



## ЭКОЛОГИЯ

УДК 631.463

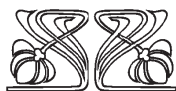
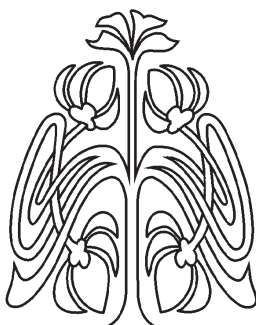
### Исследование влияния антибиотиков разных групп на нитрифицирующую активность дерново-подзолистой почвы методом лабораторного моделирования

А. Г. Космачева, С. М. Чеснокова, Т. А. Трифонова

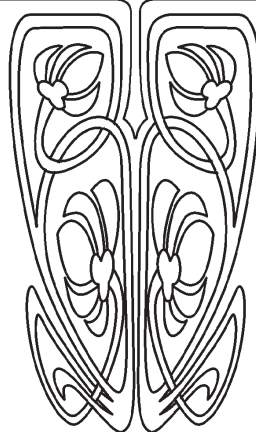
Космачева Анастасия Геворговна, аспирант кафедры биологии и экологии, Институт биологии и экологии, Владимирский государственный университет имени А. Г. и Н. Г. Столетовых, hijadelaluna@mail.ru

Чеснокова Светлана Михайловна, кандидат химических наук, доцент кафедры биологии и экологии, Институт биологии и экологии, Владимирский государственный университет имени А. Г. и Н. Г. Столетовых, chesnokova.chemist@mail.ru

Трифопова Татьяна Анатольевна, доктор биологических наук, профессор кафедры географии почв факультета почвоведения, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, заведующий кафедрой биологии и экологии Института биологии и экологии, Владимирский государственный университет имени А. Г. и Н. Г. Столетовых, tatrifon@mail.ru



НАУЧНЫЙ  
ОТДЕЛ



Увеличение количества лекарственных препаратов, в том числе антибиотических веществ, поступающих в окружающую среду, вызывает необходимость проведения исследования их влияния на функционирование экосистем. В глобальном круговороте веществ азотный цикл является одним из основных процессов. Важную роль при этом играет процесс нитрификации. Впервые изучено влияние антибиотиков разных групп – окситетрациклина, тилозина, бензилпенициллина – на нитрифицирующую активность дерново-подзолистой почвы при их индивидуальном и комбинированном воздействии методом лабораторного моделирования. В результате исследований установлено, что при индивидуальном влиянии данные препараты не оказали значительного воздействия. Однако смесь бензилпенициллина и тилозина стимулировала нитрифицирующую активность при 50 мг/кг почвы и ингибировала при 300–700 мг/кг. При воздействии смеси трех антибиотиков в диапазоне 50–300 мг/кг почвы процесс нитрификации усиливался и подавлялся при 400–700 мг/кг.

**Ключевые слова:** нитрифицирующая активность, дерново-подзолистая почва, антибиотики, индивидуальное и комбинированное воздействие.

Поступила в редакцию: 29.01.2020 / Принята: 08.04.2020 / Опубликовано: 31.08.2020

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution License (CC-BY 4.0)

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2020-20-3-352-358>

Антибиотики были обнаружены в почвах и водоемах в разных странах, при этом их экологическое воздействие все еще недостаточно изучено. В связи с тем что биогеохимическое функционирование экосистем в значительной степени зависит от микробной активности, особое значение имеет исследование влияния антибиотиков на деятельность микроорганизмов [1]. Микроорганизмы составляют 60–90% суммарной биомассы суши и выполняют такие экосистемные функции, как круговорот элементов и деградация загрязняю-



щих веществ. Трансформация азота – один из основных процессов в глобальном круговороте веществ. В цикле азота важным звеном является процесс нитрификации, состоящий из двух этапов: окисление аммония до нитрита и нитрита до нитрата [2].

В настоящее время опубликован ряд исследований о влиянии разных групп антибиотиков на нитрифицирующую активность почв [3–7].

Показано, что воздействие низких доз ципрофлоксацина (1 мг/кг почвы), относящегося к группе фторхинолонов, усиливает скорость нитрификации, а высокие дозы (50 мг/кг) ингибируют ее [3]. При добавлении сульфаниламидных антибиотиков – сульфадиазина [4, 5] и сульфадиметоксина [6] – к почвам разного типа было отмечено ингибирование потенциальной скорости нитрификации, которое усиливается с увеличением концентрации сульфадиазина. При этом суглинистые почвы оказались более устойчивыми к его воздействию в сравнении с супесчаными [5]. При воздействии навоза, загрязненного амоксициллином, на суглинистую и супесчаную почву было установлено, что добавление малых доз антибиотика с навозом существенно не изменило потенциальную скорость нитрификации по сравнению с обработками чистым навозом. Однако десятикратная доза привела к значительному снижению потенциальной скорости нитрификации в обеих почвах на девятый день инкубации в сравнении с добавлением чистого навоза. При этом потенциальная скорость нитрификации контрольных почв (без добавления навоза и антибиотиков) оставалась ниже, чем почв с добавками [7]. Хлортетрациклин и монензин не влияли на процессы нитрификации в почве [6].

Исследований о влиянии окситетрациклина, тилозина и бензилпенициллина на нитрифицирующую активность почв в данный момент не обнаружено. Однако воздействие тетрациклина с концентрациями 50 и 200 мг/кг на кинетику нитрификации в смешанной микробной культуре показало снижение скорости образования нитратов [8].

В ходе исследования по изучению влияния 11 антибактериальных агентов на скорость нитрификации в активном иле, взятом из очистных сооружений, было установлено, что окситетрациклин ингибировал нитрификацию, а тилозин стимулировал ее. Тест на ингибирование роста чистой культуры нитрифицирующих бактерий *Nitrosomonas europaea* показал, что окситетрациклин был одним из наиболее эффективных препаратов, а тилозин не оказал влияния на данные микроорганизмы [9].

При воздействии окситетрациклина на микробную активность и стабильность биопленки смешанной нитрифицирующей культуры сточных вод антибиотик вызывал постепенное снижение нитрификации, происходило частичное ингибирование окисляющих аммиак микроорганизмов, но не нитритных окислителей [10].

С одной стороны, недостаток в почве нитратов приводит к снижению продуктивности растительных организмов, что причиняет ущерб сельскохозяйственным угодьям, с другой – их избыток способствует проникновению нитратов в водоемы и источники питьевой воды, а также накоплению в растениях и передаче по пищевым цепям, вызывая риск заболеваний у человека и животных. Кроме того, существуют данные о том, что увеличение количества нитратов в почве приводит в дальнейшем к увеличению количества закиси азота, образуемого в процессе нитрификации, который впоследствии может вызывать разрушение озонового слоя атмосферы и усиливать парниковый эффект [2, 11].

Целью настоящей работы являлось исследование влияния антибиотиков разных групп на нитрифицирующую активность дерново-подзолистой почвы при их индивидуальном и комбинированном воздействии методом лабораторного моделирования.

#### Материалы и методы

Объект исследования – дерново-подзолистая легкосуглинистая почва с участка сельскохозяйственного назначения на территории Суздальского района Владимирской области. Почвенные образцы отбирали с верхнего слоя почвы (0–20 см) в соответствии с ГОСТ 17.4.4.02-84.

Агрохимические показатели почвы приведены в табл. 1.

Почва для определения нитрифицирующей активности обрабатывалась согласно общепринятой методике [12]. Для этого навеску почвы, просеянной через сито с отверстиями 2 мм, массой 100 г помещали в стерильную коническую колбу на 250 мл, увлажняли дистиллированной водой до 65% от общей влагоемкости, при этом антибиотики в образцы почв вводили в виде водных растворов в диапазоне концентраций, соответствующих 50–700 мг/кг почвы. В каждую навеску добавляли 0,1 г сульфата аммония и 0,2 г карбоната кальция, закрывали ватной пробкой и инкубировали в климатической камере Sanyo MLR-351 в течение 30 сут при постоянной температуре 27° С и отсутствии освещения. Влажность почвы поддерживали путем добавления дистиллированной воды до первоначального



Таблица 1 / Table 1

**Агрохимические показатели исследуемой почвы**  
**Agrochemical parameters of the studied soil**

	Показатель / Parameter	Значение показателей / Value of parameters	Методика исследования / Method of determination
1	Кислотность солевой вытяжки, $pH_{KCl}$ , ед. pH / Acidity, $pH_{KCl}$	$5,8 \pm 0,1$	ГОСТ 26483-85
2	Кислотность обменная, ммоль/100 г / Exchangeable acidity, mmol / 100 g	$0,03 \pm 0,01$	ГОСТ 26484-85
3	Кислотность гидролитическая, ммоль/100 г / Hydrolytic acidity, mmol/100 g	$1,5 \pm 0,2$	ГОСТ 26212-91
4	$P_2O_5$ , подвижный, мг/кг / $P_2O_5$ , mg/kg	$178 \pm 35,6$	ГОСТ Р 54650-2011
5	$K_2O$ , подвижный, мг/кг / $K_2O$ , mg/kg	$161,0 \pm 24,2$	ГОСТ Р 54650-2011
6	Органическое вещество (гумус), % / Organic matter, %	$2,4 \pm 0,5$	ГОСТ 26213-91
7	Азот аммонийный, мг/кг / N ammonium, mg/kg	$1,6 \pm 0,3$	ГОСТ 26489-85
8	Азот нитратный, мг/кг / N nitrates, mg/kg	$2,4 \pm 0,7$	ГОСТ 26951-86
9	Содержание глины, % / Clay content, %	$27,8 \pm 0,03$	ГОСТ 12536-2014

уровня еженедельно. Контролем служили образцы почв, обработанные тем же образом, но без добавления сульфата аммония. Для оценки нитрифицирующей активности измеряли содержание нитрат-ионов в образцах согласно ГОСТ 26951-86: по истечении срока инкубации почву из каждой колбы переносили в чашки Петри, высушивали при  $40^\circ C$  до воздушно-сухого состояния, тщательно перемешивали, отбирали из каждого образца по 20 г, добавляли по 50 мл 1% раствора алюмокалиевых квасцов, перемешивали на орбитальном шейкере в течение 20 мин, отстаивали и измеряли содержание в образцах нитрат-ионов потенциометрическим методом. Для оценки влияния антибиотиков на нитрифицирующую активность исследуемой почвы сравнивали результаты содержания нитрат-ионов в образце, не содержащем антибиотиков (значение 0 на графиках) с их содержанием при добавлении соответствующих концентраций антибиотиков (50–700 мг/кг почвы).

В работе использовались антибиотики разных групп: окситетрациклин (тетрациклиновый), тилозин (макролид), бензилпенициллин ( $\beta$ -лактамный). Все опыты проводились в трех повторностях. Для статистической обработки результатов полученные данные были проанализированы с использованием однофакторного параметрического дисперсионного анализа и критерия Фишера ( $F$ ) с применением программного обеспечения Statistica 7. В качестве погрешности указаны значения стандартной ошибки эксперимента.

**Результаты и их обсуждение**

По результатам проведенного анализа нитрифицирующая активность контрольного образца исследуемой почвы составляла  $10,05 \pm 1,85$  мг  $NO_3^-$  /кг почвы. Таким образом, ее величина без внесения сульфата аммония оказалась незначительной. Нитрифицирующая активность исследуемой почвы без внесения антибиотиков, но с добавлением сульфата аммония равнялась  $996,7 \pm 53,04$  мг  $NO_3^-$  / кг почвы.

Было установлено, что эффекты воздействия антибиотиков на нитрифицирующую активность исследуемой почвы были несущественными при индивидуальном воздействии и зависели от их свойств и концентрации при комбинированном воздействии (рис. 1, 2).

При индивидуальном влиянии антибиотиков не наблюдалось сильного воздействия на нитрифицирующую активность почвы. Согласно экспериментальным данным, окситетрациклин и тилозин незначительно снижали концентрацию нитрат-ионов в почве, а бензилпенициллин приводил к ее увеличению. Однако при проведении дисперсионного анализа не обнаружено статистической зависимости между содержанием нитрат-ионов и концентрацией антибиотиков (табл. 2).

Смесь бензилпенициллина и окситетрациклина незначительно стимулировала нитрифицирующую активность во всем диапазоне концентраций. Противоположное воздействие оказала комбинация окситетрациклина и тилозина. Однако данные статистического анализа

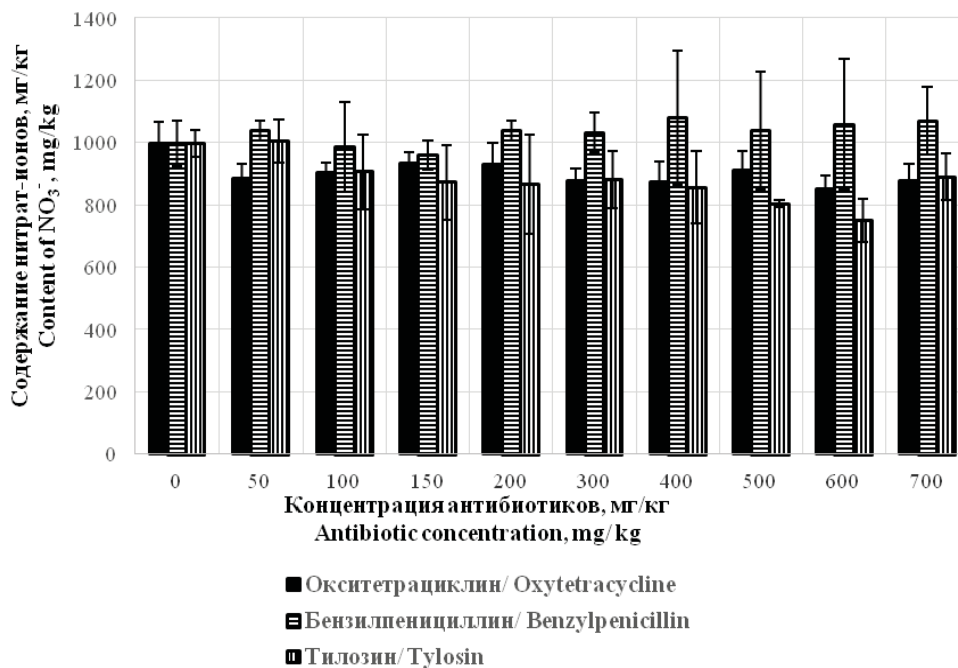


Рис. 1. Зависимость нитрифицирующей активности почвы от концентрации антибиотиков при их индивидуальном воздействии

Fig. 1. Dependence of the nitrification activity of the soil on the concentration of antibiotics during their individual exposure

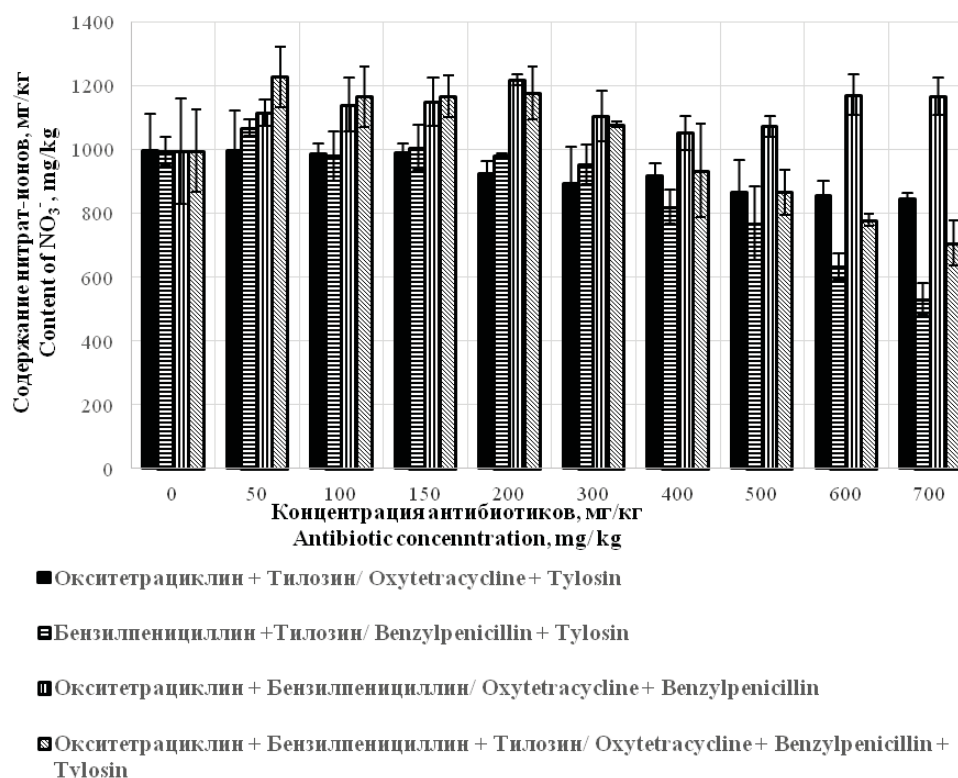


Рис. 2. Зависимость нитрифицирующей активности почвы от концентрации антибиотиков при их комбинированном воздействии

Fig. 2. Dependence of the nitrification activity of the soil on the concentration of antibiotics with their combined exposure





Таблица 2 / Table 2

Результаты дисперсионного анализа  
Analysis of variance

Антибиотик / Antibiotic	Значение критерия Фишера (F) / Value F-test (F)	Значение критерия значимости (p) / significance level (p)
Бензилпенициллин / Benzylpenicillin	0,25	0,98
Окситетрациклин / Oxytetracycline	1,84	0,12
Тилозин / Tylosin	1,91	0,11
Окситетрациклин + бензилпенициллин / Oxytetracycline + benzylpenicillin	2,10	0,08
Бензилпенициллин + тилозин / Benzylpenicillin + tylosin	25,01	0,00
Окситетрациклин + тилозин / Oxytetracycline + tylosin	1,85	0,12
Окситетрациклин + бензилпенициллин + тилозин / Oxytetracycline + benzylpenicillin + tylosin	12,87	0,00

не выявили зависимости между содержанием нитрат-ионов и концентрацией антибиотиков (см. табл. 2).

Достоверная статистическая зависимость была обнаружена при воздействии смеси бензилпенициллина и тилозина, которая стимулировала нитрифицирующую активность при 50 мг/кг почвы и ингибировала при 300–700 мг/кг, концентрации 100–200 мг/кг не оказали значительного влияния. Также достоверная зависимость обнаружена при комбинированном воздействии трех антибиотиков – в диапазоне 50–300 мг/кг процесс нитрификации усиливался, а при 400–700 мг/кг подавлялся (см. табл. 2).

**Выводы**

Антибиотики бензилпенициллин, окситетрациклин и тилозин при индивидуальном влиянии не оказывают значительного воздействия на концентрацию нитрат-ионов в дерново-подзолистой почве. Однако при совместном воздействии они могут как стимулировать, так и ингибировать нитрифицирующую активность почвы в зависимости от состава смеси и концентрации антибиотиков в ней.

Таким образом, исследованные антибиотики в определенных сочетаниях способны изменять нитрифицирующую активность дерново-подзолистых легкосуглинистых почв, смещая динамическое равновесие процесса превращения азота, что может оказать негативное воздействие на функционирование экосистемы в целом.

В связи с этим необходимо дальнейшее изучение воздействия антибиотических веществ на разные этапы азотного цикла почв.

**Список литературы**

1. *Roose-Amsaleg C., Laverman A. M.* Do antibiotics have environmental side-effects? Impact of synthetic antibiotics on biogeochemical processes // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2016. Vol. 23. P. 4000–4012. DOI: 10.1007/s11356-015-4943-3
2. *Умаров М. М., Кураков А. В., Степанов А. Л.* Микробиологическая трансформация азота в почве. М. : ГЕОС, 2007. 138 с.
3. *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. P. 939–947. DOI: 10.1007/s00374-014-0914-y
4. *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. P. 61–68. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2010.10.004
5. *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. P. 315–322.
6. *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. P. 2470–2472. DOI: 10.1016/j.soilbio.2011.09.004
7. *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. P. 56–64. DOI: 10.1002/jpln.200900210
8. *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. P. 410–419.
9. *Halling-Sørensen B.* Inhibition of Aerobic Growth and Nitrification of Bacteria in Sewage Sludge by Antibacterial Agents // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2001. Vol. 40. P. 451–460. DOI: 10.1007/s002440010197
  10. *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. P. 1–10. DOI: 10.1385/ABAB:95:1:01
  11. *Муравин Э. А.* Ингибиторы нитрификации. М.: Агропромиздат, 1989. 247 с.
  12. *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.

#### Образец для цитирования:

Космачева А. Г., Чеснокова С. М., Трифонова Т. А. Исследование влияния антибиотиков разных групп на нитрифицирующую активность дерново-подзолистой почвы методом лабораторного моделирования // *Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология*. 2020. Т. 20, вып. 3. С. 352–358. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2020-20-3-352-358>

#### Study of the Effect of Antibiotics of Various Groups on the Nitrification Activity of Sod-podzolic Soil by the Method of Laboratory Modelling

A. G. Kosmacheva, S. M. Chesnokova, T. A. Trifonova

Anastasia G. Kosmacheva, <https://orcid.org/0000-0002-1988-8615>, Vladimir State University named after Alexander Grigorievich and Nikolai Grigorievich Stoletovs, 87 Gorky St., Vladimir 600000, Russia, [hijadelaluna@mail.ru](mailto:hijadelaluna@mail.ru)

Svetlana M. Chesnokova, <https://orcid.org/0000-0001-5126-1786>, Vladimir State University named after Alexander Grigorievich and Nikolai Grigorievich Stoletovs, 87 Gorky St., Vladimir 600000, Russia, [chesnokova.chemist@mail.ru](mailto:chesnokova.chemist@mail.ru)

Tatiana A. Trifonova, <https://orcid.org/0000-0002-1628-9430>, Lomonosov Moscow State University, 1 Leninskie Gory, Moscow 119991; Vladimir State University named after Alexander Grigorievich and Nikolai Grigorievich Stoletovs, 87 Gorky St., Vladimir 600000, Russia, [tatrifon@mail.ru](mailto:tatrifon@mail.ru)

An increase in the number of drugs, including antibiotic substances entering the environment, necessitates studies of their impact on the functioning of ecosystems. In the global cycle of substances, the nitrogen cycle is one of the main processes. An important role is played by the nitrification process. For the first time, the effect of antibiotics of different groups: oxytetracycline, tylosin, benzylpenicillin on the nitrifying activity of sod-podzolic soil under their individual and combined exposure by laboratory modeling, was studied. As a result of studies, it was found that with individual influence, these drugs did not have a significant effect. However, a mixture of benzylpenicillin and tylosin stimulated nitrifying activity at 50 mg/kg of soil and inhibited at 300–700 mg/kg. Under the influence of a mixture of three antibiotics in the range of 50–300 mg/kg of soil, the nitrification process intensified and was suppressed at 400–700 mg/kg.

**Keywords:** nitrification activity, sod-podzolic soil, antibiotics, individual and combined exposure.

Received: 29.01.2020 / Accepted: 08.04.2020 / Published: 31.08.2020

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution License (CC-BY 4.0)

#### References

1. Roose-Amsaleg C., Laverman A. M. Do antibiotics have environmental side-effects? Impact of synthetic antibiotics on biogeochemical processes. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 2016, vol. 23, pp. 4000–4012. DOI: 10.1007/s11356-015-4943-3
2. 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).
3. 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
4. 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, pp. 61–68. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2010.10.004
5. 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, pp. 315–322.
6. 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, pp. 2470–2472. DOI: 10.1016/j.soilbio.2011.09.004
7. 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, pp. 56–64. DOI: 10.1002/jpln.200900210
8. Katipoglu-Yazan T., Pala-Ozok 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.
9. Halling-Sørensen B. Inhibition of Aerobic Growth and Nitrification of Bacteria in Sewage Sludge by Antibacterial Agents. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2001, vol. 40, pp. 451–460. DOI: 10.1007/s002440010197
10. 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
11. Muravin E. A. *Ingibitory nitrifikatsii* [Nitrification inhibitors]. Moscow, Agropromizdat Publ., 1989. 247 p. (in Russian).
12. Kazeev K., Kolesnikov S., Valkov V. *Biologicheskaya diagnostika i indikaciya pochv: metodologiya i metody issledovanij* [Biological diagnostic and indication of soils: the methodology and methods of researches]. Rostov-on-Don, Izd-vo RGU, 2003. 216 p. (in Russian).
- 

**Cite this article as:**

Kosmacheva A. G., Chesnokova S. M., Trifonova T. A. Study of the Effect of Antibiotics of Various Groups on the Nitrification Activity of Sod-podzolic Soil by the Method of Laboratory Modelling. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2020, vol. 20, iss. 3, pp. 352–358 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2020-20-3-352-358>

---