

И. С. Андреева^{1}, А. С. Сафатов¹, О. В. Охлопкова¹, И. К. Резникова¹, Г. А. Буряк¹, М. Е. Ребус¹*

Биогенные компоненты, выявленные при самолетном зондировании атмосферы по маршруту Новосибирск – Ханты-Мансийск – Салехард – Карское море

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, р.п. Кольцово, Российская Федерация

* e-mail: andreeva_is@vector.nsc.ru

Аннотация. В сентябре 2022 года проведено самолетное зондирование атмосферы при полете по маршруту Новосибирск – Ханты–Мансийск - Салехард – Карское море. Высотные пробы отбирали с помощью оборудования лаборатории «Оптик», смонтированной на базе самолета ТУ-134. В рамках экспедиции на высотах от 200 и до 9000 м отобраны 43 пробы атмосферного воздуха для анализа концентрации суммарного белка и выявления в аэрозоле микроорганизмов геномными методами и при высеве образцов на питательные среды для изоляции культивируемых микроорганизмов. Полученные в рамках настоящей работы данные позволили оценить биоразнообразие в атмосферных аэрозолях, представленное белковыми компонентами и микроорганизмами, охарактеризовать особенности «микробиологического фона» атмосферы, наличия патогенов, потенциально опасных для здоровья населения.

Ключевые слова: атмосфера, самолетное зондирование, концентрация белка, состав микроорганизмов, Сибирский регион

I. S. Andreeva^{1}, A. S. Safatov¹, O. V. Ohlopkova¹, I. K. Reznikova¹, G. A. Buryak¹, M. E. Rebus¹*

Biogenic components detected by airborne atmospheric sounding along the route Novosibirsk – Khanty-Mansiysk – Salekhard – Kara Sea

¹ State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector" of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Welfare, Koltsovo settlement, Russian Federation

*e-mail: andreeva_is@vector.nsc.ru

Abstract. In September 2022, airborne atmospheric sounding was conducted during a flight along the route Novosibirsk - Khanty-Mansiysk - Salekhard - Kara Sea. High altitude samples were taken using the equipment of the Optik laboratory, mounted on the base of the TU-134 aircraft. As part of the expedition, 43 samples of atmospheric air were taken at altitudes from 200 m to 9000 m to analyze the concentration of total protein and detect microorganisms in the aerosol by genomic methods and during isolation of culturable microorganisms on nutrient media. The data obtained of this work allowed assessing the biodiversity in atmospheric aerosols, represented by protein components and microorganisms, characterized features of the "microbiological background" of the atmosphere, which is necessary to identify the presence of pathogens potentially dangerous to public health.

Keywords: atmosphere, airborne sounding, protein concentration, composition of microorganisms, Siberian region

Введение

Атмосферные аэрозоли, включая биоаэрозоли, являются неотъемлемой частью атмосферы. Кроме характерного для атмосферных аэрозолей воздействия на климатические процессы [1, 2], возможно воздействие биоаэрозолей на здоровье населения путем увеличения частоты аллергий и инфекционных заболеваний человека, животных и растений [3, 4]. Для многих соединений в составе аэрозольных частиц, есть гигиенические нормативы, регламентирующие предельно допустимые концентрации этих веществ в атмосфере. Такие нормативы установлены и для некоторых биогенных компонентов атмосферных аэрозолей. Однако в литературе крайне мало данных по комплексной оценке состава атмосферных аэрозолей Сибирского региона, особенно по соотношению в нем органических и биологических соединений, включая жизнеспособные микроорганизмы. С развитием методов секвенирования нового поколения появляется возможность выявлять более полное биоразнообразие [5], включая некультивируемые микроорганизмы, которые в пробе атмосферного аэрозоля могут достигать 90%.

Цель работы: оценка концентрации и разнообразия биогенной компоненты атмосферных аэрозолей Сибирского региона, определение «микробиологического фона» верхних слоев тропосферы для выявления патогенов, потенциально опасных для здоровья населения.

Материалы и методы

В рамках арктической экспедиции 2022 г. в период с 8.09 по 11.09 выполнен перелет самолета-лаборатории «Оптик» из Новосибирска через Ханты-Мансийск в Салехард и далее к Карскому морю для отбора проб на разных высотах над сушей и над морем. Траектория маршрута самолета из г. Новосибирска и возвращения в г. Томск представлены на рис. 1. Пробы атмосферного воздуха отбирали с помощью оборудования лаборатории «Оптик», смонтированной на базе самолета ТУ-134 [6]. Для определения массы суммарного белка пробу воздуха отбирали в течение от 5 до 50 минут на фильтры типа АФА-ХА-20 (объем забранного воздуха составлял от 2 до 20 м³). Для микробиологических анализов пробы воздуха отбирали в течение 5 – 8 минут в импинджеры, обеспечивающие при перепаде давлений более 4×10^4 Па воздуха постоянство расхода 50 ± 5 л/мин. Объем пробы составлял от 0,25 до 0,4 м³. Аэрозоли осаждались в сорбирующую жидкость (50 мл раствора Хэнкса, ICN Biomedicals). Условия отбора проб атмосферных аэрозолей представлены в табл. 1.

Всего в период лётной экспедиции отобрано 26 проб для анализа концентрации суммарного белка в атмосфере и 20 проб для выявления в атмосферном аэрозоле генетического материала микроорганизмов, а также определения разнообразия и концентрации в пробах культивируемых микроорганизмов (табл. 1).

Для определения концентрации суммарного белка в пробах использовали флуорометрический метод, основанный на приобретении белком интенсивной флуоресценции после его модификации флуорогенным реактивом: 3-4-кар-

боксibenzoил хинолин-2-карбоксияльдегидом (CBQCA), образующим при взаимодействии с белками производные с более высоким квантовым выходом, чем у других красителей [7]. Белки определяли в присутствии липидов, детергентов, поверхностно активных веществ. Предел обнаружения суммарного белка на спектрофлуориметре Shimadzu RF-520 с использованием CBQCA составлял 0,0005 мкг/мл концентрированного образца, ошибка определения его концентрации не превосходила 20 %.

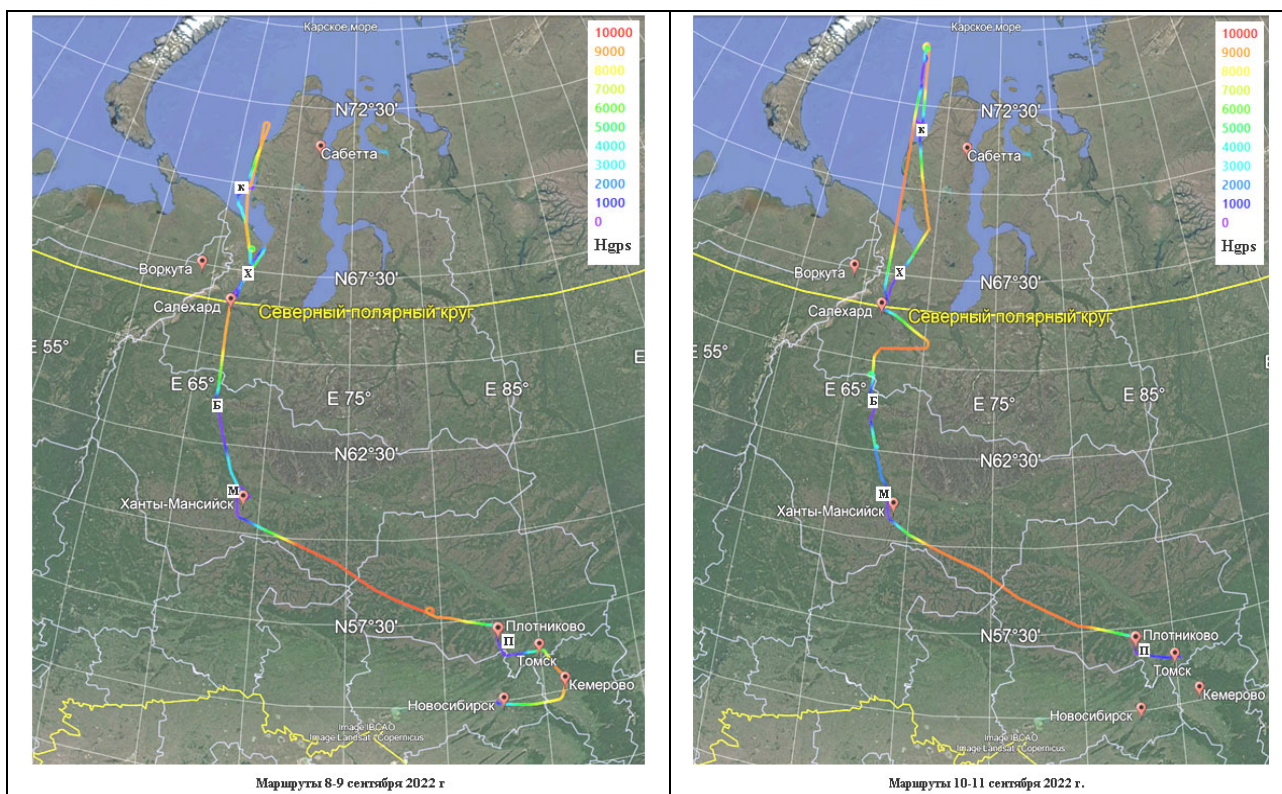


Рис. 1 – Подлётная трансекта 8/09; синхронные с кораблем (к – НИС «Мстислав Келдыш») зондирования 9-10/09 над Карским морем; обратная трансекта 11/09. Цветовое обозначение высоты полета GPS/ГЛОНАСС, м (Hgps). Обозначения пунктов на суше: Б – Белоярск, М – стационар Мухрино, П – стационар Плотниково, Х – оз. Харалынгседато

Для выявления микроорганизмов пробы аэрозолей высевали на селективные агаризованные питательные среды: LB (Difco, USA), крахмало-аммиачную среду (КАА), почвенный агар, среду Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, РФ) как описано ранее [8]. Емкости с высевами инкубировали сутки в термостате при температуре 28-30 и 6-9 °С в течение 3-14 суток. Согласно [9] исследовали морфологические и биохимические признаки изолятов. Таксономическую принадлежность микроорганизмов определяли по совокупности выявленных фенотипических характеристик и по нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рибосомной РНК (около 700 п.н.) [10]. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программы Sequencher. Идентификацию микроорганизмов на основании анализа первичной нуклеотидной по-

следовательности проводили в базе данных GenBank/EMBL/DBJ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) с помощью множественного выравнивания в программе BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Специфические праймеры для амплификации фрагмента гена 16S рРНК:

№	Структура праймера (5'→3')	Температура отжига
1	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	56
2	CGACRRCCATGCANCACT	56

Таблица 1

Условия отбора проб в рамках арктической экспедиции 2022 г.

Дата	№ проб для анализа белка	Сегмент полета	Координаты взятия проб °		№ проб для микробного анализа	Высота, м
			с.ш.	в.д.		
08.09.2023	1	Новосибирск -Плотниково	55,916	82,885	1	9000
	2	Плотниково	56,814	82,853	2	200 - 300
	3	Плотниково -Мухрино	58,854	75,768	3	9000
	4	Мухрино	60,893	68,683	4	200 - 300
	5	Ханты-Мансийск - Белоярск	62,369	67,84	5	3000
	6	Белоярск	63,738	66,680	6	200 - 300
	7	Белоярск - оз. Харальянгседато	65,689	67,122	7	9000
	8	оз. Харальянгседато	67,640	67,565	8	200 - 300
09.09.2023	9	оз. Харальянгседато	67,640	67,565	9	200 - 300
	10	оз. Харальянгседато, в сторону моря	68,376	67,048	10	6000
	11	В сторону моря	69,111	66,787	11	2000-5000
	12	Над морем	69,847	66,532	12	200 - 300
	13	Над морем	69,898	66,525	13	9000
	14	оз. Харальянгседато	67,640	67,565	-	200 - 300
10.09.2023	15	оз. Харальянгседато	67,640	67,565	14	200 - 300
	16	оз. Харальянгседато, в сторону моря	69,798	67,498	15	9000
	17	Над морем	71,957	67,432	16	200 - 300
	18	Море - оз. Харальянгседато	69,798	67,498	17	9000
	19	оз. Харальянгседато	67,640	67,565	18	200 - 300
	20	оз. Харальянгседато - Ханты-Мансийск	66,339	67,270	19	9000
11.09.2023	21	Ханты-Мансийск - Белоярск	65,039	66,975	-	9000
	22	Белоярск	63,738	66,680	-	200 - 300
	23	Белоярск-Мухрино	62,315	67,681	20	2100
	24	Мухрино	60,893	68,683	-	200 - 300
	25	Мухрино - Плотниково	58,854	75,768	-	200 - 300
	26	Плотниково	56,814	82,853	-	200 - 300

Расчет числа выявляемых в образцах жизнеспособных микроорганизмов, выражаемый в десятичных логарифмах числа колониеобразующих единиц (КОЕ), проводили по стандартным методикам [11]. Погрешность определения

концентрации микроорганизмов для описанных выше условий культивирования составляла $\pm 0,2$ lg. Выделенные культуры микроорганизмов хранили в криопротекторе при низкотемпературном замораживании.

Результаты и обсуждение

Исследование биогенного состава отобранных атмосферных аэрозолей показано, что концентрации суммарного белка (табл. 2) во всех исследуемых пробах превосходят таковые, выявленные ранее над Арктическими морями [8].

Таблица 2

Значения концентрации суммарного белка, обнаруженные в аэрозолях

Номер пробы	Объем пробы, м ³	Концентрация суммарного белка, нг/м ³	Номер пробы	Объем пробы, м ³	Концентрация суммарного белка, нг/м ³
1	5,961	1406	14	2,493	3392
2	5,084	2048	15	5,808	1702
3	20,696	452	16	6,550	1670
4	6,762	1217	17	4,650	1803
5	3,092	3051	18	6,707	1295
6	6,499	1220	19	4,371	1780
7	8,190	1179	20	9,084	1188
8	3,195	3000	21	9,501	977
9	3,195	1867	22	3,293	2523
10	1,835	6248	23	4,182	1792
11	2,716	3778	24	3,029	3537
12	3,007	2062	25	17,097	517
13	15,710	557	26	3,873	5991

Особое внимание привлекает проба 10, взятая на высоте 6000 м на границе суши и Карского моря, заметно превышающая по содержанию суммарного белка величины, фиксируемые даже для юга Западной Сибири [12]. Обратная траектория движения воздушных масс, из которых взята эта проба, проходит практически через всю территорию России на широтах $\approx 60^\circ$ с.ш. на высотах 3500 – 6500 м. Возможно высокие концентрации суммарного белка обусловлены следами от лесных пожаров, дошедших до Арктического региона, которые в августе – сентябре 2022 г. присутствовали на территории России.

Пробы 2, 3 и 20 с наибольшими значениями концентрации культивируемых микроорганизмов выделены из аэрозолей, имеющих значительный участок движения над Евразией, где и ранее фиксировались большие значения концентрации культивируемых микроорганизмов. Из представленных данных следует, что падения концентрации суммарного белка в атмосфере с увеличением широты местности взятия проб не происходит, тогда как, напротив, концентрация культивируемых микроорганизмов падает, а высотный профиль этой концентрации остается практически неизменным (табл. 3).

Таблица 3

Концентрация культивируемых микроорганизмов, обнаруженных в пробах аэрозолей при высеве на селективные агаризованные среды.

№ пробы	Концентрация lg (КОЕ/м ³) / температура культивирования		№ пробы	Концентрация lg (КОЕ/м ³) / температура культивирования	
	30 °С	6 °С		30 °С	6 °С
1	3,25	1,55	11	3,95	1,55
2	4,67	2,90	12	2,85	1,55
3	3,96	1,35	13	4,15	1,55
4	2,25	1,55	14	-	-
5	3,95	1,55	15	3,88	1,41
6	2,85	1,55	16	3,55	1,35
7	1,55	1,55	17	3,73	1,55
8	3,05	1,35	18	3,73	1,55
9	3,29	1,55	19	1,55	2,25
10	3,85	1,55	20	-	-

Примечание: значение концентрации микроорганизмов, обозначенная как «1,55», находится ниже предела обнаружения.

Данные по соотношению групп микроорганизмов, выявленных на селективных питательных средах при температуре культивирования 28-30 °С, приведены на рис. 2, таксономия изолятов – в табл. 4.

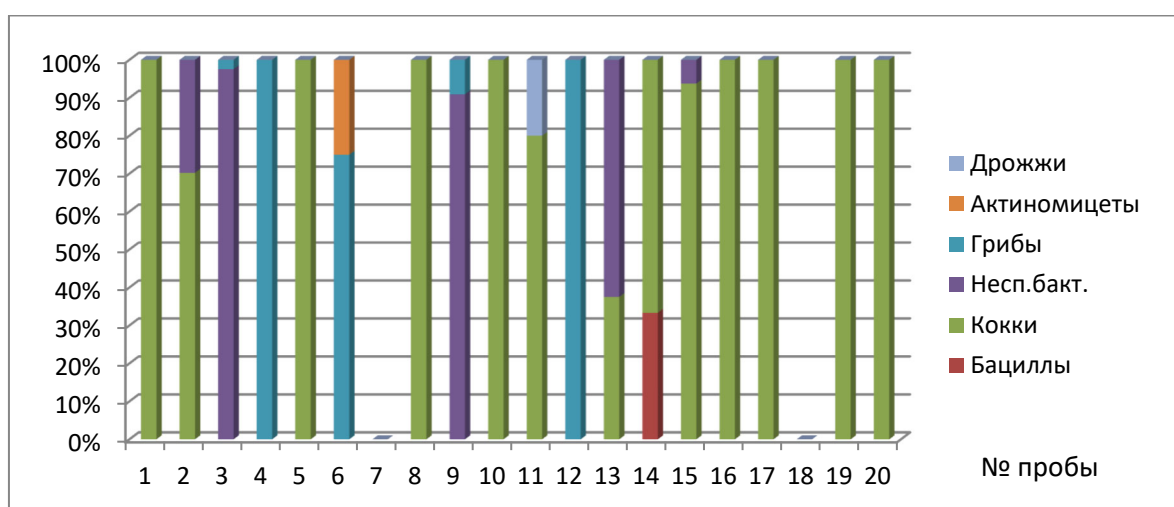


Рис. 2. Соотношение групп культивируемых микроорганизмов, обнаруженных в пробах атмосферного воздуха при высеве на агаризованные среды и температуре культивирования 30 °С.

Закономерности в распределении состава по группам в разных пробах не наблюдается, в пробах 7 и 18 в данных условиях опыта микроорганизмы не обнаружены. По причине низкой концентрации выявляемых культивируемых микроорганизмов при непосредственном высеве образцов на агаризованные среды проведены дополнительные высевы аэрозолей в жидкую питательную среду для получения накопительных культур и выявления, таким образом, микроорганиз-

мов, находящихся в пробах в незначительном количестве. Для многих проб получены дополнительные сведения о таксономическом составе обнаруживаемых культивируемых микроорганизмов: в пробах 3, 4, 9, 12, 14 выявлены плесневые грибы; в пробах 3-6, 8, 9, 17 - культуры дрожжей, в пробах 2, 5, 6, 8, 11, 12, 14 и 15 - ранее не обнаруживаемые спорообразующие бактерии; в пробах 1, 3, 4, 6, 8, 11, 12, 14, 17 - неспороносные бактерии, из проб 3, 4, 6, 7, 11, 12, 18 выделены культуры кокков. Часть бактериальных изолятов относится к патогенным видам, это представители родов *Staphylococcus*, *Moraxella*, *Rothia*, *Kocuria*, *Pseudomonas* и ряд других (табл. 4).

Таблица 4

Таксономическая принадлежность культивируемых бактерий, выявленных из проб атмосферных биоаэрозолей

Сегменты полета	Наименование рода микроорганизмов / Высота, км		
	0,3-0,2	6-2	9
Новосибирск – Ханты-Мансийск	<i>Luteimonas</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Priestia</i> , <i>Agrococcus</i> , <i>Mycetocola</i> , <i>Rhodococcus</i>	Нет данных	<i>Micrococcus</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Pseudarthrobacter</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Rothia</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Brachybacterium</i> ,
Ханты-Мансийск – Салехард	<i>Streptomyces</i> , <i>Priestia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Pseudarthrobacter</i> , <i>Rothia</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Kocuria</i>	<i>Rhodococcus</i> , <i>Mycetocola</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Paenibacillus</i>	<i>Staphylococcus</i>
Салехард – Карское море	<i>Rhodococcus</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Dermacoccus</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Rothia</i>	Нет данных	<i>Saccharopolyspora</i> , <i>Rothia</i> , <i>Ornithinimicrobium</i> , <i>Agrococcus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Dietzia</i> , <i>Brevibacterium</i>
Салехард – Ханты-Мансийск	<i>Staphylococcus</i>	<i>Kocuria</i>	Нет данных

Заключение

Проведенные исследования показали наличие биологических компонентов атмосферного аэрозоля в пробах воздуха на всех сегментах полета. Для суммарного белка обнаружена зависимость его концентрации в воздухе от высоты взятия проб, при отсутствии зависимости от широты местности, над которой брались пробы. Концентрация культивируемых микроорганизмов напротив, снижалась по мере продвижения на север, в то время как высотный профиль этой концентрации оставался практически неизменным. Определена таксономическая принадлежность выделенных бактерий, включающая патогенные микроорганизмы. Полученные данные имеют важное значение так как представлены впервые, аналогичные сведения в литературе отсутствуют.

Благодарности

Организаторам арктической экспедиции и команде УНУ самолета-лаборатория Ту-134 «Оптик» за возможность участия в уникальном эксперименте; Л.И. Пучковой, А.Д. Мошкину, С.Е. Олькину за активную помощь в проведенном исследовании. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Гранта ФЦП № 075-15-2019-1630 и Государственного задания Роспотребнадзора № 11/21.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Morris C. E., Sands D. C., Bardin M., Jaenicke R., Vogel B., Leyronas C., Ariya P. A., Psenner R. Microbiology and atmospheric processes: research challenges concerning the impact of airborne micro-organisms on the atmosphere and climate // *Biogeosci.* – 2011. – N 8. – P. 17 – 25.
2. Sun J., Ariya P. A. Atmospheric organic and bio-aerosols as cloud condensation nuclei (CNN): A review // *Atmos. Environ.* – 2006. – Vol. 40, N 5. – P. 795 – 820.
3. Kim, K.-H., Kabir E., Jahan S.A. Airborne bioaerosols and their impact on human health // *J. Environ. Sci.* – 2018. – Vol. 67. – P. 23 – 35.
4. Brown J. K. M., Hovmøller M. S. Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease // *Science.* – 2002. – Vol. 297, N 5581. – P. 537-541.
5. Prussin A. J., Marr L. C., Bibby K. J. Challenges of studying viral aerosol metagenomics and communities in comparison with bacterial and fungal aerosols // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2014. – Vol. 357, N 1. – P. 1 – 9.
6. Анохин Г. Г., Антохин П. Н., Аршинов М. Ю., Барсук В. Е., Белан Б. Д., Белан С. Б., Давыдов Д. К., Ивлев Г. А., Козлов А. В., Козлов В. С., Морозов М. В., Панченко М. В., Пеннер И. Э., Пестунов Д. А., Сигов Г. П., Симоненков Д. В., Синецын Д. С., Толмачев Г. Н., Филиппов Д. В., Фофонов А. В., Чернов Д. Г., Шаманаев В. С., Шмаргунов В. П. Самолет-лаборатория Ту-134 «Оптик» // *Оптика атмосферы и океана.* – 2011. – Т. 24. – № 9. – С. 805-816.
7. You W. W., Haugland R. P., Ryan D. K., Haugland R. P. 3-(4-Carboxybenzoyl) quinoline-2-carboxaldehyde, a reagent with broad dynamic range for the assay of proteins and lipoproteins in solution // *Annal. Biochem.* – 1997. – Vol. 244, N 2. – P. 277 – 282.
8. Андреева И. С., Сафатов А. С., Пучкова Л. И., Охлопкова О. В., Ребус М. Е., Буряк Г. А. Патогенные микроорганизмы в аэрозолях, выделенные при самолетном зондировании атмосферы над морями российской Арктики // *Интерэкспо ГЕО-Сибирь.* – 2022. – Т. 4. – С. 70 – 77.
9. Методы общей бактериологии. Т. 3. / Под ред. Ф. Герхарда, Р. Мюррэя, Р. Костилоу, Ю. Нестера, В. Вуда, Н. Крига, Г. Филипса. – М. : Мир, 1984. – 264 с.
10. Weisburg, W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // *Bacteriol.* – 1991. – Vol. 173. – P. 697 – 703.
11. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л : Гос. изд. мед. лит., 1962. – 180 с.
12. Andreeva I. S., Safatov A. S., Puchkova L. I., Emel'yanova E. K., Buryak G. A., Ternovoy V. A. Biodiversity and biotechnological potential of spore-forming bacteria of atmospheric aerosols in Southwestern Siberia // *Atmos. Ocean. Opt.* – 2021. – Vol. 34, N 5. – P. 464 – 470.

© И. С. Андреева, А. С. Сафатов, О. В. Охлопкова,
И. К. Резникова, Г. А. Буряк, М. Е. Ребус, 2023