

# БАКТЕРИОЦЕНОЗЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ПОВЕРХНОСТНЫМИ ОТЛОЖЕНИЯМИ ГОРОДА ЕКАТЕРИНБУРГА: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

М. В. Модоров<sup>1</sup>, Г. А. Лиходеевский<sup>3</sup>, А. А. Селезнев<sup>2</sup>, И. В. Ярмошенко<sup>2</sup>,  
Г. П. Малиновский<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Институт экологии растений и животных УрО РАН г. Екатеринбург, Россия*

<sup>2</sup> *Институт промышленной экологии УрО РАН г. Екатеринбург, Россия*

<sup>3</sup> *Уральский аграрный университет г. Екатеринбург, Россия*

С использованием метода высокопроизводительного секвенирования изучен состав бактериоценозов, ассоциированных с поверхностными пылегрязевыми городскими отложениями г. Екатеринбурга. Получена информация о составе сообщества. В работе приведен список таксонов бактерий, ассоциированных с поверхностными городскими отложениями г. Екатеринбурга. Девять таксонов из этого списка относятся к патогенам. Как минимум два обнаруженных вида из этого списка, а именно *Salmonella bongori* и *Shigella boydii*, способны вызывать инфекцию у людей с «нормальным» уровнем иммунитета. Выбранный метод выделения ДНК дал очень низкий выход целевого продукта, что мы связываем с использованием коммерческого набора *innuSPEED Soil DNA Kit* (Analytik Jena, Германия). Вследствие методических сложностей оценку структуры бактериоценозов провести не удалось.

**Ключевые слова:** бактерии; патогены; NGS; высокопроизводительное секвенирование; урбанизированная среда; пылегрязевые отложения.

## 1. Введение

По данным Всемирного банка, в 2020 г. на земле проживало 7,79 млрд человек, 56 % из которых составляли горожане. В Российской Федерации доля численности городского населения выше среднемировой, лишь четверть населения живет за пределами городов (The World Bank, 2022). Урбанизированная среда, без сомнения, имеет свою специфику, к которой можно отнести высокую плотность населения, интенсивное загрязнение воздуха, видовой состав растительности и ее малое обилие, нарушение почв, высокую гетерогенность ландшафтов и т. д. Исследование городских экосистем важно для создания и поддержания достойного уровня жизни значительной части населения РФ, включая снижение рисков возникновения и распространения заболеваний.

Микроорганизмы, присутствуя во всех городских средах: в воде, воздухе, пыли и почвах постоянно попадают на кожу и слизистые, в органы дыхания и желудочно-кишечный тракт человека. Следствием контакта человека с патогеном может стать развитие инфекции, поэтому выявление и контроль распространения патогенов стали важными элементами контроля качества городских экосистем (Brodie et al.,

2007; Nembach et al., 2019; Cui et al., 2019). Ряд исследований указывает на существование связи микробиома городской среды с заболеваниями неинфекционной природы, такими как астма и аллергические реакции, однако механизм этой связи не до конца ясен (Flies et al., 2020). В качестве триггеров нарушений иммунной системы рассматривают либо снижение числа микроорганизмов, с которыми контактирует человек (Strachan, 1989), либо снижение уровня таксономического разнообразия микробиома окружающего человека (Bach, 2002; Nurminen et al., 2018; Hui, 2019).

Фундаментальные исследования свидетельствуют о том, что бактериальные сообщества городских сред имеют определенные особенности, отличающие их от сообществ естественных экосистем и сельской местности. В частности, уровень таксономического разнообразия бактериальных сообществ почвы городских зеленых зон выше, чем в почвах прилежащих к городам природных экосистем (Delgado-Baquerizo et al., 2021). В то же время разнообразие и число бактериальных клеток в воздухе и пыли городов ниже, чем в сельской местности (Hui et al., 2019; Flies et al., 2020). Бактериальные сообщества различных городов имеют более высокий уровень сходства между собой в сравнении со сходствами сообществ, присутствующих в природных экосистемах и сельской местности, что справедливо для городских зеленых зон (Delgado-Baquerizo et al., 2021) и аэробактериома (Barberán et al., 2015). В почвах городских зеленых зон выше обилие таксонов *Deltaproteobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Gammaaproteobacteria* и *Bacteroidetes*. Высокая представленность двух последних таксонов может быть связана с их относительно быстрым ростом (Delgado-Baquerizo et al., 2021). В микробиомах городских зеленых зон повышено содержание генов, ассоциированных с выбросами парниковых газов, а также генов устойчивости к антибиотикам (например, бета-лактамазы), что потенциально может иметь важные последствия для здоровья человека, так как в результате горизонтального переноса генов их могут получить патогенные микроорганизмы (Delgado-Baquerizo et al., 2021).

Современные технологии, в частности методы высокопроизводительного секвенирования (NGS, next-generation sequencing), позволяют описать микробиоценоз любой среды с высоким таксономическим разрешением (Микрюков и др., 2021). Однако в случае исследований микробиома почвы существует ряд сложностей, приводящих к смещению получаемых результатов. Почва как среда обитания микроорганизмов характеризуется громадным количеством случайных и неизвестных физико-химических и биологических факторов, оказывающих влияние на структуру микробиомов. Помимо этого, существуют методические сложности, связанные с выделением и очисткой ДНК, в частности, необходимостью разрушения клеточных стенок, диспергирования почвенных агрегатов и очистки экстрактов от гуминовых кислот, ингибирующих полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Третья группа сложностей связана с высоким биоразнообразием, широким диапазоном физиологических состояний живых организмов, а также присутствием в почве внеклеточной ДНК, что затрудняет интерпретацию получаемых таксономических списков (Семенов, 2019). Вся совокупность биологических и методических сложностей затрудняет прямое сравнение результатов метабаркодинга почвенных образцов, полученных в различных лабораториях, однако в рамках одного протокола результаты анализа различных образцов можно считать сопоставимыми.

Город можно рассматривать как гетерогенную среду, связанную большим числом логистических потоков. Интерес представляет оценка сходства бактериальных сообществ города в зависимости как от типа субстрата, так и от места отбора образцов. Можно предполагать, что сообщество микроорганизмов, ассоциированное с дорожной сетью, будет относительно однородным, так как

придорожные субстраты связаны автотранспортом и людскими потоками. В то же время сообщество микроорганизмов дворовых территорий кварталов многоквартирных домов, локализованных в различных районах города, будет более гетерогенным, так как миграционные потоки здесь меньше.

В современной городской среде в результате действия природных и антропогенных седиментационных процессов образуется значительное количество пылегрязевого осадка (наносов) (Seleznev et al., 2019; 2020). Седиментационные процессы происходят по принципу каскада, часть седимента остается на различных участках городского ландшафта и объектах инфраструктуры. Отложения на городских территориях имеют высокое содержание минеральных включений, продуктов абразии дорожного покрытия и разметки, истирания шин и тормозных колодок, коррозии металлических частей автотранспорта, микропластика и др. Накопление отложений значительно возрастает при недостаточной уборке и нарушении технологий благоустройства города (Yarmoshenko et al., 2020).

В данном исследовании будут приведены результаты пилотного исследования бактериоценозов, ассоциированных с поверхностными пылегрязевыми отложениями крупного промышленного города (на примере г. Екатеринбурга). В рамках исследования ставили следующие задачи:

1. Составить список бактерий (включая патогенные таксоны), ассоциированных с поверхностными отложениями г. Екатеринбурга.
2. Описать пространственную структуру бактериоценоза поверхностных отложений г. Екатеринбурга.

## 2. Материалы и методы

Отбор поверхностных городских отложений для определения в них состава бактериальных сообществ был проведен в Екатеринбурге в течение двух дней в августе 2021 г. В эти дни, так же как и за неделю до них, стояла сухая жаркая погода. Для отбора были использованы стерильные пластиковые емкости объемом 120 мл. В пределах каждого квартала выделяли пять ландшафтных зон, а именно газон, проезд и игровую площадку, расположенные внутри дворовой территории, а также газон и дорогу, расположенные за пределами дворовой территории. Схема отбора проб приведена в табл. 1 и 2. Всего в пяти жилых кварталах, расположенных в различных частях города, был отобран 51 образец грунта (на газонах) и поверхностных отложений в других ландшафтных зонах (дорожная пыль, рыхлые наносы летне-осеннего сезона). С учетом высокой ожидаемой вариабельности состава бактериоценозов проводили два-три параллельных отбора проб (табл. 1).

Таблица 1. Число повторностей при отборе проб в пяти локациях г. Екатеринбурга

№ площадки / улица	Ландшафтная зона					Всего образцов
	внутри двора			вне двора		
	1.1 газон	1.2 проезд	1.3 игровая площадка	2.1 газон	2.2 дорога	
1 / Машиностроителей	3	3	3		2	11
2 / Смазчиков	3	3	3		2	11
3 / Краснолесья	3	3	3		1	10
4 / Жукова	3			3	2	8
5 / Родонитовая	3	3		3	2	11
Всего образцов	15	12	9	6	9	51

Таблица 2. Координаты отбора проб поверхностных отложений в августе 2021 г. на пяти участках, расположенных в черте г. Екатеринбурга

№ пробы	№ площадки	Ландшафтная зона *	Координаты места отбора пробы	
			С.Ш.	В.Д.
1	1	ВД проезд	56.882980	60.568636
2	1	ВД проезд	56.882910	60.568658
3	1	ВД проезд	56.883127	60.568470
4**	1	ВД ИП	56.882934	60.568920
5	1	ВД ИП	56.883084	60.568976
6**	1	ВД ИП	56.883203	60.568980
7**	1	ВД газон	56.883172	60.568287
8	1	ВД газон	56.883346	60.568340
9	1	ВД газон	56.883452	60.568300
10	1	ВнД дорога	56.883903	60.567874
11	1	ВнД дорога	56.883829	60.566999
13	2	ВнД дорога	56.860239	60.622657
14	2	ВнД дорога	56.859994	60.622172
16	2	ВД газон	56.859708	60.622918
17	2	ВД газон	56.859486	60.623040
18	2	ВД газон	56.859341	60.623099
19**	2	ВД проезд	56.859176	60.623143
20**	2	ВД проезд	56.859350	60.623053
21	2	ВД проезд	56.859590	60.622945
22	2	ВД ИП	56.859139	60.623026
23	2	ВД ИП	56.859384	60.622912
24	2	ВД ИП	56.859590	60.622804
25	3	ВнД дорога	56.780736	60.544058
26	3	ВнД газон	56.781353	60.543358
27	3	ВнД газон	56.781353	60.543358
28	3	ВнД газон	56.781353	60.543358
29	3	ВД газон	56.781484	60.543754
30	3	ВД газон	56.781484	60.543754
31	3	ВД газон	56.781484	60.543754
32**	3	ВД ИП	56.781484	60.543754
33	3	ВД ИП	56.781729	60.544149
34	3	ВД ИП	56.781768	60.544107
36	4	ВД газон	56.839932	60.587999
37	4	ВД газон	56.839932	60.587999
38	4	ВД газон	56.839932	60.587999
39	4	ВнД дорога	56.838799	60.588826
40	4	ВнД дорога	56.838799	60.588826
41	4	ВнД газон	56.838877	60.588581
42	4	ВнД газон	56.838902	60.588950
43	4	ВнД газон	56.838955	60.589595
44**	5	ВнД дорога	56.792491	60.618935
45	5	ВнД дорога	56.792491	60.618935
46	5	ВнД газон	56.792638	60.618778
47	5	ВнД газон	56.792675	60.619056
48	5	ВнД газон	56.792649	60.619341
49	5	ВД газон	56.792867	60.618923
50	5	ВД газон	56.793126	60.619451
51	5	ВД газон	56.793496	60.618988
52	5	ВД проезд	56.793454	60.618957
53	5	ВД проезд	56.793392	60.619317
54	5	ВД проезд	56.793184	60.619256

Примечания: \* ВД – внутри двора, ВнД – вне двора, ИП – игровая площадка;  
 \*\* пробы, для которых был осуществлен метабаркодинг.

Все отобранные образцы после доставки в лабораторию были лиофилизированы при температуре  $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$  и давлении 9 торр до полного обезвоживания. Лиофилизированные образцы хранили при  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Из всех проб, отобранных в летне-осенний период, выделили тотальную ДНК с использованием набора innuSPEED Soil DNA Kit (Analytik Jena, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Для этого брали 100–200 мг лиофилизированного образца. Навески переносили стерильными шпателями для предотвращения кроссконтаминации. Выделенную ДНК хранили при  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Всю полученную ДНК проверяли с помощью постановки ПЦР с праймерами 27F и 1492R специфичными на 16S регион бактериального генома с последующим гель-электрофорезом. Для определения лучшего выхода ПЦР-продукта были проведены постановки ПЦР с четырьмя разными составами реакционной смеси с помощью набора Tersus Plus PCR kit (Евроген) и LongAmp Taq Hot Start ДНК-полимераза (NEB). Постановку ПЦР проводили в амплификаторе BioRad T-100 (BioRad). Использовали следующую схему: предварительная денатурация при температуре  $+95\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 5 мин, затем 30 циклов  $+95\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 20 сек,  $+55\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 30 сек и  $+65\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 2 мин, после чего следовала стадия финальной элонгации при  $+65\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 5 минут. Продукт амплификации проверяли с помощью 1 % агарозного геля.

Пробоподготовку образцов для метабаркодинга проводили с использованием набора реагентов для анализа бактериального метагенома 16S Barcoding Kit (Oxford Nanopore Technologies). Для этого были использованы образцы с наиболее «качественной ДНК» (после этапа очистки ПЦР продукт этих образцов на агарозном геле был наиболее ярким). Для чтения последовательностей применяли проточную ячейку для секвенирования MinION Flow Cell (R9.4) (Oxford Nanopore Technologies).

По результатам работы MinION Flow Cell (R9.4) были получены результаты прочтений в формате fast5, для их обработки использовали программное обеспечение Guppy v6.1. В дальнейшем для каждого прочтения с использованием облачного сервиса Epi2Me и реализованного в нем протокола Fastq Barcoding проводили отнесение каждого чтения к конкретной пробе. После чего с использованием сервиса Epi2Me и анализа Fastq 16S проводили определение таксономической (родовой/видовой) принадлежности чтений, т.е. получение таксономического состава сообщества каждой пробы и количества чтений каждого таксона. Статистическую обработку результатов проводили с использованием R-project (R Core Team, 2018).

### **3. Результаты**

Проверка качества выделенной ДНК, проведенная с использованием ПЦР фрагмента 16S региона бактериального генома с последующим гель-электрофорезом ПЦР-продукта, свидетельствовала о плохом качестве ДНК-матрицы. Мы предполагаем, что причиной непредсказуемого течения амплификации могли стать вещества, содержащиеся в образцах и сохраняющиеся с экстрагированной ДНК, в частности, гуминовые кислоты. В связи с этим проводили очистку выделенной ДНК на магнитных частицах AMPure XP (Beckman Coulter Life Sciences). Кроме этого, дополнительно тестировали возможность успешной и воспроизводимой постановки ПЦР с тотальной ДНК, разведенной в 10 и 100 раз. По результатам тестов ДНК качественной матрицы, необходимой для проведения метабаркодинга, удалось получить лишь для 12 образцов.

По результатам анализа 12 образцов были получены прочтения 365 856 операционных таксономических единиц (Operational Taxonomic Unit, OTU), из

них 17 624 прочтений на уровне сходства 97 % соответствовали референсным последовательностям бактерий, депонированным в базе NCBI. В табл. 3 приведены данные о пяти образцах, в которых на уровне сходства 97 % с референсными последовательностями бактерий, депонированных в базе NCBI, было получено более 500 прочтений. Высокого обилия (> 0,5 %) в полученных образцах достигают 75 видов бактерий, для 12 из которых частота встречаемости в пробах превышает 10 %. К ним относятся *Actinoplanes siamensis*, *Cryobacterium psychrophilum*, *Curvibacter lanceolatus*, *Escherichia fergusonii*, *Gemmatimonas phototrophica*, *Haliscomenobacter hydrossis*, *Hymenobacter glacieicola*, *Kiritimatiella glycovorans*, *Mycetocola zhadangensis*, *Nodosilinea alaskaensis*, *Oscillatoria nigro-viridis*, *Planktothrix pseudagardhii*, *Simplicispira soli*, *Sphingomonas yantingensis*, *Variovorax ginsengisoli*.

Девять из обнаруженных таксонов входят в список патогенных микроорганизмов (Taylor et al., 2001). Патогены с указанием пробы, в которых они обнаружены, приведены в табл. 4.

Таблица 3. Виды бактерий, обнаруженные в поверхностных отложениях г. Екатеринбурга с частотой встречаемости в одной пробе более 0,5 %.

Таксон	Номер образца (в соответствии с табл.2)						
	4	6	7	19	20	32	44
<i>Acidovorax delafieldii</i>				+++			
<i>Actinoplanes derwentensis</i>	+++						
<i>Actinoplanes philippinensis</i>	+++						
<i>Actinoplanes siamensis</i>	++++						
<i>Acidovorax radialis</i> N35					++		
<i>Acidovorax wautersii</i>		+		++			
<i>Aliterella antarctica</i>					+++		
<i>Annwoodia aquaesulis</i>				+	+++		
<i>Arenimicrobium luteum</i>					+++		
<i>Arthrospira platensis</i>		+++					
<i>Baaleninema simplex</i>		+++					
<i>Blastocatella fastidiosa</i>				+++			
<i>Brucella microti</i>			+++				+
<i>Chroococciopsis thermalis</i> PCC 7203		+++			+		
<i>Comamonas aquatilis</i>				+++			
<i>Comamonas testosteroni</i>				+++			
<i>Cryobacterium psychrophilum</i>			++++				
<i>Curvibacter lanceolatus</i>						++++	
<i>Desulfosarcina widdelii</i>		+			++		
<i>Dissulfuribacter thermophilus</i>					++		
<i>Ereboglobus luteus</i>					+++		
<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469							++++
<i>Fructilactobacillus vespulae</i>		++					
<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> T-27					+++		
<i>Gemmatimonas phototrophica</i>		+			++++		
<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>				++++			
<i>Haloleptolyngbya alcalis</i>		+++			++	+++	
<i>Heliimonas saccharivorans</i>		++	+				
<i>Hydrogenophaga palleronii</i>		++					
<i>Hydrogenophaga soli</i>		++		++		++	+
<i>Hymenobacter frigidus</i>					++		

Таксон	Номер образца (в соответствии с табл. 2)						
	4	6	7	19	20	32	44
<i>Hymenobacter glacieicola</i>							++++
<i>Hymenobacter jejuensis</i>					+++		+
<i>Hymenobacter marinus</i>					+++		+
<i>Isosphaera pallida</i>		++					
<i>Kiritimatiella glycovorans</i>	+				++++		
<i>Kosakonia sacchari</i>							++
<i>Kribbella albertanoniae</i>	++						
<i>Limnohabitans curvus</i>				++			+
<i>Limnoraphis robusta</i>		+++					
<i>Luteitalea pratensis</i>		+++					
<i>Luteolibacter algae</i>		++					
<i>Mangrovihabitans endophyticus</i>	++						
<i>Melaminivora jejuensis</i>			+	+++	+++		+
<i>Microbacterium esteraromaticum</i>			+++				
<i>Microbacterium nanhaiense</i>			++				
<i>Micromonospora ovatispora</i>	+++						
<i>Mycetocola zhadangensis</i>			++++				
<i>Nemorincola caseinilytica</i>					++		
<i>Nesterenkonia massiliensis</i>		++	+	+			
<i>Nitrospira lenta</i>				+++			
<i>Nocardioides albertanoniae</i>	+++			+			
<i>Nocardioides insulae</i>	+++						
<i>Nocardioides intraradicalis</i>	+++						
<i>Nocardioides panacihumi</i>	+++						
<i>Nodosilinea alaskaensis</i>		++++					
<i>Nonomuraea flavida</i>	+++						
<i>Nonomuraea guangzhouensis</i>	++						
<i>Okibacterium endophyticum</i>			+++				
<i>Okibacterium fritillariae</i>			++				
<i>Oscillatoria sancta</i> PCC 7515					++	++	
<i>Oscillatoria nigro-viridis</i>		+				++++	
<i>Paludibaculum fermentans</i>				+++	+++		
<i>Parahymenobacter ocellatus</i>					+++		
<i>Peptoniphilus grossensis</i> ph5				+++	++		
<i>Planktothrix pseudagardhii</i> T1-8-4		++++					
<i>Planktothrix spiroides</i>		+++					
<i>Pseudacidovorax intermedius</i>				+++			
<i>Roseomonas fluminis</i>						+++	
<i>Rhodoferrax ferrireducens</i> T118		+		+++			+
<i>Roseomonas aquatica</i>							++
<i>Roseomonas frigidaquae</i>		+++					
<i>Salinifilum aidingensis</i>	+++	+	++	+++			+
<i>Salipiger abyssi</i>					++		
<i>Schleiferia thermophila</i>				+++			
<i>Schleiferilactobacillus shenzhenensis</i>		++					
<i>Sediminibacterium salmoneum</i> NBRC 103935					+++		

Таксон	Номер образца (в соответствии с табл. 2)						
	4	6	7	19	20	32	44
<i>Shigella boydii</i>							++
<i>Simplicispira hankyongi</i>				++			
<i>Simplicispira metamorpha</i>				+++			
<i>Simplicispira soli</i>		+		++++			
<i>Sphingomicrobium marinum</i>				+	+++		+
<i>Sphingomonas yangtingensis</i>							++++
<i>Spiribacter salinus M19-40</i>		+		+++			
<i>Streptosporangium nanhuense</i>	++						
<i>Streptosporangium terrae</i>	+++						
<i>Terriglobus tenax</i>				+++			
<i>Thermanaeromonas burensis</i>		+	+++				
<i>Tumebacillus soli</i>		+++					
<i>Variovorax ginsengisoli</i>		++++		+			+
<i>Variovorax humicola</i>		+++					+
<i>Variovorax robiniae</i>		+					++

Примечание: ++++ – виды, обилие которых в пробе превышает 10 %; +++ – виды, обилие которых в пробе составляет 1–10%; ++ – 0,5–1%; + – менее 0,5 %.

Таблица 4. Число OTU патогенных бактерий, обнаруженных в семи робах пылегрязевых отложений г. Екатеринбурга

Таксон	Число OTU таксона в проанализированных образцах (номер образца приведен в соответствии с табл. 2)						
	4	6	7	19	20	32	44
<i>Brevundimonas diminuta</i>			2				
<i>Citrobacter koseri</i>							2
<i>Comamonas testosteroni</i>				17			
<i>Escherichia coli</i>							18
<i>Eubacterium limosum</i>					2		
<i>Pantoea agglomerans</i>					2		
<i>Salmonella bongori</i>							2
<i>Shigella boydii</i>							176
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>							2
Число OTU, на уровне сходства 97 % соответствующих референсным последовательностям бактерий, депонированным в базе NCBI	406	1 656	3 994	654	644	284	9 338

– *Brevundimonas diminuta* считается таксоном широко распространенным в окружающей среде, в клинических образцах выделяется редко (Han, Andrade, 2005). В незначительном обилии (< 0,1 %) обнаружена в одной пробе (№ 7, газон внутри двора);

– *Citrobacter koseri* (ранее называемая *C. diversus*) – маловирулентный патоген, способный вызывать опасные для жизни инфекции (например, менингит), особенно у новорожденных и пациентов со сниженным иммунитетом. Лечение требует обязательной антимикробной терапии (Devenci, Coban, 2014). В незначительном количестве (< 0,1 %) обнаружена в одной пробе (№ 44, дорога снаружи домовой территории);

– *Comamonas testosteroni* – широко распространенная в природной среде бактерия, не являющаяся частью микробиома человека, обладает низкой вирулентностью. Ассоциируется с инфекцией кровеносной системы



и гастроэнтеритом (Faroog et al., 2017). В значительном количестве (2,6 % выборки) обнаружена в одной пробе (№ 19, отобрана в проезде в пределах дворовой территории);

– *Escherichia coli* является частью нормальной флоры кишечника теплокровных животных, большинство ее штаммов являются безвредными. Ряд серотипов может вызывать тяжелые пищевые отравления у людей и животных. Присутствие кишечной палочки в поверхностных отложениях может быть объяснено выгулом домашних животных, например, собак. Все обнаруженные *E. coli* были отмечены в одной пробе (№ 44), отобранной на дороге снаружи домовой территории;

– *Eubacterium limosum* – представитель нормальной микрофлоры человека, в единичных случаях высокая численность этой бактерии ассоциирована с заболеваниями (Sungkanuparph et al., 2002). В незначительном количестве (< 0,1%) обнаружена в одной пробе (№ 20, проезд внутри домовой территории);

– *Pantoea agglomerans* – ассоциированная с растениями бактерия, не являющаяся облигатным возбудителем инфекции у человека. Описана как инфекция, возникающая при инфицировании раны растительным материалом, и как внутрибольничная инфекция, в основном у людей с ослабленным иммунитетом. В большинстве случаев течение заболевания протекает легко, но встречаются описания летальных случаев (Dutkiewicz et al., 2016). В незначительном количестве (< 0,1 %) обнаружена в одной пробе (№ 20, проезд внутри домовой территории);

– *Salmonella bongori*. Сальмонеллы являются возбудителем, наиболее частой причиной возникновения диареи, могут длительное время сохраняться в окружающей среде (Salmonella, 2022). В незначительном количестве (< 0,1 %) обнаружена в одной пробе (№ 44, дорога снаружи домовой территории);

– *Shigella boydii* – причина дизентерийного заболевания, симптомы которого варьируют от легкого кишечного дискомфорта до смерти. Ежегодно бактерии рода *Shigella* вызывают до 165 млн случаев заболеваний, из которых примерно 1,1 млн случаев приводят к смерти (Kotloff et al., 2013; Kania et al., 2016). В значительном количестве (1,9 % выборки) обнаружена в одной пробе (№ 44, дорога снаружи домовой территории).

– *Sphingomonas paucimobilis*. Бактерия ассоциирована с почвой, может вызывать инфекции у пациентов с хроническими заболеваниями или подавленным иммунитетом (Göker et al., 2017). В незначительном количестве (< 0,1 %) обнаружена в одной пробе (№ 44, дорога снаружи домовой территории).

Для визуализации структуры населения бактерий использовали один из методов ординации, а именно неметрическое многомерное шкалирование (non-metric multidimensional scaling, NMDS), реализованное в пакете vegan (Version 2.6 – 2.2022). Выбранный подход (ординация) является стандартным способом визуализации результатов исследования сообществ живых организмов. Его результатом является рисунок (как правило, представляемый в двух или трех осях координат), на котором каждая отдельная проба (сообщество) отмечена точкой. Расстояние между точками соответствует уровню сходства проб, в данном случае мере сходства Брея – Кертиса (Bray – Curtis dissimilarity metric). Чем ближе точки друг к другу, тем выше сходство таксоценов сравниваемых проб.

В качестве характеристик сообщества бактерий использовали таксономическую категорию классов OTU, для которых на уровне сходства 95% было обнаружено соответствие референсным последовательностям бактерий, депонированным в базе NCBI (всего 42 379 OTU). Для анализа были отобраны пробы, в которых было расшифровано более 500 OTU, всего таких проб было семь. Прошедшие пробы не образовали выраженных кластеров, ассоциированных либо по

географической удаленности, либо по ландшафтной зоне (рис. 1). Однозначно интерпретировать данные рисунка сложно по причине небольшого числа проб, для которых получены надежные результаты.

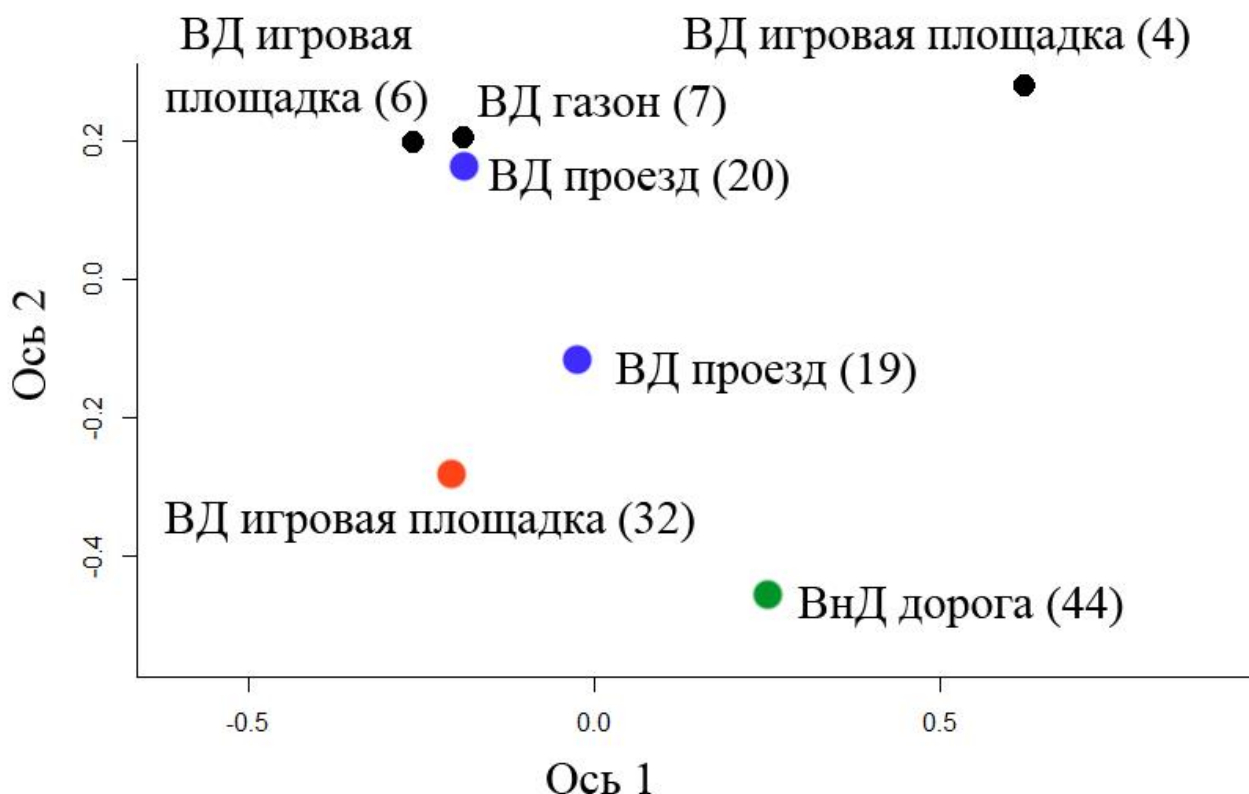


Рис. 1. NMDS – ординация семи бактериоценозов, ассоциированных с пылегрязевыми отложениями г. Екатеринбурга. Цветами показаны различные локации города, подписи характеризуют различные ландшафтные зоны. ВД – внутри дворовой территории, ВнД – вне дворовой территории. Цифра в скобках соответствует номеру образца в табл. 2

#### 4. Обсуждение и выводы

В нашем исследовании впервые для г. Екатеринбурга была предпринята попытка описать структуры бактериальных сообществ поверхностных городских отложений. Список обнаруженных таксонов включает девять видов, относимых к патогенам. Как минимум два обнаруженных вида из этого списка, а именно *Salmonella bongori* и *Shigella boydii*, способны вызывать инфекцию у людей с «нормальным» уровнем иммунитета.

Экологическая интерпретация полученных данных преждевременна. По причине плохого качества мультиплицирования случайных матриц ДНК на первых циклах ПЦР таксономический состав бактериоценоза отобранных образцов может быть значительно смещен. Распределение патогенов по образцам может быть объяснено числом прочтенных OTU, а не ландшафтной зоной в месте отбора образца. Так, наибольшее число видов патогенных микроорганизмов было отмечено в пробе № 44 (дорога за пределами дворовой территории), для которой количество прочтенных OTU также было максимальным. Ординация проб могла бы иметь экологическую интерпретацию, если бы образцы были сгруппированы в четко интерпретируемые группы (например, по типу ландшафтной зоны либо по номеру площадки), но этого мы не наблюдаем. Любые более сложные экологические закономерности либо не сильно выраженные связи между бактериоценозами различных образцов на данном этапе исследования выявить нельзя.

Высокопроизводительное секвенирование почвенных образцов является методически сложным процессом, что обусловлено большим количеством компонентов почвы и способностью гуминовых кислот ингибировать ПЦР (Семенов, 2019). В то же время высокое качество выделенной ДНК является необходимым условием успешного выполнения исследования. Используемый нами коммерческий набор для выделения ДНК из почвы innuSPEED Soil DNA Kit (Analytik Jena, Германия) давал незначительный выход целевого продукта, что не позволило провести качественную пробоподготовку образцов поверхностных отложений. На незначительный выход ДНК, полученный с применением этого набора реагентов, указывается и в других исследованиях (Knauth et al., 2012). Для увеличения числа качественно проанализированных проб в дальнейшем планируется использовать иные наборы, предназначенные для выделения ДНК из почвенных образцов.

## 5. Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, грант № 18-77-10024-П.

## 6. Список литературы

1. Анализ экологических сетей многокомпонентных сообществ микроорганизмов: Возможности, ограничения, потенциальные ошибки / В. С. Микрюков, О. В. Дуля, Г. А. Лиходеевский, Е. Л. Воробейчик // Экология. – 2021. – № 3. – С. 179–192.
2. Семенов, М. В. Метабаркодинг и метагеномика в почвенно-экологических исследованиях: успехи, проблемы и возможности / М. В. Семенов // Журнал общей биологии 2019. – Т. 80 (6). – С. 403–417.
3. Bach, J. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases / J. Bach // N. Engl. J. Med. – 2002. – Vol. 347 (12). – P. 911–920.
4. Continental-scale distributions of dust-associated bacteria and fungi / A. Barberán, J. Ladau, J.W. Leff [et al.] // PNAS. – 2015. – Vol. 112. – P. 5756–5761.
5. Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations / E. L. Brodie, T. Z. DeSantis, J. P. M. Parker [et al.] // PNAS. – 2007. – Vol. 104. – P. 299–304.
6. Diversity and abundance of bacterial pathogens in urban rivers impacted by domestic sewage / Q. Cui, Y. Huang, H. Wang, T. Fang // Environmental pollution. – 2019. – Vol. 249. – P. 24–35.
7. Global homogenization of the structure and function in the soil microbiome of urban greenspaces / M. Delgado-Baquerizo, D. J. Eldridge, Y. Liu [et al.] // Science advances. – 2021. – Vol. 7: eabg5809.
8. Deveci, A. Optimum management of *Citrobacter koseri* infection / A. Deveci, A.Y. Coban // Expert Rev. Anti Infect. Ther. – 2014. – Vol. 12(9). – P. 1137–1142.
9. Dutkiewicz, J. Pantoea agglomerans: a mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants / J. Dutkiewicz, B. Mackiewicz, M. K. Lemieszek // Annals of Agricultural and Environmental Medicine. – 2016. – Vol. 23 (2). – P. 197–205
10. Farooq, S. Comamonas testosteroni: Is It Still a Rare Human Pathogen? / S. Farooq, R. Farooq, N. Nahvi // Case Rep Gastroenterol. – 2017. – Vol. 11. – P. 42–47.
11. Urbanisation reduces the abundance and diversity of airborne microbes - but what does that mean for our health? A systematic review / E. J. Flies, L. J. Clarke, B. W. Brook, P. Jones // Science of the Total Environment. – 2020. – Vol. 738: 140337.
12. Göker, T. *Sphingomonas paucimobilis* : A rare infectious agent found in cerebrospinal fluid / T. Göker, R. Z. Aşık, M. B. Yılmaz // J. Korean Neurosurg Soc. – 2017. – Vol. 60(4). P. 481–483.
13. Han, X. Y. *Brevundimonas diminuta* infections and its resistance to fluoroquinolones / X. Y. Han, R. A. Andrade // J. of Antimicrobial Chemotherapy. – 2005. – Vol. 55. P. 853–859.
14. Dissemination prevention of antibiotic resistant and facultative pathogenic bacteria by ultrafiltration and ozone treatment at an urban wastewater treatment plant / N. Hembach, J. Alexander, C. Hiller [et al.] // Scientific reports. – 2019. – 9:12843.

15. Hui, N. Temporal variation in indoor transfer of dirt-associated environmental bacteria in agricultural and urban areas / N. Hui, A. Parajuli, R. Puhakka // *Environment International*. – 2019. – Vol. 132. 105069
16. Genome diversity of *Shigella boydii* / D. A. Kania, T. H. Hazen, A. Hossain [et al.] // *Pathogens and Disease*. – 74. – 2016, ftw027.
17. Knauth, S. Comparison of commercial kits for the extraction of DNA from paddy soils / S. Knauth, H. Schmidt, R. Tippkotter // *Letters in Applied Microbiology*. – 2012. – Vol. 56. – P. 222–228.
18. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study / K. L. Kotloff, J. P. Nataro, W. C. Blackwelder [et al.] // *The lancet*. – 2013. – Vol. 383 (9888). – P. 209–222.
19. Nature-derived microbiota exposure as a novel immunomodulatory approach / N. Nurminen, J. Lin, M. Grönroos [et al.] // *Future Microbiol.* – 2018. – Vol. 13 (7). – P. 737–744.
20. R Core Team, 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing.
21. Salmonella (non-typhoidal). – URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)). 2022.
22. Seleznev A. A. Assessment of Total Amount of Surface Sediment in Urban Environment Using Data on Solid Matter Content in Snow-Dirt Sludge / A. A. Seleznev, I. V. Yarmoshenko, G. P. Malinovsky // *Environmental Processes*. – 2019. – Vol. 6. – No 3. – P. 581–595. – DOI 10.1007/s40710-019-00383-w. – EDN XZMXJF.
23. Seleznev, A. A. Urban geochemical changes and pollution with potentially harmful elements in seven Russian cities / A. A. Seleznev, I. V. Yarmoshenko, G. P. Malinovsky // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – No 1. – P. 1668. – DOI 10.1038/s41598-020-58434-4. – EDN FLOMUR.
24. Strachan D. P. Hay fever, hygiene, and household size / D. P. Strachan // *BMJ*. – 1989. – Vol. 299. – P. 1259–1260.
25. Sungkanuparph, S. Eubacterium bacteremia and colon cancer / S. Sungkanuparph, S. Chansirikarnjana, M. Vorachit, // *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. – 2002. – Vol. 34. – № 12. – P. 941–943.
26. The World Bank, 2022. Urban population data. <https://www.worldometers.info/world-population/world-population-by-year/>, [https://data.worldbank.org/indicator/SP.URB.TOTL.IN.ZS?year\\_high\\_desc=true](https://data.worldbank.org/indicator/SP.URB.TOTL.IN.ZS?year_high_desc=true)
27. Teylor L. H. Risk factors for human disease emergence / L. H. Teylor, S. M. Latham, M. E. J. Woolhouse // *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* – 2001. – Vol. 356. – P. 983–989.
28. A landscape study of sediment formation and transport in the urban environment / I. Yarmoshenko, G. Malinovsky, E. Baglaeva, A. Seleznev // *Atmosphere*. – 2020. – Vol. 11. – No 12. – P. 1320. – DOI 10.3390/atmos11121320. – EDN TCZVAW.

## Сведения об авторах:

**Модоров Макар Васильевич**, к. биол. н., старший научный сотрудник, Институт экологии растений и животных УрО РАН.

**Лиходеевский Георгий Александрович**, научный сотрудник, Уральский аграрный университет. Эл. почта: [georglihodey@gmail.com](mailto:georglihodey@gmail.com)

**Селезнев Андриан Анатольевич**, к. геол.-минер. н., доцент кафедры безопасности жизнедеятельности Института фундаментального образования Уральского федерального университета; старший научный сотрудник лаборатории урбанизированной среды ИПЭ УрО РАН. Эл. почта: [sandrian@rambler.ru](mailto:sandrian@rambler.ru)

**Ярмошенко Илья Владимирович**, к. ф.-м. н., директор Института промышленной экологии УрО РАН. Эл. почта: [ivy@ecko.uran.ru](mailto:ivy@ecko.uran.ru)

**Малиновский Георгий Петрович**, к. биол. н., заместитель директора по научной работе ИПЭ УрО РАН. Эл. почта: [georgy@ecko.uran.ru](mailto:georgy@ecko.uran.ru),

# BACTERIOCENOSSES ASSOCIATED WITH URBAN SURFACE DEPOSITED SEDIMENTS IN EKATERINBURG: A PILOT STUDY

M. V. Modorov<sup>1</sup>, G. A. Lihodeevskiy<sup>2</sup>, A. A. Seleznev<sup>3</sup>, I. V. Yarmoshenko<sup>3</sup>,  
G. P. Malinovsky<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences,  
Ekaterinburg, Russia

<sup>2</sup> Urals State Agrarian University, Ekaterinburg, Russia

<sup>3</sup> Institute of Industrial Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences,  
Ekaterinburg, Russia

*Using the method of high-throughput sequencing, the composition of bacteriocenoses associated with urban surface deposited sediments in Ekaterinburg was studied. Information about the composition of the bacterial community has been received. The paper provides a list of taxa of bacteria associated with the urban sediments in Ekaterinburg. Nine taxa from this list are pathogens. At least two identified species from this list, namely Salmonella bongori and Shigella boydii, are capable of causing infection in people with "normal" immune levels. The chosen method of DNA isolation gave a very low yield of the target product, which we attribute to the use of the commercial innuSPEED Soil DNA Kit (Analytik Jena, Germany). Due to methodological difficulties, it was not possible to assess the structure of bacteriocenoses*

**Key words:** bacteria; pathogens; NGS; high-throughput sequencing; urban environment; surface sediment.

## References

1. Analysis of ecological networks in multicomponent communities of microorganisms: possibilities, limitations, and potential errors. V. S. Mikryukov, O. V. Dulya, E.L. Vorobeichik, G. A. Likhodeevskii // Russian J. of Ecology. 2021. – Vol. 52. № 3. – P. 188–200.
2. *Semenov, M. V.* Metabarcoding and metagenomics in soil ecology research: Achievements, challenges and prospects / M. V. Semenov // Biology Bulletin Reviews. – 2021. – Vol. 11. № 1. – P. 40–53.
3. *Bach, J.* The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases / J. Bach // N. Engl. J. Med. – 2002. – Vol. 347 (12). – P. 911–920.
4. Continental-scale distributions of dust-associated bacteria and fungi / A. Barberán, J. Ladau, J.W. Leff [et al.] // PNAS. – 2015. – Vol. 112. – P. 5756–5761.
5. Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations / E. L. Brodie, T. Z. DeSantis, J. P. M. Parker [et al.] // PNAS. – 2007. – Vol. 104. – P. 299–304.
6. Diversity and abundance of bacterial pathogens in urban rivers impacted by domestic sewage / Q. Cui, Y. Huang, H. Wang, T. Fang // Environmental pollution. – 2019. – Vol. 249. – P. 24–35.
7. Global homogenization of the structure and function in the soil microbiome of urban greenspaces / M. Delgado-Baquerizo, D. J. Eldridge, Y. Liu [et al.] // Science advances. – 2021. – Vol. 7: eabg5809.
8. *Deveci, A.* Optimum management of *Citrobacter koseri* infection / A. Deveci, A.Y. Coban // Expert Rev. Anti Infect. Ther. – 2014. – Vol. 12(9). – P. 1137–1142.
9. *Dutkiewicz, J.* Pantoea agglomerans: a mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants / J. Dutkiewicz, B. Mackiewicz, M. K. Lemieszek // Annals of Agricultural and Environmental Medicine. – 2016. – Vol. 23 (2). – P. 197–205

10. *Farooq, S. Comamonas testosteroni: Is It Still a Rare Human Pathogen?* / S. Farooq, R. Farooq, N. Nahvi // *Case Rep Gastroenterol.* – 2017. – Vol. 11. – P. 42–47.
11. *Urbanisation reduces the abundance and diversity of airborne microbes - but what does that mean for our health? A systematic review* / E. J. Flies, L. J. Clarke, B. W. Brook, P. Jones // *Science of the Total Environment.* – 2020. – Vol. 738: 140337.
12. *Göker, T. Sphingomonas paucimobilis : A rare infectious agent found in cerebrospinal fluid* / T. Göker, R. Z. Aşık, M. B. Yılmaz // *J. Korean Neurosurg Soc.* – 2017. – Vol. 60(4). P. 481–483.
13. *Han, X. Y. Brevundimonas diminuta infections and its resistance to fluoroquinolones* / X. Y. Han, R. A. Andrade // *J. of Antimicrobial Chemotherapy.* – 2005. – Vol. 55. P. 853–859.
14. *Dissemination prevention of antibiotic resistant and facultative pathogenic bacteria by ultrafiltration and ozone treatment at an urban wastewater treatment plant* / N. Hembach, J. Alexander, C. Hiller [et al.] // *Scientific reports.* – 2019. – 9:12843.
15. *Hui, N. Temporal variation in indoor transfer of dirt-associated environmental bacteria in agricultural and urban areas* / N. Hui, A. Parajuli, R. Puhakka // *Environment International.* – 2019. – Vol. 132. 105069
16. *Genome diversity of Shigella boydii* / D. A. Kania, T. H. Hazen, A. Hossain [et al.] // *Pathogens and Disease.* – 74. – 2016, ftw027.
17. *Knauth, S. Comparison of commercial kits for the extraction of DNA from paddy soils* / S. Knauth, H. Schmidt, R. Tippkotter // *Letters in Applied Microbiology.* – 2012. – Vol. 56. – P. 222–228.
18. *Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study* / K. L. Kotloff, J. P. Nataro, W. C. Blackwelder [et al.] // *The lancet.* – 2013. – Vol. 383 (9888). – P. 209–222.
19. *Nature-derived microbiota exposure as a novel immunomodulatory approach* / N. Nurminen, J. Lin, M. Grönroos [et al.] // *Future Microbiol.* – 2018. – Vol. 13 (7). – P. 737–744.
20. *R Core Team, 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing.*
21. *Salmonella (non-typhoidal).* – URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)). 2022.
22. *Seleznev A. A. Assessment of Total Amount of Surface Sediment in Urban Environment Using Data on Solid Matter Content in Snow-Dirt Sludge* / A. A. Seleznev, I. V. Yarmoshenko, G. P. Malinovsky // *Environmental Processes.* – 2019. – Vol. 6. – No 3. – P. 581–595. – DOI 10.1007/s40710-019-00383-w. – EDN XZMXJF.
23. *Seleznev, A. A. Urban geochemical changes and pollution with potentially harmful elements in seven Russian cities* / A. A. Seleznev, I. V. Yarmoshenko, G. P. Malinovsky // *Scientific Reports.* – 2020. – Vol. 10. – No 1. – P. 1668. – DOI 10.1038/s41598-020-58434-4. – EDN FLOMUR.
24. *Strachan D. P. Hay fever, hygiene, and household size* / D. P. Strachan // *BMJ.* – 1989. – Vol. 299. – P. 1259–1260.
25. *Sungkanuparph, S. Eubacterium bacteremia and colon cancer* / S. Sungkanuparph, S. Chansirikarnjana, M. Vorachit, // *Scandinavian Journal of Infectious Diseases.* – 2002. – Vol. 34. – № 12. – P. 941–943.
26. *The World Bank, 2022. Urban population data.* <https://www.worldometers.info/world-population/world-population-by-year/>, [https://data.worldbank.org/indicator/SP.URB.TOTL.IN.ZS?year\\_high\\_desc=true](https://data.worldbank.org/indicator/SP.URB.TOTL.IN.ZS?year_high_desc=true)
27. *Taylor L. H. Risk factors for human disease emergence* / L. H. Taylor, S. M. Latham, M. E. J. Woolhouse // *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* – 2001. – Vol. 356. – P. 983–989.
28. *A landscape study of sediment formation and transport in the urban environment* / I. Yarmoshenko, G. Malinovsky, E. Baglaeva, A. Seleznev // *Atmosphere.* – 2020. – Vol. 11. – No 12. – P. 1320. – DOI 10.3390/atmos11121320. – EDN TCZVAW.