

На правах рукописи



Космачева Анастасия Геворговна

**Фитотоксичность антибиотиков и их влияние
на микробиоценоз почвы**

1.5.15 – Экология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владимир – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых»

- Научный руководитель:** Заслуженный деятель науки РФ,
доктор биологических наук, профессор
Трифорова Татьяна Анатольевна
- Официальные оппоненты:** **Широких Ирина Геннадьевна**
доктор биологических наук, старший научный
сотрудник, Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение «Федеральный
аграрный научный центр Северо-Востока
имени Н.В. Рудницкого», заведующая
лабораторией биотехнологии растений и
микроорганизмов
- Селицкая Ольга Валентиновна**
кандидат биологических наук, доцент,
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Российский государственный
аграрный университет – МСХА имени К.А.
Тимирязева», доцент кафедры микробиологии
и иммунологии
- Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Нижегородская государственная
сельскохозяйственная академия»

Защита состоится «___» _____ 2022г. в ___ч. на заседании диссертационного совета 24.2.281.02 при ФГБОУ ВО «Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых» по адресу: 600000, г. Владимир, ул. Горького, 87, корп. 1, ауд. 335.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ВлГУ и на сайте <http://diss.vlsu.ru/>

Отзывы на автореферат в двух экземплярах, заверенные печатью, можно присылать по адресу: 600000, г. Владимир, ул. Горького, 87, ВлГУ, кафедра биологии и экологии.

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Кулагина Екатерина Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования связана с увеличением производства, потребления и последующего поступления в окружающую среду антибиотиков, создающих потенциальную угрозу для природных сообществ и человека (Акименко и др., 2013, 2015, 2019; Kaczala et al., 2016; Roose-Amsaleg et al., 2016; Grenni et al., 2018; Cysoń et al., 2019).

Вследствие того, что антибиотики способны воздействовать на экологически значимые нецелевые организмы, такие как беспозвоночные и растения, важное значение имеет исследование влияния антибактериальных препаратов на растительные организмы, являющиеся важным компонентом экосистем (Migliore et al., 1995–2010). Для этого применяется фитотестирование, являющееся эффективным методом оценки потенциальной опасности химического воздействия на растения и широко используемое в экотоксикологическом мониторинге (Лисовицкая, и др., 2010; Терехова, 2011, 2016; Николаева, 2017).

В связи с бактерицидными и бактериостатическими свойствами антибиотиков, существенное значение имеет изучение их воздействия на почвенные микроорганизмы и осуществляемые ими процессы (Białk-Bielińska, 2014; Bloem, 2016; 2016; Cysoń et al., 2019). Исследование таксономического разнообразия микробных сообществ методами метагеномики с использованием секвенирования гена 16S рРНК обусловлено ролью прокариот, являющихся самыми многочисленными организмами почвы и важным компонентом биохимических превращений (Zielezny et al. 2006; Reichel et al., 2013, 2015; Равин, 2015). Изучение активности ферментов связано со способностью микробных сообществ осуществлять биохимические процессы, необходимые для поддержания гомеостаза экосистемы и качества почвы, и служит показателем реакции микроорганизмов на загрязнение антибактериальными препаратами (Хазиев, 2005; Liu, et al., 2012; Reichel et al., 2015; Bloem, 2016; Cysoń et al., 2019).

Цель работы заключалась в исследовании фитотоксичности антибиотиков различных групп и их влияния на микробиоценоз почвы.

Для достижения поставленной цели были решены следующие **задачи**:

1. Оценить и сравнить фитотоксичность растворов антибиотиков и обработанной ими дерново-подзолистой почвы.
2. Исследовать воздействие антибактериальных препаратов на структуру прокариотического сообщества дерново-подзолистой почвы.
3. Изучить воздействие антибиотиков на показатели ферментативной активности дерново-подзолистой почвы в сравнении с серой лесной почвой.
4. Исследовать комбинированное влияние антибактериальных препаратов и солей тяжелых металлов на фитотоксичность и ферментативную активность почвы.

Научная новизна. Впервые проведено исследование фитотоксичности широкого диапазона концентраций окситетрациклина, тилозина и бензилпенициллина на развитие мягкой озимой пшеницы и кресс-салата, как при индивидуальном влиянии, так и в смеси с солями тяжелых металлов. Изучено влияние окситетрациклина, тилозина, бензилпенициллина и их смесей на фитотоксичность и ферментативную активность дерново-подзолистой почвы, а также на ферментативную активность серой лесной почвы. Исследовано воздействие данных антибиотиков на динамику микробных сообществ дерново-подзолистой почвы методом секвенирования гена 16S рРНК.

Научно-практическая значимость работы. Результаты исследования вносят вклад в изучение проблемы загрязнения антибиотиками почвенных экосистем, выявляя неоднородное, преимущественно, токсическое воздействие. Полученные данные отражают влияние антибиотиков как на прокариотические сообщества и ферментативные процессы почв, так и на развитие растительных организмов на начальной стадии онтогенеза. Результаты исследования могут быть использованы в экотоксикологической

оценке почв, разработке нормативов предельно-допустимых концентраций антибактериальных препаратов в почвах сельскохозяйственного назначения, а также в учебном процессе при изучении курсов экотоксикологии и экологического мониторинга.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Влияние антибактериальных препаратов на развитие однодольных и двудольных растений в ювенильной стадии онтогенеза различается в зависимости от группы антибиотика.
2. Фитотоксические эффекты воздействий растворов антибиотиков и почвы, загрязненной теми же препаратами, отличаются.
3. Структура прокариотического сообщества дерново-подзолистой почвы под воздействием антибактериальных препаратов существенно не изменяется, что свидетельствует об устойчивости почвенного микробиома.
4. Влияние антибиотиков на ферментативную активность дерново-подзолистой почвы различно, и зависит от группы препарата. По энзиматическим показателям дерново-подзолистая почва менее устойчива к загрязнению антибактериальными препаратами в сравнении с серой лесной почвой.
5. Комбинированное воздействие растворов антибактериальных препаратов с растворами солей тяжелых металлов приводит к изменению токсических эффектов на растения и ферментативную активность почв.

Достоверность результатов работы подтверждается достоверностью исходных данных, корректными методами исследования, оценкой воспроизводимости результатов с помощью статистических методов.

Апробация результатов исследования. Материалы исследования представлены на 9 конференциях: Международной научно-технической конференции «Инновационные пути решения актуальных проблем природопользования и защиты окружающей среды» (Алушта, 2018), IX Международной научно-практической конференции «Экология речных бассейнов» (Суздаль, 2018), II Международной научно-практической

конференции «Актуальные проблемы природопользования и природообустройства» (Пенза, 2019), IX Всероссийской с международным участием научно-практической конференции «Изучение, сохранение и восстановление естественных ландшафтов» (Волгоград, 2019), V Международной научно-практической конференции «Трансграничное сотрудничество в области экологической безопасности и охраны окружающей среды» (Гомель, 2020), X International Scientific Conference of young scientists, graduates, master and PhD students «Actual environmental problems» (Минск, 2020), II Международной научно-практической конференции «Современные подходы и методы в защите растений» (Екатеринбург, 2020), EcoHealth 2021: Международной научно-исследовательской конференции по экотоксикологии, здоровью человека и экологической безопасности (Барнаул, 2021), X Международной научно-практической конференции «Экология речных бассейнов» (Владимир, 2021).

Личный вклад автора. Тема, цель, задачи и методы исследования определены автором совместно с научным руководителем. Критический обзор литературных источников, отбор и подготовка почвенных образцов, модельные лабораторные исследования фитотоксичности и ферментативной активности, а также обработка экспериментальных данных проведены автором лично.

Публикации. По результатам исследования опубликовано 13 научных работ, в том числе 4 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 4 статьи в изданиях, включенных в мировые базы данных научного цитирования Scopus и Web of Science.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 164 страницах текста компьютерной верстки, содержит 23 таблицы, 54 рисунка. Состоит из введения, 4 глав, выводов и списка литературы, включающего 221 источник, в том числе 166 на иностранных языках.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность сотрудникам кафедры биологии и экологии ВлГУ за содействие и оказанную

поддержку. Особую благодарность автор выражает научному руководителю, заслуженному деятелю науки Российской Федерации, д.б.н., профессору Трифионовой Татьяне Анатольевне и доценту, к.х.н. Чесноковой Светлане Михайловне за ценные рекомендации на всех этапах исследования.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Проблема загрязнения почв антибактериальными препаратами и их воздействия на растения (обзор литературы)

В главе рассматриваются литературные данные российских (Акименко и др. 2013, 2015, 2019) и зарубежных (van de Vijver et al., 2016; Akram et al., 2017; Grenni et al., 2018; Cusó et al., 2019) публикаций, посвященных загрязнению антибактериальными препаратами наземных экосистем. Приведен обзор основных методов исследований и полученных результатов влияния антибиотиков на растительные культуры, структуру почвенного микробиома и ферментативные процессы. Многолетние исследования демонстрируют способность растений поглощать и накапливать лекарственные препараты, приводя к изменению ростовых процессов, генетических и биохимических показателей (Migliore et al., 1995–2010; Xie et al., 2010–2011; Azanu et al., 2016, 2018). Показана способность антибиотиков влиять на активность почвенных ферментов, структуру бактериальных сообществ и экологические функции, такие как производство биомассы и преобразование питательных веществ, что приводит к потере функциональной стабильности (Thiele-Bruhn et al., 2005; Kotzerke et al., 2008, 2011; Chen et al., 2013; Wang et al., 2016). Таким образом, накопление антибактериальных препаратов в окружающей среде представляет не только угрозу здоровья животных и человека, благодаря развитию бактерий с множественной резистентностью, но и опасность для функций и структуры экосистем, воздействуя на естественные микробные сообщества и растительные компоненты, влияющие на фундаментальные экологические процессы.

Глава 2. Объекты и методы исследований

2.1. Объекты исследований

Объекты исследований – дерново-подзолистая и серая лесная почвы сельскохозяйственного назначения, которые были отобраны на территории Суздальского района Владимирской области на глубине 0–20 см в соответствии с ГОСТ 17.4.4.02-84.

Используемые антибиотики представлены тремя группами: β -лактамный (бензилпенициллин), тетрациклиновый (окситетрациклин), макролид (тилозин), различающиеся по физико-химическим характеристикам, спектру и механизму действия.

Для дополнительных исследований были использованы растворы солей тяжелых металлов: нитрат свинца ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$), сульфат никеля ($\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), сульфат меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) в интервале концентраций металлов 10–60 мг/дм³.

Для проведения исследований по фитотестированию растворов антибиотиков в качестве тест-культур использовались двудольное растение кресс-салат (*Lepidium sativum*) сорт «Забава», однодольное растение – пшеница мягкая озимая (*Triticum aestivum* L.) сорт «Мера», районированная во Владимирской области. Для проведения исследований по фитотестированию почв использовалась пшеница мягкая озимая того же сорта.

2.2. Методы исследований

Исследования по фитотестированию растворов антибиотиков проводили в чашках Петри в трех повторностях. В каждую чашку Петри помещали по 50 семян используемой тест-культуры, таким образом были проанализированы 150 семян для каждой дозы антибиотика и для контроля. В качестве тест-объектов применялись водные растворы антибактериальных препаратов соответствующих концентраций (200–700 мг/дм³). Семена пшеницы обрабатывали 10 см³ раствора, кресс-салата – 5 см³. Контролем служила дистиллированная вода. Чашки Петри инкубировали при 26 °С без освещения в течение 96 часов. Тест-реакциями служили: длина корней, высота побегов, всхожесть семян. Тест-параметрами являлись токсические эффекты

воздействия антибиотиков на растения (ТЭ), рассчитываемые для каждой определяемой тест-реакции по формуле 1, интегральный токсический эффект (ИТЭ), рассчитываемый по формуле 2, показатель координации роста, рассчитываемый по формуле 3.

$$ТЭ = \frac{\bar{x}_0 - \bar{x}_a}{x_0} \times 100\%, \quad (1)$$

где $\bar{x}_0$ и $\bar{x}_a$ – среднее арифметическое значение тест-параметра в контроле и опыте, соответственно.

$$ИТЭ = \frac{ТЭ_в + ТЭ_{дк} + ТЭ_{вп}}{3}, \quad (2)$$

где ТЭв, ТЭдк, ТЭвп – значение токсических эффектов всхожести, длины корней и высоты побегов соответственно.

$$\frac{\bar{L}_к}{\bar{L}_п}, \quad (3)$$

где $\bar{L}_к$ – средняя длина корней, $\bar{L}_п$ – средняя высота побегов.

Для проведения дополнительных исследований по фитотестированию смесей растворов антибиотиков и солей тяжелых металлов, семена обрабатывали водными растворами антибактериальных препаратов с концентрацией 700 мг/дм³ и солей тяжелых металлов в диапазоне концентраций металлов 10–60 мг/дм³. Ход экспериментов, определяемые тест-реакции и тест-параметры аналогичны описанным выше исследованиям по фитотестированию растворов антибиотиков.

Для проведения исследований по фитотестированию дерново-подзолистой почвы и расчета степени токсичности в зависимости от концентрации внесенных антибиотиков использовали методику М-П-2006 ФР.1.39.2006.02264. Определяемые тест-реакции и тест-параметры аналогичны описанным выше. Используемые концентрации антибактериальных препаратов составляли 50–600 мг/кг почвы.

Для проведения исследований влияния антибиотиков на ферментативную активность, воздушно-сухие образы обрабатывали растворами используемых антибактериальных препаратов в концентрациях,

соответствующих 50–700 мг/кг почвы. Контролем служила почва без внесения антибиотиков. Опыты по уреазной, каталазной, нитрифицирующей активностям проводились в трехкратной повторности, целлюлозолитической – в четырехкратной.

Целлюлозолитическую активность почв устанавливали модифицированным аппликационным методом Кристенсена (Возняковская, 1987).

Нитрифицирующая активность оценивалась по содержанию нитрат-ионов после тридцатидневной инкубации образцов. Почвы были подготовлены согласно методике (Казеев, 2003), после инкубации анализировались потенциометрическим методом согласно ГОСТ 26951-86.

Определение уреазной активности почвы осуществляли фотоколориметрическим методом (Казеев, 2003).

Каталазную активность определяли газометрическим методом А.Ш. Галстяна (Хазиев, 2005).

Статистическая обработка результатов исследований проводилась с использованием программного обеспечения Statistica 7.0. Для статистического анализа зависимости исследуемых показателей от концентрации антибиотиков был использован корреляционный анализ ($p < 0,05$), рассчитан коэффициент корреляции Пирсона. В качестве погрешностей указаны значения стандартной ошибки среднего.

Построение графиков по фитотестированию и ферментативной активности осуществляли в программе Microsoft Excel.

Определение таксономического состава почвенной микробиоты осуществлялось с помощью методов секвенирования нового поколения (NGS). Результаты получены с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

Пробы почвы, предназначенные для секвенирования, обрабатывали растворами бензилпенициллина, окситетрациклина и тилозина концентрациями 200 мг/кг почвы. До выделения ДНК пробы хранились в

стерильных пластиковых герметично закрытых контейнерах при температуре -10°C.

Альфа- и бета-анализ биоразнообразия между частотами операционных таксономических единиц (ОТЕ) был произведён с помощью CLC Genomics Workbench с параметрами по умолчанию. Альфа-разнообразие оценивалось с использованием индексов разнообразия Шеннона, Симпсона, Chao1, филогенетического разнообразия Фейта. Для оценки статистической значимости между группами использовался тест Крускала–Уоллиса. Для оценки бета-разнообразия использовался метод «weighted unifrac», позволяющий оценить процент сходств/различий между образцами с учетом филогенетической информации. Результаты были представлены с использованием методов многомерной статистики PCoA–principal components analysis (анализ главных компонент). В качестве целевого участка амплификации использовали область v3-v4 гена 16S рРНК. Данные, полученные в результате секвенирования образцов, обрабатывались с использованием программного обеспечения CLC Genomics Workbench. Группировку ОТЕ проводили при уровне таксономического порога сходства 97% и достоверности общей встречаемости не менее 10 ОТЕ на анализируемую группу образцов.

Глава 3. Результаты фитотестирования антибактериальных препаратов

3.1. Фитотестирование растворов антибиотиков

Растворы антибиотиков оказывают видоспецифичное токсическое влияние на растения в ювенильной стадии развития. Эффекты воздействия зависят от группы антибиотика и его концентрации.

График зависимости интегральных токсических эффектов пшеницы и кресс-салата от концентрации антибиотиков представлен на рисунке 1.

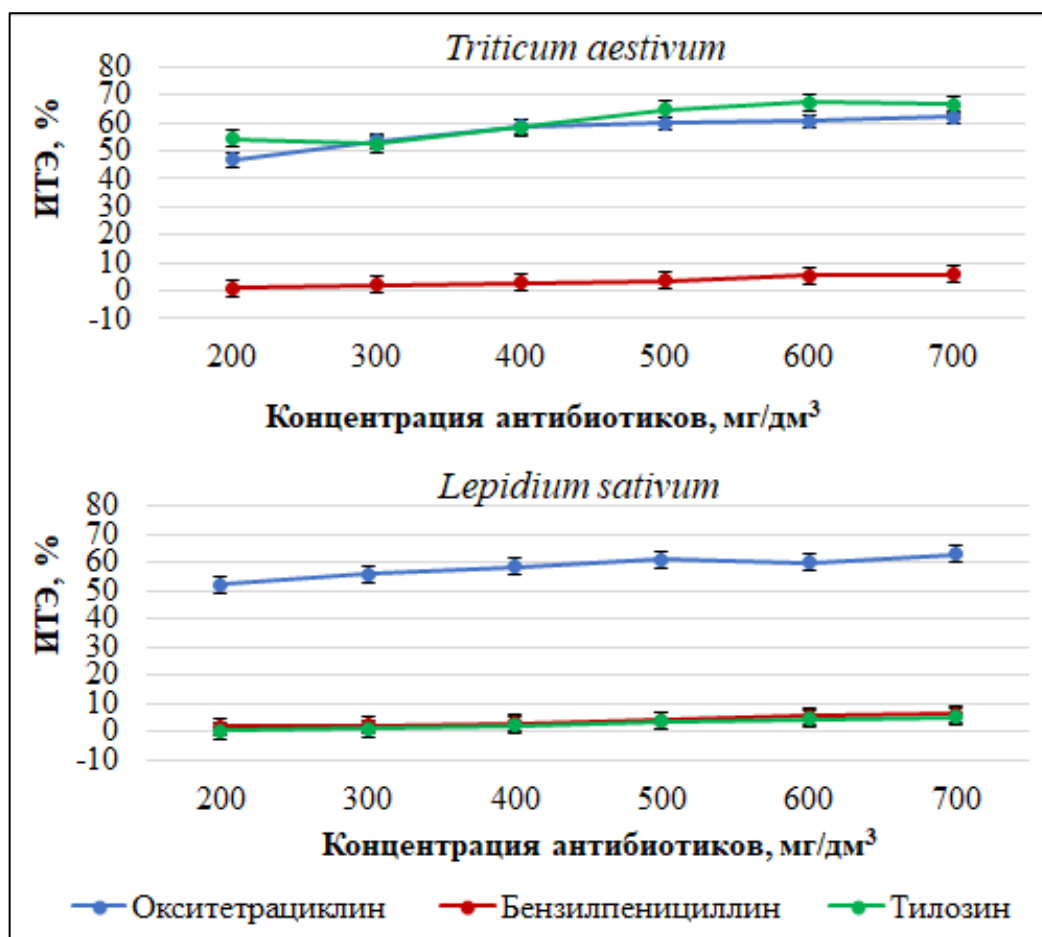


Рисунок 1. Зависимость интегральных токсических эффектов пшеницы и кресс-салата от концентрации антибиотиков

Наименее токсичный для обеих тест-культур – β -лактамный бензилпенициллин. Наиболее токсичными являются окситетрациклин и его смеси с другими антибиотиками. Тилозин, относящийся к группе макролидов, проявляет сильное токсическое воздействие на пшеницу и слабое на кресс-салат.

Наиболее чувствительный параметр к воздействию антибиотиков – прорастание корней, наименее чувствительный – всхожесть.

Пшеница мягкая озимая (*Triticum aestivum* L.), относящаяся к классу однодольных, более чувствительна к растворам антибиотиков в сравнении с двудольным кресс-салатом (*Lepidium sativum*).

При воздействии смесей антибиотиков на растения, проявляются как эффекты синергизма, так и эффекты антагонизма, зависящие вида растения, сочетания препаратов и их концентраций.

Влияние антибиотиков приводит к изменению координации роста тест-организмов, различающегося в зависимости от концентрации и физико-химических свойств препаратов и вида растений.

Комбинированное воздействие растворов антибактериальных препаратов с растворами солей тяжелых металлов приводит к изменению токсических эффектов в сравнении с индивидуальным влиянием поллютантов, и зависит от состава используемой смеси. График зависимости интегральных токсических эффектов пшеницы и кресс-салата от концентрации тяжелых металлов в смеси с антибиотиками представлен на рисунке 2. Наиболее токсичной на ранних стадиях онтогенеза для мягкой озимой пшеницы является смесь окситетрациклина с сульфатом меди, наименее токсичной – смесь окситетрациклина с нитратом свинца. Наиболее токсичной для кресс-салата на ранних стадиях онтогенеза является смесь окситетрациклина с нитратом свинца, наименее токсичными – смеси сульфата никеля с бензилпенициллином и тилозином.

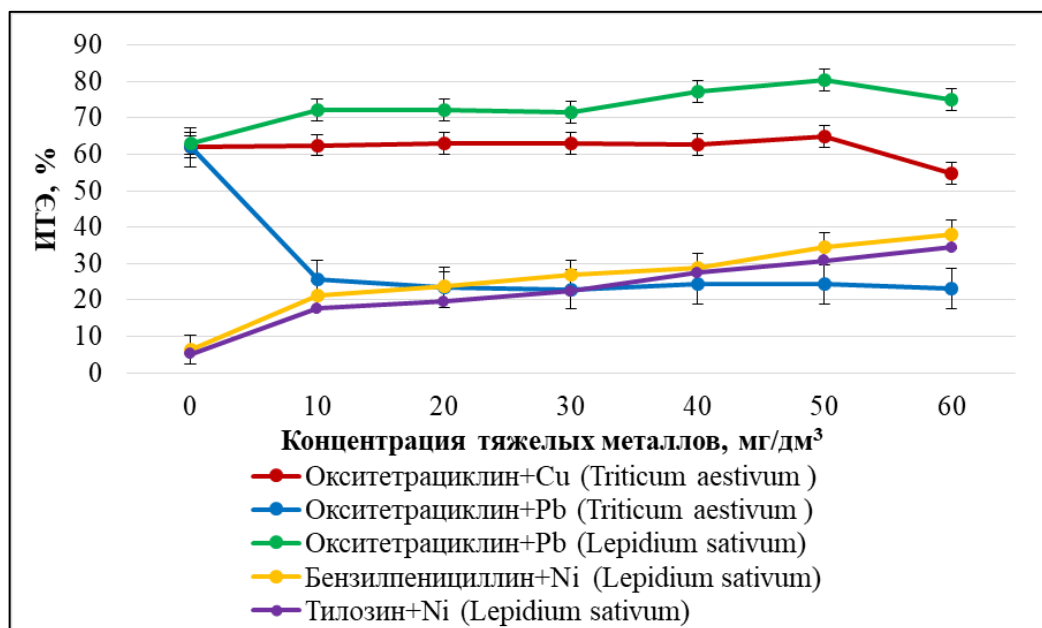


Рисунок 2. Зависимость интегральных токсических эффектов пшеницы и кресс-салата от концентрации тяжелых металлов в смеси с антибиотиками

3.2. Фитотестирование почвы, загрязненной антибиотиками

График зависимости интегральных токсических эффектов пшеницы от концентрации антибиотиков в почве представлен на рисунке 3.

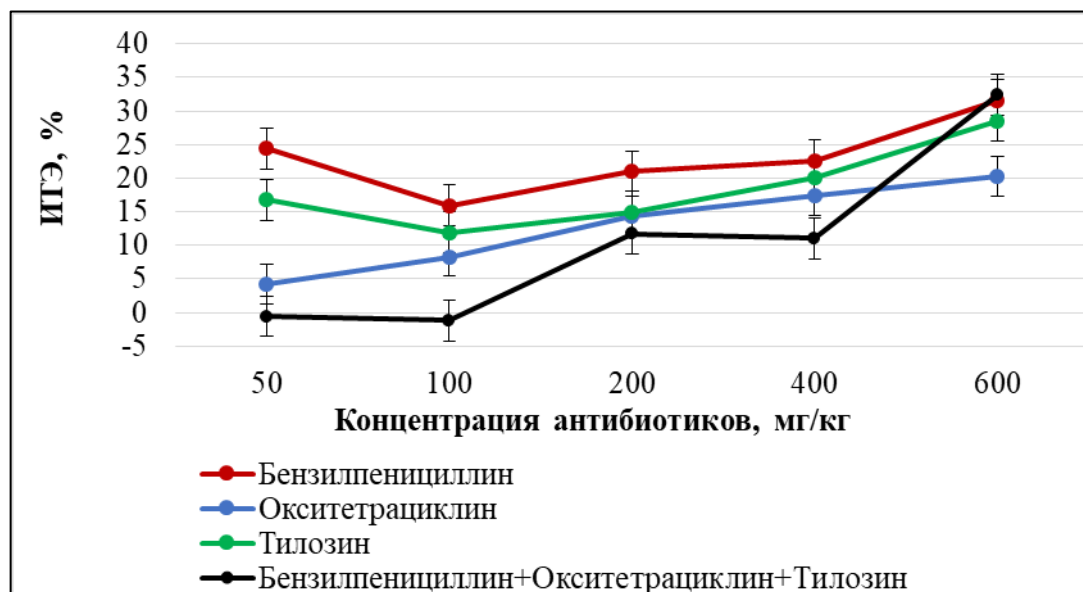


Рисунок 3. Зависимость интегральных токсических эффектов пшеницы от концентрации антибиотиков в почве

При загрязнении дерново-подзолистой почвы, наибольшее токсическое воздействие на культивируемую пшеницу оказал бензилпенициллин, наименьшее – смесь трех антибиотиков.

Сравнение результатов фитотестирования растворов антибактериальных препаратов с исследованиями почвы, загрязненной теми же антибиотиками, демонстрирует различия в эффектах воздействий.

При загрязнении почвы бензилпенициллином и его бинарными смесями с тилозином и окситетрациклином не наблюдается корреляционной зависимости интегральных токсических эффектов от концентрации препаратов ($p > 0,05$), однако интегральный токсический эффект бензилпенициллина является максимальным на всем диапазоне концентраций в сравнении с другими применяемыми антибиотиками. Интегральный токсический эффект загрязненных бензилпенициллином почв превышает таковой у растворов бензилпенициллина тех же концентраций, что может быть объяснено усилением ингибирующего влияния антибиотика его

взаимодействием с тяжелыми металлами и другими поллютантами, содержащимися в почве.

Интегральные токсические эффекты почв, загрязненных окситетрациклином и тилозином, оказались ниже токсических эффектов водных растворов этих антибиотиков при тех же концентрациях, что может быть связано с высоким коэффициентом сорбции препаратов, вследствие чего они труднее усваиваются растениями, в отличие от бензилпенициллина, характеризующегося низким коэффициентом сорбции.

Установлено, что почвы, загрязненные антибиотиками, характеризуются V и IV степенями токсичности, в зависимости от концентрации препаратов, т.е. являются практически нетоксичными и малотоксичными соответственно.

Глава 4. Исследование воздействия антибактериальных препаратов на структуру почвенного микробиома и ферментативные процессы

4.1. Структура микробиома почв

Количество ОТЕ на образец, индексы Шеннона, Симпсона, Chao1, и Филогенетическое разнообразие Фейта представлены в таблице 1.

Таблица 1. Метрики альфа-разнообразия

Почвенные пробы	Количество ОТЕ	Индекс Chao1	Индекс Шеннона	Индекс Симпсона	Филогенетическое разнообразие Фейта
1	186	189,8	4,74	0,90	7,91
2	191	199	5,21	0,95	7,77
3	194	202	4,90	0,92	8,01
4	197	201,9	4,49	0,88	7,92

Статистический анализ результатов данных индексов демонстрирует отсутствие значительного разнообразия теоретического числа видов/ОТЕ в исследуемом микробиоме при воздействии антибиотиков, отсутствие значительной изменчивости таксономической структуры, равномерное распределение без преобладания каких-либо представителей, отсутствие

существенных изменений в структуре микробного сообщества с точки зрения филогенетической связи.

Результаты сравнения динамики изменений обилия представителей микробиоты по сгруппированным операционным таксономическим единицам представлены на рисунке 4.

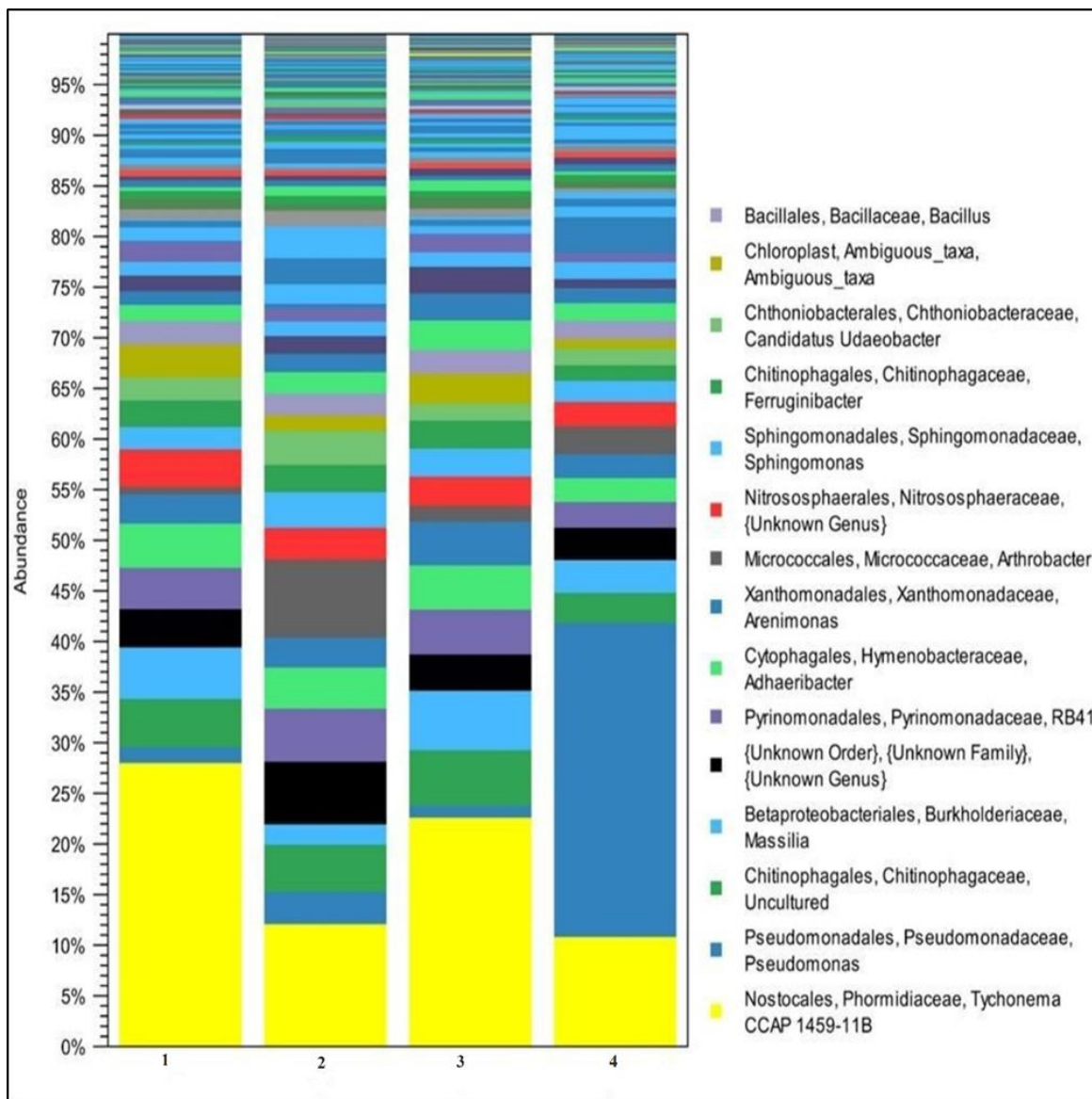


Рисунок 4. Графическое сравнение обилия бактерий на уровне рода по исследованным образцам. Ось ординат отображает обилие (Abundance) в %. Цифрами по оси абсцисс обозначены образцы почв: 1 – необработанная почва (контроль), 2 – почва, обработанная бензилпенициллином, 3 – почва, обработанная окситетрациклином, 4 – почва, обработанная тилозином

Метагеномный анализ 16S рРНК выявил преобладание грамотрицательных бактерии р. *Tychonema* (о. *Nostocales*), бактерий р. *Pseudomonas*. В незначительных количествах присутствовали также сем. *Chitinophagaceae* (о. *Chitinophagales*), р. *Arthrobacter* (о. *Micrococcales*), р. *Massilia* (о. *Betaproteobacteriales*), р. *Lysobacter* и р. *Arenimonas* (о. *Xanthomonadales*), в меньшей степени представлены археи сем. *Nitrososphaeraceae* (о. *Nitrososphaerales*). Доминирующей бактерией в контроле, а также образцах, загрязненных бензилпенициллином и тилозином, оказались цианобактерии р. *Tychonema* (о. *Nostocales*). В почве, содержащей тилозин, преобладали бактерии р. *Pseudomonas*.

Численность отдельных представителей исследуемых микробиомов на уровне отряда варьирует в зависимости от применяемого антибактериального препарата. Для каждого почвенного образца наблюдается собственная таксономическая композиция обилия, филогенетически родственная между собой. В контрольном образце преобладают бактерии о. *Nostocales*, о. *Frankiales*, о. *Gaielleles*, о. *Opitutales*, и археи о. *Nitrososphaerales*. Для пробы, загрязненной 200 мг/кг бензилпенициллина характерны две группы, состоящие из бактерий о. *Pyrinomonadales*, о. *Solibacterales*, о. *Gemmatimonadales*, о. *Microtrichiales* и о. *Chitinobacteriales*, о. *Streptomycetales*, о. *Sphingomonadales*, о. *Rhizobiales*, о. *Micrococcales*, о. *Pseudonocardiales*. Для почвы, содержащей 200 мг/кг окситетрациклина доминирующими бактериям являлись о. *Sphingobacteriales*, о. *Blastocatellales*, о. *Caulobacterales*, о. *Xanthomonadales*, о. *Chitinophagales*, о. *Steroidobacteriales*. В образце, загрязненном 200 мг/кг тилозина, преобладали о. *Pseudomonadales*, о. *Gammaproteobacteria*, о. *Pedosphaerales*, о. *Bacillales*, о. *Azospirillales*.

На рисунке 5 представлены данные анализа главных компонент (PCoA) почвенных образцов.

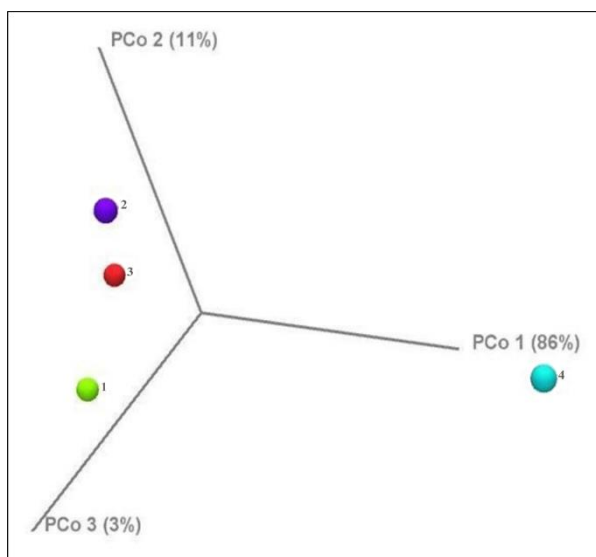


Рисунок 5. Анализ главных компонент (РСоА) микробиомов контрольного и обработанных антибиотиками образцов почвы. Цифрами обозначены образцы почв:

- 1 – необработанная почва (контроль),
- 2 – почва, обработанная бензилпенициллином,
- 3 – почва, обработанная окситетрациклином,
- 4 – почва, обработанная тилозином

Анализ главных компонент демонстрирует различие кластера микробиома образца 4 (при воздействии тилозина) от контрольной пробы (образец 1) и проб, загрязненных бензилпенициллином (образец 2) и окситетрациклином (образец 3). Однако статистически значимых изменений в структуре микробиомов не выявлено ($p > 0,05$).

Таким образом, структура бактериальных сообществ исследованных проб статистически значимо не отличалась по видовому или филогенетическому разнообразию, доминированию какого-либо таксона ($p > 0,05$), что демонстрирует устойчивость почвенных сообществ в ответ на воздействие используемых антибиотиков. Основные таксономические группы бактерий не претерпевают значимых изменений ($p > 0,05$), но меняется их обилие в образце. К таким группам относятся бактерии о. *Nostocales* и р. *Massilia* (сем. *Burkholderiaceae*). В контрольном образце (проба 1) в незначительных количествах присутствовали археи, тогда как в почвах, обработанных антибактериальными препаратами (пробы 2–4) они не были обнаружены. Доминирование бактерий р. *Pseudomonas* в пробе, содержащей тилозин (проба 4) (рисунок 4) и отличие кластера данного микробиома (рисунок 5) в сравнении с пробами 1,2,3 может быть связано с широким спектром действия тилозина и содержанием в составе используемого препарата дополнительных веществ (пропиленгликоль и

гидроксиметилбензол), обладающих антисептическими свойствами. Однако отличие данных показателей не было статистически значимым ($p > 0,05$).

Метагеномное профилирование по 16S рРНК показало доминирование грамотрицательных бактерий рода *Tychopea* в необработанной почве, которое сохранилось при обработке бензилпенициллином и окситетрациклином, однако при загрязнении тилозином композиция микробиома сместилась в сторону доминирования бактерий рода *Pseudomonas*.

4.2. Ферментативная активность почв

Исследования зависимости каталазной, целлюлозолитической, нитрифицирующей, уреазной активностей дерново-подзолистой почвы от концентраций бензилпенициллина, окситетрациклина, тилозина и их смесей демонстрируют способность антибактериальных препаратов изменять активность ферментов. Сравнение полученных результатов выявляет различный ответ, зависящий как от свойств почв, так и от свойств и концентраций применяемых антибиотиков.

Каталазная активность контрольного образца дерново-подзолистой почвы составила $5,06 \pm 0,05$ мл O_2 /мин $\times$ 1 г, серой лесной – $3,82 \pm 0,05$ мл O_2 /мин $\times$ 1 г.

Целлюлозолитическая активность контрольного образца дерново-подзолистой почвы составила $47,35\% \pm 2,11\%$, серой лесной – $73,96\% \pm 2,67\%$.

Содержание нитрат-ионов при исследовании нитрифицирующей активности в контрольном образце дерново-подзолистой почвы составило $996,7 \pm 53,04$ мг/кг, серой лесной – $942,33 \pm 41,13$ мг/кг.

По степени обогащенности уреазой почвы характеризовались как очень бедные с содержанием аммиака в контрольном образце дерново-подзолистой почвы $0,951$ г NH_3 /10 г почвы*24 часа, серой лесной – $1,178$ г NH_3 /10 г почвы*24 часа.

График зависимости ферментативной активности почв от концентрации антибиотиков представлен на рисунке 6.

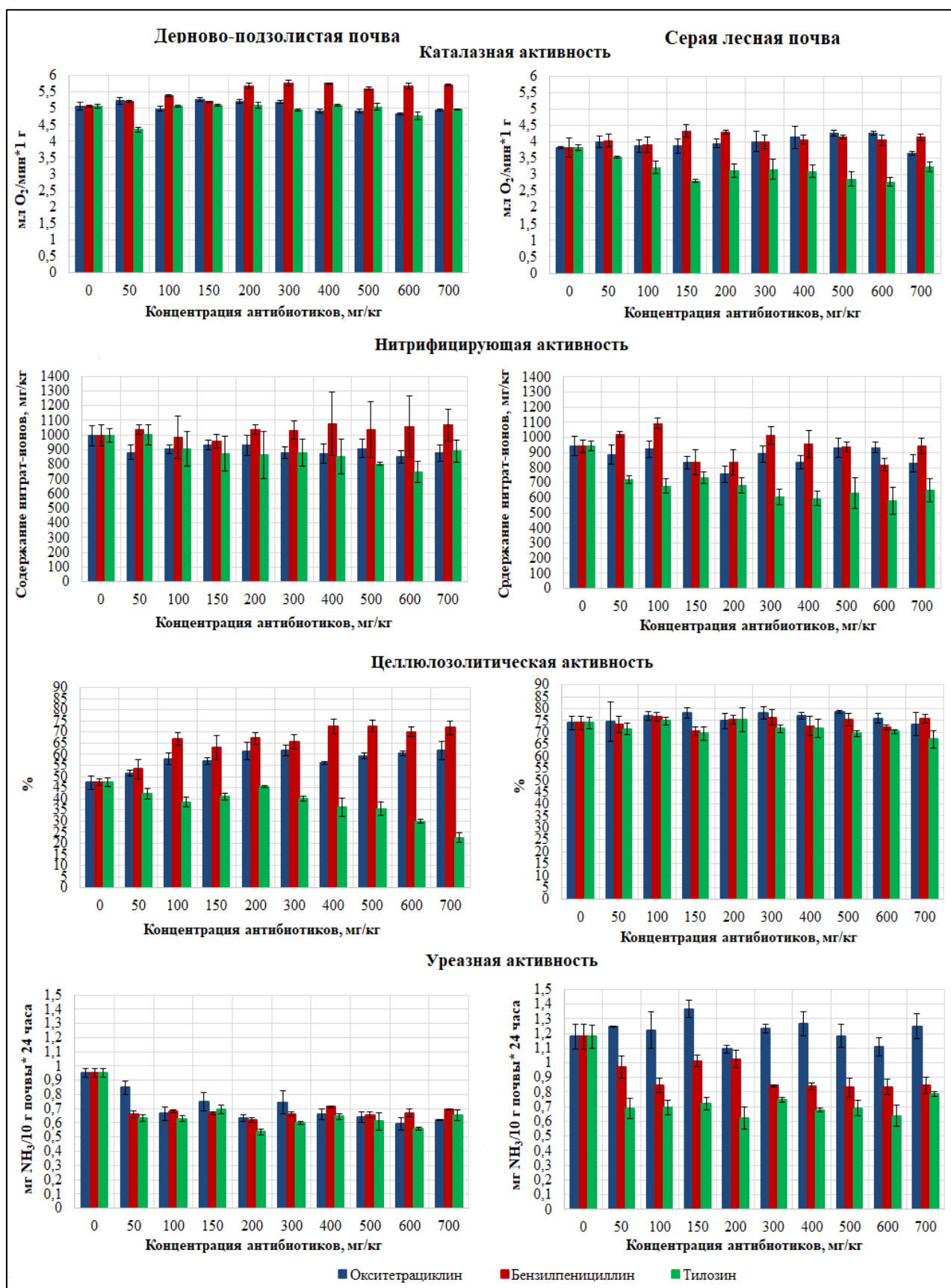


Рисунок 6. Зависимость ферментативной активности почв от концентрации антибиотиков

Результаты корреляционного анализа зависимости ферментативной активности почв от концентрации антибиотиков представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты корреляционного анализа зависимости ферментативной активности почв от концентрации антибиотиков

	Бензилпенициллин	Окситетрациклин	Тилозин
Дерново-подзолистая почва			
Каталазная активность	r=0,7425; p=0,014	r=-0,6756; p=0,032	r=0,0876; p=0,810
Нитрифицирующая активность	r=0,6959; p=0,025	r=-0,6375; p=0,047	r=-0,7245; p=0,018
Уреазная активность	r=-0,3337; p=0,346	r=-0,7525; p=0,012	r=-0,4443; p=0,198
Целлюлозолитическая активность	r=0,7887; p=0,007	r=0,6649; p=0,036	r=-0,9034; p=0,000
Серая лесная почва			
Каталазная активность	r=0,2610; p=0,466	r=0,2535; p=0,480	r=-0,5672; p=0,087
Нитрифицирующая активность	r=-0,3011; p=0,398	r=-0,0626; p=0,864	r=-0,6920; p=0,027
Уреазная активность	r=-0,6983; p=0,025	r=-0,1625; p=0,654	r=-0,3536; p=0,316
Целлюлозолитическая активность	r=0,1049; p=0,773	r=0,0467; p=0,898	r=-0,7050; p=0,023

*зеленой заливкой выделена положительная корреляционная зависимость; красной заливкой – отрицательная корреляционная зависимость ($p < 0,05$).

Наименее токсичным для энзиматических показателей почв антибактериальным препаратом являлся бензилпенициллин, характеризующийся наименьшим спектром воздействия, и оказывающий дозозависимое стимулирование каталазной, целлюлозолитической, нитрифицирующей активностей дерново-подзолистой почвы и ингибирование уреазной активности серой лесной почвы.

Окситетрациклин, обладающий более широким спектром воздействия, демонстрировал как стимулирующее влияние в случае целлюлозолитической активности дерново-подзолистой почвы, так и ингибирующее – для каталазной, нитрифицирующей, уреазной активностей, не оказывая дозозависимого воздействия на показатели серой лесной почвы.

Тилозин, также обладающий широким спектром воздействия и имеющий в составе дополнительные вещества с антисептическими свойствами, в большинстве экспериментов оказывал выраженное токсическое влияние на энзиматические процессы, являющееся дозозависимым для целлюлозолитической и нитрифицирующей активностей обеих почв.

Сравнительный анализ демонстрирует, что серая лесная почва более устойчива к воздействию антибиотиков по исследуемым показателям в сравнении с дерново-подзолистой.

Комбинированное воздействие растворов антибиотиков и солей тяжелых металлов на каталазную активность дерново-подзолистой почвы выявило антагонистическое воздействие сульфата никеля по отношению к эффекту стимуляции каталазной активности бензилпенициллином и усиление ингибирующего действия окситетрациклина при увеличении концентрации нитрата свинца в почве.

Выводы

1. Влияние антибактериальных препаратов на развитие однодольных и двудольных растений на начальном этапе онтогенеза различается в зависимости от группы антибиотика. Растворы антибиотиков оказывают видоспецифичное токсическое влияние на растения в ювенильной стадии развития. Эффекты воздействия зависят от группы препарата и его концентрации. Наименее токсичный для обеих тест-культур – β -лактамный бензилпенициллин. Наиболее токсичными являются окситетрациклин и его смеси с другими антибиотиками. Тилозин, относящийся к группе макролидов, проявляет сильное токсическое воздействие на пшеницу и слабое на кресс-салат.

2. Эффекты воздействий растворов антибиотиков и почв, загрязненных теми же препаратами, отличаются. При загрязнении дерново-подзолистой почвы, наибольшее токсическое воздействие на культивируемую пшеницу оказал бензилпенициллин, наименьшее – смесь трех антибиотиков.

Данные результаты демонстрируют некорректность прямой экстраполяции эффектов фитотоксичности антибиотиков на почвы, загрязненные антибиотиками.

3. Антибиотики различных групп по-разному воздействуют на ферментативную активность почвы. Дерново-подзолистая почва менее устойчива к загрязнению антибактериальными препаратами в сравнении с серой лесной почвой по энзиматическим показателям. Наименее токсичным является β -лактамный бензилпенициллин, оказывающий дозозависимое стимулирование каталазной, целлюлозолитической и нитрифицирующей активностей дерново-подзолистой почвы. Макролид тилозин проявляет выраженное дозозависимое токсическое влияние на целлюлозолитическую и нитрифицирующую активность обеих почв. Окситетрациклин стимулирует целлюлозолитическую активность и ингибирует каталазную, нитрифицирующую, уреазную активности дерново-подзолистой почвы.

4. Метагеномное профилирование по 16S рРНК показало доминирование грамотрицательных бактерий рода *Tychoneta* в контрольном образце почвы, которое сохранилось при обработке бензилпенициллином и окситетрациклином, однако, при загрязнении тилозином, композиция микробиома сместилась в сторону доминирования бактерий рода *Pseudomonas*.

5. Несмотря на способность антибиотиков изменять показатели ферментативной активности дерново-подзолистой почвы, выявлена устойчивость структуры её прокариотического сообщества. Вероятно, почва, как природное биокосное тело, способна поддерживать свою микробную структуру, даже несмотря на довольно сильное внешнее воздействие, что говорит о её высокой саморегулирующей способности.

6. Комбинированное воздействие растворов антибактериальных препаратов с растворами солей тяжелых металлов приводит к изменению фитотоксических эффектов индивидуального влияния поллютантов, зависящему от состава смеси. Выявлено антагонистическое воздействие

сульфата никеля по отношению к эффекту стимуляции каталазной активности бензилпенициллином и усиление ингибирующего действия окситетрациклина при увеличении концентрации нитрата свинца в почве.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

Статьи в научных журналах, включенных в Перечень ВАК РФ

1. Трифонова, Т.А. Оценка влияния антибиотиков ампициллина и тилозина на ферментативную активность дерново-подзолистой почвы и их токсичности для культурных растений / Т.А. Трифонова, С.М. Чеснокова, А.Г. **Космачева** // Теоретическая и прикладная экология. – 2020. – № 2. – С. 150–156. (*Scopus, Web of Science*)
2. **Космачева, А.Г.** Исследование влияния антибиотиков разных групп на нитрифицирующую активность дерново-подзолистой почвы методом лабораторного моделирования / А.Г. **Космачева**, С.М. Чеснокова, Т.А. Трифонова // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. – 2020. – Т. 20. – № 3. – С. 352–358.
3. Трифонова, Т.А. Исследование влияния антибиотиков различных групп на целлюлозолитическую активность дерново-подзолистой почвы методом лабораторного моделирования / Т.А. Трифонова, С.М. Чеснокова, А.Г. **Космачева** // Агрохимия. – 2020. – № 10. – С. 72–78.
4. Трифонова, Т.А. Влияние антибиотиков на целлюлозолитическую и нитрифицирующую активности серой лесной почвы / Т.А. Трифонова, А.Г. **Космачева**, С.М. Чеснокова // Юг России: экология, развитие. – 2020. – Т.15, – № 4. – С. 52–62. (*Scopus, Web of Science*)

Статьи в изданиях, включенных в мировые базы данных научного цитирования Scopus и Web of Science

5. Enzymatic Activity and Microbial Diversity of Sod-Podzolic Soil Microbiota Using 16S rRNA Amplicon Sequencing following Antibiotic Exposure / T. Trifonova, А. **Kosmacheva**, A. Sprygin, S. Chesnokova, O. Byadovskaya // Antibiotics. – 2021. – Vol. 10. – Article number: 970. (*Scopus, Web of Science*)

6. **Kosmacheva, A.G.** Assessment of the effect of antibiotic mixtures of different groups on phytotoxicity of sod-podzolic soil / **A. G. Kosmacheva**, T. A. Trifonova, S. M. Chesnokova // AIP Conference Proceedings. – 2021. – Vol. 2388. – Article number: 020013. (*Scopus*)

Статьи в других научных изданиях

7. Чеснокова, С.М. Оценка фитотоксичности и опасности для окружающей среды антибиотиков, используемых в сельском хозяйстве / С.М. Чеснокова, **А.Г. Космачева** // В сборнике: Инновационные пути решения актуальных проблем природопользования и защиты окружающей среды. Материалы докладов Международной научно-технической конференции. Ч. III. – Белгород, 2018. – С. 289–295.

8. Чеснокова, С.М. Оценка фитотоксичности антибиотиков и тяжелых металлов при комбинированном воздействии / С.М. Чеснокова, **А.Г. Космачева**, А.А. Друганов, Т.А. Трифонова // В сборнике: Экология речных бассейнов. Труды IX Международной научно-практической конференции. – Владимир, 2018. – С. 477–483.

9. **Космачева, А.Г.** Оценка влияния антибиотиков бензилпенициллина, окситетрациклина и тилозина на каталазную активность дерново-подзолистой и серой лесной почв. / **А.Г. Космачева** // Грани познания. – 2019. – № 6 (65). – С. 79–83.

10. **Космачева, А.Г.** Исследование комбинированного влияния антибиотиков и тяжелых металлов на каталазную активность дерново-подзолистой почвы / **А.Г. Космачева** // В сборнике: Актуальные проблемы природопользования и природообустройства. Сборник статей II Международной научно-практической конференции. – Пенза, 2019. – С. 156–160.

11. **Космачева, А.Г.** Исследование токсичности дерново-подзолистой почвы, загрязненной антибиотиками различных групп, методом лабораторного фитотестирования / **А.Г. Космачева** // Трансграничное сотрудничество в области экологической безопасности и охраны окружающей

среды: V Международная научно-практическая конференция: сборник материалов. – Гомель, С. 289–295.

12. **Kosmacheva, A.** Toxicity assessment of soil contaminated with different antibiotic groups / **A. Kosmacheva** // Actual environmental problems: Proceedings of the X International Scientific Conference of young scientists, graduates, master and PhD students: International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University. – Minsk, 2020 – P. 223.

13. **Космачева, А.Г.** Оценка влияния смесей антибиотиков разных групп на фитотоксичность дерново-подзолистой почвы / А.Г. Космачева, Т.А. Трифонова, С.М. Чеснокова // В сборнике: Современные подходы и методы в защите растений. Материалы II Международной научно-практической конференции. – Екатеринбург, 2020. – С. 214–215.