



Абрамов Е.Г., Антропова Н.С.

Влияние антибиотика тетрациклина гидрохлорида на биотрансформацию мочевины при его воздействии на почвенные нитрифицирующие штаммы

ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью»
Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации, 119121, Москва, Россия

Введение. Последствия бесконтрольного использования антибиотиков в сельском хозяйстве — актуальная проблема гигиены окружающей среды. Тетрациклин может попасть в почву с уриной домашних животных, угнетать жизнедеятельность почвенных бактериальных штаммов и ингибировать процессы ферментативного гидролиза мочевины (карбамида), нарушая глобальный цикл круговорота азота в природе. Отсутствие как количественных, так и качественных критериев оценки этого влияния определило актуальность исследований.

Материалы и методы. Исследования выполнены с использованием хроматографической системы «Стайер» с катионными и анионными разделяющими колонками и эксклюзивными методами анализа, разработанными авторами. При моделировании растворов тяжёлых металлов использовали атомно-абсорбционный спектрометр МГА-915МД с ЭТА. Объектами исследований являлись модельные растворы карбамида с разным содержанием ингибирующих веществ. В качестве источника уреазы и штаммов *Nitrobacter* и *Nitrosomonas* использована дерново-подзолистая почва из Учебно-опытного почвенно-экологического центра «Чашниково» МГУ им. М.В. Ломоносова.

Результаты. Предложен усовершенствованный хроматографический метод анализа мочевины в воде — более быстрый по сравнению с описанным авторами ранее. Показано ингибирующее воздействие антибиотика тетрациклина гидрохлорида на процесс биотрансформации нитрита в нитрат, обусловленного штаммами *Nitrobacter*. Значимого влияния антибиотика на биотрансформацию мочевины в аммоний и аммония в нитрит под действием штаммов *Nitrosomonas* не установлено.

Ограничения исследования. Исследования проводили на модельных водных системах, включавших водную фазу, содержащую разные концентрации антибиотика, навеску почвы, мочевины, ионы тяжёлых металлов при температуре плюс 30 °С, рН ~ 6,5. Не изучалось влияние солевого фона, рН, температуры на биотрансформацию, что могло бы, не меняя общей картины, выявить нюансы в кинетике протекания основных процессов.

Заключение. Исследования показали отсутствие влияния антибиотика тетрациклина гидрохлорида на кинетику распада мочевины до аммония и углекислого газа, обусловленную уреазной ферментативной активностью; отсутствует влияние антибиотика при окислении аммония до нитритов штаммами *Nitrosomonas*. Обнаружено селективное ингибирующее воздействие антибиотика при окислении нитрита в нитрат, обусловленное штаммами *Nitrobacter*; ингибирование процессов биотрансформации ионами хрома по всей цепочке превращений от мочевины до нитрата, а также ингибирующее действие избыточного кислорода на совокупность процессов биотрансформации при барботаже воздуха через водную фазу.

Ключевые слова: биотрансформация; мочевина; тетрациклин; аммоний; нитрит; нитрат

Соблюдение этических стандартов: не требуется предоставления заключения комитета по биомедицинской этике или иных документов.

Для цитирования: Абрамов Е.Г., Антропова Н.С. Влияние антибиотика тетрациклина гидрохлорида на биотрансформацию мочевины при его воздействии на почвенные нитрифицирующие штаммы. *Гигиена и санитария*. 2022; 101(5): 589–595. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-5-589-595>

Для корреспонденции: Абрамов Евгений Геннадиевич, науч. сотр. отд. физико-химических исследований и экотоксикологии ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, 119121, Москва. E-mail: EAbrahamov@cspmz.ru

Участие авторов: Абрамов Е.Г. — сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста, концепция исследования, редактирование; Антропова Н.С. — сбор и обработка материала, написание текста. *Все соавторы* — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Благодарность. Авторы выражают благодарность А.В. Загайновой и сотрудникам лаборатории микробиологии ФГБУ «ЦСП» ФМБА России за оказанное содействие в проведении опытов.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование не имело финансовой поддержки.

Поступила: 16.03.2022 / Принята к печати: 12.04.2022 / Опубликована: 31.05.2022

Evgeny G. Abramov, Natalia S. Antropova

The effect of the antibiotic tetracycline hydrochloride on the biotransformation of urea when exposed to soil nitrifying strains

Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia, Moscow, 119121, Russian Federation

Introduction. The consequences of uncontrolled use of antibiotics in agriculture are an urgent problem of environmental hygiene. Tetracycline can enter the soil with the urine of domestic animals, inhibit the vital activity of soil bacterial strains and inhibit the processes of enzymatic hydrolysis of urea (carbamide), disrupting the global nitrogen cycle in nature. The lack of both quantitative and qualitative criteria for assessing this influence determined the relevance of the research.

Materials and methods. The studies were carried out using the “Stayer” chromatographic system with cationic and anionic separating columns and exclusive analysis methods developed by the authors. When modelling solutions of heavy metals, an atomic absorption spectrometer MGA-915MD with ETA was used. The objects of research were model solutions of carbamide with different content of inhibiting substances. As a source of urease and strains of *Nitrobacter* and *Nitrosomonas*, sod-podzolic soil from the Educational and Experimental Soil-Ecological Center “Chashnikovo” of Lomonosov Moscow State University was used. **Results.** An improved, more rapid chromatographic method for the analysis of urea in water is proposed compared to the method described by the authors earlier. The inhibitory effect of the antibiotic tetracycline hydrochloride on the process of biotransformation of nitrite into nitrate caused by *Nitrobacter* strains has been shown. No significant effect of the antibiotic on the biotransformation of urea into ammonium and ammonium into nitrite under the action of *Nitrosomonas* strains has been established.

Limitations. The studies were carried out on the model of water systems, which included an aqueous phase containing different concentrations of the antibiotic, soil suspension, urea, heavy metal ions at a temperature of $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} \sim 6.5$. The influence of salt background, pH, and temperature on biotransformation has not been studied, which could, without changing the overall picture, reveal nuances in the kinetics of the main processes.

Conclusion. Studies have shown the absence of the effect of the antibiotic tetracycline hydrochloride on the kinetics of the decomposition of urea to ammonium and carbon dioxide due to urease enzymatic activity; there is no effect of the antibiotic on the oxidation of ammonium to nitrites by *Nitrosomonas* strains. It was found: selective inhibitory effect of an antibiotic during the oxidation of nitrite to nitrate, due to *Nitrobacter* strains; inhibition of biotransformation processes by chromium ions along the entire chain of transformations from urea to nitrate; and the inhibitory effect of excess oxygen on the totality of biotransformation processes during air bubbling through the aqueous phase.

Keywords: biotransformation; urea; tetracycline; ammonium; nitrite; nitrate

Compliance with ethical standards: no provision of the conclusion of the Biomedical Ethics Committee or other documents (in Russian and English) is required.

For citation: Abramov E.G., Antropova N.S. The effect of the antibiotic tetracycline hydrochloride on the biotransformation of urea when exposed to soil nitrifying strains. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2022; 101(5): 589-595. https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-5-589-595 (In Russian)

For correspondence: Evgeny G. Abramov, research associate of Department of Physico-Chemical Research and Ecotoxicology, Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Biological and Medical Agency, Moscow, 119121, Russian Federation, Moscow. E-mail: EAbramov@cspmz.ru

Information about the authors:

Abramov E.G., https://orcid.org/0000-0001-9611-8430 Antropova N.S., https://orcid.org/0000-0002-9311-9910

Contribution: Abramov E.G. – collection and processing of material, statistical processing, writing text, research concept, editing. Antropova N.S. – collecting and processing material, writing text. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

Gratitude. The authors express their gratitude to A.V. Zagainova and the staff of the Microbiology laboratory of the FSBI "CSP" of the FMBA of Russia for their assistance in conducting experiments.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement. The study had no sponsorship.

Received: March 16, 2022 / Accepted: April 12, 2022 / Published: May 31, 2022

Введение

Опасными последствиями бесконтрольного применения антибиотиков в сельском хозяйстве являются увеличение их фоновых концентраций в окружающей среде, развитие резистентности у патогенных микроорганизмов, а также нарушение функционального состояния почвенного покрова [1]. Проблема контроля антибиотиков не в продуктах питания, а в объектах окружающей среды, в частности в почве, является новой, и она обусловлена тем, что значительные количества препаратов, а именно тетрациклина, могут попадать в окружающую среду с биологическими отходами животноводческих хозяйств. При этом носителем как антибиотика, так и мочевины является урина животных, то есть в одном объёме биологической жидкости могут одновременно присутствовать два вещества, одно из которых (антибиотик) может быть ингибитором последующего биохимического разложения другого вещества (мочевины). Применение тетрациклина в животноводстве, влияя в целом на здоровье и привес поголовья, может оказывать отрицательное воздействие на экосистему из-за попадания в неё неразложившегося антибиотика вместе с мочой и навозом, так как суточная доза тетрациклина для одной единицы крупного рогатого скота может достигать 12 г [2]. Принимая во внимание подавление тетрациклином из-за блокирования синтеза клеточного белка самого широкого спектра вредных микроорганизмов, например, грамотрицательных *Enterobacter* spp., можно спрогнозировать также и подавление активности уреазных почвенных бактерий, а также грамотрицательных штаммов *Nitrosomonas* и *Nitrobacter*, обеспечивающих глобальный круговорот органического и неорганического азота в экосистеме планеты, поскольку активность тетрациклина по отношению и к грамположительным, и грамотрицательным бактериям в воде проявляется уже в концентрационном диапазоне 1–25 мг/дм³ [3–6].

Изучению уреазной активности почвы посвящено большое количество работ [7–12], при этом следует отметить, что процесс биотрансформации мочевины изучают не только в почве, но и в водных объектах, так как продукты её гидролиза (аммоний, нитриты, нитраты), образующиеся под действием бактериальных штаммов, оказывают существенное многофакторное влияние на экологию [13–15] и являются нормируемыми компонентами для вод различного назначения. Так, ПДК для водопроводной воды по аммиаку, нитритам и нитратам составляет 2,5; 3,5; 45 мг/дм³.

Мочевина (карбамид, амид карбаминовой кислоты), химическая формула (NH₂)₂CO, является конечным про-

дуктом белкового распада в организме человека и млекопитающих [16] и выделяется с мочой (ПДК для водоёмов рыбохозяйственного назначения составляет 80 мг/дм³). Мочевина попадает в экосистему с отходами животноводческих хозяйств, хозяйственно-бытовыми коллекторными стоками, в результате использования карбамида в качестве удобрения. В химическом отношении это вещество устойчиво, а симметричная молекула карбамида химически инертна и не окисляется кислородом воздуха. В природе существует процесс ферментативной деградации мочевины под действием уреазы в соответствии со схемой реакции:



а сама уреазная активность почвы принята в качестве эталонного показателя, характеризующего экологическое здоровье почвенного покрова того или иного региона [17, 18]. Высокая уреазная активность почвы является необходимым условием использования карбамида в качестве удобрения, так как растения потребляют продукты гидролиза мочевины, а не сам карбамид. Реакция (1) является первой стадией процесса экологической минерализации (утилизации) органического азотсодержащего отхода, в результате чего нелетучее и водорастворимое органическое вещество поллютант (карбамид) трансформируется в летучие продукты – аммиак и диоксид углерода. Последние не улетучиваются, а образуют карбонат аммония, взаимодействуя между собой в почвенном объёме и запуская последующие биохимические реакции аммонификации и нитрификации с выходом нитритов и нитратов. Эти продукты вновь усваиваются растениями и микроорганизмами, являясь источником азота для биосинтеза нуклеиновых кислот, протеинов и других биоорганических компонентов. Однако продукты гидролиза мочевины на каждой из стадий являются нормируемыми компонентами, а их содержание в питьевой воде регламентируется следующими значениями ПДК: 2; 3; 45 мг/дм³ для ионов NH₄⁺; NO₂⁻; NO₃⁻ соответственно¹.

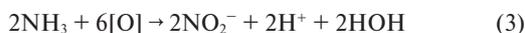
Процессы аммонификации и нитрификации мочевины [19–21] под действием микроорганизмов можно представить следующими схемами биохимических реакций:

1. Образование углекислого газа и аммиака (иона аммония) через стадию образования карбаминовой кислоты:



¹ СанПиН 1.2.3685-21. Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания. Раздел 3. Нормативы качества и безопасности воды. М., 2022.

2. Окисление аммиака под действием бактерий *Nitrosomonas* и превращение в нитрит:



3. Окисление нитрита в нитрат под действием бактерий *Nitrobacter*:



Окончательное образование нитрата как продукта трансформации в результате процесса (биохимического) окисления мочевины можно представить реакциями:



что возможно при достаточной щёлочности почвы, нейтрализующей кислоту (например, присутствие бикарбонатного или карбонатного аниона, чернозёмов).

5. Наконец, возможно протекание процесса биотрансформации (условного окисления) мочевины с ограниченным количеством кислорода по схеме:



Этот механизм может реализоваться в том случае, если в реакционном объёме существует дефицит вспомогательных ионов (например, бикарбоната натрия). Тогда синтез конечного вещества и соблюдение материального баланса происходят за счёт «химического материала» мочевины.

Бактериальные штаммы, участвующие в переработке мочевины, являются грамотрицательными, при этом *Nitrosomonas* размножаются бинарным делением в отличие от *Nitrobacter*, размножающихся почкованием.

С учётом вышесказанного представляло интерес оценить ингибирующее воздействие наиболее широко применяемого в животноводстве антибиотика – тетрациклина гидрохлорида – на один из важнейших процессов, обеспечивающих круговорот азота в природе, – биотрансформацию мочевины и изучить его влияние на сопряжённые процессы аммонификации и нитрификации. Располагая разработанными новыми эксклюзивными [22, 23] хроматографическими методами контроля самой мочевины и продуктов её гидролиза (нитрита), мы получили возможность установить в количественном отношении ингибирующее влияние тетрациклина на процесс биотрансформации карбамида, используя методические подходы, базирующиеся на количественном анализе продуктов гидролиза во времени на всех стадиях превращения мочевины: от исходного вещества до конечного продукта – нитрат-иона. Такая методология сравнительного анализа продуктов гидролиза во времени позволяет в присутствии ингибиторов дифференцированно оценить биохимическую активность штаммов бактерий, ответственных за ту или иную стадию превращения веществ. Или, другими словами, оценить устойчивость соответствующих почвенных штаммов к тетрациклину. При этом сама почва, отобранная в достаточном количестве в одном и том же месте, рассматривается в качестве усреднённого источника уреазы и штаммов *Nitrosomonas* и *Nitrobacter* для получения воспроизводимых результатов, без чего на сегодняшний день невозможно объективно судить об актуальности самой проблемы химического контроля тетрациклина в почве, других объектах окружающей среды и перспективе разработок методов контроля этого вещества.

Материалы и методы

Контроль содержания мочевины. Концентрацию мочевины в водной фазе определяли эксклюзивным способом, разработанным авторами. В литературе отсутствуют данные о применении хроматографии для определения мочевины за исключением [22].

В развитие метода, описанного в [22], при применении катионной колонки «Аквилон» C1 в качестве элюента ис-

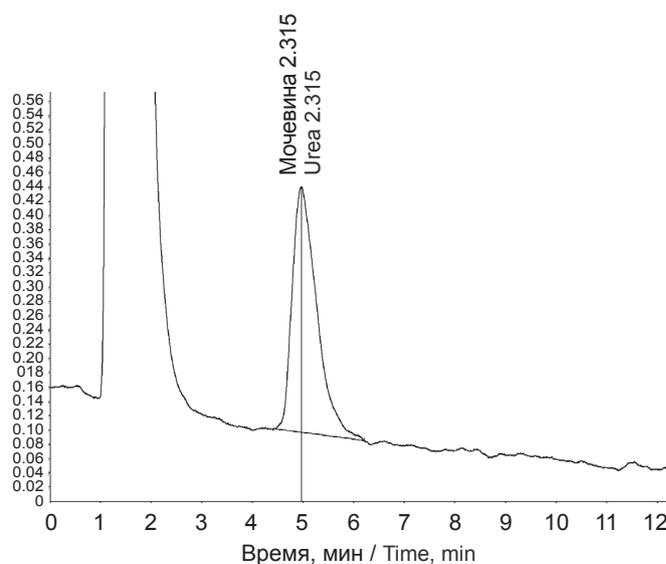


Рис. 1. Хроматографический пик мочевины ($C = 100 \text{ мг/дм}^3$), полученный на колонке C1 «Аквилон», элюент – метансульфоновая кислота $0,9 \text{ мМоль/дм}^3$, детектирование кондуктометрическое.

Fig. 1. Chromatographic peak of urea ($C = 100 \text{ mg/dm}^3$) obtained on column C1 “Aquilon”, eluent – 0.9 mMol/dm^3 methanesulfonic acid, conductometric detection.

пользовали водный раствор метансульфоновой (а не метановой) кислоты $0,9 \text{ мМоль/дм}^3$ (удельная электропроводность $\lambda \approx 100 \text{ мкS/см}$). Скорость элюирования $0,85 \text{ см}^3/\text{мин}$, объём петли дозатора 250 мкл . Время выхода пика карбамида $\sim 5 \text{ мин}$. В отличие от методологии, описанной в [22], применяли кондуктометрическое, а не амперометрическое детектирование без подавления фона. Этот вариант анализа в итоге оказался менее трудоёмким и менее затратным по времени при хорошей форме хроматографического пика карбамида (рис. 1). Предел обнаружения без концентрирования пробы при прямом вводе составил 5 мг/дм^3 .

Для обеспечения оптимального режима работы разделяющей колонки использовалась (как и в [22]), по мере необходимости, пробоподготовка, которая включала удаление солевого фона с использованием сорбента смешанного действия Пьюролайт MB 400 ($100 \text{ мг сорбента на } 20 \text{ см}^3$ пробы, условия сорбции статические, время сорбции $0,5 \text{ ч}$). Применение сорбента смешанного действия позволило удалить не только неорганические компоненты, но и природные гуминовые и фульвокислоты из водной фазы перед введением аликвоты в хроматограф. В таком случае возможно концентрирование пробы за счёт упаривания до 10 раз, а предел обнаружения карбамида в этом варианте анализа составляет $0,5 \text{ мг/дм}^3$.

На рис. 1 представлена хроматограмма, иллюстрирующая вышесказанное. Пик мочевины соответствует смоделированной концентрации 100 мг/дм^3 на фоне водопроводной воды; проба не подвергалась предварительной пробоподготовке, вводилась в хроматографическую систему прямым вводом.

Поскольку пик натрия (первый из катионного ряда) при таких условиях элюирования выходит на $\sim 65 \text{ мин}$, для водных образцов с содержанием аммонийного иона менее 5 мг/дм^3 применялся следующий алгоритм проведения анализа по определению мочевины: последовательное введение ~ 10 образцов для получения пиков мочевины на одном файле. Затем выполняется промывка колонки $5 \text{ мМоль/дм}^3 \text{ HNO}_3$ в течение 25 мин, после чего можно проводить следующий цикл измерений с использованием раствора метансульфоновой кислоты в качестве элюента.

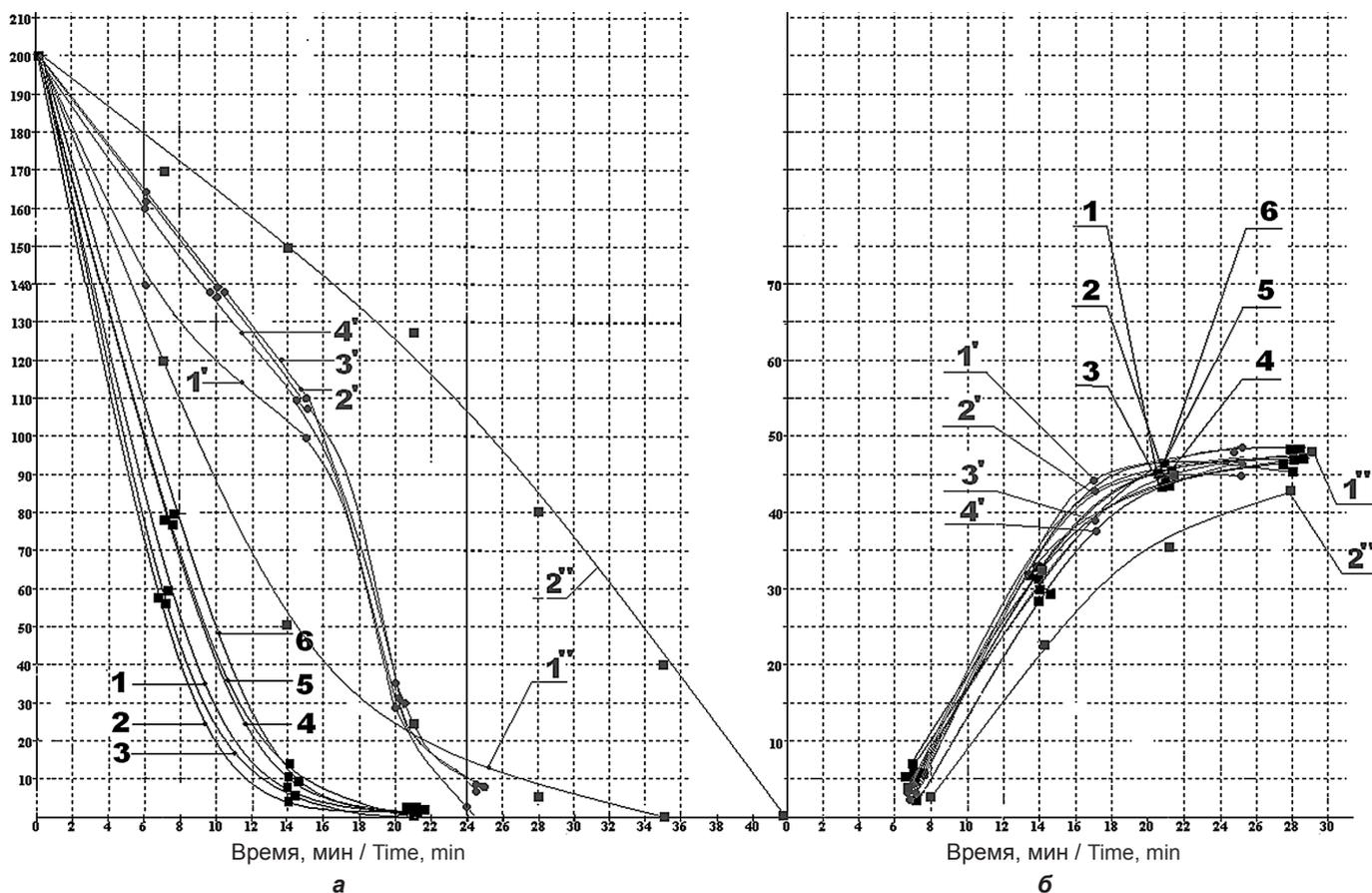


Рис. 2. Кинетика биоразложения мочевины (а) и образования аммония (б). Кривые 1, 2, 3, 4, 5, 6 – содержание тетрациклина гидрохлорида: 0, 1, 10, 50, 100, 200 мг/дм³. Кривые 1', 2', 3', 4' – содержание тетрациклина гидрохлорида: 0, 10, 50, 150 мг/дм³. Опыты проведены при барботаже воздуха через водную фазу. Кривые 1'' – содержание ионов свинца – 1 мг/дм³; 2'' – содержание ионов хрома – 1 мг/дм³.

Fig. 2. Kinetics of biodegradation of urea (a) and formation of ammonium (b). Curves 1, 2, 3, 4, 5, 6 – tetracycline hydrochloride content: 0, 1, 10, 50, 100, 200 mg/dm³. Curves 1', 2', 3', 4' – tetracycline hydrochloride content: 0, 10, 50, 150 mg/dm³. The experiments were carried out with air bubbling through the water phase. Curves 1'' – lead ion content – 1 mg/dm³; 2'' – chromium ion content – 1 mg/dm³.

Ограничение по иону аммония связано с сильным уходом нулевой линии вниз в присутствии аммонийного иона сразу после выхода свободного объема и её длительным подъёмом, что сильно искажает или полностью маскирует пик мочевины при мешающих концентрациях $[\text{NH}_4^+] > 5 \text{ мг/дм}^3$.

Контроль содержания ионов аммония. При анализе ионов аммония использована разделяющая колонка Shodex IC YS-50 150/4,6, Japan. Элюент – 2,5 мМоль/дм³ метансульфоновой кислоты; скорость потока – 0,75 см³/мин; детектирование кондуктометрическое без подавления фона, температура колонки плюс 30 °С, объём петли дозатора 10 мкл, давление 5,5 МПа.

Контроль содержания нитрат-ионов. При определении нитрата применялась разделяющая колонка Phenomenex Star-Ion A 300 100/4,6, USA. Элюент – 1,8 мМоль/дм³ Na₂CO₃ + 1,7 мМоль/дм³ NaHCO₃; скорость потока – 1 см³/мин; детектирование кондуктометрическое со стандартным капиллярным подавлением фона, температура колонки плюс 30 °С; объём петли дозатора 5 мкл; давление 2,4 МПа.

Контроль содержания нитрит-ионов. При определении нитрита была использована разделяющая колонка Phenomenex Star-Ion A300 100/4,6, USA; элюент – 1,8 мМоль/дм³ Na₂CO₃ + 1,7 мМоль/дм³ NaHCO₃; скорость потока – 1 см³/мин; детектирование амперометрическое с капиллярным эксклюзивным подавлением фона [20], $U_{\text{анодное}} = +1,05 \text{ В}$; температура колонки плюс 30 °С; объём петли дозатора 5 мкл; давление 2,4 МПа.

Контроль концентрации ионов свинца и хрома. Контроль концентрации ионов хрома и свинца осуществляли методом атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией (ЭТА) с использованием атомно-абсорбционного спектрометра МГА-915 МД.

Постановка эксперимента. При проведении опытов навеска тетрациклина гидрохлорида растворялась в бидистиллированной воде ($C = 1; 10; 50; 100; 200 \text{ мг/дм}^3$); навеска ($m = 200 \text{ мг}$) синтетического карбамида растворялась в этих же объёмах ($C_0 = 200 \text{ мг/дм}^3; V = 1 \text{ дм}^3$). В экспериментах использовали объём раствора $V = 0,4 \text{ дм}^3$, в который в качестве источника уреазы и микробиологической среды помещали 10 г почвы. Соотношение твёрдой и жидкой фаз равнялось 1 : 40.

Как источник микробиологической среды была использована дерново-подзолистая почва из Учебно-опытного почвенно-экологического центра «Чашниково» МГУ им. М.В. Ломоносова (УО ПЭЦ МГУ «Чашниково», Экспериментальный плодовый сад и питомник растений). Почва этой местности слабо минерализована, и переход неорганических компонентов в водную фазу при её использовании незначителен. Почва имеет слабокислую реакцию, что существенно для устойчивости тетрациклина, который сохраняет активность в кислой среде лучше, чем в щелочной [3].

Для сопоставления ингибирующей активности тетрациклина и тяжёлых металлов аналогичные опыты параллельно

были поставлены с растворами ионов свинца и хрома с концентрацией $C_0 = 1 \text{ мг/дм}^3$.

Процесс гидролиза карбамида проводили при температуре плюс 30°C , выход продуктов контролировали ионохроматографическим методом с двумя детекторами (амперометрическим и кондуктометрическим) с катионными и анионными колонками. В ходе эксперимента определяли концентрацию мочевины и промежуточных продуктов гидролиза: аммония, нитритов и нитратов. Поскольку штаммы, обуславливающие биотрансформацию карбамида, являются аэробными, исследования проводили при двух факторах: с принудительной аэрацией водной фазы (барботажем воздуха) и без аэрации. Таким образом, кинетику биохимических превращений изучали при нескольких внешних факторах воздействия: наличии ингибиторов (тетрациклин, металлы) и наличии (отсутствии) принудительной аэрации. Результаты усреднялись по трём сериям повторных опытов.

Результаты

Полученные результаты представлены на рис. 2–4. Исследования показали, что тетрациклин оказывает выборочное влияние на микробиологическую активность организмов, обуславливающих поэтапное биохимическое окисление мочевины и промежуточных продуктов её гидролиза в зависимости от концентрации антибиотика в реакционной зоне.

Из рис. 2 следует, что замедляющее действие на процесс биотрансформации на начальном этапе оказывают ионы тяжёлых металлов (свинца и хрома), воздействие же антибиотика на уреазные бактерии отсутствует, так как кинетика уменьшения концентрации мочевины, а также кинетика выхода ионов аммония сравнимы для холостых водных растворов и для растворов, содержащих тетрациклин в концентрациях от 1 до 200 мг/дм^3 . При этом воздействие хрома (см. рис. 2, кривая 2'') на кинетику снижения концентрации карбамида и кинетику образования аммония более значимо, чем воздействие свинца (см. рис. 2, кривая 1''), что объяснимо меньшим произведением растворимости карбоната свинца (и соответственно выведением его из реакционной зоны в виде осадка), чем гидроксида хрома [24].

Рис. 3 и рис. 4 иллюстрируют ингибирующее влияние тетрациклина гидрохлорида на активность бактериальных штаммов *Nitrobacter*, обуславливающих биохимическое окисление нитрита до нитрата. Кривые 1, 2, 3 (см. рис. 3) иллюстрируют меньшее накопление нитрита в случае холостого опыта и опытов с малым содержанием антибиотика (0 ; 1 ; 10 мг/дм^3) по сравнению с кривыми 4, 5, 6, показывающими накопления нитрита (см. рис. 3) при концентрации антибиотика 50 ; 100 ; 200 мг/дм^3 . Для больших концентраций тетрациклина содержание накопившегося нитрита (не переработанного *Nitrobacter*) выше в ~ 2 раза, и кинетика его распада медленнее на ~ 10 – 15 дней (медленнее ~ 2 раза), что полностью коррелирует с кинетическими кривыми образования конечного продукта – нитрата, сдвиг кривых образования которого составляет порядка 13 – 15 дней для больших концентраций антибиотика (см. рис. 4, кривые 4, 5, 6) по сравнению с холостым опытом и малыми концентрациями (см. рис. 4, кривые 1, 2, 3).

При принудительном барботаже воздуха на этих стадиях превращений также наблюдается общее ингибирующее действие избытка кислорода, что выражено в более высоких концентрациях накопившегося нитрита и временном сдвиге кривых образования нитрата (см. рис. 3, 4, кривые 1', 2', 3', 4').

Представляет интерес характер самих кривых накопления и распада нитрита, а также вид кривых выхода нитрата. Резкое падение концентрации нитрита после прохождения максимума (см. рис. 3), коррелирующее со скачкообразным подъёмом кривых образования нитрата (см. рис. 4), может свидетельствовать о резком скачкообразном размножении бактерий штамма *Nitrobacter*. Опыты по определению времени устойчивости тетрациклина в водной фазе показали, что

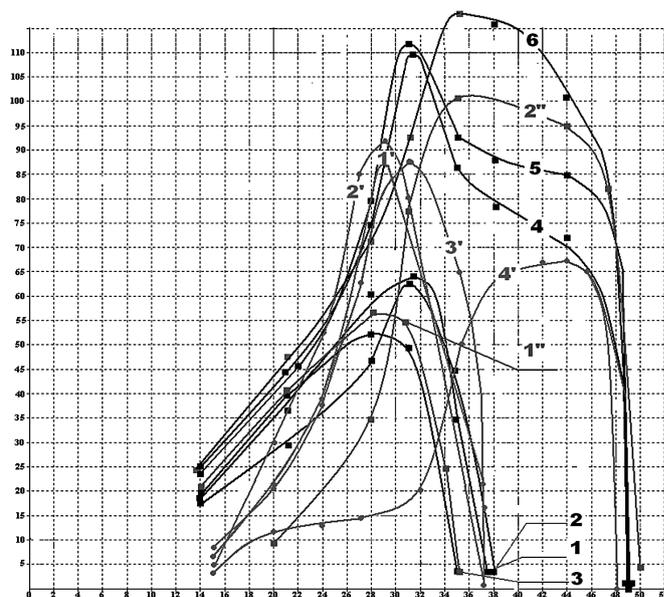


Рис. 3. Кинетика биотрансформации нитрита. Кривые 1, 2, 3, 4, 5, 6 – содержание тетрациклина гидрохлорида: 0, 1, 10, 50, 100, 200 мг/дм^3 . Кривые 1', 2', 3', 4' – содержание тетрациклина гидрохлорида: 0, 10, 50, 150 мг/дм^3 . Опыты проведены при барботаже воздуха через водную фазу. Кривые 1'' – содержание ионов свинца – 1 мг/дм^3 ; 2'' – содержание ионов хрома – 1 мг/дм^3 .

Fig. 3. Kinetics of nitrite biotransformation. Curves 1, 2, 3, 4, 5, 6 – tetracycline hydrochloride content: 0, 1, 10, 50, 100, 200 mg/dm^3 . Curves 1', 2', 3', 4' – tetracycline hydrochloride content: 0, 10, 50, 150 mg/dm^3 . The experiments were carried out with air bubbling through the water phase. Curves 1'' – lead ion content – 1 mg/dm^3 ; 2'' – chromium ion content – 1 mg/dm^3 .

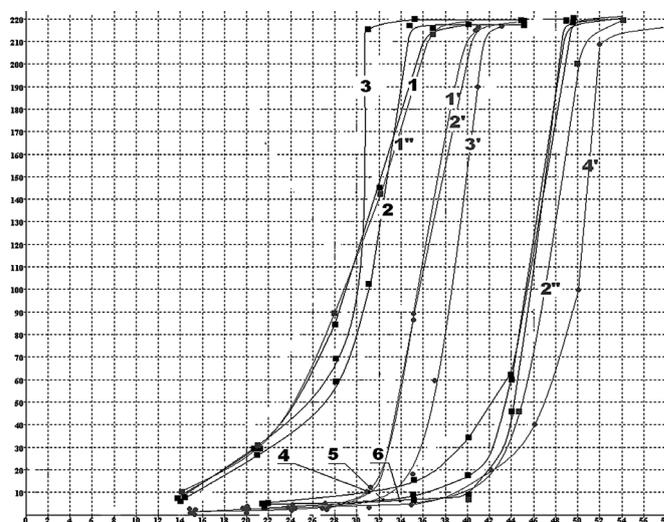


Рис. 4. Кинетика образования нитрата. Кривые 1, 2, 3, 4, 5, 6 – содержание тетрациклина гидрохлорида: 0, 1, 10, 50, 100, 200 мг/дм^3 . Кривые 1', 2', 3', 4' – содержание тетрациклина гидрохлорида: 0, 10, 50, 150 мг/дм^3 . Опыты проведены при барботаже воздуха через водную фазу. Кривые 1'' – содержание ионов свинца – 1 мг/дм^3 ; 2'' – содержание ионов хрома – 1 мг/дм^3 .

Fig. 4. Kinetics of nitrate formation. Curves 1, 2, 3, 4, 5, 6 – tetracycline hydrochloride content: 0, 1, 10, 50, 100, 200 mg/dm^3 . Curves 1', 2', 3', 4' – tetracycline hydrochloride content: 0, 10, 50, 150 mg/dm^3 . The experiments were carried out with air bubbling through the water phase. Curves 1'' – lead ion content – 1 mg/dm^3 ; 2'' – chromium ion content – 1 mg/dm^3 .

его активность в отношении широко известных грамотрицательных штаммов бактерий *Salmonella* и *E. coli* [25, 26] сохраняется от 30 до 45 дней, что коррелирует с полученными результатами по почвенным штаммам.

Обсуждение

Эксперименты с ионами тяжёлых металлов были поставлены для сравнения воздействия общеизвестных поллютантов (ионов свинца и хрома) и тетрациклина на процесс биотрансформации мочевины в идентичных условиях. Ингибирующее действие ионов свинца носит ограниченный кинетический характер из-за осаждения карбоната свинца и проявляется только на стадии I гидролиза мочевины (концентрация ионов свинца после первой недели эксперимента составляет ~ 5 мкг/дм³ при исходной концентрации 1 мг/дм³), а ингибирующее действие ионов хрома прослеживается по всей цепочке превращений от мочевины до нитратов (концентрация ионов хрома ~ 0,6 мг/дм³ и постоянна в течение 5 нед эксперимента, исходная концентрация также равна 1 мг/дм³). Из этого можно сделать вывод о том, что биохимические процессы протекают в водной фазе, а не на твёрдой поверхности почвы.

Неожиданным и интересным стал факт ингибирующего действия избыточного кислорода на процесс биотрансформации. Поскольку штаммы почвенных бактерий являются аэробными, изначально предполагалось, что аэрация должна увеличить скорость протекания биохимических процессов, однако замедляющий эффект от избытка кислорода был отмечен для всех стадий в цепи превращений от мочевины до нитрата, за исключением кинетики образования аммония, который является промежуточным продуктом. По-видимому, его «приход» и «расход» менее зависимы от концентраций других компонентов. Иными словами, чем меньше «приход» аммония, тем меньше его «расход», а чем больше «приход» аммония, тем больше и его «расход».

Основным результатом проведённых исследований является установление факта селективного ингибирующего действия тетрациклина гидрохлорида на почвенные бактериальные грамотрицательные штаммы *Nitrobacter*, обуславливающие биотрансформацию нитрита в нитрат, что с высокой степенью вероятности можно считать доказанным. В отношении остальных почвенных штаммов (уреазных или *Nitrosomonas*) воздействия тетрациклина гидрохлорида, существенно влияющего на процессы биотрансформации веществ, не выявлено. Учитывая эксклюзивность авторских методов физико-химического анализа (хроматографический контроль содержания мочевины и ионов нитрита и включающий эти методы сам подход по комплексному контролю во времени всех стадий биотрансформации мочевины от исходного вещества до нитрат-ионов), в методическом отношении работа является новой и не имеющей аналогов.

Представляет интерес проведение на основе этой методологии более широкой оценки воздействия антибиотика при варьировании условий проведения эксперимента: рН, солевой фон, характер почвы (включая щелочные почвы). Эти параметры дальнейших экспериментов обсуждались выше в разделе «Ограничения исследований». К вышесказанному

можно добавить, что процесс поглощения антибиотика почвой является сложным, обусловленным химическим взаимодействием между активными (гуминовыми) веществами почвы и аминными группами тетрациклина. Количественная десорбция целевого вещества из почвенных образцов и его инструментальное определение в методическом плане представляются в дальнейшем решаемыми, но достаточно трудоёмкими задачами — химической и аналитической.

Заключение

Представленные результаты позволяют сделать следующие выводы.

1. В отличие от ионов тяжёлых металлов (хрома, см. рис. 2–4, кривая 2”), ингибирующих все стадии биотрансформации мочевины от распада исходного вещества до образования ионов нитрата, антибиотик тетрациклина гидрохлорид ингибирует жизнедеятельность почвенных штаммов *Nitrobacter*, обеспечивающих биотрансформацию нитрита в нитрат. Следствием угнетения штаммов *Nitrobacter*, в частности, может быть накопление в окружающей среде нитрит-ионов (для которых ПДК в воде рыбохозяйственного значения, например, составляет всего 0,08 мг/дм³) — наиболее токсичного из всех веществ, образующихся в процессах трансформации мочевины и продуктов её гидролиза. Как было показано в [22], рост концентрации нитрит-ионов в воде различных водных объектов, включая системы городского водоснабжения, на сегодняшний день можно считать установленным фактом. По данным авторов, полученным в марте 2022 г., содержание аммония, нитритов и нитратов в воде после аэротенков Курьяновских очистных сооружений составило соответственно 20; 2,2; 140 мг/дм³. Поэтому добавление ещё одного фактора загрязнения окружающей среды в виде тетрациклина, который потенциально способен замедлять кинетику биоразложения нитритов и обуславливать их концентрирование в окружающей среде, однозначно можно охарактеризовать как негативное явление, а разработку методов контроля тетрациклина в почве признать востребованной.

2. Влияние тетрациклина на уреазную биотрансформацию самой мочевины, а также на процессы дальнейшего биоразложения образовавшихся промежуточных продуктов (аммония) в пределах погрешности эксперимента (~ 20%) можно считать несущественными. Устойчивость к тетрациклину *Nitrosomonas* по сравнению с *Nitrobacter* в условиях разведения эксперимента может быть обусловлена рядом различий между ними. Одним из известных различий между штаммами является способ размножения: *Nitrosomonas* — делением, *Nitrobacter* — преимущественно почкованием. *Nitrosomonas* представлены большим количеством видов, приспособленных к определённым условиям жизни [27], но все они потребляют аммоний. *Nitrobacter* сосуществуют с другими бактериями, обеспечивающими процессы круговорота азота, а энергия преобразования нитрита в нитрат невысока. *Nitrobacter* реализуют более «тонкие» механизмы использования этой энергии по сравнению с другими штаммами [28–30], что может влиять и на их размножение, и на устойчивость к негативному внешнему воздействию, в данном случае — к воздействию тетрациклина гидрохлорида.

Литература

(п.п. 5–7, 11, 19, 21, 27–30 см. References)

1. Акименко Ю.В., Казеев К.Ш., Колесников С.И., Минникова Т.В. Оценка устойчивости экологических функций почв к загрязнению антибиотиками. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2017; 19(2–2): 207–10.
2. Мирошникова М.С., Мирошникова Е.П., Аринжанов А.Е., Киякова Ю.В. Применение антибиотиков в сельском хозяйстве и альтернативы их использования. *Аграрный научный журнал*. 2021; (5): 65–70. <https://doi.org/10.28983/asj.2021i5pp65-70>
3. Наваши С.М., Фомина И.П. *Справочник по антибиотикам*. М.: Медицина; 1974.
4. Донкова Н.В., Донков С.А., Кадетова М.Ю. Изучение устойчивости к антибиотикам бактерий рода *Bacillus* методом серийных разведений. *Вестник Красноярского государственного аграрного университета*. 2019; (3): 71–8.
5. Забелина О.Н. Ферментативная активность почвы природно-рекреационных ландшафтов урбанизированных территорий. *Современные проблемы науки и образования*. 2014; (2): 493.
6. Свирикене А. Микробиологические и биохимические показатели при оценке антропогенного воздействия на почвы. *Почвоведение*. 2003; (2): 202–10.
7. Швакова Э.В. Изменение активности уреазы при повышенных содержаниях тяжелых металлов (Pb, Zn, Cu) в почве. *Arctic Environmental Research*. 2013; (2): 202–10.
8. Черникова В.А., Чекереса А.И. *Агроэкология*. М.: Колос; 2000.

Original article

13. Гиззатова Г.Л., Шипаева Т.А. Уреаза – ключевой фермент деградации мочевины. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2016; (3–3): 88–90. <https://doi.org/10.18454/IRJ.2016.45.175>
14. Рыжак А.В., Кукконен Н.А. Мочевина в водных объектах гумидной зоны. *Экологическая химия*. 2014; 23(1): 44–8.
15. Шаравьев П.В., Неверова О.П., Ильясов О.Р., Шкуратова И.А. Биоиндикация состояния водных экосистем в зоне птицефабрик. *Аграрный вестник Урала*. 2013; (4): 67–9.
16. Каррер П. *Курс органической химии*. Госхимиздат. Ленинград; 1962.
17. Федотов Г.Н., Неклюдов А.Д., Горшкова А.В., Пахомов Е.И., Поздняков А.И. Способ определения скорости гидролиза мочевины уреазой в почвах. Патент на изобретение РФ 2236004 С1; 2004.
18. Пахота А.А., Федоренко Е.С., Крепакова М.Р. Изменение уреазной активности при искусственном загрязнении почвы и внесении биочара. В кн.: *Фундаментальные основы биогеохимических технологий и перспективы их применения в охране природы, сельском хозяйстве и медицине. Труды XII Международной биогеохимической школы, посвященной 175-летию со дня рождения В.В. Докучаева*. Тула; 2021: 163–6.
20. Авдеенков П.П., Чистяков Н.Е. Биохимический механизм аммонификации. В кн.: *Сборник трудов XXII научно-практической конференции «Российская наука в современном мире»*. М.; 2019: 16–7.
22. Абрамов Е.Г., Малышева А.Г. Биотрансформация мочевины в воде водных объектов. *Гигиена и санитария*. 2022; 101(1): 21–9. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-1-21-29>
23. Абрамов Е.Г., Малышева А.Г. Ионхроматографическое амперометрическое определение йодидов, нитритов, и железа двухвалентного в воде. *Гигиена и санитария*. 2020; 99(11): 1307–12. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-11-1288-1293>
24. Никольский Б.П. *Справочник химика в 6 томах. Том 3*. М.: Ленинград; 1964.
25. Скитович Г.С., Шадрова Н.Б., Прунтова О.В., Серова К.Б., Шмайхель С.Е. Идентификация и антибиотикорезистентность изолятов бактерий рода *Salmonella*. *Ветеринария сегодня*. 2018; (4): 3–11. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2018-4-27-3-7>
26. Стецюк О.У., Решедько Г.К. Сравнение результатов определения чувствительности к антибиотикам грамотрицательных аэробных бактерий диско-диффузионным методом на среде АГВ и агаре Мюллера–Хинтона. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2004; 6(2): 155–67.

References

1. Akimenko Yu.V., Kazeev K.Sh., Kolesnikov S.I., Minnikova T.V. Estimation the soil ecological functions sustainability to antibiotic pollution. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk*. 2017; 19(2–2): 207–10. (in Russian)
2. Miroshnikova M.S., Miroshnikova E.P., Arinzhano A.E., Kilyakova Yu.V. Application of antibiotics in agriculture and alternatives of their use. *Agrarnyy nauchnyy zhurnal*. 2021; (5): 65–70. <https://doi.org/10.28983/asjy2021i5pp65-70> (in Russian)
3. Navashin S.M., Fomina I.P. Handbook of Antibiotics [Spravochnik po antibiotikam]. *Moscow: Meditsina*; 1974. (in Russian)
4. Donkova N.V., Donkov S.A., Kadetova M.Yu. Studying the stability to antibiotics of bacteria of the genus *Bacillus* by serial breeding method. *Vestnik Krasnoyarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2019; (3): 71–8. (in Russian)
5. Shao L., You C., Cao J., Jiang Y., Liu Y., Liu Q. High treatment failure rate is better explained by resistance gene detection than by minimum inhibitory concentration in patients with urogenital Chlamydia trachomatis infection. *Int. J. Infect. Dis.* 2020; 96: 121–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.015>
6. Oliveira L., Langoni H., Hulland C., Ruegg P.L. Minimum inhibitory concentrations of *Staphylococcus aureus* recovered from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. *J. Dairy. Sci.* 2012; 95(4): 1913–20. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4938>
7. Kappaun K., Piovesan A.R., Carlini C.R., Ligabue-Braun R. Ureasases: historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – A review. *J. Adv. Res.* 2018; 13: 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.05.010>
8. Zabelina O.N. Enzymatic activity of recreational landscapes soil in urban areas. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2014; (2): 493. (in Russian)
9. Svirskene A. Microbiological and biochemical indicators of anthropogenic impacts on soils. *Pochvovedenie*. 2003; (2): 202–10. (in Russian)
10. Shvakova E.V. Changes in urease activity with high content of heavy metals (Pb, Zn, Cu) in the soil. *Arctic Environmental Research*. 2013; (2): 202–10. (in Russian)
11. Qin S., Hu C., Dong W. Nitrification result in underestimation of soil urease activity as determined by ammonium production rate. *Pedobiologia*. 2010; 53(6): 401–4.
12. Chernikova V.A., Chekeres A.I. *Agroecology [Agroekologiya]*. Moscow; 2000. (in Russian)
13. Gizatova G.L., Shipaeva T.A. Urease – a key enzyme in the biodegradation of urea. *Mezhdunarodnyy nauchno-issledovatel'skiy zhurnal*. 2016; (3–3): 88–90. <https://doi.org/10.18454/IRJ.2016.45.175> (in Russian)
14. Ryzhakov A.V., Kukkonen N.A. Urea in water bodies of the humid zone. *Ekologicheskaya khimiya*. 2014; 23(1): 44–8. (in Russian)
15. Sharaviev P.V., Neverova O.P., Ilyasov O.R., Shkuratova I.A. Bioindication of aquatic ecosystems in the poultry farms. *Agrarnyy vestnik Urala*. 2013; (4): 67–9. (in Russian)
16. Karer P. *Course of Organic Chemistry [Kurs organicheskoy khimii]*. Leningrad; 1962. (in Russian)
17. Fedotov G.N., Neklyudov A.D., Gorshkova A.V., Pakhomov E.I., Pozdnyakov A.I. Method for determining the rate of urea hydrolysis by urease in soils. Patent RF No. 2236004 C1; 2004. (in Russian)
18. Pakhota A.A., Fedorenko E.S., Krepaкова M.R. Changes in urease activity during artificial soil pollution and the introduction of biochar. In: *Fundamental Foundations of Biogeochemical Technologies and Prospects for their Application in Nature Conservation, Agriculture and Medicine. Proceedings of the XII International Biogeochemical School Dedicated to the 175th Anniversary of the Birth of V.V. Dokuchaev [Fundamental'nye osnovy biogeokhimicheskikh tekhnologiy i perspektivy ikh primeneniya v okhrane prirody, sel'skom khozyaystve i meditsine. Trudy KhII Mezhdunarodnoy biogeokhimicheskoy shkoly, posvyashchennoy 175-letiyu so dnya rozhdeniya V.V. Dokuchaeva]*. Tula; 2021: 163–6. (in Russian)
19. Nicolle A., Cagnina S., de Bruin T. First-principle based modeling of urea decomposition kinetics in aqueous solutions. *Chem. Phys. Lett.* 2016; 664: 149–53.
20. Avdeenko P.P., Chistyakov N.E. Biochemical mechanism of ammonification. In: *Proceedings of the XXII Scientific and Practical Conference «Russian Science in the Modern World» [Sbornik trudov KhKhII nauchno-prakticheskoy konferentsii «Rossiyskaya nauka v sovremennom mire»]*. Moscow; 2019: 16–7. (in Russian)
21. Sonthiphand P., Neufeld J.D. Nitrifying bacteria mediate aerobic ammonia oxidation and urea hydrolysis within the Grand River. *Aquat. Microb. Ecol.* 2014; 73(2): 151–62.
22. Abramov E.G., Malysheva A.G. Biotransformation of urea in the water of water bodies. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2022; 101(1): 21–9. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-1-21-29> (in Russian)
23. Abramov E.G., Malysheva A.G. Ionic chromatographic determination of iodides, nitrites and bivalent iron in water with amperometric detector. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2020; 99(11): 1307–12. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-11-1288-1293> (in Russian)
24. Nikolskiy B.P. *Handbook of a Chemist in 6 Volumes. Volume 3 [Spravochnik khimika v 6 tomakh. Tom 3]*. Moscow: Leningrad; 1964. (in Russian)
25. Skitovich G.S., Shadrova N.B., Pruntova O.V., Serova K.B., Shmaykhel S.E. Identification and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates. *Veterinariya segodnya*. 2018; (4): 3–11. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2018-4-27-3-7> (in Russian)
26. Stetsyuk O.U., Reshed'ko G.K. Comparison of the results of determining the sensitivity to antibiotics of gram-negative aerobic bacteria by the disk-diffusion method on AGV medium and Muller-Hinton agar. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2004; 6(2): 155–67. (in Russian)
27. Nakagawa T., Takahashi R. *Nitrosomonas stercoris* sp. nov., a chemoautotrophic ammonia-oxidizing bacterium tolerant of high ammonium isolated from composted cattle manure. *Microbes Environ.* 2015; 30(3): 221–7. <https://doi.org/10.1264/jsm2.me15072>
28. Grunditz C., Dalhammar G. Development of nitrification inhibition assays using pure cultures of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*. *Water Res.* 2001; 35(2): 433–40. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00312-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00312-2)
29. Kirstein K., Bock E. Close genetic relationship between *Nitrobacter hamburgensis* nitrite oxidoreductase and *Escherichia coli* nitrate reductases. *Arch. Microbiol.* 1993; 160(6): 447–53. <https://doi.org/10.1007/bf00245305>
30. Yool A., Martin A.P., Fernández C., Clark D.R. The significance of nitrification for oceanic new production. *Nature*. 2007; 447(7147): 999–1002. <https://doi.org/10.1038/nature05885>