

УДК 631.41; 631.46

## ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВ АНТИБИОТИКАМИ

©2013 Ю.В. Акименко, К.Ш. Казеев, С.И. Колесников, М.С. Мазанко

Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону

Поступила 10.06.2013

В модельных экспериментах изучено влияние фармацевтических антибиотиков (бензилпенициллин, фармазин) разных доз 100 мг/кг, 600 мг/кг на численность микроорганизмов и ферментативную активность чернозема обыкновенного. Все исследуемые дозы антибиотиков оказывают достоверное подавляющее воздействие на численность почвенных микроорганизмов и ферменты. Между дозой антибиотиков и изменением биологических показателей почв установлена линейная зависимость. По устойчивости к фармацевтическим антибиотикам исследуемые группы почвенных микроорганизмов образовали ряд (высокие концентрации): амилитические бактерии > микромицеты > аммонифицирующие бактерии, ферменты: каталаза > дегидрогеназа > фосфатаза.

**Ключевые слова:** антибиотики, загрязнение, почвенные микроорганизмы, ферментативная активность, чернозем обыкновенный.

В отличие от пестицидов, используемых в сельском хозяйстве, антибиотики до недавнего времени не вызывали особого внимания как потенциальные загрязнители. В российской литературе практически нет исследований по влиянию фармакологических препаратов на биологические свойства почв. Лишь в некоторых исследованиях антибиотики использовались для селективного ингибирования с целью определения соотношения грибов и бактерий в биомассе разных типов почв [2, 13]. На сегодняшний день научный интерес, с одной стороны, сосредоточился на изучении поведения антибиотиков и их «судьбы» в окружающей среде, с другой стороны, на их влиянии на другие организмы. Некоторые антибиотики сохраняются долгое время в окружающей среде, особенно в почве, а другие быстро деградируют [17].

Различные антибиотики часто обнаруживаются в грунтовой и питьевой воде, сточных водах и сельскохозяйственных почвах [21]. Например, фармацевтические антибиотики из класса тетрациклинов ежегодно обнаруживаются в почвах локально в концентрациях до 300-500 мг/кг, из класса сульфонамидов – до 1000 мг/кг [16]. Антибиотики, широко распространенные в окружающей среде, затрагивают как водные, так и наземные организмы, изменяют активность и состав почвенных микроорганизмов [20] и приводят к развитию бактериальной устойчивости у микроорганизмов [19].

Проведено много исследований, посвященных использованию антибиотиков в растениеводстве и ветеринарии в качестве гербицидов, инсектицидов, стимуляторов роста растений, а также в качестве пищевой добавки для нагула молока, мяса у крупного рогатого скота и для улучшения роста молодняка. К настоящему времени проведен широкий

диапазон исследований с целью определения эффектов тяжелых металлов [8, 9], нефти и нефтепродуктов [11], радиоизлучений [6] и других загрязнителей на почвенную микробиоту.

Результаты исследований влияния фармацевтических антибиотиков на микроорганизмы почв изучены мало, а иногда и противоречивы. Например, было сообщено, что некоторые антибиотики подавляют активность почвенных микроорганизмов, установлена зависимость влияния антибиотиков от их концентрации: чем выше доза, тем сильнее эффект [14]. В других исследованиях, напротив, говорится о положительном влиянии антибиотиков на рост и развитие микроорганизмов [16]. Загрязнение почвы сульфаклоридазинем приводит к ингибированию численности почвенной микробиоты, и дальнейшее увеличение концентрации данного антибиотика вызывает развитие устойчивости у микроорганизмов [18].

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния различных фармацевтических антибиотиков на численность почвенных микроорганизмов и ферментативную активность чернозема обыкновенного. Представленная работа является частью цикла научных исследований по изучению влияния биологически активных веществ на эколого-биологические показатели почв Юга России.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлся чернозем обыкновенный карбонатный мощный слабогумусированный тяжелосуглинистый на желто-бурых суглинках, отобранный на территории Ботанического сада Южного федерального университета. Данный тип почв был выбран в связи с тем, что черноземы составляют большую часть почвенного покрова Юга России и имеют особое значение в продовольственном обеспечении страны [4].

Почва для модельных экспериментов была отобрана из пахотного горизонта (0-25 см). Воздушно-сухие образцы почв обрабатывали растворами антибиотиков бензилпенициллина и фармазина в раз-

Акименко Юлия Викторовна, магистрант, старший лаборант, e-mail: akimenkojuliya@mail.ru; Казеев Камиль Шагидулович, д.г.н., проф., e-mail: kamil\_kazeev@mail.ru; Колесников Сергей Ильич, д.с.-х.н., заведующий кафедрой, e-mail: kolesnikov@sfned.ru; Мазанко Мария Сергеевна, аспирант, инженер, e-mail: Mary.bio@list.ru

личных концентрациях: 100 мг/кг, 600 мг/кг почвы. Данные концентрации были выбраны исходя из литературных данных по встречаемости антибиотиков в окружающей среде [16], а также благодаря ранее проведенным исследованиям и получению достоверных влияний разных доз антибиотиков на биологические свойства почв [1]. Все образцы инкубировали в течении 10 сут при температуре 20-25°C в темном месте, во избежание быстрого разложения антибиотиков, и оптимальном увлажнении (60% от полевой влагоемкости). Контролем служила почва, не подвергавшаяся обработке антибиотиками.

Для исследования влияния антибиотиков на почвенную микробиоту были выбраны бактерицидный (бензилпенициллин), бактериостатический (фармазин) антибиотики, которые широко используются в медицине и животноводстве. Бензилпенициллин – антибиотик группы биосинтетических пенициллинов, активен в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, анаэробных спорообразующих палочек. Фармазин – препарат, широко используемый в ветеринарии, содержащий в качестве активно действующего вещества тилозин – антибиотик из группы макролидов, активен в отношении большинства грамположительных и некоторых грамотрицательных бактерий [3].

Комплексное исследование микробоценоза чернозема обыкновенного включало определение численности жизнеспособных микроорганизмов методом глубинного посева соответствующих разведений на твердые среды: аммонифицирующих бактерий – на мясо-пептонном агаре, амилотических бактерий – на крахмало-аммиачном агаре, микромицетов – на подкисленной среде Чапека.

При получении аналитических данных, применялась разработанная и апробированная методология исследования биологической активности [7] с использованием общепринятых в почвоведении и биологии методов [12].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

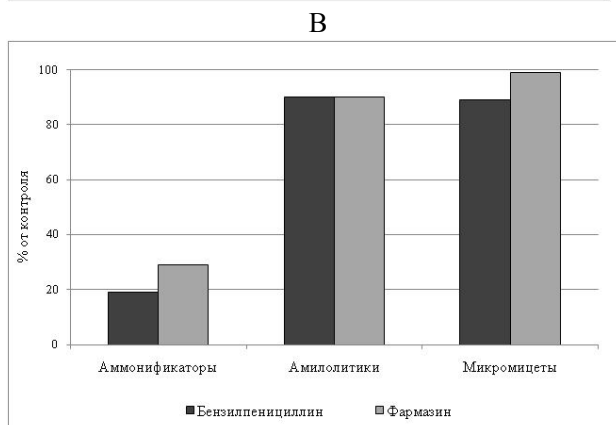
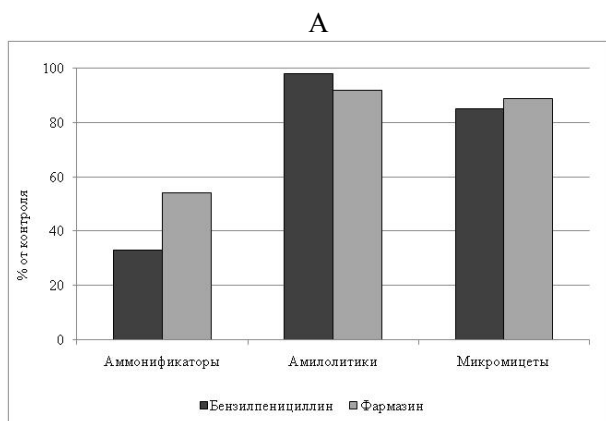
Аммонифицирующие бактерии обеспечивают процессы гниения, разлагая мертвую органику до простых веществ, и, тем самым, играют ключевую роль в круговороте веществ. Амилотические бактерии составляют значительную долю от общего числа бактерий в почве. Основным отличительным признаком этой группы является способность разрушать крахмал и поставлять питательные элементы другим микроорганизмам почвы. Почвенные микромицеты обладают широкими адаптивными способностями и занимают разнообразные экологические ниши. Микромицеты, составляющие ассоциации на низших фазах трансформации органического вещества почвы, играют важную роль в создании почвенного плодородия [5]. Влияние антибиотиков на численность почвенных микроорганизмов чернозема обыкновенного показано на рис. 1.

Все исследуемые дозы фармацевтических антибиотиков оказали достоверное подавляющее воздействие на численность почвенных микроорганизмов. Наиболее устойчивыми к действию антибиотиков оказались амилотические бактерии, наименее устойчивыми аммонифицирующие бактерии. При концентрации антибиотиков 100 мг/кг наблюдается значительное подавление численности аммонификаторов до 65% от контроля ( $p < 0,001$ ) (рис. 1А). Что касается амилотических бактерий, то достоверных изменений их численности по сравнению с контролем не зафиксировано. Как и ожидалось, антибактериальные антибиотики (бензилпенициллин, фармазин) во всех исследуемых концентрациях не вызвали достоверных изменений численности микромицетов. И скорее всего, разница в численности по сравнению с контролем объясняется самим фактом стресса для микробиоты при внесении загрязнителей. Наибольшее подавляющее воздействие на все группы микроорганизмов оказал бензилпенициллин в максимально исследуемых концентрациях (600 мг/кг) (рис. 1В). Бензилпенициллин ингибирует численность аммонификаторов практически на 80% от контроля ( $p < 0,001$ ). Таким образом, бактерицидный препарат бензилпенициллин оказался наиболее эффективен в отношении аммонифицирующих бактерий, а бактериостатический фармазин – в отношении амилотических бактерий.

Многолетними исследованиями показана максимальная эффективность диагностики и мониторинга почвенного покрова биохимическими методами, в частности, с помощью показателей ферментативной активности почв. Применению ферментативной активности в качестве диагностического показателя способствует низкая ошибка опытов, простота определения, высокая чувствительность к внешним воздействиям [6, 10].

Ранее было показано, что антибиотики из группы тетрациклинов в концентрации 300 мг/кг существенно снижают активность каталазы и фосфатазы в почвах, это снижение колеблется в пределах 35-55% от контрольных образцов [15]. В рамках нашего исследования антибиотики во всех исследуемых концентрациях оказали значительное ингибирующее воздействие на ферментативную активность чернозема обыкновенного. Влияние антибиотиков на ферментативную активность чернозема обыкновенного показано на рис. 2.

Ферменты класса оксидоредуктаз (каталаза, де-гидрогеназа) оказались наиболее устойчивы к действию антибиотиков, нежели ферменты класса гидролаз (фосфатаза). Антибиотики в концентрации 100 мг/кг достоверно повлияли на активность всех исследуемых ферментов (рис. 2А). Наибольший ингибирующий эффект ферментативной активности наблюдается в концентрации антибиотиков 600 мг/кг, активность фосфатазы достоверно снижается на 70% от контроля ( $p < 0,001$ ) (рис. 2В).



**Рис. 1.** Изменение численности почвенных микроорганизмов при действии антибиотиков в концентрации 100 мг/кг почвы (А), 600 мг/кг почвы (В)

### ВЫВОДЫ

1. Все исследуемые дозы фармацевтических антибиотиков оказывают достоверное подавляющее воздействие на численность почвенных микроорганизмов и ферментативную активность чернозема обыкновенного.

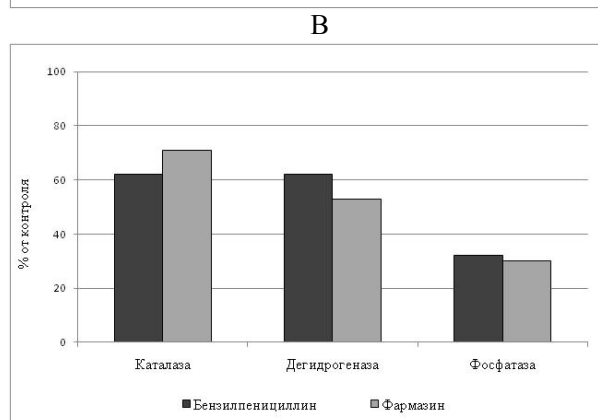
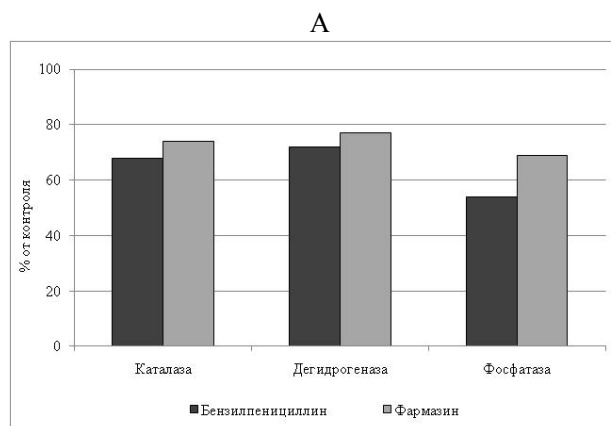
2. Степень влияния антибиотиков зависит от их природы и механизма действия. Бактерицидные препараты (бензилпенициллин) наиболее эффективны в отношении аммонифицирующих бактерий, а бактериостатические (фармазин) – в отношении амилолитических бактерий.

3. Между дозой антибиотиков и изменением численности микроорганизмов почв установлена линейная зависимость. Чем выше концентрации вносимых антибиотиков, тем сильнее ингибирующий эффект.

4. По устойчивости к фармацевтическим антибиотикам исследуемые группы почвенных микроорганизмов образовали ряд (высокие концентрации): амилолитические бактерии > микромицеты > аммонифицирующие бактерии.

5. По устойчивости к фармацевтическим антибиотикам исследуемые классы ферментов образовали ряд (высокие концентрации): каталаза > дегидрогеназа > фосфатаза.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (14.А18.21.0187, 14.А18.21.1269) и в рамках



**Рис. 2.** Изменение ферментативной активности чернозема при действии антибиотиков в концентрации 100 мг/кг почвы (А), 600 мг/кг почвы (В)

реализации Программы развития Южного федерального университета.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акименко Ю.В., Казеев К.Ш., Колесников С.И. Динамика ферментативной активности чернозема обыкновенного при загрязнении антибиотиками // Научный журнал КубГАУ. 2013. № 01 (85). С. 578-587. <http://ej.kubagro.ru/2013/01/pdf/46.pdf>.
2. Ананьева Н.Д., Стольникова Е.В., Сусьян Е.А., Ходжаева А.К. Грибная и бактериальная микробная биомасса (селективное ингибирование) и продуцирование  $CO_2$  и  $N_2O$  дерново-подзолистыми почвами постагрогенных биогеоценозов // Почвоведение. 2010. № 11. С. 1387-1393.
3. Базы данных по лекарственным средствам. <http://drugreg.ru/Bases/>.
4. Вальков В.Ф., Казеев К.Ш., Колесников С.И. Почвы Юга России. Ростов-на-Дону: Изд-во «Эверест», 2008. 276 с.
5. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология: Учебник для студ. биол. специальностей вузов. 4-е изд., стер. М.: Издательский центр «Академия», 2003. 464 с.
6. Денисова Т.В., Казеев К.Ш., Колесников С.И., Вальков В.Ф. Влияние гамма излучения на биологические свойства почв // Почвоведение. 2005. № 7. С. 877-881.
7. Казеев К.Ш., Колесников С.И. Биодиагностика почв: методология и методы исследований. Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета, 2012. 260 с.
8. Колесников С.И., Казеев К.Ш., Вальков В.Ф. Влияние загрязнения тяжелыми металлами на микробную систему чернозема // Почвоведение. 1999. № 4. С. 505-511.

9. Колесников С.И., Казеев К.Ш., Вальков В.Ф. Влияние загрязнения тяжёлыми металлами на щелочно-кислотные и окислительно-восстановительные условия в черноземе обыкновенном // *Агрохимия*. 2001. № 9. С. 54-59.
10. Колесников С.И., Казеев К.Ш., Татосян М.Л., Вальков В.Ф. Влияние загрязнения нефтью и нефтепродуктами на биологическое состояние чернозема обыкновенного // *Почвоведение*. 2006. № 5. С. 616-620.
11. Колесников С.И., Спивакова Н.А., Везденеева Л.С., Кузнецова Ю.С., Казеев К.Ш. Моделирование влияния химического загрязнения на биологические свойства гидроморфных солончаков зоны сухих степей Юга России // *Аридные экосистемы*. 2011. Т. 17. № 2 (47). С. 18-22.
12. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ. 1991. 304 с.
13. Сусян Е.А., Ананьева Н.Д., Благодатская Е.В. Разделение грибного и бактериального субстрат-индуцированного дыхания с использованием антибиотиков в почвах разных экосистем // *Микробиология*. 2005. Т. 74. № 3. С. 394-400.
14. Colinas C., Ingham E., Molina R. Population responses of target and non-target forest soil-organisms to selected biocides // *Soil Biol. Biochem.* 1994. V. 26. P. 41-47.
15. Feng Liu, Guang-Guo Ying, Ran Tao, Jian-Liang Zhao, Ji-Feng Yang, Lan-Feng Zhao. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities // *Environmental Pollution*. 2009. V. 157. P. 1636-1642.
16. Hamscher G., Sczesny S., Hoper H., Nau H. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry // *Anal. Chem.* 2002. V. 74. P. 1509-1518.
17. Rooklidge S.J. Environmental antimicrobial contamination from terraccumulation and diffuse pollution pathways // *Science of the Total Environment*. 2004. V. 325. P. 1-13.
18. Schmitt H., van Beelen P., Tolls J., van Leeuwen C.L. Pollution-induced community tolerance of soil microbial communities caused by the antibiotic sulfachloropyridazine // *Environ. Sci. Technol.* 2004. V. 38. P. 1148-1153.
19. Su H.-C., Ying G.-G., Tao R., Zhang R.-Q., Zhao J.-L., Liu Y.-S. Class 1 and 2 integrons, sul resistance genes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from Dongjiang River, South China // *Environ Pollut.* 2012. V. 169. P. 42-49.
20. Underwood J.C., Harvey R.W., Metge D.W., Repert D.A., Baumgartner L.K., Smith R.L. et al. Effects of the antimicrobial sulfamethoxazole on groundwater bacterial enrichment // *Env. Sci. Technol.* 2011. V. 45. P. 3096-4101.
21. Zhou L.-J., Ying G.-G., Zhao J.-L., Yang J.-F., Wang L., Yang B. et al. Trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in the sediments of the Yellow River, Hai River and Liao River in northern China // *Environ Pollut.* 2011. V. 159. P. 1877-1885.

## ECOLOGICAL CONSEQUENCES OF POLLUTION OF SOILS ANTIBIOTICS

©2013 Yu.V. Akimenko, K.Sh. Kazeev, S.I. Kolesnikov, M.S. Mazanko

South Federal University, Rostov-na-Donu

In model experiments influence of pharmaceutical antibiotics (benzylpenicillin, pharmazin) different doses of 100 mg/kg, 600 mg/kg on the number of microorganisms and enzymes activity of the chernozem is studied. All studied doses of antibiotics make reliable overwhelming impact on the number of soil microorganisms and enzymes. Between a dose of antibiotics and change of biological indicators of soils linear dependence is established. On resistance to pharmaceutical antibiotics studied groups of soil microorganisms formed a row (high concentration): amylolytic bacteria > micromycetes > ammonifying bacteria and enzymes: catalase > dehydrogenase > phosphatase.

**Key words:** antibiotics, pollution, soil microorganisms, enzymes activity, chernozem ordinary.

Julia Akimenko, postgraduate student, e-mail: akimenkojuliya@mail.ru; Camille Kazeev, Doctor of Geography, professor, e-mail: kamil kazeev@mail.ru; Sergey Kolesnikov, Doctor of Agriculture, head of department, e-mail: kolesnikov@sfedu.ru; Maria Mazanko, postgraduate student, engineer, e-mail: Mary.bio@list.ru