

Аминов
Александр Иванович

**ВЛИЯНИЕ ГЕРБИЦИДА РАУНДАП НА ГЛИКОЗИДАЗЫ РЫБ
И ОБЪЕКТОВ ИХ ПИТАНИЯ**

03.02.08 – Экология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород

2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук»

Научный руководитель: доктор биологических наук, старший научный сотрудник, главный научный сотрудник лаборатории экологии рыб Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН» **Голованова Ирина Леонидовна**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук РФ и Украины, профессор, ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории экотоксикологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН» **Руднева Ирина Ивановна**

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры гидробиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» **Гершкович Дарья Михайловна**

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук» (г. Петрозаводск)

Защита состоится «___» _____ 2018 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.12 при Национальном исследовательском Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, ГСП-20, пр. Гагарина 23, корп.1, ауд. 321.

E-mail: dis212.166.12@gmail.com

Факс: (831) 462-30-85

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского по адресу: https://diss.unn.ru/files/2017/786/diss-Aminov_-786.pdf, с авторефератом – в сети Интернет на сайте ВАК России по адресу: <http://vak.ed.gov.ru/dis-list>.

Автореферат разослан «___» _____ г.

Учёный секретарь диссертационного совета
к.б.н.

 Н.И. Зазнобина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Выявление физиолого–биохимических и морфологических адаптаций организма к различным экологическим условиям – одна из задач факториальной экологии (аутэкологии). Нарушение температурного режима водоемов, появление искусственных магнитных полей, выпадение кислотных осадков, избыточное поступление металлов и органических ксенобиотиков изменили привычную среду обитания гидробионтов. Возросшие масштабы использования пестицидов создают серьезную экологическую проблему, приводя к трансформации водных экосистем и негативно влияя на состояние водных животных (Vera et al., 2012). Благодаря исключительному разнообразию видового состава, особенностей питания и структурной организации пищеварительной системы, рыбы являются классическим объектом исследования в рамках факториальной экологии.

В адаптациях рыб к действию абиотических факторов среды активное участие принимают гликозидазы (ферменты, гидролизующие углеводы) (Уголев, Кузьмина, 1993; Высоцкая, Немова, 2008; Кузьмина, 2015). Изменение характеристик пищеварительных гликозидаз продемонстрировано при действии ряда физических и химических агентов в период раннего онтогенеза и на более поздних этапах развития (Голованова и др., 2008, 2013, 2015; Кузьмина и др., 2013; Filippov et al., 2014). При этом влияние важнейших экологических факторов на чувствительность гликозидаз к действию пестицидов практически не исследовано. Между тем применение физиолого–биохимических методов позволит подойти к решению одной из задач факториальной экологии – как увеличение антропогенной нагрузки на экосистему будет отражаться на жизнедеятельности отдельных организмов.

Степень разработанности темы исследования. Пестициды относятся к основным загрязнителям природных вод. Высокотехнологичный системный гербицид широкого спектра действия глифосат (N-(phosphonomethyl) glycine) – один из самых распространенных в мире (Benbrook, 2016). В поверхностных водах концентрация глифосата обычно не превышает 10–15 мкг/л, в районах непосредственного применения она достигает 700 мкг/л в воде и 5.0 мг/кг в седиментах и почве (Struger et al., 2008; Peruzzo et al., 2008; Aparicio et al., 2013). Его широкое применение обусловлено высокой эффективностью действия, хорошей биоразлагаемостью (период полураспада в воде составляет 7–14 дней, в донных отложениях водоемов – до 120 дней), а также появлением культур, генетически устойчивых к этому гербициду (Giesy et al., 2000; Benbrook, 2016).

Раундап, созданный на основе изопропиламиновой соли глифосата, используют для уничтожения сорной растительности на полях и приусадебных участках, а также в коллекторно-дренажных каналах, оросительных системах и прудах. В ряде работ отмечена низкая токсичность Раундапа и глифосата для водных животных (Neckovic et al., 1996; Giesy et al., 2000; Tsui, Chu, 2008; Filizadeh, Rajabi Islami, 2011; Kier, Kircland, 2013). В то же время установлено, что Раундап оказывает неблагоприятное действие на микроводоросли, макрофиты, беспозвоночных и рыб, вызывая нарушения различных функций

(Folmar et al., 1979; Tate et al., 1997; Tsui, Chu, 2003; Cox, 2004; Lushchak et al., 2009; Modesto, Martinez, 2010a; Rossi et al., 2011; Fan et al., 2013; Webster, Santos, 2015).

У рыб, являющихся хорошим биоиндикатором загрязнения водной среды, он нарушает процессы развития (Webster et al., 2014), изменяет поведение (Filizadeh, Rajabi Islami, 2011) и физиолого-биохимический статус организма (Jiraungkoorskul et al., 2002; Languano, Martinez, 2008; Cattaneo et al., 2011; Тарлева и др., 2014; Fan et al., 2013; Richard et al., 2014; Жиденко и др., 2015). Раундап изменяет энергетический метаболизм (Menendez-Helman et al., 2015) и углеводный обмен (Жиденко и др., 2009), оказывает мутагенный и генотоксический эффекты (Cavalcante et al., 2008; Guilherme et al., 2012; Filho et al., 2013a; Moreno et al., 2014), генерирует окислительный стресс и обладает нейротоксическим действием (Lushchak et al., 2009; Modesto, Martinez, 2010b; Fan et al., 2013; Webster, Santos, 2015).

Известно, что эффективность питания рыб и продуктивность водоемов в значительной мере зависят от состояния ферментных систем пищеварительного тракта, способности рыб переваривать и усваивать различные компоненты корма. Поступая в организм с водой и пищей, Раундап может оказывать прямое и опосредованное влияние на активность пищеварительных ферментов. Однако действие Раундапа на активность гликозидаз у рыб и объектов их питания до начала нашей работы было изучено крайне слабо (Голованова, Папченкова, 2009; Папченкова и др., 2009). Поскольку углеводы играют важную роль в энергетическом и пластическом обмене организма, а гидролазы жертвы могут принимать участие в пищеварении у рыб и обеспечивать аутодеградацию собственных тканей (Кузьмина, 2000), изучение характеристик указанных ферментов при действии Раундапа представляет значительный интерес не только для факториальной экологии, но и для практики рыбного хозяйства.

Цель работы: изучить действие гербицида Раундап на активность гликозидаз у рыб и объектов их питания в зависимости от ряда экологических факторов.

Задачи исследования:

1. Исследовать влияние Раундапа в широком диапазоне концентраций на активность гликозидаз в кишечнике рыб и в организме их кормовых объектов при стандартных условиях (температура 20°C, pH 7.4).

2. Изучить влияние Раундапа на активность гликозидаз в кишечнике рыб и в организме их кормовых объектов при разных значениях температуры и pH.

3. Оценить влияние некоторых экологических факторов на чувствительность гликозидаз рыб к действию Раундапа.

Научная новизна. Впервые показаны изменения активности гликозидаз в кишечнике рыб разных экологических групп и в организме их кормовых объектов при *in vitro* действии Раундапа в концентрациях, встречающихся в компонентах водной среды. Наряду с торможением Раундап может оказывать и стимулирующий эффект (особенно на активность мальтазы и сахаразы). Чувствительность ферментов, расщепляющих полисахарид крахмал, к действию Раундапа в кишечнике молоди, как правило, выше по сравнению с

взрослыми рыбами. Гликозидазы рыб ихтиофагов менее чувствительны к действию Раундапа по сравнению с типичными планкто- и бентофагами.

Установлено, что Раундап оказывает больший эффект на гликозидазы слизистой оболочки кишечника рыб, чем химуса. Впервые показано, что активность гликозидаз в тканях реальной жертвы, извлеченной из желудка хищника, в присутствии Раундапа снижается, в то время, как у потенциальной жертвы увеличивается. Наибольшее снижение активности гликозидаз в кишечнике рыб и в тканях их кормовых объектов отмечено при комплексном действии температуры 0°C, кислых или щелочных рН и Раундапа. Впервые выявлено, что различные экологические факторы (степень антропогенного загрязнения, присутствие в корме полихлорированных бифенилов (ПХБ), магнитная буря и повышение температуры среды) усиливают чувствительность гликозидаз рыб к действию гербицида. В то же время хроническая экспозиция к Раундапу снижает чувствительность гликозидаз к действию Раундапа *in vitro*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные расширяют представления о действии экологических факторов на функционирование пищеварительной системы рыб разных экологических групп. Результаты работы важны для сравнительной оценки характера влияния Раундапа на активность гликозидаз в кишечнике рыб и в организме кормовых объектов рыб планкто-, бенто- и ихтиофагов. Кроме того, полученные данные необходимо учитывать при разработке рациональных условий питания рыб в условиях аквакультуры в современных экологических условиях. Результаты работы могут быть использованы в курсах лекций по экологии, гидробиологии, а также экологической биохимии и физиологии рыб. Знания о характере влияния пестицидов на физиолого-биохимический статус гидробионтов позволят предвидеть опасные ситуации и их последствия, и разрабатывать превентивные меры.

Методология и методы исследования. Методология диссертационной работы основана на аутэкологическом исследовании активности гликозидаз в кишечнике рыб разных экологических групп и в организме объектов их питания, а также сравнении и анализе, позволяющем с помощью физиолого-биохимических методов оценить влияние загрязнения гербицидами водной среды на отдельные организмы. Использованы спектрофотометрические методы определения активности гликозидаз: глюкозооксидазный метод (мальтаза), модифицированный метод Нельсона (Nelson, 1944) (амилолитическая активность и активность сахаразы); ихтиологические методы определения размерно-массовых характеристик рыб, токсикологические методы, метод критического термического максимума (Becker, Genoway, 1979), метод воспроизведения геомагнитных флуктуаций (Krylov et al., 2014), статистические методы.

Соответствие паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют шифру специальности 03.02.08 – экология, конкретно пункту – факториальная экология.

Положения, выносимые на защиту:

1. Раундап в концентрациях, встречающихся в компонентах водной среды, может оказывать как тормозящий, так и стимулирующий эффект на активность гликозидаз у рыб и объектов их питания. У рыб сила и направленность эффекта зависит от вида, возраста и типа питания, локализации фермента и концентрации гербицида. Активность гликозидаз в тканях беспозвоночных в присутствии Раундапа в большинстве случаев повышается.

2. Наибольший тормозящий эффект Раундапа на активность гликозидаз кишечника рыб отмечен при кислых рН. Снижение температуры при нейтральных рН нивелирует тормозящий эффект, при кислых рН усиливает его. Влияние Раундапа на активность гликозидаз у кормовых объектов рыб в меньшей мере зависит от температуры и рН.

3. Чувствительность гликозидаз рыб к действию Раундапа зависит от ряда экологических факторов. Она повышается при увеличении температуры среды, действии магнитной бури, высоком уровне антропогенного загрязнения, присутствии ПХБ в корме и снижается после хронического действия Раундапа.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов обеспечена достаточным количеством экземпляров рыб и беспозвоночных, необходимым количеством повторностей, адекватным использованием статистических методов обработки данных и выбором компьютерных пакетов программ. Полученные результаты хорошо согласуются с данными российских и зарубежных авторов о действии Раундапа на живые организмы.

Апробация результатов. Результаты работы представлены на Междунар. конф. «Экология водных беспозвоночных», посвящ. 100-летию Ф.Д. Мордухай-Болтовского (Борок, 2010); Всерос. науч.-практич. конф. «Современные проблемы биологии, экологии, химии и экологического образования» (Ярославль, 2010); XIV Междунар. совещ. и VII школе по эвол. физиологии, посвящ. памяти акад. Л.А. Орбели (Санкт-Петербург, 2011); IV и V Всерос. конф. по вод. экотоксикол., посвящ. памяти Б.А. Флерова, с приглаш. спец. из стран ближ. зарубежья «Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы» (Борок, 2011, 2014); XIX и XX Всерос. мол. науч. конф. «Актуальные проблемы биологии и экологии» (Сыктывкар, 2012, 2013); Междунар. науч.-практич. конф. «Экология, эволюция и систематика животных» (Рязань, 2012); Междунар. науч. конф. «Актуальные проблемы биологической и химической экологии» (Мытищи, 2012); Всерос. конф. с междунар. участ. «Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптации гидробионтов» (Борок, 2012); XV Школе-конф. мол. уч. «Биология внутренних вод» (Борок, 2013); IV Междунар. симп. «Чужеродные виды в Голарктике» (Борок, 2013); Междунар. науч. конф. студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов – 2015» (Москва, 2015); Всерос. молодеж. гидробиол. конф. «Перспективы и проблемы современной гидробиологии» (Борок, 2016).

Личный вклад автора. Сбор и обработка материала исследования, проведение биохимических экспериментов, статистический анализ полученных данных, интерпретация и обобщение результатов, формулировка выводов

выполнены автором лично. Эксперименты по влиянию температуры среды, магнитного поля и ПХБ проведены совместно с коллегами, доля участия в совместных публикациях пропорциональна числу авторов.

Публикации. По теме диссертации опубликована 21 печатная работа: 19 статей (из них 9 статей в журналах, входящих в перечень ВАК РФ) и 2 тезисов.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 190 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, трех глав результатов исследований, общего заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложения. Работа содержит 33 рисунка и 24 таблицы, из них 8 рисунков и 11 таблиц в приложении. Список литературы включает 324 источника, в том числе 200 на иностранном языке.

Благодарность. Автор выражает глубокую благодарность д.б.н. И.Л. Головановой за предоставленную тему и неоценимую помощь на всех этапах выполнения работы; д.б.н. В.К. Голованову, к.б.н. А.А. Филиппову, к.б.н. В.В. Крылову, Д.С. Капшаю, А.А. Морозову и В.В. Юрченко за помощь в постановке экспериментов *in vivo*, а также Т.И. Крицыной за определение возраста рыб.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В главе дана характеристика гербицида Раундап, описано влияние глифосатсодержащих гербицидов на различные аспекты жизнедеятельности живых организмов. Представлены сведения о роли углеводов в питании рыб и ферментах, обеспечивающих переваривание углеводных компонентов пищи. Рассмотрено влияние природных и антропогенных факторов на активность гликозидаз у рыб и беспозвоночных.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Исследовано 13 видов пресноводных костистых рыб (тип Vertebrata, кл. Osteichthyes), относящихся к 7 семействам.

В качестве консументов исследованы половозрелые рыбы: тюлька *Clupeonella cultriventris* (Nord.) (сем. Clupeidae), плотва *Rutilus rutilus* (L.), лещ *Abramis brama* (L.), язь *Leuciscus idus* (L.), густера *Blicca bjoerkna* (L.) (сем. Cyprinidae), окунь *Perca fluviatilis* L., судак *Sander lucioperca* (L.) (сем. Percidae), налим *Lota lota* (L.) (сем. Lotidae), щука *Esox lucius* L. (сем. Esocidae), сом *Silurus glanis* L. (сем. Siluridae), а также молодь рыб: сеголетки тюльки, плотвы, окуня и двухлетки карпа *Cyprinus carpio* (L.), плотвы и щуки. Возраст половозрелых рыб 4–11+ (тюльки 1+).

В качестве объектов питания рыб–ихтиофагов исследованы: сеголетки карася серебряного *Carassius auratus* (L.) (сем. Cyprinidae), головешки–ротана *Perccottus glenii* (Dyb) (сем. Odontobutidae), тюльки, плотвы, карпа, окуня и судака. Потенциальные объекты питания рыб бенто– и планктофагов – ряд видов беспозвоночных, относящихся к 2 типам, 4 классам и 5 семействам:

тип Artropoda, кл. Crustacea: сем. Daphniidae, дафния *Daphnia magna* (Straus), а также планктонные организмы, входящие в состав суммарных проб рачкового зоопланктона и включающие представителей отр. Daphniiformes, Copepoda и Ostracoda, в которых доминировали дафнии *Daphnia longispina* Muller; кл. Insecta: сем. Chironomidae, личинки хирономид *Chironomus plumosus* (L.); тип Mollusca, кл. Bivalvia: сем. Dreissenidae, дрейссена полиморфная *Dreissena polymorpha* (Pall); кл. Gastropoda: сем. Lymneidae, прудовик большой *Lymnaea stagnalis* (L.); сем. Bulinidae, катушка роговая *Planorbarius corneus* (L.).

Все виды животных отловлены в летне–осенний период (налим – зимой) в Рыбинском водохранилище, его притоках или прибрежных прудах. Всего в различных экспериментах было исследовано около 900 экз. рыб (таблица 1) и несколько тысяч экз. беспозвоночных.

Таблица 1

Количество рыб, использованных для решения различных задач

	Задача исследования	Вид рыб	Экз
1	Влияние Раундапа (0.1–50 мкг/л) на гликозидазы кишечника молоди рыб при стандартных условиях (температура 20°C, pH 7.4)	Тюлька, карп, плотва, окунь, щука	220
2	Влияние Раундапа (0.1–50 мкг/л) на гликозидазы кишечника взрослых рыб при стандартных условиях	Тюлька, лещ, язь, сом, плотва, налим, окунь, щука, судак, густера	115
3	Влияние Раундапа (0.1–50 мкг/л) на гликозидазы в организме молоди рыб при стандартных условиях	Тюлька, плотва, карп, карась, окунь, щука, судак, ротан	70
4	Влияние Раундапа (25 мкг/л) на гликозидазы кишечника молоди рыб при разных значениях температуры и pH	Тюлька, карп, окунь	120
5	Влияние Раундапа (25 мкг/л) на гликозидазы кишечника взрослых рыб при разных значениях температуры и pH	Окунь, налим, щука, судак, сом	30
6	Влияние Раундапа (25 мкг/л) на гликозидазы в организме молоди рыб при разных значениях температуры и pH	Тюлька, молодь карповых, окунь	120
7	Влияние степени антропогенного загрязнения	Лещ, плотва	36
8	Влияние присутствия ПХБ в корме	Лещ	25
9	Влияние хронической экспозиции к Раундапу	Ротан	24
10	Влияние скорости повышения температуры воды	Карп, ротан	96
11	Влияние магнитной бури	Плотва	40

В экспериментах *in vitro* изучено влияние Раундапа в концентрации 0.1–50 мкг/л на активность гликозидаз в кишечнике рыб и в организме их кормовых объектов при стандартных условиях (температура 20°C, pH 7.4), а также в концентрации 25 мкг/л при разных значениях температуры (0, 10 и 20°C) и pH

(5, 7.4, 8.3). Выбранный для исследования диапазон температуры и pH отражает естественные колебания этих показателей в природных водоемах и пищеварительном тракте рыб. Влияние экологических факторов (температура воды, магнитная буря, ПХБ, Раундап, степень загрязнения водоема) на чувствительность гликозидаз рыб к действию Раундапа изучено в экспериментах *in vivo*. Активность гликозидаз определяли в гомогенатах слизистой оболочки кишечника и химуса рыб, а также целого организма их кормовых объектов. Для взрослых рыб использовали индивидуальные гомогенаты, для беспозвоночных и молоди рыб – суммарные гомогенаты от нескольких особей и считали их за одну биологическую повторность (n). Амилолитическую активность (АА), отражающую суммарную активность ферментов, гидролизующих крахмал – α -амилазы КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы КФ 3.2.1.3 и мальтазы КФ 3.2.1.20, а также активность сахаразы КФ 3.2.1.48 оценивали по приросту гексоз методом Нельсона (Nelson, 1944) в модификации Уголева, Иезуитовой (1969). Активность мальтазы определяли глюкозо-оксидазным методом с помощью набора для клинической биохимии «Фотоглюкоза» (ООО «Импакт», Россия).

Для приготовления растворов гербицида использовали коммерческий препарат «Раундап» (произведен ЗАО фирма «Август» (Россия) по лицензии фирмы «Монсанто Европа С. А.» (Бельгия)). Выбор концентраций Раундапа (0.1–50 мкг/л по глифосату) обусловлен значениями ПДК (1 мкг/л) для воды рыбохозяйственных водоемов (Перечень..., 1999) и значениями LC_{50} для рыб и беспозвоночных (Giesy et al., 2000; Папченкова и др., 2009). Концентрации 0.1–10 мкг/л соответствуют содержанию глифосата в природных водах, 25 и 50 мкг/л – в почве, воде и донных отложениях в районах непосредственного применения гербицида (Struger et al., 2008; Aparicio et al., 2013).

Статистическая обработка. Результаты представлены в виде средних значений и их ошибок ($M \pm m$). В случае нормального распределения (тест Шапиро–Уилка) при сравнении результатов использовали однофакторный и многофакторный дисперсионный анализ (ANOVA, LSD-тест или Dunnett-тест) с оценкой значимости различий при помощи критерия Фишера (F). Если распределение отличалось от нормального (взрослые ихтиофаги), использовали критерий Краскела–Уоллиса. Различия показателей считали статистически значимыми при уровне значимости $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ или $p \leq 0.001$.

Глава 3. Влияние Раундапа на гликозидазы рыб и объектов их питания при стандартных условиях (температура 20°C, pH 7.4)

Молодь рыб. В серии предварительных экспериментов установлено, что Раундап может снижать АА в слизистой оболочке кишечника молоди плотвы в диапазоне концентраций от $1 \cdot 10^{-13}$ мкг/л до 1 г/л (рисунок 1) и повышать активность мальтазы при концентрациях выше 0.01 мкг/л. При этом сверхмалые $\leq 1 \cdot 10^{-11}$ М ($\leq 1 \cdot 10^{-3}$ мкг/л) концентрации и концентрации, отличающиеся на 2–17 порядков, могут вызывать одинаковый эффект.

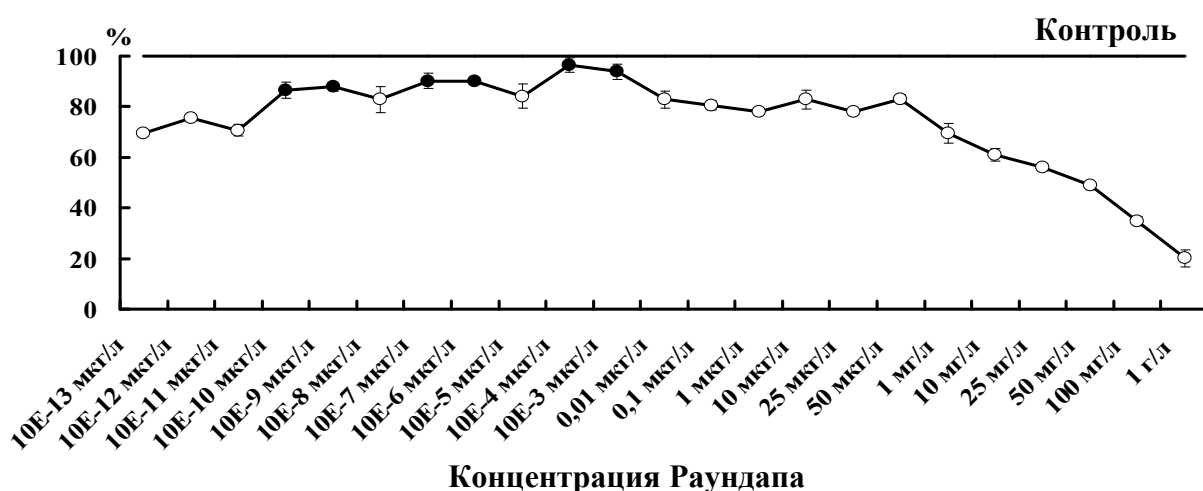


Рисунок 1. Амилитическая активность в слизистой оболочке кишечника 2-х леток плотвы (20 экз.) (% от контроля) при разных концентрациях Раундапа *in vitro*; ○ – различия показателей статистически значимы по сравнению с контролем (ANOVA, Dunnett-test), $p < 0.05$; ● – не отличаются от контроля, $n = 5$.

Наибольший уровень АА в слизистой оболочке кишечника и в химусе при стандартных значениях температуры и pH (20°C, pH 7.4) отмечен у карпа и плотвы, более низкий у окуня и тюльки, минимальный – у щуки (таблица 2).

Таблица 2

Активность гликозидаз (мкмоль/г·мин) в слизистой оболочке кишечника молоди рыб (0+ – 1+) в присутствии Раундапа *in vitro*

Вид (экз.)	Концентрация Раундапа, мкг/л					
	0	0.1	1	10	25	50
Амилитическая активность						
Тюлька	11.7±0.3 ^a	10.3±0.3 ^б	10.3±0.5 ^б	9.51±0.6 ^б	9.20±0.5 ^б	9.10±0.3 ^б
Карп	228.8±2.0 ^a	193.6±3.9 ^б	179.2±4.8 ^{бв}	176.8±8.6 ^{бв}	173.6±7.9 ^б	166.4±4.7 ^б
Плотва	57.2±1.6 ^a	56.4±3.5 ^a	52.4±3.2 ^{аб}	52.9±1.1 ^{аб}	47.2±1.5 ^{бв}	42.1±1.9 ^б
Окунь	34.4±1.2 ^{аб}	37.6±2.1 ^a	32.5±2.6 ^{а,б}	31.2±3.0 ^{абв}	28.4±3.1 ^{бв}	24.8±2.1 ^б
Щука	0.89±0.02 ^a	0.79±0.02 ^б	0.78±0.02 ^б	0.77±0.03 ^б	0.74±0.03 ^б	0.74±0.01 ^б
Активность сахаразы						
Тюлька	0.64±0.01 ^a	0.68±0.07 ^a	0.63±0.01 ^a	0.67±0.01 ^a	0.66±0.01 ^a	0.67±0.01 ^a
Карп	1.24±0.09 ^a	1.25±0.11 ^a	1.27±0.04 ^a	1.29±0.05 ^a	1.36±0.13 ^a	1.36±0.10 ^a
Плотва	1.16±0.11 ^a	1.09±0.1 ^a	1.24±0.10 ^a	1.66±0.17 ^{аб}	1.80±0.10 ^a	1.88±0.06 ^a
Окунь	0.59±0.04 ^a	0.51±0.03 ^a	0.82±0.03 ^б	0.93±0.02 ^б	1.06±0.04 ^б	1.14±0.00 ^б
Активность мальтазы						
Тюлька	4.48±0.08 ^{аб}	–	–	–	4.18±0.19 ^a	4.85±0.08 ^б
Карп	5.13±0.15 ^a	5.48±0.29 ^{аб}	5.35±0.14 ^{аб}	5.53±0.09 ^{аб}	5.82±0.20 ^{бв}	6.04±0.21 ^б
Окунь	1.44±0.05 ^a	–	1.37±0.14 ^a	1.79±0.08 ^б	1.28±0.05 ^a	2.30±0.07 ^б

Примечание: разные надстрочные индексы указывают на статистически значимые различия между показателями в строке (ANOVA, LSD-тест), $p < 0.05$; количество исследованных рыб 12–50 экз., $n = 5$; «–» данные отсутствуют.

Раундап снижает АА в слизистой оболочке кишечника у исследованных видов рыб на 11–28% от контроля. Торможение АА у карпа составило 15–27%, у тюльки 12–22%, у щуки 11–17% во всем диапазоне концентраций Раундапа. Снижение АА на 17 и 26% у плотвы и на 28% у окуня отмечено лишь при наибольших концентрациях. Активность сахаразы у плотвы повышается на 55–62% при наиболее высоких концентрациях Раундапа, у окуня – на 39–93% в более широком диапазоне концентраций. Активность мальтазы у карпа выше контроля на 13–18%, у окуня на 24 и 60% лишь при наиболее высоких концентрациях Раундапа. Активность гликозидаз в химусе в присутствии Раундапа изменяется лишь у карпа: АА снижается на 14–26% по мере увеличения концентрации гербицида, активность мальтазы повышается на 10%, сахаразы – на 16% от контроля при концентрациях Раундапа 10 и 50 мкг/л соответственно. У других исследованных видов рыб статистически значимые эффекты отсутствуют.

Взрослые рыбы. Наибольший уровень АА в слизистой оболочке кишечника половозрелых рыб (таблица 3) отмечен у бентофагов плотвы, язя и

Таблица 3

Активность гликозидаз (мкмоль/г·мин) в слизистой оболочке кишечника взрослых рыб в присутствии Раундапа *in vitro*

Вид (экз.)	Концентрация Раундапа, мкг/л					
	0	0.1	1	10	25	50
Амилолитическая активность						
Тюлька	5.97±0.06 ^a	5.77±0.12 ^{ab}	5.73±0.04 ^{ab}	5.47±0.11 ^b	5.50±0.15 ^b	5.47±0.21 ^b
Лещ	8.96±0.29 ^a	9.71±0.16 ^{ab}	9.60±0.12 ^{ab}	9.44±0.18 ^{ab}	10.51±0.11 ^b	10.29±0.16 ^b
Язь	11.10±0.18 ^a	10.18±0.17 ^b	9.77±0.13 ^b	10.18±0.17 ^b	9.97±0.12 ^b	11.10±0.18 ^a
Плотва	14.9±1.25 ^a	12.3±0.56 ^{ab}	9.37±1.27 ^b	10.5±0.84 ^{ab}	6.51±0.98 ^г	9.14±0.60 ^{бг}
Налим	0.81±0.01 ^a	1.09±0.02 ^b	0.89±0.01 ^a	1.27±0.02 ^b	0.89±0.01 ^a	0.86±0.02 ^{ab}
Окунь	0.92±0.10 ^a	0.86±0.02 ^a	0.94±0.04 ^a	1.02±0.02 ^a	0.90±0.02 ^a	0.78±0.04 ^a
Щука	0.43±0.01 ^a	0.44±0.01 ^a	0.46±0.01 ^a	0.45±0.01 ^a	0.44±0.01 ^a	0.44±0.01 ^a
Судак	0.28±0.04 ^a	0.36±0.06 ^a	0.32±0.04 ^a	0.32±0.02 ^a	0.34±0.02 ^a	0.24±0.02 ^a
Сом	0.59±0.03 ^a	0.60±0.01 ^a	0.58±0.02 ^a	0.57±0.02 ^a	0.56±0.02 ^a	0.58±0.01 ^a
Активность сахаразы						
Тюлька	1.43±0.03 ^a	1.59±0.05 ^a	1.44±0.05 ^a	1.51±0.05 ^a	1.45±0.05 ^a	1.52±0.03 ^a
Плотва	4.08±0.10 ^a	3.40±0.06 ^b	2.60±0.03 ^г	2.80±0.08 ^b	2.61±0.05 ^{бг}	2.64±0.05 ^{бг}
Щука	0.55±0.02 ^a	0.39±0.03 ^a	0.43±0.04 ^a	0.36±0.04 ^a	0.32±0.02 ^b	0.29±0.02 ^b
Активность мальтазы						
Плотва	11.2±0.30 ^a	10.21±0.34 ^{ab}	10.32±0.12 ^{ab}	8.50±0.53 ^b	9.87±0.16 ^b	10.00±0.27 ^b
Язь	7.02±0.30 ^a	4.26±0.14 ^b	6.20±0.15 ^{ab}	3.59±0.19 ^b	4.02±0.18 ^b	4.64±0.11 ^b
Лещ	1.68±0.20 ^{ab}	2.04±0.28 ^{бв}	1.47±0.17 ^a	1.92±0.10 ^{abв}	2.28±0.13 ^b	2.25±0.13 ^b
Густера	1.61±0.04 ^a	1.34±0.09 ^b	1.70±0.07 ^a	1.12±0.03 ^b	1.58±0.04 ^a	1.55±0.08 ^a
Сом	2.16±0.02 ^a	2.12±0.01 ^a	2.18±0.03 ^a	1.41±0.15 ^b	2.19±0.05 ^a	2.26±0.01 ^a

Примечание: разные надстрочные индексы указывают на статистически значимые различия между показателями в строке (ANOVA, LSD–тест, для ихтиофагов Kruskal–Wallis), $p < 0.05$; количество исследованных рыб 7–8 экз. (тюлька 50, сом 4); $n = 4–8$.

леща, минимальный – у типичных и факультативных ихтиофагов. Раундап оказывает разнонаправленное влияние на АА у рыб разных видов: понижает её на 30–56% у плотвы, на 8–12% у тюльки и язя, но повышает у леща и налима при некоторых концентрациях. Активность сахаразы у плотвы снижается на 17–36% от контроля во всем диапазоне концентраций Раундапа, у щуки – на 42–47% при наибольших концентрациях, у тюльки не меняется. Активность мальтазы снижается на 11–24% у плотвы, на 17–30% у густеры, на 34–49% у язя, но увеличивается у леща примерно на 35% от контроля при наибольших концентрациях Раундапа.

Максимальный уровень АА в химусе отмечен у язя и леща, минимальный у ихтиофагов, особенно у судака. В присутствии Раундапа выявлено снижение АА на 38–48% у плотвы и на 10–27% у язя практически во всем диапазоне концентраций. Снижение АА на 11–14% у налима и на 41% у судака, а также повышение АА на 20–25% у окуня и на 7–14% у леща отмечено при отдельных концентрациях гербицида. Активность сахаразы снижается на 58% у щуки, но повышается на 21–49% у плотвы и на 14% у тюльки лишь при некоторых концентрациях Раундапа. Активность мальтазы увеличивается у язя, плотвы, леща и сома при некоторых концентрациях Раундапа не более чем на 14–30% от контроля.

Объекты питания ихтиофагов. Максимальный уровень АА в целом организме сеголетков при температуре 20°C и рН 7.4 выявлен у карася, минимальный – у судака и тюльки (таблица 4).

Таблица 4

Амилолитическая активность (мкмоль/г·мин) в целом организме молоди рыб в присутствии гербицида Раундап *in vitro*

Вид (экз.)	Концентрация Раундапа, мкг/л					
	0	0.1	1	10	25	50
Амилолитическая активность						
Тюлька	0.51±0.03 ^a	0.52±0.03 ^a	0.47±0.03 ^a	0.47±0.02 ^a	0.49±0.03 ^a	0.46±0.02 ^a
Карп	4.30±0.18 ^{ab}	2.63±0.26 ^b	3.58±0.14 ^г	4.00±0.16 ^{бг}	4.95±0.19 ^a	4.34±0.35 ^{ab}
Плотва	9.07±0.32 ^a	10.4±0.27 ^{ab}	10.2±0.54 ^{ab}	10.8±0.53 ^б	11.4±0.78 ^б	11.1±0.37 ^б
Плотва*	8.27±0.12 ^a	6.67±0.34 ^б	6.40±0.40 ^б	6.47±0.39 ^б	6.13±0.63 ^б	5.60±0.39 ^б
Ротан	8.12±0.12 ^a	7.24±0.12 ^b	7.52±0.31 ^{ab}	7.96±0.16 ^{ab}	8.58±0.15 ^a	8.04±0.16 ^{ab}
Карась	22.3±0.73 ^{ab}	17.9±1.38 ^b	19.5±0.80 ^{бв}	23.5±0.90 ^a	21.9±0.33 ^{ab}	23.7±0.27 ^a
Окунь	4.11±0.07 ^{ab}	3.79±0.32 ^{ab}	4.27±0.17 ^{ab}	3.49±0.45 ^a	4.27±0.44 ^{ab}	4.53±0.40 ^б
Щука	3.93±0.24 ^a	4.07±0.12 ^a	4.13±0.17 ^a	5.40±0.19 ^б	5.53±0.27 ^б	5.73±0.29 ^б
Судак	0.66±0.04 ^a	0.54±0.09 ^a	0.52±0.05 ^a	0.41±0.05 ^б	0.77±0.07 ^a	0.60±0.09 ^{ab}

Примечание: разные надстрочные индексы указывают на статистически значимые различия между показателями в строке (ANOVA, LSD–тест), $p < 0.05$; * – плотва (4 экз.), извлеченная из желудка щуки; количество исследованных рыб 15–100 экз.; $n = 4–5$.

В присутствии Раундапа отмечены разнонаправленные эффекты. У ряда видов (ротан, карась, судак) тормозящие эффекты выявлены лишь при одной из

концентраций. У карпа снижение АА на 39 и 17% отмечено при минимальных концентрациях гербицида. У щуки и плотвы АА повышается на 19–46% от контроля при концентрациях Раундапа 10–50 мкг/л. В то же время у плотвы, извлеченной из желудка щуки, выявлен концентрационно–зависимый тормозящий эффект: АА снижается на 19–32% с ростом концентрации Раундапа. Активность мальтазы в присутствии Раундапа изменяется разнонаправлено. Она увеличивается на 18–152% у плотвы, окуня, щуки и карпа, снижается на 12–41% у ротана, судака и плотвы, извлеченной из желудка щуки, и не меняется у тюльки и карася. При этом четкой зависимости эффекта от концентрации Раундапа не выявлено. Активность сахаразы в присутствии Раундапа у большинства исследованных видов не меняется. Лишь у плотвы, извлеченной из желудка щуки, она снижается на 57–77% в диапазоне концентраций Раундапа 1–50 мкг/л и у ротана – на 13 и 15% при концентрациях 0.1 и 25 мкг/л.

Беспозвоночные. Наибольшая активность мальтазы и сахаразы отмечена у личинок хирономид, АА – в тканях прудовика и катушки; наименьшая активность всех изученных гликозидаз – в суммарных пробах рачкового зоопланктона. Раундап снижает АА на 30–34% в тканях рачкового зоопланктона лишь при наиболее высоких концентрациях. Самые низкие концентрации гербицида снижают АА у дрейссены, в то время как самые высокие повышают её у дрейссены, прудовика и дафнии магна на 14–30% от контроля. Активность мальтазы у рачкового зоопланктона и хирономид повышается практически во всем диапазоне исследованных концентраций, у дрейссены и прудовика – при наиболее высоких концентрациях гербицида. Активность сахаразы в тканях исследованных беспозвоночных (исключая прудовика и катушку) повышается лишь при более высоких концентрациях Раундапа. Четкой зависимости эффектов от концентрации гербицида во всех вариантах опыта не выявлено.

Глава 4. Влияние Раундапа на гликозидазы рыб и объектов их питания при разных значениях температуры и рН

Молодь рыб. Максимальный уровень АА в слизистой оболочке кишечника у тюльки, карпа и окуня выявлен при температуре 20°C и рН 7.4 в отсутствие Раундапа. Снижение температуры уменьшает ферментативную активность у всех исследованных видов, смещение рН в кислую сторону снижает АА в большей степени у карпа, в меньшей у тюльки, у окуня изменений нет.

Чувствительность гликозидаз к действию Раундапа (25 мкг/л) зависит от температуры и рН. Уровень АА при рН 7.4 и температуре 20°C у тюльки снижается на 26%, при 10°C – на 12% по сравнению с активностью в отсутствие Раундапа (контроль), при 0°C тормозящий эффект отсутствует. При щелочных рН тормозящий эффект Раундапа выявлен при температуре 0 и 10°C и составляет 74 и 33% от контроля, соответственно. При кислых рН тормозящий эффект Раундапа составил 80, 21 и 24% при 0, 10 и 20°C, соответственно. У

карпа отмечены близкие эффекты: торможение АА при рН 5.0 составило соответственно 42, 38 и 30% при 0, 10 и 20°C, при рН 7.4 – 20% (20°C), при рН 8.3 – 39% (0°C). У окуня снижение АА в присутствии Раундапа выявлено лишь в зоне кислых рН при 0°C. Максимальное снижение АА выявлено при комплексном действии температуры 0°C, рН 5.0 и Раундапа: на 98% у тюльки, 95% у карпа, 72% у окуня от таковой при температуре 20°C, рН 7.4 в отсутствие Раундапа. Статистически значимое усиление эффекта отмечено при действии всех трех факторов, $p < 0.0001$. Сила влияния Раундапа не превышает 3%.

Взрослые рыбы. Максимальный уровень АА в слизистой оболочке кишечника у факультативных и типичных ихтиофагов выявлен при температуре 20°C, рН 7.4 и в отсутствие Раундапа. Снижение температуры уменьшает АА в 1.5–4 раза у всех исследованных видов, смещение рН в кислую сторону – в 2 раза лишь у окуня. Раундап (25 мкг/л) снижает АА у сома на 21% при 20°C, рН 7.4, на 14–17% при кислых и щелочных рН. У других видов наибольшее снижение АА выявлено в зоне кислых рН: на 11–38% у щуки, 26–57% у налима, 57–71% у судака и 76–87% у окуня. У сома, судака и щуки тормозящий эффект Раундапа отмечен и при щелочных рН. Максимальное снижение АА при комплексном действии температуры 0°C, рН 5.0 и Раундапа составило 59% у сома, 81% у судака, 89% у щуки и налима, 97% у окуня. Статистически значимое усиление эффекта отмечено при действии всех трех факторов (исключая судака) (таблица 5).

Таблица 5

Статистическая значимость при оценке раздельного и комплексного влияния температуры (Т), рН и Раундапа (Р) на АА в слизистой оболочке кишечника взрослых рыб; в скобках – сила влияния каждого фактора (%) по отдельности

Фактор	Виды рыб				
	Окунь	Налим	Щука	Судак	Сом
Т	0.0000 (48.0)	0.0000 (87.3)	0.0000 (91.7)	0.0000 (23.6)	0.0000 (56.6)
рН	0.0000 (27.1)	0.0000 (5.1)	0.0000 (3.6)	0.0000 (10.9)	0.0000 (20.0)
Р	0.0000 (3.2)	0.0000 (1.5)	0.0000 (0.7)	0.0000 (34.5)	0.0000 (2.6)
Т+рН	0.0000	0.0000	0.0000	0.0315	0.0673
Т+Р	0.0000	0.0000	0.0000	0.0037	0.0000
рН+Р	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0010
рН+Р+Т	0.0000	0.0002	0.0464	0.1305	0.0159

Жирным шрифтом – влияние фактора статистически значимо, $p < 0.05$.

В химусе наибольшая АА также отмечена при температуре 20°C и рН 7.4 в отсутствие Раундапа. Снижение температуры уменьшает АА в 2–3.5 раза, смещение рН в кислую сторону – практически не меняет её. При нейтральных рН Раундап снижает АА на 9–25% лишь у щуки, при щелочных рН – у всех исследованных видов рыб (в большей степени у щуки на 32–67%). Торможение АА в присутствии Раундапа при рН 5.0 составило у сома 10–20%, у судака 23–27%, у налима 48–53%, у щуки 42–71%. В химусе щуки сила тормозящего

эффекта увеличивается с понижением pH. Наибольшее снижение АА отмечено при комплексном действии температуры 0°C, pH 5.0 и Раундапа: на 71% у сома, 81% у налима и 95% у щуки (54% у судака при pH 8.3). У щуки и налима статистически значимое усиление эффекта отмечено при действии всех трех факторов, $p < 0.05$.

Объекты питания ихтиофагов. Максимальный уровень АА в целом организме молоди рыб (сеголетки плотвы, а также окуня и тюльки) выявлен при температуре 20°C и pH 7.4 в отсутствие Раундапа. При нейтральных pH снижение АА в присутствии Раундапа (25 мкг/л) отмечено у тюльки (на 54 и 30% при температуре 0 и 10°C) и окуня (на 27% при 20°C). При щелочных pH повышение АА на 59–62% выявлено у молоди плотвы и тюльки (0°C), на 27% у окуня (10°C). При кислых pH снижение АА на 54% показано у тюльки (0°C) и на 24% у плотвы (20°C). Наибольшее снижение АА отмечено при комплексном действии всех трёх факторов: на 54, 81 и 97% (pH 5.0; температура 0°C в присутствии Раундапа) и 60, 79 и 88% (pH 8.3; температура 0°C в присутствии Раундапа) у окуня, тюльки и плотвы, соответственно. Статистически значимое усиление эффекта отмечено у окуня и плотвы при действии всех трех факторов, $p < 0.01$.

Беспозвоночные. Максимальная АА в организме беспозвоночных отмечена при температуре 20°C и pH 7.4 в отсутствие Раундапа. При кислых pH (температура 10 и 20°C) Раундап (25 мкг/л) снижает АА на 15–21% в тканях рачкового зоопланктона, хирономид и катушки. При pH 7.4 и температуре 0°C повышение АА составило 18% в тканях рачкового зоопланктона и 54% у прудовика, при pH 8.3 – 23% лишь у дрейссены. Наибольшее снижение АА отмечено при комплексном действии трёх факторов: 29 и 33% у хирономид, 48 и 57% у дрейссены, 60 и 62% у катушки, 84 и 93% у прудовика, 88 и 76% у рачкового зоопланктона в присутствии Раундапа при температуре 0°C, pH 5.0 и 8.3 соответственно. Однако эти эффекты, в значительной мере, обусловлены совместным действием низкой температуры и pH ($p < 0.0001$), вклад Раундапа в комплексный эффект (исключая хирономид и катушку) незначителен.

Глава 5. Влияние экологических факторов на чувствительность гликозидаз рыб к действию Раундапа *in vitro*

Степень антропогенного загрязнения. Содержание загрязняющих веществ (тяжелые металлы, ПХБ и хлорорганические пестициды) в разных компонентах экосистемы (вода, донные отложения, бентос, рыбы) Шекснинского плеса Рыбинского водохранилища на 1–2 порядка выше по сравнению с наиболее чистыми Моложским и Волжским плесами (Флеров и др., 2001; Чуйко и др., 2010). Установлено, что в присутствии Раундапа в концентрации 0.1–50 мкг/л АА у плотвы (7–8+) из Волжского плеса снижается на 11% лишь при максимальной концентрации, из Шекснинского плеса – на 15–18% во всем диапазоне концентраций Раундапа. Уровень АА в кишечнике леща (10–11+) из этих районов в присутствии Раундапа не меняется. Снижение активности

мальтазы при концентрации Раундапа 10–50 мкг/л составило 12–25% у плотвы из Волжского плеса и 25–29% у рыб из Шекснинского плеса. Активность мальтазы у леща из более чистого района увеличивается на 44 и 70% при концентрациях Раундапа 10 и 25 мкг/л, из более загрязненного – не изменяется. Гликозидазы леща более устойчивы к действию Раундапа по сравнению с плотвой, что может быть обусловлено как разным спектром питания, так и разным изоферментным составом гликозидаз, функционирующих у этих видов. Вместе с тем у леща из Шекснинского плеса отмечено повышение чувствительности гликозидаз, гидролизующих крахмал, к *in vitro* действию ионов меди и цинка (Голованова и др., 2014).

Полихлорированные бифенилы (ПХБ) – одна из самых распространенных групп стойких органических загрязнителей, относящихся к классу хлорорганических соединений. У молоди леща (3+), получавшего корм с повышенным содержанием ПХБ (коммерческий препарат Aroclor 1254 из расчета 2 мг/г сухой массы корма), показано изменение чувствительности гликозидаз слизистой оболочки кишечника к действию Раундапа в концентрации 0.1–50 мкг/л. Чувствительность ферментов, гидролизующих крахмал, зависит от длительности поступления ПХБ с кормом. На 7-е сутки эксперимента различия отсутствуют, а на 14 сутки у рыб контрольной группы (корм без ПХБ) АА повышается на 8–15%, у рыб опытной группы – снижается на 14–19% при некоторых концентрациях Раундапа. Активность мальтазы в присутствии Раундапа увеличивается на 8–33% у рыб опытной группы и лишь на 4–8% у рыб контрольной группы уже на 7 сутки опыта.

Хроническое действие Раундапа. Чувствительность гликозидаз, гидролизующих крахмал, в кишечнике молоди ротана к действию Раундапа *in vitro* снижалась после 30 сут. экспозиции к этому гербициду в концентрации 2 мкг/л (2 ПДК). Торможение АА в кишечнике рыб контрольной группы при концентрации Раундапа 0.1–50 мкг/л составило 47–64%, опытной группы – лишь 13–21% от контроля (таблица 6). Зависимость силы эффекта от концентрации гербицида отсутствует.

Таблица 6

АА (мкмоль/г·мин) в кишечнике ротана (1+) в присутствии Раундапа *in vitro* у рыб контрольной (30–сут. экспозиция без Раундапа) и опытной (30–сут. экспозиция в растворе Раундапа в концентрации 2 мкг/л) групп, n = 6

Группа (экз.)	Концентрация Раундапа, мкг/л					
	0	0.1	1	10	25	50
Контрольная (12)	4.69±0.10 ^a	1.97±0.08 ^b	1.71±0.11 ^b	1.73±0.17 ^b	1.92±0.11 ^b	2.51±0.17 ^b
Опытная (12)	2.82±0.11 ^a	2.45±0.04 ^b	2.44±0.02 ^{ob}	2.22±0.10 ^b	2.38±0.07 ^b	2.39±0.08 ^b

Примечание: разные надстрочные индексы указывают на статистически значимые различия между показателями в строке (ANOVA, LSD–тест), $p < 0.05$.

Повышение температуры воды. Чувствительность гликозидаз, гидролизующих крахмал и мальтозу в целом организме молоди ротана (акклимированного к температуре 13°C в осенний период) к *in vitro* действию Раундапа меняется при разных скоростях нагрева воды. В отсутствие нагрева АА снижается на 11% лишь при минимальной концентрации Раундапа. Медленная скорость нагрева 0.02°C/ч вызывает понижение АА на 11–19% при концентрациях Раундапа 0.1, 25 и 50 мкг/л. При более высоких скоростях нагрева АА повышается при некоторых концентрациях Раундапа: на 11–13% при скорости 4.2°C/ч, на 9–18% при скоростях 8.5, 27 и 42°C/ч. Активность мальтазы в отсутствие нагрева снижается на 12–16% при концентрации гербицида 1 и 25 мкг/л, при скоростях нагрева 4.2, 8.5, 42°C/ч – на 12–19% при более высоких концентрациях. Наибольший тормозящий эффект Раундапа (24–53% от контроля) выявлен при скорости нагрева 27°C/ч. Самая медленная скорость нагрева приводит к повышению активности мальтазы на 64–86% во всем диапазоне концентраций Раундапа (исключая 0.1 мкг/л).

Уровень АА в слизистой оболочке кишечника сеголетков карпа, акклимированных к температуре 32°C в осенний период, в присутствии Раундапа повышается на 6–8% практически во всем диапазоне исследованных концентраций (рисунок 2).

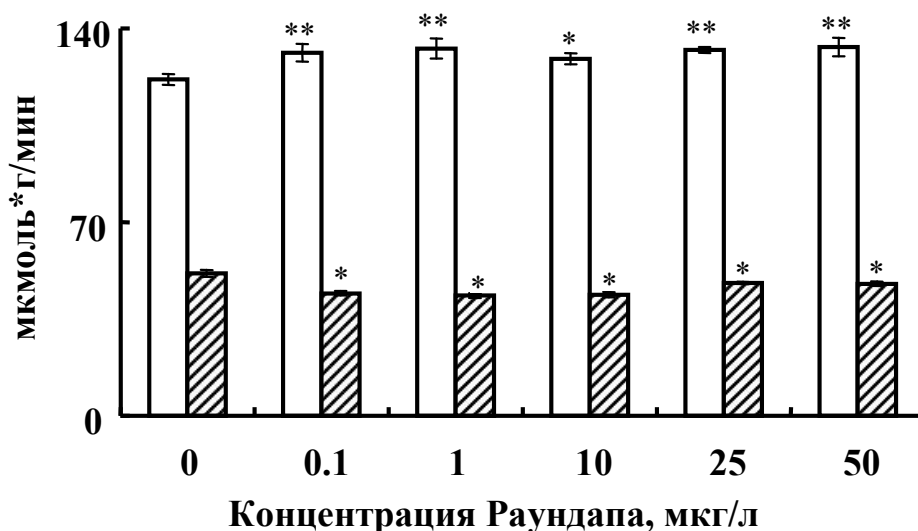


Рисунок 2. Амилолитическая активность (мкмоль/г·мин) в слизистой оболочке кишечника карпа (0+) в присутствии Раундапа *in vitro* при скорости нагрева воды 0°C/ч □ и 8°C/ч ▨; различия показателей статистически значимы по сравнению с контролем (0 мкг/л) при: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ (ANOVA, Dunnett-test); количество исследованных рыб = 12 экз.; $n = 6$.

У рыб, подвергнутых нагреву со скоростью 8°C/ч, Раундап вызывает снижение АА на 7–16% от контроля. Зависимости силы эффекта от концентрации Раундапа не выявлено. Активность мальтазы у карпов, не подвергавшихся и подверженных нагреву, в присутствии Раундапа не меняется.

Действие магнитной бури (МБ) в период раннего эмбриогенеза приводит к усилению чувствительности гликозидаз в кишечнике сеголетков плотвы к *in vitro* действию Раундапа по сравнению с особями, развивавшимися в условиях естественного геомагнитного поля (ГМП) (таблица 7).

У рыб, развивавшихся в ГМП, АА снижалась на 10–12%, активность мальтазы повышалась на 34–69% от контроля (концентрация Раундапа 0 мкг/л). У рыб, подвергнутых действию МБ на стадии органогенеза (в отрезок 48–72 ч после оплодотворения), АА снижалась на 27–36%, активность мальтазы, повышалась на 61–69%. Зависимость эффекта от концентрации гербицида отсутствует.

Таблица 7

Влияние магнитной бури (в диапазоне частот 0–5 Гц) в период эмбриогенеза (48–72 ч после оплодотворения) на активность гликозидаз (мкмоль/г·мин) в слизистой оболочке кишечника сеголетков плотвы (по 20 экз.) в присутствии Раундапа *in vitro*, n=6

Условия опыта	Концентрация Раундапа, мкг/л					
	0	0.1	1	10	25	50
Амилолитическая активность						
ГМП	29.3±0.94 ^a	26.1±0.65 ^б	25.7±0.72 ^б	26.4±0.17 ^б	–	25.9±0.74 ^б
МБ	34.7±0.89 ^a	22.1±0.80 ^б	22.9±1.25 ^{бв}	25.5±0.98 ^б	–	25.3±1.09 ^б
Мальтаза						
ГМП	13.4±0.43 ^a	18.3±0.56 ^б	17.9±0.43 ^б	19.9±0.44 ^б	20.1±0.27 ^б	22.6±0.43 ^г
МБ	13.0±0.19 ^a	20.9±0.52 ^б	21.0±0.79 ^б	21.5±0.33 ^б	21.3±0.19 ^б	22.0±0.57 ^б

Примечание: разные надстрочные индексы указывают на статистически значимые различия между показателями в строке (ANOVA, LSD–тест), $p < 0.05$.

Усиление чувствительности кишечных гликозидаз (мальтаза, АА) к действию Раундапа *in vitro* ранее было выявлено у сеголетков плотвы, подвергавшихся действию изменений локального магнитного поля (500 нТл) в период до гастрюляции (1–6 ч после оплодотворения) (Филиппов и др., 2015).

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые показано, что гербицид Раундап, в концентрациях, встречающихся в компонентах водной среды, может изменять активность гликозидаз в кишечнике пресноводных костистых рыб и в тканях их кормовых объектов (беспозвоночные и молодь рыб). Реакция гликозидаз на действие Раундапа зависит от вида, возраста и типа питания рыб, а также локализации фермента (слизистая оболочка, химус или ткани всего организма). При стандартных условиях (температура 20°C, pH 7.4) Раундап снижает АА в слизистой оболочке кишечника молоди, а также взрослых рыб планкто- и бентофагов (исключая леща и налима), у взрослых ихтиофагов эффекты отсутствуют. Активность мальтазы и сахаразы в присутствии Раундапа, как

правило, повышается у молоди и снижается у взрослых рыб. Зависимость силы эффекта от концентрации Раундапа носит нелинейный характер, что свидетельствует об отсутствии прямого действия гербицида на активный центр ферментов. Возможно, компоненты Раундапа могут действовать на субстрат ферментативной реакции или процессы взаимодействия субстрата и фермента. Направленность действия Раундапа на гликозидазы слизистой оболочки кишечника и химуса может различаться. Вероятно, это связано с тем, что в составе химуса помимо ферментов, синтезированных пищеварительной системой консумента, функционируют ферменты объектов питания и энтеральной микробиоты.

Активность ферментов в тканях целого организма отражает не только активность ферментов пищеварительного тракта, но и многочисленных лизосомальных гидролаз всех органов и тканей. Очевидно, этим обусловлены различия в действии Раундапа на одноименные ферменты слизистой оболочки кишечника рыб и организма объектов их питания. Активность гликозидаз (особенно мальтазы и сахаразы) у беспозвоночных, являющихся объектами питания молоди всех видов рыб и взрослых рыб планкто- и бентофагов, в присутствии Раундапа, как правило, повышается. В организме молоди рыб (объектов питания ихтиофагов) в присутствии Раундапа выявлены как тормозящий, так и стимулирующий эффекты. Повышение активности гликозидаз в тканях кормовых объектов в присутствии Раундапа может компенсировать снижение активности ферментов в пищеварительном тракте питающихся ими рыб.

Сила и направленность действия Раундапа зависят от температуры и pH. Кислые pH, как правило, увеличивают тормозящий эффект Раундапа на активность гликозидаз кишечника рыб. Снижение температуры при кислых pH увеличивает тормозящий эффект Раундапа, при нейтральных pH нивелирует его. Зависимость эффектов Раундапа от температуры и pH в тканях беспозвоночных и молоди рыб менее выражена, чем в слизистой оболочке кишечника рыб, что может быть обусловлено разным набором и соотношением изоформ гликозидаз, функционирующих в их тканях. Максимальное снижение АА в слизистой оболочке кишечника, химусе и тканях кормовых объектов рыб отмечено при совместном действии температуры 0°C, pH 5.0 или 8.3, и Раундапа. В большинстве случаев, взаимодействие трех факторов статистически значимо. Поскольку, попадая в пищеварительный тракт консументов, ферменты жертвы могут принимать участие в процессах самопереваривания (Кузьмина, 2000), снижение активности гликозидаз в их тканях при низкой температуре и кислых pH в присутствии Раундапа может уменьшать потенциальный вклад экзоферментов в пищеварение у рыб. Сравнительный анализ влияния Раундапа на активность гликозидаз в организме беспозвоночных и химусе молоди рыб, а также в химусе взрослых рыб и в организме молоди выявил сходные эффекты. Наибольшее снижение АА в присутствии Раундапа выявлено в химусе взрослых щук и в тканях реальной жертвы. Вероятно, это обусловлено активизацией лизосомальных гликозидаз

жертвы в условиях кислой среды желудка консумента и большей их чувствительностью к действию Раундапа.

В нашей работе впервые показано, что экологические факторы физической и химической природы могут изменять чувствительность гликозидаз рыб к действию Раундапа. Повышение температуры воды в осенний сезон может усиливать чувствительность гликозидаз рыб к действию гербицида. Наибольшие изменения чувствительности гликозидаз к Раундапу выявлены при скоростях нагрева воды 27°C/ч (мальтаза) и 0.02°C/ч (АА). Эти различия могут быть связаны с разной термостабильностью мальтазы и α -амилазы, входящей в состав ферментов, гидролизующих крахмал. Усиление чувствительности гликозидаз к действию Раундапа при действии МБ в период раннего эмбриогенеза, вероятно, обусловлено влиянием на процессы синтеза панкреатических и мембранных ферментов, что приводит к появлению гликозидаз с разными свойствами. Гликозидазы плотвы из загрязненного района Рыбинского водохранилища более чувствительны к действию Раундапа по сравнению с рыбами из более чистого района, что может быть связано с молекулярной разнокачественностью ферментов, функционирующих в кишечнике рыб из разных мест обитания. Усиление негативного действия Раундапа на активность гликозидаз в слизистой оболочке кишечника выявлено и при большем содержании ПХБ в пище леща, демонстрируя синергический эффект действия загрязнителей. Впервые показано, что хроническая 30-сут. экспозиция к Раундапу (2 мкг/л) снижает чувствительность гликозидаз в кишечнике ротана к *in vitro* действию этого гербицида. Вероятно, во время хронической экспозиции у рыб активируются механизмы резистентности к действию гербицида, вследствие чего торможение АА в присутствии Раундапа *in vitro* снижается. Хроническое действие потенциально токсичных веществ на водные организмы характеризуется чередованием периодов стимуляции и угнетения показателей жизнедеятельности (Филенко, 2001). Подобный характер зависимости прослеживается и в связи эффекта с концентрацией, где выявляются диапазоны стимулирующих и угнетающих концентраций, что значительно влияет на характер динамики токсического эффекта.

В настоящее время установлено, что глифосатсодержащие пестициды даже в низких дозах могут влиять на структуру и функции нецелевых организмов в течение длительных промежутков времени (Cuhra et al., 2013; Liess et al., 2013). Несмотря на то, что Раундап в водной среде весьма нестабилен и его попадание в водоемы носит импульсный характер, токсическое действие на водные организмы может проявиться еще до его полного распада (Richard et al., 2014; Loro et al., 2015). В нашей работе впервые показано, что сверхмалые концентрации Раундапа ($1 \cdot 10^{-13}$ мкг/л), как и более высокие (на 2–17 порядков), могут вызывать равный эффект. Несмотря на отсутствие влияния гербицида на активность гликозидаз у ряда видов рыб при стандартных условиях *in vitro*, проявление тормозящего эффекта Раундапа при действии некоторых экологических факторов может снижать скорость ассимиляции углеводных компонентов пищи, и, как следствие, эффективность питания и темп роста рыб. Повышение активности гликозидаз в присутствии

Раундапа можно рассматривать как адаптивную реакцию на кратковременное действие гербицида.

Широкое применение и прогнозируемое увеличение использования (Benbrook, 2016) делают необходимым изучение потенциальных экологических последствий применения глифосатсодержащих гербицидов. Аварийные разливы, смывы с полей или сброс неочищенных сточных вод в природные водоемы могут увеличивать их содержание. В настоящее время глифосат обнаружен в продуктах питания, кормах и питьевой воде (Cuhra et al., 2016), что требует пересмотра норм его содержания в окружающей среде (Primost et al., 2017). Результаты нашей работы подтверждают полученные в настоящее время многочисленные данные о влиянии Раундапа на жизнедеятельность нецелевых организмов и необходимость использования физиолого-биохимических методов для ранней диагностики состояния гидробионтов в современных экологических условиях.

ВЫВОДЫ

1. При стандартных условиях (температура 20°C, pH 7.4) Раундап в широком диапазоне концентраций (0.1–50 мкг/л) снижает амилолитическую активность (АА) в слизистой оболочке кишечника молоди и взрослых рыб бенто- и планктофагов на 8–56 % (у взрослых леща и налима повышает ее на 15–57%), у взрослых ихтиофагов эффекты отсутствуют. Активность мальтазы и сахаразы в присутствии Раундапа, как правило, повышается у молоди и снижается у взрослых рыб (исключая леща). Чувствительность гликозидаз к Раундапу выше у молоди, чем у взрослых рыб, у рыб планкто- и бентофагов (особенно плотвы), чем у типичных ихтиофагов. Гликозидазы в химусе взрослых плотвы и язя, а также молоди карпа наиболее чувствительны к действию гербицида.

2. Активность гликозидаз в организме беспозвоночных в присутствии Раундапа при стандартных условиях (температура 20°C, pH 7.4), как правило, повышается (на 6–85% от контроля). Гликозидазы в тканях катушки роговой наименее чувствительны к действию гербицида. В целом организме молоди рыб отмечены как тормозящий (на 11–41%), так и стимулирующий (на 18–151%) эффекты, активность сахаразы не меняется. Гликозидазы тюльки и карася менее чувствительны к действию Раундапа. Наиболее четкий тормозящий эффект Раундап оказывает на гликозидазы реальной жертвы (плотва, извлеченная из желудка щуки).

3. Сила и направленность действия Раундапа на активность кишечных гликозидаз рыб зависят от температуры и pH. Снижение pH до 5.0, как правило, усиливает тормозящий эффект Раундапа на АА у молоди (до 14–80%) и у взрослых рыб (до 38–87%), снижение температуры до 0°C также усиливает его преимущественно при кислых pH (у молоди и при щелочных pH). В химусе взрослых рыб отмечены сходные эффекты. Действие Раундапа на активность гликозидаз целого организма потенциальной жертвы (беспозвоночные и молодь рыб) в меньшей мере зависит от температуры и pH: при pH 5.0 снижение АА в

тканях хирономид, катушки и рачкового зоопланктона составило 15–21%, у тюльки и плотвы 24 и 54% соответственно.

4. Наибольшее снижение активности гликозидаз в кишечнике рыб, а также в целом организме кормовых объектов выявлено при комплексном действии Раундапа (25 мкг/л), температуры 0°C, рН 5.0 или 8.3. Степень снижения варьирует в зависимости от вида гидробионтов и локализации ферментов. Максимальный тормозящий эффект Раундапа на АА в слизистой оболочке кишечника молоди рыб составил 73–98%, взрослых рыб – 59–97% (в химусе 74–95%), в организме молоди рыб – 60–97%, беспозвоночных – 33–93% от контроля. В кишечнике рыб в большинстве случаев отмечено статистически значимое усиление эффекта при действии всех трех факторов, в целом организме объектов питания – лишь в ряде случаев (молодь плотвы, хирономиды, катушка). У консументов наибольшее снижение АА отмечено преимущественно в зоне кислых рН, у объектов их питания – в зоне щелочных рН.

5. Экологические факторы физической и химической природы изменяют чувствительность гликозидаз к действию Раундапа *in vitro*. Увеличение чувствительности гликозидаз (АА и мальтаза) отмечено у молоди плотвы при действии магнитной бури в период эмбриогенеза; в кишечнике молоди карпа при повышении температуры воды в осенний период, а также в организме молоди ротана (особенно при скоростях нагрева воды 0.02 и 27°C/ч); в кишечнике плотвы из районов с повышенной антропогенной нагрузкой; в кишечнике леща при повышенном содержании ПХБ (2 мкг/г) в корме. Вместе с тем 30-сут. экспозиция к гербициду в концентрации 2 мкг/л снижает чувствительность кишечных гликозидаз к действию Раундапа *in vitro*: АА снижается в 3–5 меньше, чем у рыб в контроле. Изменения чувствительности гликозидаз происходят преимущественно за счет усиления силы эффекта при одних и тех же концентрациях гербицида, при этом отмечено усиление как тормозящего (АА и активность мальтазы), так и стимулирующего (преимущественно мальтаза) эффекта.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Голованова, И.Л. Влияние гербицида Раундап *in vitro* на активность карбогидраз молоди рыб / И.Л. Голованова, А.А. Филиппов, **А.И. Аминов** // Токсикологический вестник. – 2011. – № 5. – С. 31–35.

2. **Аминов, А.И.** Влияние гербицида Раундап на активность гликозидаз в организме беспозвоночных животных и молоди рыб / **А.И. Аминов**, И.Л. Голованова, А.А. Филиппов // Биология внутренних вод. – 2013. – №. 4. – С. 82–88.

3. Голованова, И.Л. Влияние гербицида Раундап на активность гликозидаз молоди рыб и их кормовых объектов при различных значениях температуры и рН / И.Л. Голованова, **А.И. Аминов** // Вестник АГТУ. Серия: Рыбное хозяйство. – 2013. – № 1. – С. 129–134.

4. Голованова, И.Л. Физиолого–биохимические и температурные характеристики сеголетков ротана при хроническом действии Раундапа / И.Л. Голованова, **А.И. Аминов**, Д.С. Капшай, В.К. Голованов // Вестник АГТУ. Серия: Рыбное хозяйство. – 2013. – № 3. – С. 98–103.

5. Филиппов, А.А. Влияние органических загрязнителей на пищеварительные ферменты рыб (обзор) / А.А. Филиппов, И.Л. Голованова, **А.И. Аминов** // Биология внутренних вод. – 2013. – № 2. – С. 78–84.

6. Голованова, И.Л. Влияние гербицида Раундап на активность гликозидаз в кишечнике молоди теплолюбивых видов рыб в зависимости от температуры акклимации / И.Л. Голованова, **А.И. Аминов**, Д.С. Капшай, В.К. Голованов // Вестник АГТУ. Серия: Рыбное хозяйство. – 2015. – № 2. – С. 90–97.

7. Filippov, A.A. Effect of magnetic storm on the sensitivity of juvenile roach intestinal glycosidase to heavy metals (Cu, Zn) and the herbicide Roundup / A.A. Filippov, **A.I. Aminov**, I.L. Golovanova, Yu.V. Chebotareva, Yu.G. Izyumov, V.V. Krylov // Inland Water Biology. – 2015. – Vol. 8. – No. 4. – P. 417–420.

8. Голованова, И.Л. Влияние сверхнизких концентраций Раундапа на активность гликозидаз у молоди рыб / И.Л. Голованова, **А.И. Аминов**, Г.А. Урванцева, М.С. Смирнов // Вестник АГТУ. Серия: Рыбное хозяйство. – 2016. – № 2. – С. 100–107.

9. Голованова, И.Л. Влияние некоторых экологических факторов на чувствительность гликозидаз рыб к действию гербицида Раундап *in vitro* / И.Л. Голованова, **А.И. Аминов** // Труды Кар НЦ РАН, серия Экологические исследования. – 2016. – №. 12. – С. 96–105.

Работы в других изданиях:

10. **Аминов, А.И.** Влияние гербицида Раундап на активность карбогидраз молоди рыб в экспериментах *in vitro* / А.И. Аминов // Современ. проблемы биологии, экологии, химии. Матер. рег. науч. студ. конф. – Ярославль, 2011. – С. 144–149.

11. Голованова, И.Л. Влияние глифосата на гликозидазы водных беспозвоночных и рыб / И.Л. Голованова, **А.И. Аминов**, А.А. Филиппов // Тез. докл. и лекций XIV Междун. совещ. и VII школы по эволюц. физиологии, посвящ. памяти акад. Л.А. Орбели. – СПб, 2011. – С. 58.

12. Голованова, И.Л. Влияние гербицида Раундап на активность гликозидаз беспозвоночных животных / И.Л. Голованова, **А.И. Аминов**, Е.Л. Грачева, Г.А. Урванцева // Совр. проблемы биологии, экологии, химии и экологич. образования. Матер. науч.–практич. конф. 24–25 нояб. 2011 / отв.ред. В. Н. Казин; – ЯрГУ им. П.Г. Демидова. – Ярославль, 2011. – С. 30–35.

13. Голованова, И.Л. Влияние гербицида Раундап на активность гликозидаз рыб и их кормовых объектов / И.Л. Голованова, **А.И. Аминов** // Матер. IV Всерос. конф. по водной экотоксикологии, посвящ. памяти Б.А. Флерова «Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы» и школы–семинара «Современные методы исследования и оценки качества вод, состояния водных организмов и экосистем в условиях антропогенной нагрузки». (Борок 24–29 сент. 2011). – Борок, 2011. – Ч. 1. – С. 95–100.

14. **Аминов, А.И.** Влияние гербицида Раундап на активность гликозидаз в организме беспозвоночных животных и молоди рыб / А.И. Аминов // Матер. докл. XIX Всерос. молодеж. науч. конф. (Сыктывкар, Республика Коми, Россия, 2–6 апреля 2012 г.). – Сыктывкар, 2012. – С. 182–184.

15. **Аминов, А.И.** Влияние гербицида Раундап на амилалитическую активность у рыб и беспозвоночных при различных значениях pH и температуры / А.И. Аминов, И.Л. Голованова // Экология, эволюция и систематика животных. Матер. Междун. науч.–практ. конф. Россия. Рязань. 13–16 ноября 2012 г. – Рязань: НП «Голос губернии», 2012. – С. 177–178.

16. **Аминов, А.И.** Эффекты гербицида Раундап на активность гликозидаз молоди рыб при различных значениях pH и температуры / А.И. Аминов, И.Л. Голованова // Физиологические, биохимические и молекулярно–генетические механизмы адаптаций гидробионтов. Матер. Всерос. конф. с междун. участием (Борок, 22–27 сентября 2012 г.) – Кострома: «Костромской печатный дом», 2012. – С. 5–9.

17. **Аминов, А.И.** Влияние гербицида Раундап на активность пищеварительных гликозидаз молоди рыб при различных значениях температуры и pH / А.И. Аминов // Вестник Мордовского ун–та. – Саранск, 2013. – С. 58–63.

18. **Aminov, A.I. Golovanova I.L.** Digestive glycosidase of Amur sleeper under effect of Roundup herbicide / A.I.Aminov, I.L.Golovanova // Invasion of Alien species in Holarctic (Borok – 4). The IV International symposium. – 2013. – P. 28. (22–28 sept.) Tez.

19. Филиппов, А.А. Влияние магнитной бури на чувствительность гликозидаз молоди плотвы к действию загрязнителей *in vitro* / А.А. Филиппов, **А.И. Аминов**, В.В. Крылов // Матер. докл. II Всерос. (XVII) молодеж. науч. конф. «Молодежь и наука на Севере» (в 2–х томах). Том I. Биологические науки (XX Всерос. молодеж. науч. конф. «Актуальные проблемы биологии и экологии»). Физиология человека и животных. Медицина и здравоохранение. Фундаментальные науки – медицине (Сыктывкар, Республика Коми, Россия, 22–26 апреля 2013 г.). – Сыктывкар, 2013. – С. 141–142.

20. Филиппов, А.А. Отдаленные последствия действия типичной магнитной бури на активность и чувствительность гликозидаз молоди плотвы к действию меди и цинка / А.А. Филиппов, **А.И. Аминов**, И.Л. Голованова, В.В. Крылов, Ю.В. Чеботарева, Ю.Г. Изюмов // Матер. V Всерос. конф. по водной экотоксикологии, посвящ. памяти Б.А. Флерова «Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы» и школа–семинар для молодых ученых, аспирантов и студентов «Современные методы исследования состояния поверхностных вод в условиях антропогенной нагрузки» (28 октября – 1 ноября 2014). – Борок, 2014. – С. 155–159.

21. **Аминов, А.И.** Влияние гербицида Раундап на активность гликозидаз рыб и объектов их питания / А.И. Аминов // Перспективы и проблемы современной гидробиологии. Матер. Всерос. молодеж. гидробиол. конф. (пос. Борок, Ярославская обл., 10–13 ноября 2016) – Ярославль: Филигрань, 2016. – С. 205–207.