

УДК 631.427. 631.465

ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ МИКРОБОЦЕНОЗА БУРОЙ ЛЕСНОЙ ПОЧВЫ К ЗАГРЯЗНЕНИЮ БИОЦИДАМИ

© 2018 О.В. Чуvaraева, Ю.В. Акименко, К.Ш. Казеев, С.И. Колесников

Южный федеральный университет, г. Таганрог

В лабораторных модельных исследованиях изучена устойчивость микробоценоза бурой лесной почвы к загрязнению биоцидами (тилозин, бастион) в концентрациях 1, 10, 100, 1000 мг/кг почвы. В результате проведенных исследований установлено негативное воздействие загрязнения бурой лесной почвы биоцидами, по изменению основных микробиологических показателей, свидетельствующее о нарушении экологических функций почвы. Степень влияния биоцидов определяется их природой, концентрацией и сроками воздействия. Антибиотик тилозин оказывает более сильное воздействие по сравнению с фунгицидом бастион. Внесение малых доз загрязнителей (1, 10 мг/кг) приводит к незначительному увеличению численности почвенных микроорганизмов. Внесение загрязнителей в высоких концентрациях (100, 1000 мг/кг) приводит к снижению обилия почвенных микроорганизмов. Максимальное воздействие биоцидов проявляется в первые сроки после загрязнения почвы (3 суток), на последующих сроках экспозиции наблюдается тенденция к восстановлению микробного сообщества, однако полного восстановления до контрольных значений не наблюдается и на 90 сут. после загрязнения.

Ключевые слова: загрязнение, антибиотики, бурая лесная почва, тилозин, бастион, почвенные микроорганизмы, люминесцентная микроскопия.

«Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00388, Министерства образования и науки Российской Федерации (5.5735.2017/8.9) и РНФ в рамках научного проекта № 18-76-00010».

ВВЕДЕНИЕ

Почва играет важную роль в обеспечении жизнедеятельности человечества. Этот очень тонкий слой обладает удивительным свойством, не присущим ни одной из других составляющих нашей планеты – биологической продуктивностью. По своей природе почва – это гетерогенная система, служащая средой обитания для огромного количества живых организмов [1]. Почва сформирована несколькими фазами вещества: твердой, жидкой и газообразной. Условия данной среды могут быть крайне изменчивыми: различные биотические и абиотические факторы формируют условия, постоянно варьирующие в результате взаимодействия этих факторов. В различных типах почв могут формироваться абсолютно разные условия из-за различий в материнской породе, месторасположении и климате, геоморфологических про-

Чуvaraева Ольга Викторовна, магистр.

E-mail: sayori11@yandex.ru

Акименко Юлия Викторовна, кандидат биологических наук, доцент.

E-mail: jvakimenko@sfedu.ru

Казеев Камиль Шагидклович, доктор географических наук, профессор.

E-mail: kazeev@sfedu.ru

Колесников Сергей Ильич, доктор сельскохозяйственных наук, профессор.

E-mail: kolesnikov@sfedu.ru

цессах, в результате которых данный тип почв был образован [2]. Так же на характеристики почвы влияет её историческое развитие и местная флора и фауна. В этой связи микроорганизмы, благодаря высокой способности к адаптациям различного рода в ответ на изменения условий среды, успешно размножаются и заселяют почвы абсолютно разного химического и гранулометрического состава в кардинально разных климатических условиях.

Все составляющие почвы, как живые, так и неживые находятся в постоянном взаимодействии и поддерживают, таким образом, совместную жизнедеятельность [3]. Живые организмы почвы формируют почвенное плодородие в результате своей жизнедеятельности. В данном процессе участвуют растения, насекомые, животные (простейшие и многоклеточные), а так же микробоценоз почвы, включающий в себя различные бактерии, микроскопические грибы, актиномицеты и микроскопические водоросли [4].

При высокой способности к адаптациям и выживаемости, микробное сообщество почвы, однако, оказывается очень уязвимым в условиях химического загрязнения. В силу быстроты метаболических процессов микробоценоз первым реагирует на загрязнение различными токсическими веществами [5].

Масштабное развитие промышленности и сельского хозяйства влечет за собой повышенный риск загрязнения почв различными

химикатами. Вблизи городов, заводов и промышленных районов почвы подвергаются сильной антропогенной нагрузке. Каждый день на поверхностный слой почвы попадает пыль и влага с остатками нефтяных фракций, оксидов и тяжелых металлов. В зоне усиленной сельскохозяйственной и животноводческой деятельности в почву с воздушными массами, сточными водами и природными удобрениями попадает огромное количество биоцидов: пестицидов и антибиотиков [6]. В настоящее время большое количество исследований в данной области позволило установить отрицательное воздействие использования пестицидов, и особо опасные из них запрещены к использованию во множестве стран по всему миру. Однако не меньшую опасность влечет за собой бесконтрольное использование антибиотиков в различных целях: как медицинских и ветеринарных средств, в качестве стимуляторов роста растений и животных, как инсектицидов и гербицидов. Антибиотики обнаруживаются в почвах повсеместно в высоких концентрациях, на большом удалении от сельскохозяйственных комплексов [7,8].

В масштабах огромных животноводческих ферм сложно количественно контролировать использование антибиотиков, таким образом, вместе со сточными водами и навозом они попадают в природные экосистемы и быстро накапливаются на разных трофических уровнях [9]. На территории Европы во многих странах законодательно закреплён запрет использования антибиотиков в качестве стимуляторов роста и кормовых добавок. В Российской Федерации подобные нормативные акты отсутствуют и с каждым годом количество антибиотиков, определяемых в различных экосистемах, увеличивается.

Таким образом, вопрос исследования воздействия загрязнения пестицидами и антибиотиками на почвенный микробиоценоз представляется актуальным, в контексте развивающегося сельского хозяйства, а так же из-за обостряющейся проблемы антибиотикорезистентности.

Цель исследования – оценка устойчивости микробиоценоза бурой лесной почвы к загрязнению биоцидами (тилозином, бастионом) в концентрациях 1, 10, 100, 1000 мг/кг почвы на разных сроках экспозиции (3, 30 и 90 суток).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве биоцидов были выбраны бактерицидный ветеринарный антибиотик (тилозин) и системный фунгицид (бастион), широко используемые в ветеринарии и сельском хозяйстве [10]. Тилозин – антибиотик макролидного ряда, продуцируемый *Streptomyces fradiae*, широко применяемый в животноводстве в качестве лечебно-профилактического средства

и стимулятора роста. Активен в отношении большинства Gr+ и некоторых Gr– бактерий [11]. Бастион – комбинированный фунгицид системного действия для борьбы с возбудителями грибковых заболеваний, распространяющихся с семенами и через почву. Эффективен против грибов класса аскомицетов, базидиомицетов и несовершенных грибов.

Объектом исследования была бурая лесная почва, отобранная в Республике Адыгея, п. Никель (0-20 см). Данная почва является довольно плодородной при условии интенсивного окультивирования, и широко распространена в регионах Кавказа, а так же на Дальнем Востоке. На Северном Кавказе данный тип почв активно используется фондом лесного хозяйства и заповедниками. Естественная растительность данных почв в большинстве регионов представлена широколиственными буково-дубовыми, буково-грабовыми, буково-ясеневыми лесами [12]. Воздушно-сухие образцы почвы обрабатывались раствором антибиотика тилозина и фунгицида бастион (в концентрациях 1, 10, 100, 100 мг/кг почвы). Все образцы инкубировали в вегетационных сосудах при температуре 20–25°C в темном месте, во избежание быстрого разложения антибиотиков. Исследования проводились через 3, 30 и 90 сут. после внесения загрязнителей. Контролем служили образцы почвы не загрязненные биоцидами. Концентрации и сроки инкубации были выбраны исходя из проведенных ранее рекогносцировочных исследований [13, 14, 15], а так же на основе литературных данных [16].

Для исследования устойчивости микробиоценоза бурой лесной почвы были выбраны следующие показатели, широко используемые при оценке качества и биологической эффективности почв: общая численность бактерий и обилие бактерий рода *Azotobacter*.

Исследование общей численности бактерий проводилось методом люминесцентной микроскопии с окрашиванием флуорохромным красителем акридиновым оранжевым. Подсчет светящихся зеленым цветом клеток бактерий проводился на инвертированном микроскопе фирмы «ZEISS» модель AXIO Vert. A1 со светофильтром 450–490 нм. При подсчете клеток просматривали по 20 полей зрения для каждого предметного стекла.

Расчет количества клеток на 1 г почвы проводили по формуле:

$$N = S1 * a * n / v * S2 * c,$$

где N – число клеток на 1 г почвы;

S1 – площадь препарата (мкм²);

a – количество клеток в одном поле зрения (усреднение производится по всем препаратам);

n – показатель разведения почвенной суспензии (мл);

v – объем капли, наносимой на стекло (мл);

S2 – площадь поля зрения микроскопа (мкм²);

c – навеска почвы (г).

Исследование обилия бактерий рода *Azotobacter* проводилось методом комочков обростания на питательной среде Эшби. Каждый образец был исследован в 3-х кратной повторяемости по 25 комочков в каждой чашке Петри, и инкубировался в течение 5-10 дней при комнатной температуре (18-22°). Учет проводился по числу комочков со слизистыми обростаниями и выражен в процентах от общего количества комочков. Края слизистых обростаний просматривались на микроскопе с объективом 10× непосредственно в чашке Петри для подтверждения природы образования слизистых обростаний.

Статистическая обработка результатов исследования проведена с использованием ста-

тистического пакета Statistica 10.0 и Excel. Рассчитаны основные показатели вариационной статистики: среднее (μ) ошибка среднего ($\mu \pm m$), стандартное отклонение (s), коэффициент вариации (CV) и другие.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Бактерии напрямую влияют на физиологические свойства почвы. Увеличение количества естественных бактериальных организмов в почве увеличивает её плодородие [17]. Наибольшее количество бактерий обитает в области распространения корневой системы растений – ризосфере [18].

Анализ общей численности бактерий методом люминесцентной микроскопии показал (рис. 1-2), что загрязнение бурой лесной почвы

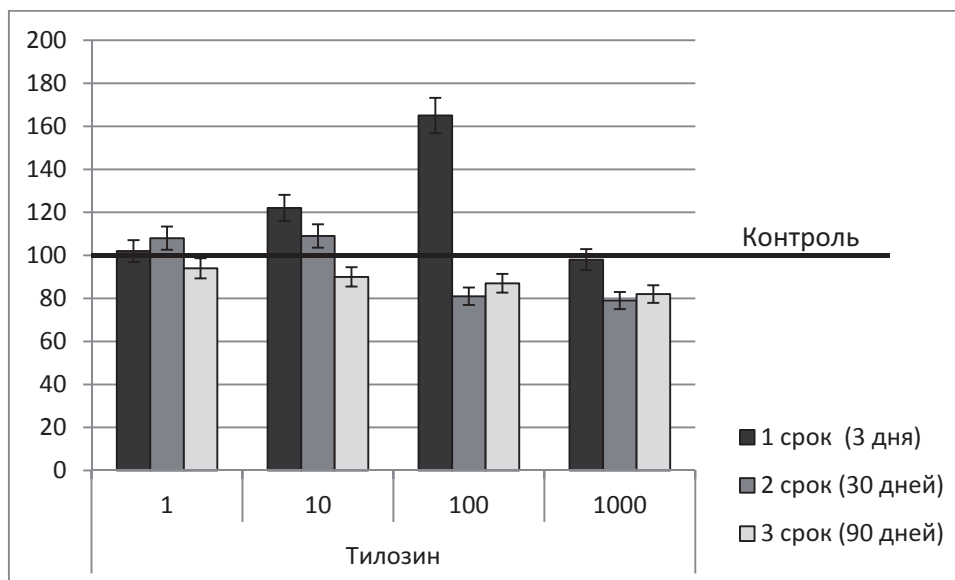


Рис. 1. Динамика общей численности бактерий бурой лесной почвы при загрязнении тилозином, % от контроля

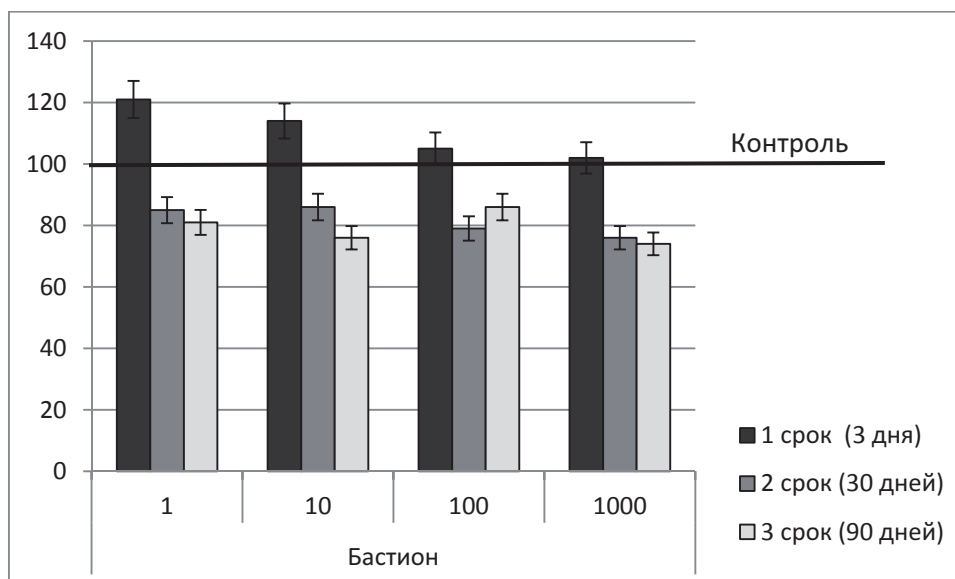


Рис. 2. Динамика общей численности бактерий бурой лесной почвы при загрязнении бастионом, % от контроля

на всех сроках инкубации, в концентрациях 1 и 10 мг/кг не приводят к существенному изменению общей численности бактерий, наблюдается небольшое увеличение их численности по сравнению с контролем (на 5-10%). Полученные данные свидетельствуют об «эффекте малых доз», и подтверждаются другими работами [19, 20].

Между концентрацией биоцидов и численностью бактерий установлена тесная обратная корреляция ($r = -0,80$). На 30 сут. исследования наблюдается снижение численности бактерий во всех образцах почвы, относительно контрольных (на 20-40%). После 90 сут. инкубации, общая численность бактерий снижена на 10-20% от контроля. Однако следует отметить общую тенденцию к восстановлению общей численности микроорганизмов на протяжении сроков инкубации. Из исследованных биоцидов, наибольшее подавляющее воздействие на численность бактерий бурой лесной почвы оказывает антибиотик тилозин, нежели фунгицид бастион.

Почва обильно населена множеством бактерий, в числе которых бактерии р.*Azotobacter*. Это Г⁻ бактерии, свободноживущие в почве. Особенность данного рода бактерий состоит в том, что его представители осуществляют трансформацию атмосферного азота из формы атмосферного азота N₂, которая очень тяжело поддается усваиванию живыми организмами, в формы соединений азота, которые являются более доступными для использования. Бактерии данного рода являются одними из немногих свободноживущих азотфиксаторов [21].

Благодаря данной особенности, эти бактерии способствуют повышению плодородия почв [22], и широко используются в сельскохозяйственной деятельности, как азотистые удобрения, а так же служат хорошим индикатором качества почв.

В рамках проведенного исследования на первом сроке инкубации, через 3 сут. от момента внесения загрязнителей, было установлено незначительное увеличение обилия бактерий р.*Azotobacter* в образцах почвы, загрязнённых биоцидами в концентрации 1 мг/кг почвы по сравнению с контрольными образцами (рис. 3-4). В образцах загрязнённых биоцидами в концентрациях 10 и 100 мг/кг почвы наблюдалось небольшое снижение обилия бактерий относительно контроля. В концентрации 1000 мг/кг почвы данные биоциды оказали существенное подавляющее воздействие на обилие бактерий данного рода, снизив её, в среднем на 70-80%. На сроке инкубации в 30 суток были отмечены значительные колебания численности бактерий при загрязнении биоцидами в различных концентрациях. В образцах почвы, загрязнённых биоцидами в концентрации 1 мг/кг почвы, наблюдалось снижение численности относительно первого срока инкубации. В то время как в образцах загрязнённых биоцидами в концентрации 1000 мг/кг почвы наоборот было отмечено увеличение численности бактериальной популяции. Эти изменения численности могут быть связаны с явлением популяционных волн и постепенным восстановлением численности популяции, приближением её значения к среднему показателю после резкого уменьшения и увеличения численности бактерий р.*Azotobacter*, которое наблюдалось через 3 суток после внесения загрязнителя в почву.

При увеличении срока инкубации загрязнённых образцов были отмечены тенденции к восстановлению обилия данного рода бактерий. В лабораторных исследованиях на 90 сут. наблюдалась примерно равная численность бактерий во всех образцах, независимо от начальной

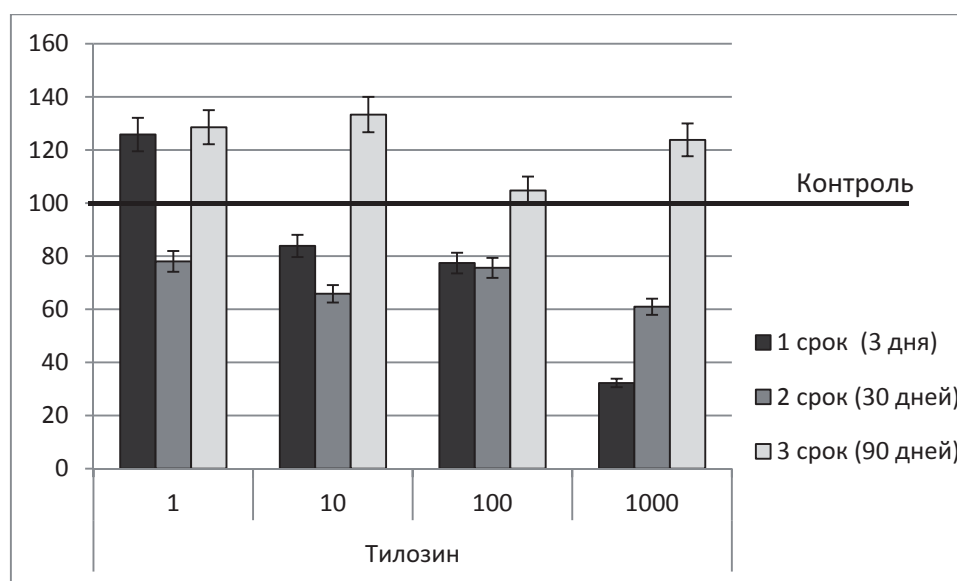


Рис. 3. Динамика обилия бактерий р.*Azotobacter* бурой лесной почвы при загрязнении тилозином, % от контроля

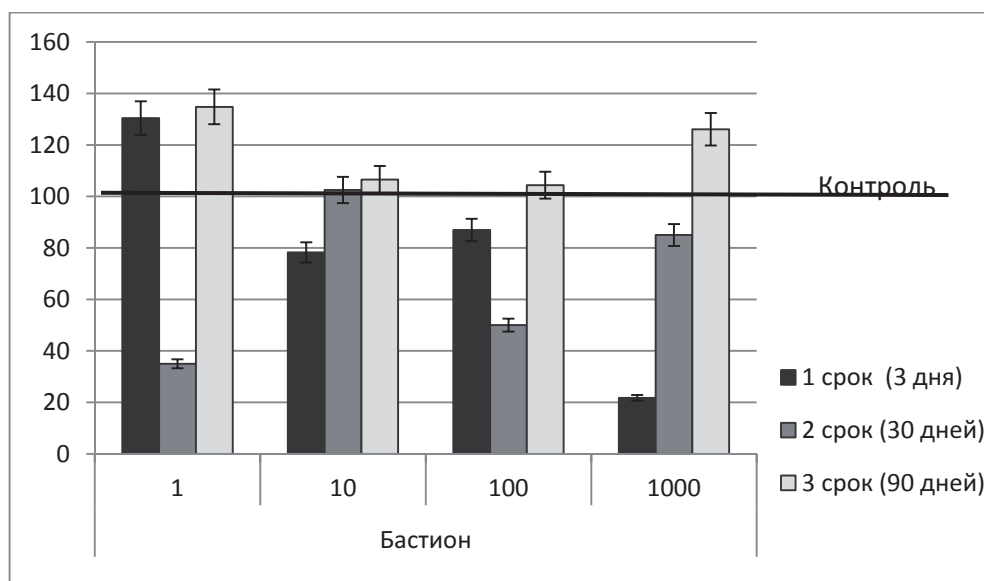


Рис. 4. Динамика обилия бактерий р.Azotobacter бурой лесной почвы при загрязнении бастионом, % от контроля

концентрации загрязняющего вещества. Было отмечено некоторое увеличение численности бактерий р.Azotobacter по сравнению с контрольными образцами. По всей видимости, это может быть связано с высокой скоростью адаптации микроорганизмов к загрязнению биоцидами, а так же с постепенным разложением внесённых в почву загрязняющих веществ.

Устойчивость бактерий р.Azotobacter к антибиотикам в небольших концентрациях также наблюдалась в исследованиях других авторов [23]. В ранее проведённых исследованиях наблюдалась устойчивость бактерий р.Azotobacter к воздействию макролидного антибиотика тилозина в концентрации 500 мг/кг почвы.

ВЫВОДЫ

Установлено негативное воздействие загрязнения бурой лесной почвы биоцидами, по изменению микробиологических показателей.

Степень влияния биоцидов определяется их природой, концентрацией и сроками воздействия. Наибольшее влияние оказывает макролидный антибиотик тилозин, чем фунгицид бастион.

Внесение малых доз биоцидов (1, 10 мг/кг почвы) приводит к незначительному увеличению численности почвенных микроорганизмов и обилия бактерий р.Azotobacter. Данное явление в научной литературе носит название «эффекта малых доз». Загрязнение бурой лесной почвы биоцидами в концентрациях 100 и 1000 мг/кг почвы приводит к снижению общей численности бактерий и обилия бактерий р.Azotobacter.

Максимальное воздействие биоцидов проявляется в первые сроки после загрязнения почвы (3 суток). На последующих сроках (30, 90

суток) наблюдается тенденция восстановления микробиологических показателей. Однако, полного восстановления микробиологических показателей не наблюдается и на 90 сутки после загрязнения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chandra N., Kumar S. Antibiotics Producing Soil Microorganisms //Antibiotics and Antibiotics Resistance Genes in Soils. – Springer, Cham, 2017. – С. 1-18.
2. Butler MS, Buss AD (2006) Natural products—the future scaffolds for novel antibiotics? *Biochem Pharmacol* 71:919–929
3. Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J (2010) Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol* 8:251–259
4. Martinez JL, Fajardo A, Garmendia L, Hernandez A, Linares JF, Martinez-Solano L, Sanchez MB (2009) A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 33:44–65
5. Акименко Ю.В., Казеев К.Ш., Колесников С.И., Козунь Ю.С., Мясникова М.А. Изменение биологических свойств чернозема обыкновенного североприазовского при загрязнении современными биоцидами // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. Т. 18. №2 (2), 2016. С. 276-279.
6. Kemper N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment a review // *Ecological Indicators*. 2008. V. 8. P.1–13.
7. Höper H., Kues J., Nau H., Hamscher G. Eintrag und Berbleib von Tier-arzneimittelwirkstoffen in Boden // *Bodenschutz*. 2002. V.4. P.141–148.
8. Smukler, S.M., Jackson, L.E., Murphree, L., Yokota, R., Koike, S.T., Smith, R.F. Transition to large-scale organic vegetable production in the Salinas Valley, California, 2008, *Agriculture, Ecosystems and Environment* 126,168-188.

9. Акименко Ю. В. и др. Оценка устойчивости экологических функций почв к загрязнению антибиотиками // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2017. Т. 19. № 2-2.
10. Акименко Ю.В., Казеев К.Ш., Колесников С.И. Влияние антибиотиков (бензилпенициллина, фарамазина, нистатина) на биологические свойства чернозема обыкновенного // Почвоведение. 2014. № 9. С. 1095–1101.
11. Акименко Ю.В., Казеев К.Ш., Колесников С.И., Козунь Ю.С., Мясникова М.А., Одабашьян М.Ю., Николаева К.Н., Тимошенко А.Н. Устойчивость микроорганизмов чернозема к загрязнению антибиотиками в условиях полевого модельного опыта // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2014. № 104. С. 135-148.
12. Середин Р.М. Природные ресурсы и производственные силы Северного Кавказа // Растительные ресурсы. Часть 1. Лес. Изд-во Ростовского Университета, 1980. - 360с
13. 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.
14. Акименко Ю.В., Казеев К.Ш., Колесников С.И. Изменение биохимических свойств чернозема обыкновенного при загрязнении биоцидами // Агротехника. 2015. № 3. С. 81-87.
15. Акименко Ю.В., Казеев К.Ш., Колесников С.И., Козунь Ю.С., Мясникова М.А. Изменение биологических свойств чернозема обыкновенного североприазовского при загрязнении современными биоцидами // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. Т. 18, №2 (2), 2016. С. 276-279.
16. Sum P., Cabrera M.L., Huang C.-H., Pavlostathis S.G. Biodegradation of veterinary ionophore antibiotics in broiler litter and soil microcosms, 2014, Environ. Sci. Technol. 48, 2724–2731.
17. Виноградский С.Н. Микробиология почвы. М., 1952
18. Тихонович И. А., Проворов Н. А. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агросистем будущего. СПб, 2009
19. 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.
20. Акименко Ю.В., Казеев К.Ш., Колесников С.И. Экологические последствия загрязнения чернозема антибиотиками. Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета. 2013. 120 с.
21. Gandora V., Gupta R. D., Bhardwaj K. K. R. (1998). Abundance of Azotobacter in great soil groups of North-West Himalayas. Journal of the Indian Society of Soil Science 46 (3): 379–383.
22. Bürgmann H. et al. New molecular screening tools for analysis of free-living diazotrophs in soil // Applied and environmental microbiology. – 2004. – Т. 70. – №. 1. – С. 240-247.
23. Чуварева О.В., Акименко Ю.В. Мониторинг изменения численности бактерий чернозема обыкновенного при загрязнении тилозином (методом люминесцентной микроскопии) // Экология и биология почв. – 2015. – С. 120-122.

ESTIMATION OF THE SUSTAINABILITY OF BROWN FOREST SOIL'S MICROFLORA TO ANTIBIOTIC POLLUTION

© 2018 O.V. Chuvaraeva, Yu.V. Akimenko, K.Sh. Kazeev, S.I. Kolesnikov

Southern Federal University, Taganrog

In laboratory model researches resistance of a mikrobotsenoz of the brown forest soil to pollution by biocides (тилозин, a bastion) in concentration 1, 10, 100, 1000 mg/kg of the soil is studied. As a result of the conducted researches the negative impact of pollution of the brown forest soil by biocides, on change of the key microbiological indicators, confirming violation of ecological functions of the soil is established. Extent of influence of biocides is defined by their nature, concentration and terms of influence. The antibiotic тилозин makes stronger impact in comparison with fungicide a bastion. Introduction of small doses of pollutants (1, 10 mg/kg) leads to insignificant increase in number of soil microorganisms. Introduction of pollutants in high concentrations (100, 1000 mg/kg) leads to decrease in abundance of soil microorganisms. The maximum influence of biocides is shown in the first terms after pollution of the soil (3 days), on the subsequent terms of an exposition the tendency to restoration of microbic community is observed, however the complete recovery to control values isn't observed also on 90 days after pollution.
Keywords: pollution, antibiotics, brown forest soil, tylosin, bastion, soil microorganisms, fluorescent microscopy.

Olga Chuvaraeva, Undergraduate of Ecology Department.

E-mail: sayori11@yandex.ru

Yuliya Akimenko, Candidate of Biology, Associate Professor of Ecology Department.

E-mail: jvakimenko@sfnedu.ru

Kamil Kazeev, Professor, Doctor of Geographical Sciences, Professor of Ecology Department.

E-mail: kamil_kazeev@mail.ru

Sergey Kolesnikov, Professor, Doctor of Agricultural Sciences, Head of Ecology Department.

E-mail: kolesnikov@sfnedu.ru