

УДК 631.41; 631.46

UDC 631.41; 631.46

**ДИНАМИКА ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЧЕРНОЗЕМА ОБЫКНОВЕННОГО ПРИ ЗАГРЯЗНЕНИИ АНТИБИОТИКАМИ<sup>1</sup>**

**DYNAMICS OF ENZYME'S ACTIVITY OF BLACK SOIL WHEN POLLUTING WITH ANTIBIOTICS**

Акименко Юлия Викторовна

Akimenko Yuliya Viktorovna

Казеев Камил Шагидуллович  
д.г.н., к.б.н., профессор

Kazeev Kamil Shagidulloovich  
Dr.Sci.Geol., Cand.Biol.Sci., professor

Колесников Сергей Ильич  
д.с.-х.н., профессор  
*Южный федеральный Университет, Ростов-на-Дону, Россия*

Kolesnikov Sergey Ilich  
Dr.Sci.Agr., professor  
*South Federal University, Rostov-on-Don, Russia*

Было исследовано влияние антибиотиков на ферментативную активность чернозема. Внесение высоких доз (600 мг/кг) антибиотиков (бензилпенициллин, нистатин) приводит к значительному снижению ферментативной активности почв. Наиболее чувствительны к действию антибиотиков ферменты класса гидролаз, их активность снижается на 50-70% от контрольных значений, наименее чувствителен класс оксидоредуктаз (10-40%). Действие антибиотиков на ферментативный пул почв носит пролонгированный характер

In the article, we have studied the effect of antibiotics on enzyme's activity of black soil. Introduction of the high doses (600 mg/kg) of antibiotics benzympenicillin, nystatin) leads to considerable decrease in enzyme's activity of soils. The class of hydrolyses is most sensitive to the action of antibiotics, their activity decreases for 50-70% from control values, the class of oxidoreductase is least sensitive (10-40%). Antibiotic's action on enzyme's pool of soils has the prolonged character

Ключевые слова: АНТИБИОТИКИ, ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ, ПОЧВЫ ЮГА РОССИИ

Keywords: ANTIBIOTICS, ENZYME ACTIVITY, SOIL OF SOUTHERN RUSSIA

**Введение**

Выдающееся открытие А. Флемингом пенициллина привело к тому, что возникла наука об антибиотиках, была создана мощная промышленность по их производству, не имеющая аналогов. В результате антибиотики приобрели социальное значение, повлияли на экономику [1].

Тонны фармакологически активных веществ, используются ежегодно человеком для лечения животных и профилактики болезней [2]. После лечения, большинство антибиотиков выводится из организма, либо в неизменном виде, либо в виде метаболитов, некоторые из которых все еще являются биологически активными [3]. Очевидно, это делает их потенциально опасными для бактерий и других организмов в окружающей среде [4].

<sup>1</sup> Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации 14.A18.21.0187, 14.A18.21.1269, 16.740.11.0528, 5.5160.2011.

Доминирующий путь попадания антибиотиков в почву, осуществляется через применение навоза в сельскохозяйственных землях в качестве удобрения [5,6]. Антибиотики могут попадать в сельскохозяйственные угодья посредством орошения, так как они часто обнаруживаются в сточных водах [7].

В отличие от пестицидов, используемых в сельском хозяйстве, антибиотики не вызывали особого внимания как потенциальные загрязнители, до недавнего времени [8]. В настоящее время бактериальная резистентность является большой проблемой с точки зрения здоровья человека и животных. Однако экотоксичность антибиотиков в окружающей среде мало изучена [9].

На сегодняшний день, научный интерес, с одной стороны, сосредоточился на изучении поведения антибиотиков и их судьбы в окружающей среде, с другой стороны, на их влиянии на другие организмы. Некоторые антибиотики сохраняются долгое время в окружающей среде, особенно в почве, а другие очень быстро деградируют [10].

Отмечая широкие возможности использования антибиотиков в лечебных целях, разрабатывая методы, позволяющие преодолевать множественную лекарственную устойчивость у микроорганизмов, нельзя не учитывать очень важного фактора, который приобретает всё большую актуальность: это влияние антибиотиков на окружающую среду. В результате деятельности человека количество антибиотиков во внешней среде возрастает [11].

Среди важных вопросов, связанных с проблемой «антибиотики и окружающая среда», немалое значение приобрело влияние антибиотиков на различные почвенные биоценозы. Микрофлора в различных населённых пунктах, на территории лечебных учреждений, на предприятиях, производящих препараты, на животноводческих фермах, микрофлора сточных вод благодаря применению антибиотиков изменилась. Без микробов существо-

вание почвы невозможно, так как они являются необходимым звеном в круговороте всех биогенных элементов, участвуют в почвообразовании и поддержании почвенного плодородия. Таким образом, антропогенное воздействие, нарушающее почвенные биоценозы, заключается в попадании и накоплении в почве химических соединений, к которым относятся и антибиотики [12].

Проведено много исследований, посвященных использованию антибиотиков в борьбе с фитопатогенными организмами, наносящими ущерб сельскому хозяйству. В растениеводстве антибиотики используются в качестве гербицидов, инсектицидов, стимуляторов роста растений. Из большого числа антибиотиков, испытанных в целях применения их для борьбы с различными заболеваниями растений, вызываемыми бактериями и грибами, наибольший эффект наблюдался при использовании гризеофульвина, циклогексамида (актидиона) и некоторых других [13].

Антибиотики нашли широкое применение в ветеринарии как лечебные средства против многих заболеваний сельскохозяйственных животных, так же их применяют в качестве пищевой добавки для нагула молока, мяса у крупного рогатого скота и для улучшения роста молодняка. Среди антибиотиков, используемых в ветеринарии, очень эффективным препаратом оказался гризеоовиридин и метимицин [14].

Известно, что биологические показатели хорошо диагностируют негативные последствия антропогенного воздействия на почвы и почвенный покров [15-17]. Многолетними исследованиями показана максимальная эффективность диагностики и мониторинга почвенного покрова биохимическими методами, в частности, с помощью показателей ферментативной активности почв. Применению ферментативной активности в качестве диагностического показателя способствуют низкая ошибка опытов, простота определения, высокая чувствительность к внешним воздействиям. Доказана ведущая роль показателей ферментативной активности при

оценке влияния загрязнения различными продуктами техногенеза (пестициды, тяжелые металлы, нефть и нефтепродукты) на экологическое состояние почв [18-23]. Поэтому в настоящей работе в качестве диагностических показателей были использованы почвенные ферменты, такие как каталаза, дегидрогеназа, инвертаза и фосфатаза.

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

Целью настоящего исследования являлось изучение динамики ферментативной активности чернозема обыкновенного при воздействии антибиотиков.

### **Объекты и методы исследований**

Объектом исследования являлся чернозем обыкновенный южно-европейской фации карбонатный мощный слабогумусированный тяжело-суглинистый на желто-бурых и палево-бурых лессовидных глинах и суглинках, отобранный на территории Ботанического сада Южного федерального университета. Биологические параметры черноземов подробно рассмотрены ранее [24].

Методика исследования, заключалась в следующем: образцы почвы ( $A_{\text{пах}}0-25\text{см}$ ), массой 150г обрабатывали раствором антибиотиков бензинпенициллина и комплекса бензинпенициллина и нистатина в различных концентрациях: 100 мг/кг, 300 мг/кг, 450 мг/кг, 600 мг/кг почвы. Исследования проводились через 10, 60 и 120 суток при температуре 20-25°C. Образцы почвы в течение всего опыта инкубировали в темном месте, во избежание быстрого разложения антибиотиков, а также при постоянной температуре и влажности.

Активность каталазы, дегидрогеназы, инвертазы и фосфатазы определяли в лабораториях кафедры экологии и природопользования Южного федерального университета [25].

### Результаты и обсуждение

Многолетними исследованиями показана максимальная эффективность диагностики и мониторинга почвенного покрова биохимическими методами, в частности, с помощью показателей ферментативной активности почв. Применению ферментативной активности в качестве диагностического показателя способствует низкая ошибка опытов, простота определения, высокая чувствительность к внешним воздействиям [26,27].

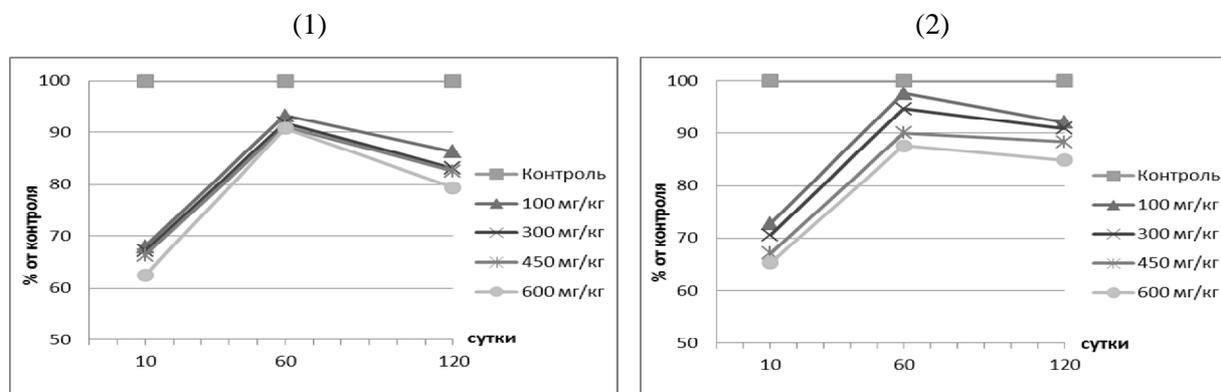
Почва является самой богатой системой по ферментному разнообразию и ферментативному пулу. Разнообразие и богатство ферментов в почве позволяет осуществляться последовательным биохимическим превращениям различных поступающих в нее органических остатков. Значительную роль почвенные ферменты играют в процессах гумусообразования. Превращение растительных и животных остатков в гумусовые вещества является сложным биохимическим процессом с участием различных групп микроорганизмов, а также иммобилизованных почвой внеклеточных ферментов. Выявлена прямая связь между интенсивностью гумификации и ферментативной активностью [28].

Ранее было показано, что антибиотики из группы тетрациклинов в концентрации 300 мг/кг существенно снижают активность каталазы и фосфатазы в почвах, это снижение колеблется в пределах 35-55% от контрольных образцов [29]. В рамках нашего исследования антибиотики оказали значительное ингибирующее воздействие, во всех исследуемых концентрациях, на ферментативную активность чернозема обыкновенного.

Что касается действия противогрибкового препарата – нистатина, то нами было показано, что нистатин наиболее сильно подавляет активность гидролаз (инвертаза), нежели оксидоредуктаз (каталаза и дегидрогеназа) [30].

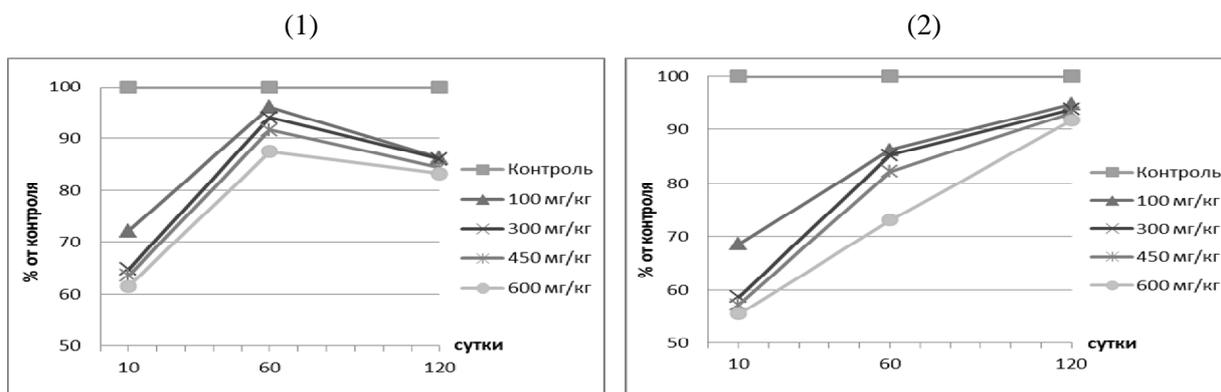
Как бензилпенициллин (бактерицидный препарат), так и комплекс его с нистатином (фунгицидный препарат) оказывают примерно одинаково-

вое ингибирующее воздействие. На 10-е сутки опыта активность каталазы снижается на 35-40% от контроля, на 60-е сутки наблюдается резкое восстановление активности фермента до 90-95%, и затем его незначительное снижение на 120-е сутки опыта (рис.1).



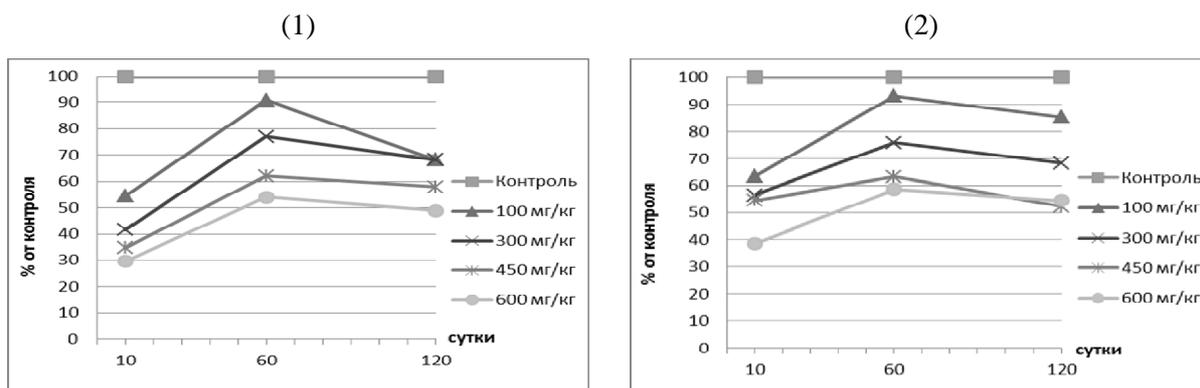
**Рис.1** Динамика активности каталазы чернозема обыкновенного под влиянием бензилпенициллина<sup>(1)</sup> и комплекса бензилпенициллина и нистатина<sup>(2)</sup>

Ферменты класса оксидоредуктаз катализируют процессы биологического окисления и восстановления. Из них дегидрогеназа, катализирующая окислительно-восстановительные реакции путем дегидрирования органических веществ, оказалась более чувствительной к действию антибиотиков, нежели каталаза, катализирующая реакцию разложения перекиси водорода с образованием воды и молекулярного кислорода. Бензилпенициллин в концентрации 600 мг/кг снижает активность фермента практически на 40%, а в комплексе с нистатином на 50%, но активность этого фермента с течением времени восстанавливается до контрольных значений (рис.2).



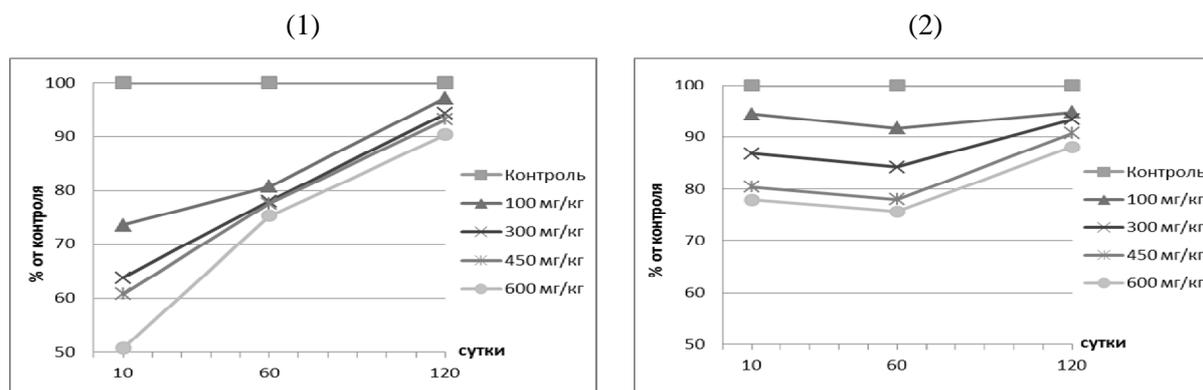
**Рис.2** Динамика активности дегидрогеназы чернозема обыкновенного под влиянием бензилпенициллина<sup>(1)</sup> и комплекса бензилпенициллина и нистатина<sup>(2)</sup>

Ферменты класса гидролаз, катализируют расщепление с присоединением воды. Инвертаза гидролизует сахарозу с образованием редуцирующих сахаров. Этот фермент встречается почти во всех типах почв. Очень высокая активность инвертазы обнаружена в горно-луговых почвах [31]. Инвертаза и фосфатаза, в рамках нашего опыта, оказались наименее устойчивы к действию антибиотиков во всех исследуемых концентрациях. Удалось подавить активность этих ферментов практически на 50-70% от контроля. Активность фосфатазы в течение всего опыта варьирует, но тем не менее мы не наблюдаем полного восстановления фермента (рис.3).



**Рис.3.** Динамика активности фосфатазы чернозема обыкновенного под влиянием бензилпенициллина<sup>(1)</sup> и комплекса бензилпенициллина и нистатина<sup>(2)</sup>

Инвертаза ведет себя противоположно, на 120-е сутки опыта наблюдается практически полное восстановление фермента (рис.4).



**Рис.4** Динамика активности инвертазы чернозема обыкновенного под влиянием бензилпенициллина<sup>(1)</sup> и комплекса бензилпенициллина и нистатина<sup>(2)</sup>

### Выводы

На основании проведенного исследования, удалось:

1. зафиксировать снижение ферментативной активности чернозема обыкновенного во всех вариантах опыта с различными концентрациями антибиотиков;
2. выявить прямую зависимость между дозой антибиотика и степенью снижения ферментативной активности почвы (чем выше доза, тем сильнее эффект);
3. установить, что комплекс антибактериальных и антигрибковых препаратов оказывает наибольшее подавляющее действие, нежели действие одного антибиотика;
4. проследить, что действие антибиотиков на ферментативный пул почв носит пролонгированный характер.

Однако необходимо понимать, что результаты, полученные в лабораторных условиях нельзя непосредственно переносить на явления, имеющие место в естественных местах обитания организмов, явления микробного антагонизма в почве протекают своеобразно, иногда значительно отличаясь от антагонизма тех же микробов на искусственных питательных средах.

### Список литературы

1. Русанов К.В. Пенициллиновый приоритет: у линии фронта// Новости медицины и фармации. 2007. №11. С. 24.
2. Diaz-Cruz, M.S. Lopez de Alda, M.J., Barcelo, D., 2003. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. Trends in Analytical Chemistry 22 (6), 340–351.
3. Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B.A., 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment // Chemosphere 65, 725–759.
4. Bager, A.J., Jensen, J., Krogh, P.H., 2000. Effects of the antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna // Chemosphere 40, 751–757.
5. Golet, E.M., Xifra, I., Siegrist, H., Alder, A.C., Giger, W., 2003. Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil // Environmental Science and Technology 37, 3243–3249.
6. Kemper N., 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment a review. Ecological Indicators 8, 1–13.
7. Renew, J.E., Huang, C.H., 2004. Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography–electrospray mass spectrometry // Journal of Chromatography A 1042, 113–121.
8. Halling-Sorensen, B. Nielsen, S.N. Lanzky, P.F. Ingerslev, F. Lu, 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environmental review // Chemosphere 36, 357–394.
9. Rooklidge S.J., 2004. Environmental antimicrobial contamination from terraccumulation and diffuse pollution pathways. Science of the Total Environment 325, 1–13.
10. Покровский В.Н. Антибиотики и бактерии. М.: Знание, 1990. 64с.
11. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках (6-ое издание, переработанное и дополненное). М.: Издательство МГУ, Наука, 2004. 524 с.
12. Ваксман З.А. Антогонизм микробов и антибиотические вещества. 1964. 342с.
13. Коробкова Т.П., Иваницкая Л.П., Дробышева Т.Н. Современное состояние и перспективы применения антибиотиков в сельском хозяйстве // Антибиотики и медицинская биотехнология, 1987, №8. С. 563-571.
14. Хохрин С.Н. Кормление сельскохозяйственных животных М.: Колос, 2004 692 с.
15. 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 степей Юга России // Аридные экосистемы. 2011. Т. 17. № 2 (47). С. 18-22.
16. Колесников С.И., Казеев К.Ш., Вальков В.Ф. Влияние загрязнения тяжелыми металлами на микробную систему чернозема // Почвоведение. 1999. № 4. С. 505-511.
17. Казеев К.Ш., Тер-Мисякянц Т.А., Кузнецова Ю.С., Поляков А.И., Кутузова И.В., Мазанко М.С., Прудникова М.А., Колесников С.И. Влияние вырубки леса на биологические свойства горных почв Западного Кавказа // Политематический сетевой электронный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ). 2012. № 08(82). <http://ej.kubagro.ru/2012/08/pdf/72.pdf>
18. Галстян А.Ш. Об устойчивости ферментов почв // Почвоведение. 1982. № 4. С. 108-110.
19. Галстян А. Ш. Унификация методов определения ферментов почв // Почвоведение. 1978. № 2. С. 107-114.

20. Денисова Т.В. О применимости показателей ферментативной активности в биодиагностике электромагнитного загрязнения почв// Экология и биология почв: проблемы диагностики и индикации. Мат-лы Междунар. Научной конф. Ростов н/Д: Ростиздат, 2006. С. 151-154.
21. Казеев К.Ш., Колесников С.И., Вальков В.Ф. Биологическая диагностика и индикация почв: методология и методы исследований. Ростов-на-Дону. 2003. 204 с.
22. Колесников С.И., Казеев К.Ш., Денисова Т.В., Даденко Е.В. Разработка региональных экологических нормативов содержания загрязняющих веществ в почвах юга России // Политематический сетевой электронный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ). 2012. № 08(82). <http://ej.kubagro.ru/2012/08/pdf/73.pdf>
23. Казеев К.Ш., Креница А.М., Колесников С.И., Казадаев А.А., Булышева Н.И., Утянская Н.И., Внукова Н.В., Вальков В.Ф. Биологические свойства почв каштаново-солонцовых комплексов // Почвоведение, 2005, №4. С. 464-474.
24. Вальков В.Ф., Казеев К.Ш., Колесников С.И. Почвы Юга России. Ростов-на-Дону: Изд-во «Эверест», 2008. 276 с.
25. Казеев К.Ш., Колесников С.И., Вальков В.Ф. Биологическая диагностика и индикация почв: методология и методы исследований. Ростов н/Д: Изд-во Рост. ун-та, 2003. 204 с.
26. 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.
27. Колесников С.И., Казеев К.Ш., Татосян М.Л., Вальков В.Ф. Влияние загрязнения нефтью и нефтепродуктами на биологическое состояние чернозема обыкновенного // Почвоведение. 2006. №5. С. 616-620.
28. Звягинцев Д.Г. Биологическая активность почв и шкалы для оценки некоторых ее показателей // Почвоведение. 1978. №6. С. 48-54.
29. Feng Liu ,Guang-Guo Ying, Ran Tao, Jian-Liang Zhao, Ji-Feng Yang, Lan-Feng Zhao, 2009. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities // Environmental Pollution 157, 1636–1642.
30. Малыгина Ю.В., Казеев К.Ш. Влияние антибиотиков на микрофлору и ферментативную активность чернозема обыкновенного / «Актуальные вопросы экологии и природопользования» Мат-лы научной конф. «Неделя науки-2011». Отв. ред. К.Ш. Казеев. Ростов н/Д: ЗАО «Ростиздат», 2011. С. 68-72.
31. Хазиев Ф.Х. Системно-экологический анализ ферментативной активности почв. М.: Наука, 1982. 203 с.