

Оригинальная статья/ Original article
УДК 631.463
DOI: 10.18470/1992-1098-2020-4-52-62

Влияние антибиотиков на целлюлозолитическую и нитрифицирующую активности серой лесной почвы

Татьяна А. Трифонова^{1,2}, Анастасия Г. Космачева², Светлана М. Чеснокова²

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Владимирский государственный университет им. А.Г. и Н.Г. Столетовых, Владимир, Россия

Контактное лицо

Татьяна А. Трифонова, доктор биологических наук, профессор факультета Почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова, заведующий кафедрой биологии и экологии, Заслуженный деятель науки РФ, Владимирский государственный университет им. А.Г. и Н.Г. Столетовых; 119991 Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12.
Тел. +79107712442
Email tatrifon@mail.ru
ORCID <https://orcid.org/0000-0002-1628-9430>

Формат цитирования

Трифонова Т.А., Космачева А.Г., Чеснокова С.М. Влияние антибиотиков на целлюлозолитическую и нитрифицирующую активности серой лесной почвы // Юг России: экология, развитие. 2020. Т.15, N 4. С. 52-62. DOI: 10.18470/1992-1098-2020-4-52-62

Получена 6 июня 2020г.
Прошла рецензирование 15 июля 2020 г.
Принята 25 августа 2020 г.

Резюме

Цель. Исследование влияния антибиотиков разных групп: тилозина, окситетрациклина и бензилпенициллина на потенциальную нитрифицирующую и целлюлозолитическую активности серой лесной почвы методами модельных лабораторных исследований.

Материал и методы. Объект исследования – окультуренная серая лесная среднесуглинистая почва. Исследование осуществлялось путем проведения модельных лабораторных экспериментов. Анализируемые образцы инкубировались при 27°C в отсутствие освещения в течение 30 суток, затем определялась целлюлозолитическая активность (аппликационным методом) и нитрифицирующая активность (потенциометрическим методом). Был установлен таксономический состав бактериального сообщества исследуемой почвы на основании анализа ампликонных библиотек фрагментов рибосомальных оперонов методом высокопроизводительного секвенирования генов 16S рРНК.

Результаты. Наибольшее число нитрифицирующих организмов исследуемой почвы – археи семейства *Nitrososphaeraceae*, являющиеся автотрофными окислителями аммония. Наиболее устойчивой к воздействию использованных антибиотиков являлась целлюлозолитическая активность, которая подавлялась только при добавлении тилозина и его смеси с окситетрациклином. Нитрифицирующая активность почвы изменялась в зависимости от состава и концентрации вносимых препаратов, наибольшее ингибирующее воздействие оказал тилозин. Смеси антибиотиков незначительно усиливали процесс нитрификации при 50-100 мг/кг, и подавляли в диапазоне 150-700 мг/кг.

Выводы. Попадая в почву, исследуемые антибиотики способны как стимулировать, так и ингибировать ферментативные процессы. Наибольшее воздействие оказывают смеси антибиотиков в сравнении с их индивидуальным внесением. В среднесуглинистой серой лесной почве присутствие антибиотиков более опасно для нитрифицирующей активности.

Ключевые слова

Антибиотики, целлюлозолитическая активность, нитрифицирующая активность, серая лесная почва, почвенная микробиота.

Effect of antibiotics on the cellulolytic and nitrification activity of gray forest soil

Tatiana A. Trifonova^{1,2}, Anastasia G. Kosmacheva² and Svetlana M. Chesnokova²

¹M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

²Alexander and Nikolay Stoletov Vladimir State University, Vladimir, Russia

Principal contact

Tatiana A. Trifonova, Doctor of Biological Sciences, Professor, Faculty of Soil Science, Head, Department of Biology and Ecology, Alexander and Nikolay Stoletov Vladimir State University; 1 Leninskie Gory, Moscow, Russia 119991.

Тел. +79107712442

Email tatrifon@mail.ru

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-1628-9430>

How to cite this article

Trifonova T.A., Kosmacheva A.G., Chesnokova S.M. Effect of antibiotics on the cellulolytic and nitrification activity of gray forest soil. *South of Russia: ecology, development*. 2020, vol. 15, no. 4, pp. 52-62. (In Russian) DOI: 10.18470/1992-1098-2020-4-52-62

Received 6 June 2020

Revised 15 July 2020

Accepted 25 August 2020

Abstract

Aim. To investigate the effect of certain antibiotics - tylosin, oxytetracycline and benzylpenicillin - on the potential nitrifying and cellulolytic activity of gray forest soil using laboratory model research methods.

Material and Methods. The object of the research was agricultural gray forest medium loamy soil. The study was carried out by conducting laboratory model experiments. The analysed samples were incubated at 27°C and in the absence of illumination for 30 days and then subsequently analysed for cellulolytic activity (by the application method) and nitrification activity (by the potentiometric method). The taxonomic composition of the bacterial community of the studied soil was established based on analysis of amplicon libraries of fragments of ribosomal operons of 16S rRNA genes by the NGS method.

Results. The largest number of nitrification organisms in the soil studied were archaea of the family *Nitrososphaeraceae* which are autotrophic ammonium oxidants. Most resistant to the effects of the antibiotics used was cellulolytic activity which was suppressed only by the addition of tylosin and its admixture with oxytetracycline. The nitrification activity of the soil varied depending on the concentration and preparations applied, the greatest inhibitory effect being exerted by tylosin. Antibiotic mixtures slightly enhanced the nitrification process at 50-100 mg/kg and were suppressed in the range of 150-700 mg/kg.

Conclusion. Once in the soil, the antibiotics studied are capable of both stimulating and inhibiting enzymatic processes. Mixtures of antibiotics rather than their individual applications produce the greatest impact. In medium loamy gray forest soil the presence of antibiotics is more dangerous to nitrification activity.

Key Words

Antibiotics, cellulolytic activity, nitrification activity, grey forest soil, soil microbiota.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время среди фармацевтических препаратов, присутствующих в различных экосистемах в качестве поллютантов, значительное внимание уделяется антибиотикам. Они играют ключевую роль в борьбе с инфекционными заболеваниями людей и животных. Ветеринарные антибиотики используются для лечения и профилактики болезней, для стимулирования роста скота, птицы и аквакультуры. Большинство из них не полностью метаболизируются в организме людей и животных, поэтому до 90% выделяется с мочой и калом, попадая в воду и почву через муниципальные сточные воды, навоз животных, осадки сточных вод, которые часто используются для орошения и удобрения сельскохозяйственных земель [1-3]. При этом в навозе могут присутствовать как остатки антибиотиков, так и бактерии, устойчивые к ним. Гены, устойчивые к антибиотикам, обнаруживаются в сельскохозяйственных почвах даже через 40 лет после первого применения навоза [3]. Концентрации антибиотиков в наземных экосистемах, варьируются от нескольких нг/кг до сотен мг/кг: тетрациклины до 900 мг/кг, макролиды до 800 мг/кг [1-5]. Содержание антибиотиков в навозе, почвах, осадках сточных вод зависят от типа лекарственного средства, его метаболизма, продолжительности лечения и времени отбора проб относительно поступления препарата в среду. Наиболее часто используемыми антибиотиками являются тетрациклиновые, β -лактамы, сульфонамиды и макролиды, а наиболее часто встречающимися и имеющими наибольшие концентрации в навозе и почве: тетрациклины, фторхинолоны, сульфонамиды и макролид тилозин [1-3].

В связи с тем, что функцией антибиотиков является воздействие на микроорганизмы, попадая в окружающую среду, они также способны оказывать влияние на микробные сообщества экосистем, которые играют ключевую роль в фундаментальных экологических процессах. Опубликовано множество данных о влиянии антибиотиков на почвенные бактерии и грибы, и осуществляемые ими процессы. Было выявлено их воздействие, как на отдельные микробные популяции, так и на целые сообщества. Данные препараты способны влиять на обилие, функциональное, структурное и генетическое разнообразие почвенных микроорганизмов и их активность [2]. Воздействие антибиотиков на микробные сообщества экосистем может быть прямым – краткосрочным, и косвенным – долгосрочным. Краткосрочные воздействия связаны с бактерицидными и бактериостатическими функциями препаратов, приводящими к последующим исчезновениям некоторых микробных популяций и вызывающими сокращение микробного биоразнообразия. Они могут влиять на рост и активность ферментов бактериальных сообществ и, в конечном итоге, на экологические функции (производство биомассы и преобразование питательных веществ), что приводит к потере функциональной стабильности. Косвенное воздействие заключается в развитии мультирезистентных бактерий, устойчивых к антибиотикам, что может влиять на динамику и физиологию природных

микробных популяций и представлять угрозу для общественного здравоохранения [1].

Превращение веществ и энергии почвенных экосистем происходит благодаря действию ферментативных процессов, которые определяют её биологическую активность и необходимы для поддержания гомеостаза экосистемы и качества почвы. Почва является самой богатой системой по ферментативному пулу, поэтому исследование ферментативной активности широко используется в её диагностике, позволяя оценить плодородие, влияние антропогенных факторов, рекомендуется использовать и при экологическом мониторинге [6]. Изменение ферментативной активности служит важным показателем реакции микроорганизмов на стресс, вызванный антибиотиками в почве [2]. В практическом земледелии наиболее значимыми являются ферменты классов гидролаз и оксидоредуктаз, особенно энзиматические показатели, связанные с циклами основных биогенных элементов, таких как углерод, азот и фосфор [6]. При этом одним из важных факторов, ограничивающих целлюлозолитическую активность, является недостаток азота в формах, доступных микроорганизмам: бактерии наиболее активны в почвах, содержащих нитратный азот, а грибы и актиномицеты в большинстве случаев – аммонийный азот [7]. Таким образом, нитрифицирующая и целлюлозолитическая активности почвы – важные и взаимосвязанные процессы, и являются одними из наиболее значимых показателей состояния почвенной экосистемы.

В настоящее время мониторинг загрязнения антибиотиками почв сельскохозяйственных угодий в Российской Федерации не осуществляется. Также не проводится регулярная оценка их воздействия на свойства агроэкосистем. Опубликовано ряд исследований о влиянии антибиотиков на ферментативную активность чернозема обыкновенного, бурых лесных и темно-каштановых почв юга России [4; 5]. Однако данные о влиянии этих препаратов на биологическую активность других типов почв недостаточны. Ранее нами было проведено исследование влияния антибиотиков разных классов на целлюлозолитическую и уреазную активности дерново-подзолистой почвы, а также на каталазную активность дерново-подзолистой и серой лесной почв [8; 9].

Опубликован ряд исследований о влиянии различных групп антибиотиков на нитрифицирующую активность почв [2; 10-14]. Установлено, что воздействие низких доз ципрофлоксацина (1 мг/кг почвы), относящегося к группе фторхинолонов, усиливают скорость нитрификации, а высокие дозы (50 мг/кг) ингибируют её [10]. При добавлении сульфаниламидных антибиотиков [11-13] к почвам разных типов было отмечено ингибирование потенциальной скорости нитрификации, которое усиливается с увеличением их концентрации. При этом суглинистые почвы оказались более устойчивыми к их воздействию в сравнении с супесчаными [12]. При воздействии навоза, загрязненного амоксициллином на суглинистую и супесчаную почвы было установлено, что добавление малых доз антибиотика с

навозом существенно не изменило потенциальные скорости нитрификации по сравнению с обработками чистым навозом. Однако высокие дозы привели к значительному снижению потенциальных скоростей нитрификации в обеих почвах на девятый день инкубации в сравнении с добавлением чистого навоза [14]. Также установлено, что монензин и хлортетрациклин не влияли на процессы нитрификации в почве [13].

Воздействие 50 мг/кг и 200 мг/кг тетрациклина на кинетику нитрификации в смешанной микробной культуре снижало скорость образования нитратов [15]. Окситетрациклин ингибировал нитрификацию в активном иле, взятом из очистных сооружений, а тилозин стимулировал её. Также окситетрациклин подавлял рост чистой культуры нитрифицирующих бактерий *Nitrosomonas europaea*, а тилозин не оказал на них влияния [16]. Воздействие окситетрациклина на микробную активность и стабильность биопленки смешанной нитрифицирующей культуры сточных вод вызывало постепенное снижение нитрификации и частичное ингибирование окисляющих аммиак микроорганизмов, но не повлияло на нитритных окислителей [17].

Существуют данные исследования *in vitro* о влиянии антибиотиков амоксициллина, хлорамфеникола, эритромицина, рафициллина в концентрациях 100 и 500 мг/л на целлюлозолитические ферменты, выделенные из патогенных грибов *Fusarium oxysporum* и *Fusarium moniliforme*. Ни один из данных препаратов полностью не ингибировал целлюлазную активность у обоих тестируемых организмов. Однако амоксициллин, активнее подавлял целлюлозолитическую активность, чем другие анти-

биотики. Целлюлазная активность *F. moniliforme* была сравнительно менее чувствительной к антибиотикам при более высоких концентрациях [18].

В настоящее время не обнаружено опубликованных исследований, посвященных влиянию антибиотиков окситетрациклина, бензилпенициллина, тилозина на целлюлозолитическую и нитрифицирующую активности почв.

Целью данной работы являлось исследование влияния антибиотических препаратов разных групп: (тилозина, окситетрациклина, бензилпенициллина) на потенциальную нитрифицирующую и целлюлозолитическую активности серой лесной почвы методами модельных лабораторных исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объект исследования – серая лесная среднесуглинистая почва. Почвенные образцы отбирали по ГОСТ 17.4.4.02-84 с верхнего горизонта, в связи с наибольшей активностью ферментов, содержанием гумуса и воздействием агротехнических мероприятий на данную глубину, с сельскохозяйственного участка Суздальского района Владимирской области [19]. Серые лесные почвы занимают в регионе 220 тыс. га, что соответствует 14,3% от общей площади. При этом они составляют 33% пахотных земель области, дают 70% валовой сельскохозяйственной продукции. Аналогичные включения серых лесных почв в подзолистые свойственны для Владимирской, Ивановской, Ярославской областей, составляя 305 тыс. га пашен Верхневолжского региона [6]. В таблице 1 указаны агрохимические показатели исследуемой почвы.

Таблица 1. Агрохимические показатели исследуемой почвы

Table 1. Agrochemical indicators of the soil studied

Показатели Indicators	Единица измерения Unit of measurement	Значения показателей Values of indicators	Методика исследования Method of determination
Кислотность, pH _{KCl} Acidity, pH _{KCl}	ед. pH	6,78±0,2	ГОСТ 26483-85 GOST 26483-85
P ₂ O ₅ , подвижный P ₂ O ₅ , mobile	мг/100 г mg/100 g	24,2±4,84	ГОСТ Р 54650-2011 GOST R 54650-2011
K ₂ O, подвижный K ₂ O, mobile	мг/100 г mg/100 g	83,4±12,51	ГОСТ Р 54650-2011 GOST R 54650-2011
Органическое вещество Organic matter	%	3,99±0,60	ГОСТ 26213-91 GOST 26213-91
Азот аммонийный N ammonium	мг/кг mg/kg	4,8±0,72	ГОСТ 26489-85 GOST 26489-85
Азот нитратный N nitrates	мг/кг mg/kg	20,40±4,08	ГОСТ 26951-86 GOST 26951-86
Содержание физической глины Physical clay content	%	35,5±3,55	ГОСТ 12536-2014 GOST 12536-2014

Был установлен таксономический состав бактериального сообщества исследуемой почвы на основании анализа ампликонных библиотек фрагментов рибосомальных оперонов методом высокопроизводительного секвенирования генов 16S рРНК. Результаты получены с использованием оборудования

ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

Почва для определения нитрифицирующей активности обрабатывалась согласно общепринятой методике [20], инкубировалась при 27°C в климатической камере Sanyo MLR-351 при отсутствии освеще-

щения в течение 30 суток и анализировалась потенциометрическим методом, согласно ГОСТ 26951-86. Нитрифицирующая активность почвы оценивалась по содержанию нитрат-ионов после 30-дневной инкубации.

Для изучения актуальной целлюлозолитической активности широко используются аппликационные методы, как полевые, так и лабораторные, сущность которых основана на определении количества переработанного в процессе реакции субстрата в оптимальных условиях [6]. В ходе исследований целлюлозолитическую активность почвы устанавливали в лабораторных условиях модифицированным аппликационным методом Кристенсена [21]. Преимущество лабораторного метода состоит в возможности поддержания заданных оптимальных условий (температуры и влажности) для жизнедеятельности микроорганизмов. Для проведения эксперимента на дно каждой стерильной чашки Петри помещали кусок хлопчатобумажной ткани, который служил источником клетчатки, размером 3x4 см, предварительно выдержанный в сушильном шкафу при 105°C в течение 2 часов и взвешенный на аналитических весах с погрешностью 0,0001 г. Далее в каждую чашку Петри добавляли 5 г исследуемой почвы, увлажненной до 60% от полной влагоемкости и загрязненной антибиотиками в концентрациях, соответствующих 50-700 мг/кг почвы. В качестве контроля использовали почву без внесения антибиотиков. Чашки Петри взвешивали, инкубировали в климатической камере Саню MLR-351 при отсутствии освещения в течение 30 суток при температуре 27°C. Влажность поддерживали путем периодического взвешивания и доведения до исходной массы дистиллированной водой. По прошествии 30 суток остатки ткани извлекали из чашек Петри, очищали от почвы, высушивали при 105°C и взвешивали на аналитических весах. Показателем целлюлозолитической активности почвы служила разница в массе ткани (%), разложившейся за время опыта.

В работе использовались антибиотики разных групп: окситетрациклин (тетрациклиновый), тилозин (макролид), бензилпенициллин (β-лактамы). Исходные препараты антибиотиков окситетрациклина гидрохлорид и бензилпенициллина натриевая соль представляли собой порошки для приготовления инъекционного раствора, расфасованные в пенициллиновые склянки в количестве 1 г (1000000 ЕД). Тилозин – в лекарственной форме раствора для инъекций с концентрацией 200 мг/см³ действующего вещества. Исходные растворы антибиотиков с концентрацией 10 мг/см³ готовили путем разбавления исходных препаратов в дистиллированной воде. Исследуемые концентрации антибиотиков были выбраны на основании литературных данных [4].

Опыты по определению нитрифицирующей активности проводились в трех повторностях, целлюлозолитической – в четырех. Для статистической обработки результатов полученные данные были

проанализированы с использованием статистического пакета Statistica 7.0. Был проведен корреляционный анализ зависимости показателя ферментативной активности от концентрации антибиотика ($p < 0,05$), рассчитан коэффициент корреляции Пирсона. В качестве погрешности указаны значения стандартной ошибки эксперимента.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате анализа таксономического состава бактериального сообщества было установлено, что преобладающими оказались грамотрицательные бактерии типов *Proteobacteria* (23,7%), *Bacteroidetes* (14,2%), *Cyanobacteria* (13,8%). Из них наибольшее число нитрифицирующих организмов относятся к археям семейства *Nitrososphaeraceae* – 4,2%, являющиеся автотрофными окислителями аммония. Также было выявлено наличие автотрофных аммоний-окисляющих бактерий семейства *Nitrosomanadaceae* – 0,4%, и автотрофных нитрит-окисляющих бактерий рода *Nitrospira* – 0,4% (семейство *Nitrospiraceae*).

Величина целлюлозолитической активности контрольного образца почвы (без добавления антибиотика) составила $73,96\% \pm 2,67\%$.

Согласно полученным результатам, при индивидуальном воздействии бензилпенициллина и окситетрациклина не наблюдалось значительного влияния на целлюлозолитическую активность исследуемой почвы. Достоверная отрицательная корреляционная зависимость была установлена для тилозина. При концентрациях 100 мг/кг почвы и 200 мг/кг почвы он стимулирует процесс разложения целлюлозы на 0,8% и 1,38% соответственно. При концентрациях 50, 150, 300-700 мг/кг почвы – ингибирует на 2,34-6,89%, при этом наибольшее подавление целлюлозолитической активности наблюдается при максимальной концентрации антибиотика (рис. 1, табл. 2).

При комбинированном воздействии статистически значимые результаты получены только для смеси окситетрациклина и тилозина: при концентрации 50 мг/кг почвы целлюлозолитическая активность незначительно увеличивается относительно контроля, а в диапазоне 100-700 мг/кг почвы – уменьшается (рис. 2, табл. 2).

Нитрифицирующая активность исследуемой почвы без внесения антибиотиков (контроль) равнялась $942,33 \pm 41,13$ мг NO_3^- / кг почвы.

Было установлено, что эффекты воздействия антибиотиков на нитрифицирующую активность исследуемой почвы зависели от их свойств и концентраций, как при индивидуальном, так и при комбинированном воздействии (рис. 3, 4; табл. 2).

При индивидуальном воздействии окситетрациклина и бензилпенициллина статистически значимой зависимости не обнаружено. При добавлении тилозина происходило дозозависимое ингибирование нитрифицирующей активности почвы на всем диапазоне концентраций, максимальное снижение было отмечено при 600 мг/кг.

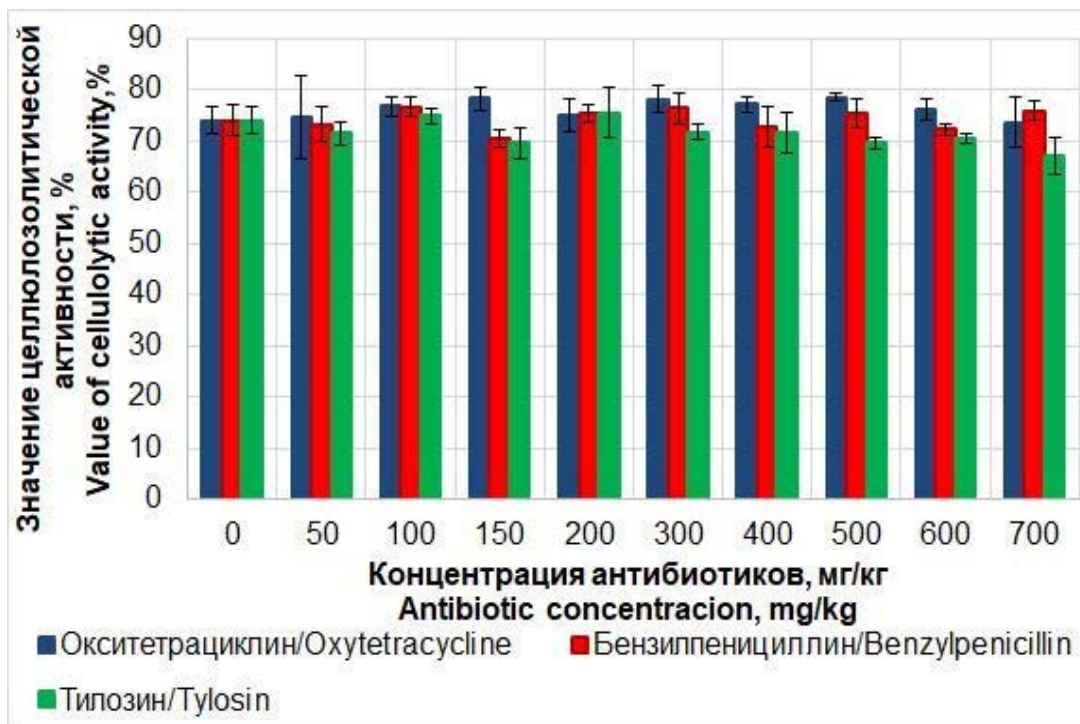


Рисунок 1. Зависимость целлюлозолитической активности почвы от концентрации антибиотиков при индивидуальном воздействии

Figure 1. Dependence of cellulolytic activity of soil on concentration of antibiotics with individual exposure

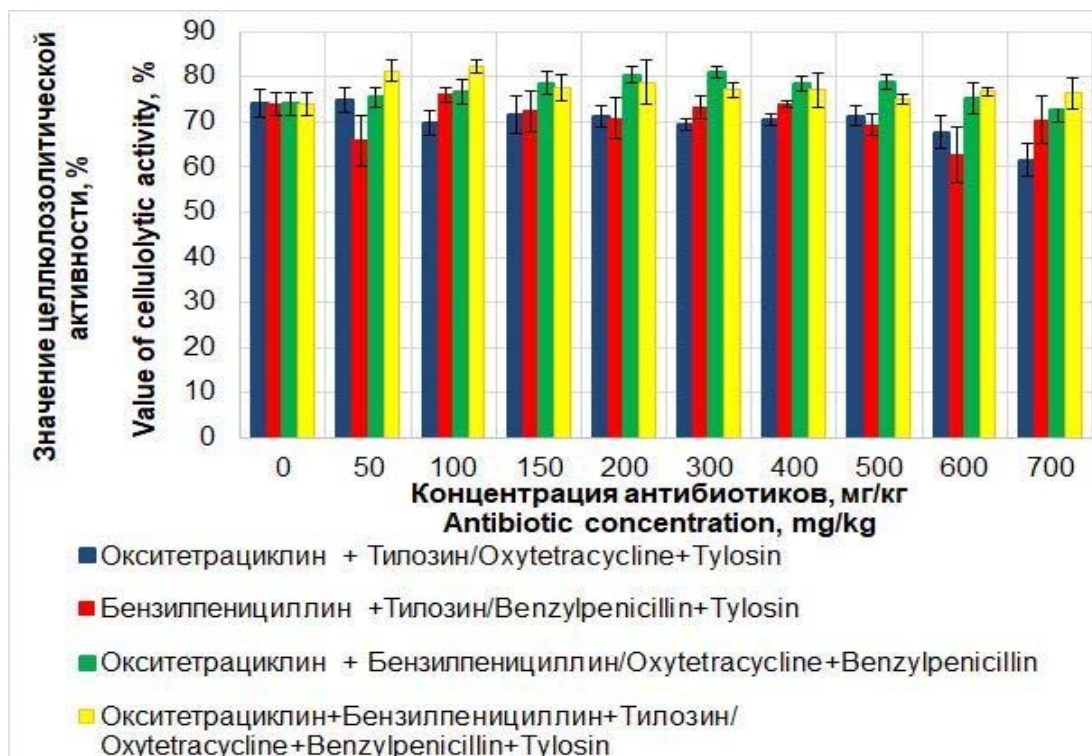


Рисунок 2. Зависимость целлюлозолитической активности почвы от концентрации антибиотиков при комбинированном воздействии

Figure 2. Dependence of cellulolytic activity of soil on concentration of antibiotics with combined exposure

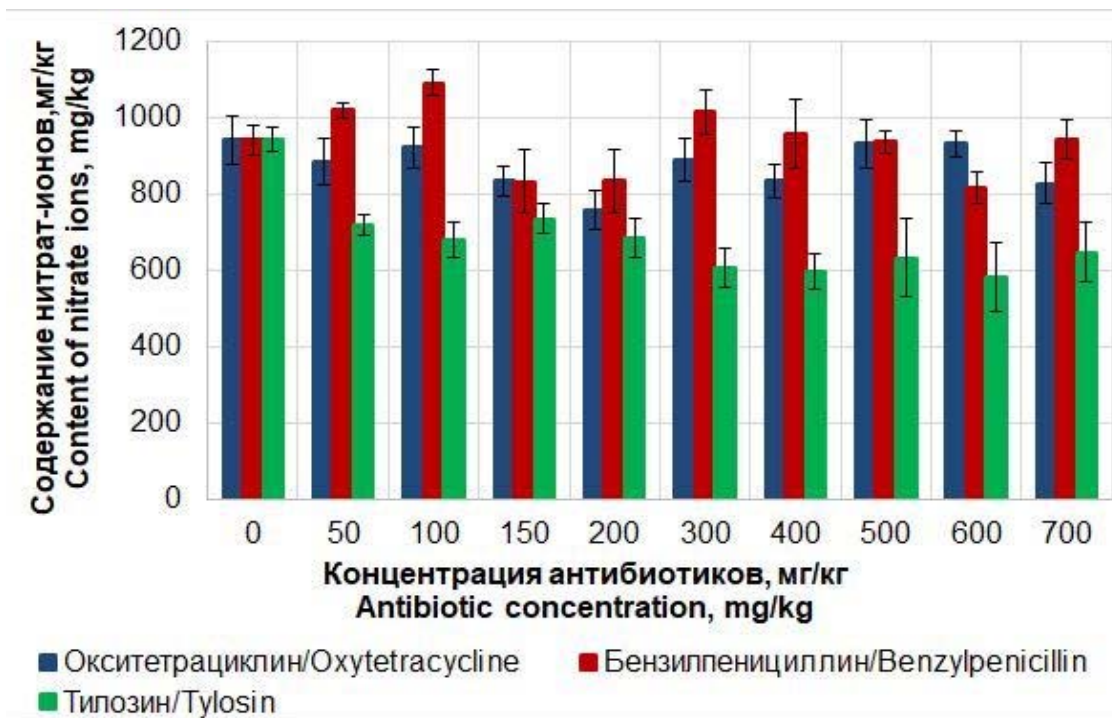


Рисунок 3. Зависимость нитрифицирующей активности почвы от концентрации антибиотиков при индивидуальном воздействии
Figure 3. Dependence of nitrification activity of soil on concentration of antibiotics with individual exposure

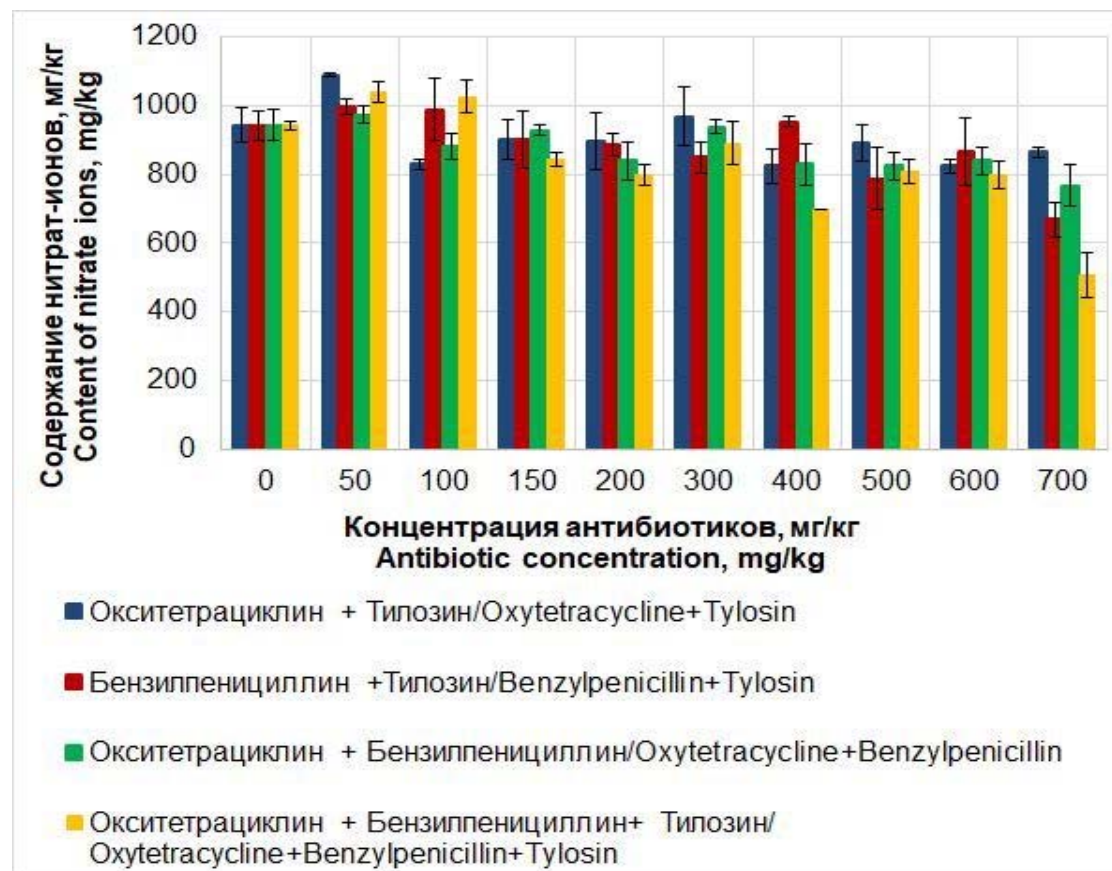


Рисунок 4. Зависимость нитрифицирующей активности почвы от концентрации антибиотиков при комбинированном воздействии
Figure 4. Dependence of nitrification activity of soil on concentration of antibiotics with combined exposure

При комбинированном воздействии антибиотиков было установлено дозозависимое ингибирование нитрифицирующей активности почвы при воздействии двойных смесей бензилпенициллина с окситетрациклином и тилозином и трехкомпонентной смеси. При воздействии окситетрациклина и тилозина на нитрифицирующую активность почвы достоверной корреляционной зависимости не было

обнаружено (табл. 2). Смесь трех антибиотиков оказалась при этом наиболее сильное влияние. При минимальных добавленных концентрациях антибиотика наблюдалось усиление нитрификации: 50 мг/кг – для смесей окситетрациклина и тилозина, окситетрациклина и бензилпенициллина, 50-100 мг/кг – для смеси бензилпенициллина и тилозина и трехкомпонентной смеси.

Таблица 2. Результаты корреляционного анализа

Table 2. Correlation analysis results

Антибиотики Antibiotics	Целлюлозолитическая активность Cellulolytic activity		Нитрифицирующая активность Nitrification activity	
	Коэффициент корреляции (r) Correlation coefficient (r)	Значение критерия значимости (p) Significance criteria value (p)	Коэффициент корреляции (r) Correlation coefficient (r)	Значение критерия значимости (p) Significance criteria value (p)
Бензилпенициллин / Benzylpenicillin	0,10	0,77	-0,3	0,4
Окситетрациклин / Oxytetracycline	0,05	0,9	-0,06	0,86
Тилозин / Tylosin	-0,71	0,02	-0,69	0,03
Окситетрациклин + Бензилпенициллин Oxytetracycline + Benzylpenicillin	-0,15	0,69	-0,82	0,00
Бензилпенициллин + Тилозин Benzylpenicillin + Tylosin	-0,39	0,26	-0,80	0,01
Окситетрациклин + Тилозин Oxytetracycline + Tylosin	-0,81	0,01	-0,52	0,13
Окситетрациклин + Бензилпенициллин + Тилозин Oxytetracycline + Benzylpenicillin + Tylosin	-0,39	0,26	-0,82	0,00

Установлено, что наиболее устойчивой к воздействию данных препаратов является целлюлозолитическая активность, которая изменяется лишь при добавлении тилозина и его смеси с окситетрациклином. Полученные данные можно объяснить большим вкладом грибов в разрушение клетчатки в почве, в отличие от процесса нитрификации, обусловленного функциями бактериальных сообществ. Грибы, в свою очередь, не входят в спектр действия используемых антибиотиков, поэтому целлюлозолитическая активность не подверглась значительным изменениям. Тем не менее, ингибирующее действие тилозина можно объяснить наличием в составе используемого препарата дополнительных веществ – бензилового спирта и пропандиола, которые обладают антисептическими свойствами [22; 23]. Результаты этого исследования согласуются с опубликованными ранее данными о влиянии тилозина и ампициллина на целлюлозолитическую активность дерново-подзолистой почвы при индивидуальном и комбинированном воздействии, в котором также было установлено ингибирующее влияние тилозина на процесс разрушения клетчатки в почве [8].

Установлено, что нитрифицирующая активность исследуемой почвы изменялась в зависимо-

сти от состава и концентрации вносимых антибиотиков. Тилозин подавлял ее на всем диапазоне концентраций, в то же время смеси антибиотиков были способны как незначительно усилить, так и подавлять процессы нитрификации. Наибольшее воздействие на нитрифицирующую активность оказала трехкомпонентная смесь при концентрации 700 мг/кг, демонстрируя эффект синергизма использованных препаратов. Аналогичное влияние было выявлено нами при исследовании тех же антибиотических препаратов на активность каталазы серой лесной почвы. Достоверная отрицательная корреляционная зависимость значения ферментативной активности от концентрации вносимых антибиотиков была установлена для трехкомпонентной смеси и комбинации бензилпенициллина с окситетрациклином. Ингибирование активности каталазы наблюдалось также при воздействии тилозина, однако корреляционной зависимости между его концентрациями и значениями активности фермента обнаружено не было [9].

Наибольшее влияние на почвенные ферментативные процессы в данном исследовании оказал тилозин, что, вероятно, связано с широким диапазоном его воздействия и наличием дополнительных веществ в используемом препарате.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые изучено влияние антибиотиков тилозина, окситетрациклина, бензилпенициллина в широком диапазоне концентраций (50–700 мг/кг почвы) на целлюлозолитическую и нитрифицирующую активности среднесуглинистой серой лесной почвы, как при индивидуальном воздействии, так и при комбинированном.

Установлено, что попадая в почву, исследуемые антибиотики способны оказывать как стимулирующее, так и ингибирующее влияние на ферментативные процессы, при этом наблюдается тенденция к усилению подавления ферментативной активности с повышением концентраций антибиотиков. Наибольшее воздействие оказывают смеси антибиотиков в сравнении с их индивидуальным добавлением, то есть проявляется эффект синергизма.

В среднесуглинистой серой лесной почве присутствие антибиотиков более опасно для нитрифицирующей активности, сильнее подверженной их воздействию. В свою очередь, изменение процессов нитрификации может привести к нарушению азотного цикла, в дальнейшем оказывая влияние на количество и качество сельскохозяйственной продукции. Недостаток нитратов в почве приводит к уменьшению продуктивности, снижая плодородие почв. А их избыток способствует проникновению в водоемы и источники питьевой воды, накоплению в растениях и передаче по пищевым цепям, вызывая риск заболеваний человека и животных, а также увеличение оксида азота (I), образуемого в процессе нитрификации, который впоследствии может вызывать разрушение озонового слоя атмосферы и усиливать парниковый эффект [24]. Известно также, что азот является элементом, лимитирующим урожайность культур севооборотов для серых лесных почв [6].

Разрушение целлюлозы является одним из основных процессов в цепи превращений органических веществ почвы и круговороте углерода, с ним связано образование гумусовых веществ почвы и формирование её структуры. В связи с этим снижение или увеличение пула целлюлозолитических микроорганизмов и их активности может привести к нарушению почвенного гомеостаза [6; 7].

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Grenni P., Ancona V., Caracciolo A.B. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review // *Microchemical Journal*. 2018. V. 136. P. 25-39. DOI: 10.1016/j.microc.2017.02.006
2. Суко́н М., Мрозик А., Piotrowska-Seget Z. Antibiotics in the Soil Environment—Degradation and Their Impact on Microbial Activity and Diversity // *Front Microbiol*. 2019. V. 10. 338 p. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00338
3. van de Vijver L., Verwer C., Smolders G., Hospers-Brands M., van Eekeren N. The cycle of veterinary antibiotics in the ecosystem. Louis Bolk Institute. 2016. 31 P.
4. Акименко Ю. В., Казеев К.Ш., Колесников С.И. Влияние загрязнения антибиотиками на биологические свойства чернозема обыкновенного:

монография. Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета, 2015. 154 с.

5. Акименко Ю.В., Чувараева О.В., Колесников С.И., Казеев К.Ш, Минникова Т.В. Оценка экологического состояния основных почв юга России в условиях загрязнения антибиотиками: монография. Ростов-на-Дону, Таганрог : Издательство Южного федерального университета, 2019. 114 с.
6. Зинченко М.К. Ферментативные процессы в серых лесных почвах Верхневолжья. Суздаль. И.: ПреСто. 2019. 140 с.
7. Наплекова Н.Н. Метаболиты аэробных целлюлозоразрушающих микроорганизмов и их роль в почвах / Под ред. Р. А. Цильке. Новосибирск: Новосибирский государственный аграрный университет, 2010. 228 с.
8. Трифонова Т.А., Чеснокова С.М., Космачева А.Г. Оценка влияния антибиотиков ампициллина и тилозина на ферментативную активность дерново-подзолистой почвы и их токсичности для культурных растений // *Теоретическая и прикладная экология*. 2020. N 2. С. 150-156. DOI: 10.25750/1995-4301-2020-2-150-156
9. Космачева А.Г. Оценка влияния антибиотиков бензилпенициллина, окситетрациклина и тилозина на каталазную активность дерново-подзолистой и серой лесной почв // *Грани познания*. 2019. N 6 (65). С. 79-83. URL: <http://grani.vspu.ru/jurnal/70> (дата обращения: 15.05.2020)
10. Cui H., Wang S-P., Fu J., Zhou Z-Q., Zhang N., Guo L. Influence of ciprofloxacin on microbial community structure and function in soils // *Biology and Fertility of Soils*. 2014. V. 50. P. 939-947. DOI: 10.1007/s00374-014-0914-y
11. Hammesfahr U., Kotzerke A., Lamshöft M., Wilke B-M., Kandeler E., Thiele-Bruhn S. Effects of sulfadiazine-contaminated fresh and stored manure on a soil microbial community // *European Journal of Soil Biology*. 2011. V. 47. Iss. 1. P. 61-68. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2010.10.004
12. Kotzerke A., Sharma S., Schauss K., Heuer H., Thiele-Bruhn S., Smalla K., Wilke B-M., Schloter M. Alterations in soil microbial activity and N-transformation processes due to sulfadiazine loads in pig-manure // *Environmental Pollution*. 2008. V. 153. Iss. 2. P. 315-322. DOI: 10.1016/j.envpol.2007.08.020
13. Toth J. D., Feng Y., Dou Z. Veterinary antibiotics at environmentally relevant concentrations inhibit soil iron reduction and nitrification // *Soil Biology & Biochemistry*. 2011. V. 43. Iss. 12. P. 2470-2472. DOI: 10.1016/j.soilbio.2011.09.004
14. Kotzerke A., Fulle M., Sharma S., Kleinedam K., Welzl G., Lamshöft M., Schloter M., Wilke B-M. Alterations in total microbial activity and nitrification rates in soil due to amoxicillin-spiked pig manure // *J. Plant Nutr. Soil Sci*. 2011. V. 174. Iss. 1. P. 56-64. DOI: 10.1002/jpln.200900210
15. Katipoglu-Yazan T., Pala-Ozkok I., Ubay-Cokgor E., Orhon D. Acute impact of erythromycin and tetracycline on the kinetics of nitrification and organic carbon removal in mixed microbial culture // *Bioresource Technology*. 2013. V. 144. P. 410-419. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.06.121

16. 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
17. Campos J.L., Garrido J.M., Mendez R., Lema J.M. Effect of Two Broad-Spectrum Antibiotics on Activity and Stability of Continuous Nitrifying System // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2001. V. 95. P. 1-10. DOI: 10.1385/ABAB:95:1:01
18. Mehta A., Chopra S., Mehta P. Antibiotic inhibition of pectolytic and cellulolytic enzyme activity in two *Fusarium* species // Мycopathologia. 1994. V. 124 (3). P. 185-188. DOI: 10.1007/BF01103736
19. Герасимова М.И., Красильников П.В. Мировая реферативная база почвенных ресурсов 2014. Международная система почвенной классификации для диагностики почв и создания легенд почвенных карт. Исправленная и дополненная версия 2015. Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. Рим, 2018. 216 с.
20. Казеев К.Ш., Колесников С.И., Вальков В.Ф. Биологическая диагностика и индикация почв: методология и методы исследований. Ростов н/Д.: Изд-во РГУ, 2003. 216 с.
21. Основные микробиологические и биохимические методы исследования почвы: методические рекомендации. Под ред. Возняковской Ю.М. Л.: ВНИИСХМ, 1987. 47 с.
22. Anderson B., de Peyster A., Gad S.C., Hakkinen P.J.B., Kamrin M., Locey B., Mehendale H.M., Pope C., Shugart L., Wexler P. Encyclopedia of Toxicology, Four-Volume Set: Encyclopedia of toxicology, Second Edition.. Academic Press, 2005. 2000 p.
23. Химическая энциклопедия: в 5 т. гл. ред. Н.С. Зефирова. М.: Большая Российская энциклопедия, Т. 4: Пол-Три. 1995. С. 103-104.
24. Умаров М.М., Кураков А.В., Степанов А.Л. Микробиологическая трансформация азота в почве. М.: ГЕОС, 2007. 138 с.
25. *zagryazneniya antibiotikami* [Assessment of the ecological state of the main soils of the south of Russia under conditions of antibiotic contamination]. Rostov-on-Don, Taganrog, Southern Federal University Publ., 2019, 114 p. (In Russian)
26. Zinchenko M.K. *Fermentativnye protsessy v serykh lesnykh pochvakh Verkhnevolzh'ya* [Enzymatic processes in the gray forest soils of the Upper Volga]. Suzdal, PreSsto Publ., 2019, 140 p. (In Russian)
27. Naplekova N.N. *Metabolity aerobnykh tsellyulozozrushayushchikh mikroorganizmov i ikh rol' v pochvakh* [Metabolite of the aerobic cellulolytic microorganisms and their function in a soils]. Novosibirsk, NSAU Publ., 2010, 228 p. (In Russian)
28. Trifonova T. A., Chesnokova S.M., Kosmacheva A.G. Evaluation of the effect of ampicillin and tylosin antibiotics on the enzymatic activity of sod-podzolic soil and their toxicity to cultivated plants. *Theoretical and Applied Ecology*, 2020, no. 2, pp. 150-156. (In Russian) DOI: 10.25750/1995-4301-2020-2-150-156
29. Kosmacheva A.G. [Assessment of the impact of the antibiotics «benzylpenicillin», «oxytetracycline» and «tylosin» on the catalase activity of weakly loamy sod-podzolic and grey forest soils]. *Grani poznaniya*, 2019, no. 6 (65). pp. 79-83. (In Russian) Available at: <http://grani.vspu.ru/jurnal/70> (accessed 15.05.2020)
30. Cui H., Wang S-P., Fu J., Zhou Z-Q., Zhang N., Guo L. Influence of ciprofloxacin on microbial community structure and function in soils. *Biology and Fertility of Soils*, 2014, vol. 50, pp. 939-947. DOI: 10.1007/s00374-014-0914-y
31. Hammesfahr U., Kotzerke A., Lamshöft M., Wilke B-M., Kandeler E., Thiele-Bruhn S. Effects of sulfadiazine-contaminated fresh and stored manure on a soil microbial community. *European Journal of Soil Biology*, 2011, vol. 47, iss. 1, pp. 61-68. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2010.10.004
32. Kotzerke A., Sharma S., Schauss K., Heuer H., Thiele-Bruhn S., Smalla K., Wilke B-M., Schloter M. Alterations in soil microbial activity and N-transformation processes due to sulfadiazine loads in pig-manure. *Environmental Pollution*, 2008, vol. 153, iss. 2, pp. 315-322. DOI: 10.1016/j.envpol.2007.08.020
33. Toth J. D., Feng Y., Dou Z. Veterinary antibiotics at environmentally relevant concentrations inhibit soil iron reduction and nitrification. *Soil Biology & Biochemistry*, 2011, vol. 43, iss. 12, pp. 2470-2472. DOI: 10.1016/j.soilbio.2011.09.004
34. Kotzerke A., Fulle M., Sharma S., Kleinedam K., Welzl G., Lamshöft M., Schloter M., Wilke B-M. Alterations in total microbial activity and nitrification rates in soil due to amoxicillin-spiked pig manure. *J. Plant Nutr. Soil Sci*, 2011, vol. 174, iss. 1, pp. 56-64. DOI: 10.1002/jpln.200900210
35. Katipoglu-Yazan T., Pala-Ozkok I., Ubay-Cokgor E., Orhon D. Acute impact of erythromycin and tetracycline on the kinetics of nitrification and organic carbon removal in mixed microbial culture. *Bioresource Technology*, 2013, vol. 144, pp. 410-419. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.06.121
36. Halling-Sørensen B. Inhibition of Aerobic Growth and Nitrification of Bacteria in Sewage Sludge by Anti-

bacterial Agents. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2001, vol. 40, pp. 451-460. DOI: 10.1007/s002440010197

17. Campos J.L., Garrido J.M., Mendez R., Lema J.M. Effect of Two Broad-Spectrum Antibiotics on Activity and Stability of Continuous Nitrifying System. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2001, vol. 95, pp. 1-10. DOI: 10.1385/ABAB:95:1:01

18. Mehta A., Chopra S., Mehta P. Antibiotic inhibition of pectolytic and cellulolytic enzyme activity in two *Fusarium* species. *Mycopathologia*, 1994, vol. 124 (3), pp. 185-188. DOI: 10.1007/BF01103736

19. Gerasimova M.I., Krasil'nikov P.V. *Mirovaya referativnaya baza pochvennykh resursov 2014. Mezhdunarodnaya sistema pochvennoi klassifikatsii dlya diagnostiki pochv i sozdaniya legend pochvennykh kart. Ispravlenaya i dopolnennaya versiya 2015* [IUSS Working Group WRB. 2015. World Reference Base for Soil Resources 2014, update 2015. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. World Soil Resources Reports No. 106]. FAO, Rome, 2018, 216 p.

20. Kazeev K., Kolesnikov S., Valkov V. *Biologicheskaya diagnostika i indikatsiya pochv: metodologiya i metody*

issledovaniy [Biological diagnostic and indication of soils: the methodology and methods of researches]. Rostov-on-Don, RSU Publ., 2003, 216 p. (In Russian)

21. Voznyakovskoi Yu.M., ed. *Osnovnye mikrobiologicheskie i biokhimicheskie metody issledovaniya pochvy: metodicheskie pekomentatsii* [Basic microbiological and biochemical methods of soil research: methodological recommendations]. Leningrad, VNIISKHM Publ., 1987, 47 p. (In Russian)

22. Anderson B., de Peyster A., Gad S.C., Hakkinen P.J.B., Kamrin M., Locey B., Mehendale H.M., Pope C., Shugart L., Wexler P. *Encyclopedia of Toxicology, Four-Volume Set: Encyclopedia of toxicology, Second Edition*. Academic Press, 2005. 2000 p. Zefirov N.S., ed. *Khimicheskaya entsiklopediya* [Chemical encyclopedia]. Moscow, Pol-Tri Publ., 1995, vol. 4, pp. 103-104. (In Russian)

23. Umarov M.M., Kurakov A.V., Stepanov A.L. *Mikrobiologicheskaya transformatsiya azota v pochve* [Microbial transformation of nitrogen in soil]. Moscow, GEOS Publ., 2007, 138 p. (In Russian)

КРИТЕРИИ АВТОРСТВА

Анастасия Г. Космачева занималась планированием и проведением экспериментальных исследований, проводила лабораторное моделирование загрязнения почвы и лабораторно-аналитические исследования изменения ферментативных показателей почвы, анализировала и интерпретировала данные результатов исследования. Татьяна А. Трифонова осуществляла общее руководство исследованием, корректуру рукописи до подачи в редакцию. Светлана М. Чеснокова разработала концепцию исследования. Все авторы в равной степени участвовали в написании рукописи, и несут ответственность при обнаружении плагиата, самоплагиата или других неэтических проблем.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Anastasia G. Kosmacheva was engaged in the planning and conducts of experimental studies, conducted laboratory modeling of soil pollution and laboratory and analytical studies of changes in the enzymatic parameters of the soil, analyzed and interpreted the research results data. Tatiana A. Trifonova carried out the general management of the research and proofread the manuscript before submitting it to the Editor. Svetlana M. Chesnokova developed the research concept. All authors participated equally in writing the manuscript and are equally responsible for plagiarism, self-plagiarism or other ethical transgressions.

NO CONFLICT OF INTEREST DECLARATION

The authors declare no conflict of interest.

ORCID

Татьяна А. Трифонова / Tatiana A. Trifonova <https://orcid.org/0000-0002-1628-9430>

Анастасия Г. Космачева / Anastasia G. Kosmacheva <https://orcid.org/0000-0002-1988-8615>

Светлана М. Чеснокова / Svetlana M. Chesnokova <https://orcid.org/0000-0001-5126-1786>