

УДК 57.044; 631.45

Оценка экологического состояния чернозема обыкновенного при загрязнении антибиотиками тетрациклиновой группы

Акименко Ю.В., Попова Е.А., Фастова А.С., Колесников С.И., Казеев К.Ш.

Южный федеральный университет

Аннотация

*В статье представлены результаты комплексной оценки экологического состояния чернозема при загрязнении тетрациклинами в концентрации 10, 100 и 1000 мг/кг по степени изменения биологических показателей. Установлено, что загрязнение тетрациклинами приводит к ухудшению экологического состояния чернозема обыкновенного. Степень изменения биологических показателей определяется химической структурой тетрациклинов и их концентрацией. Между концентрацией тетрациклинов и степенью изменения биологических показателей установлена отрицательная корреляционная связь. Окситетрациклин оказывает наибольшее отрицательное воздействие на биологические показатели, чем тетрациклин. Активность оксидоредуктаз, общая численность бактерий, длина корней редиса являются наиболее информативными показателями при загрязнении чернозема тетрациклинами, показатель обилия бактерий р. *Azotobacter* не информативен.*

Ключевые слова: ЗАГРЯЗНЕНИЕ, ТЕТРАЦИКЛИН, ОКСИТЕТРАЦИКЛИН, ЧЕРНОЗЕМ ОБЫКНОВЕННЫЙ, ЭКОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ

Введение

В последние десятилетия, в связи с интенсивным развитием животноводства и аквакультуры наблюдается значительный рост использования антибиотиков. Тетрациклины (ТЦ), по масштабам применения, занимают одно из первых мест среди других антибиотиков, использующихся в ветеринарии [1]. Их применяют не только для профилактики и лечения животных, но и в качестве кормовых добавок скоту, для ускорения их роста, увеличения например, надоев молока и нагула мяса. Согласно литературным данным, в США используют более 3 тыс. тонн антибиотиков тетрациклиновой группы

ежегодно, а в Европе – более 2,5 тыс. тонн [2]. Крупномасштабное использование антибиотиков в сельском хозяйстве приводит к их накоплению в объектах окружающей среды (воде, почвах, в продуктах питания животного и растительного происхождения). Антибиотики поступают в окружающую со сточными водами животноводческих и фармацевтических предприятий, а также благодаря использованию навоза в качестве удобрения и орошения сельскохозяйственных полей [3]. Установлено, что содержание тетрациклинов в почвах значительно колеблется от 2.8 [4] до 243 мкг/кг, иногда обнаруживаются и более высокие концентрации [5]. Присутствие тетрациклинов в объектах окружающей среды, особенно в продуктах питания животного и растительного происхождения оказывает не только отрицательное воздействие на здоровье человека, но и приводит к нарушению экологического баланса в экосистемах. Важно учитывать, что антибиотики по-разному инактивируются в почве. Тетрациклины, например, могут сохраняться в почве более 1 года [6]. Попадая, и накапливаясь в почве, антибиотики приводят к нарушению структуры естественных бактериальных сообществ, к возникновению антибиотикорезистентности, ингибированию почвенных ферментов и увеличению токсичности свойств [7-10], что может привести к нарушению производства биомассы, деградации органического вещества и в конечном счете, нарушению экологического равновесия агроэкосистем [11, 12].

В настоящее время имеются некоторые законодательно закрепленные нормативы по содержанию ТЦ в продуктах питания. Например, Европейским Союзом утверждены предельно допустимые концентрации (ПДК), составляющие 200 мкг/кг для яиц, мяса животных, птицы и 100 мкг/л для молока [13], однако отсутствуют соответствующие нормативы для объектов окружающей среды, в т.ч. почв, ввиду неоднозначного и недостаточного количества исследований по оценке экотоксичности антибиотиков на их биологические свойства.

Цель исследования – оценка экологического состояния чернозема обыкновенного по степени изменения биологических показателей при загрязнении тетрациклинами.

Материалы и методы

В ходе исследования был проведен ряд лабораторных модельных экспериментов для оценки экологического состояния чернозема обыкновенного (Ботанический сад ЮФУ,

Ростов-на-Дону, верхний слой 0–20 см) при загрязнении тетрациклинами. Моделировали загрязнение чернозема тетрациклином и окситетрациклином в концентрациях 10, 100 и 1000 мг/кг почвы, концентрации выбраны согласно литературным данным [14, 15] и результатам ранее проведенных рекогносцировочных исследований [16-18].

Тетрациклины (ТЦ) являются природными и полусинтетическими антибиотиками. Представлены полифункциональными гидронафтаценовыми соединениями. Тетрациклин – $R_1 = R_3 = H$, $R_2 = OH$, окситетрациклин – $R_1 = H$, $R_2 = R_3 = OH$. ТЦ активны в отношении большинства G^+ и G^- бактерий, а также простейших и некоторых вирусов. ТЦ угнетают внутриклеточный синтез белка и ферментов, необходимых бактериям, специфически ингибируя ферменты, участвующие в связывании тРНК с акцепторами рибосом [19].

Почву инкубировали в вегетационных сосудах в трехкратной повторности при температуре 20–22°C и весовой влажности почвы 25%. Экологическое состояние чернозема оценивали на основе степени изменения биологических показателей (табл. 1) через 30 суток после загрязнения тетрациклинами. Анализ биологических показателей проводили с использованием общепринятых методов, использующихся в экологии и почвоведении [20].

Таблица 1. Лабораторно-аналитические методы исследований

№	Показатель	Метод	Прибор	Единицы измерения
1.	Общая численность бактерий	По Д.Г. Звягинцеву, П.А. Кожевину	люминесцентный микроскоп Carl Zeiss Axio LabA1	10^9 в 1 г воздушно-сухой почвы
2.	Обилие бактерий рода <i>Azotobacter</i>	Метод комочков обрастания на среде Эшби	абактериальный бокс BAVnp-01- "Laminar-S." - 1.8	% комочков почвы, обросших слизью
3.	Активность каталазы	По А.Ш. Галстяну	газометрический прибор	мл O_2 на 1 г воздушно-сухой почвы за 1 мин
4.	Активность дегидрогеназ	Колориметрический метод по А.Ш. Галстяну в модификации Ф.Х. Хазиева	спектрофотометр ПЕ-5300ВИ	мг ТФФ в 10 г воздушно-сухой почвы за 24 ч
5.	Интенсивность начального роста растений	По изменению длины корней по М.А. Бабьевой, Н.К. Зеновой	климатическая камера Binder KBW 240	% от контроля

Общую численность бактерий определяли методом люминесцентной микроскопии, обилие бактерий рода *Azotobacter* – методом комочков обрастания на среде Эшби, активность каталазы – по скорости разложения перекиси водорода, активность дегидрогеназ – по скорости превращения хлорида трифенилтетразолия в трифенилформазан, о фитотоксичности почвы судили по длине корней редиса *Raphanus sativus* (сорт «Жара»).

Использованный набор биологических показателей позволяет дать интегральную характеристику экологического состояния в целом и оценить устойчивость почвы [20]. Методика расчета интегрального показателя биологического состояния (ИПБС) [20] позволяет интегрировать относительные значения разных биологических показателей, абсолютные значения которых не могут быть оценены друг с другом, так как имеют разные единицы измерения.

Так как биологические показатели почв варьируют в достаточно широком диапазоне, их значения, полученные в процессе исследования, были подвергнуты вариационно–статистическому и корреляционному анализу. Статистическая обработка результатов исследования проведена с использованием статистического пакета Statistica 10.0 и Microsoft Excel 2010.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что загрязнение чернозема обыкновенного антибиотиками тетрациклиновой группы приводит к ухудшению экологического состояния (табл. 2): снижается общая численность бактерий, обилие бактерий рода *Azotobacter*, активность каталазы и дегидрогеназ, интенсивность начального роста редиса *Raphanus sativus* (сорт «Жара»).

Одним из самых чувствительных показателей экологического состояния почв при различных видах антропогенной нагрузки является изменение микробиологических свойств почвы. Бактерии рода *Azotobacter* являются традиционным индикатором химического загрязнения почвы [21]. По результатам исследования установлено, что достоверное снижение обилия бактерий данного рода наблюдается при загрязнении высокими концентрациями антибиотиков 100 и 1000 мг/кг почвы, наибольшее

ингибирующее воздействие оказывает окситетрациклин, при загрязнении в концентрации 1000 мг/кг наблюдается практически полное подавление бактерий р. *Azotobacter*.

Общая численность бактерий в почве отражает состояние редуцентов в экосистеме [22]. По степени обогащенности микроорганизмами (по Звягинцеву, 1978) [23] чернозем обыкновенный (контрольный, не загрязненный образец) характеризуется как богатый (5,68 млрд/г). Общее количество бактерий чернозема достоверно не изменяется при загрязнении окситетрациклином в концентрации 10 мг/кг, при воздействии тетрациклина отмечается стимулирующий эффект, известный в литературе как эффект «малых доз», отмечается увеличение общего количества бактерий на 29% от контроля. Однако, высокие концентрации тетрациклина и окситетрациклина (100, 1000 мг/кг) приводят к ингибированию почвенных бактерий, их общее количество снижается на 33 и 24%, соответственно.

Согласно литературным данным, ветеринарные антибиотики оказывают различные эффекты воздействия на почвенный микробоценоз почвы. Например, в почвах, донных отложениях, почвах, обработанных навозом, под действием антибиотиков группы сульфаниламидов снижается общая численность бактерий и микробная биомасса. Наблюдаются изменения в разнообразии и функционировании микробного сообщества почв, загрязненных тилозином, окситетрациклином, хлортетрациклином и др. [24, 25]. Так же установлено изменение соотношения бактерии-грибы, замедление процессов нитрификации и денитрификации в почвах при воздействии тетрациклина, окситетрациклина, сульфаниламидов [26].

Активность оксидоредуктаз (каталазы и дегидрогеназ) характеризует скорость минерализации в почве органических веществ. Кроме того, оксидоредуктазы отличаются высокой чувствительностью к химическому загрязнению по сравнению с другими классами ферментов [27, 28]. При этом ферментативная активность характеризует в целом потенциальную биологическую активность почвы. Согласно шкале степени обогащенности ферментами (по Звягинцеву, 1978) [23] чернозем обыкновенный (контрольный, не загрязненный образец) характеризуется средним уровнем обогащенности каталазой (6,8 мл O₂/г/мин) и высоким уровнем активности дегидрогеназ (22,67 мг ТФФ/10 г/24 ч). При загрязнении чернозема антибиотиками тетрациклиновой группы, во всех концентрациях, наблюдается ингибирование активности оксидоредуктаз. Наибольшее ингибирующее

воздействие оказывает тетрациклин. Дегидрогеназы инактивируются в большей степени, чем каталаза, их активность снижается на 47% при загрязнении тетрациклином и на 44% окситетрациклином (концентрация – 1000 мг/кг).

В целом, изменение ферментативной активности почв при загрязнении антибиотиками, отмечено и в других исследованиях. Например, показано ингибирование уреазы, каталазы, фосфатазы тетрациклином в концентрации 5–50 мг/кг [29], активность фосфатазы также под действием окситетрациклина, тилозиа, сульфаметазина и триметоприма снижается на 20–30% [30]. Имеются данные и об отсутствии отрицательного воздействия антибиотиков на ферменты почв. Например, показано отсутствие ингибирования дегидрогеназной активности сульфапиридином и окситетрациклином даже в высоких концентрациях (1000 мг/кг) [31].

Таблица 2. Изменение биологических показателей чернозема обыкновенного при загрязнении тетрациклинами, % от контроля

	Концентрация, мг/кг почвы	Биологический показатель					
		Общее количество бактерий	Обилие бактерий р. <i>Azotobacter</i>	Активность каталазы	Активность дегидрогеназ	Длина корней редиса	ИПБС
Контроль	-	100	100	100	100	100	100
Тетрациклин	10	129	100	88	80	129	105
	100	91	89	79	53	95	81
	1000	67	24	76	30	81	56
Окситетрациклин	10	101	95	96	75	126	99
	100	90	50	73	70	95	76
	1000	76	10	70	56	87	60

Длина корней редиса позволяет судить о фитотоксичности почвы, об интенсивности начального роста и развития растений [32]. Наблюдается неоднозначный эффект воздействия тетрациклиновых антибиотиков на показатели начального роста редиса (длина корней), проявляющийся, с одной стороны, стимулирующим влиянием при низких концентрациях (10 мг/кг) и ингибирующим – при высоких (1000 мг/кг), подобные результаты описаны в работе Pan and Chu (2017) [33].

В качестве индикатора нарушения той или иной группы экологических функций почвы хорошо зарекомендовал себя ИПБС почвы. Установлено, что при снижении ИПБС менее чем на 5% нарушения экосистемных функций почвы не происходит. Уменьшение значений ИПБС на 5–10% свидетельствует о нарушении информационных функций, на 10–25 % – биохимических, физико–химических, химических и целостных, более чем на 25 % – физических [34]. При загрязнении чернозема антибиотиками тетрациклиновой группы в концентрации 10 мг/кг не установлено однозначного достоверного изменения ИПБС (табл. 2). При загрязнении тетрациклином в концентрациях 100 и 1000 мг/кг ИПБС снижается (относительно контроля) на 19 и 44%, при загрязнении окситетрациклином на 24 и 40%, соответственно, что свидетельствует о нарушении всех экосистемных функций чернозема обыкновенного. В целом, по степени снижения ИПБС, загрязнение окситетрациклином приводит к большему нарушению экологического состояния чернозема, чем загрязнение тетрациклином.

Статистическая обработка результатов исследования выявила достоверную обратную корреляционную зависимость между концентрацией антибиотиков и изменением биологических показателей (табл. 3). Чувствительность исследуемого показателя оценивали по степени его снижения в зависимости от концентрации антибиотика (%), а информативность – по степени корреляции значения показателя и концентрации антибиотика.

Таблица 3. Корреляционная связь между биологическими показателями чернозема и концентрацией тетрациклинов (* $p < 0,05$)

	Общее количество бактерий	Обилие бактерий <i>p.Azotobacter</i>	Активность каталазы	Активность дегидрогеназ	Длина корней редиса
Тетрациклин	-0,84*	-1,00	-0,75*	-0,88*	-0,78*
Окситетрациклин	0,93	0,89	0,65	0,98*	0,72

Наиболее чувствительными биологическими показателями к загрязнению ТЦ являются активность оксидоредуктаз и обилие бактерий *p.Azotobacter*, менее

чувствительны показатели изменения длины корней редиса и общего количества бактерий. Однако, общая численность бактерий, активность оксидоредуктаз, длина корней редиса наиболее информативными при загрязнении чернозема тетрациклинами, чем обилие бактерий р. *Azotobacter*.

Заключение

Загрязнение антибиотиками тетрациклиновой группы приводит к ухудшению экологического состояния чернозема обыкновенного, нарушаются все экосистемные функции почвы. Между концентрацией тетрациклинов и степенью изменения биологических показателей установлена отрицательная корреляционная связь. Степень изменения биологических показателей определяется химической структурой тетрациклинов и их концентрацией. Достоверное ингибирующее воздействие большинства показателей антибиотиками тетрациклиновой группы наблюдается при концентрации 100 и 1000 мг/кг почвы. В целом же, по степени изменения ИПБС, загрязнение окситетрациклином приводит к большему нарушению экологического состояния чернозема, чем загрязнение тетрациклином. Наиболее информативными показателями при загрязнении чернозема обыкновенного антибиотиками тетрациклиновой группы являются – активность оксидоредуктаз, общая численность бактерий, показатель обилия бактерий р. *Azotobacter* не информативен.

Благодарности

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента Российской Федерации для молодых российских ученых – кандидатов наук (МК-2085.2022.1.4), Ведущей научной школы Российской Федерации (НШ-449.2022.5), Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 220-5234-7520).

Список использованных источников

1. Kim K.R., Owens G., Kwon S.I., So K.H., Lee D.B., Ok Y.S. Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment // Water. Air. Soil Pollut. – 2011. – N 214. – P. 163-174.
2. Dagherir R., Drogui P. Tetracycline antibiotics in the environment: a review // Environ. Chem. Lett. – 2013. – V. 11. – P. 209-227.

-
3. Du L., Liu W. Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agro–ecosystems // *Agronomy for Sustainable Development*. – 2012. – V.32. – P.309-327.
 4. Zheng W., Zhang L., Zhang K., Wang X., Xue F. Determination of tetracyclines and their epimers in agricultural soil fertilized with swine manure by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry // *J. Integr. Agr.* – 2012. – V. 11. – P. 1189-1198.
 5. Li Y.W., Wu X.L., Mo C.H., Tai Y.P., Huang X.P., Xiang L. Investigation of Sulfonamide, Tetracycline, and Quinolone Antibiotics in Vegetable Farmland Soil in the Pearl River Delta Area, Southern China // *J. Agr. Food Chem.* – 2011. – V. 59. – P. 7268-7276.
 6. Zuccato E., Calamari D., Natangelo M., Fanelli R. Presence of therapeutic drugs in the environment // *Lancet*. – 2000. – V.355. – P.1789-1790.
 7. Jechalke S., Heuer H., Siemens J., Amelung W., Smalla K. Fate and effects of veterinary antibiotics in soil // *Trends Microbial.* – 2014. – V.22. – P.536-545.
 8. Jufer H., Reilly L., E.Mojica E.R., Geli I., Domingo F., Petrović M. Antibiotics Pollution in Soil and Water: Potential Ecological and Human Health Issues // *Encyclopedia of Environmental Health*. – 2019. – P. 118-131.
 9. Gros M., Mas–Pla J., Boy–Roura M. et al. Veterinary pharmaceuticals and antibiotics in manure and slurry and their fate in amended agricultural soils: Findings from an experimental field site // *Sci. Total Environ.* – 2019. – N. 654. – P. 1337-1349.
 10. Akimenko Y. Influence of Pollution by Antibiotics on Biological Properties of Soils (Through the Example of Ordinary Chernozem) // *Water, Air, and Soil Pollution*. – 2021. – 232(6), 232.
 11. Chee-Sanford J.C., Mackie R.I., Koike S., Krapac I.van G., Lin Y.F., Yannarell A.C., Maxwell S., Aminov R.I. Fate and Transport of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistance Genes // *J. Environ. Qual.* – 2009. – N 38. – P. 1086-1108.
 12. Martinez J.L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants // *Environ. Pollut.* – 2009. – N 157. – P. 2893–2902.
 13. Companyó R., Granados M., Guiteras J., Prat M.D. Antibiotics in food: Legislation and validation of analytical methodologies. // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2009. –V. 395. – P. 877-891.
 14. Sarmah A.K., Meyer M.T., Boxall A.B. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment // *Chemosphere*. – 2006. – N 65. – P. 725-759.
 15. Sun P., Cabrera M.L., Huang C.–H., Pavlostathis S.G. Biodegradation of veterinary ionophore antibiotics in broiler litter and soil microcosms // *Environ. Sci. Technol.* – 2014. – 48. – P. 2724–2731.
 16. 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.

17. Акименко Ю.В., Казеев К.Ш., Колесников С.И. Влияние загрязнения антибиотиками на биологические свойства чернозема обыкновенного. Южный федеральный университет. – Ростов–на–Дону: Издательство Южного федерального университета, 2015. – 154 с.

18. Акименко Ю.В., Казеев К.Ш., Колесников С.И., Минникова Т.В. Оценка устойчивости экологических функций почв к загрязнению антибиотиками // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2017. – Т. 19. – № 2–2. – С. 207-210.

19. Zakeri B., Wright G.D. Chemical biology of tetracycline antibiotics // *Biochem Cell Biol.* –2008. – 86: 124-1316.

20. Казеев К.Ш., Колесников С.И., Акименко Ю.В., Даденко Е.В. Методы биодиагностики наземных экосистем. Ростов–на–Дону: Издательство Южного федерального университета, 2016. – 356 с.

21. Val'kov V.F., Kolesnikov S.I., Kazeev K.Sh., Tashchiev S.S. Influence of heavy metal pollution on microscopic fungi and Azotobacter of common chernozem // *Russ. J. Ecol.* – 1997. – N 28. – P. 345-346.

22. McFeters G.A., Yu F.P., Pyle B.H., Stewart P.S. Physiological assessment of bacteria using fluorochromes // *J. Microbiol. Methods.* – 1995. – 21. – P. 1–13.

23. Звягинцев Д.Г. Биологическая активность почв и шкала для оценки некоторых ее показателей // *Почвоведение.* – 1978. – № 6. – С. 48-54.

24. Sun J., Zeng Q., Tsang D.C., Zhu L.Z., Li X.D. Antibiotics in the agricultural soils from the Yangtze River Delta, China // *Chemosphere.* – 2017. – N 189. – P. 301-308.

25. Zhao F., Chen L., Yang L., Li S., Sun L., Yu X. Distribution, dynamics and determinants of antibiotics in soils in a peri-urban area of Yangtze River Delta, Eastern China // *Chemosphere.* – 2018. – N 211. – P. 261-270.

26. Grenni P., Ancona V., Caracciolo A.B. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review // *Microchem. J.* – 2018. – N 136. – P. 25-39.

27. Kolesnikov, S.I., Kazeev, K.S., Val'kov, V.F. Effects of heavy metal pollution on the ecological and biological characteristics of common chernozem // *Russ. J. Ecol.* – 2000. – 31. P. 174-181.

28. Martinez M., Gutiérrez-Romero V., Janssens M., Ortega-Blu R. Biological soil quality indicators: A review // *Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol Microb. Biotechnol.* – 2010. – P. 319–328.

29. Bansal O.P. Green remediation of tetracyclines in soil-water systems // *Trends Microbiol.* – 2013. – N 5. – P. 2039-2044.

30. Liu F., Ying G., Tao R., Zhao J., Yang J., Zhao L. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities // *Environ. Pollut.* – 2009. – N 157. – P. 1636-1642.

31. Thiele-Bruhn S., Beck I.C. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass // Chemosphere. – 2005. – N 59. – P. 457-465.
32. Бабьева М.А., Зенова Н.К. Биология почв. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 336 с.
33. Pan M., Chu L.M. Fate of antibiotics in soil and their uptake by edible crops // Sci. Total Environ. – 2017 – N 599–600. – P. 500-512.
34. Колесников С.И., Казеев К.Ш., Вальков В.Ф., Денисова Т.В. Методология нормирования химического загрязнения почв на основе нарушения их экологических функций // Экология и промышленность России. – 2007. – № 11. – С. 48-51.

Цитирование:

Акименко Ю.В., Попова Е.А., Фастова А.С., Колесников С.И., Казеев К.Ш. Оценка экологического состояния чернозема обыкновенного при загрязнении антибиотиками тетрациклиновой группы [Электрон. ресурс] // АгроЭкоИнфо: Электронный научно-производственный журнал. – 2022. – № 4. – Режим доступа: http://agroecoinfo.ru/STATYI/2022/4/st_424.pdf. DOI: <https://doi.org/10.51419/202124424>.