

УДК 631.427. 631.465

ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ ПОЧВ К ЗАГРЯЗНЕНИЮ АНТИБИОТИКАМИ

© 2017 Ю.В. Акименко, К.Ш. Казеев, С.И. Колесников, Т.В. Минникова

Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону

Статья поступила в редакцию 20.05.2017

В лабораторных модельных исследованиях рассмотрена устойчивость экологических функций чернозема обыкновенного к загрязнению антибиотиками, на основе интегрального показателя биологического состояния почвы (ИПБС). Установлено негативное воздействие загрязнения чернозема обыкновенного антибиотиками по изменению основных биологических показателей, свидетельствующее о нарушении экологических функций почвы (снижение ИПБС на 10-25% от контроля). Степень влияния антибиотиков определяется их природой и сроками воздействия. Бактерицидные антибиотики оказывают наибольшее подавляющее воздействие на исследуемые показатели, чем бактериостатические. По степени ингибирования биологических показателей антибиотики образуют следующий ряд: ампициллин \geq стрептомицин $>$ тилозин $>$ тромексин $>$ алисерил. Наиболее информативным из исследованных биологических показателей является численность аммонифицирующих бактерий и активность дегидрогеназ. Наименее информативным является активность каталазы. Показатель обилия бактерий р. *Azotobacter* при загрязнении антибиотиками неинформативен.

Ключевые слова: загрязнение, антибиотик, чернозем обыкновенный, экологическая функция, почва, микроорганизмы, ферментативная активность

В отечественной и мировой науке накоплен обширный материал по проблеме влияния различных антропогенных воздействий на состояние почв. Большая часть исследований посвящена проблемам химического загрязнения почв и сохранению сельскохозяйственных и экологических функций почв с целью обеспечения продовольственной и экологической безопасности человечества. На сегодняшний день достаточно хорошо изучено изменение биологических свойств разных типов почв России при загрязнении тяжелыми металлами, нефтью и нефтепродуктами [1, 2] пестицидами [3, 4], электромагнитными воздействиями различной природы [5], а так же при разных технологиях возделывания сельскохозяйственных культур [6]. Однако в отличие от тех же пестицидов, которые уже давно используются в сельском хозяйстве, антибиотики не вызвали интереса как потенциальные загрязнители окружающей среды. Но в связи с интенсификацией их использования во всех сферах сельского хозяйства в настоящее время проблеме загрязнения антибиотиками природных экосистем и почвенного покрова, в частности, уделяется особое внимание.

В последнее время научный интерес сосредоточился с одной стороны на изучении путей поступления, распространения и поведения антибиотиков в окружающей среде, с другой стороны на влиянии, которое они оказывают на другие организмы.

Продолжительное воздействие антибиотиков может усилить отбор устойчивых штаммов

бактерий. Установлена резистентность к антибиотикам микроорганизмов сточных [7], поверхностных вод [8], почвы [9]. Основными источниками поступления антибиотиков в окружающую среду является фармацевтическая продукция, ветеринария и медицина человека. В настоящее время во многих странах в животноводстве и растениеводстве применяют большое количество антибиотиков, как для стимулирования роста животных, так и в профилактических целях. Используемые антибиотики передвигаются по пищевым цепочкам, накапливаясь в растениях, в частности овощах и фруктах [10, 11]. В почву антибиотики попадают благодаря применению навоза [12] и сточных вод [13] на сельскохозяйственных землях в качестве удобрения. С каждым годом все чаще разные концентрации антибиотиков обнаруживаются в сточных водах, почвах, грунтовой и питьевой воде. Локально в почвах обнаруживаются антибиотики группы тетрациклинов от следовых количеств до 900 мг/кг, группы макролидов до 800 мг/кг [14]. По прогнозу экспертов ВТО в России использование антибиотиков будет ежегодно расти примерно на 35-40%. В большинстве Европейских стран запрещено использовать антибиотики в качестве кормовых добавок и в профилактических целях. В России же отсутствуют нормативные документы о содержании и определении антибиотиков в объектах окружающей среды, кормовые антибиотики не запрещены.

Таким образом, представляется перспективным осуществление диагностики, мониторинга и нормирования воздействия на почву антибиотиков по степени нарушения экологических и сельскохозяйственных функций, выполняемых почвой в природных экосистемах и агроэкосистемах. Нарушение сельскохозяйственных и экологических функций почвы происходит в определенной последовательности в зависимости от силы антропогенного влияния. Как правило, первоначально нарушаются

Акименко Юлия Викторовна, кандидат биологических наук, ассистент. E-mail: akimenkojuliya@mail.ru
Казеев Камиль Шагидуллович, доктор географических наук, профессор. E-mail: denisova777@inbox.ru
Колесников Сергей Ильич, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, заведующий кафедрой экологии и природопользования. E-mail: kolesnikov@sfsedu.ru
Минникова Татьяна Владимировна, младший научный сотрудник. E-mail: loko261008@yandex.ru

информационные функции, и далее биохимические, физико-химические, химические и целостные, и в последнюю очередь физические функции почвы. Критерием степени нарушения тех или иных функций почв является ИПБС почвы, который определяется на основе набора наиболее информативных биологических показателей, которые первыми реагируют на антропогенное влияние. При снижении интегрального показателя происходит нарушение различных функций почвы.

Цель исследования: оценка устойчивости экологических и сельскохозяйственных функций почв к загрязнению антибиотиками, по биологическим показателям чернозема обыкновенного.

Материалы и методы исследования. Объектом исследований являлся микробоценоз чернозема обыкновенного южно-европейской фации карбонатного мощного слабогумусированного тяжелосуглинистого на желто-бурых лессовидных суглинках. Черноземы обыкновенные (Voronich Chernozemes Pachic), занимают обширные равнины Азово-Кубанской низменности в пределах Краснодарского края и южной части Ростовской области, по новой классификации – черноземы миграционно-сегрегационные [15]. В качестве объекта черноземы были выбраны потому, что эти почвы характеризуются высокой численностью, разнообразием микроорганизмов и их высокой активностью [16]. Кроме того, черноземная зона является важнейшим сельскохозяйственным районом страны. Больше половины пахотных почв представлены черноземами, на которых выращивают зерновые, масличные и технические культуры и т.п. Это районы, характеризующиеся широко развитым животноводством и растениеводством. Отбор почвы для лабораторных модельных исследований производили в Ботаническом саду Южного федерального университета (пахотный слой, 0–25 см).

Для решения поставленных в исследовании задач нами была заложена серия модельных лабораторных опытов. Изучали воздействие медицинских антибиотиков – ампициллина, стрептомицина и ветеринарных антибиотиков – тилозина, тремексина, ализерила в концентрации 500 мг/кг на биологические свойства чернозема обыкновенного. Эта концентрация была выбрана по литературным данным согласно остаточным количествам антибиотиков, обнаруживаемым в окружающей среде [17] и благодаря результатам ранее проведенных рекогносцировочных исследований [18, 19]. Антибиотики вносили в почву в виде растворов. Исследования проводили на 3, 30 и 90 сутки после загрязнения. Все образцы почв инкубировали в темном месте при температуре 20–25°C и оптимальном увлажнении (60% от полевой влагоемкости). Контролем была почва, не загрязненная антибиотиками. Аналитические определения биологических свойств чернозема выполняли в 3-х кратной повторности для изучения микробиологических свойств почв и в 9-ти кратной повторности для изучения биохимических свойств.

Комплексное исследование микробиологических свойств чернозема обыкновенного включало определение численности жизнеспособных микро-

организмов различных эколого-трофических групп методом посева соответствующих разведений (2;3;5) на твердые питательные среды: на мясо-пептоном агаре (МПА) определяли количество аммонифицирующих бактерий, на крахмало-аммиачном агаре (КАА) – амилотических бактерий, на среде Чапека – обилие микромицетов. Методом комочков обрастания на среде Эшби определяли обилие бактерий р.*Azotobacter*. Для изучения биохимических свойств почвы были использованы следующие методы: А.Ш. Галстяна (1978) для определения активности каталазы, А.Ш. Галстяна (1982) для определения активности дегидрогеназы. Для выявления общих закономерностей влияния загрязнения антибиотиками на биологическое состояние чернозема обыкновенного был использован ИПБС почвы. Его определяли с помощью наиболее информативных биологических показателей [20]. Статистическая обработка результатов исследования проведена с использованием статистического пакета Statistica 10.0 и программы Excel.

Результаты и их обсуждение. Анализ результатов исследования показал, что загрязнение чернозема антибиотиками оказывает ингибирующее воздействие на жизнедеятельность аммонифицирующих бактерий, подобные результаты были получены и в других исследованиях [21]. Ампициллин, стрептомицин и тилозин приводят к снижению количества бактерий-аммонификаторов более, чем на 40% от контроля. Наибольший ингибирующий эффект воздействия оказывает ампициллин (снижение на 50–60% от контроля, $p < 0,001$) в первые сроки от момента загрязнения (3 суток). На дальнейших сроках исследования (30, 90 суток) прослеживается незначительная тенденция к восстановлению численности бактерий-аммонификаторов, но и на 90 сутки после загрязнения восстановления до контрольных значений не происходит, разница в численности бактерий по сравнению с контролем составляет 20–30% для ампициллина, стрептомицина, тилозина. В образцах, загрязненных тремексином и ализерилом, достоверной разницы в количестве бактерий-аммонификаторов на 90 сутки не установлено.

При загрязнении чернозема антибиотиками наблюдается достоверное снижение количества амилотических бактерий в первые сроки от момента загрязнения (3 суток). Наибольшее ингибирующее воздействие на обилие амилотических бактерий оказывает ампициллин и стрептомицин (снижение на 50–60% и 40–50%, соответственно, $p < 0,001$). Загрязнение почвы тремексином и ализерилом не вызывает достоверных изменений обилия амилотических бактерий на 30 и 90 сутки от момента загрязнения. В первый срок исследований (3 суток) при загрязнении данными антибиотиками количество амилотических бактерий снижается на 10–15% по сравнению с контролем. В других исследованиях установлено, что сульфонамидные антибиотики, тетрациклин, триметоприм [22] в концентрациях 300–500 мг/кг оказывают значительное ингибирующее воздействие на численность амилотических бактерий. На последующих сроках исследований (30, 90 суток) наблюдается восстановление

численности амилотических бактерий, особенно в образцах почв, загрязненных тромексином и ализерилом.

Как и ожидалось, антибактериальные антибиотики не вызвали статистически достоверного снижения обилия микромицетов. В образцах почв, загрязненных ампициллином, стрептомицином и тилозином на 3 и 90 суток от момента загрязнения, обилие микромицетов превышает контроль на 10-20% ($p < 0,05$).

Бактерии *p. Azotobacter* оказались наиболее устойчивыми к загрязнению антибиотиками. Изменение обилия бактерий наблюдали лишь на 3 суток после загрязнения антибиотиками (снижение на 20% от контроля при загрязнении ампициллином, на 40% при загрязнении стрептомицином, на 18% при загрязнении тилозином. Тромексин и ализерил не оказывают достоверного подавляющего воздействия на обилие бактерий на протяжении всех сроков исследований. В исследованиях других авторов, бактерии *p. Azotobacter* были чувствительнее к разным видам загрязнений, например, нефтью и нефтепродуктами, тяжелыми металлами, ионизирующему излучению, чем другие группы почвенных микроорганизмов [1, 5].

Изучено влияние антибиотиков на активность ферментов двух классов: оксидаз (каталаза, дегидрогеназы). Загрязнение чернозема обыкновенного антибиотиками приводит к снижению активности всех исследованных ферментов. Из ферментов класса оксидаз – активность дегидрогеназ снижалась в большей степени, чем активность каталазы. При исследовании влияния антибиотиков (ампициллина, стрептомицина, тилозина) в концентрации 500 мг/кг установили, что активность каталазы снижалась на 10–15% при внесении антибиотиков. На последующих сроках наблюдается тенденция восстановления активности фермента. Из антибиотиков наиболее эффективным в отношении дегидрогеназы оказался тилозин.

Критерием степени нарушения тех или иных функций почв является ИПБС почвы, который определяется на основе набора наиболее информативных биологических показателей, которые первыми реагируют на антропогенное влияние. При снижении ИПБС происходит нарушение различных функций почвы. Результаты, полученные при моделировании загрязнения чернозема антибиотиками, показали что, загрязнение почв антибиотиками приводит к снижению ИПБС (рис. 1).

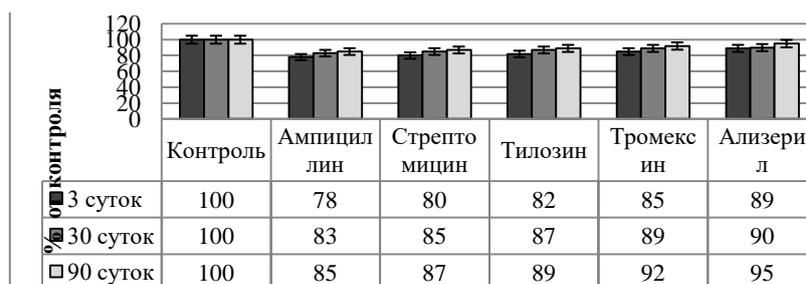


Рис. 1. Динамика изменения ИПБС чернозема обыкновенного при загрязнении антибиотиками (500 мг/кг)

Выводы:

1. Установлено негативное воздействие загрязнения чернозема обыкновенного антибиотиками, по изменению основных биологических показателей, свидетельствующее о нарушении экологических функций почвы (снижение ИПБС на 10-25% от контроля).

2. Степень влияния антибиотиков определяется их природой и сроками воздействия. Бактерицидные антибиотики оказывают большее подавляющее воздействие на исследуемые показатели, чем бактериостатические. По степени ингибирования биологических показателей чернозема антибиотики образуют следующий ряд: ампициллин \geq стрептомицин $>$ тилозин $>$ тромексин $>$ ализерил.

3. Наиболее информативным из исследованных биологических показателей при загрязнении антибиотиками является численность аммонифицирующих бактерий и активность дегидрогеназ. Наименее информативным – активность каталазы. Показатель обилия бактерий *p. Azotobacter* при загрязнении антибиотиками неинформативен.

4. Максимальное воздействие антибиотиков проявляется в первые сроки после загрязнения чернозема (3 суток). На последующих сроках (30, 90

суток) наблюдается тенденция восстановления биологических показателей. Однако, полного восстановления биологических свойств (до контрольных значений) не наблюдается и на 90 суток после загрязнения. Динамика восстановления, как численности микроорганизмов, так и ферментативной активности носит нелинейный характер.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (5.5735.2017/8.9) и Президента Российской Федерации (НШ-9072.2016.11, МК-326.2017.11)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Колесников, С.И. Оценка экотоксичности тяжелых металлов и нефти по биологическим показателям чернозема / С.И. Колесников, М.Г. Жаркова, К.Ш. Казеев и др. // Экология. 2014. № 3. С. 163.
2. Колесников, С.И. Оценка устойчивости дерново-карбонатных типичных почв Черноморского побережья Кавказа к химическому загрязнению / С.И. Колесников, А.А. Кузина, К.Ш. Казеев и др. // Российская сельскохозяйственная наука. 2016. №5. С. 37-40.
3. Казеев, К.Ш. Влияние загрязнения современными пестицидами на биологическую активность чернозема обыкновенного / К.Ш. Казеев, Е.С. Лосева, Л.Г. Боровикова, С.И. Колесников // Агрохимия. 2010. № 11. С. 39-44.

4. 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.
5. Денисова, Т.В. Интегральная оценка электромагнитных воздействий различной природы на биологические свойства почв юга России / Т.В. Денисова, К.Ш. Казеев, С.И. Колесников, В.Ф. Вальков // *Почвоведение*. 2011. № 11. С. 1386-1390.
6. Акименко, Ю.В. Влияние технологии прямого посева на микробиологические свойства черноземов: монография / Ю.В. Акименко, Г.В. Мокриков, К.Ш. Казеев, С.И. Колесников. – Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета, 2016. – 96 с.
7. Iversen, A. High prevalence of vancomycin resistant enterococci in Swedish sewage / A. Iversen, I. Kuhn, A. Franklin, R. Mollby // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. № 68. P. 2838-2842.
8. Joy, S.R. Fate and transport of antimicrobials and antimicrobial resistance genes in soil and runoff following land application of swine manure slurry / S.R. Joy et al. // *Environ. Sci. Technol.* 2013. V. 47. P. 12081-12088.
9. Heuer, H. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields / H. Heuer et al. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2011. V. 14. P. 236-243.
10. Radjenovic', J. Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment / J. Radjenovic', M. Petrovic', D. Barceló // *Water Res.* 2009. V. 43. P. 831-841.
11. Rosal, R. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation / R. Rosal, A. Rodríguez, J.A. Perdigón-Melón et al. // *Water Res.* 2010. V. 44. P. 578-588.
12. Kemper, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment: a review // *Ecological Indicators*. 2008. № 8. P. 1-13.
13. Renew, J.E. Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography–electrospray mass spectrometry / J.E. Renew, C.H. Huang // *Journal of Chromatography*. 2004. P. 113-121.
14. Yang, J.-F. Spatial and seasonal distribution of selected antibiotics in surface waters of the Pearl Rivers / J.-F. Yang, G.-G. Ying, J.-L. Zhao et al. // *China. Environ. Sci. Health*. 2011. V.46. P. 272.
15. Классификация и диагностика почв России / Сост.: Л.Л. Шишов, В.Д. Тонконогов, И.И. Лебедева. – Смоленск: Ойкумена, 2004. 342 с.
16. Вальков, В.Ф. Почвы Юга России / В.Ф. Вальков, К.Ш. Казеев, С.И. Колесников. – Ростов-на-Дону: Эверест, 2008. 276 с.
17. Sarmah, A.K. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment / A.K. Sarmah et al. // *Chemosphere*. 2006. V. 65. P. 725-759.
18. Акименко, Ю.В. Влияние антибиотиков (бензилпенициллина, фармазина, нистатина) на биологические свойства чернозема обыкновенного / Ю.В. Акименко, К.Ш. Казеев, С.И. Колесников // *Почвоведение*. 2014. № 9. С. 1095-1101.
19. 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.
20. Казеев, К.Ш. Методы биодиагностики наземных экосистем: монография / К.Ш. Казеев, С.И. Колесников, Ю.В. Акименко, Е.В. Даденко. – Ростов-на-Дону: Изд-во Южного федерального университета, 2016. 356 с.
21. Kong, W.D. The veterinary antibiotic oxytetracycline and Cu influence functional diversity of the soil microbial community / W.D. Kong, Y.G. Zhu, B.J. Fu et al. // *Environ. Pollut.* 2006. V. 143. P. 129-137.
22. Wunder, D.B. The effects of antibiotic cocktails at environmentally relevant concentrations on the community composition and acetate biodegradation kinetics of bacterial biofilms / D.W. Wunder, D.T. Tan, T.M. LaPara, R.M. Hozalski // *Chemosphere*. 2013. № 90. P. 2261-2266.

ESTIMATION THE SOIL ECOLOGICAL FUNCTIONS SUSTAINABILITY TO ANTIBIOTIC POLLUTION

© 2017 Yu.V. Akimenko, K.Sh. Kazeev, S.I. Kolesnikov, T.V. Minnikova

Southern Federal University, Rostov-on-Don

In the laboratory model studies, the sustainability of ecological functions of ordinary chernozem to pollution by antibiotics was examined based on the integral indicator of soil biological state (IIBS). The negative effect of ordinary chernozem pollution by antibiotics on the change in basic biological indices, indicating a violation of the soil ecological functions (decrease IIBS by 10-25% of the control). The degree of influence of antibiotics is determined by their nature and timing of exposure. Bactericidal antibiotics have the greatest inhibitory effect on the studied parameters, than bacteriostatic. By the degree of inhibition the biological parameters, antibiotics form the following series: ampicillin > streptomycin > tylosin > tromexin > alizeryl. The most informative of studied biological parameters is the number of ammonifying bacteria and the activity of dehydrogenases. The least informative is catalase activity. The abundance of bacteria *Azotobacter* in case of contamination with antibiotics is not informative. The maximum exposure to antibiotics is manifested in the first period after the contamination of chernozem (3 days). On subsequent terms (30, 90 days) there is a tendency to restore biological indicators. However, complete restoration of biological properties (up to control values) is not observed and on 90 days after contamination.

Key words: pollution, antibiotic, ordinary chernozem, ecological function, soil, microorganisms, enzymatic activity

Yulia Akimenko, Candidate of Biology, Assistant. E-mail: akimenkojuliya@mail.ru; Kamil Kazeev, Doctor of Geography, Professor. E-mail: denisova777@inbox.ru; Sergey Kolesnikov, Doctor of Agriculture, Professor, Head of the Ecology and Nature Management Department. E-mail: kolesnikov@sfsedu.ru; Tatiana Minnikova, Minor Research Fellow. E-mail: loko261008@yandex.ru