

Оценка влияния антибиотиков ампициллина и тилозина на ферментативную активность дерново-подзолистой почвы и их токсичности для культурных растений

© 2020. Т. А. Трифонова^{1, 2}, д. б. н., профессор,
С. М. Чеснокова², к. х. н., профессор, А. Г. Космачева², аспирант,

¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12,

²Владимирский государственный университет им. А. Г. и Н. Г. Столетовых,
600000, Россия, г. Владимир, ул. Горького, д. 87,
e-mail: hijadelaluna@mail.ru

Проведено исследование влияния антибиотиков ампициллина и тилозина на каталазную, уреазную и целлюлазную активности дерново-подзолистой слабоокультуренной почвы и их токсичности для культурных растений при индивидуальном и комбинированном воздействии. Токсичность антибиотиков для культурных растений определяли методом биотестирования. В качестве тест-объектов использовали семена *Raphanus sativus* L. var. *sativus* и *Triticum aestivum* L. Эффекты ингибирования ферментативной активности зависят как от вида антибиотиков, так и от их концентрации. Показано, что исследованные антибиотики наиболее опасны для фермента целлюлазы. Наиболее сильно ингибирует целлюлазу ампициллин (на 96%), при концентрации 600 мг/кг почвы. Концентрации, снижающие активность каталазы на 50% (IC₅₀), составляют: при индивидуальном воздействии ампициллина 300 мг/кг почвы, при комбинированном воздействии ампициллина и тилозина – 600 мг/кг почвы. Тилозин даже при концентрации 600 мг/кг почвы снижает каталазную активность лишь на 28%. IC₅₀ ампициллина при индивидуальном воздействии на активность уреазы равна 400 мг/кг почвы. При индивидуальном воздействии тилозина и его комбинированном воздействии с ампициллином активность уреазы на всём диапазоне концентраций снижается на 58–63%. Наиболее чувствительным тест-параметром при изучении фитотоксичности является длина корня, а тест-организмом – пшеница мягкая озимая (*Triticum aestivum* L.). Наибольшее ингибирование роста корней и побегов у пшеницы происходит при индивидуальном действии тилозина, а у *R. sativus* L. var. *sativus* – при комбинированном действии этих антибиотиков.

Ключевые слова: антибиотики, дерново-подзолистая почва, ферментативная активность, фитотоксичность.

Evaluation of the effect of ampicillin and tylosin antibiotics on the enzymatic activity of sod-podzolic soil and their toxicity to cultivated plants

© 2020. Т. А. Trifonova^{1, 2} ORCID: 0000-0002-1628-9430^{*}

S. M. Chesnokova² ORCID: 0000-0001-5126-1786^{*}

A. G. Kosmacheva² ORCID: 0000-0002-1988-8615^{*}

¹M. V. Lomonosov Moscow State University,
1, Leninskie Gory, Moscow, Russia, 119991,

²Vladimir State University named after

Alexander Grigorievich and Nikolai Grigorievich Stoletovs,
87, Gorky St., Vladimir, Russia, 600000,

e-mail: hijadelaluna@mail.ru

The effect of antibiotics ampicillin and tylosin on the catalase, urease, and cellulase activity of sod-podzolic slightly cultured soil and their toxicity to plants under individual and combined effects has been studied. The toxicity of antibiotics for plants is determined by biotesting. The seeds of *Raphanus sativus* L. var. *sativus* and *Triticum aestivum* L. were used as test objects. It has been established that the studied antibiotics are the most dangerous for the cellulase enzyme. Cellulase is inhibited by ampicillin most strongly (by 96% at a concentration of 600 mg/kg of soil), and least of all by tylosin. They have a similar effect on catalase activity. Concentrations that reduce catalase activity by 50% (IC₅₀) are: 300 mg/kg of soil for individual effects of ampicillin, 600 mg/kg for soil for combined effects of ampicillin and tylosin. Tylosin reduces urease activity by less than 50%. Urease activity is most inhibited by tylosin, least of all by ampicillin. The IC₅₀ of ampicillin with an individual effect on urease activity is 400 mg/kg of soil. With individual exposure to tylosin and its combined exposure with ampicillin activity, urease in all ranges is reduced by 58–63%. The most sensitive test

parameter in the study of phytotoxicity is the root length, and the test organism is winter wheat (*Triticum aestivum* L.). The maximum inhibition of the growth of roots and shoots in *Triticum aestivum* L. occurs under the individual action of tylosin, and in *Raphanus sativus* L. var. *sativus* with the combined action of ampicillin and tylosin.

Keywords: antibiotics, sod-podzolic soil, enzymatic activity, phytotoxicity.

В конце XX – начале XXI веков во всех странах Европы, Азии и США в поверхностных водах и почвах были выявлены лекарственные средства, широко используемые в медицине и животноводстве [1–4]. Среди них наиболее часто обнаруживались антибиотики [5–6] – специфические продукты жизнедеятельности различных организмов, либо полусинтетические или синтетические органические вещества, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определённым группам микроорганизмов, избирательно задерживающие их рост, либо полностью подавляющие их развитие [7].

Причины загрязнения окружающей среды антибиотиками – широкое использование в медицине, ветеринарии, птицеводстве, растениеводстве, аквакультуре. В животноводстве их используют не только для борьбы с инфекционными болезнями, но и в качестве кормовой добавки для улучшения продуктивности животных и роста молодняка [8]. В растениеводстве антибиотики применяют в качестве регуляторов роста растений. Большинство антибиотиков хорошо растворимы в воде, из организма человека и животных они выделяются с мочой (до 90%) и экскрементами (около 75%), поэтому данные поллютанты накапливаются в осадках сточных вод и навозе, из которых поступают в почвы [9–11]. Концентрация антибиотиков в почвах различных стран изменяется от следовых количеств до 700–1000 мг/кг. По прогнозам экспертов Всемирной Торговой Организации применение антибиотиков в России ежегодно будет увеличиваться примерно на 35–40%, что приведёт к росту поступления данных поллютантов в поверхностные воды и почвы агроценозов.

В работах [10–13] показано, что ветеринарные антибиотики изменяют структуру микробиоценоза и ферментативную активность почвы.

В Российской Федерации (РФ) в настоящее время мониторинг загрязнения почв антибиотиками не проводится в силу отсутствия финансирования и интереса к антибиотикам как к потенциально-опасным загрязнителям окружающей среды. Опубликован ряд работ, в которых даны оценки последствий загрязнения антибиотиками и закономерности

их воздействия на биологические свойства чернозёма, характеризующегося значительными запасами гумуса, элементов питания, микробной биомассы и высокой биологической активностью [14–17]. Установлено, что ферментативная активность почв является чувствительным показателем воздействия антропогенных факторов на почвы [17–18].

Большую часть земельного фонда средне-таёжной и южнотаёжной зон России составляют подзолистые и дерново-подзолистые почвы. Их удельный вес от общей площади сельскохозяйственных угодий составляет 12,3 и 14% от общей площади пашен, что ставит их на второе место после чернозёмов [19]. Дерново-подзолистые почвы слабо гумусированы, бедны питательными элементами, содержат мало растительных остатков и ферментов, их микробиоценоз характеризуется слабой устойчивостью к действию различных загрязнителей [17]. На этих почвах чаще всего используют навоз и осадки сточных вод в качестве удобрений. Сведений о влиянии антибиотиков на ферментативную активность дерново-подзолистых почв ни в отечественной, ни в зарубежной литературе в настоящее время нами не обнаружено. Очень мало данных встречается также о воздействии данных поллютантов на развитие культурных растений на ранних стадиях онтогенеза. В связи с этим изучение эффектов воздействия антибиотиков на ферментативную активность дерново-подзолистых почв Нечерноземной зоны РФ и их фитотоксичности чрезвычайно актуально.

Цель работы – изучение влияния антибиотиков ампициллина и тилозина на ферментативную активность слабокультуренной дерново-подзолистой почвы методом лабораторного моделирования и на их фитотоксичность для культурных растений на ранних стадиях онтогенеза методом биотестирования.

Объекты и методы исследования

Для исследования использована дерново-подзолистая супесчаная слабокультуренная почва Меленковского района Владимирской области.

Агрохимические показатели почвы приведены в таблице.

Агрохимические показатели почвы / Agrochemical indicators

	Показатели Indicators	Значения показателей Values of indicators	Методика определения Method of determination
1	Кислотность, рН _{КCl} Acidity, рН _{КCl}	5,6±0,2	ГОСТ 26483-85 GOST 26483-85
2	P ₂ O ₅ , мг/кг P ₂ O ₅ , mg/kg	171±34,2	ГОСТ Р 54650-2011 GOST R 54650-2011
3	K ₂ O, мг/кг K ₂ O, mg/kg	119±17,85	ГОСТ Р 54650-2011 GOST R 54650-2011
4	Органическое вещество, % Organic matter, %	1,98±0,4	ГОСТ 26213-91 GOST 26213-91
5	N минеральный, мг/кг N mineral, mg/kg	12±2,4	ГОСТ 26951-86 GOST 26951-86

Как следует из таблицы, анализируемая почва бедна минеральными соединениями азота и гумусом, следовательно, отличается малой устойчивостью к воздействию различных поллютантов [16].

В работе использованы аптечные препараты ампициллин и тилозин. Ампициллин – полусинтетический бактерицидный антибиотик группы пенициллинов широкого спектра действия. Тилозин – антибиотик группы макролидов, продуцируемый *Streptomyces fradiae*, широко применяется в животноводстве как в лечебно-профилактических целях, так и в качестве стимулятора роста молодняка [7].

Отбор проб почвы проводили в соответствии с рекомендациями [19].

В исследованиях изучались ферментативная активность каталазы, уреазы и целлюлазы. Антибиотики вводили в пробы почв в количествах, соответствующих 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 мг/кг почвы. Каталазную активность определяли по количеству пероксида водорода, неразложившегося при взаимодействии с почвой, титрованием перманганатом калия [21]. Уреазную активность оценивали по количеству аммиака, выделившегося при разложении мочевины, содержащейся в почве, под действием фермента уреазы. Количество выделившегося аммиака определяли фотоколориметрически по окраске комплекса, образовавшегося при взаимодействии с реактивом Несслера [21]. Целлюлозолитическую активность устанавливали аппликационным методом [21]. Контролем во всех опытах служила почва, не содержащая антибиотики (нулевая точка в рисунках). Опыты проводили в трёхкратной повторности. В исходной почве каталазная активность составляла $0,245 \pm 0,003 \text{ см}^3 0,1 \text{ М KMnO}_4 / (\text{г} \cdot 20 \text{ мин})$, что соответствует $1,23 \text{ см}^3 \text{ O}_2 / \text{мин}$ (бедная), уреазная

активность – $0,372 \pm 0,004 \text{ мг NH}_3 / (10 \text{ г} \cdot \text{сут})$ (очень бедная), целлюлозолитическая активность – $62,27 \pm 1,36\%$ (высокая) [22, 23].

Фитотоксичность антибиотиков для культурных растений оценивали методом биотестирования. В качестве тест-объектов использовали семена редиса (*Raphanus sativus* L. var. *sativus*) сорт Розово-красный с белым кончиком (среднеранний) и пшеницы (*Triticum aestivum* L.) мягкой озимой сорта Мера. В качестве тест-параметров определяли всхожесть семян, длину корня и высоту побегов. Каждый опыт проводили в трёх повторностях. В чашку Петри на фильтровальную бумагу помещали по 50 семян тест-объекта. Семена обрабатывали водными растворами антибиотиков в концентрациях 200, 300, 400, 500, 600, 700 мг/дм³ и выдерживали в термостате при 26 °С в течение 96 часов.

Результаты и обсуждение

Установлено, что в интервале концентраций 50–600 мг/кг почвы по ингибированию активности каталазы антибиотики располагаются в ряд: ампициллин > ампициллин + тилозин > тилозин. Таким образом, тилозин при совместном воздействии незначительно снижает токсический эффект ампициллина. Однако, во всём диапазоне концентраций антибиотиков каталазная активность изменяется незначительно, что возможно, связано с появлением антибиотикорезистентности в диапазоне концентраций 100–600 мг/кг (рис. 1).

При всех концентрациях антибиотиков в наименьшей степени ингибирует активность уреазы ампициллин, в наибольшей – тилозин. IC₅₀ ампициллина при индивидуальном воздействии на активность уреазы равна 400 мг/кг почвы. При индивидуальном

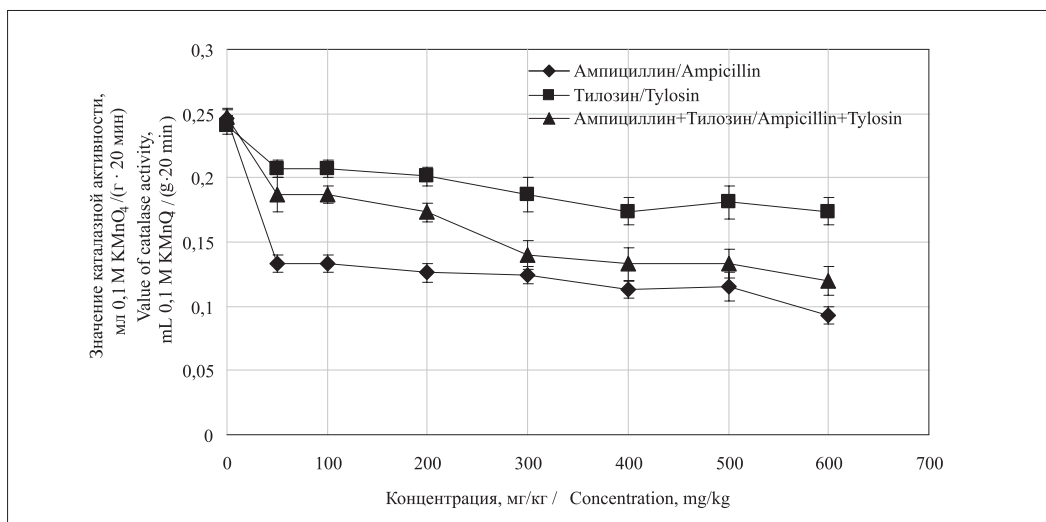


Рис. 1. Зависимость каталазной активности от концентрации антибиотиков в почве
 Fig. 1. Dependence of catalase activity on the concentration of antibiotics in the soil

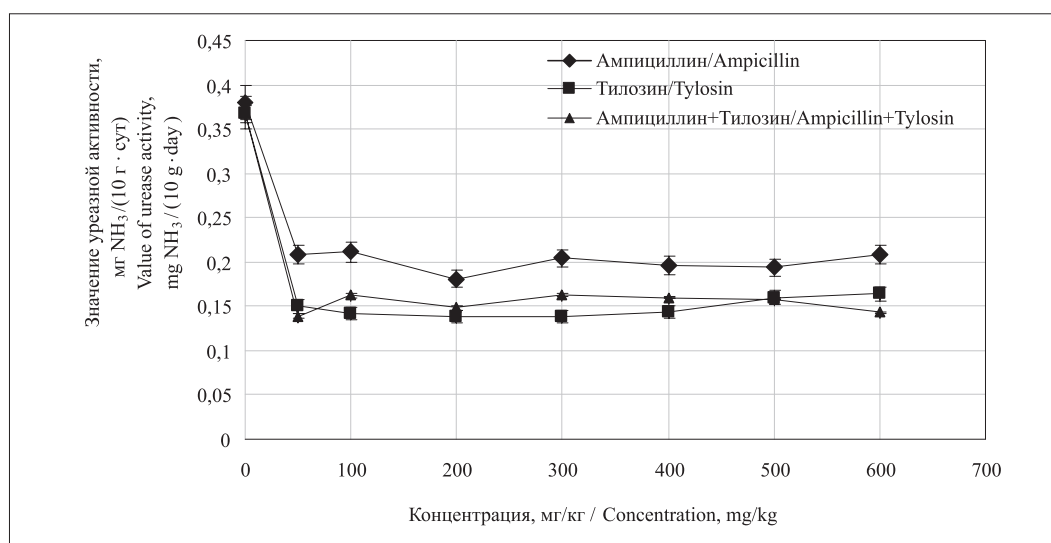


Рис. 2. Зависимость уреазной активности от концентрации антибиотиков в почве
 Fig. 2. Dependence of urease activity on the concentration of antibiotics in the soil

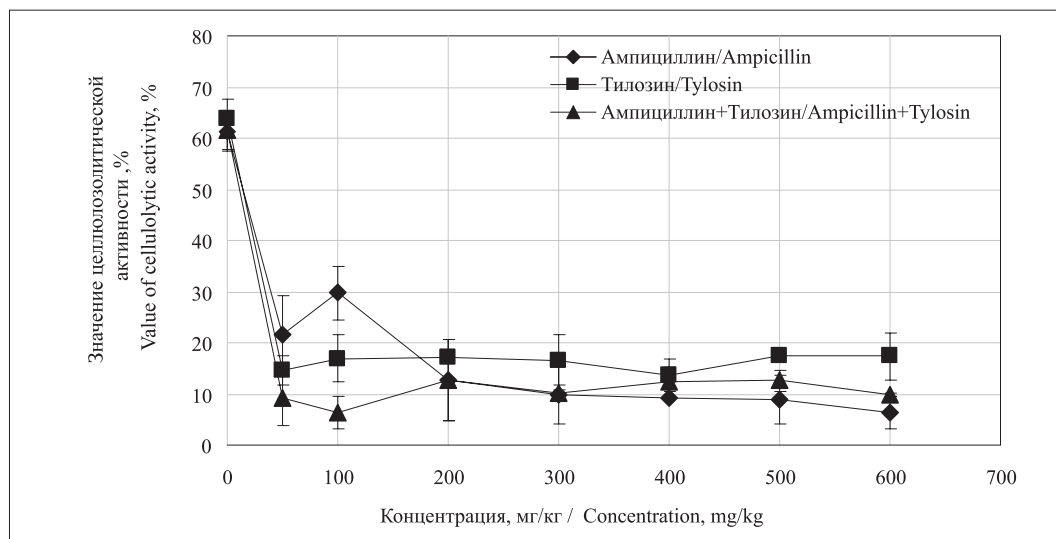


Рис. 3. Зависимость целлюлозолитической активности от концентрации антибиотиков в почве
 Fig. 3. Dependence of cellulolytic activity on the concentration of antibiotics in the soil

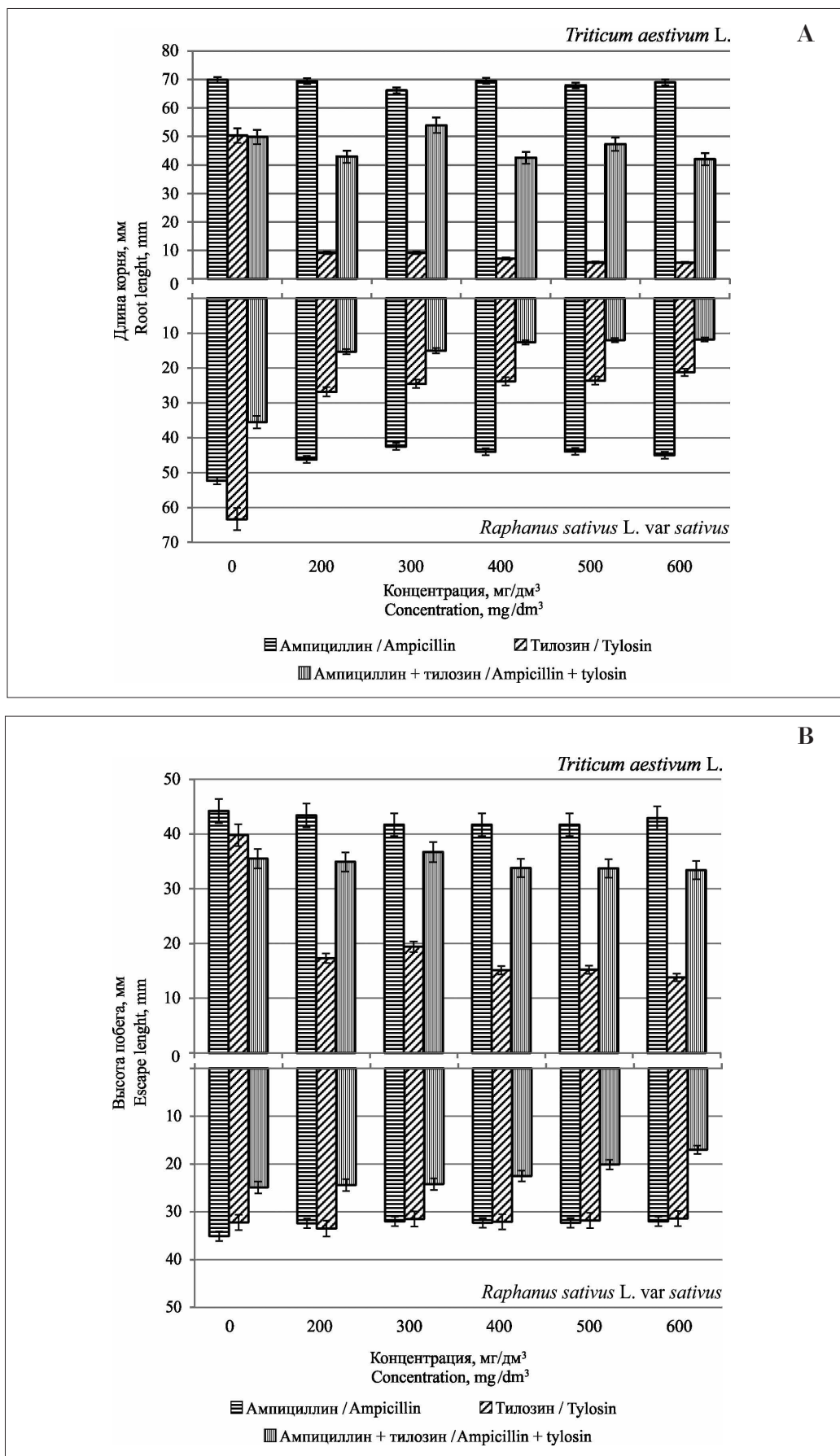


Рис. 4. Зависимость длины корней (А) и высоты побега (В) от концентрации антибиотиков
 Fig. 4. Dependence of root length (A) and length of the shoot (B) on antibiotic concentration

воздействии тилозина и его комбинированном воздействии с ампициллином активность уреазы во всём диапазоне концентраций снижается на 58–63% (рис. 2).

В интервале концентраций антибиотиков 200–600 мг/кг почвы по степени токсичности для целлюлазы антибиотики расположились в ряд: ампициллин > ампициллин + тилозин > тилозин. При индивидуальном воздействии тилозина на целлюлазу в концентрации 50 мг/кг почвы её активность резко снижается на 62% для ампициллина, 77% для тилозина и на 85% при их комбинированном воздействии (рис. 3).

Таким образом, каталаза наиболее чувствительна к ампициллину, уреазы – к тилозину, а целлюлаза, при концентрациях 50–100 мг/кг почвы – к смеси ампициллина и тилозина, при концентрациях 200–600 мг/кг почвы – к ампициллину. Следовательно, эффекты ингибирования целлюлазы зависят не только от вида антибиотиков, но и от их концентрации.

При изучении фитотоксичности ампициллина и тилозина при индивидуальном и комбинированном воздействии установлено, что во всём интервале концентраций наибольшее ингибирование роста корней у *T. aestivum* происходит при воздействии тилозина, а у *R. sativus* var. *sativus* – при комбинированном воздействии тилозина и ампициллина (рис. 4А).

Ингибирование роста побегов как при индивидуальном, так и при комбинированном воздействии антибиотиков значительно меньше, чем ингибирование роста корней. Наиболее сильное снижение роста побега происходит при индивидуальном воздействии тилозина для пшеницы, рост побегов редиса изменяется незначительно (рис. 4В).

Результаты показывают, что пшеница является более чувствительным тест-организмом для исследования воздействия изученных антибиотиков.

Заключение

Впервые проведена оценка влияния антибиотиков тилозина и ампициллина на каталазную, целлюлазную и уреазную активность слабокультуренной дерново-подзолистой почвы. Показано, что использованная почва бедна по содержанию каталазной, очень бедна по содержанию уреазной, однако обладает высокой целлюлазной активностью. Изученные антибиотики, как при индивидуальном, так и при комбинированном воздействии подавляют

активность ферментов. Эффекты токсического воздействия исследованных антибиотиков на активность ферментов зависят не только от вида антибиотика, но и от их концентрации. Исследованные антибиотики при всех концентрациях как при индивидуальном, так и при комбинированном воздействии, наиболее опасны для целлюлазы. При больших концентрациях антибиотиков чувствительность ферментов к ним снижается.

При исследовании фитотоксичности тилозина и ампициллина установлено, что наиболее чувствительным тест-параметром является длина корня, а тест-организмом – пшеница мягкая. Наибольшее ингибирование роста корней и побегов у *T. aestivum* происходит при индивидуальном действии тилозина, а у *R. sativus* var. *sativus* при комбинированном действии этих антибиотиков. В целом, сельскохозяйственные растения на начальных этапах развития более устойчивы к антибиотикам, чем исследованные почвенные ферменты.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ проект № 19-05-00363 А.

References

1. Hirsch R., Ternes T., Haberer K., Kratz K.-L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment // *Sci. Total. Environ.* 1999. V. 225. P. 109–118. doi: 10.1016/S0048-9697(98)00337-4
2. Kim S.-C., Carlson K. Occurrence of ionophore antibiotics in water and sediments of a mixed-landscape watershed // *Water Res.* 2006. V. 40. P. 2549–2560. doi: 10.1016/j.watres.2006.04.036
3. Ternes T., Joss A. Human pharmaceuticals, hormones and fragrances: The challenge of micropollutants in urban water management. London: IWA Publishing, 2007. 468 p. doi: 10.2166/9781780402468
4. Nikolaou A., Meric S., Fatta D. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments // *Anal. Bioanal. Chem.* 2007. V. 387. P. 1225–1234. doi: 10.1007/s00216-006-1035-8
5. Underwood J.C., Harvey R.W., Metge D.W., Repert D.A., Baumgartner L.K., Smith R.L., Roane T.M., Barber L.B. Effects of the antimicrobial sulfamethoxazole on groundwater bacterial enrichment // *Environ. Sci. Technol.* 2011. V. 45. P. 3096–3101. doi: 10.1021/es103605e
6. Zhou L.-J., Ying G.-G., Zhao J.-L., Yang J.-F., Wang L., Yang B., Liu S. 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. doi: 10.1016/j.envpol.2011.03.034

7. Egorov N.S. Fundamentals of the study of antibiotics. Moskva: Izd-vo MGU, 2004. 528 p. (in Russian).
8. Hohrin N.S. Feeding farm animals. Moskva: Kolos S, 2004. 692 p. (in Russian).
9. Yang J.-F., Ying G.-G., Zhao J.-L., Tao R., Su H.-C., Liu Y.-S. Spatial and seasonal distribution of selected antibiotics in surface waters of the Pearl Rivers, China // *Journal of Environmental Science and Health*. 2011. V. 46. P. 272–280. doi: 10.1080/03601234.2011.540540
10. 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. doi: 10.1007/s002440010197
11. Kemper N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment a review // *Ecol. Indicators*. 2008. V. 8. P. 1–13. doi: 10.1016/j.ecolind.2007.06.002
12. Kreuzig R., Kullmer C., Matthies B., Dieckmann H. Fate and behaviour of pharmaceutical residues in soils // *Fresenius Environ. Bull.* 2003. V. 12. P. 550–558.
13. Akimenko Y.V., Kazeev K.Sh., Kolesnikov S.I. Influence of pollution by antibiotics on the biological properties of ordinary chernozem: monograph. Rostov-na-Donu: Izd-vo Uznogo federalnogo un-ta, 2015. 153 p. (in Russian).
14. Akimenko Yu.V., Kazeev K.Sh., Kolesnikov S.I. Change of biochemical properties of the chernozem ordinary at pollution by biocides // *Agrochimiya*. 2015. No. 3. P. 81–87 (in Russian).
15. Akimenko Yu.V., Kazeev K.Sh., Kolesnikov S.I., Minnikova T.V. Estimation the soil ecological functions sustainability to antibiotic pollution // *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk*. 2017. No. 2. P. 207–210 (in Russian).
16. Akimenko Yu.V., Kazeev K.Sh., Kolesnikov S.I. The impact of antibiotics (benzylpenicillin, and nystatin) on the biological properties of ordinary chernozems // *Eurasian Soil Science*. 2014. V. 47. No. 9. P. 910–916. doi: 10.1134/S1064229314070023
17. Zvyagintsev D.G. Soil and microorganisms. Moskva: Izd-vo Moskovskogo un-ta, 1987. 256 p. (in Russian).
18. Chen W., Liu W., Pan N., Jiao W., Wang M. Oxytetracycline on functions and structure of soil microbial community // *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 2013. V. 13. P. 967–975. doi: 10.4067/S0718-95162013005000076
19. Shoba S.A., Alyabina I.O., Kolesnikova V.M., Molchanov E.N., Rozhkov V.A., Stolbovoy V.S., Urusevskaya I.S., Shermet B.V., Konyushkov D.E. Soil resources of Russia. Soil-geographical database. Moskva: GEOS, 2010. 128 p. (in Russian).
20. GOST 17.4.4.02-84. Protection of nature. The soil. Methods of sampling and sample preparation for chemical, bacteriological, helminthological analysis. Moskva: Standardinform, 2008. 8 p. (in Russian).
21. Khaziev F.Kh. Methods of soil enzymology. Moskva: Nauka, 2005. 252 p. (in Russian).
22. Zvyagintsev D.G. Biological activity of soils and some scales for its evaluation // *Soil Science*. 1978. No. 6. P. 48–54.
23. Titova V.I., Kozlov A.V. Methods for assessing the functioning of soil microbiocenosis involved in the transformation of organic matter: a scientific and methodological guide. Nizhny Novgorod: Nizhegorodskaya s.-h. akademiya, 2012. 64 p.