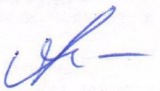


На правах рукописи



Handwritten signature in blue ink, consisting of stylized initials and a horizontal line.

АНТРОПОВА НАТАЛЬЯ СЕРГЕЕВНА

**МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ГИГИЕНИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ  
АНТИБИОТИКА ТЕТРАЦИКЛИНА В ПОЧВЕ**

3.2.1 – Гигиена

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России).

**Научный руководитель:**

Кандидат медицинских наук

**Ушакова Ольга Владимировна**

**Официальные оппоненты:**

**Шейна Наталья Ивановна** – доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры гигиены Института профилактической медицины им. З.П. Соловьева Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Радилов Андрей Станиславович** – доктор медицинских наук, профессор, исполняющий обязанности директора Федерального государственного унитарного предприятия «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства России.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе».

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 202\_\_ г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д.68.1.011.01 при ФГБУ «ЦСП» ФМБА России по адресу: 119121, г. Москва, ул. Погодинская, д.10, стр.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства и на сайте Учреждения <https://www.cspfmba.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

**Водянова Мария Александровна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы и степень её разработанности.** Начиная со второй половины XX века, антибиотики стали широко применяться в разных сферах деятельности человека: в медицине, пищевой промышленности, растениеводстве, животноводстве и птицеводстве [Чеснокова, 2018]. Одним из негативных последствий их активного применения является развитие антибиотикорезистентности (АР), что признано одной из главных угроз общественному здоровью и безопасности в мире [WHO, 2023].

Проблема АР рассматривается многими организациями, включая Всемирную организацию здравоохранения и Центры по контролю и профилактике заболеваний (Centers for Disease Control and Prevention), что способствует разработке стратегий по её предотвращению [Давидович, 2020]. Так в России в 2017 г. была утверждена Стратегия предупреждения распространения АР в Российской Федерации на период до 2030 г, а 30 декабря 2020 г. был принят закон N 492-ФЗ "О биологической безопасности в Российской Федерации", где распространение АР относится к основным угрозам биологической безопасности, вводятся ограничения на применение терапевтических препаратов и устанавливается контроль за ними.

В то же время масштаб влияния от попадания антибиотиков в окружающую среду не определён. На рынке продаются минимум 70% антибиотиков, которые используются для лечения человека, также применяются в ветеринарии [Лаврухина, 2022]. Несоблюдение регламентов их использования приводит к попаданию антибиотиков в животноводческую продукцию, воду и почву, усугубляя проблему распространения АР [Сусоñ, 2019, Conde-Cid, 2019].

В России вопрос нормирования антибиотиков касается преимущественно продуктов питания, где строгие нормативы обеспечивают безопасность потребителей. В то же время, в окружающей среде мониторинг антибиотиков практически отсутствует, как и нет чётких нормативов по их содержанию, что создаёт потенциальные риски для экосистем и здоровья человека. Нормативные меры включают разработку гигиенических критериев качества воды [Рахманин, Егорова 2014], почвы и воздуха, контроль за использованием антибиотиков в сельском хозяйстве и медицине, а также за утилизацией отходов производства и потребления [Русаков, 2024]. Гигиенические нормативы являются основополагающим регламентом, на котором базируется система общегосударственного контроля за состоянием окружающей среды [Жолдакова, Юдин, 2018]. СанПиН 1.2.3685-21 «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания» содержит значения предельно допустимых концентраций (ПДК) для некоторых антибиотиков в воздухе населённых мест и в воде различных систем водоснабжения.

Актуальность исследования обусловлена отсутствием в России гигиенических нормативов содержания антибиотиков в почве. Их разработка требует учёта множества

факторов, включая тип почвы, её физико-химические свойства и климатические условия. Установление и официальное утверждение гигиенических нормативов в России предусматривает обязательное наличие утвержденных методов контроля, однако на данный момент такие методы отсутствуют. Несмотря на наличие множества научных исследований и методов по определению антибиотиков в почве, результаты этих работ часто оказываются несогласованными, что затрудняет их интерпретацию и сравнение. Одной из причин этих расхождений является применение различных подходов и аналитических методов (хроматографические, электрохимические, электрофоретические, иммунологические и т.д.). Поэтому разработка аттестованной методики является необходимой для обеспечения стандартизации процессов, что, в свою очередь, позволит получать воспроизводимые и сопоставимые результаты, создаст единые стандарты для проведения исследований, направленных на разработку нормативов.

Одним из перспективных направлений является изучение антибиотиков тетрациклиновой группы. Более пятидесяти лет тетрациклины (ТЦ) активно применяются в ветеринарии для лечения и стимуляции роста животных, занимая лидирующие позиции на рынке [EMA,2023]. Несмотря на запреты на использование антибактериальных препаратов для стимуляции роста в некоторых странах с 2006 года [Ришко, 2019] в России закон, запрещающий добавление антибиотиков в корма без рецепта, был принят только в 2022 году. Это обуславливает необходимость исследования кумулятивного эффекта тетрациклинов в окружающей среде, ввиду их долгого бесконтрольного применения. К тому же при низком содержании органических веществ в почве для антибиотика данной группы установлен наибольший риск попадания в пищевую цепь [Лаврухина, 2022].

**Целью работы** являлась разработка методических основ комплексной гигиенической оценки влияния антибиотика тетрациклина на разные типы почв (дерново-подзолистую и чернозём) и метода количественного определения для его последующего нормирования содержания в почве.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

- 1) Выявить биологический эффект и оценить степень воздействия антибиотика ТЦ для двух типов почв: дерново-подзолистой и чернозёма с применением фитотестирования, биотестирования и микробиологических методов;
- 2) Определить максимальный безопасный уровень содержания ТЦ в почвах;
- 3) Подобрать и оптимизировать условия пробоподготовки почвы для количественного определения антибиотика;
- 4) Изучить особенности накопления, распределения, химической трансформации и распада тетрациклина в почвах разных типов;
- 5) Научно обосновать метод для мониторингования антибиотика ТЦ в почве.

**Научная новизна работы.** В результате комплексного исследования по влиянию антибиотика на разные типы почв установлено, что чернозём в большей степени подвержен влиянию ТЦ и продуктов его трансформации: безопасным уровнем содержания ТЦ в дерново-подзолистой почве является 1 мг/г, в чернозёме – 0,01 мг/г. На примере условно-патогенных штаммов *E.coli* доказано, что при попадании в почву, загрязнённую ТЦ, микроорганизмы мутируют с изменением аминокислот в кодируемых белках, что может привести к развитию антибиотикорезистентности.

Впервые описан процесс распада ТЦ в почве путём отщепления азотосодержащих групп, с идентификацией возможных продуктов распада масс-спектрометрическим методом. Методом ионной хроматографии доказано, что ТЦ образует устойчивые комплексы с органическими соединениями и металлами, содержащимися в почве.

**Теоретическая значимость работы.** Проведенные исследования показали, что при попадании ТЦ в почву именно тип почвы определяет биологический эффект воздействия антибиотика. В разных типах почв ТЦ трансформируется с образованием близких по структуре устойчивых комплексов антибиотика с почвенным веществом – эти данные могут стать основой для дальнейшего изучения поведения антибиотиков в почве. Выявленные мутации в геноме микроорганизмов, находящихся в почве с антибиотиком, открывают новое направление изучения биологического риска для здоровья человека и экосистемы.

**Практическая значимость работы.** Разработан и валидирован способ определения ТЦ и продуктов его распада в почве с помощью ВЭЖХ-МС/МС и ионной хроматографии, включающий пробоподготовку, сорбционное концентрирование и хроматографический анализ, позволяющий объективизировать изучение почв, загрязнённых антибиотиком. Разработана методика определения остаточных количеств ТЦ в почве методом ВЭЖХ-МС/МС с чувствительностью 0,001 мг/г для последующей аттестации. Предложенный алгоритм комплексной оценки содержания и трансформации антибиотиков в почве при установлении норматива открывает возможности для дальнейшего нормирования и контроля загрязнений почвы антибиотиками.

Результаты исследований по установлению безопасных концентраций ТЦ в почвах применяются в работе ФГУЗ «ЦГиЭ МО» Подольского филиала (справка о внедрении №122/91 - 3 от 31.03.2025).

**Методология и методы исследований.** Для гигиенической оценки влияния ТЦ на почву применялись методы фитотестирования, биотестирования, микробиологические методы определения биологической активности и самоочищающей способности почвы. Чувствительность выделенных бактерий к ТЦ определялась с помощью диско-диффузионного метода. Для выявления мутаций в геноме бактерий, выделенных из почвы с ТЦ, проводилось

полногеномное секвенирование. Сорбционную ёмкость почвы изучали при помощи ВЭЖХ с амперометрическим детектированием. Для определения ТЦ в почве и продуктов его трансформации использовались методы обращённо-фазовой и ионной хроматографии. Идентификация и количественное определение ТЦ в почве проводилось при помощи метода масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией. Экстрагирование антибиотика из почвы проводили жидкостной экстракцией (ЖЭ) с дополнительной очисткой и концентрированием с помощью твердофазной экстракции (ТФЭ). Достоверность данных подтверждалась статистическим анализом, включающим описательную статистику, оценку нормальности распределения (критерии Шапиро-Уилка), а также параметрический (t-критерий Стьюдента) и непараметрический (U-критерий Манна-Уитни) методы для определения значимости различий между группами.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1) Степень и характер биологического влияния антибиотика тетрациклина на почву показывают, что чернозём более подвержен негативному воздействию, с установленным максимально безопасным уровнем содержания ТЦ - 0,01 мг/г, в то время как дерново-подзолистая почва обладает большей устойчивостью, с максимально безопасным уровнем - 1 мг/г;

2) Разработанная методика на основе ВЭЖХ-МС/МС с оптимизированной пробоподготовкой обеспечивает количественное определение тетрациклина в почве с чувствительностью 0,001 мг/г и извлечение тетрациклина до 80% из дерново-подзолистой почвы и до 30% из чернозёма;

3) Трансформация тетрациклина в почве приводит к образованию устойчивых комплексов с органическими веществами и металлами почвы и подтверждается идентификацией продуктов трансформации с помощью хроматографических методов.

**Степень достоверности и апробация результатов работы.** Достоверность результатов исследования обеспечивается применением современных инструментальных и биологических методов анализа, корректным выбором экспериментальных моделей, достаточным объёмом выборок и повторяемостью опытов, а также статистической обработкой данных с применением критериев достоверности. Результаты работ были представлены и обсуждены на следующих конференциях: VII Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье. Инновационные подходы в решении медико-биологических проблем здоровья населения» (Москва, 2018), Vth International conference «Actual scientific & technical issues of chemical safety» ASTICS-2020 (Казань, 2020), Международная научно-практическая конференция «Здоровье и окружающая среда» (Минск, 2020), II Национальный конгресс с международным участием по экологии человека, гигиене и медицине окружающей среды «Сысинские чтения» (Москва, 2021), XII Всероссийская научно-

практическая интернет-конференция с международным участием «Анализ риска здоровью – 2022 фундаментальные и прикладные аспекты обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения» (Пермь, 2022), Международная научно-практическая конференция «Здоровье и окружающая среда» (Минск, 2023), Всероссийский Форум молодых учёных «Медицинская наука: вчера, сегодня, завтра», посвященный 300-летию Российской Академии Наук и 80-летию отделения медицинских наук РАН» (Москва, 2024), IV Национальный конгрессе с международным участием по экологии человека, гигиене и медицине окружающей среды «Сысинские чтения» (Москва, 2024), Международная научно-практическая конференция «Здоровье и окружающая среда» (Минск, 2024).

**Личный вклад автора** состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования, и заключается в формулировке проблемы, постановке цели и задач работы, выборе методов исследования, выполнении экспериментальных работ, а также обработке, описании, обобщении полученных результатов исследований, подготовке публикаций, написании текста диссертации и автореферата.

**Публикации.** Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 12 печатных изданиях, включая 7 статей в рецензируемых изданиях, из них 4 статьи, представлены в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России для размещения материалов диссертаций по специальности 3.2.1. Гигиена (биологические науки), 5 тезисов докладов.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы, содержащего 180 источников, приложений. Работа изложена на 157 страницах машинописного текста, иллюстрирована 33 рисунками и 17 таблицами.

**Соответствие паспорту научной специальности.** Диссертационное исследование соответствует следующим пунктам паспорта научной специальности 3.2.1 – Гигиена: п. 2 (исследования влияния факторов среды обитания на условия жизнедеятельности и здоровье населения, разработка методологических подходов, гигиенических нормативов в атмосферном воздухе населенных мест, жилых и общественных зданий, в воде водных объектов, почве), п. 10 (разработка и апробация новых методов гигиенических исследований, высокочувствительных аналитических методов обнаружения, идентификации и количественного определения потенциально опасных загрязнителей в различных объектах), п. 11 (разработка санитарно-эпидемиологических и гигиенических требований и профилактических мероприятий, направленных на создание безопасных и благоприятных для человека условий жизнедеятельности).

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили антибиотик тетрациклина гидрохлорид, дерново-подзолистая среднесуглинистая почва, отобранная с опытного поля длительного стационара ФГБНУ «Федерального исследовательского центра «Немчиновка» Московской области (далее – ДП почва) и верхняя часть гумусово-аккумулятивного горизонта типичного чернозема, отобранного в старовозрастной лесополосе, длительное время не находившейся в сельскохозяйственном использовании, заповедник «Каменная степь», Таловского района Воронежской области (далее – Чернозём).

Для проведения модельных экспериментов ТЦ вносили в почву в виде водного раствора и в виде сухого вещества. Исследовали разные концентрации антибиотика в почве: 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 мг/г.

Экотоксикологические и гигиенические исследования проведены в соответствии с общепринятыми принципами, изложенными, в том числе, в МР по гигиеническому обоснованию ПДК химических веществ в почве, и включали фитотестирование с использованием семян однодольных и двудольных культур — овса *Avena sativa* и редиса *Raphanus sativus* L. var. *sativus*; биотестирование на гидробионтах *Daphnia magna* St. и инфузориях *Tetrahymena pyriformis*; микробиологические методы, включающие оценку биологической активности почв (динамика численности сапротрофных бактерий, грибов и актиномицетов) и самоочищающую способность почв от внесённых условно-патогенных культур *Escherichia coli* и *Enterococcus faecalis*. Определение чувствительности выделенных из почвы бактерий *E. coli* к ТЦ проводили диско-диффузионным методом с последующим полногеномным секвенированием для выявления мутаций.

Для определения ТЦ в почве и продуктов его трансформации использовали ВЭЖХ-МС/МС и ионную хроматографию. Пробоподготовка состояла из жидкостной экстракции буфером ЭДТА-Макилвейна (pH=4) с последующей очисткой методом ТФЭ на патронах Диапак ПГ (60 мг).

Жидкостную хроматографию проводили на системе ВЭЖХ «Agilent 1200» с масс-спектрометрическим детектором «Agilent 6430 (QQQ)» и обращено-фазовой колонкой Zorbax SB-C18, 50×2,1 мм; 1,8 мкм.

При экстракции ТЦ для ионной хроматографии применяли концентрированную соляную кислоту с метанолом; для катионного анализа использовали колонку Shodex IC YS-50 150/4,6 (125×4,6 мм, 5 мкм) с кондуктометрическим и амперометрическим детектированием.

Объем выполненных работ и использованные методы представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Объём, материалы и методы исследования

Направление исследований	Методы исследования	Объём исследований, количество наблюдений
Экотоксикологические исследования	Фитотестирование	192
	Биотестирование	513
Микробиологические исследования	Биологическая активность почвы	864
	Самоочищающая способность почвы	630
	Оценка антибиотикорезистентности	300
Химико-аналитические методы	Процесс удерживания тетрациклина почвой	50
	Разработка и валидация аналитического метода определения тетрациклина с помощью ВЭЖХ-МС/МС	400
	Определение тетрациклина и его продуктов распада в почве методом ВЭЖХ-МС/МС	100
	Определение тетрациклина и его продуктов трансформации в почве методом ионной хроматографии	350
Общее число единиц информации:		3 399

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Процесс удерживания тетрациклина почвой.** Для оценки механизма сорбции изучали поглощение ТЦ почвой из водных растворов при pH=6,5. Навески почвы (0,1–10 г) заливали 100 мл раствора ТЦ ( $C=100 \text{ мг/дм}^3$ ). Встряхивали до установления равновесия, при котором концентрация в растворе не менялась. Контроль ТЦ в водной фазе осуществляли методом ВЭЖХ с амперометрическим детектированием на колонке C18 «Kromasil». По оценке содержания остаточной концентрации ТЦ в водной фазе рассчитывали величину сорбции.

При проведении статического опыта были получены изотермы сорбции (рисунок 1) и рассчитан коэффициент распределения ( $K$ ) в линейных участках изотермы по формуле:  $K=a/C$ , где  $a$  - концентрация сорбированного вещества в твердой фазе (мг/г),  $C$  - концентрация вещества ( $\text{мг/см}^3 \cdot 10^{-3}$ ).

Значения коэффициента распределения в дерново-подзолистой почве составили  $K \leq 2000$ , а в чернозёме  $K > 4000$ . Коэффициент распределения является важным параметром для оценки удержания антибиотиков в окружающей среде и уровня их устойчивости. По данным литературы считается, что антибиотики со значением  $K > 4000$  очень стойкие (период полураспада составляет  $>60$  дней). Напротив, антибиотики, характеризующиеся значением  $K < 15$ , обладают высокой подвижностью и низкой устойчивостью (период полураспада  $< 5$  дней) [Voxall, 2010].

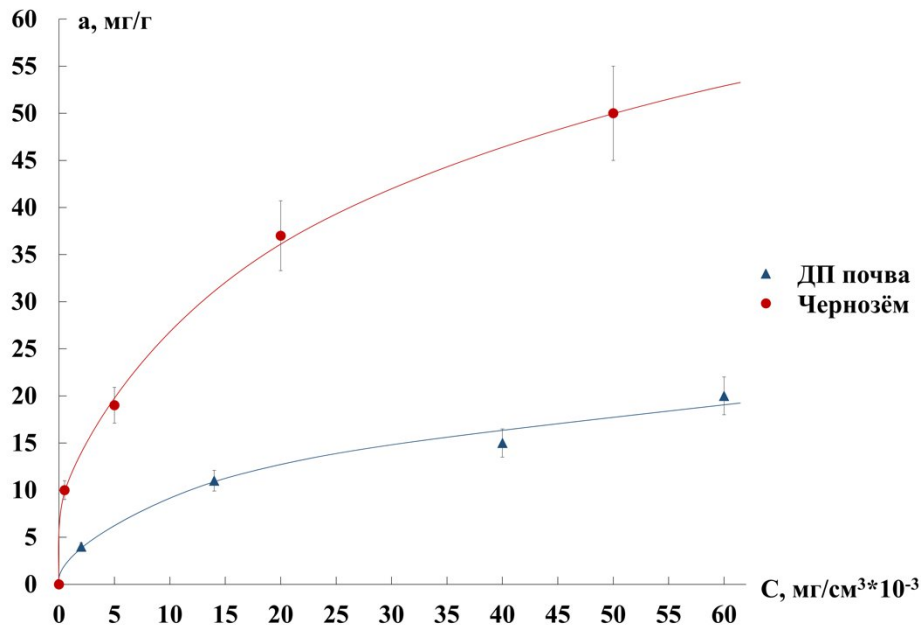


Рисунок 1 – Изотерма сорбции тетрациклина в почвах

Из полученных зависимостей величины сорбции от равновесной концентрации антибиотика в воде следует, что почва обладает очень высоким сродством к ТЦ. Такие параметры процесса сорбции могут свидетельствовать о химической природе механизма поглощения ТЦ твердой фазой (вследствие образования химических связей), а не физической (вследствие развитой поверхности). Таким образом, чернозём, в котором органического вещества больше, проявляет бóльшие сорбционные свойства к ТЦ, чем дерново-подзолистая почва, что подтверждается значениями коэффициента распределения.

**Определение фитотоксичности водного раствора тетрациклина и почв, загрязненных ТЦ.** Предварительно проводили оценку влияния водных растворов тетрациклина в различных концентрациях. Контролем являлись семена овса и редиса, проращиваемые на дистиллированной воде.

Результаты исследований показали, что овёс оказался более чувствительной культурой к воздействию ТЦ, чем редис. Это выражается в достоверном уменьшении средней длины корней ( $p \leq 0,05$ ) уже при более низких концентрациях растворов ТЦ по сравнению с контролем, фитотоксический эффект в растворах наблюдается в концентрациях от 0,1 до 100  $\text{mg/dm}^3$  (рисунок 2А).

Исследования в непосредственном контакте тест-культур с почвой с внесенной в нее разного количества ТЦ (а не на экстракте) обеспечивает более точные и чувствительные результаты, поскольку растения реагируют на реальные условия среды. Контролем служила почва без внесенного ТЦ, увлажненная дистиллированной водой (рисунок 2Б). В дерново-подзолистой почве эффект торможения снижался в тестировании на овсе и сохранялся в

максимально большой концентрации ТЦ в почве (10 мг/г). На редисе эффект торможения роста корней проростков отсутствовал полностью, т.е. загрязненная почва не обладала фитотоксической активностью.

На чернозёме результаты показали иную картину по сравнению с дерново-подзолистой почвой. Достоверное уменьшение длины корней ( $p \leq 0,05$ ) наблюдали в концентрациях ТЦ в почве: 0,1, 1 и 10 мг/г для овса и в максимальной концентрации 10 мг/г для редиса. Это практически полностью соответствует результатам, полученным на водных растворах ТЦ.

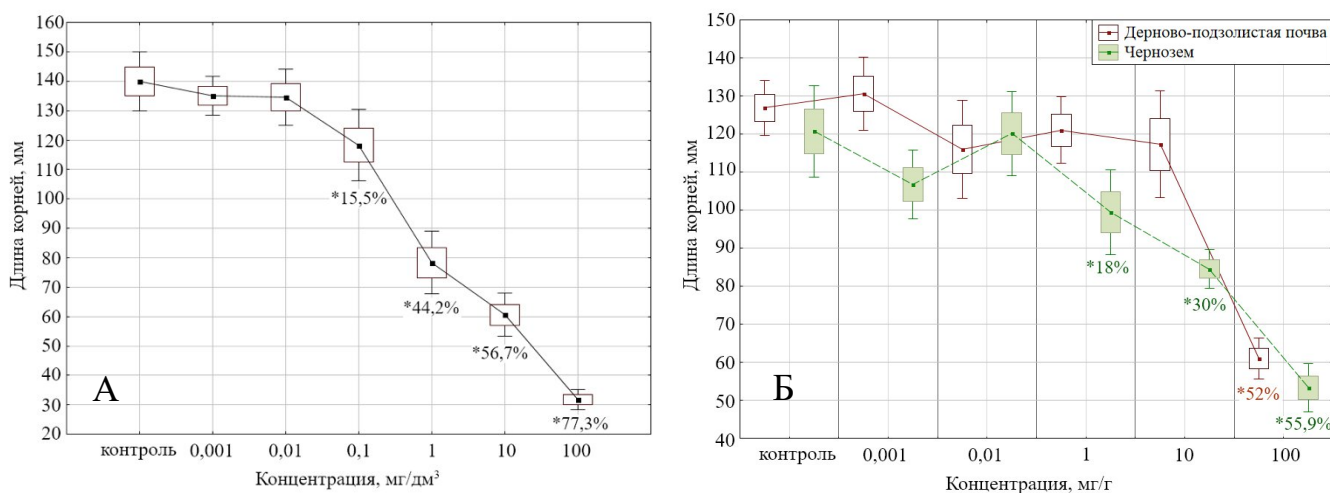


Рисунок 2 – Оценка фитотоксического действия растворов ТЦ (А), дерново-подзолистой почвы и чернозёма с ТЦ (Б) на тест-культуре *Avena sativa* (овёс).

Примечание – \* статистически-значимые отличия от контроля,  $p \leq 0,05$

**Эколого-гигиеническая оценка методами биотестирования.** Экотоксикологические исследования растворов тетрациклина и водных почвенных вытяжек проводились с целью изучения их воздействия на гидробионты. Методика проведения острого токсикологического эксперимента основана на определении смертности ветвистоусых рачков *Daphnia magna* Straus (представители низших ракообразных), являющиеся обязательным тест-объектом. Критерием токсичности служила гибель 50 % тест-объектов за 96 часов экспозиции в исследуемой пробе. В качестве второго тест-организма использовали простейших – инфузорий *Tetrahymena pyriformis*. Критерием токсичности в данном случае служил показатель размножения (Кт), который в норме не должен быть меньше 50%. Постановка биотестов осуществлялась в 3х кратной повторности в 2х сериях эксперимента. Достоверность отклонения показателей определялась по критерию Стьюдента.

Оценка чистых растворов ТЦ показала токсическое влияние вещества в концентрациях 1, 10, 100 мг/дм³, приводящих к практически 100% гибели дафний, а также к снижению прироста инфузорий ( $K_t \leq 50\%$ ) в концентрациях 10 и 100 мг/дм³.

Исследования почвенных экстрактов из образцов дерново-подзолистой почвы с внесённым в неё ТЦ показали отсутствие острого токсического воздействия на дафнии и

генеративную функцию инфузорий. В то же время водные экстракты чернозёма оказали негативный эффект в образцах с максимальной концентрацией ТЦ в почве — 10 мг/г (25% гибели дафний, Кт инфузорий – 50%).

**Эколого-гигиеническая оценка качества почв методами почвенной биоиндикации (биологическая активность почв).** В эксперименте оценивали динамику количественных изменений аборигенной флоры почвы, а именно основных групп почвенных микроорганизмов: сапротрофных бактерий, почвенных микроскопических грибов и актиномицетов. Количество наблюдений в микробиологических исследованиях (N) представлены в таблице 1, для статистической обработки данных был применен критерий Манна-Уитни.

Отмечено, что количество сапротрофных бактерий в дерново-подзолистой почве не претерпело значительных изменений в течение месяца, и динамика их роста в опытных образцах соответствовала динамике роста бактерий в контроле. В чернозёме наблюдалась стимуляция роста бактерий, причем чем выше было содержание тетрациклина в почве, тем интенсивнее отмечался рост бактерий, что, вероятно связано с высоким содержанием органических веществ в чернозёме, где антибиотик выступает дополнительным питательным элементом для бактерий.

В исследованиях по динамике изменения численности микроскопических грибов отмечена высокая стимуляция их роста в образцах как дерново-подзолистой почвы, так и чернозёма при максимальном содержании ТЦ – 10 мг/г. В дерново-подзолистой почве к концу экспозиции (30 сутки) количество грибов достоверно увеличилось в 4 раза по сравнению с контрольной группой ( $p \leq 0,05$ ). В чернозёме рост грибов происходил быстрее: скачок наблюдался уже на 20 сутки, а количество грибов отличалось от контрольной группы в 2,5 раза ( $p \leq 0,05$ ).

Отмечено, что на увеличение численности актиномицетов влияли низкие концентрации ТЦ в почве (0,001 и 0,01 мг/г). При этом в образцах дерново-подзолистой почвы активный рост наблюдался в середине экспозиции и затем снижался до уровня контрольной группы. В чернозёме же стимуляция роста продолжалась до окончания эксперимента.

**Оценка самоочищающейся способности почвы и развития антибиотикорезистентности.** К отрицательным изменениям под влиянием изучаемых химических веществ прежде всего необходимо отнести торможение процесса самоочищения почвы от условно-патогенных микроорганизмов. Для этого в почвы вносили смесь из пяти штаммов *E. coli* (музейные штаммы АТТС 10536, 1257, М17 и свежевыделенные из сточных вод лактозоположительный 300 и лактозоотрицательный 303) и смесь из двух штаммов *E. faecalis* (свежевыделенные из сточных вод штаммы IBD-017в и IBD-020) для имитации фекального загрязнения, в концентрации  $10^9$  КОЕ/г. Контролем служили почвы без внесенного антибиотика ТЦ и с внесёнными культурами *E. coli* и *E. faecalis*. Почву содержали в климатической камере

( $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , влажность воздуха = 60%), производя высевы почвенной суспензии на среду Эндо и энтерококкагар до тех пор, пока *E.coli* и *E. faecalis* сохраняли жизнеспособность в почве.

Установлено, что скорость отмирания внесенных в почву бактерий различна, в зависимости от вида микроорганизма при прочих одинаковых условиях. Влияние ТЦ на жизнедеятельность *E. coli* в чернозёме не выявлено. Более того, в образцах с максимальной концентрацией ТЦ процесс самоочищения в отношении *E. coli* протекал на 10 дней раньше, чем в контроле. Однако в дерново-подзолистой почве с концентрацией ТЦ 10 мг/г зафиксировано значительное снижение скорости очищения в отношении *E. coli* более чем в 2 раза ( $p \leq 0,05$ ): с 40 дней в контрольной группе до 100 дней в опытной группе.

На самоочищающую способность почвы от *E. faecalis* ТЦ не оказал влияния. Скорость отмирания была одинакова как в опытных образцах, так и в контроле дерново-подзолистой почвы и чернозёма.

Исследования по развитию антибиотикорезистентности в отношении ТЦ проводили на разных штаммах *E. coli* (музейные штаммы АТТС 10536, 1257, М17 и свежевыделенные из сточных вод лактозоположительный 300 и лактозоотрицательный 303), выживших после внесения в почву, загрязненную антибиотиком. Применяли диско-диффузионный метод в чашках Петри на среде Мюллера-Хинтон с применением стандартных дисков с ТЦ. На поверхность среды наносили бактериальную суспензию, приготовленную из выделенных из почвы микроорганизмов, после чего на неё помещали диски с антибиотиком. В процессе диффузии формируется зона подавления роста микроорганизмов вокруг дисков. После инкубации в течение 24 часов измеряли диаметр зоны лизиса вокруг дисков.

Установлено, что за время пребывания микроорганизмов в почве с различными концентрациями тетрациклина (60 суток) антибиотикорезистентность не развивалась, так как формировалась зона лизиса. Однако отмечено, что с увеличением концентрации ТЦ в почве и времени нахождения в ней *E.coli* зона лизиса у выделенных бактерий постепенно уменьшалась, что говорит о начале развития антибиотикорезистентности.

Определение мутаций разных штаммов *E.coli*, изолированных из почвы, содержащей антибиотик, проводилось с использованием полногеномного секвенирования и последующей биоинформационной обработки данных. Информация о приобретенных мутациях в геномах получена методом выравнивания прочтений нуклеотидов на полученную сборку референсных геномов с помощью программы Breseq. В результате обнаружено значительное количество генетических изменений. Из них от 17 до 21% мутаций привели к изменениям аминокислот в кодируемых белках, что указывает на наличие несинонимичных замен. Эти изменения могут оказывать влияние на структуру и функции белков, которые играют ключевую роль в механизмах антибиотикорезистентности у различных патогенных микроорганизмов.

**Разработка и валидация аналитического метода определения содержания тетрациклина с помощью ВЭЖХ-МС/МС.** Количественное определение тетрациклина проводили методом абсолютной калибровки по сумме площадей пиков аналитического сигнала при помощи градуировочного графика. При сканировании в режиме полного ионного тока (МС1) определяли протонированную молекулу исследуемого соединения, основные ионы-продукты регистрировали в режиме тандемной масс-спектрометрии (МС/МС). Для количественного анализа провели оптимизацию МС/МС метода в режиме мониторинга ионов, образующихся при переходе протонированной молекулы в соответствующий специфический фрагмент (режим мониторинга заданных реакций в МС/МС - МЗР), для достижения максимальной чувствительности. Регистрировали как минимум два МЗР-перехода аналита, при количественной обработке хроматограмм использовали один из них.

Характеристические фрагментные ионы, т.е. ионы, которые специфичны исключительно для ТЦ, определяли тандемной масс-спектрометрией при разных значениях энергии соударения (СЕ) 0; 10; 20; 30 В. Определены следующие характеристичные фрагментные ионы:  $m/z$  410 при СЕ=20 В и  $m/z$  427 при СЕ=10 В. Наиболее интенсивный ион ( $m/z$  410) может быть использован для количественных измерений, а ион  $m/z$  427 может быть использован для подтверждения правильности определения (референсный ион). Последнее необходимо для достоверной идентификации ТЦ в смеси.

Для определения селективности были протестированы образцы почвы после пробоподготовки, включающей экстракцию и очистку, на возможность создания помех при регистрации аналитического сигнала, потенциально мешающими химическими веществами. В предлагаемых условиях анализа метод специфичен. Селективность метода достигается использованием масс-спектрометрического детектора по ионам, характеризующего вещества ( $m/z$  410 и 427).

Градуировочные графики для дерново-подзолистой почвы и чернозёма построены с использованием 4 градуировочных растворов с концентрациями ТЦ 0,01, 0,1, 1 и 10 мкг/см<sup>3</sup>. Концентрацию ТЦ определяли по площадям соответствующих хроматографических пиков на ионных масс-хроматограммах по методу абсолютной калибровки. Зависимость величины хроматографического пика от концентрации ТЦ калибровочных стандартов в области измерения методики была линейной в рассматриваемом диапазоне концентраций (для дерново-подзолистой почвы  $y=0.799+189.982*x$  при  $R^2=0.995$ ; для чернозёма  $y=0.024+186.168*x$  при  $R^2=0.997$ ). Самый низкий стандарт на градуировочном графике, равный 0,01 мкг/см<sup>3</sup>, был принят в качестве предела количественного определения.

С целью определения процента извлечения ТЦ из почвы были приготовлены 10 серий стандартных растворов ТЦ в воде с концентрацией 1 мкг/см<sup>3</sup> и экстрактов из почвы с

концентрацией ТЦ 1 мг/г. Процент извлечения определяли сравнением площадей масс-хроматографических пиков ТЦ в почвенном экстракте, полученном с помощью ЖЭ буфером Макилвейна+ЭДТА с последующей очисткой ТФЭ и концентрированием, с площадью пика раствора ТЦ. Установлено, что процент извлечения ТЦ из дерново-подзолистой почвы составил не более  $70\pm 10\%$ , а из чернозёма не более  $20\pm 10\%$ .

**Определение тетрациклина и продуктов его распада в почве методом ВЭЖХ-МС/МС.** Для оценки времени распада ТЦ в почвах проводили измерения сразу после внесения антибиотика в концентрациях 0,001 и 0,1 мг/г (0 сутки), на 14 и 28 сутки. Количественное определение остаточного содержания ТЦ проводили методом внешнего стандарта по сумме площади пика идентифицированного соединения при помощи градуировочного графика. По результатам измерений были построены графики кинетической зависимости деградации тетрациклина от времени (рисунок 3).

Показана зависимость изменения количества ТЦ от времени при разных нагрузках ТЦ и типе почвы. Зависимость описывается экспоненциальной функцией, расчетный период полутрансформации (полураспада) тетрациклина –  $t_{1/2}$  составляет в дерново-подзолистой почве для концентрации ТЦ 0,001 мг/г –  $7\pm 3$  дня, для концентрации 0,1 мг/г –  $5\pm 2$  дня. Вместе с тем в черноземе процесс распада протекает немного медленнее и  $t_{1/2}$  составляет для концентрации 0,001 мг/г –  $12\pm 5$  дней, а для 0,1 мг/г –  $8\pm 3$  дня. Таким образом, чем выше концентрация вещества, тем быстрее происходит его трансформация в другое вещество и распад.

Для определения продуктов распада и трансформации было проведено сравнение масс-спектров образцов ТЦ, которые находились в почве 1 и 28 дней. Интенсивность исходного иона ТЦ  $m/z$  445 со временем значительно уменьшилась, при этом наблюдался рост пиков ионов с массами  $m/z$  679, 701, 340 для обоих видов почвы.

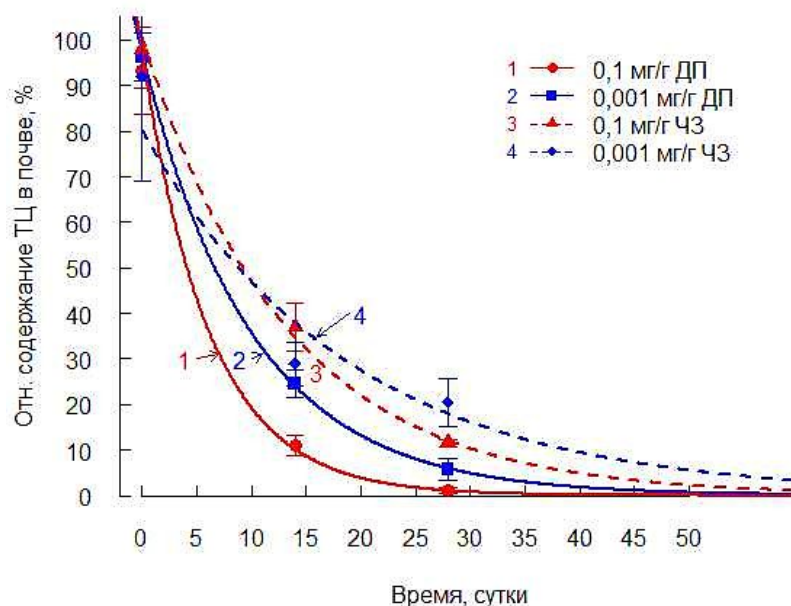


Рисунок 3 – Графики кинетической зависимости изменения концентрации ТЦ в разных концентрациях от времени в дерново-подзолистой почве и чернозёме

На основе полученных данных, исходя из молекулярных масс обнаруженных соединений, можно предположить, что трансформация ТЦ в почве определяется параллельными процессами: декарбоксамидированием, дезаминированием и дегидроксилированием, которые также описываются в литературе [Wang,2024]. Дезаминирование обусловлено отщеплением аминогруппы из положения С-4, декарбоксамидирование — с отщеплением карбоксамидной группы из положения С-2, а дегидроксилирование включает отщепление гидроксильных групп предположительно из С-3, где образуемые водородные связи создают устойчивую структуру, менее подверженную отщеплению. На рисунке 4 показана возможная структура и механизм трансформации ТЦ, которая объясняет наличие пиков  $m/z$  679, 701, 340.

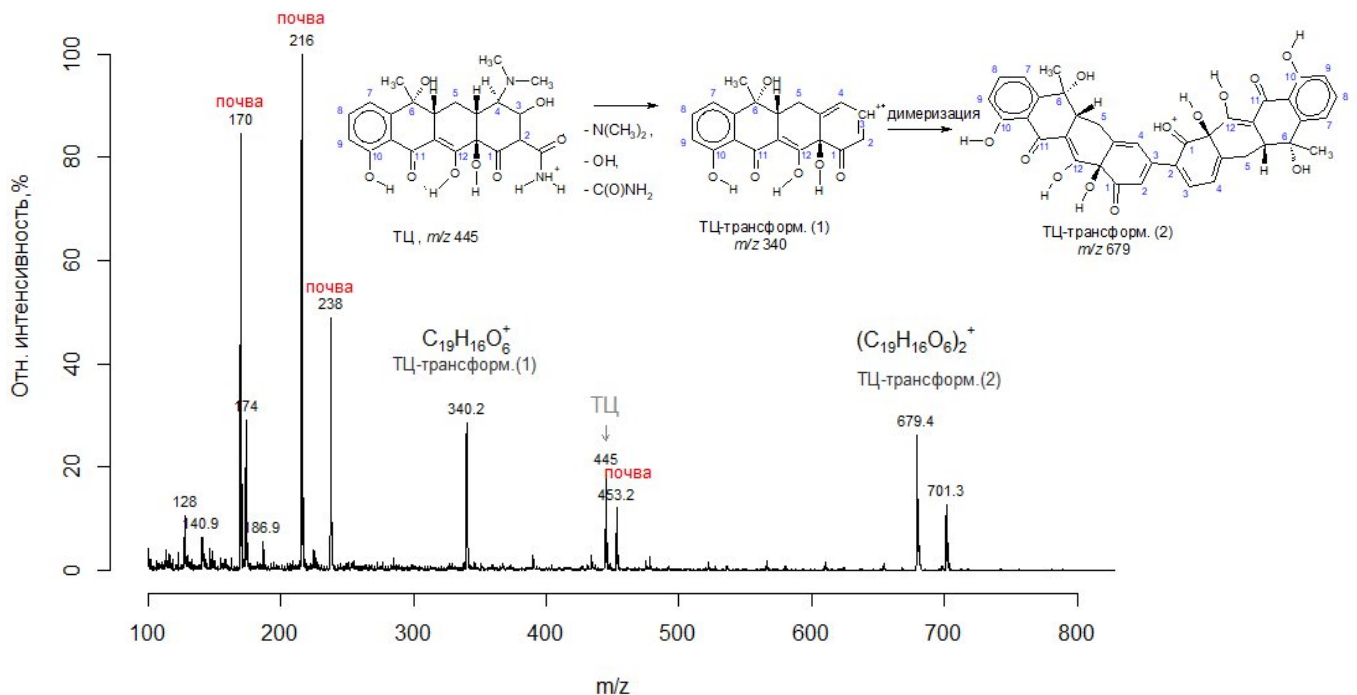


Рисунок 4 – Механизм трансформации тетрациклина путем димеризации

Вместе тем, было обнаружено, что перечисленные процессы трансформации могут способствовать образованию более стабильных соединений, увеличивая скорость разложения ТЦ и приводя к образованию продуктов трансформации с измененной биологической активностью и токсичностью. Последующая димеризация приводит к образованию более крупных и сложных молекул, что может повлиять на их растворимость и биодоступность. Эти димерные продукты могут также проявлять токсичные свойства, влияя на экологическую динамику в загрязненных антибиотиком средах.

**Определение тетрациклина и продуктов его трансформации в почве методом ионной хроматографии.** Разработанный метод определения ТЦ и продуктов его распада в почве с помощью ВЭЖХ-МС/МС обладает чувствительностью до 0,1 мг/г. Тетрациклин обладает амфотерными свойствами благодаря окси-, гидрокси-, амидным и аминным группам. Исследовали трансформацию тетрациклина гидрохлорида в почве при высоких концентрациях

(1 и 10 мг/г) с использованием ионной хроматографии на катионной колонке Shodex IC YS-50, эффективной для сильно полярных органических соединений с аминными и амидными группами. Для десорбции применялась концентрированная соляная кислота с метанолом, обеспечивая максимальное извлечение и минимальный переход высокомолекулярных гуминовых компонентов почвы, склонных к коагуляции и осадкообразованию в кислых средах.

С почвенных образцов, как не содержащих ТЦ, так и с ним, в десорбирующий раствор переходят вещества с одинаковым временем удерживания, однако площади пиков у холостых образцов меньше. Такой подход не позволяет мониторить неизвестные почвы на ТЦ из-за отсутствия нулевой точки. Попытки выделить специфический для ТЦ сигнал — добавление катионов металлов (Fe, Cr, Cu и др.) и варьирование хроматографических параметров — не дали результата: изменения были одинаковыми для всех проб. Растворы, содержащие гуминовые вещества и ТЦ, исследовали электрохимическим способом. В ячейку с титановыми электродами, покрытыми диоксидом рутения, помещали исследуемые растворы и устанавливали напряжение 20 В. При прохождении тока органическое вещество концентрировалось на катоде, образуя осадок, раствор обесцвечивался, а содержание органического вещества снижалось почти до нуля.

Таким образом, проведенные исследования показали, что после десорбции ТЦ образует фиксируемое амперометрически фиксируемое катионное соединение, не разделяющееся с почвенным веществом на катионной колонке, а его катионный характер подтверждает отсутствие удерживания на ВЭЖХ-колонке. Кондуктометрический детектор дал удовлетворительный результат выявив соединение, относящееся только к тетрациклину, с пиком между ионами аммония и калия (рисунок 5). В холостых образцах этот пик отсутствует, а при содержании ТЦ 0,1–10 мг/г площадь пика линейно зависит от концентрации. Это вещество не фиксируется амперометрическим детектором, что свидетельствует об отсутствии у него восстановительных свойств.

Идентичные результаты получены и для чернозема, при этом, почвенное вещество, соответствующего пику 7, было менее выраженным по сравнению с дерново-подзолистыми образцами. Линейную зависимость использовали для исследования временной трансформации тетрациклина в почве. Установлено, что в течение 10 недель концентрация тетрациклина, находящегося в почвенных образцах, снижалась с  $C_0 = 10$  мг/г до  $C_t = 2$  мг/г.

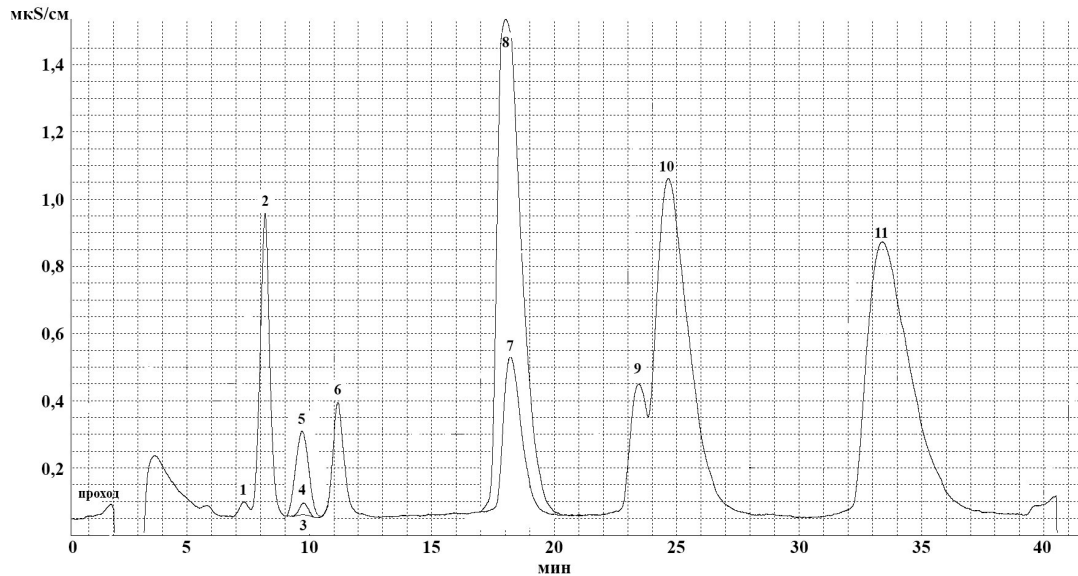


Рисунок 5 – Хроматограмма почвенной вытяжки при кондуктометрическом детектировании

Примечание – Пики 1, 2, 6, 10, 11 – неорганические компоненты, перешедшие из почвы в раствор после метанольно-кислотной десорбции, соответственно: Na, NH<sub>4</sub>, K, Mg, Ca. Пики 3, 4, 5, 7, 8, 9 – пики, соответствующие органическим компонентам; 3,4,5 – пики органической катионной компоненты, относящиеся к разному исходному содержанию тетрациклина в почве: 3 – 0,1 мг/г; 4 – 1 мг/г; 5 – 10 мг/г. Пики 7, 8 – аналоги вещества, описанного ранее, зафиксированного амперометрически, но в данном случае при других параметрах элюирования. 7 – холостая проба; 8 – проба, содержащая тетрациклин 10 мг/г.

Образцы сухого ТЦ также подвергли воздействию концентрированной соляной кислоты, что привело к образованию растворов насыщенного желтого цвета, свидетельствующих об образовании ангидротетрациклина. Хроматографический анализ не обнаружил катионных форм. Добавление катионов Mg<sup>2+</sup> и Ca<sup>2+</sup> также не проявило катионной активности. При смешении сухих остатков с водной фазой почвенной вытяжки от холостых образцов появился пик (3,4,5) на хроматограмме и рост пика (7,8), что указывает на взаимодействие ангидротетрациклина с почвенным веществом и образование вещества смешанного состава. Это подтверждает образование катионных форм, содержащих как фрагменты тетрациклина, так и органические почвенные компоненты условного строения: R1 – Me<sup>++</sup> – R2, где R1 – тетрациклиновая составляющая, R2 – органическая почвенная (наряду с катионом металла) компонента.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема загрязнения окружающей среды антибиотиками активно обсуждается в научном сообществе и является одной из наиболее важных на сегодняшний день. Необходимость контроля за распространением антибиотиков в окружающей среде не вызывает сомнений.

Многочисленные исследования, посвящённые определению антибиотиков в почве [Сусо́й,2019; Chico,2008; Rashid,2023], показывают разрозненные результаты, что затрудняет их интерпретацию и сопоставление. Одной из причин различий является использование разных методов анализа и используемого оборудования: некоторые из них более чувствительны и способны обнаруживать следовые количества антибиотиков, в то время как другие — менее

эффективны. Также результаты могут варьироваться в зависимости от страны, региона, типа почвы и других факторов, что делает их трудными для обобщения.

Разные подходы к интерпретации данных также могут приводить к различным выводам о степени загрязнения. Это подчеркивает необходимость разработки собственных аттестованных методов для определения ТЦ, которые могут быть использованы как при определении его остаточного содержания в почве, так и при изучении процессов его трансформации и распада.

Разработанный метод на основе использования высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) показал хорошую селективность и чувствительность, что позволило проводить точные измерения остаточного содержания ТЦ в различных почвах.

Проведенные исследования, основанные на хроматографических методах, показали, что ТЦ взаимодействует с почвенным веществом, образуя катионные формы с высокой энергией химической связи. Это подтверждается изотермами сорбции с коэффициентами распределения  $K > 2000$  для дерново-подзолистой почвы и  $K > 4000$  для чернозёма, что указывает на химическую адсорбцию ТЦ, особенно в органически богатых почвах. Литературные данные описывают, что связь антибиотиков с органическими веществами и минералами затрудняет их десорбцию, продлевая время нахождения в почве [Conde-Cid,2019; Kemper,2008]. Это подтверждается собственными исследованиями, где процент извлечения ТЦ из дерново-подзолистой почвы составил не более 80 %, а из чернозёма — не более 30 %.

В ходе исследования установлено, что скорость разложения ТЦ зависит от его концентрации и типа почвы. В чернозёме при низких концентрациях антибиотика период полураспада достигает  $12 \pm 5$  дней, что подтверждается литературными данными о медленном разложении антибиотиков в органически богатых почвах. Также выявлено, что продуктами трансформации ТЦ являются устойчивые комплексы с органическими соединениями и металлами, что затрудняет их идентификацию. Хромато-масс-спектрометрический анализ позволяет установить распад антибиотика по ионам с массами 679, 701 и 340.

Модельные исследования образцов почвы, проведенные с использованием хроматографических методов, показали, что связывание ТЦ с природными компонентами почвы, с одной стороны, затрудняет его аналитический контроль, а с другой, предположительно может снижать его воздействие на различные биологические формы. Однако продукты распада или трансформации ТЦ могут быть также с неопределенной степенью опасности. Для этого была проведена эколого-гигиеническая оценка влияния ТЦ и продуктов его трансформации на почву по общепринятым гигиеническим показателям (таблица 2).

Таблица 2 – Систематизированные данные по гигиеническим методам оценки влияния ТЦ на почву разного типа

Концентрация ТЦ в почве (мг/г)	ФИТО-ТЕСТИРОВАНИЕ на овсе		ФИТО-ТЕСТИРОВАНИЕ на редисе		БИО-ТЕСТИРОВАНИЕ на <i>Daphnia magna</i>		БИО-ТЕСТИРОВАНИЕ на <i>Tetrahymena pyriformis</i>		САМО-ОЧИЩАЮЩАЯСЯ СПОСОБНОСТЬ		БАКТЕРИИ		ГРИБЫ		АКТИНОМИЦЕТЫ	
	ДП почва	Чернозём	ДП почва	Чернозём	ДП почва	Чернозём	ДП почва	Чернозём	ДП почва	Чернозём	ДП почва	Чернозём	ДП почва	Чернозём	ДП почва	Чернозём
0,001															±	±
0,01															±	±
0,1		+														+
1		+														+
10	+	+		+		+		+	+			±	+	+		

	Отсутствие негативного влияния
+	Выявлено негативное влияние
±	Неоднозначный эффект

Исследования демонстрируют, что ТЦ и его продукты трансформации оказывают комплексное воздействие на почву, которое может различаться в зависимости от типа почвы. Так, в чернозёме тетрациклин оказывает более выраженную фитотоксичность, чем в дерново-подзолистой почве. Водные вытяжки из чернозёма с высокой концентрацией ТЦ, также оказали негативный эффект на гидробионты. Это может быть связано с особенностями физико-химических свойств чернозёма, такими как высокое содержание органических веществ, которые могут усиливать токсичность антибиотика и продуктов его трансформации.

Микробиологические данные показывают, что ТЦ стимулирует рост почвенных грибов, нарушая баланс микробного сообщества в пользу токсинообразующих видов — как в дерново-подзолистой почве, так и в чернозёме. Также тетрациклин может снижать бактериальное разнообразие, подавляя чувствительные виды, однако он может служить источником углерода и, наоборот, увеличивать разнообразие. Так, в чернозёме высокие дозы ТЦ увеличивали рост сапротрофных бактерий, а низкие дозы — рост актиномицетов (в то время как высокие их подавляли). Таким образом, структура микробного сообщества изменялась как при низких, так и при высоких концентрациях антибиотика.

К настоящему времени процесс развития и распространения антибиотикорезистентности в окружающей среде остаётся недостаточно изученным. Несмотря на очевидную связь с экологическими факторами, механизмы их взаимодействия и влияние на здоровье человека

требуют дальнейших исследований. Собственные исследования показали, что при нахождении *E.coli* в почве с ТЦ в течение 60 дней не наблюдается развития антибиотикорезистентности. Однако полногеномное секвенирование выявило значительное число генетических изменений, включая несинонимичные замены, потенциально влияющих на белки, участвующие в механизмах резистентности. Это подчёркивает необходимость дальнейшего изучения генетической адаптации микроорганизмов к антибиотикам в окружающей среде.

Полученные данные позволяют обосновать различия в безопасных уровнях содержания тетрациклина для разных типов почвы: для дерново-подзолистой почвы максимальная безопасная концентрация составляет 1 мг/г, что свидетельствует об её большей устойчивости к ТЦ по сравнению с чернозёмом, для которого эта концентрация составляет всего 0,01 мг/г. Это согласуется с данными [Акименко, 2015], где снижение большинства основных биологических показателей в чернозёме происходит уже при концентрации антибиотиков 0,1 мг/г.

При установлении нормативов антибиотиков в почве необходимо учитывать их специфику, включая противомикробную активность. На основе собственных и литературных данных предложен алгоритм исследований комплексной оценки антибиотиков, планируемых для использования при установлении гигиенических нормативов в почве (таблица 3).

Таблица 3 – Алгоритм комплексной оценки антибиотиков при установлении гигиенического норматива в почве.

<p align="center"><b>I этап</b></p> <p align="center"><b>Изучение литературы по выбору приоритетных антибиотиков</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Распространенность использования в сельском хозяйстве, ветеринарии и медицине;</li> <li>- Физико-химические свойства изучаемого вещества;</li> <li>- Исследованные влияния на человека и экосистему.</li> </ul>
<p align="center"><b>II этап</b></p> <p align="center"><b>Химическое изучение (оценка) поведения антибиотика в почве</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Оценка поглотительной способности антибиотика почвами разного типа;</li> <li>- Изучение стабильности, распада и трансформации антибиотика в почве;</li> <li>- Выбор метода, или в случае его отсутствия разработка с последующей аттестацией, количественного определения антибиотика и продуктов его трансформации в почве.</li> </ul>
<p align="center"><b>III этап</b></p> <p align="center"><b>Экспериментальные исследования определения степени влияния антибиотика на почву</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Оценка влияния антибиотика по основным гигиеническим показателям вредности (водно-и воздушно – миграционный, транслокационный, санитарно-гигиенический);</li> <li>- Оценка развития антибиотикорезистентности у почвенных микроорганизмах.</li> </ul>
<p align="center"><b>IV этап</b></p> <p><b>Представление разработанного норматива с методом контроля в комиссию по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека</b></p>	

Таким образом, результаты исследований подчёркивают необходимость учитывать тип почвы и её свойства при оценке воздействия тетрациклина на экосистемы, опосредованно влияющие на здоровье человека. Эти данные могут быть полезны для разработки стратегий управления использованием антибиотиков в сельском хозяйстве, направленных на минимизацию их негативного воздействия на окружающую среду и при научном обосновании гигиенических нормативов ТЦ в почве.

## ВЫВОДЫ

1) Выявлены различия в воздействии ТЦ на разные типы почв: чернозём, как наиболее органическая почва, особенно подвержен негативному влиянию антибиотика и продуктов его трансформации, что выражается в фитотоксичности на прорастание семян растений, негативном эффекте на гидробионты, разбалансировке комплексов почвенных микроорганизмов, выражавшейся в росте почвенных грибов и изменении структуры микробного сообщества.

2) В гигиенических исследованиях по лимитирующим показателям (фитотестирование, биотестирование, микробиология) установлены максимально допустимые (безопасные) уровни содержания ТЦ для дерново-подзолистой почвы – 1 мг/г, для чернозёма – 0,01 мг/г, что свидетельствует о большей устойчивости дерново-подзолистой почвы к воздействию антибиотика.

3) На модели *E. coli* установлено, что попадание антибиотиков в почву способствует развитию антибиотикорезистентности у микроорганизмов, вызывая мутации в их геноме путем изменения аминокислот в кодируемых белках.

4) Разработан ВЭЖХ-МС/МС метод для количественного определения ТЦ в почве с чувствительностью 0,001 мг/г. Оптимальными условиями извлечения ТЦ из почвы при хроматографическом анализе являются сочетание буфера Макилвейна с ЭДТА, длительное экстрагирование и применение УЗ-ванны с последующей очисткой методом ТФЭ (сорбционное концентрирование).

5) Показано, что в почве тетрациклин образует катионные формы с высокой энергией химической связи, что затрудняет его десорбцию и увеличивает время нахождения в почве. Установлено, что при пробоподготовке для хроматографического анализа степень извлечения ТЦ из дерново-подзолистой почвы составляет не более 80 %, а из чернозёма не более 30 %.

6) Скорость разложения тетрациклина в почве зависит от его концентрации и типа почвы: чем ниже концентрация антибиотика, тем медленнее происходит его распад, особенно в органических почвах. Период полураспада минимальной изучаемой концентрации ТЦ 0,001 мг/г составил в дерново-подзолистой почве  $7 \pm 3$  дня, в то время как в чернозёме –  $12 \pm 5$  дней.

7) Разработанный хромато-масс-спектрометрический метод позволяет установить присутствие продуктов трансформации, образующихся в результате процессов декарбоксамидирования, дезаминирования и дегидроксилирования ( $m/z$  679, 701, 340), что позволяет изучить особенности трансформации тетрациклина в почве, продуктами которого являются устойчивые комплексы с органическими соединениями, а также с металлами, содержащимися в почве.

8) Установлено, что предложенный алгоритм регламентирования содержания антибиотиков в почве должен включать в себя оценки стабильности и распада антибиотика в почве, влияния по основным гигиеническим показателям и оценку развития антибиотикорезистентности.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1) Особенности поведения антибиотика тетрациклина гидрохлорида в почвенной среде / **Н.С. Антропова**, А.В. Стрелецкий, О.В. Ушакова, С.М. Юдин // Медицина труда и промышленная экология. – 2025. – Т. 65, №7. – С. 477-483.

2) Streletskiy, A. V. Improvement of the Selectivity and Sensitivity of Analysis of Tetracycline Antibiotics Based on the ESI-MS Method with a Single-Quadrupole Mass Analyzer / A. V. Streletskiy, **N. S. Antropova** // Journal of Analytical Chemistry. – 2025. – Vol. 80, № 4. – P. 666-674.

3) Стрелецкий, А.В. Улучшение селективности и чувствительности анализа антибиотиков тетрациклинового ряда на основе метода ИЭР-МС с моноквадрупольным масс-анализатором / А.В. Стрелецкий, **Н.С. Антропова** // Журнал аналитической химии. – 2025. – Т.80, №5 – С. 479-488.

4) **Антропова, Н. С.** Изучение процесса поглощения почвой тетрациклина и его трансформация при кислотной десорбции / **Н. С. Антропова**, Е. Г. Абрамов // Гигиена и санитария. – 2024. – Т. 103, № 4. – С. 310-317.

5) Проблемы, связанные с загрязнением окружающей среды антибиотиками на примере тетрациклинов (обзор) / **Н. С. Антропова**, О. В. Ушакова, О. Н. Савостикова, Е. И. Филимонова // Здоровье населения и среда обитания - ЗНиСО. – 2024. – Т. 32, № 3. – С. 33-43.

6) Абрамов, Е. Г. Влияние антибиотика тетрациклина гидрохлорида на биотрансформацию мочевины / Е. Г. Абрамов, **Н. С. Антропова** // Гигиена и санитария. – 2022. – Т. 101, № 5. – С. 589-595.

7) **Антропова, Н.С.** Исследование матричного эффекта при анализе антибиотика тетрациклина в почве методом жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС) / **Н.С. Антропова**, А.В. Стрелецкий // Здоровье и окружающая среда : Сборник материалов международной научно-практической конференции, Минск, 05-06 декабря 2024 года

/ Редколлегия: С.И. Сычик (гл. ред.) [и др.]. – Гомель : Редакция газеты «Гомельская праўда», 2024. – С. 288-292.

8) **Антропова, Н. С.** Транслокация антибиотиков из почвы и безопасность пищевой продукции растительного происхождения / **Н. С. Антропова, М. А. Водянова** // Здоровье и окружающая среда : Сборник материалов международной научно-практической конференции, Минск, 19–20 ноября 2020 года / Редколлегия: С.И. Сычик (гл. ред.) [и др.]. – Минск: Белорусский государственный университет, 2021. – С. 315-317.

9) **Антропова, Н. С.** Влияние антибиотиков тетрациклиновой группы на урезную активность почвы при гидролизе мочевины / **Н. С. Антропова, Е. Г. Абрамов** // Сысинские чтения - 2021 : Материалы II Национального конгресса с международным участием по экологии человека, гигиене и медицине окружающей среды, Москва, 17–19 ноября 2021 года. – Москва: 2021. – С. 33-37.

10) **Antropova, N. S.** Prospects for studying tetracycline group antibiotics in the process of their accumulation in soils and translocation into plants / **N. S. Antropova, O. V. Ushakova** // V international Conference "actual scientific & technical issues of chemical safety" (ASTICS-2020) : Book of Abstracts, Kazan, 06–08 октября 2020 года. – Kazan: 2020. – P. 104-105.

11) Риск распространения антибиотикорезистентности через объекты окружающей среды и продукты питания (обзорная статья) / **Н. С. Антропова, О. В. Ушакова, М. А. Водянова, О. Н. Савостикова** // Russian Journal of Rehabilitation Medicine. – 2020. – № 4. – С. 36-51.

12) **Антропова, Н. С.** Потенциальная опасность фармацевтических препаратов для здоровья человека при загрязнении ими объектов окружающей среды / **Н. С. Антропова, М. А. Водянова, О. Н. Савостикова** // Окружающая среда и здоровье. Инновационные подходы в решении медико-биологических проблем здоровья населения : Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов, Москва, 25–26 октября 2018 года. – Москва: Принт-П, 2018. – С. 29-32.

### Список сокращений

АР – антибиотикорезистентность

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием

ДП – дерново-подзолистая почва

ЖЭ – жидкостная экстракция

ПДК – предельно допустимые концентрации

ТЦ – тетрациклин

ТФЭ – твердофазная экстракция

УЗ – ультразвуковой/ая