

УДК 631.463

doi: 10.26907/2542-064X.2019.3.395-407

## РАСПРОСТРАНЕНИЕ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ В ПОЧВЕ ПРИ ЕЕ ОБРАБОТКЕ КОМПОСТАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ ОКСИТЕТРАЦИКЛИН И ГЕНЫ УСТОЙЧИВОСТИ К НЕМУ

*Н.В. Данилова<sup>1</sup>, П.А. Курынцева<sup>1</sup>, М.Ш. Тагиров<sup>2</sup>, П.Ю. Галицкая<sup>1</sup>,  
С.Ю. Селивановская<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

<sup>2</sup>Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства ФИЦ Казанский  
научный центр РАН, г. Казань, 420059, Россия

### Аннотация

Вследствие активного применения антибактериальных препаратов в животноводстве остатки антибиотиков и гены устойчивости к ним поступают в почвы при ее удобрении навозами и компостами. В работе оценивали поступление генов антибиотикорезистентности в почву при ее удобрении компостами, содержащими окситетрациклин (ОТС) и гены устойчивости к тетрациклину. Для этого были исследованы следующие смеси в течение 35 сут: а) почва, обработанная чистым компостом, б) почва, обработанная компостом, содержащим 300 мг/кг ОТС, в) почва, обработанная компостом, содержащим гены антибиотикорезистентности. В почве после обработки компостами увеличилось количество бактерий и грибов, причем наибольшие изменения численности бактерий отмечены для почвы, обработанной компостом с ОТС. Внесение в почву компостов с антибиотиком и генами устойчивости *tet(M)* и *tet(X)* привело к формированию у почвенных микроорганизмов антибиотикорезистентности с наибольшим количеством копий генов на 5–7-е сутки: в среднем  $3.31 \cdot 10^6$  и  $7.77 \cdot 10^6$  копий/г соответственно. Оба гена, *tet(M)* и *tet(X)*, но в меньшем количестве, были выявлены в почве с чистым компостом на 14–21-е сутки.

**Ключевые слова:** антибиотики, окситетрациклин, антибиотикорезистентность, гены устойчивости, компост, ПЦР в реальном времени

### Введение

Антибактериальные препараты активно используют в сельском хозяйстве для выращивания животных. Их применяют не только для профилактики и лечения бактериальных инфекций, но и для ускорения набора массы молодняка [1–4]. Среди многообразия групп антибиотиков наиболее интенсивно фермерами применяются тетрациклины: тетрациклин, окситетрациклин, хлортетрациклин [4, 5].

В связи со слабой адсорбцией в организме животных до 90% исходной дозы антибиотика выводится в окружающую среду в составе экскрементов [3, 5–9]. Согласно ряду исследований в навозе сельскохозяйственных животных обнаруживают остатки антибиотиков в концентрациях до нескольких сотен мг/кг [10].

Помимо самих антибиотиков навоз животных содержит устойчивую к антибиотикам кишечную микрофлору.

Применение навоза для восстановления и повышения плодородия пахотных угодий является широко распространенной практикой в сельском хозяйстве, поэтому существует риск попадания остатков антибиотиков и микроорганизмов, обладающих резистентностью к ним, в почвенные экосистемы [3, 11]. Имеются различные сведения об эффективности компостирования для очищения навоза от антибактериальных препаратов и генов устойчивости к ним. Так, во многих исследованиях приводятся данные, согласно которым компостирование навоза ввиду высоких температур во время процесса представляется эффективным способом, позволяющим значительно снизить содержание антибиотиков и генов устойчивости к ним в исходном навозе [12–14]. Вместе с этим следует отметить, что удобрение сельскохозяйственных угодий навозами, не подвергшимися компостированию, или незрелыми компостами создает потенциальный риск распространения остатков антибиотиков и генов устойчивости в почвы. Кроме того, во время термофильной фазы компостирования высокая температура может интенсифицировать горизонтальный перенос антибиотикорезистентности [15]. Антибиотики в составе навозов и компостов могут привести к нарушениям в круговороте питательных элементов, необходимых сельскохозяйственным растениям, вследствие изменения структуры и функционирования микробного сообщества почвы. Кроме того, распространение генов антибиотикоустойчивости от бактерий, населяющих компосты, к почвенным бактериям и их аккумуляция в растениях могут стать потенциальным риском их попадания в организм человека по пищевой цепи [3].

В настоящей работе оценивали присутствие генов устойчивости к тетрациклинам *tet(X)* и *tet(M)* у микроорганизмов почвы при удобрении компостами, содержащими окситетрациклин (ОТС) и гены антибиотикорезистентности.

### 1. Экспериментальная часть

Компост был приготовлен на основе коровьего навоза, отобранного на частной ферме (Лаишевский район, Республика Татарстан). В исходный навоз был добавлен препарат ОТС в концентрации 150 мг/кг. ОТС был выбран в качестве модельного антибиотика, поскольку он является распространенным и эффективным препаратом при лечении инфекционных заболеваний животных в Российской Федерации. Компостирование осуществляли в течение 4 месяцев при температуре 20–25 °С. В процессе компостирования содержание генов устойчивости к тетрациклинам *tet(X)* и *tet(M)* достигало  $3.99 \cdot 10^8$  копий/г, но их количество постепенно снижалось. По окончании процесса компостирования генов *tet(X)* и *tet(M)* методом ПЦР в реальном времени обнаружено не было.

Полученный компост был разделен на три части. Первая часть представляла собой исходный компост (К), во вторую часть компоста был добавлен ОТС концентрацией 300 мг/кг (К+ОТС). В третью часть компоста для формирования антибиотикорезистентности у микроорганизмов добавлялся ОТС концентрацией 300 мг/кг 3 раза с периодичностью 2 недели. В итоге через 6 недель содержание генов устойчивости в компосте составило  $8.59 \cdot 10^6$  копий /г для *tet(M)*

и  $3.03 \cdot 10^7$  копий /г для *tet(X)* (К+АРГ), в то время как сам препарат ОТС полностью разложился.

Компост был добавлен в почву в дозе 0.8%, что соответствует 20 т/га. В результате были получены следующие смеси: почва (П), почва с чистым компостом (П+К), почва с компостом и ОТС (П+К+ОТС), почва с компостом и антибиотикорезистентными генами (П+К+АРГ). Почва для исследования отобрана на территории Лаишевского района Республики Татарстан с глубины 0–20 см, тип – серая лесная. Отбирали почву методом конверта с глубины 0–20 см. По 4 кг почвы было помещено в лабораторные пластиковые контейнеры. В качестве контрольного образца использовалась почва без компоста. Опыт проводили в трех независимых повторностях.

Смеси почвы и компоста инкубировали 35 сут в лабораторных условиях при температуре 20–25 °С и относительной влажности 60%.

Содержание ОТС в почве оценивали методом жидкостной хроматографии на приборе Agilent 1200 LC/MS System (Agilent, США). ОТС экстрагировали согласно методике, описанной в работе [16]. Детекцию антибиотика проводили с использованием колонки Zorbax SB C18 с УФ-детектором (длина волны 365 и 265 нм). В качестве мобильной фазы А была использована вода, в качестве мобильной фазы В – ацетонитрил. Концентрацию антибиотика рассчитывали методом внешнего стандарта по площади пика ионов [16].

Выделение тотальной ДНК из образцов почвы массой 0,3 г производили с использованием набора Fast DNA Spin Kit For Soil (MP Bio, Германия). Для очищения ДНК применяли QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Германия).

Численность бактериальных и грибных штаммов анализировали методом ПЦР в реальном времени [17] с использованием двух пар праймеров: 947f/1349r для бактерий (f: AACGCGAAGAACCTTAC, r: CGGTGTGTACAAGGCCCGGG AACG) и ITS1f/ITS2r (f: TCCGTAGGTGAACCTGCGG, r: GCTGCGTTCTTCA TCGATGC) для микроскопических грибов в амплификаторе BioRad CFX-96 cycler (BioRad, Германия). Для амплификации использовали следующую программу: первичная денатурация при 95 °С в течение 5 мин, далее 39 трехступенчатых циклов при 62–60 °С в течение 45 с, при 95 °С в течение 15 с и при 72 °С в течение 30 с. Рабочий раствор для амплификации имел следующий состав (25 мкл): матричная ДНК – 1 мкл, праймеры (10 мкМоль) – по 0.5 мкл, dNTP (10 мМоль) – 2.5 мкл, Taq Buffer (10×) – 2.5 мкл, MgCl<sub>2</sub> (25 мМоль) – 2.5 мкл, Taq polymerase (5 ед./мкл) – 0.2 мкл и ddH<sub>2</sub>O – 15.3 мкл. Для построения калибровочных кривых использовали бактерию *Pseudomonas putida* и микромицет *Penicillium notatum*.

Оценка наличия антибиотикорезистентных генов *tet(M)* и *tet(X)* в почве после ее удобрения компостами проводилась с помощью метода ПЦР в реальном времени [18]. Клонирование генов *tet(M)* и *tet(X)* осуществляли с помощью TA Cloning Kit (Invitrogen Corporation, США). Плазмиды с генами *tet(M)* и *tet(X)* экстрагировали с использованием PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen Corporation, США). Для реакции ПЦР в реальном времени использовали следующие специфические праймеры: *tet(M)* (f:GGTTGGAATGTGACGGACTG, r:ATCGTTGTATGCTCGTGAAAGA), *tet(X)* (f:GAAAGAGACAACGACCGAGAG, r:ACACCCATTGGTAAGGCTAAG). Реакционная смесь (25 мкл) содержала

следующие компоненты: матричная ДНК – 1 мкл, праймеры (10 мкМоль) – по 0.5 мкл, dNTP (10 мМоль) – 2.5 мкл, Taq Buffer (10×) – 2.5 мкл, MgCl<sub>2</sub> (25 мМоль) – 2.5 мкл, Taq polymerase (5 ед./мкл) – 0.2 мкл и ddH<sub>2</sub>O – 15.3 мкл. Амплификацию проводили в термоциклере BioRadCFX-96 cycler (BioRad, Германия) по следующей программе: предварительная денатурация – 3 мин при 94 °С; 39 циклов: денатурация – 45 с при 94 °С, отжиг – 45 с при 55 °С, элонгация – 45 с при 72 °С.

## 2. Результаты и их обсуждение

При оценке численности бактерий и грибов методом ПЦР в реальном времени было выявлено, что внесение в почву, как чистого компоста, так и компостов, содержащих антибиотик и гены устойчивости, изменяет количество бактериальных и грибных штаммов (рис. 1). В контрольной почве в течение всего эксперимента их количество было значительно ниже и составило в среднем  $2.24 \cdot 10^6$  и  $3.25 \cdot 10^4$  копий генов/г соответственно. В ряде исследований также указывается, что в почве после обработки компостом численность бактерий и грибов увеличивается по сравнению с исходной [19–21].

В почве с чистым компостом (образец П+К) количество бактериальных штаммов находилось примерно на одном уровне – в среднем  $7.30 \cdot 10^6$  копий/г; в количестве грибных штаммов наблюдался небольшой спад на 3-е сутки (в 1.42 раза по сравнению с 1-ми сутками). Значительных колебаний в численности бактерий и микроскопических грибов в данном образце П+К обнаружено не было, что, скорее всего, связано с отсутствием в исходном компосте токсичных для них соединений.

Более значительные колебания численности бактерий были отмечены в образцах П+К+ОТС и П+К+АРГ. Так, на 1-е и 3-е сутки численность бактерий в образце П+К+ОТС была ниже, чем в других смесях почвы с компостом, и составила  $4.85 \cdot 10^6$  копий генов/г. На 5-е сутки был зафиксирован резкий рост в их количестве –  $1.50 \cdot 10^7$  копий генов/г, что в 3.43 раза больше, чем на 3-е сутки. Такая высокая численность бактерий держалась до 21 суток. На 28–35-е сутки количество генов бактерий снизилось и составило в среднем  $1.13 \cdot 10^7$  копий/г, однако оно значительно превышало таковое в остальных образцах. Описанное снижение численности бактерий на 1–3-е сутки может быть связано с ингибированием чувствительных к антибиотику бактерий, а последующее резкое увеличение – с активным размножением устойчивых видов [3].

В образце П+К+АРГ произошел рост численности бактерий на 3–7-е сутки в 1.76 раза в сравнении с 1-ми сутками. Далее наблюдалось плавное снижение количества копий бактериальных генов, которое на 35-е сутки составило  $5.95 \cdot 10^6$  копий/г. Вероятно, увеличение количества бактерий связано, как и в образце П+К+ОТС, с размножением видов, выработавших механизмы устойчивости к ОТС, который был внесен в исходный компост для формирования антибиотикорезистентности.

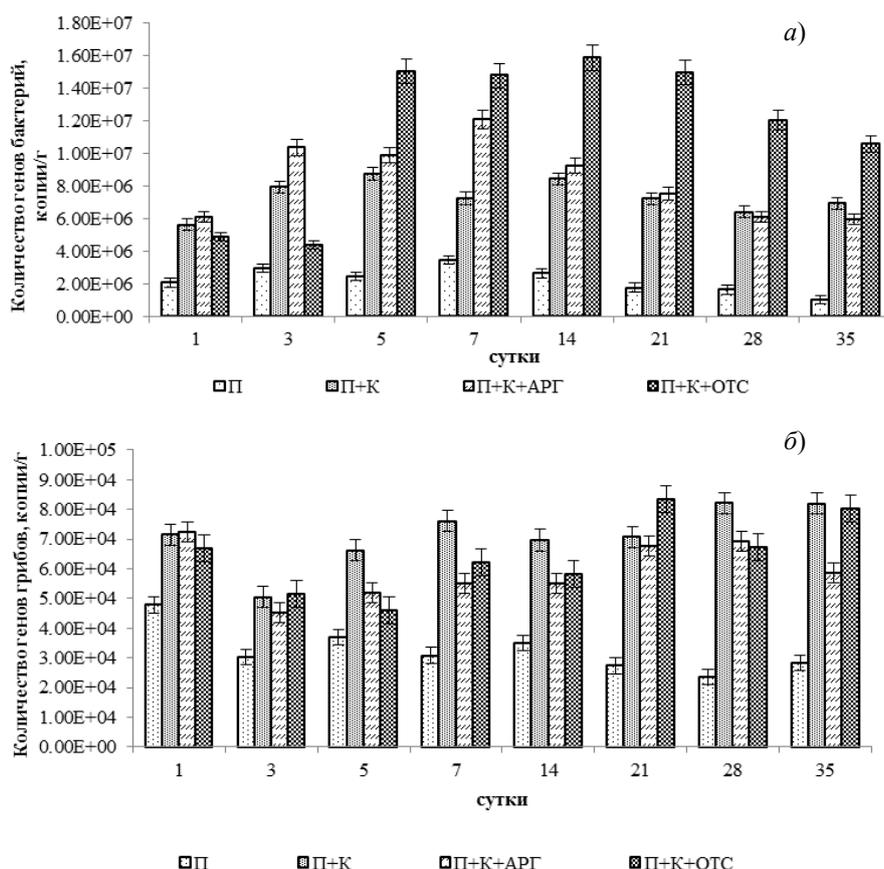


Рис. 1. Количество бактерий (а) и грибов (б) в смесях почвы и компоста, содержащего ОТС и гены устойчивости к тетрациклину

Как и в случае бактерий, численность грибов в контрольной почве оказалась ниже, чем в почве, обработанной компостом, содержащим антибиотик, и компостом, содержащим гены устойчивости, что связано с более богатым по численности составом микробного сообщества компостов. В остальных образцах почвы и компоста наблюдались колебания численности грибов во времени, однако значимых различий между образцами обнаружено не было.

Соотношение численности бактерий и грибов, представленное на рис. 2, более ярко демонстрирует описанные тенденции: так, в чистой почве наблюдался постоянный уровень их соотношения. В почве с чистым компостом (образец П+К) соотношение бактерии/грибы было больше, чем в почве без компоста, особенно на 3-е сутки, поскольку для компоста характерно другое по соотношению микробное сообщество [22]. В образце П+К+АРГ на 3–14-е сутки соотношение бактерии и грибов значительно превышает таковое в почве с чистым компостом, так как вероятно для бактерий-носителей антибиотикорезистентности в чистой почве более благоприятные условия [23]. В образце П+К+ОТС на 1-е и 3-е сутки соотношение бактерий и грибов находится в пределах уровня контрольного образца, так как антибиотик, вероятно, оказывал прямое токсическое воздействие [6]. Далее это соотношение значительно увеличилось в результате приспособления

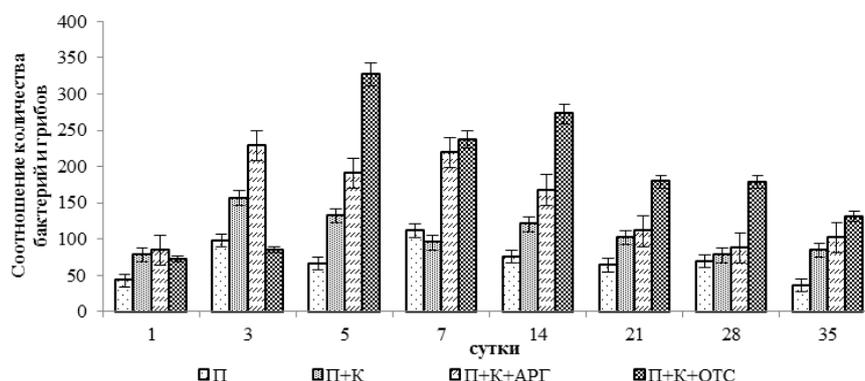


Рис. 2. Соотношение численности бактерий и грибов в смесях почвы и компоста, содержащего ОТС и гены устойчивости к тетрациклинам

к антибиотику видов с генами устойчивости, которые заняли экологическую нишу [24]. В целом для всех образцов почвы с компостом в соотношении численности бактерий и грибов отмечалось плавное снижение к 35-м суткам вследствие стабилизации микробного сообщества.

Результаты скрининга на присутствие генов антибиотикорезистентности в почве представлены на рис. 3. Было обнаружено, что контрольная почва не содержала устойчивые к тетрациклинам гены. Внесение в почву компоста, содержащего препарат ОТС, и компоста, содержащего гены устойчивости *tet(M)* и *tet(X)*, привело к формированию антибиотикорезистентности у почвенных микроорганизмов, что подтверждается литературными данными [25–27]. Гены устойчивости *tet(M)* и *tet(X)* были обнаружены в этих образцах начиная с 1-х суток эксперимента. Более низкий уровень содержания генов *tet(M)* и *tet(X)* в смеси почвы и компоста с ОТС на 1-е сутки, вероятно, связан с тем, что бактерии не сразу выработали механизмы устойчивости против ОТС. Наибольшее количество генов устойчивости отмечено на 5–7-е сутки: в образце П+К+АРГ количество генов *tet(M)* и *tet(X)* составило в среднем  $3.31 \cdot 10^6$  и  $7.77 \cdot 10^6$  копий/г, в образце П+К+ОТС –  $4.48 \cdot 10^6$  и  $9.10 \cdot 10^6$  копий/г соответственно. Увеличение содержания генов устойчивости на 5-е сутки может быть результатом интенсификации горизонтального переноса между бактериями компоста и почвенными бактериями [27].

Представляется интересным, что наиболее интенсивно устойчивость к тетрациклинам формировалась в образце П+К+ОТС, что, вероятно, связано с наличием прямого фактора «давления среды» [28]. К концу эксперимента образцах П+К+ОТС и П+К+АРГ наблюдалось плавное снижение уровня резистентности.

В образце П+К наличие генов устойчивости к тетрациклинам *tet(M)* и *tet(X)* ожидаемо не было выявлено. В дальнейшем оба вида генов были обнаружены в почве, но в меньших количествах, чем в образцах с двумя другими видами компоста. Появление генов устойчивости в почве, обработанной чистым компостом, вероятно, обусловлено тем, что в исходных навозах, использованных для компостирования, такие гены присутствовали [29]. Они элиминировались, видимо, в связи с неблагоприятными для их бактерий-носителей условиями

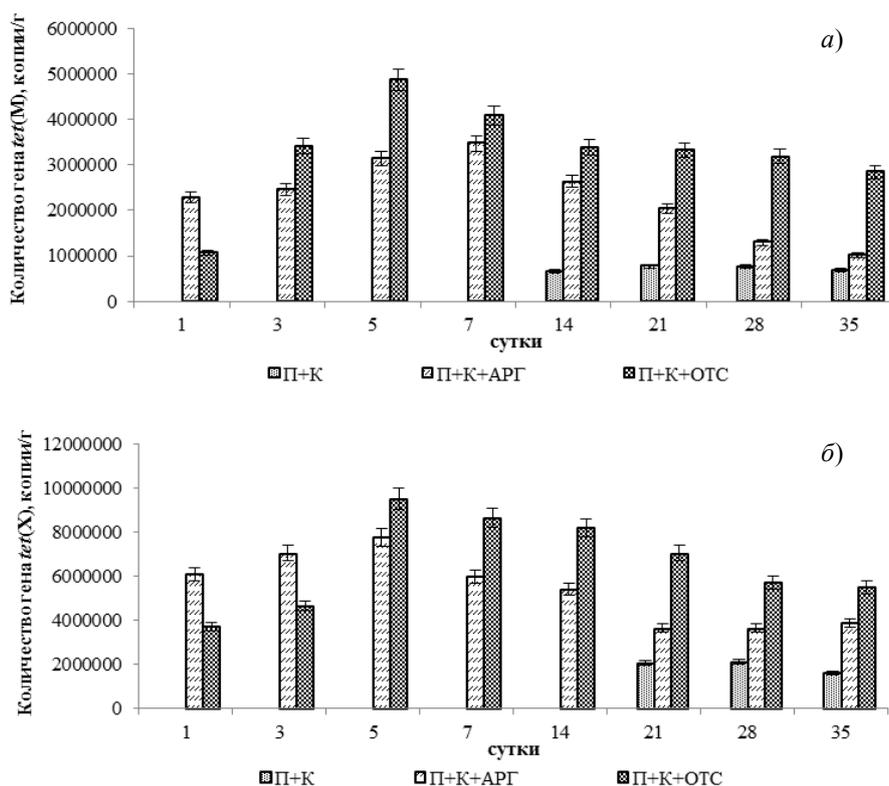


Рис. 3. Содержание генов устойчивости к тетрациклинам *tet(M)* (а) и *tet(X)* (б) в смесях почвы и компоста, содержащего ОТС и гены устойчивости к тетрациклинам

во время компостирования, такими как высокая температура, изменения рН, появление продуктов разложения органического вещества [27]. Однако, по всей вероятности, элиминирование не произошло полностью, а лишь до уровня, находящегося ниже предела обнаружения используемого метода – ПЦР в реальном времени. При попадании в благоприятные для себя (почвенные) условия бактерии, носители генов устойчивости, начали размножаться и, возможно, передавать способность к антибиотикорезистентности другим видам, вследствие чего гены устойчивости были обнаружены в почве [23].

### Заключение

В работе показано, что при удобрении почвы как условно чистым компостом, так и компостами, содержащими ОТС и гены антибиотикорезистентности, наблюдается увеличение количества бактериальных и грибных штаммов по сравнению с необработанной контрольной почвой. Удобрение почвы компостом с ОТС, вероятно, вызвало сначала значительное элиминирование чувствительных к нему бактерий, а затем рост численности тех видов, которые приобрели устойчивость. Присутствие в компосте и антибиотика, и генов антибиотикорезистентности привело к увеличению в почве бактерий, носителей устойчивости к тетрациклинам. Причем наиболее значительно количество генов устойчивости к тетрациклинам увеличилось в почве с компостом, содержащим ОТС. На более

поздних стадиях инкубирования гены устойчивости к тетрациклинам были отмечены для почвы, обработанной и условно чистым компостом.

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-29-25054).

#### Литература

1. *Bouki C., Venieri D., Diamadopoulos E.* Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2013. – V. 91, No 5. – P. 1–9. – doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.01.016.
2. *Naquin A., Shrestha A., Sherpa M., Nathaniel R., Boopathy R.* Presence of antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant in Thibodaux, Louisiana, USA // *Bioresour. Technol.* – 2015. – V. 188. – P. 79–83. – doi: 10.1016/j.biortech.2015.01.052.
3. *Sarmah A.K., Meyer M.T., Boxall A.B.* A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment // *Chemosphere.* – 2006. – V. 65, No 5. – P. 725–759. – doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.03.026.
4. *Thiele-Bruhn S., Beck I.C.* Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass // *Chemosphere.* – 2005. – V. 59, No 4. – P. 457–465. – doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.01.023.
5. *Fang H., Han Y., Yin Y., Pan X., Yu Y.* Variations in dissipation rate, microbial function and antibiotic resistance due to repeated introductions of manure containing sulfadiazine and chlortetracycline to soil // *Chemosphere.* – 2014. – V. 96. – P. 51–56. – doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.07.016.
6. *Halling-Sørensen B., Nors Nielsen S., Lanzky P.F., Ingerslev F., Holten Lützhøft H.C., Jørgensen S.E.* Occurrence, fate and effects of pharmaceuticals substance in the environment – A review // *Chemosphere.* – 1998. – V. 36, No 2. – P. 357–393. – doi: 10.1016/s0045-6535(97)00354-8.
7. *Hammesfahr U., Heuer H., Manzke B., Smalla K., Thiele-Bruhn S.* Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils // *Soil Biol. Biochem.* – 2008. – V. 40, No 7. – P. 1583–1591. – doi: 10.1016/j.soilbio.2008.01.010.
8. *Reichel R., Rosendahl I., Peeters E.T.H.M., Focks A., Groeneweg J., Bierl R., Schlichting A., Amelung W., Thiele-Bruhn S.* Effects of slurry from sulfadiazine-(SDZ) and difloxacin-(DIF) medicated pigs on the structural diversity of microorganisms in bulk and rhizosphere soil // *Soil Biol. Biochem.* – 2013. – V. 62. – P. 82–91. – doi: 10.1016/j.soilbio.2013.03.007.
9. *Zhang T., Zhang M., Zhang X., Fang H.H.* Tetracycline resistance genes and tetracycline resistant lactose-fermenting enterobacteriaceae in activated sludge of sewage treatment plants // *Environ. Sci. Technol.* – 2009. – V. 43, No 10. – P. 3455–3460. – doi: 10.1021/es803309m.
10. *Wu X., Wei Y., Zheng J., Zhao X., Zhong W.* The behavior of tetracyclines and their degradation products during swine manure composting // *Bioresour. Technol.* – 2011. – V. 102, No 10. – P. 5924–5931. – doi: 10.1016/j.biortech.2011.03.007.
11. *Kemper N.* Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment // *Ecol. Indic.* – 2008. – V. 8, No 1. – P. 1–13. – doi: 10.1016/j.ecolind.2007.06.002.
12. *Dolliver H., Noll S.L.* Antibiotic degradation during manure composting // *J. Environ. Qual.* – 2008. – V. 37, No 3. – P. 1245–1253. – doi: 10.2134/jeq2007.0399.

13. *Ramaswamy J., Prasher S.O., Patel R.M., Hussain S.A., Barrington S.F.* The effect of composting on the degradation of a veterinary pharmaceutical // *Bioresour. Technol.* – 2010. – V. 101, No 7. – P. 2294–2299. – doi: 10.1016/j.biortech.2009.10.089.
14. *Arikan O.A., Sikora L.J., Mulbry W., Khan S.U., Foster G.D.* Composting rapidly reduces levels of extractable oxytetracycline in manure from therapeutically treated beef calves // *Bioresour. Technol.* – 2007. – V. 98, No 1. – P. 169–176. – doi: 10.1016/j.biortech.2005.10.041.
15. *Kim K., Owens G., Ok Y.S., Park W.K., Lee D.B., Kwon S.I.* Decline in extractable antibiotics in manure-based composts during composting // *Waste Manage.* – 2012. – V. 32, No 1. – P. 110–116. – doi: 10.1016/j.wasman.2011.07.026.
16. *Li B., Zhang T., Xu Z., Fang H.H.* Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Anal. Chim. Acta.* – 2009. – V. 645, No 1–2. – P. 64–72. – doi: 10.1016/j.aca.2009.04.042.
17. ISO 17601:2016 Soil quality – Estimation of abundance of selected microbial gene sequences by quantitative PCR from DNA directly extracted from soil. – 2016. – P. 1–31.
18. *Zhang W., Huang M., Qi F., Sun P., Van Ginkel S.* Effect of trace tetracycline concentrations on the structure of a microbial community and the development of tetracycline resistance genes in sequencing batch reactors // *Bioresour. Technol.* – 2013. – V. 150, No 1. – P. 9–14. – doi: 10.1016/j.biortech.2013.09.081.
19. *Arslan E.I., Obek E., Kirbag S.* Determination of the effect of compost on soil microorganisms // *Int. J. Sci. Technol.* – 2008. – V. 3, No 2. – P. 151–159.
20. *Kim K.D., Nemeč S., Musson G.* Effects of composts and soil amendments on soil microflora and *Phytophthora* root and crown rot of bell pepper // *Crop Prot.* – 1997. – V. 16, No 2. – P. 165–172. – doi: 10.1016/S0261-2194(96)00074-9.
21. *Zhen Z., Liu H., Wang N., Guo L., Meng J., Ding N., Wu G., Jiang G.* Effects of manure compost application on soil microbial community diversity and soil microenvironments in a temperate cropland in China // *PLoS One.* – 2014. – V. 9, No 10. – Art. e108555, P. 1–12. – doi: 10.1371/journal.pone.0108555.
22. *Danon M., Franke-Whittle I.H., Insam H., Chen Y., Hadar Y.* Molecular analysis of bacterial community succession during prolonged compost curing // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2008. – V. 65, No 1. – P. 133–144. – doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00506.x.
23. *Xu S., Amarakoon I.D., Zaheer R., Smith A., Sura S., Wang G., Reuter T., Zvomuya F., Cessna A.J., Larney F.J., McAllister T.A.* Dissipation of antimicrobial resistance genes in compost originating from cattle manure after direct oral administration or post-excretion fortification of antimicrobials // *J. Environ. Sci. Health* – 2018. – V. 53, No 4. – P. 373–384. – doi: 10.1080/10934529.2017.1404337.
24. *Cheng W., Li J., Wu Y., Xu L., Su C., Qian Y., Zhu Y.G., Chen H.* Behavior of antibiotics and antibiotic resistance genes in eco-agricultural system: A case study // *J. Hazard. Mater.* – 2016. – V. 304. – P. 18–25. – doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.10.037.
25. *Venglovsky J., Sasakova N., Placha I.* Pathogens and antibiotic residues in animal manures and hygienic and ecological risks related to subsequent land application // *Bioresour. Technol.* – 2009. – V. 100, No 22. – P. 5386–5391. – doi: 10.1016/j.biortech.2009.03.068.
26. *Wang F.H., Qiao M., Chen Z., Su J.Q., Zhu Y.G.* Antibiotic resistance genes in manure-amended soil and vegetables at harvest // *J. Hazard. Mater.* – 2015. – V. 299, No 3. – P. 215–221. – doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.05.028.

27. Xie W.-Y., Shen Q., Zhao F.J. Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: A review // Eur. J. Soil Sci. – 2017. – V. 69, No 1. – P. 181–195. – doi: 10.1111/ejss.12494.
28. Chen W., Liu W.L., Pan N., Jiao W., Wang M. Oxytetracycline on functions and structure of soil microbial community // J. Soil Sci. Plant Nutr. – 2013. – V. 13, No 4. – P. 967–975. – doi: 10.4067/S0718-95162013005000076.
29. Qian X., Sun W., Gu J., Wang X.J., Sun J.J., Yin Y.N., Duan M.L. Variable effects of oxytetracycline on antibiotic resistance gene abundance and the bacterial community during aerobic composting of cow manure // J. Hazard. Mater. – 2016. – V. 315. – P. 61–69. – doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.05.002.

Поступила в редакцию  
29.03.19

---

**Данилова Наталья Викторовна**, младший научный сотрудник НИЛ «Биоконтроль» Института экологии и природопользования

Казанский (Приволжский) федеральный университет  
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия  
E-mail: [natasha-danilova91@mail.ru](mailto:natasha-danilova91@mail.ru)

**Курынцева Полина Александровна**, кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры прикладной экологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет  
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия  
E-mail: [polinazwerewa@yandex.ru](mailto:polinazwerewa@yandex.ru)

**Тагиров Марсель Шарипзянович**, доктор сельскохозяйственных наук, директор

Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства ФИЦ Казанский научный центр РАН  
ул. Оренбургский тракт, д. 48, г. Казань, 420059, Россия  
E-mail: [tatniva@mail.ru](mailto:tatniva@mail.ru)

**Галицкая Полина Юрьевна**, кандидат биологических наук, доцент кафедры прикладной экологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет  
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия  
E-mail: [gpolina33@yandex.ru](mailto:gpolina33@yandex.ru)

**Селивановская Светлана Юрьевна**, доктор биологических наук, профессор кафедры прикладной экологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет  
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия  
E-mail: [svetlana.selivanovskaya@kpfu.ru](mailto:svetlana.selivanovskaya@kpfu.ru)

doi: 10.26907/2542-064X.2019.3.395-407

**Spreading of Antibiotic Resistance as a Result of Soil Fertilization  
by Manure Composts Containing Oxytetracycline and Antibiotic-Resistant Genes***N.V. Danilova*<sup>a\*</sup>, *P.A. Kuryntseva*<sup>a\*\*</sup>, *M.Sh. Tagirov*<sup>b\*\*\*</sup>, *P.Yu. Galitskaya*<sup>a\*\*\*\*</sup>,  
*S.Yu. Selivanovskaya*<sup>a\*\*\*\*\*</sup><sup>a</sup>*Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*<sup>b</sup>*Tatar Scientific Research Institute of Agriculture, FRC Kazan Scientific Center,  
Russian Academy of Sciences, Kazan, 420059 Russia*E-mail: \**natasha-danilova91@mail.ru*, \*\**polinazwerewa@yandex.ru*, \*\*\**tatniva@mail.ru*,  
\*\*\*\**gpolina33@yandex.ru*, \*\*\*\*\**svetlana.selivanovskaya@kpfu.ru*

Received March 29, 2019

**Abstract**

Due to the active usage of antibacterial drugs in animal husbandry, antibiotic residues and antibiotic-resistance genes enter the soil when it is fertilized with manure and compost. In this work, we estimated the spread of antibiotic-resistance genes in the soil when it was fertilized with composts containing oxytetracycline (OTC) and tetracycline-resistance genes. The following mixtures were studied for 35 days: the soil with “clean” compost, the soil with compost and 300 mg kg<sup>-1</sup> OTC, the soil with compost and antibiotic-resistance genes. In the soil treated with composts, the number of bacteria and fungi increased, with the greatest changes in the number of bacteria observed for the soil with compost containing OTC. The addition of compost with the antibiotic and the resistance genes *tet(M)* and *tet(X)* to the soil led to the formation of antibiotic resistance in soil microorganisms with the highest number of gene copies for 5–7 days: an average of 3.31·10<sup>6</sup> and 7.77·10<sup>6</sup> copies g<sup>-1</sup>, respectively. Both genes, *tet(M)* and *tet(X)*, but in smaller numbers, were detected in the soil with “clean” compost on days 14–21, respectively.

**Keywords:** antibiotics, oxytetracycline, antibiotic resistance, antibiotic-resistance genes, compost, real-time PCR

**Acknowledgments.** The study was supported by the Russian Science Foundation (project no. 18-29-25054).

**Figure Captions**

Fig. 1. The number of bacteria (*a*) and fungi (*b*) in the mixtures of soil and compost containing OTC and tetracycline-resistance genes.

Fig. 2. The ratio of the number of bacteria and fungi in the mixtures of soil and compost containing OTC and tetracycline-resistance genes.

Fig. 3. The content of the tetracycline-resistance genes *tet(M)* (*a*) and *tet(X)* (*b*) in the mixtures of soil and compost containing OTC and tetracycline-resistance genes.

**References**

1. Bouki C., Venieri D., Diamadopoulos E. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2013, vol. 91, no. 5, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.01.016.
2. Naquin A., Shrestha A., Sherpa M., Nathaniel R., Boopathy R. Presence of antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant in Thibodaux, Louisiana, USA. *Bioresour. Technol.*, 2015, vol. 188, pp. 79–83. doi: 10.1016/j.biortech.2015.01.052.

3. Sarmah A.K., Meyer M.T., Boxall A.B. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 2006, vol. 65, no. 5, pp. 725–759. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.03.026.
4. Thiele-Bruhn S., Beck I.C. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere*, 2005, vol. 59, no. 4, pp. 457–465. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.01.023.
5. Fang H., Han Y., Yin Y., Pan X., Yu Y. Variations in dissipation rate, microbial function and antibiotic resistance due to repeated introductions of manure containing sulfadiazine and chlortetracycline to soil. *Chemosphere*, 2014, vol. 96, pp. 51–56. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.07.016.
6. Halling-Sørensen B., Nors Nielsen S., Lanzky P.F., Ingerslev F., Holten Lützhøft H.C., Jørgensen S.E. Occurrence, fate and effects of pharmaceuticals substance in the environment – A review. *Chemosphere*, 1998, vol. 36, no. 2, pp. 357–393. doi: 10.1016/s0045-6535(97)00354-8.
7. Hammesfahr U., Heuer H., Manzke B., Smalla K., Thiele-Bruhn S. Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.*, 2008, vol. 40, no. 7, pp. 1583–1591. doi: 10.1016/j.soilbio.2008.01.010.
8. Reichel R., Rosendahl I., Peeters E.T.H.M., Focks A., Groeneweg J., Bierl R., Schlichting A., Amelung W., Thiele-Bruhn S. Effects of slurry from sulfadiazine-(SDZ) and difloxacin-(DIF) medicated pigs on the structural diversity of microorganisms in bulk and rhizosphere soil. *Soil Biol. Biochem.*, 2013, vol. 62, pp. 82–91. doi: 10.1016/j.soilbio.2013.03.007.
9. Zhang T., Zhang M., Zhang X., Fang H.H. Tetracycline resistance genes and tetracycline resistant lactose-fermenting enterobacteriaceae in activated sludge of sewage treatment plants. *Environ. Sci. Technol.*, 2009, vol. 43, no. 10, pp. 3455–3460. doi: 10.1021/es803309m.
10. Wu X., Wei Y., Zheng J., Zhao X., Zhong W. The behavior of tetracyclines and their degradation products during swine manure composting. *Bioresour. Technol.*, 2011, vol. 102, no. 10, pp. 5924–5931. doi: 10.1016/j.biortech.2011.03.007.
11. Kemper N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol. Indic.*, 2008, vol. 8, no. 1, pp. 1–13. doi: 10.1016/j.ecolind.2007.06.002.
12. Dolliver H., Noll S.L. Antibiotic degradation during manure composting. *J. Environ. Qual.*, 2008, vol. 37, no. 3, pp. 1245–1253. doi: 10.2134/jeq2007.0399.
13. Ramaswamy J., Prasher S.O., Patel R.M., Hussain S.A., Barrington S.F. The effect of composting on the degradation of a veterinary pharmaceutical. *Bioresour. Technol.*, 2010, vol. 101, no. 7, pp. 2294–2299. doi: 10.1016/j.biortech.2009.10.089.
14. Arikian O.A., Sikora L.J., Mulbry W., Khan S.U., Foster G.D. Composting rapidly reduces levels of extractable oxytetracycline in manure from therapeutically treated beef calves. *Bioresour. Technol.*, 2007, vol. 98, no. 1, pp. 169–176. doi: 10.1016/j.biortech.2005.10.041.
15. Kim K., Owens G., Ok Y.S., Park W.K., Lee D.B., Kwon S.I. Decline in extractable antibiotics in manure-based composts during composting. *Waste Manage.*, 2012, vol. 32, no. 1, pp. 110–116. doi: 10.1016/j.wasman.2011.07.026.
16. Li B., Zhang T., Xu Z., Fang H.H. Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 2009, vol. 645, nos. 1–2, pp. 64–72. doi: 10.1016/j.aca.2009.04.042.
17. ISO 17601:2016 Soil quality — Estimation of abundance of selected microbial gene sequences by quantitative PCR from DNA directly extracted from soil, 2016, pp. 1–31.
18. Zhang W., Huang M., Qi F., Sun P., Van Ginkel S. Effect of trace tetracycline concentrations on the structure of a microbial community and the development of tetracycline resistance genes in sequencing batch reactors. *Bioresour. Technol.*, 2013, vol. 150, no. 1, pp. 9–14. doi: 10.1016/j.biortech.2013.09.081.
19. Arslan E.I., Obek E., Kirbag S. Determination of the effect of compost on soil microorganisms. *Int. J. Sci. Technol.*, 2008, vol. 3, no. 2, pp. 151–159.
20. Kim K.D., Nemeč S., Musson G. Effects of composts and soil amendments on soil microflora and *Phytophthora* root and crown rot of bell pepper. *Crop Prot.*, 1997, vol. 16, no. 2, pp. 165–172. doi: 10.1016/S0261-2194(96)00074-9.
21. Zhen Z., Liu H., Wang N., Guo L., Meng J., Ding N., Wu G., Jiang G. Effects of manure compost application on soil microbial community diversity and soil microenvironments in a temperate

- cropland in China. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 10, art. e108555, pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0108555.
22. Danon M., Franke-Whittle I.H., Insam H., Chen Y., Hadar Y. Molecular analysis of bacterial community succession during prolonged compost curing. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2008, vol. 65, no. 1, pp. 133–144. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00506.x.
  23. Xu S., Amarakoon I.D., Zaheer R., Smith A., Sura S., Wang G., Reuter T., Zvomuya F., Cessna A.J., Larney F.J., McAllister T.A. Dissipation of antimicrobial resistance genes in compost originating from cattle manure after direct oral administration or post-excretion fortification of antimicrobials. *J. Environ. Sci. Health*, 2018, vol. 53, no. 4, pp. 373–384. doi: 10.1080/10934529.2017.1404337.
  24. Cheng W., Li J., Wu Y., Xu L., Su C., Qian Y., Zhu Y.G., Chen H. Behavior of antibiotics and antibiotic resistance genes in eco-agricultural system: A case study. *J. Hazard. Mater.*, 2016, vol. 304, pp. 18–25. doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.10.037.
  25. Venglovsky J., Sasakova N., Placha I. Pathogens and antibiotic residues in animal manures and hygienic and ecological risks related to subsequent land application. *Bioresour. Technol.*, 2009, vol. 100, no. 22, pp. 5386–5391. doi: 10.1016/j.biortech.2009.03.068.
  26. Wang F.H., Qiao M., Chen Z., Su J.Q., Zhu Y.G. Antibiotic resistance genes in manure-amended soil and vegetables at harvest. *J. Hazard. Mater.*, 2015, vol. 299, no. 3, pp. 215–221. doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.05.028.
  27. Xie W.-Y., Shen Q., Zhao F.J. Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: A review. *Eur. J. Soil Sci.*, 2017, vol. 69, no. 1, pp. 181–195. doi: 10.1111/ejss.12494.
  28. Chen W., Liu W.L., Pan N., Jiao W., Wang M. Oxytetracycline on functions and structure of soil microbial community. *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, 2013, vol. 13, no. 4, pp. 967–975. doi: 10.4067/S0718-95162013005000076.
  29. Qian X., Sun W., Gu J., Wang X.J., Sun J.J., Yin Y.N., Duan M.L. Variable effects of oxytetracycline on antibiotic resistance gene abundance and the bacterial community during aerobic composting of cow manure. *J. Hazard. Mater.*, 2016, vol. 315, pp. 61–69. doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.05.002.

**Для цитирования:** Данилова Н.В., Курынцева П.А., Тагиров М.Ш., Галицкая П.Ю., Селивановская С.Ю. Распространение антибиотикорезистентности в почве при ее обработке компостами, содержащими окситетрациклин и гены устойчивости к нему // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2019. – Т. 161, кн. 3. – С. 395–407. – doi: 10.26907/2542-064X.2019.3.395-407.

**For citation:** Danilova N.V., Kuryntseva P.A., Tagirov M.Sh., Galitskaya P.Yu., Selivanovskaya S.Yu. Spreading of antibiotic resistance as a result of soil fertilization by manure composts containing oxytetracycline and antibiotic-resistant genes. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2019, vol. 161, no. 3, pp. 395–407. doi: 10.26907/2542-064X.2019.3.395-407. (In Russian)