

УДК 631.46; 574

ИЗМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЧЕРНОЗЕМА ОБЫКНОВЕННОГО СЕВЕРОПРИАЗОВСКОГО ПРИ ЗАГРЯЗНЕНИИ СОВРЕМЕННЫМИ БИОЦИДАМИ

© 2016 Ю.В. Акименко, К.Ш. Казеев, С.И. Колесников, Ю.С. Козунь, М.А. Мясникова

Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону

Статья поступила в редакцию 24.05.2016

Рассмотрено изменение биологических свойств (3, 30, 90 суток) чернозема обыкновенного при загрязнении современными биоцидами (антибиотиками, пестицидами) в концентрации 500 мг/кг почвы. Загрязнение чернозема биоцидами приводит к снижению численности микроорганизмов и ферментативной активности почв. Корреляционный анализ полученных данных выявил положительную корреляцию ферментов двух классов (дегидрогеназы, инвертазы) с численностью микромицетов ($r=0,63$, $r=0,65$), каталазы с аммонифицирующими бактериями ($r=0,73$). Данные результаты позволяют судить о вкладе той или иной группы микроорганизмов в ферментативный пул почв. Отдельные параметры биологических свойств не восстанавливаются и спустя 90 суток после загрязнения.

Ключевые слова: антибиотики, пестициды, загрязнение, микроорганизм, ферментативная активность, чернозем обыкновенный

В настоящее время создано огромное количество биологически активных веществ как природного, так и синтетического происхождения, так как современная технология возделывания сельскохозяйственных культур и выращивания скота не обходится без применения химических средств защиты и рострегуляции. Черноземы составляют большую часть почвенного покрова юга России и являются главным земельным ресурсом сельскохозяйственного производства [4]. В сельском хозяйстве и медицине используется огромный арсенал биоцидов, производство которых с каждым годом увеличивается в десятки и сотни раз. В отличие от пестицидов, которые уже давно используются в сельском хозяйстве, антибиотики не вызывали интереса как потенциальные загрязнители окружающей среды, но в связи с интенсификацией их использования во всех сферах сельского хозяйства в настоящее время проблеме загрязнения природных экосистем антибиотиками и приобретении к ним устойчивости патогенных микроорганизмов уделяется особое внимание. По мере углубления знаний об антибиотиках, стали накапливаться данные о неблагоприятных последствиях бесконтрольного применения этих препаратов. Ветеринарные антибиотики широко используются во всем мире, не только в терапевтических целях, но и в качестве профилактических средств, кормовых добавок и рострегуляторов. Т.к. многие антибиотики водорастворимы, вплоть до 90% одной дозы может выделяться с мочой и 75% с экскрементами животных [11]. Важным экологическим последствием безрассудного применения антибиотиков в сельском хозяйстве

является увеличение их фоновых концентраций. В последнее время антибиотики все чаще обнаруживаются в почвах, грунтовой, питьевой воде и сточных водах [16]. В почву антибиотики попадают посредством применения навоза и сточных вод на сельскохозяйственных землях в качестве удобрения [13]. По различным данным, антибиотики тетрациклинового ряда обнаруживаются в почвах в концентрациях 1–900 мг/кг [14], макролидного ряда 1–800 мг/кг [12].

Цель исследования: изучить изменение биологических свойств чернозема обыкновенного северо-приазовского при загрязнении современными биоцидами (антибиотиками, пестицидами) в условиях модельного опыта.

Объекты и методы исследования. Из биоцидов были выбраны следующие препараты: антибиотики (тилозин, ампициллин, стрептомицин), широко используемые в медицине и сельском хозяйстве, а так же системный фунгицид (инпут). Характеристика биоцидов по С.М. Навашину и И.П. Фоминой [6].

Ампициллин - полусинтетический антибиотик пенициллиновой группы широкого спектра действия. Фармакологическое действие – бактерицидное. В медицинской практике применяют ампициллин, ампициллина натриевую соль, ампициллина тригидрат. Активен в отношении большинства Gr^+ и Gr^- микроорганизмов, а так же аэробных не спорообразующих бактерий. Не эффективен в отношении к пенициллиназообразующим штаммам. Стрептомицин - антибиотик группы аминогликозидов. Образуется в процессе жизнедеятельности актиномицетов *Streptomyces globisporus*. В низких концентрациях оказывает бактериостатическое действие, в более высоких оказывает бактерицидный эффект. Имеет широкий спектр противомикробного действия. Тилозин – макролидный антибиотик, продуцируемый *Streptomyces fradiae*. Широко применяется в животноводстве как в качестве лечебно-профилактического средства, так и стимулятора роста. В России зарегистрирован ряд пероральных препаратов тилозина: Тилан, Тиланик, Фармазин. Фармакологическое действие – бактериостатическое. Активен в отношении большинства Gr^+ и некоторых Gr^- бактерий. Инпут является системным фунгицидом, содержащий активно действующие вещества: протиоконазол (*Prothioconazole*) и спироksamин (*Spirooxamine*)

Акименко Юлия Викторовна, кандидат биологических наук, ассистент кафедры экологии и природопользования. E-mail: jvakimenko@sfn.ru

Казеев Камил Шайдуллович, доктор географических наук, профессор кафедры экологии и природопользования. E-mail: kamil.kazeev@mail.ru

Колесников Сергей Ильич, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, заведующий кафедрой экологии и природопользования. E-mail: kollesnikov@sfn.ru

Козунь Юлия Сергеевна, кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры экологии и природопользования. E-mail: kuz.yuliya@mail.ru

Мясникова Маргарита Алексеевна, кандидат биологических наук, ассистент кафедры экологии и природопользования. E-mail: margarita_prudnikova@mail.ru

160, 300 г/кг/л, соответственно. Протиоконазол используется для обработки вегетирующих растений и для протравливания зерна против различных возбудителей. Основным почвенным метаболитом является протиоконазол-дестео. В почве DT_{50} протиоконазола-дестео составляет 16,3–72,3 дня. Спиросксамин является представителем группы ингибиторов синтеза стероидов. Подавляет возбудителей мучнистой росы, ржавчины и септориоза зерновых злаковых культур. Относительно стабилен на свету и в почве (DT_{50} = 50,5 дня; DT_{50} = 35–64 дня, соответственно).

Для оценки последствий загрязнения почв биоцидами был исследован микробоценоз и ферментативная активность чернозема обыкновенного северо-приазовского Ботанического сада Южного федерального университета. Почву отбирали из пахотного слоя (0–25 см). Подготовленные образцы почвы загрязняли растворами биоцидов в концентрации 500 мг/кг почвы. Данные концентрации были выбраны исходя из литературных данных по остаточным количествам антибиотиков в окружающей среде [8, 15], а так же благодаря результатам ранее проведенных рекогносцировочных исследований [1–3]. Контролем служила почва, не загрязненная биоцидами. Изменение биологических свойств чернозема изучали через 3, 30, 90 суток после загрязнения.

Изучали следующие показатели биологической активности чернозема: численность аммонифицирующих и амилотических бактерий, микромицетов, обилие бактерий *p. Azotobacter*; активность ферментов класса оксидоредуктаз (каталаза, дегидрогеназа), гидролаз (инвертаза), а так же почвенное «дыхание». Аналитические определения выполняли в 3-кратной повторности для изучения почвенных микроорганизмов и в 6-ти кратной повторности для изучения ферментативной активности почв.

Лабораторные и аналитические модельные исследования выполнены с использованием широко распространенных методов биодиагностики и биондикации почв [5]. Исследование микробоценоза чернозема обыкновенного включало определение численности основных групп почвенных микроорганизмов методом глубинного посева на питательные среды: аммонификаторов – на МПА, амилотических – на КАА, микромицетов – на подкисленной среде Чапека, бактерий *p. Azotobacter* – на среде Эшби (метод комочков обростания). Активность каталазы и дегидрогеназы измеряли методом Галстяна в модификации Хазиева, активность инвертазы с помощью модифицированного колориметрического метода Хазиева. Изменение интенсивности выделения углекислого газа изучали в течение 90 суток, с интервалом в 1 день в течение первых 14 суток после внесения биоцидов, с последующим увеличением интервала между измерениями от 3-х и более суток. Интенсивность выделения CO_2 измеряли с помощью портативного газоанализатора ПГА-7, в котором углеродсодержащие газы определяются с помощью ИФК-спектоскопии. Погрешность измерений 0,01–0,02%.

Результаты и их обсуждение. Внесение в почву антибиотиков и их комплексов с фунгицидом приводит к изменению биологических свойств чернозема, наблюдается достоверное снижение всех исследуемых показателей. Степень снижения зависела от природы антибиотика и сроков исследования, подобные результаты были получены ранее и с другими классами антибиотиков [3]. Загрязнение чернозема антибиотиками приводит к снижению численности основных групп

почвенных микроорганизмов. Максимальное подавляющее воздействие биоцидов на почвенный микробоценоз проявляется на 3 сут. после загрязнения. Наибольшее подавляющее воздействие на численность аммонифицирующих бактерий оказывает антибиотик стрептомицин и его смесь с фунгицидом инпут (на 80–90% от контроля, $p < 0,001$, $n = 3$). Ампициллин и тилозин снижают численность бактерий-аммонификаторов более чем на 50% от контроля. Инпут не оказывает достоверного подавляющего воздействия на численность аммонификаторов. Однако в сочетании инпута с антибиотиками рост бактерий-аммонификаторов ингибируется в большей степени, что свидетельствует о синергизме данных препаратов и усилении их отрицательного воздействия. Восстановление численности бактерий (смесь стрептомицин+инпут) не наблюдается и на 90 сут. исследования, разница в численности бактерий по сравнению с контролем составляет около 80%. Другие исследователи получали аналогичные результаты со смесями препаратов и выявили проявление синергетических эффектов смесей антибиотиков [10]. Однако причины таких эффектов все еще остаются невыясненными. Амилотические бактерии оказались более устойчивы к загрязнению биоцидами, в отличие от аммонификаторов. При загрязнении чернозема ампициллином и стрептомицином численность амилотических практически не изменяется на всех сроках исследования. Тем не менее, тилозин, а так же смеси антибиотиков с фунгицидом приводят к снижению численности амилотических, причем с увеличением сроков исследования наблюдается уменьшение численности бактерий.

Антибиотики не оказывают достоверного воздействия на почвенных микромицетов, в отличие от их смесей с фунгицидом инпут. На 3 сут. исследования наблюдается максимальное снижение численности микромицетов в варианте с фунгицидом (на 56% от контроля, $p < 0,001$, $n = 3$). Численность микромицетов под действием комплекса препаратов снижается с течением сроков исследования, аналогично ситуации с амилотическими. В вариантах с ампициллином и стрептомицином происходит постепенное увеличение численности микромицетов по сравнению с контролем, на 90 сут. исследования численность микромицетов в варианте с ампициллином превышает контроль практически в два раза ($p < 0,05$, $n = 3$). Это можно объяснить устранением конкуренции со стороны бактерий и активным заселением микромицетами экологической ниши. Бактерии *p. Azotobacter* оказались менее чувствительными к загрязнению биоцидами. Изменение в обилии бактерий наблюдали лишь на 3 сут. исследования (снижение на 30–40% от контроля при воздействии ампициллина и стрептомицина соответственно, и на 50–60%, при воздействии смесей ампициллин+инпут и стрептомицин+инпут, соответственно), на остальных сроках не наблюдали никаких изменений.

Таким образом, по степени устойчивости к антибиотикам, исследованные микроорганизмы образовали ряд: микромицеты > бактерии *p. Azotobacter* > бактерии-амилотические > бактерии-аммонификаторы.

В исследовании рассмотрено влияние биоцидов на активность почвенных ферментов класса оксидоредуктаз (каталаза, дегидрогеназа) и гидролаз (инвертаза). В целом оксидоредуктазы оказались наиболее устойчивыми к загрязнению биоцидами, чем гидролазы. Из ферментов оксидоредуктаз каталаза более устойчива к внесению антибиотиков, нежели дегидрогеназа. Наибольшее снижение активности каталазы наблюда-

ли в вариантах со смесями антибиотиков и фунгицида. Например, смесь ампицилина и стрептомицина с фунгицидом приводит к снижению активности каталазы на 27% по сравнению с контролем ($p < 0,001$, $n=6$). На протяжении всех сроков исследования наблюдается восстановление активности данного фермента. В отличие от активности каталазы, активность дегидрогеназы практически не изменяется на всех сроках исследования. Инвертаза иначе реагирует на внесение биоцидов. Если максимальное снижение активности оксидоредуктаз наблюдалось на 3 сут., то инвертазы на 30 сут. исследования. Смесь антибиотиков с инпутом приводит к наибольшему снижению активности исследуемых ферментов. По степени устойчивости к антибиотикам ферменты образовали ряд: каталаза > инвертаза > дегидрогеназа. Корреляционный анализ полученных данных выявил положительную корреляцию ферментов двух исследуемых классов (дегидрогеназы, инвертазы) с численностью микромицетов ($r=0,63$, $r=0,65$, соответственно), каталазы с аммонифицирующими бактериями ($r=0,73$). Что дает возможность судить о вкладе той или иной группы микроорганизмов в ферментативный пул почв.

Изменение интенсивности почвенного «дыхания» при загрязнении ксенобиотиками интересно в плане обсуждения характера связей между структурными и функциональными компонентами экосистем. Полученные данные свидетельствуют о достаточно сложном механизме интенсивности выделения CO_2 после загрязнения почв биоцидами (рис). На первые сутки исследования после внесения антибиотиков наблюдается значительный поток CO_2 из почвы как в контрольном образце, так и в загрязненных. Пики выделения CO_2 определяются в интервале 4–6 суток, в зависимости от вида вносимого вещества. Повидимому, увеличение выделения CO_2 на данном этапе связано уже не с физико-химическими процессами, а с активизацией микробиоты. Согласно данным Н.Д. Сорокина и др. [9] динамика численности экологотрофических групп микроорганизмов четко коррелирует с интенсивностью их дыхания. Корреляционный анализ данных, полученных на 3 сутки после внесения препаратов, позволил установить обратную корреляцию между дыханием и численностью амилотических бактерий ($r = -0,79$), дыханием и активностью каталазы ($r = -0,63$), а так же прямую корреляцию дыхания с активностью пероксидазы ($r=0,64$).

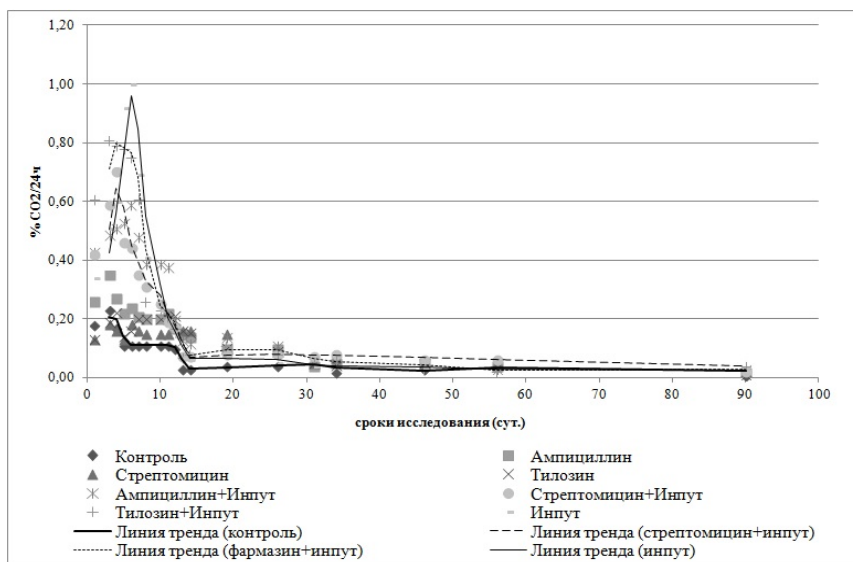


Рис. 1. Динамика интенсивности выделения CO_2 черноземом при внесении биоцидов

После 6–7 суток инкубации дыхание начинает резко падать, происходит почти двукратное его снижение. На восьмые сутки инкубации и в дальнейшем происходит некоторая стабилизация образования CO_2 . По-видимому, на данном этапе основным субстратом для микроорганизмов становится труднодоступное органическое вещество, разложение которого дает небольшой, но достаточно постоянный выход водорастворимого органического углерода. Подобно нашим результатам, в исследованиях Пуртовой и др. [7], было показано, что внесение минеральных удобрений в стандартных дозах ($\text{N}_{30}\text{P}_{60}\text{K}_{60}$) в почвах вызывает активизацию процессов выделения CO_2 . Полученные результаты показывают, что почвенное дыхание – сложная функциональная характеристика. Для установления основных закономерностей в изучении интенсивности выделения CO_2 в течение инкубационного периода с учетом использования антибиотических веществ необходимо проведение дальнейших исследований.

Выводы: загрязнение почв современными биоцидами приводит к снижению показателей биологической активности чернозема обыкновенно североприазовского. В наибольшей степени изменяются микробиологические показатели, чем ферментативная активность почв. Наиболее информативным из исследованных биологических показателей при загрязнении биоцидами является численность аммонифицирующих бактерий и активность дегидрогеназы. Наименее информативным является показатель активности каталазы. Показатель обилия бактерий *p.Azotobacter* при загрязнении антибиотиками неинформативен. При исследовании восстановления биологических свойств установлено, что восстановление, как микробиологических показателей, так и показателей ферментативной активности носит не прямолинейный характер, т.е. нельзя сказать, что с увеличением сроков исследования происходит все большее их восстановление. Скорость восстановления биологических свойств зависит от природы и структуры вносимых веществ. От

дельные параметры биологических свойств не восстанавливаются и спустя 90 суток после загрязнения. Загрязнение почв антибиотиками в сочетании с фунгицидами приводит к значительному ухудшению биологических свойств почв, нежели действие этих препаратов по отдельности, проявляя тем самым синергетические эффекты, механизм действия которых нуждается в дальнейших исследованиях.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (6.345.2014/К) и государственной поддержке ведущей научной школы Российской Федерации (НШ-9072.2016.11).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Акименко, Ю.В. Влияние фармацевтических антибиотиков на динамику численности почвенных микроорганизмов // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки. 2014. №5 (183). С. 63-68.
2. Акименко, Ю.В. Изменение биохимических свойств чернозема обыкновенного при загрязнении биоцидами / Ю.В. Акименко, К.Ш. Казеев, С.И. Колесников // Агрохимия. 2015. № 3. С. 81-87.
3. Акименко, Ю.В. Экологические последствия загрязнения почв антибиотиками / Ю.В. Акименко, К.Ш. Казеев, С.И. Колесников, М.С. Мазанко // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013. Т. 15. № 3. С. 1196.
4. Вальков, В.Ф. Почвы юга России / В.Ф. Вальков, К.Ш. Казеев, С.И. Колесников. – Ростов-на-Дону: Эверест, 2008. 276 с.
5. Казеев, К.Ш. Биодиагностика почв: методология и методы исследований / К.Ш. Казеев, С.И. Колесников. – Ростов-на-Дону: Изд-во Южного федерального университета, 2012. 260 с.
6. Навашин, С.М. Справочник по антибиотикам, 3 изд. / С.М. Навашин, И.П. Фомина. – М.: Наука, 1974. 576 с.
7. Пуртова, Л.Н. Эмиссия углекислого газа из почв природных и антропогенных ландшафтов юга приморья / Л.Н. Пуртова, Н.М. Костенков, В.А. Семаль, И.В. Комачкова // Фундаментальные исследования. 2013. № 1. С. 585-589.
8. Самойленко, Н.Н. Влияние фармацевтических препаратов и их производных на окружающую среду / Н.Н. Самойленко, И.А. Ермакович // Вода и экология: проблемы и решения. 2014. № 2 (58). С. 78-87.
9. Сорокин, Н.Д. Биологическая активность лесных почв Центральной Эвенкии / Н.Д. Сорокин, С.Ю. Евграфова // Почвоведение. 1999. №5. С. 634-638.
10. Cernohorska, L. Antibiotic synergy against biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* / L. Cernohorska, M. Votava // Folia Microbiol. 2008. V.53. P. 57-60.
11. Halling-Sørensen, B. Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2001. V.40. P. 451-460.
12. Höper, H. Eintrag und Berbleib von Tierarzneimittelwirkstoffen in Boden / H. Höper, J. Kues, H. Nau, G. Hamscher // Bodenschutz. 2002. V.4. P.141-148.
13. Kemper, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment a review // Ecological Indicators. 2008. V. 8. P. 1-13.
14. Pawelzick, H.T. A survey of the occurrence of various tetracyclines and sulfamethazine in sandy soils in northwestern Germany fertilized with liquid manure / H.T. Pawelzick, H. Höper, H. Nau, G. Hamscher // In: SETAC Euro 14th Annual Meeting, Prague, Czech Republic, 18-22 April, 2004. P. 23-28.
15. Thiele-Bruhn, S. Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions / S. Thiele-Bruhn, T. Seibicke, H-R. Schulten, P. Leinweber // J. Environ. Qual. 2004. V.33. P. 1331-1342.
16. Zhou, L.J. Trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in the sediments of the Yellow River, Hoi River and Liao River in northern China / L.J. Zhou, G.G. Ying, J.L. Zhao et al. // Environ. Pollut. V. 2011. V. 159. P. 1877.

CHANGE OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF NORTH AZOV CHERNOZEM ORDINARY AT POLLUTION BY MODERN BIOCIDES

© 2016 Yu.V. Akimenko, K.Sh. Kazeev, S.I. Kolesnikov, Yu.S. Kozun, M.A. Myasnikova

Southern Federal University, Rostov-on-Don

Change of biological properties (3, 30, 90 days) of the chernozem ordinary at pollution by modern biocides (antibiotics, pesticides) in concentration of 500 mg/kg of the soil is considered. Pollution of the chernozem biocides leads to depression of number of microorganisms and enzymatic activity of soils. The correlation analysis of the obtained data taped positive correlation of enzymes of two classes (dehydrogenase, invertase) with a number of micromycetes ($r=0,63$, $r=0,65$), catalases with ammonifying bacteria ($r=0,73$). These results allow to judge a contribution of this or that group of microorganisms to enzymatic pool of soils. Separate parameters of biological properties aren't restored also 90 days later after pollution.

Key words: antibiotics, pesticides, pollution, microorganism, enzymatic activity, chernozem ordinary

Yuliya Akimenko, Candidate of Biology, Assistant at the Department of Ecology and Nature Management. E-mail: jvakimenko@sfedu.ru
Kamil Kazeev, Doctor of geography, Professor at the Department of Ecology and Nature Management. E-mail: kamil_kazeev@mail.ru
Sergey Kolesnikov, Doctor of Agriculture, Professor, Head of the Department of Ecology and Nature Management. E-mail: kolesnikov@sfedu.ru
Yuliya Kozun, Candidate of Biology, Lecturer at the Department of Ecology and Nature Management. E-mail: kuz.yuliya@mail.ru
Margarita Myasnikova, Candidate of Biology, Assistant at the Department of Ecology and Nature Management. E-mail: margarita_prudnikova@mail.ru