

Влияние антибиотиков (бензилпенициллина, фармазина, нистатина) на численность микроорганизмов в черноземе обыкновенном

Ю. В. АКИМЕНКО, К. Ш. КАЗЕЕВ, С. И. КОЛЕСНИКОВ

Южный федеральный университет
344006, Ростов-на-Дону, ул. Большая Садовая, 105
E-mail: akimenkojuliya@mail.ru

Статья поступила 14.06.2013

АННОТАЦИЯ

В модельных экспериментах изучено влияние фармацевтических антибиотиков (бензилпенициллина, фармазина, нистатина) разных доз (100 мг/кг, 300, 450, 600 мг/кг) на численность микроорганизмов чернозема обыкновенного. Все исследуемые дозы антибиотиков оказывают достоверное подавляющее воздействие на численность почвенных микроорганизмов. Между дозой антибиотиков и изменением численности микроорганизмов почв установлена линейная зависимость. По устойчивости к фармацевтическим антибиотикам исследуемые группы почвенных микроорганизмов образовали ряд (высокие концентрации): бактерии рода *Azotobacter* > амилотические бактерии > аммонифицирующие бактерии > микромицеты.

Ключевые слова: антибиотики, загрязнение, почвенные микроорганизмы, чернозем обыкновенный.

Тонны фармакологически активных веществ ежегодно используются человеком в медицине, сельском хозяйстве и животноводстве. Эксперименты показали, что примерно 90 % получаемых животными антибиотиков выводятся из организма и оказываются в навозе, большая часть которого используется для удобрений сельскохозяйственных угодий и тепличных хозяйств [Kreuzig et al., 2003]. Поэтому антибиотики попадают в почву в основном благодаря применению навоза и сточных вод на сельскохозяйственных землях в качестве удобрения. Большинство фармацевтических антибиотиков попадают в экосистемы либо в неизменном виде, либо в виде метаболитов, многие из которых все еще остаются биологически активными.

В отличие от пестицидов, используемых в сельском хозяйстве, антибиотики не рассматривались как потенциальные загрязнители до недавнего времени. В российской литературе практически нет исследований по влиянию фармакологических препаратов на биологические свойства почв. Лишь в некоторых исследованиях антибиотики использовались для селективного ингибирования с целью определения соотношения грибов и бактерий в биомассе разных типов почв [Сусьян и др., 2005; Ананьева и др., 2010]. На сегодняшний день научный интерес, с одной стороны, сосредоточился на изучении поведения антибиотиков и их судьбы в окружающей среде, с другой, на их влиянии на другие организмы. Некоторые антибиотики сохраняются долгое время в окружающей среде.

де, особенно в почве, а другие быстро деградируют [Rooklidge, 2004].

Различные антибиотики часто обнаруживаются в грунтовой, питьевой, сточных водах и сельскохозяйственных почвах [Zhou et al., 2011]. Например, фармацевтические антибиотики из класса тетрациклинов ежегодно обнаруживаются в почвах локально в концентрациях до 300–500 мг/кг, из класса сульфонамидов до 1000 мг/кг [Hamscher et al., 2002]. Антибиотики, широко распространенные в окружающей среде, затрагивают как водные, так и наземные организмы, изменяют активность и состав почвенных микроорганизмов [Underwood et al., 2011] и приводят к развитию у них бактериальной устойчивости [Su et al., 2012].

Кроме того, различные антибиотики образуются естественным путем в почвах, так как антибиоз – естественный механизм защиты у многих микроорганизмов почв, которые синтезируют антибиотики посредством вторичного метаболизма [Thomashow et al., 1997]. Однако концентрации и типы антибиотиков, попадающих в почвы и воды, значительно отличаются от естественного фона.

Проведено много исследований, посвященных использованию антибиотиков в растениеводстве и ветеринарии в качестве гербицидов, инсектицидов, стимуляторов роста растений, также антибиотики используют при откорме животных для повышения их продуктивности [Хохрин, 2004].

К настоящему времени проведено большое количество исследований для определения эффектов тяжелых металлов [Колесников и др., 1999, 2001в], нефти и нефтепродуктов [Колесников и др., 2011] радиоизлучений [Денисова и др., 2005] и других загрязнителей на почвенную микробиоту.

В отличие от тяжелых металлов, которые изменяют как биохимические, так и микробиологические показатели почв [Колесников и др., 1999, 2001в], антибиотики изменяют главным образом микробиосферу и, вероятно, по той же причине, последствия антибиотического загрязнения привлекли меньше внимания.

Влияние фармацевтических антибиотиков на микроорганизмы почв мало изучено, полученные ранее результаты являются про-

тиворечивыми. Например, сообщали, что некоторые антибиотики подавляют активность почвенных микроорганизмов, установили прямую зависимость влияния антибиотиков от их концентрации (чем выше доза, тем сильнее эффект) [Colinas et al., 1994]. В других же исследованиях говорится о положительном влиянии антибиотиков на рост и развитие микроорганизмов [Hamscher et al., 2002]. Загрязнение почвы сульфохлорридазином приводит к уменьшению численности почвенной микробиоты и дальнейшее увеличение концентрации данного антибиотика вызывает развитие устойчивости у микроорганизмов [Schmitt et al., 2004].

Цель настоящего исследования – изучение влияния различных фармацевтических антибиотиков на численность почвенных микроорганизмов чернозема обыкновенного.

Представленная работа является частью цикла научных исследований по изучению влияния биологически активных веществ на биологические показатели почв юга России.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлся чернозем обыкновенный карбонатный мощный слабогумусированный тяжелосуглинистый на желтобурых суглинках, отобранный на территории Ботанического сада Южного федерального университета. Данный тип почв выбрали в связи с тем, что черноземы составляют большую часть почвенного покрова Юга России и имеют особое значение в продовольственном обеспечении страны [Вальков и др., 2008].

Почву для модельных экспериментов отбирали из пахотного горизонта (0–25 см). Воздушно-сухие образцы почв обрабатывали растворами антибиотиков бензилпенициллина, фармазина и их комплексами с нистатином в различных концентрациях: 100 мг/кг, 300, 450, 600 мг/кг почвы. Данные концентрации выбрали исходя из литературных данных по встречаемости антибиотиков в окружающей среде [Hamscher et al., 2002], а также благодаря ранее проведенным исследованиям и получению достоверных влияний разных доз антибиотиков на биологические свойства почв [Акименко и др., 2013]. Все образцы инкубировали в течение 10 суток при

температуре 20–25 °С в темном месте, во избежание быстрого разложения антибиотиков, и оптимальном увлажнении (60 % от полевой влагоемкости). Контролем служила почва, не подвергавшаяся обработке антибиотиками.

Для исследования влияния антибиотиков на почвенную микробиоту были выбраны бактерицидный (бензилпенициллин), бактериостатический (фармазин) и фунгицидный (нистатин) антибиотики, которые широко используются в медицине и животноводстве. Бензилпенициллин – антибиотик группы биосинтетических пенициллинов. Оказывает бактерицидное действие за счёт ингибирования синтеза клеточной стенки микроорганизмов. Активен в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, анаэробных спорообразующих палочек. Фармазин – препарат, широко используемый в ветеринарии, содержащий в качестве активно действующего вещества тилозин – антибиотик из группы макролидов, активен в отношении большинства грамположительных и некоторых грамотрицательных бактерий. Нистатин – полиеновый противогрибковый антибиотик. Действует на патогенные грибы и особенно на дрожжеподобные грибы рода *Candida*, а также на аспергиллы, в отношении бактерий неактивен [Базы данных...].

Комплексное исследование микробиоценоза чернозема обыкновенного включало определение численности жизнеспособных микроорганизмов методом глубинного посева соответствующих разведений на твердые среды: азотфиксирующих бактерий (рода *Azotobacter*) – на среде Эшби (метод комочков обрастания), аммонифицирующих бактерий – на мясо-пептонном агаре, амилотических бактерий – на крахмало-аммиачном агаре, микромицетов – на подкисленной среде Чапека.

При получении аналитических данных, применялась разработанная и апробированная методология исследования биологической активности [Казеев, Колесников, 2012] с использованием общепринятых в почвоведении и биологии методов [Методы..., 1991]. Аналитические определения биологических свойств почвы выполняли в трехкратной повторности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Аммонифицирующие бактерии обеспечивают процессы деструкции, разлагая мертвую органику до простых веществ, и тем самым, играют ключевую роль в круговороте веществ [Гусев, Минеева, 2003]. Влияние антибиотиков на численность аммонифицирующих бактерий чернозема обыкновенного показано на рис. 1.

Все исследуемые дозы фармацевтических антибиотиков оказали достоверное подавляющее воздействие на численность аммонификаторов. Максимальный ингибирующий эффект наблюдался при концентрации антибиотиков 600 мг/кг, численность аммонификаторов снижается больше чем на 60 % ($p < 0,001$), такая тенденция наблюдается со всеми исследуемыми антибиотиками. Однако и концентрации препаратов 100 мг/кг приводят к снижению численности бактерий, наибольшее снижение наблюдается при действии комплекса фармазина и нистатина ($p < 0,001$). Из исследуемых антибиотиков бензилпенициллин оказал наиболее сильное подавляющее воздействие на аммонифицирующие бактерии во всех концентрациях. В комплексах антибактериальных антибиотиков с фунгицидным (нистатином) установлен меньший достоверный эффект воздействия на аммонификаторы (дозы 450, 600 мг/кг, $p < 0,001$), по-видимому, нистатин блокирует действие антибактериальных препаратов и снижает эффект их воздействия. Другие исследовате-

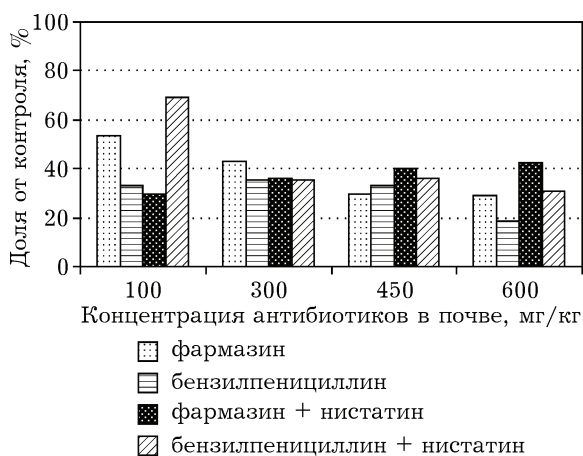


Рис. 1. Влияние антибиотиков на численность аммонифицирующих бактерий

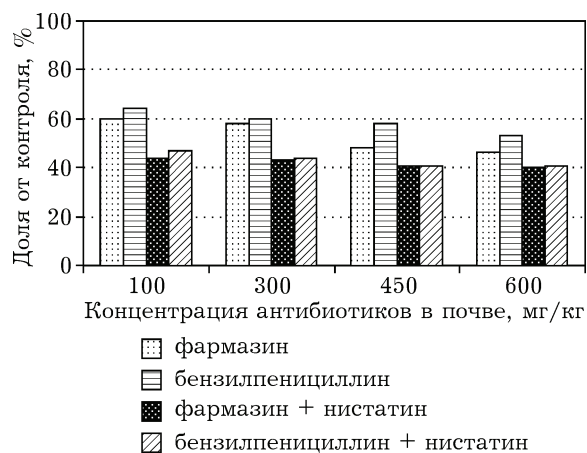


Рис. 2. Влияние антибиотиков на численность амилотических бактерий

ли [Ghosh et al., 2009] также отмечали снижение эффекта подавления в присутствии фунгицидных препаратов и проявлении синергистических эффектов смесей антибиотиков одинаково направленного действия [Cernohorska, Votava, 2008]. Причины таких эффектов все еще остаются не выясненными.

Амилотические бактерии составляют значительную долю от общего числа бактерий в почве. Основным отличительным признаком этой группы является способность разрушать крахмал [Гусев, Минеева, 2003]. В других исследованиях показано, что такие антибиотики, как сульфонамид [Thiele-Bruhn et al., 2004], тетрациклин, триметоприм [Wunder et al., 2013], оказывают подавляющее воздействие на амилотиков в разных концентрациях.

Особенности изменения численности амилотических бактерий при воздействии антибиотиков представлены на рис. 2. Комплексы антибиотиков в концентрациях 300 мг/кг, 450 и 600 мг/кг оказывают достоверно одинаковый и наибольший ингибирующий эффект, снижая численность амилотиков на 40–60 % ($p < 0,001$). Из антибактериальных антибиотиков наиболее эффективным в отношении амилотиков оказался фармазин, нежели бензилпенициллин. По сравнению с аммонификаторами (см. рис. 1), амилотические бактерии более устойчивы к действию исследуемых фармацевтических антибиотиков.

Влияние антибиотиков на численность микромицетов чернозема обыкновенного представлено на рис. 3.

Как и ожидалось, антибактериальные антибиотики (бензилпенициллин, фармазин) во всех исследуемых концентрациях не вызвали достоверных изменений численности микромицетов. Скорее всего, разница в численности по сравнению с контролем объясняется самим фактом стресса для микробиоты при внесении загрязнителей. Комплексы, содержащие фунгицидный препарат (нистатин) привели к снижению численности микромицетов во всех исследуемых дозах, наибольшее снижение наблюдалось при дозе 600 мг/кг для комплекса фармазина и нистатина на 86 % ($p < 0,001$). Ранее показано, что нистатин в концентрации 500 мг/л оказывает значительное подавляющее воздействие на микроскопические грибы, снижая их численность практически на 95 % от контроля [Акименко, 2012]. Таким образом, даже в комплексе с антибактериальными препаратами, нистатин не снижает своего подавляющего воздействия.

Проведено исследование влияния фармацевтических антибиотиков на бактерии рода *Azotobacter*. Во многих исследованиях показано, что род *Azotobacter* является высоко чувствительным к загрязнениям, и он предлагается в качестве тест-объекта при оценке состояния свойств почв при различных загрязнениях [Колесников и др., 1999; Денисова и др., 2005]. Однако для всех исследуемых антибиотиков, в концентрациях 100, 300, 450 мг/кг не было зафиксировано достоверных изменений, только лишь при концентрации 600 мг/кг наблюдается достоверное

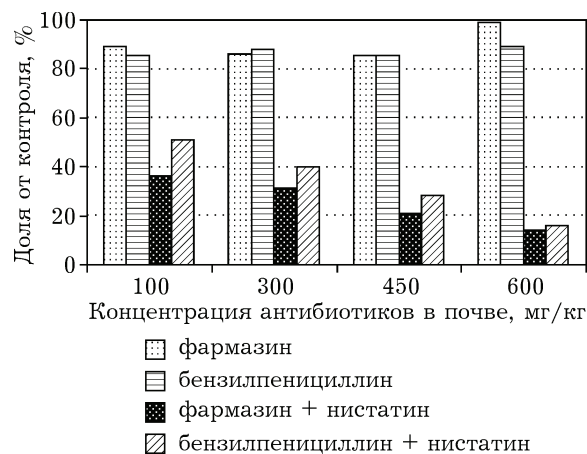


Рис. 3. Влияние антибиотиков на численность почвенных микромицетов

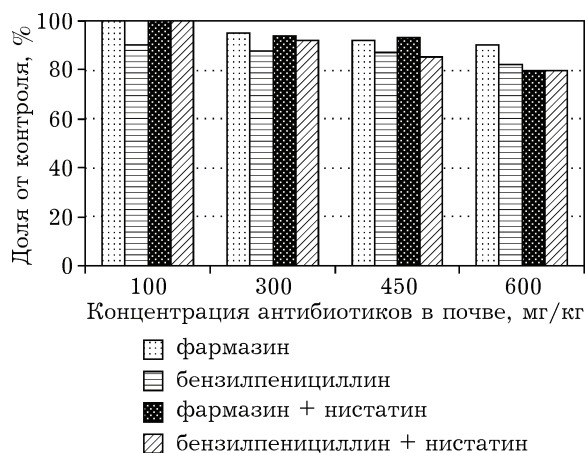


Рис. 4. Влияние антибиотиков на обилие бактерий рода *Azotobacter*

снижение обилия бактерий на 20 % ($p < 0,05$) от контроля для комплексов антибиотиков (рис. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все исследуемые дозы фармацевтических антибиотиков оказывают достоверное подавляющее воздействие на численность почвенных микроорганизмов.

Степень влияния антибиотиков определяется их природой, структурой и механизмом действия. Бактерицидные препараты (бензилпенициллин) наиболее эффективны в отношении аммонифицирующих бактерий, а бактериостатические (фармазин) – в отношении амилотических бактерий.

Между дозой антибиотиков и изменением численности микроорганизмов почв установлена линейная зависимость. Чем выше концентрации вносимых антибиотиков, тем сильнее их подавляющее воздействие.

По устойчивости к фармацевтическим антибиотикам исследуемые группы почвенных микроорганизмов образовали ряд (высокие концентрации): бактерии рода *Azotobacter* > амилотические бактерии > аммонифицирующие бактерии > микромицеты.

В комплексах антибактериальных антибиотиков с фунгицидным установлен меньший достоверный эффект воздействия на аммонификаторы, что нельзя сказать об амилотиках. Поэтому достоверное суждение о синергизме и антагонизме вносимых антибиотиков пока не представляется возможным. Для

объяснения механизмов такого взаимодействия требуются дополнительные исследования.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (гранты 07-04-00690-а, 07-04-10132-к, 08-04-10080-к), ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 годы (16.740.11.0528, 14.А18.21.0187, 14.А18.21.1269), государственной поддержке ведущей научной школы РФ (НШ-5316.2010.4, НШ-2449.2014.4) и в рамках реализации Программы развития Южного федерального университета до 2021 года.

ЛИТЕРАТУРА

- Акименко Ю. В. Изменение эколого-биологических свойств чернозема обыкновенного под действием антибиотиков // Почвы России: современное состояние, перспективы изучения и использования: материалы докл. VI съезда Об-ва почвоведов им. В. В. Докучаева. Всерос. с междунар. участием науч. конф. (Петрозаводск – Москва, 13–18 августа 2012 г.). Петрозаводск: Карел. науч. центр РАН, 2012. Кн 2. С. 309–311.
- Акименко Ю. В., Казеев К. Ш., Колесников С. И. Динамика ферментативной активности чернозема обыкновенного при загрязнении антибиотиками // Политематический сетевой электронный науч. журн. КубГАУ. 2013. № 85. С. 289–298.
- Ананьева Н. Д., Стольникова Е. В., Сусьян Е. А., Ходжаева А. К. Грибная и бактериальная микробная биомасса (селективное ингибирование) и продуцирование CO_2 и N_2O дерново-подзолистыми почвами постагрогенных биогеоценозов // Почвоведение. 2010. № 11. С. 1387–1393.
- Базы данных по лекарственным средствам. <http://drugreg.ru/Bases/>.
- Вальков В. Ф., Казеев К. Ш., Колесников С. И. Почвы Юга России. Ростов н/Д: Изд-во “Эверест”, 2008. 276 с.
- Гусев М. В. Микробиология: учебник для студ. биол. специальностей вузов / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. 4-е изд., стер. М.: Изд. центр “Академия”, 2003. 464 с.
- Денисова Т. В., Казеев К. Ш., Колесников С. И., Вальков В. Ф. Влияние гамма излучения на биологические свойства почв // Почвоведение. 2005. № 7. С. 877–881.
- Казеев К. Ш., Колесников С. И. Биодиагностика почв: методология и методы исследований. Ростов н/Д: Изд-во Южного фед. ун-та, 2012. 260 с.
- Колесников С. И., Казеев К. Ш., Вальков В. Ф. Влияние загрязнения тяжелыми металлами на микробную систему чернозема // Почвоведение. 1999. № 4. С. 505–511.
- Колесников С. И., Казеев К. Ш., Вальков В. Ф. Влияние загрязнения тяжелыми металлами на щелочно-кислотные и окислительно-восстановительные условия в черноземе обыкновенном // Агрохимия. 2001. № 9. С. 54–59.
- Колесников С. И., Спивакова Н. А., Везденева Л. С., Кузнецова Ю.С., Казеев К. Ш. Моделирование влияния химического загрязнения на биологические свойства гидроморфных солончаков зоны сухих сте-

- пей Юра России // Аридные экосистемы. 2011. Т. 17, № 2 (47). С. 18–22.
- Методы почвенной микробиологии и биохимии / под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ, 1991. 304 с.
- Сусьян Е. А., Ананьева Н. Д., Благодатская Е. В. Разделение грибного и бактериального субстрат-индуцированного дыхания с использованием антибиотиков в почвах разных экосистем // Микробиология. 2005. Т. 74, № 3. С. 394–400.
- Хохрин С. Н. Кормление сельскохозяйственных животных. М.: Колос, 2004. 692 с.
- Cernohorska L., Votava M. Antibiotic synergy against biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa*. *Folia Microbiol.* 2008. Vol. 53. P. 57–60.
- Colinas C., Ingham E., Molina R., Population responses of target and non-target forest soil-organisms to selected biocides. *Soil Biol. Biochem.* 1994. Vol. 26. P. 41–47.
- Wunder D. B., Tan D. T., LaPara T. M., Hozalski R. M. The effects of antibiotic cocktails at environmentally relevant concentrations on the community composition and acetate biodegradation kinetics of bacterial biofilms // *Chemosphere.* 2013. Vol. 90. P. 2261–2266.
- Ghosh G. C., Okuda T., Yamashita N. Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in Japan and their effects on bacterial ammonia oxidation // *Water Sci. Technol.* 2009. Vol. 59. P. 779–786.
- Hamscher G., Sczesny S., Hoper H., Nau H. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2002. Vol. 74. P. 1509–1518.
- Kreuzig R., Kullmer C., Matthies B., Holtge S., Dieckmann H. Fate and behaviour of pharmaceutical residues in soils // *Fresenius Environ. Bull.* 2003. Vol. 12. P. 550–558.
- Rooklidge S.J. Environmental antimicrobial contamination from terraccumulation and diffuse pollution pathways // *Sci. Total Environ.* 2004. Vol. 325. P. 1–13.
- Schmitt, H., van Beelen, P., Tolls, J., van Leeuwen, C.L. Pollution-induced community tolerance of soil microbial communities caused by the antibiotic sulfachloropyridazine // *Environ. Sci. Technol.* 2004. Vol. 38. P. 1148–1153.
- Su H.-C., Ying G.-G., Tao R., Zhang R.-Q., Zhao J.-L., Liu Y.-S. Class 1 and 2 integrons, sul resistance genes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from Dongjiang River, South China // *Environ Pollut.* 2012. Vol. 169. P. 42–9.
- Thiele-Bruhn S., Seibicke T., Schulten H.-R., Leinweber P. Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions // *J. Environ. Qual.* 2004. Vol. 33. P. 1331–1342.
- Thomashow L.S., Bonsall R.F., Weller D.M. Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ // *Manual of Environmental Microbiology* / ed. C. J. Hurst, G. R. Knudson, M. J. McInerney, L. D. Stetzenbach, M. V. Walter. Washington: ASM Press, 1997. P. 493–499.
- Underwood J. C., Harvey R. W., Metge D. W., Repert D. A., Baumgartner L. K., Smith R. L., et al. Effects of the antimicrobial sulfamethoxazole on groundwater bacterial enrichment // *Environ. Sci. Technol.* 2011. Vol. 45. P. 3096–101.
- Zhou L.-J., Ying G.-G., Zhao J.-L., Yang J.-F., Wang L., Yang B. et al. 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. Vol. 59. P. 1877–85.

Influence of Antibiotics (Benzylpenicillin, Pharmazin, Nystatin) on the Number of Microorganisms in the Ordinary Chernozem

Y. V. AKIMENKO, K. S. KAZEEV, S. I. KOLESNIKOV

Southern Federal University

344006, Rostov-na-Donu, Bol'shaya Sadovaya str., 105

E-mail: akimenkojuliya@mail.ru

Influence of different doses (100 mg/kg, 300 mg/kg, 450 mg/kg, 600 mg/kg) of pharmaceutical antibiotics (benzylpenicillin, pharmazin, nystatin) on the number of microorganisms of the chernozem was studied through model experiments. All studied doses of antibiotics have certain inhibitory effect on the number of soil microorganisms. Linear dependence between doses of antibiotics and changes in the number of soil microorganisms was established. As for resistance to pharmaceutical antibiotics the studied groups of soil microorganisms formed a row (high concentration): *Azotobacter* > amylolytic bacteria > ammonifying bacteria > micromycetes.

Key words: antibiotics, pollution, soil microorganisms, chernozem ordinary.