

**Краткая информация о результатах, полученных по итогам выполнения проекта
«Применение биочара для управления микробиологическими сообществами в
процессе переработки отхода птицеводства, содержащего антибиотики, с целью
улучшения удобрительных свойств продукта и снижения риска распространения
антибиотикорезистентности»**

(Номер проекта 18-29-25054, Девиз РФФИ-124ф)

- 1. Оценка влияния биочара на интенсивность процесса компостирования куриного помета (пиковая температура и ее длительность, динамика растворимого органического углерода, структура микробных сообществ)*

Внесение биочара из куриного помета в компостные смеси на основе куриного помета, так же как и внесение окситетрациклина и смеси тяжелых металлов в целом не оказывало значительного влияния на физико-химические параметры компостирования, однако некоторым образом повлияло на уровень респираторной активности компостов. Так, температурный профиль компостных смесей в целом совпадал для всех вариантов: термофильная фаза длилась со 2 по 5 сутки компостирования, и значения температуры составили 44-53°C. Далее после 5 суток во всех вариантах наблюдалось постепенное снижение температуры. С 15 суток и до конца процесса компостирования ее значения держались на уровне 18-22 °С. Для всех исследуемых компостных смесей было зафиксировано схожее изменение уровня влажности. Начиная с 14 суток, ее значения стабилизировались и до конца процесса компостирования составили от 61 до 77%. Отмечены небольшие колебания влажности с 42 до 55 суток и с 65 до 75 суток. Изменение содержания растворимого органического углерода так же носило сходный характер для всех вариантов компостных смесей. На 1 сутки его значения составили 5-6 мг/г, далее к 14 суткам наблюдался резкое увеличение его уровня до 21,3-32,2 мг/г. В целом, для всех вариантов компостных смесей наиболее высокое содержание растворимого органического углерода было отмечено с 14 по 21 сутки. Далее зафиксировано резкое снижение его уровня до 2,3-5 мг/г. Начиная с 35 суток не наблюдалось значительных изменений в содержании растворимого органического углерода. К концу компостирования его значения составили 3,3-5,7 мг/г. Все исследуемые компостные смеси обладали схожей динамикой респираторной активности в течение всего процесса компостирования. На 1 сутки ее значения составили от 0,002 до 0,008 мгСО₂/г*ч. Далее к 3 суткам во всех вариантах наблюдалось резкое увеличение уровня респирации до 0,008-0,013 мгСО₂/г*ч, что по времени совпало с термофильной фазой компостирования. Интересно, что

наиболее высокие значение респираторной активности были отмечены для тех вариантов компостных смесей, которые содержали ОТС и тяжелые металлы (образцы О, ВО, М, ВМ, ВМО). К 14 суткам во всех вариантах наблюдалось снижение уровня респираторной активности. С 42 суток респираторная активность вышла на плато, ее значения на конец процесса компостирования составили 0,0008-0,001 мгСО₂/г*ч.

2. *Оценка поведения антибиотиков тетрациклиновой группы в процессе компостирования зависимости от а) температуры (ее значения и ительности сохранения), б) прямой сорбции на биочаре, в) наличия химических веществ (гуминовых кислот, металлов), г) наличия биодеструкторов*

В рамках проекта проводили компостирование подстилочного куриного помета, который: 1) был предварительно стерилизован и инокулирован тремя штаммами микроорганизмов (системы в и г), 2) не был предварительно стерилизован (системы д и е). В системы г и е был добавлен биочар из куриного помета в количестве 15% (по массе). Для сравнения проводили так же компостирование нестерильного помета в термофильном режиме (при регулировании температуры), а также инкубирование стерильного помета при температурах, повторяющих таковые при компостировании нестерильного помета. На втором этапе проводили варьирование уровней рН, концентрации ОТС и металлов в этих же системах.

Снижение содержания антибиотика окситетрациклина (ОТС) значительно быстрее происходило в системах «д» и «е» (до 0 мг/кг на 42 сутки), чем в «в» и «г» (до 0 мг/кг на 84 сутки). При этом различия в паре д/е были незначительными, тогда как в паре в/г они наблюдались. При инкубировании стерильного помета с ОТС как с биочаром, так и без него, снижение содержания антибиотика происходило значительно медленнее – так, на 84 сутки его оно составило в обоих случаях порядка 110 мг/кг. Полученные результаты свидетельствуют о: а) замедлении разложения ОТС в твердых средах по сравнению с жидкими, что, вероятно, связано с сорбцией и десорбцией молекул антибиотика на поверхности твердых частиц; б) значительном ускорении процесса трансформации антибиотика в твердых средах, содержащих микроорганизмы, причем степень ускорения выше в средах с большим количеством микроорганизмов; в) дополнительной роли биочара в среде с низким содержанием микроорганизмов, вероятно, обусловленной его положительным влиянием на выживаемость и активность микроорганизмов на первых этапах после интродукции.

Выявлена значимая роль биострукции в разложении окситетрациклина в процессе компостирования куриного помета (в отличие от незначимой роли при инкубировании в жидких средах)

Продемонстрировано, что концентрация всех исследованных метаболитов ОТС при компостировании пометов, содержащих ОТС, является крайне низкой (менее 6%).

Добавление в компостные смеси металлов (никель, кадмий, железо, медь) не привело к достоверно значимым изменениям температурного профиля, содержания ОТС и его метаболитов.

Предположительно, регулирование температуры привело не только к повышению активности микроорганизмов, но и к смене состава их сообществ. Именно это может быть причиной снижения содержания ОТС и его метаболитов в компостах. Инкубирование стерильного компоста при повышенной температуре не привело к интенсивному процессу разложения ОТС. Можно заключить, что в разложении ОТС немаловажную роль играют процессы биодеструкции, наряду с химической.

3. Оценка поведения ГУА в процессе компостирования в зависимости от: а) температуры (ее значения и длительности сохранения), б) прямой сорбции на биочаре, в) наличия химических веществ (гуминовых кислот, металлов), г) изменения структуры микробного сообщества (в частности, вызванного присутствием биочара), наличия горизонтального трансфера генов и влияющих на него факторов (селективного давления антибиотиков, наличия металлов и проч.)

Компостирование привело к снижению числа ГУА во всех видах исследуемых систем, в ряде случаев – до уровней ниже пределов обнаружения. Важно, что все такие случаи были выявлены для систем, в которых присутствовал биочар. Аналогичные компосты без биочара содержали ГУА, хотя и в значительно меньшем первоначального количестве. Таким образом, биочар играет роль в снижении антибиотикорезистентности компостов.

Исходя из совокупности представленных выше результатов, можно заключить, что ключевым для протекания процесса компостирования является микробное сообщество исходных компостов, а добавление биочара не приводит к значительным изменениям основных физико-химических характеристик компостирования, включая скорость разложения антибиотика ОТС. При этом наличие биочара приводит к элиминации ГУА к тетрациклинам в процессе компостирования. Предположительно, это связано с влиянием

биочара на состав микробного сообщества компоста, в частности, сдвигу состава сообщества в сторону видов, не содержащих ГУА.

Так же с исходной начальной концентрацией ОТС положительно связано было и количество трех ГУА (tet(X), tet(M) и tet(A)) (Rсредн 0,82). Изложенное верно и для предварительно стерилизованных, и нестерилизованных компостных смесей, с добавлением биочара и без него.

Интересным представляется выявленное нами достоверное увеличение количества ГУА, вызванное внесением металлов в компостные смеси без биочара (R=0,94). Действительно, в литературе описаны процессы интенсификации горизонтального трансфера генов устойчивости к металлам при загрязнении среды металлами, трансфер генов ГУА является при этом побочным эффектом, т.к. и те, и другие гены устойчивости зачастую присутствуют в составе одной передаваемой плазмиды. Интересно, что указанный эффект наблюдался нами лишь в компостных смесях без биочара и не наблюдался в смесях с его присутствием. Как и в случае с рН, можно предположить, что это обусловлено не прямым воздействием биочара на ГУА, а косвенным эффектом от его влияния на состав сообщества, которое селекционировалось в сторону видов со сниженным количеством ГУА.

Предположительно, регулирование температуры привело не только к повышению активности микроорганизмов, но и к смене состава их сообществ. Именно это может быть причиной снижения содержания ОТС, его метаболитов и количества ГУА в компостах. Напомним, что (в рисунке 1 Приложения 1) инкубирование стерильного компоста при повышенной температуре не привело к интенсивному процессу разложения ОТС. Можно заключить, что в разложении ОТС немаловажную роль играют процессы биодеструкции, наряду с химической.

Получены новые данные о влиянии ОТС, металлов изменений рН и температуры на поведение ГУА при компостировании куриного помета. Показано, что содержание ОТС (от 50 до 300 мг/кг) в пометах влияет на количество ГУА в них, но не на тенденции их изменения. Добавление в компостные смеси металлов (никель, кадмий, железо, медь) приводит к увеличению содержания ГУА к тетрациклинам, что, вероятно, связано с интенсификацией горизонтального трансфера генов, расположенных в одних и тех же плазмидах. Интересно, что указанный эффект наблюдался нами лишь в компостных смесях без биочара. Можно предположить, что это обусловлено не прямым воздействием биочара на ГУА, а косвенным эффектом от его влияния на состав микробного сообщества, которое селекционировалось в сторону снижения содержания ГУА.

4. *Статистическое моделирование и прогноз процессов, происходящих в микробных сообществах компостов на основе куриного помета с добавлением биочара, с целью выработки стратегии управления ими для получения компостов с высокими удобрительными свойствами, без антибиотиков и ГУА*

Анализ структуры бактериального сообщества проводили на основе секвенирования ампликонов на базе Illumina MiSeq (Illumina, США). Наиболее обильными на начальных этапах компостирования были представители типов Firmicutes и Actinobacteria. Начиная с 14 суток, их сменили представители типов Proteobacteria и Bacteroidetes. Суммарно в исследуемых образцах было выявлено 283 бактериальных ОТЕ. Значительных различий в количестве ОТЕ между вариантами смесей с добавлением и без добавления биочара, смеси металлов, окситетрациклина обнаружено не было. На 1 сутки количество ОТЕ бактерий в образцах варьировало от 128 до 170. К 84 суткам наблюдалось постепенное увеличение их численности в среднем в 1,5-2 раза, что составило 255-283 ОТЕ. На 1-3 сутки компостирования во всех вариантах полностью доминировал один и тот же вид *Corynebacterium* sp (обилие 14-23%), на 7 сутки его обилие снизилось до 6-8%, к 84 суткам составляло 0-2% во всех вариантах компостирования. Аналогичную тенденцию к снижению обилия во всех вариантах продемонстрировал вид *Staphylococcus sciuri*: на 1-3 сутки его обилие составило 6-12%, на 7 сутки – 3-4%. Пик обилия для видов, представляющих семейства *Bacillaceae* и *Aerococcaceae*, наблюдался на 3 сутки компостирования (9-18% и 7-11%, соответственно), что вероятно, связано с его устойчивостью к высоким температурам и способностью разлагать органические соединения с выделением тепла. Для вида-представителя семейства *Sphingobacteriaceae* отмечен рост обилия от начала компостирования (0% во всех вариантах) к его концу (4-6%). В целом представители семейств *Corynebacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Lactobacillales*, *Planococcaceae* и *Staphylococcaceae*, обнаруженные как в контрольном компосте, так и в компостах с различными комбинациями добавок (биочар, антибиотик, тяжелые металлы), были максимально представлены в термофильную фазу (1-7 сутки), постепенно снижая свое обилие к 84 суткам. До 7 суток бактерии семейств *Flavobacteriaceae*, *Alcaligenaceae*, *Sphingobacteriaceae*, *Xanthomonadaceae* и *Chitinophagaceae* присутствовали в образцах в минимальном количестве, однако к концу компостирования наблюдалось постепенное увеличение их численности. В целом, значительных различий в динамике количества доминирующих бактериальных таксонов в компостных смесях с различными добавками обнаружено не было. На завершающей стадии компостирования все образцы компостов характеризовались схожим обилием бактерий-доминантов. Несмотря на указанные

свойства между динамикой обилия видов в компостных смесях, между вариантами наблюдались и некоторые различия. Так, на 28 сутки обилие вида *Aequorivita sp.* было ниже во всех вариантах компостов М, ВМ, МО и ВМО, содержащих тяжелые металлы, чем в остальных вариантах. Вероятно, внесение металлов в компостные смеси оказало угнетающее воздействие на указанный вид. На 84 сутки компостирования были отмечены различия в обилии вида *Gelidibacter sp.* в парах О-ВО и М-ВМ, а именно в компостах, содержащих ОТС и тяжелые металлы (образцы О и М) обилие вида *Gelidibacter sp.* оказалось выше (9%), чем в компостах с этими же добавками, но с дополнительным содержанием биочара (обилие 3%), что, вероятно, обусловлено «смягчающим» действием биочара, который сорбировал внесенные металлы. Обнаружено, что наибольшим обилием (4-8%) вида-представителя семейства *Alteromonadaceae* на 28-84 сутки характеризовался контрольный компост К. Для выявления обусловленности этих различий добавками к компостам или случайными факторами, далее были проведены регрессионный и корреляционный анализы (см. ниже).

Сходства и различия сообществ между собой были оценены с помощью метода неметрического многомерного шкалирования (NMDS). В целом бактериальные сообщества компостов, содержащих различные комбинации добавок биочара, антибиотика и тяжелых металлов, обладали высоким сходством между собой, так как точки на графике NMDS, обозначающие собой образцы, расположены близко друг к другу. Основным фактором, отличающим бактериальные сообщества между собой, являлась длительность компостирования – точки, характеризующие образцы, отобранные в один и тот же день, но для разных вариантов, расположены близко друг другу, но далеко от точек, характеризующих другие дни компостирования. Интересно, что группы точек, характеризующих близкие дни отбора (1-3, 3-7, 56-84) расположены ближе друг к другу, чем группы точек, характеризующихся значительной разницей во времени отбора (например, 1 и 84 сутки).

Для анализа влияния добавок (биочара, окситетрациклина, металлов и их сочетаний) на основные параметры компостирования (температура, респираторная активность, Ph, Eh, содержание общего и растворимого органического углерода, общего азота) были применены дисперсионный и регрессионный анализы. Выявлено, что внесение биочара значимо влияло на температуру, влажность и содержание общего азота, внесение окситетрациклина - на влажность и содержание общего азота, внесение металлов - на респираторную активность компостных смесей.

Модели RLM, LM и ANOVA были также использованы для анализа значимости влияния биочара, окситетрациклина, металлов и их сочетаний на количество копий генов

устойчивости к антибиотикам *tet(A)* и *tet(X)*, гена, характеризующего интенсивность горизонтального трансфера *int1*. Установлено, что значимым внесение добавок являлось лишь для гена *tet(A)*, но не для гена *tet(X)*. Для гена *tet(A)* внесение биочара привело к снижению количества копий генов относительно контроля на 26,7%, внесение металлов - на 34,5%, а внесение окситетрациклина привело к повышению количества копий генов устойчивости на 43,7%. На количества копий гена *int1* значимо оказывает влияние лишь внесение окситетрациклина, увеличивая их на 45,9%.

Методом RDA установлено, что доля объясненной изменчивости составляла 67%, и она была обусловлена четырьмя факторами, первый из которых (RDA1, соосный длительности компостирования) был определяющим (66%) для структуры бактериального сообщества. Таким образом, основным факторам, определяющим структуру бактериальных сообществ, является комплекс физико-химических параметров, характеризующих фазу компостирования, и внесение добавок не оказывает существенного влияния на эту структуру. Имея в виду влияние фазы компостирования лидирующим с точки зрения формирования бактериальных сообществ в целом, следует учесть особенное «поведение» отдельных бактериальных типов. Так, например, обилие типа *Proteobacteria* меньше остальных зависит от фазы компостирования, при этом оно соосно с вектором М (металлы). Скорее все, бактерии данного типа обладают большей устойчивостью к металлам, чем другие, а потому выигрывают конкурентную борьбу в их присутствии. Это результирует в большем обилии бактерий данного типа в компостах с добавлением металлов.

Далее нами была проведена попытка выявить механизмы снижения количества генов устойчивости к антибиотикам при внесении биочара. Для этого использовались все результаты, представленные выше. Выявлено, что обилие ряда ОТЕ было сопряжено с количеством копий генов устойчивости к тетрациклинам. Можно предположить, что именно эти ОТЕ являются носителями генов устойчивости. Интересно, что внутри одного и того же семейства и рода имелись и ОТЕ с высокой корреляцией с генами устойчивости, и с низкой. Примерами таких семейств являются *Bacillaceae*, *Planococcaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Xanthomonadaceae*. Далее мы выделили те ОТЕ, количество генов устойчивости в которых было сопряжено с обилием, а влияние биочара являлось значимым и негативным. К таким ОТЕ относились представитель рода *Natronobacillus* (сопряженность с *tet(A)* 79%, с *tet(X)* 86%, влияние биочара – 37%), *Pseudomonadaceae* (сопряженность с *tet(A)* 75%, с *tet(X)* 80%, влияние биочара – 46%), *Luteimonas* (сопряженность с *tet(A)* 100%, с *tet(X)* 94%, влияние биочара – 34%), *Trichococcus*

(сопряженность с *tet(A)* 58%, с *tet(X)* 74%, влияние биочара – 44%). Назовем так же те ОТЕ, обилие которых значимо возросло при внесении биочара. Это *Corynebacterium variabile*, *Flavobacteriales*, *Rhodothermaceae*, *Clostridia*, GMD14H09, *Halorhodospira*, *Piscirickettsiaceae* (внесение биочара привело к росту обилия данных ОТЕ в среднем на 334, 231, 292, 222, 423, 1017 и 287%, соответственно). Для всех этих ОТЕ не было выявлено сопряженности с количеством генов устойчивости к антибиотикам. Это поддерживает нашу гипотезу о том, что биочар создает благоприятные условия для развития видов, не являющихся носителями генов устойчивости к антибиотикам, тем самым косвенно влияя на численность видов-носителей и, соответственно, количество генов устойчивости.