

**Краткая информация о результатах,
полученных во второй год 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)**

Распространение устойчивости микроорганизмов к антибиотикам является значительной проблемой не только в медицине, но и в сельском хозяйстве. Животные и птицы получают антибиотики для лечения и профилактики заболеваний, а также для стимуляции набора веса. До 90% антибиотиков выводится из организма в неизменном виде с мочой и калом. Кроме того, в составе навозов и пометов зачастую присутствуют приобретенные резистентность к антибиотикам микроорганизмы. Даже после элиминации самих антибиотиков, свойства устойчивости к ним могут длительно сохраняться у микроорганизмов экосистем, в которые они попали, передаваясь из поколения в поколения путем вертикального трансфера, а также от одного вида микроорганизмов к другому – в ходе горизонтального.

Компостирование навозов и пометов является процессом, который значительно влияет на поведение генов устойчивости к антибиотикам, поскольку при компостировании значительно изменяется микробный состав субстратов и происходят колебания температуры. Однако в научной литературе нет однозначного мнения о направленности такого влияния – одни ученые показывают, что компостирование приводит к элиминированию генов устойчивости к антибиотикам, другие – к отсутствию элиминирования или даже росту их содержания. Такая полярность во мнениях исследователей связана с различиями в свойствах компостируемых субстратов, климатических условиях, при которых проводится компостирование, и рядом других факторов. В последнее время проводится поиск возможностей снизить содержание генов устойчивости к антибиотикам в процессе компостирования с помощью различных добавок. В данном исследовании в качестве такой добавки использовался биочар из куриного помета – пористый материал, являющийся продуктом низкотемпературного бескислородного разложения биомассы.

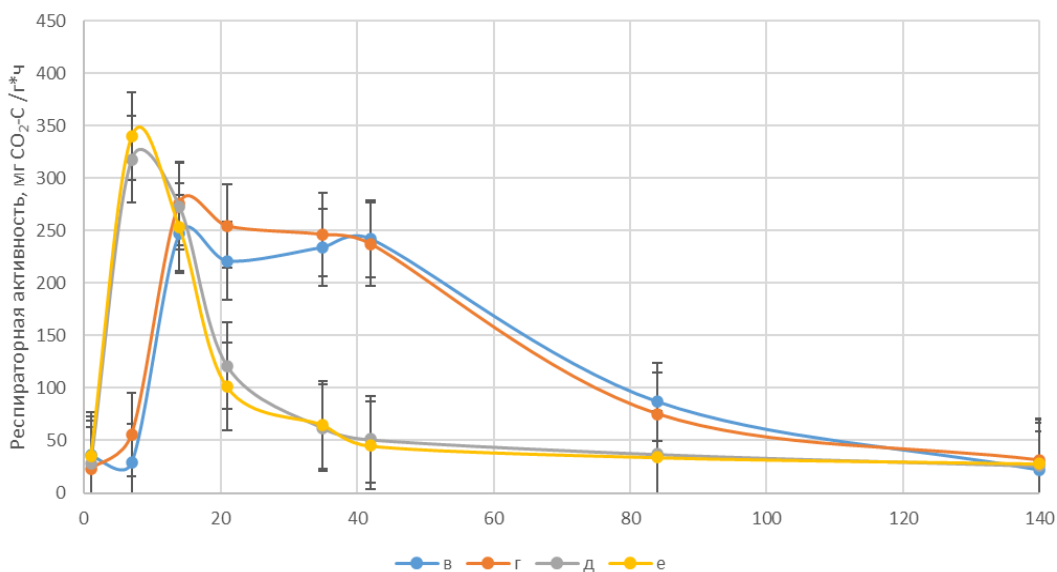
В рамках второго года исследований проведено компостирование подстилочного куриного помета, который: 1) был предварительно стерилизован и инокулирован тремя штаммами микроорганизмов (системы «в» и «г»), 2) не был предварительно стерилизован (системы «д» и «е»). В системы «г» и «е» был добавлен биочар 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.

Полученные температурные профили совпадали в парах систем в/г и д/е. В случае компостирования нестерильных пометов повышение температуры с уровня комнатной до 50-55 °С наблюдалось с 3 по 7 сутки. С 7 до 21 сутки отмечалось постепенное снижение температуры, однако продолжалось сохранение саморазогрева компостов относительно температуры окружающей среды. Далее температура сохранялась на уровне окружающей среды, с незначительными колебаниями. В системах в/г (стерильный помет, с добавлением микроорганизмов) температурный пик был сдвинут во времени и снижен по абсолютным значениям – так, максимальные температуры 40-45 °С отмечались с 15 по 37 сутки. 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

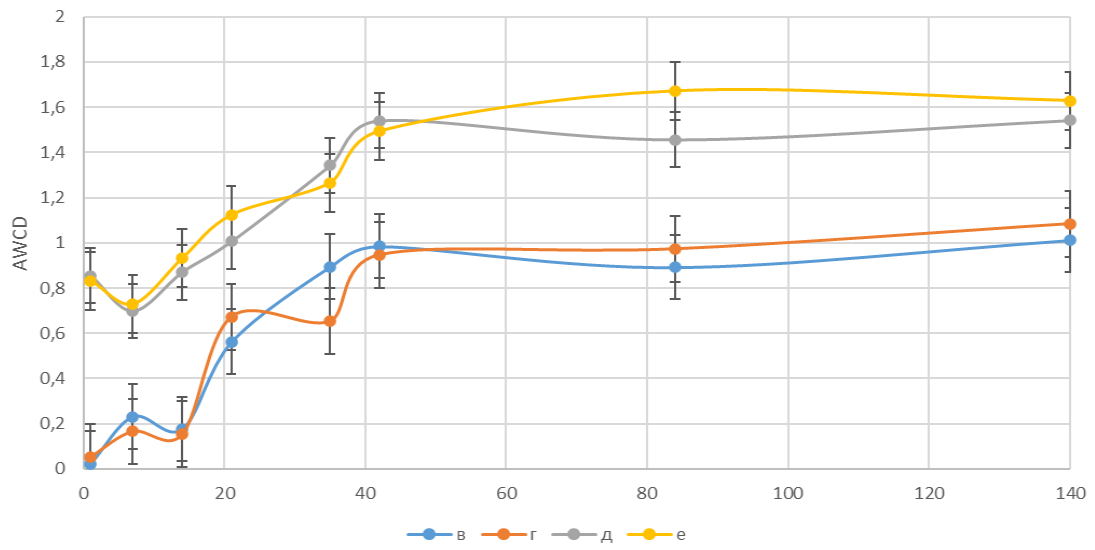
него, снижение содержания антибиотика происходило значительно медленнее – так, на 84 сутки его оно составило в обоих случаях порядка 110 мг/кг. Полученные результаты свидетельствуют о: а) замедлении разложения ОТС в твердых средах по сравнению с жидкими, что, вероятно, связано с сорбцией и десорбцией 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.

Динамика респираторной активности была схожа в парах в/г и д/е, что, как и динамика температуры, по всей вероятности, связано с микробной активностью. В системах д/е отмечался пик респираторной активности, который по длительности несколько превышал температурный. В случае стерилизованных компостов, в которые были внесены микроорганизмы, максимальные значения были ниже и наблюдались позже. Общая метаболическая активность микробных сообществ компостов, выраженная с использованием показателя средней окрашенности ячеек AWCD в тесте Biolog Ecoplate, так же значительно различалась в парах систем. Между уровнями токсичности компостных смесей систем в-е по отношению к гидробионтам *Daphnia magna* и *Paramecium caudatum* был установлен коэффициент корреляции 0,76. В целом, *D. magna* оказалась более чувствительным тест-объектом к компонентам компостных смесей, чем псевдомонада. При этом именно в случае дафний наблюдались значительные различия в токсичности в паре систем в/г по сравнению с д/е (Рисунок 1).

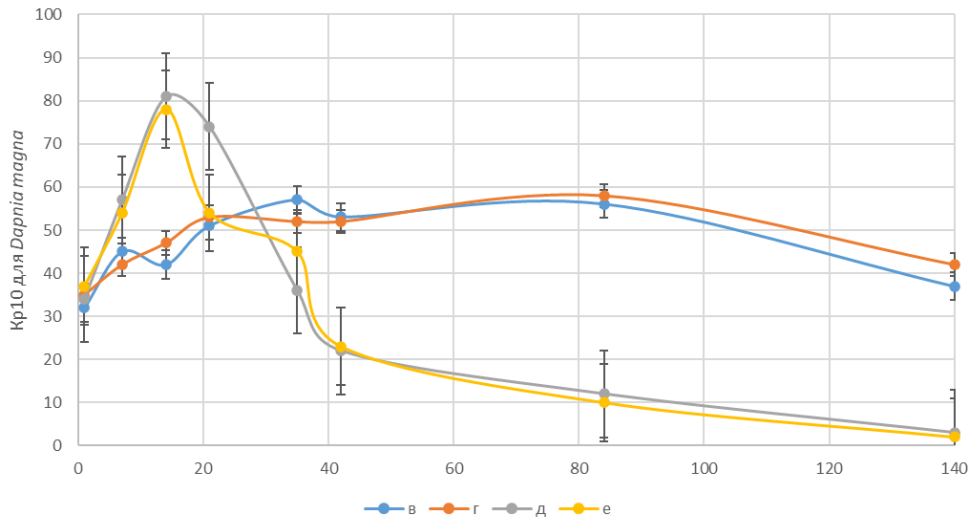
а



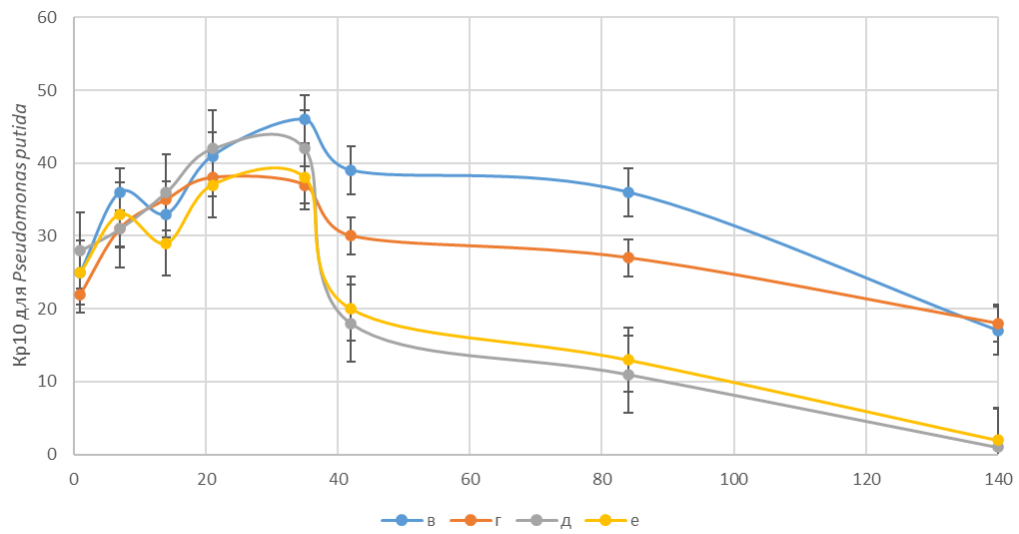
б



в



г



Д

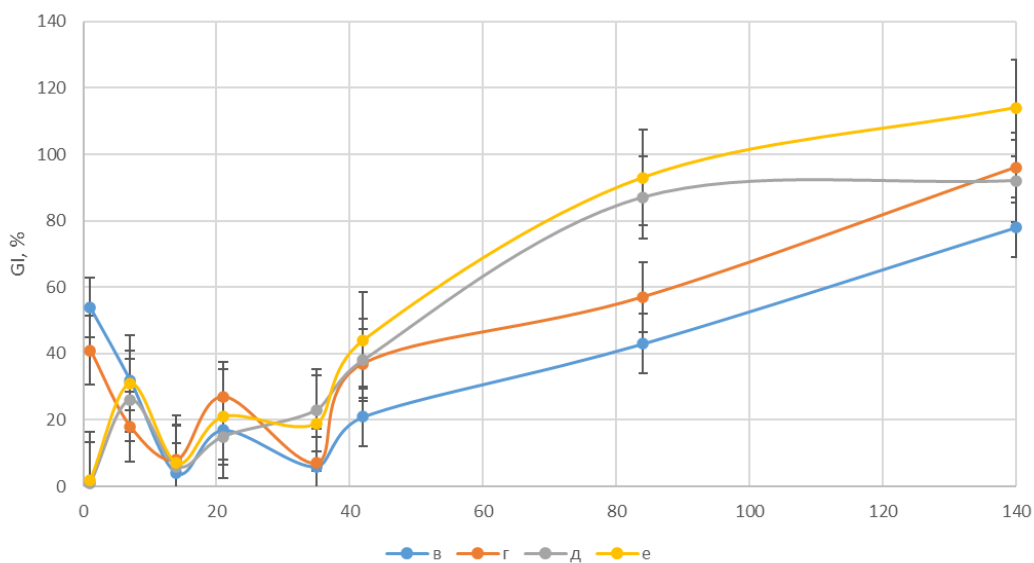


Рисунок 1. Данные о респираторной (а) и метаболической (б) активности, токсичности по отношению к гидробионтам (в) и удобрительных свойствах (д) компостных смесей систем в-е.

Фитотоксичность компоста оценивалась с помощью индекса прорастания (GI) на растениях овса (*Avena sativa*). В исходных смесях GI не превышал 3% и не зависел от присутствия биочара. Изменение GI было схожим внутри пар смесей в/г и д/е и различалось между парами. Так, в начале компостирования стерилизованные смеси обладали значительно более низкой фитотоксичностью по сравнению с нестерилизованными. В обеих парах наблюдались значительные флуктуации фитотоксичности в процессе компостирования, что, как известно из данных литературы, связано с разложением исходных органических соединений с образованием метаболитов, т.ч. органических кислот с высокой токсичностью в качестве промежуточных продуктов, и последующим синтезом органических соединений будущего компоста из простых составляющих. В начале компостирования во всех четырех видах систем были обнаружены все три выбранных нами для анализа гена устойчивости к тетрациклину. Наиболее высокое количество копий в начале компостирования было выявлено для гена *tet(X)* ($4,26 \cdot 10^3$ – $2,16 \cdot 10^6$), менее – для гена *tet(M)* ($5,90 \cdot 10^2$ – $2,17 \cdot 10^6$) и наименьшее – для гена *tet(A)* (0 – $2,31 \cdot 10^2$). В дальнейшем указанная тенденция преобладания числа копий *tet(X)* генов над другими сохранялась. Характер изменения числа копий генов устойчивости был схожим в паре в/г для всех трех генов (Рисунок 2).

Компостирование привело к снижению числа генов устойчивости к антибиотикам (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 первоначальном количестве. Таким образом, биочар играет роль в снижении антибиотикорезистентности компостов.

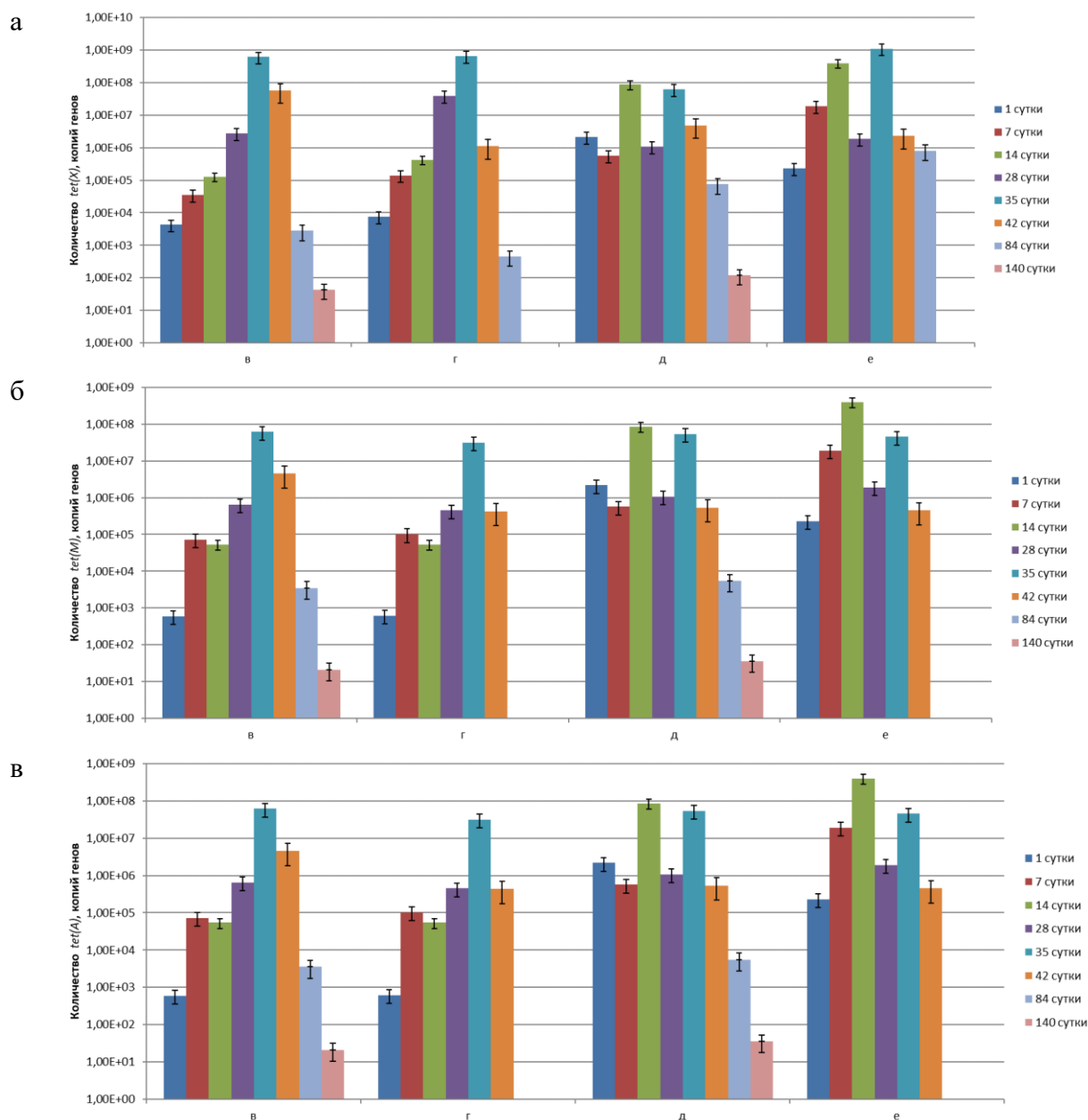


Рисунок 2. Содержание антибиотиков тетрациклиновой группы в компостах систем в-е

Далее было проведено варьирование параметров компостирования: концентрации ОТС, концентрации металлов (железо, никель, кадмий, медь), pH, температуры. Показано, что содержание ОТС (от 50 до 300 мг/кг) в пометах влияет на количество ГУА в них, но не на тенденции их изменения. При этом содержание ОТС не влияет на интегральные микробные характеристики, такие как респираторная активность и способность потреблять углеродные субстраты, что, вероятно, связано с выполнением устойчивыми членами сообществ функций элиминированных неустойчивых. Варьирование pH (от 4 до 10 ед.) оказывает приводит к повышению токсичности компостов, причем больше этот эффект выражен в вариантах без биочара, что, вероятно, обусловлено отсутствием буферного действия последнего. 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 плазидах. 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. Предположения будут проверены на 3м году исследований.

Таблица 1. Описание основных эффектов варьирования параметров (содержания ОТС, содержания металлов, рН, регулирования температуры) на процессы компостирования в системах в-е.

Вид варьируемого параметра и система		Температурный профиль	Содержание ОТС и метаболитов	Количество ГУА	Респираторная активность	Метаболическая активность	Выживаемость D. magna	Выживаемость для P. caudatum	GI, %
Начальная концентрация ОТС	в	0	++	+	0	0	0	0	-
	г	0	++	+	0	0	0	0	-
	д	0	++	+	0	0	0	0	0
	е	0	++	+	0	0	0	0	0
рН	в	0	0	0	0	-	-	-	0
	г	0	0	0	0	0	-	0	0
	д	0	0	0	0	-	-	-	0
	е	0	0	0	0	0	-	0	0
Содержание металлов	в	0	0	+	0	0	--	-	-
	г	0	0	0	0	0	--	-	-
	д	0	0	+	0	0	--	-	-
	е	0	0	0	0	0	--	-	-
Регулирование температуры	в		--	-	+	+	+	+	+
	г		--	-	+	+	+	+	+
	д		--	-	+	+	+	+	+
	е		--	-	+	+	+	+	+

+ - наличие слабого влияния (чем больше, тем больше)

++ - наличие сильного влияния (чем больше, тем больше)

-- - наличие слабого влияния (чем больше, тем меньше)

--- - наличие сильного влияния (чем больше, тем меньше)