1171	99%	0.0	93.24%	1478	AJ244681.2
✓	Agrococcus sp. strain AB-39 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Agrococcus sp.	1170	1170	99%	0.0	93.32%	1415	MZ573157.1
✓	Agrococcus jenensis partial 16S rRNA gene, strain NSDHB10-92E	Agrococcus jenensis	1168	1168	97%	0.0	93.81%	955	LT853740.1
✓	Agrococcus sp. strain DB-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Agrococcus sp.	1168	1168	98%	0.0	93.50%	1421	MZ573162.1
✓	Agrococcus sp. strain BS41 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Agrococcus sp.	1166	1166	97%	0.0	93.80%	1383	MT397244.1

Рисунок 11. Наиболее сходные последовательности 16S рРНК к образцу 19 согласно NCBI Blast.

select all 100 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer				
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Bacillus megaterium strain HTI 16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Priestia megaterium	1437	1437	99%	0.0	99.13%	1462	MK521052.1
✓	Bacillus sp. (in: Bacteria) strain CR4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: firmicutes)	1437	1437	99%	0.0	99.13%	1032	MF919472.1
✓	Bacillus megaterium strain KU143 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Priestia megaterium	1435	1435	100%	0.0	98.88%	1466	KX037158.1
✓	Priestia megaterium strain V1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Priestia megaterium	1435	1435	99%	0.0	99.00%	1457	MW541935.1
✓	Priestia megaterium strain SX1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Priestia megaterium	1434	1434	99%	0.0	99.00%	1459	MF431747.1
✓	Bacillus megaterium strain P3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Priestia megaterium	1434	1434	98%	0.0	99.49%	1424	KP241857.1
✓	Priestia megaterium strain BEhA_23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Priestia megaterium	1434	1434	97%	0.0	99.74%	936	QN025948.1
✓	Bacillus megaterium strain ROA047 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Priestia megaterium	1432	1432	99%	0.0	98.88%	1431	MT525296.1
✓	Bacillus megaterium strain ROA024 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Priestia megaterium	1432	1432	99%	0.0	98.88%	1483	MT510154.1
✓	Priestia megaterium strain FDU301 chromosome, complete genome	Priestia megaterium	1432	19926	99%	0.0	98.88%	5272433	CP045272.1
✓	Bacillus aryabhatai strain PR-D07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Priestia aryabhatai	1432	1432	99%	0.0	98.88%	919	MT453908.1
✓	Bacillus megaterium strain NEPZ-22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Priestia megaterium	1432	1432	99%	0.0	98.88%	1480	MT184834.1
✓	Priestia megaterium strain S188 chromosome, complete genome	Priestia megaterium	1432	17087	99%	0.0	98.88%	5278689	CP049296.1
✓	Bacillus megaterium strain SX06NA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Priestia megaterium	1432	1432	99%	0.0	98.88%	1393	MT052643.1

Рисунок 12. Наиболее сходные последовательности 16S рРНК к образцу 16 согласно NCBI Blast.

Sequences producing significant alignments

Download

Select columns

Show

100

☒ select all 100 sequences selected

GenBank

Graphics

Distance tree of results

MSA Viewer

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Micrococcus luteus strain MI 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Micrococcus luteus	1410	1410	99%	0.0	98.86%	1418	MN905159.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Micrococcus luteus strain KUK 2-23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Micrococcus luteus	1410	1410	99%	0.0	98.86%	1477	MN826453.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Micrococcus luteus strain ATCC 4698 chromosome, complete genome	Micrococcus luteus	1410	2820	99%	0.0	98.86%	2560556	CP035298.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Micrococcus luteus strain SGAlr0127 chromosome, complete genome	Micrococcus luteus	1410	2814	99%	0.0	98.86%	2570740	CP025616.2
<input checked="" type="checkbox"/>	Micrococcus luteus strain B34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Micrococcus luteus	1410	1410	99%	0.0	98.86%	1251	MK123499.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Micrococcus sp. strain SKRM01-03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Micrococcus sp.	1410	1410	99%	0.0	98.86%	1459	MK503550.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Micrococcus sp. strain CDRSL-4D 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Micrococcus sp.	1410	1410	99%	0.0	98.86%	1344	MH707195.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Micrococcus sp. strain CDR-SL-16 TS8A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Micrococcus sp.	1410	1410	99%	0.0	98.86%	1244	MH701860.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Micrococcus sp. strain Actino-33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Micrococcus sp.	1410	1410	99%	0.0	98.86%	1487	MH671529.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Micrococcus luteus strain NCTC2665 genome assembly, chromosome: 1	Micrococcus luteus NCTC 2665	1410	2820	99%	0.0	98.86%	2495693	LS483396.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Micrococcus luteus strain B40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Micrococcus luteus	1410	1410	99%	0.0	98.86%	885	MH279782.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Micrococcus luteus strain JK4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Micrococcus luteus	1410	1410	99%	0.0	98.86%	1504	MF490436.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Micrococcus alcaevarae strain PRQ35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Micrococcus alcaevarae	1410	1410	99%	0.0	98.86%	1200	MG968301.1

Рисунок 13. Наиболее сходные последовательности 16S рРНК к образцу 14 согласно NCBI Blast.

☒ select all 100 sequences selected

[GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Kurthia zoofii strain W2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Kurthia zoofii	983	983	99%	0.0	85.80%	1494	MT086102.1
<input checked="" type="checkbox"/> Kurthia zoofii strain IPH103 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	Kurthia zoofii	983	983	99%	0.0	85.80%	1546	DQ350826.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thermophilus strain B2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Siminovitchia th...	976	976	99%	0.0	85.68%	1375	KY711185.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thermophilus strain HS-BTL2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Siminovitchia th...	976	976	99%	0.0	85.68%	1515	KX702370.1
<input checked="" type="checkbox"/> Siminovitchia thermophila strain SqZ-10 16S ribosomal RNA, partial sequence	Siminovitchia th...	976	976	99%	0.0	85.68%	1473	NR_109677.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus sp. D-52 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. D-52	970	970	96%	0.0	86.03%	1453	EU520305.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured Bacillus sp. clone bb2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured Bacill...	966	966	96%	0.0	85.94%	780	KU386342.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured compost bacterium partial 16S rRNA gene, clone PS3661	uncultured comp...	965	965	97%	0.0	85.79%	1483	FN667511.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thermophilus strain ANSK03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Siminovitchia th...	963	963	99%	0.0	85.42%	1480	KT152689.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thermophilus strain YPY6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Siminovitchia th...	961	961	96%	0.0	85.96%	1405	MF595848.1
<input checked="" type="checkbox"/> Kurthia zoofii strain TN5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Kurthia zoofii	948	948	96%	0.0	85.57%	1464	JQ415978.1
<input checked="" type="checkbox"/> Kurthia zoofii strain NBIGP 4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Kurthia zoofii	948	948	96%	0.0	85.57%	1484	JF304286.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured Bacillus sp. clone BL016B79 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured Bacill...	913	913	92%	0.0	85.46%	791	DQ188672.1
<input checked="" type="checkbox"/> Kurthia zoofii strain 36-Y7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Kurthia zoofii	911	911	98%	0.0	84.58%	1455	KU647229.1

Рисунок 14. Наиболее сходные последовательности 16S рРНК к образцу 2 согласно NCBI Blast.

Полученные данные согласуются с описанными в научных статьях [Klimenko и др., 2020; Pochtovyi и др., 2022] наблюдениями о том, что наиболее часто микробиота общественного транспорта в основном представлена почвенными видами и обитателями кожи человека. А так же подтверждает выдвинутое нами в разделе 3.1. предположение о родопринадлежности выделенных бактерий к *Bacillus* и *Micrococcus*.

3.3. Исследование численности микроорганизмов на различных поверхностях

Количество микроорганизмов, высеваемых с полученных проб, изменялось в течение дня. Как показано на Рис.10 и Рис.11, как для проб, взятых в метро, так и в автобусе, на чашках с утренних проб количество колоний было существенно меньше, чем в вечерние часы.

Обсемененность поверхностей в наземном транспорте

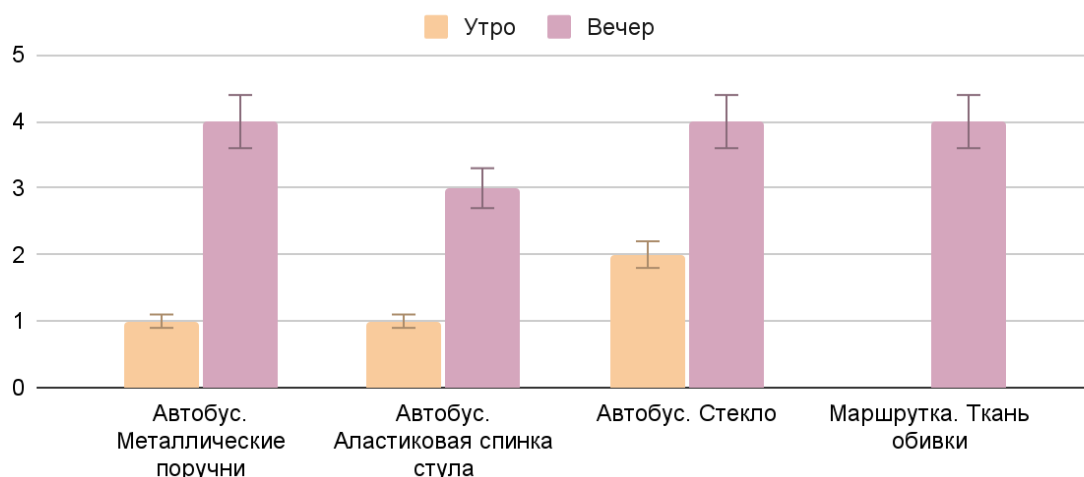


Рисунок 15. Обсемененность различных поверхностей в наземном транспорте.

Так, в пробах общественного транспорта, количество колоний вечером в 2-4 раза превышало значения, полученные утром. При этом на всех исследованных поверхностях достигалась примерно одинаковая численность микроорганизмов.

Для проб, взятых в метро (Рис.11), наблюдается сходная динамика, однако видна разница между количеством колоний в пробах, взятых с поверхности стекла и с пластиковых поручней. Таким образом, можно заключить, что на стекле в метро микроорганизмов накапливается больше.

Анализ пробы, взятой после обработки в метро показывает, что несмотря на то, что исследованная поверхность не была абсолютно стерильной, чего в принципе сложно было бы добиться, такую обработку можно считать более эффективной. В этих пробах наблюдали лишь единичные колонии, образованные грамположительными сарцинами, вероятно относящимися к *Micrococcus*. Спорообразующих форм обнаружено не было.

Обсемененность различных поверхностей в метро

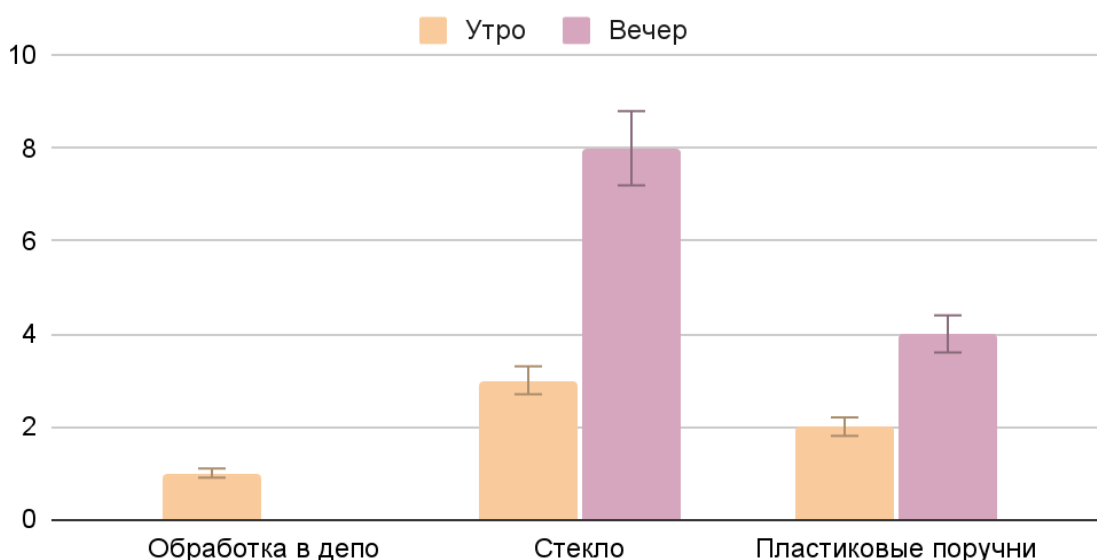


Рисунок 16. Обсемененность различных поверхностей в метро

Выводы

Проведенные исследования микробиоты общественного транспорта показали, что на металлических поручнях, пластиковых поручнях и спинках стульев и стекле скапливается различное число микроорганизмов. Патогенных видов не обнаружено. Были выявлены организмы, входящие в состав микрофлоры рук человека. Однако необходимость разработки методических документов, нормирующих показатели ОМЧ на поверхностях в транспорте и нормирующих правила дезинфекции автобусов, остаётся актуальной.

Список научной литературы

1. Harwood C. R. Bacillus. : Springer Science & Business Media, 1989. 442 с.
2. Белова И. и др. ВИДОВОЙ СОСТАВ МИКРОБИОТЫ АВТОБУСОВ ВНУТРИГОРОДСКИХ МАРШРУТОВ // Здоровье населения и среда обитания.

2021. № 4. С. 10–17.

3. Нетрусов А. И. и др. Практикум по микробиологии. , 2005.

4. Тихонов В., Николаева О., Пильгун П. Оценка численности микроорганизмов в воздухе общественного транспорта Москвы в зимний период // Городские исследования и практики. 2018. Т. 3. № 3. С. 36–47.

5. Al-Alawi A. и др. Aspergillus-Related Lung Disease // Canadian Respiratory Journal. 2005. Т. 12. С. 377–387.

6. Belkum A., Hermans P. V. BOX PCR Fingerprinting for Molecular Typing of *Streptococcus pneumoniae* | Springer Nature Experiments // Antibiotic Resistance. , 2001.

7. Chen Y.-L. и др. Obtaining long 16S rDNA sequences using multiple primers and its application on dioxin-containing samples // BMC Bioinformatics. 2015. Т. 16. № Suppl 18. С. S13.

8. Klimenko N. S. и др. Co-occurrence patterns of bacteria within microbiome of Moscow subway // Computational and Structural Biotechnology Journal. 2020. Т. 18. С. 314–322.

9. Lee A., Wong E. Optimization and the Robustness of BOX A1R PCR for DNA Fingerprinting Using Trout Lake *E. coli* Isolates // 2009. Т. 13. С. 104–113.

10. Pochtovyi A. A. и др. Microbiological Characteristics of Some Stations of Moscow Subway // Biology. 2022. Т. 11. № 2. С. 170.

11. Scott E. B. An Overview of the Genus *Aspergillus* // The Aspergilli. , 2007.

12. Среднесуточный пассажиропоток города Москвы // Единый транспортный портал URL: <https://transport.mos.ru/> (дата обращения: 30.01.2023).

13. Генетика микробиоты Москвы // Исследование микробиоты в клинике Атлас URL: <https://open-resource.ru/spisok-literatury/> (дата обращения: 30.01.2023).

14. Об утверждении санитарных правил СП 2.5.3650-20 "Санитарно-эпидемиологические требования к отдельным видам транспорта и объектам транспортной инфраструктуры" // Электронный фонд правовой и нормативно-технической информации URL:

<https://docs.cntd.ru/document/566406892?marker=6560IO> (дата обращения: 30.01.2023).

15. Д. Васина, А.М. Щетинин, Р.С. Овчинников и др. Микробиологические характеристики некоторых станций московского метрополитена // MDPI URL: <https://www.mdpi.com/2079-7737/11/2/170>

16. Ученые выяснили, какие микробы живут в московском метро // РИО новости URL: <https://ria.ru/20200213/1564643478.html>