

МИКРОБНОЕ СООБЩЕСТВО ОТХОДОВ ПТИЦЕФАБРИКИ И ЕГО РОЛЬ В ОБРАЗОВАНИИ СЕРОВОДОРОДА

© 2021 г. Е. В. Груздев^{а, *}, Е. А. Латыголец^б, А. В. Белецкий^а, М. А. Григорьев^б, А. В. Марданов^а,
М. К. Кадырбаев^б, О. П. Иккерт^б, О. В. Карначук^б, Н. В. Равин^а

^аИнститут биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

^бЛаборатория биохимии и молекулярной биологии, Томский государственный университет, Томск, 634050 Россия

*e-mail: gruevg@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.02.2021 г.

После доработки 12.03.2021 г.

Принята к публикации 15.03.2021 г.

Микробиота отходов птицеводства остается практически неизученной, несмотря на ее ведущую роль в образовании летучих одорантов и неприятного запаха. Одним из основных компонентов запаха является сероводород, который может образовываться в результате микробной сульфатредукции. Исследован состав микробного сообщества отходов крупной птицефабрики “Межениновская”, расположенной на расстоянии 15 км от г. Томска. Методом профилирования 16S рРНК в микробном сообществе обнаружены представители сульфатредуцирующих *Desulfovibrionaceae*. Их доля в сообществе возрастала при инкубации отходов в среде с сульфатом и лактатом, при этом увеличивалась и продукция сероводорода. Источником сульфата в отходах может являться гипс, а также кормовые добавки, сформулированные в виде сульфатов, например, лизин сульфат.

Ключевые слова: микробиота отходов птицеводства, сероводород, сульфатредукция, *Desulfovibrio*

DOI: 10.31857/S0026365621040042

Образование летучих соединений с резким запахом – известная проблема производства мяса птицы. Основным источником запаха являются одоранты, включающие летучие органические соединения и неорганические соединения – аммоний, сероводород и восстановленные соединения серы (Traube et al., 2010). Сероводород имеет низкий порог чувствительности, 0.007 мг/м³, и служит одним из основных компонентов неприятного запаха отходов сельскохозяйственных животных (Traube et al., 2011). В концентрации свыше 0.1% в воздухе сероводород быстро вызывает тяжелое отравление с летальным исходом. Продолжительное воздействие низких концентраций H₂S может вызывать нейроповеденческие дисфункции (Fiedler et al., 2008).

В биотопах, содержащих сульфат, при дефиците кислорода диссимилиационная сульфатредукция является основным источником образования сероводорода. При производстве мяса птицы окисленные формы серы могут поступать с кормовыми добавками, часто формулируемыми в виде сульфатов. Нерастворимый сульфат кальция, гипс, используют как составной компонент подстилки для впитывания влаги. Нам не известно систематических исследований присутствия сульфатредуцирующих прокариот в отходах птицеводства. Недавнее

исследование продемонстрировало, что диссимилиационное образование H₂S является важным процессом в слепой кишке кур-несушек (Huang et al., 2019). Авторы сообщают, что содержание *Desulfovibrio*, *Mailhella*, *Bilophila* и *Lawsonia* в слепой кишке коррелировало с образованием H₂S. Основываясь на этом факте, было сделано заключение, что именно диссимилиационная сульфатредукция, а не разложение серосодержащих аминокислот, вносят основной вклад в образование сероводорода в кишечнике кур.

Основным источником одорантов при производстве мяса птицы являются отходы, представляющие смесь помета птицы, подстилки, перьев, остатков корма и воды (Wadud et al., 2012). Наиболее распространенный способ утилизации отходов представляет их компостирование путем выдерживания в специальных хранилищах. При компостировании происходит частичное обеззараживание отходов от патогенов человека и животных, после чего полученный компост используют в качестве органического удобрения для выращивания растений (Dunlop et al., 2016). Места складирования отходов, так называемые помехохранилища, являются основным источником неприятного запаха. До сих пор микробиота отходов производства птицы и ее роль в производстве летучих соедине-

ний остается практически неизученной (Dunlop et al., 2016).

Целью настоящего исследования являлся анализ микробного сообщества отходов производства птицы, накапливаемого в помехохранилище птицефабрики “Межениновская”, расположенного в непосредственной близости (около 15 км) от областного центра, города Томска. В летнее время интенсивный запах, образуемый в районе птицефабрики, является предметом активных общественных дискуссий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб, полевые измерения, минералогический и элементный анализ. Пробы отходов в помехохранилище были отобраны 12 июля 2019 г. Концентрацию H_2S в месте отбора пробы для анализа измеряли в разные сезоны года, с периодичностью около одного раза в месяц с использованием переносного газоанализатора ОКА-Т (“Информ-аналитика”, Россия) с электрохимическим сенсором (погрешность инструмента составляет $\pm 25\%$). Измерения не проводили в период снежного покрова, который в Томске длится с начала ноября до конца марта. Минералогический состав отходов, высушенных на воздухе, определяли с использованием дифрактометра Shimadzu XRD-6000 как описано ранее (Ikkert et al., 2013). Для определения элементного состава использовали сканирующий электронный микроскоп, совмещенный с рентгеновской спектроскопией с использованием микроскопа PhilipsSEM 515 и спектрометр EDAXInc (“Mahwan”, США).

Эксперименты с микрокосмами. В сыровоточные бутылки объемом 500 мл вносили 300 мл отходов помехохранилища и 200 мл искусственной среды. Среда имела следующий состав (в г/л): KH_2PO_4 – 0,2, NH_4Cl – 0,25, $NaCl$ – 1, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0,4, KCl – 0,5, 0,113 – $CaCl_2$. В экспериментальные микрокосмы вносили сульфат (28 мМ в виде Na_2SO_4) и лактат (18 мМ) вместе с сульфатом (28 мМ). Микрокосмы инкубировали в темноте при температуре 20°C в течение 15 сут. Контрольный микрокосм инкубировали в тех же условиях, но без внесения добавок. Во время инкубации микрокосмов контролировали содержание сероводорода.

Характеристика состава микробных сообществ по генам 16S рРНК. В конце инкубации микрокосмов 1 мл осадка использовали для выделения ДНК с помощью DNeasy PowerMax SoilKit (“Qiagen”, Hilden, Германия). ПЦР-фрагменты были получены с использованием универсальных праймеров 341F (5'-CCTAYGGGDBGCWSCAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVGGGTHTCTAAT-3'), баркодированы с помощью NexteraXT IndexKitv.2 (“Illumina”, США) и очищены с использованием

AgencourtAM Purebeads (“Beckman Coulter”, Brea, CA, США). Затем ПЦР фрагменты были секвенированы на Illumina MiSeq (чтения 2×300 нт с обоих концов). Парные чтения были объединены с использованием FLASH v.1.2.11 (Magoc, Salzberg, 2011). Полученные последовательности (26983 шт. для микрокосма без сульфата, 37516 шт. для микрокосма с сульфатом без лактата и 25911 шт. для микрокосма с сульфатом и лактатом) были кластеризованы в операционные таксономические единицы (ОТЕ) при 97% идентичности с помощью программы Usearch (Edgar, 2010); низкокачественные чтения, химерные и единичные последовательности были удалены при кластеризации с использованием алгоритма Usearch. Таксономическая идентификация была выполнена по базе SILVA v.132 с использованием алгоритма VSEARCH (Rognes et al., 2016).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание сероводорода в воздухе, минералогический и элементный анализ отходов. Концентрации сероводорода в воздухе возле помехохранилища в период измерений колебалась от 0,065 (в конце октября) до 0,5 (в конце августа) мг/м³ (рис. 1). Это содержание значительно превышает предельно допустимую концентрацию, 0,008 мг/м³, установленную в Российской Федерации для жилых районов. Содержание сероводорода в воздухе возле помехохранилища закономерно коррелировало с температурой воздуха, подтверждая биологическую природу H_2S .

Минералогический состав отходов показал присутствие нерастворимого сульфата кальция, гипса, $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ (рис. 2). Также была обнаружена кристаллическая сера и карбонаты – кальцит $CaCO_3$ и анкерит $Ca(Fe, Mg, Mn)(CO_3)_2$. Элементный анализ подтвердил значительное присутствие кальция и серы. Таким образом, в отходах присутствовали возможные акцепторы электронов для сульфатредукции и сероредукции. Многие сульфатредуцирующие бактерии способны восстанавливать сульфат гипса фактически с такой же скоростью, как растворимый сульфат (Karnachuk et al., 2002).

Состав микробных сообществ микрокосмов. Предварительные исследования состава микробного сообщества профилированием гена 16S рРНК не выявили организмов с известной способностью к диссимиляционной сульфатредукции. Основываясь на том факте, что низкое содержание сульфата и доноров электронов могут лимитировать численность сульфатредукторов в отходах, были предприняты попытки обнаружить эту функциональную группу путем стимулирования процесса в микрокосмах с добавлением сульфата и лактата –

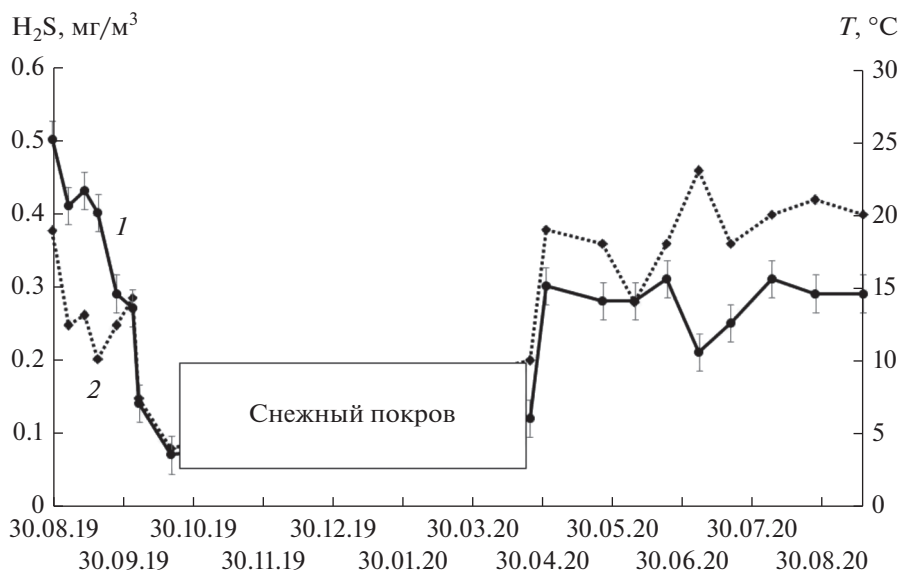


Рис. 1. Изменение концентрации сероводорода (1) и температура воздуха (2) возле помехохранилища фабрики «Межениновская». Стандартное отклонение рассчитано из трех измерений.

модельных субстратов для диссимиляционных сульфатредукторов.

Микрокосмы инокулировали отходами из помехохранилища, в экспериментальные микрокосмы вносили лактат вместе с сульфатом или только сульфат, микрокосм без добавок использовали как контрольный. По окончании 15-сут инкубации микрокосмов концентрация H₂S составляла 35 мг/л в микрокосме с сульфатом и лактатом, 26 мг/л в микрокосме с сульфатом и 16 мг/л в контроле без добавок.

Состав микробных сообществ микрокосмов определяли с помощью высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рРНК. Во всех трех микрокосмах доминирующими группами были *Bacteroidetes* (34–44% последовательностей генов 16S рРНК), *Firmicutes* (29–36%) и *Gammaproteobacteria* (9–12%) (рис. 3). В основном это были типичные представители микробиома кишечника птиц: семейства *Bacteroidaceae* и *Prevotellaceae* среди *Bacteroidetes*, *Acidaminococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Veillonellaceae* среди *Firmicutes*.

Археи, в основном метилотрофные метаногены порядка *Methanomassiliicoccales*, составляли 18–19% сообщества в контроле и в микрокосме с сульфатом. В микрокосме с сульфатом и лактатом их доля снижалась до 8%, что может быть обусловлено конкуренцией с сульфатредукторами за низкомолекулярные доноры электронов.

Из числа известных сульфатредукторов в микрокосмах были обнаружены дельтапротеобактерии семейства *Desulfovibrionaceae*. Их доли в контрольном микрокосме и в микрокосме с сульфатом со-

ставляли 0.43 и 0.37% соответственно, а в присутствии сульфата и лактата она возрастала до 1.0%. *Desulfovibrionaceae* были представлены двумя ОТЕ, относящимися к родам *Bilophila* и *Desulfovibrio*, причем последние составляли более 90%. Эти два рода были обнаружены ранее в кишечнике кур-несушек (Huang et al., 2019), увеличение их численности в присутствии сульфата и лактата согласуется с предположением об их роли в образовании сероводорода.

В составе микробного сообщества также присутствовали бактерии, близкие к роду *Tissierella*. Эта группа образует сероводород из аминокислот за счет ферментов цистеинсинтазы (CysK) и цистеиндисульфгидразы (CdsH) (Vukhtiyarova et al., 2019). *Tissierella* spp., выделенные из фекалий человека (Ikkert et al., 2013) и с поверхности медных монет, образовывали до 30 мг H₂S на литр среды. *Tissierellaceae* составляли менее 1% сообщества, их доля не возрастала в микрокосмах с сульфатом.

Сульфат-редукция как вероятный источник сероводорода. Таким образом, предварительный анализ микробного сообщества указывает, что вероятным источником сероводорода, образуемого в отходах помехохранилища, является сульфатредукция, осуществляемая *Desulfovibrionaceae* — представителями кишечной микрофлоры кур. В присутствии гипса, а возможно и других источников сульфата (например, сульфата лизина, используемого в кормовых добавках), и низкомолекулярных органических соединений, образуемых ферментативными микроорганизмами филумов *Bacteroidetes* и *Firmicutes*, эти бактерии могут развиваться и образовывать значительные количе-

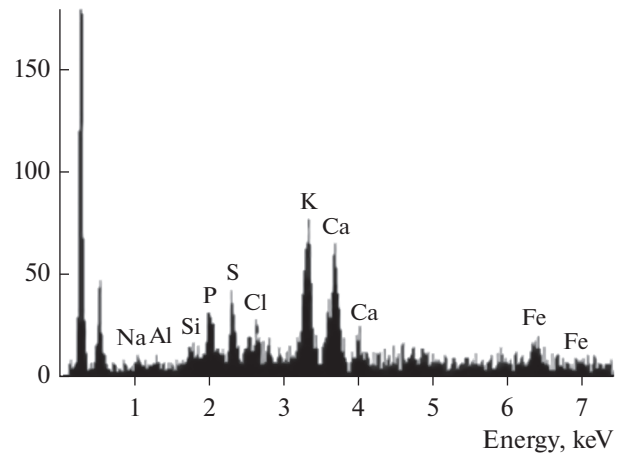
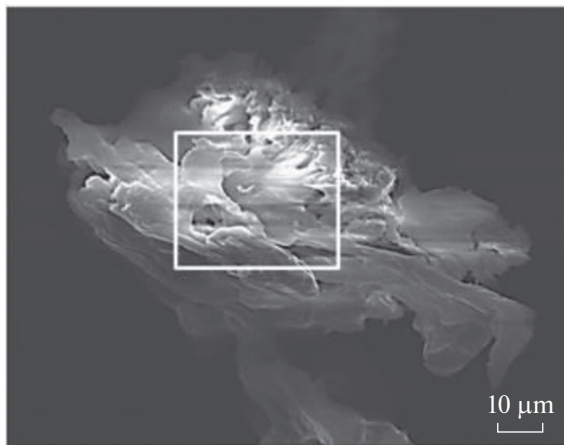
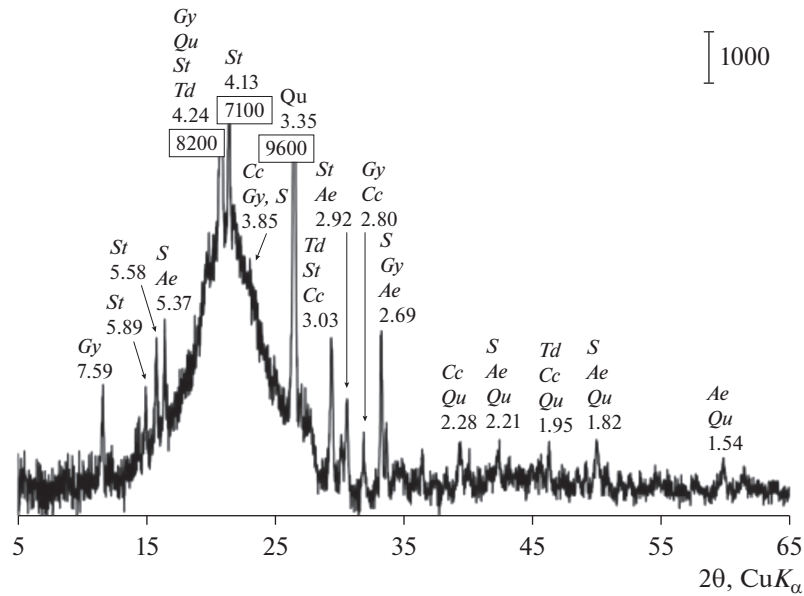


Рис. 2. Дифрактограмма, показывающая минералогический состав отходов помехохранилища (вверху). Обозначения: *Ae* анкерит, $\text{Ca}(\text{Fe}, \text{Mg}, \text{Mn})(\text{CO}_3)_2$, (PDF-79-1347); *Cc* кальцит, CaCO_3 , (PDF-24-0027); *Er* эрионит, $(\text{Na}_2, \text{K}_2, \text{Ca})_2\text{Al}_4\text{Si}_{14}\text{O}_{36} \cdot 15\text{H}_2\text{O}$, (PDF-12-0275); *Gy* гипс, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, (PDF-03-0044); *Qu* кварц, SiO_2 , (PDF-01-0649); *S* сера, S_8 , (PDF-76-2242); *St* струвит, $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, (PDF-15-0762); *Td* тридимит, SiO_2 , (PDF-29-1493). Микрофотография (сканирующий электронный микроскоп) отходов и элементный анализ (внизу).

ства сероводорода, выделяющегося в помехохранилищах.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-14-00245) и Минобрнауки России.

ВКЛАД АВТОРОВ

Отбор проб и постановка микрокосмов проведена Е.А. Латыголец и М.А. Григорьевым. М. Кадырбаев измерял концентрацию сероводорода. О.П. Иккерт проводила дифракционный и элементный анализ. Выделение ДНК из микрокосмов и секвенирование гена 16S рРНК проведено Е.В. Груздевым и А.В. Мардановым. Биоинформационный анализ последовательностей выполнен А.В. Белецким. Анализ данных и подготов-

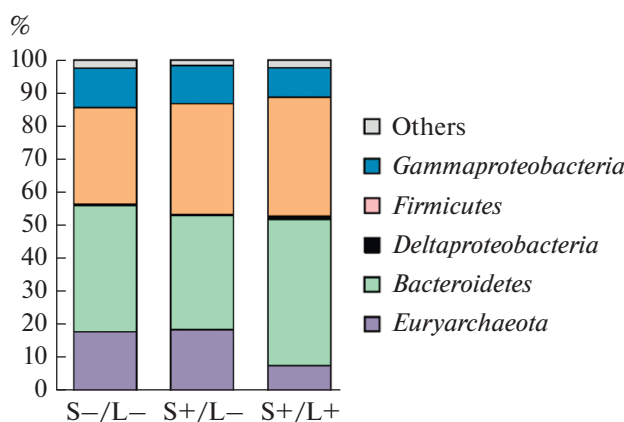


Рис. 3. Состав микробных сообществ микрокосмов по данным анализа генов 16S рРНК. S-/L-, микрокосм без лактата и сульфата; S+/L-, микрокосм с сульфатом без лактата; S+/L+, микрокосм с сульфатом и лактатом.

ка статьи выполнены О.В. Карначук и Н.В. Равиним. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bukhtiyarova P.A., Antsiferov D.V., Brasseur G., Avakyan M.R., Frank Y.A., Ikkert O.P., Pimenov N.V., Tuovinen O.H., Karnachuk O.V.* Isolation, characterization, and genome insights into an anaerobic sulfidogenic *Tissierella* bacterium from Cu-bearing coins // *Anaerobe*. 2019. V. 56. P. 66–77.
- Dunlop M.W., Blackall P.J., Stuetz R.M.* Odour emissions from poultry litter – A review litter properties, odour formation and odorant emissions from porous materials // *J. Environ. Manage.* 2016. V. 177. P. 306–319.
- Edgar R.C.* Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
- Fiedler N., Kipen H., Ohman-Strickland P., Zhang J., Weisel C., Laumbach R., Kelly-McNeil K., Olejeme K., Liou P.* Sensory and cognitive effects of acute exposure to hydrogen sulfide // *Environ. Health. Perspect.* 2008. V. 116. P. 78–85.
- Huang C.B., Xiao L., Xing S.C., Chen J.Y., Yang Y.W., Zhou Y., Chen W., Liang J.B., Mi J.D., Wang Y., Wu Y.B., Liao X.D.* The microbiota structure in the cecum of laying hens contributes to dissimilar H₂S production // *BMC Genomics*. 2019. V. 20. P. 770.
- Ikkert O.P., Gerasimchuk A.L., Bukhtiyarova P.A., Tuovinen O.H., Karnachuk O.V.* Characterization of precipitates formed by H₂S-producing, Cu-resistant *Firmicute* isolates of *Tissierella* from human gut and *Desulfosporosinus* from mine waste // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2013. V. 103. P. 1221–1234.
- Karnachuk O., Kurochkina S., Tuovinen O.* Growth of sulfate-reducing bacteria with solid-phase electron acceptors // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. V. 58. P. 482–486.
- Magoc T., Salzberg S.L.* FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies // *Bioinformatics*. 2011. V. 27. P. 2957–2963.
- Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F.* VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics // *PeerJ Preprints*. 2016. V. 4. e2409v1.
- Trabue S., Kerr B., Bearson B., Ziemer C.* Swine odor analyzed by odor panels and chemical techniques // *J. Environ. Qual.* 2011. V. 40. P. 1510–1520.
- Trabue S., Scoggin K., Li H., Burns R., Xin H., Hatfield J.* Speciation of volatile organic compounds from poultry production // *Atmos. Environ.* 2010. V. 44. P. 3538–3546.
- Wadud S., Michaelsen A., Gallagher E., Parcsi G., Zemb O., Stuetz R., Manefield M.* Bacterial and fungal community composition over time in chicken litter with high or low moisture content // *Br. Poult. Sci.* 2012. V. 53. P. 561–569.

The Microbial Community of Poultry Farm Waste and Its Role in Hydrogen Sulfide Production

E. V. Gruzdev^{1,*}, E. A. Latygolets², A. V. Beletsky¹, M. A. Grigoriev², A. V. Mardanov¹, M. K. Kadyrbaev², O. P. Ikkert², O. V. Karnachuk², and N. V. Ravin¹

¹*Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

²*Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia*

*e-mail: gruevg@yandex.ru

Received February 4, 2021; revised March 12, 2021; accepted March 15, 2021

Abstract—The microbiota of chicken litter remains largely unexplored, despite its leading role in the formation of volatile odorants and unpleasant odors. One of the main components of the odor is hydrogen sulfide, which may be formed as a result of microbial sulfate reduction. The composition of the microbial community of poultry plant waste was investigated. Samples were collected at the Mezheninovskaya large poultry farm,

15 km from Tomsk, Russia. The 16S rRNA gene profiling revealed sulfate-reducing *Desulfovibrionaceae* in the microbial community. Both their share in the community and sulfide production increased upon incubation of the waste in the medium with sulfate and lactate. The possible sulfate sources in the waste are gypsum and the feed additives introduced as sulfates, such as lysine sulfate.

Keywords: chicken litter microbiota, hydrogen sulfide, sulfate reduction, *Desulfovibrio*