

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ГИДРОБИОНТОВ

УДК 597-11:632.954

И. Л. Голованова, А. И. Аминов, Д. С. Капшай, В. К. Голованов

ВЛИЯНИЕ ГЕРБИЦИДА РАУНДАП НА АКТИВНОСТЬ ГЛИКОЗИДАЗ В КИШЕЧНИКЕ МОЛОДИ ТЕПЛОЛЮБИВЫХ ВИДОВ РЫБ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ АККЛИМАЦИИ

Цель работы – изучить влияние резкого повышения температуры воды на чувствительность гликозидаз к *in vitro* действию гербицида Раундап у молоди обыкновенного карпа *Cyprinus carpio* (L.), серебряного карася *Carassius carassius* (L.) и головешки-ротана *Perccottus glenii* Dybowsky, акклиматизированных к температуре 13 и 32 °С. Молодь рыб, отловленную осенью, в лабораторных условиях акклиматизировали в течение 10 суток при естественном фотопериоде. Затем температуру воды в аквариумах повышали со скоростью 8 °С/ч до достижения критического термического максимума. До и после резкого температурного воздействия в гомогенатах кишечника рыб определяли амилолитическую активность и активность мальтазы в присутствии сублетальных концентраций Раундапа (0,1–50,0 мкг/л). Для определения амилолитической активности, отражающей суммарную активность ферментов, гидролизующих крахмал (α -амилаза, глюкоамилаза и мальтаза), применяли модифицированный метод Нельсона. Активность мальтазы определяли с помощью набора для клинической биохимии «Фотоглюкоза». Установлено, что повышение температуры воды со скоростью 8 °С/ч меняет эффект действия Раундапа на активность гликозидаз у исследованных видов рыб в зависимости от температуры предварительной акклиматизации. При этом активность ферментов, гидролизующих крахмал, более чувствительна к действию Раундапа во всех вариантах воздействия, чем активность мембранного фермента мальтазы. Резкое повышение температуры воды в меньшей степени меняет эффекты действия Раундапа у ротана по сравнению с карпом и карасем.

Ключевые слова: рыбы, гликозидазы, амилолитическая активность, мальтаза, критический термический максимум, Раундап, гербициды.

Введение

Раундап, созданный на основе изопропиламиновой соли глифосата [N-(phosphonomethyl) glycine], является одним из самых известных в мире гербицидов. Его широкое применение обусловлено высокой эффективностью действия, скоростью биоразложения в окружающей среде, а также появлением культур, генетически устойчивых к этому гербициду [1]. США, Бразилия, Аргентина, Индия и Китай являются ведущими странами-производителями генетически устойчивых к Раундапу сортов сои и риса [2]. В России, а также странах бывшего СНГ Раундап широко используется для уничтожения сорной растительности на полях и приусадебных участках, а также в коллекторно-дренажных каналах, оросительных системах и прудах. Период полураспада глифосата в воде составляет 7–14 дней, в донных отложениях водоемов – до 120 дней [1], в почве – от 6 до 9 дней в лабильной фазе до 222–835 дней в нелабильной [3]. Благодаря высокой способности сорбироваться на взвешенных частицах, он может разноситься на большие расстояния от места попадания в водоем [1]. Разложение глифосата происходит при действии микроорганизмов [4], но связывание с хелатирующими металлами (медь, цинк, свинец) в донных отложениях значительно замедляет этот процесс [5]. Механизм действия Раундапа заключается в ингибировании ферментного пути с участием шикимовой кислоты, что препятствует синтезу 3-х аминокислот: фенилаланина, тирозина и триптофана [6, 7]. У животных этот метаболический путь отсутствует. Однако, попадая в организм рыб, гербицид включается в метаболизм и может вызывать нарушения различных функций [6–11]. Кроме того, установлено, что содержащееся в составе Раундапа поверхностно-активное вещество – полиоксиэтиленамин, гораздо более токсично, чем сам глифосат [12, 13]. Основным токсическим эффектом Раундапа и глифосата связывают с генерацией окислительного стресса и нейротоксическим действием,

приводящим к снижению активности ацетилхолинэстеразы [7, 9–11]. Изменения активности пищеварительных гликозидаз в присутствии Раундапа у беспозвоночных и молоди рыб были выявлены как в экспериментах *in vivo* [14, 15], так и *in vitro* [16].

Повышение температуры в результате глобальных климатических изменений, а также природных и антропогенных феноменов может изменять не только физиолого-биохимические показатели рыб, но и реакцию организма на химические агенты [15, 17, 18]. Медленное повышение температуры окружающей среды увеличивает активность пищеварительных гликозидаз рыб, в то время как резкие изменения температуры, не позволяющие организму адаптироваться, снижают активность ферментов и термоустойчивость рыб [19]. В то же время термоустойчивость рыб в значительной мере зависит от температуры предварительной акклимации [20]. Ранее было показано, что резкое повышение температуры воды усиливает негативный эффект хронического действия Раундапа на амилолитическую активность в кишечнике ротана [15], однако зависимость эффектов Раундапа от повышения температуры воды у рыб, акклимированных к разным значениям температуры, ранее не исследовалась.

Целью нашей работы было изучить влияние резкого повышения температуры воды на чувствительность гликозидаз к *in vitro* действию Раундапа у молоди карпа, карася и ротана, акклимированных к температуре 13 и 32 °С.

Материалы и методы исследования

Работа была выполнена в осенний период 2012 г. на молоди обыкновенного карпа *Cyprinus carpio* (L.) (масса $1,65 \pm 0,48$ г; длина тела $3,98 \pm 0,43$ см) и серебряного карася *Carassius carassius* (L.) ($8,52 \pm 2,73$ г; $6,96 \pm 0,49$ см), выращенных на стационаре полевых и экспериментальных работ «Сунога» Института биологии внутренних вод (ИБВВ) им. И. Д. Папанина РАН, и головешки-ротана *Perccottus glenii* Dybowsky (масса $4,76 \pm 0,90$ г; длина $4,92 \pm 1,16$ см), отловленного в прудах Ярославской области. По температурным характеристикам (окончательно избираемой и верхней летальной температуре) исследованные виды относятся к наиболее теплолюбивым видам рыб, обитающих в пресных водоемах северо-запада России [21]. В лабораторных условиях рыб акклимировали в течение 10 дней к температуре 13 и 32 °С при естественном фотопериоде. Температура 13 °С характерна для водоемов средней полосы России в осенне-весенний сезон, температура 32 °С отмечена в аномально теплый летний период 2010 г. [22]. Рыб кормили 1 раз в сутки личинками хирономид в количестве 5–10 % от общей массы тела.

Затем группу рыб (по 6 экз. в каждой, 2 повторности) помещали в экспериментальный аквариум объемом 60 л, оборудованный системой нагрева и аэрации. Температуру воды в аквариуме повышали со скоростью 8 °С/ч до нарушения локомоторной функции рыб – переворота на бок или кверху брюшком, сублетальное значение температуры фиксировали как критический термический максимум (КТМ) [23]. Продолжительность нагрева варьировала от 1 до 2 часов в зависимости от вида рыб и температуры предварительной акклимации. Затем рыб извлекали из аквариума, помещали на стекло ледяной бани, извлекали кишечника и готовили суммарные гомогенаты из медиальной части кишечника от 6 экз. рыб одного вида.

Амилолитическую активность, отражающую суммарную активность ферментов, гидролизующих крахмал (α -амилаза КФ 3.2.1.1, глюкоамилаза КФ 3.2.1.3 и мальтаза КФ 3.2.1.20), оценивали по приросту гексоз модифицированным методом Нельсона [24]. Активность мальтазы определяли с помощью набора для клинической биохимии «Фотоглюкоза» (ООО «Импакт», Россия). Ферментативную активность выражали в микромолях продуктов реакции, образующихся за 1 минуту инкубации ферментативно активного препарата и субстрата в расчете на 1 г влажной массы ткани, мкмоль/(г · мин). Для приготовления раствора токсиканта использовали коммерческий препарат гербицида, имеющий торговое название «Раундап» (произведен и расфасован ЗАО фирма «Август» (Россия) по лицензии фирмы «Монсанто Европа С. А.» (Бельгия)). Средство представляет собой водный раствор глифосата в концентрации 360 г/л. Дополнительные ингредиенты, усиливающие действие активного элемента или облегчающие использование гербицида, ни в аннотации, ни в тексте на упаковке не указаны. Концентрации Раундапа, рассчитанные по содержанию глифосата, составляли 0 (контроль); 0,1; 1; 10; 25 и 50 мкг/л. Выбор тестируемых концентраций был обусловлен значениями ПДК Раундапа для воды рыбохозяйственных водоемов (1 мкг/л) и содержанием глифосата в воде в районах непосредственного применения гербицида [25].

Результаты представлены в виде средних и их ошибок ($M \pm m$). Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного анализа (ANOVA, LSD-тест) при $p = 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Значения КТМ у рыб, акклимированных к температуре 13 °С, составили $31,1 \pm 0,2$ °С у карпа, $32,2 \pm 0,1$ °С у карася и $30,6 \pm 0,2$ °С у ротана; у акклимированных к температуре 32 °С – $41,3 \pm 0,1$; $41,2 \pm 0,1$ и $38,8 \pm 0,1$ °С соответственно (рис. 1). Эти результаты согласуются с данными о росте значений КТМ с повышением температуры акклимации рыб [10]. В отсутствие Раундапа уровень амилолитической активности составляет $98,6 \pm 4,6$ у карася и $5,62 \pm 0,12$ мкмоль/(г·мин) у ротана, акклимированных к температуре 13 °С, и $121,6 \pm 2,0$ мкмоль/(г·мин) у карпа, акклимированного к температуре 32 °С. Амилолитическая активность у карпа в присутствии Раундапа повышается на 8–10 %, у карася – на 20–29 % практически во всем диапазоне исследованных концентраций. У ротана в ряде случаев отмечен тормозящий эффект Раундапа на 10–19 % от контроля.

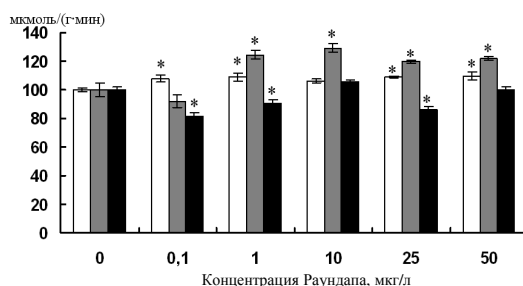


Рис. 1. Амилолитическая активность в кишечнике карпа □, карася ■ и ротана ■, в присутствии Раундапа *in vitro*, мкмоль/(г·мин). Карп акклимирован к температуре 32 °С, карась и ротан – к температуре 13 °С.
* Статистически достоверные различия показателей по сравнению с контролем (0 мкг/л), принятым за 100 %

У рыб, акклимированных к температуре 13 °С и подвергнутых затем нагреву со скоростью 8 °С/ч, Раундап вызывает разнонаправленные эффекты: у карпа снижает амилолитическую активность на 8–18 %, у карася в ряде случаев повышает на 8–12 %, у ротана достоверные эффекты отсутствуют (рис. 2). У рыб, акклимированных к температуре 32 °С, Раундап также вызывает разнонаправленные эффекты: у карпа снижает амилолитическую активность на 14–16 % при низких значениях концентрации и на 7 % при более высоких, у карася повышает её на 6–17 % при средних значениях концентрации, у ротана достоверное торможение на 10–12 % отмечено лишь при концентрации 0,1 и 25,0 мкг/л.

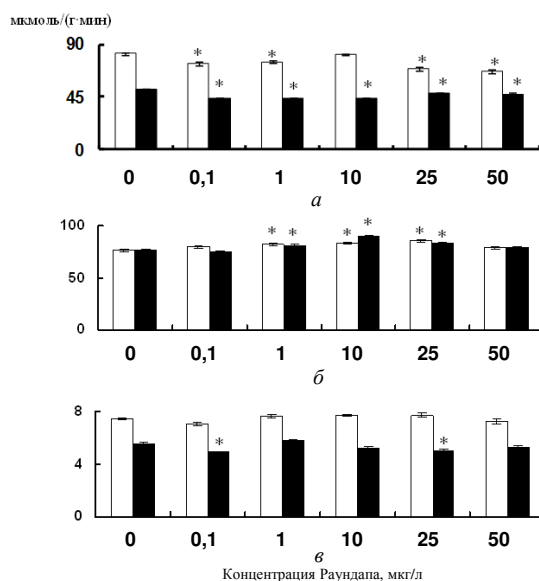


Рис. 2. Амилолитическая активность, мкмоль/(г·мин), в кишечнике: а – карпа; б – карася; в – ротана в присутствии Раундапа *in vitro* после резкого повышения температуры воды со скоростью 8 °С/ч, предварительно акклимированных к температуре 13 °С – □ и 32 °С – ■.

* Статистически достоверные различия показателей по сравнению с контролем (0 мкг/л)

Активность мальтазы у карпа и карася, не подвергавшихся нагреву, в присутствии Раундапа достоверно не меняется (рис. 3). У рыб, акклимированных к температуре 13 °С, достоверное повышение ферментативной активности на 8–13 % отмечено лишь у карпа в диапазоне значений концентрации 0,1–25,0 мкг/л. У рыб, акклимированных к температуре 32 °С, достоверные изменения отсутствуют.

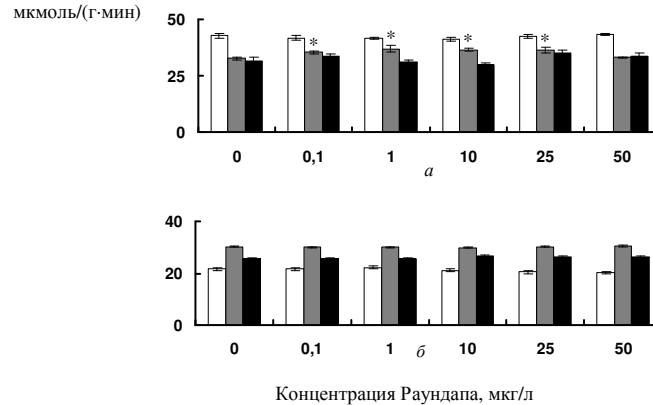


Рис. 3. Активность мальтазы, мкмоль/(г·мин), в кишечнике: *a* – карпа; *б* – карася в присутствии Раундапа *in vitro*. Активность ферментов у рыб, не подвергавшихся нагреву □ (карп акклимирован к температуре 32 °С, карась – к температуре 13 °С), и после резкого повышения температура воды со скоростью 8 °С/ч, предварительно акклимированных к температуре 13 °С ■ и 32 °С ■. * Статистически достоверные различия показателей по сравнению с контролем (0 мкг/л), принятым за 100 %

Необходимо отметить, что в данной работе зависимости величины эффекта от концентрации Раундапа не выявлено ни в одном из случаев экспериментальных воздействий. Ранее были показаны изменения активности гликозидаз в целом организме и слизистой оболочке кишечника у молоди рыб в присутствии Раундапа *in vitro* [16]. Гербицид вызывает разнонаправленные изменения активности мальтазы, сахаразы, амилаолитической активности у плотвы *Rutilus rutilus* (L.), судака *Sander lucioperca* (L.), тюльки *Clupeonella cultriventris* (Nord.), щуки *Esox lucius* L., карпа и окуня *Perca fluviatilis* L. [26]. При этом установлено, что гликозидазы слизистой оболочки кишечника более чувствительны к действию Раундапа по сравнению с одноименными ферментами хмуса и целого организма. Раундап оказывает больший ингибирующий эффект на активность гликозидаз в тканях реальной жертвы (плотва, извлеченная из желудка щуки) по сравнению с потенциальной жертвой. Величина и направленность эффектов зависят от вида рыб, спектра ферментов, участвующих в гидролизе углеводов, а в ряде случаев – и от концентрации гербицида [16, 26]. Кроме того, в экспериментах *in vitro* было установлено, что эффекты Раундапа зависят от температуры и pH [27]. В ходе исследований были выявлены также видовые различия при действии Раундапа *in vitro* в отсутствие и в условиях резкого повышения температуры воды. Наименьшие изменения амилаолитической активности в присутствии гербицида выявлены у ротана, что хорошо согласуется с данными о его высокой устойчивости к действию неблагоприятных факторов [28, 29]. При этом ферменты, гидролизующие крахмал, более чувствительны к действию Раундапа во всех вариантах воздействия, по сравнению с мальтазой. Последнее хорошо согласуется с данными о большей чувствительности к действию антропогенных факторов панкреатических ферментов по сравнению с собственно мембранными [30].

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о разнонаправленном действии Раундапа на гликозидазы кишечника теплолюбивых видов рыб – стимулирующий у карпа и карася и тормозящий у ротана. Повышение температуры воды со скоростью 8 °С/ч изменяет величину эффекта у исследованных видов рыб в зависимости от температуры предварительной акклимации. Резкое повышение температуры воды вызывает торможение амилаолитической активности у карпа, акклимированного к температуре 13 °С, преимущественно при высоких концентрациях, акклимированного к температуре 32 °С, – при низких концентрациях Раундапа. У карася, акклимированного

к обоим значениям температуры, резкий рост температуры воды снижает величину стимулирующего эффекта. У ротана, акклимированного к температуре 13 °С, при повышении температуры достоверные эффекты отсутствуют, у акклимированного к 32 °С – практически не изменяются по сравнению с таковыми без нагрева. Активность мальтазы в присутствии Раундапа достоверно повышалась лишь у карпа, акклимированного к температуре 13 °С и подверженного нагреву. Существенных изменений активности мальтазы в кишечнике карася не отмечено. Таким образом, резкое изменение температуры среды может изменять чувствительность гликозидаз кишечника теплолюбивых видов рыб к действию Раундапа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Giesy J. P. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide / J. P. Giesy, S. Dobson, K. R. Solomon // *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 2000. Vol. 167. P. 35–120.
2. Dimetrio P. M. Effects of pesticide formulations and active ingredients on the Coelenterate *Hydra attenuata* (Pallas, 1766) / P. M. Dimetrio, G. D. Bulus Rossini, C. A. Bonetto, A. E. Ronco // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2012. Vol. 88, no. 1. P. 15–19.
3. Eberbach P. Applying Non-steady-state Compartmental Analysis to Investigate the Simultaneous Degradation of Soluble and Sorbed Glyphosate (N-(Phosphonomethyl)glycine) in Four Soils / P. Eberbach // *Pesticide Science.* 1998. Vol. 52. P. 229–240.
4. Karpouzias D. G. Microbial Degradation of Organophosphorus Xenobiotics: Metabolic Pathways and Molecular Basis / D. G. Karpouzias, B. K. Singh // *Advances in microbial physiology.* Elsevier Ltd: 2006. V. 51. P. 119–185.
5. Tsui M. T. K. Environmental fate and non-target impact of glyphosate-based herbicide (Roundup) in a subtropical wetland / M. T. K. Tsui, L. M. Chu // *Chemosphere.* 2008. Vol. 71. P. 439–446.
6. Cattaneo R. Toxicological Responses of Cyprinus Carpio Exposed to a Commercial Formulation Containing Glyphosate / R. Cattaneo, B. Clasen, V. L. Loro, C. C. de Menezes, A. Preto, B. Baldisserotto, A. L. Santi, L. A. de Avila // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* 2011. Vol. 87, no. 6. P. 597–602.
7. Lushchak O. V. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues / O. V. Lushchak, O. I. Kubrak, J. M. Storey, K. B. Storey, V. I. Lushchak // *Chemosphere.* 2009. Vol. 52, no. 7. P. 932–937.
8. Жиденко А. А. Динамика гематологических показателей молоди карпа под действием гербицидов / А. А. Жиденко // *Гидробиологический журнал.* 2008. Т. 44, № 3. С. 80–88.
9. Modesto K. A. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defences and acetylcholinesterase activity / K. A. Modesto, C. B. R. Martinez // *Chemosphere.* 2010. Vol. 81. P. 781–787.
10. Fan J. Y. Herbicide Roundup and its main constituents cause oxidative stress and inhibit acetylcholinesterase in liver of *Carassius auratus* / J. Y. Fan, J. J. Geng, H. Q. Ren, X. R. Wang, C. Han // *J. of Environ. Sci. and Health.* 2013. Part B. Vol. 48. P. 844–850.
11. Webster T. M. U. Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup / T. M. U. Webster, E. M. Santos // *BMC Genomic.* 2015. P. 16–32 // URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/16/32>.
12. Folmar L. C. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates / L. C. Folmar, H. O. Sanders, A. M. Julin // *Arch Environ Contam Toxicol.* 1979. Vol. 8. P. 269–278.
13. Tsui M. T. K. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors / M. T. K. Tsui, L. M. Chu // *Chemosphere.* 2003. Vol. 52, no. 7. P. 1189–1197.
14. Папченкова Г. А. Репродуктивные показатели, размеры и активность гидролаз у *Daphnia magna* в ряду поколений при действии гербицида «Раундап» / Г. А. Папченкова, И. Л. Голованова, Н. В. Ушакова // *Биология внутр. вод.* 2009. № 3. С. 105–110.
15. 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 // *Вестн. Астрахан. гос. техн. ун-та. Серия: Рыбное хозяйство.* 2013. № 3. С. 98–103.
16. 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 внутр. вод.* 2013. № 4. С. 82–88.
17. Sappal R. Interaction of copper and thermal stress on mitochondrial bioenergetics in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* / R. Sappal, N. MacDonald, M. Fast, D. Stevens, F. Kibenge, A. Siah, C. Kamunde // *Aquatic Toxicology.* 2014. Vol. 157. P. 10–20.
18. Fernandes J. Combined effect of Heat Shock and Chlorine Fails to Elicit Acquires Thermal Tolerance in *Labeo rohita* Spawns / J. Fernandes, A. K. Pal, P. Kumar, P. P. Chandrachoodan, M. S. Akhtar // *Proceeding of the National Academy of Sciences, India,* 2015 // URL: <http://www.researchgate.net/publication/272917796>.
19. Golovanova I. L. Effect of ambient temperature increase on intestinal mucosa amylolytic activity in freshwater fish / I. L. Golovanova, V. K. Golovanov, A. K. Smirnov, D. D. Pavlov // *Fish Physiology and Biochemistry.* 2013. Vol. 39, no. 6. P. 1497–1504.
20. Капшай Д. С. Верхняя летальная температура у молоди теплолюбивых видов рыб в зависимости от температуры акклимации / Д. С. Капшай, В. К. Голованов // *Тр. Карел. науч. центра РАН.* 2013. № 3. С. 185–189.

21. Голованов В. К. Температурные критерии жизнедеятельности пресноводных рыб / В. К. Голованов. М.: Полиграф-Плюс. 2013. 300 с.
22. Голованов В. К. Эколого-физиологические закономерности распределения и поведения пресноводных рыб в термоградиентных условиях / В. К. Голованов // Вопросы ихтиологии. 2013. Т. 53, № 3. С. 286–314.
23. Becker C. D. Evaluation of the critical thermal maximum for determining thermal tolerance of freshwater fish / C. D. Becker, R. G. Genoway // Environ. Biol. Fish. 1979. Vol. 4, no. 3. P. 245–256.
24. Уголев А. М. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз / А. М. Уголев, Н. Н. Иезуитова // Исследование пищеварительного аппарата у человека. Л.: Наука, 1969. С. 192–196.
25. Peruzzo P. J. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soil associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina / P. J. Peruzzo, A. A. Porta, A. E. Ronco // Environmental Pollution. 2008. Vol. 156, no. 1. P. 61–66.
26. Голованова И. Л. Влияние гербицида Раундап *in vitro* на активность карбогидраз молоди рыб / И. Л. Голованова, А. А. Филиппов, А. И. Аминов // Токсикол. вестн. 2011. № 5. С. 31–35.
27. Голованова И. Л. Влияние гербицида Раундап на активность гликозидаз молоди рыб и их кормовых объектов при различных значениях температуры и pH / И. Л. Голованова, А. И. Аминов // Вестн. Астрахан. гос. техн. ун-та. Серия: Рыбное хозяйство. 2013. № 1. С. 129–134.
28. Бознак Э. И. Головешка-ротан *Percottus glenii* (Eleotridae) из бассейна реки Вычегда / Э. И. Бознак // Вопр. ихтиологии. 2004. Т. 44, № 2. С. 712–713.
29. Ручин А. Б. Влияние абиотических факторов на скорость роста ротана *Percottus glenii* Dybowski, 1877 / А. Б. Ручин, Е. А. Лобачев, М. К. Рыжов // Биология внутр. вод. 2004. № 4. С. 79–83.
30. Голованова И. Л. Влияние природных и антропогенных факторов на гидролиз углеводов у рыб и объектов их питания: автореф. ... д-ра биол. наук / И. Л. Голованова. СПб.: ИЭФБ им. И. М. Сеченова РАН. 2006. 43 с.

Статья поступила в редакцию 20.03.2015

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Голованова Ирина Леонидовна – Россия, 152742, Ярославская обл., пос. Борок; Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина Российской академии наук; г-р биол. наук, старший научный сотрудник; главный научный сотрудник лаборатории экологии рыб; golovanova5353@mail.ru.

Аминов Александр Иванович – Россия, 152742, Ярославская обл., пос. Борок; Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина Российской академии наук; лаборатория экологии рыб; аспирант; alexsis89@rambler.ru.

Капшай Дмитрий Сергеевич – Россия, 152742, Ярославская обл., пос. Борок; Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина Российской академии наук; лаборатория экологии рыб; аспирант; kapsh@ibiw.yaroslavl.ru.

Голованов Владимир Константинович – Россия, 152742, Ярославская обл., пос. Борок; Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина Российской академии наук; г-р биол. наук, старший научный сотрудник; ведущий научный сотрудник лаборатории экологии рыб; vkgolovan@mail.ru.



I. L. Golovanova, A. I. Aminov, D. S. Kapshay, V. K. Golovanov

INFLUENCE OF HERBICIDE ROUNDUP ON THE ACTIVITY OF GLYCOSIDASES IN THE INTESTINE OF JUVENILE THERMOPHILIC FISH SPECIES DEPENDING ON THE ACCLIMATION TEMPERATURE

Abstract. The purpose of this study is to examine the impact of an abrupt rise in water temperature on the sensitivity of glycosidases to *in vitro* Roundup herbicide activity in juvenile common carp *Cyprinus carpio* (L.), goldfish *Carassius carassius* (L.) and amur sleeper *Percottus glenii* Dybowski acclimated to the temperature of 13 and 32 °C. Juvenile fish caught in autumn, were acclimated in the laboratory during 10 days under natural photoperiod. Then the water temperature in the

aquarium was increased at a rate of 8 °C/h until reaching the critical thermal maximum. The amylolytic activity and maltase activity in the intestine homogenates under in vitro Roundup sub-lethal concentrations (0.1–50.0 µg/l) were estimated both before and after an abrupt temperature rise. The amylolytic activity, reflecting the sum activity of enzymes that hydrolyze starch (α -amylase, glucoamylase and maltase) was determined by the modified Nelson's method. Maltase activity was determined with the help of the set for Clinical Biochemistry "Fotoglyukoza". It was found that the increase of water temperature at a rate of 8 °C/h changed the effects of Roundup on the glycosidase activities in the tested fish depending on the acclimation temperature. The enzymes, that hydrolyze starch, are more sensitive to Roundup in all the variants of exposure than the activity of the membrane enzyme maltase. The abrupt increase in water temperature, to a lesser extent, changes the Roundup effects in amur sleeper compared with carp and goldfish.

Key words: fish, glycosidase, amylolytic activity, maltase, critical thermal maximum, Roundup, herbicide.

REFERENCES

1. Giesy J. P., Dobson S., Solomon K. R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 2000, vol. 167, pp. 35–120.
2. Dimetrio P. M., Bulus Rossini G. D., Bonetto C. A., Ronco A. E. Effects of pesticide formulations and active ingredients on the Coelenterate *Hydra attenuata* (Pallas, 1766). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2012, vol. 88, no. 1, pp. 15–19.
3. Eberbach P. Applying Non-steady-state Compartmental Analysis to Investigate the Simultaneous Degradation of Soluble and Sorbed Glyphosate (N-(Phosphonomethyl)glycine) in Four Soils. *Pesticide Science*, 1998, vol. 52, pp. 229–240.
4. Karpouzas D. G., Singh B. K. *Microbial Degradation of Organophosphorus Xenobiotics: Metabolic Pathways and Molecular Basis. Advances in microbial physiology*. Elsevier Ltd., 2006, vol. 51, pp. 119–185.
5. Tsui M. T. K., Chu L. M. Environmental fate and non-target impact of glyphosate-based herbicide (Roundup) in a subtropical wetland. *Chemosphere*, 2008, vol. 71, pp. 439–446.
6. Cattaneo R., Clasen B., Loro V. L., de Menezes C. C., Pretto A., Baldisserotto B., Santi A., de Avila L. A. Toxicological Responses of *Cyprinus Carpio* Exposed to a Commercial Formulation Containing Glyphosate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2011, vol. 87, no. 6, pp. 597–602.
7. Lushchak O. V., Kubrak O. I., Storey J. M., Storey K. B., Lushchak V. I. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere*, 2009, vol. 52, no. 7, pp. 932–937.
8. Zhidenko A. A. Dinamika gematologicheskikh pokazatelei molodi karpa pod deistviem gerbitsidov [Dynamics of hematological indicators of juvenile carp under the influence of herbicides]. *Gidrobiologicheskii zhurnal*, 2008, vol. 44, no. 3, pp. 80–88.
9. Modesto K. A., Martinez C. B. R. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defences and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 2010, vol. 81, pp. 781–787.
10. Fan J. Y., Geng J. J., Ren H. Q., Wang X. R., Han C. Herbicide Roundup and its main constituents cause oxidative stress and inhibit acetylcholinesterase in liver of *Carassius auratus*. *J. of Environ. Sci. and Health.*, 2013, part B, vol. 48, pp. 844–850.
11. Webster T. M. U., Santos E. M. *Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup*. *BMC Genomic*, 2015, pp. 16–32. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/16/32>.
12. Folmar L. C., Sanders H. O., Julin A. M. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 1979, vol. 8, pp. 269–278.
13. Tsui M. T. K., Chu L. M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 2003, vol. 52, no. 7, pp. 1189–1197.
14. Papchenkova G. A., Golovanova I. L., Ushakova N. V. Reproaktivnye pokazateli, razmery i aktivnost' gidrolaz u *Daphnia magna* v riadu pokolenii pri deistvii gerbitsida «Raundap» [Reproductive parameters, sizes and activity of hydrolase of *Daphnia magna* in a number of generations under the effect of Roundup herbicide]. *Biologiya vnutrennikh vod*, 2009, no. 3, pp. 105–110.
15. Golovanova I. L., Aminov A. I., Kapshai D. S., Golovanov V. K. Fiziologo-biokhimicheskie i temperaturnye kharakteristiki segoletkov rotana pri khronicheskom deistvii Raundapa [Physiological and biochemical and temperature parameters of amur sleeper fingerlings under the constant effect of Roundup]. *Vestnik Astrakhan'skogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta. Seriya: Rybnoe khoziaistvo*, 2013, no. 3, pp. 98–103.
16. Aminov A. I., Golovanova I. L., Filippov A. A. Vliianie gerbitsida Raundap na aktivnost' glikozidaz v organizme bespozvonochnykh zhivotnykh i molodi ryb [Influence of Roundup herbicide on the activity of glycosidase in the organism of invertebrates and juvenile fish]. *Biologiya vnutrennikh vod*, 2013, no. 4, pp. 82–88.
17. Sappal R., MacDonald N., Fast M., Stevens D., Kibenge F., Siah A., Kamunde C. Interaction of copper and thermal stress on mitochondrial bioenergetics in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology*, 2014, vol. 157, pp. 10–20.

18. Fernandes J., Pal A. K., Kumar P., Chandrachoodan P. P., Akhtar M. S. Combined effect of Heat Shock and Chlorine Fails to Elicit Acquires Thermal Tolerance in *Labeo rohita* Spawns. *Proceeding of the National Academy of Sciences, India, 2015*. Available at: <http://www.researchgate.net/publication/272917796>.
19. Golovanova I. L., Golovanov V. K., Smirnov A. K., Pavlov D. D. Effect of ambient temperature increase on intestinal mucosa amylolytic activity in freshwater fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2013, vol. 39, no. 6, pp. 1497–1504.
20. Kapshai D. S., Golovanov V. K. Verkhniaia letal'naiia temperatura u molodi teploliubivnykh vidov ryb v zavisimosti ot temperatury akklimatsii [Upper lethal temperature of juvenile thermophilic fish depending on the acclimation temperature]. *Trudy Karel'skogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk*, 2013, no. 3, pp. 185–189.
21. Golovanov V. K. *Temperaturnye kriterii zhiznedeiatel'nosti presnovodnykh ryb* [Temperature criteria of life activity of freshwater fish]. Moscow, Poligraf-Plus, 2013. 300 p.
22. Golovanov V. K. Ekologo-fiziologicheskie zakonomernosti raspredeleniia i povedeniia presnovodnykh ryb v termogradientnykh usloviakh [Ecological and physiological peculiarities of distribution and behavior of freshwater fish in thermogradient conditions]. *Voprosy ikhtiologii*, 2013, vol. 53, no. 3, pp. 286–314.
23. Becker C. D., Genoway R. G. Evaluation of the critical thermal maximum for determining thermal tolerance of freshwater fish. *Environ. Biol. Fish.*, 1979, vol. 4, no. 3, pp. 245–256.
24. Ugolev A. M., Iezuitova N. N. Opredelenie aktivnosti invertazy i drugikh disakharidaz [Determination of the activity of invertase and other disaccharidase]. *Issledovanie pishchevaritel'nogo apparata u cheloveka*. Leningrad, Nauka Publ, 1969. P. 192–196.
25. Peruzzo P. J., Porta A. A., Ronco A. E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soil associated with direct sowing soybean cultivation in North pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution*, 2008, vol. 156, no. 1, pp. 61–66.
26. Golovanova I. L., Filippov A. A., Aminov A. I. Vliianie gerbitsida Raundap in vitro na aktivnost' karbohidraz molodi ryb [Influence of Roundup herbicide in vitro on the activity of carbohydrase of juvenile fish]. *Toxikologicheskii vestnik*, 2011, no. 5, pp. 31–35.
27. Golovanova I. L., Aminov A. I. Vliianie gerbitsida Raundap na aktivnost' glikozidaz molodi ryb i ikh kormovykh ob'ektov pri razlichnykh znacheniiakh temperatury i pH [Influence of Roundup herbicide on the activity of glycosidase of juvenile fish and their forage objects at different temperature values and pH]. *Vestnik Astrakhan'skogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta. Seriya: Rybnoe khoziaistvo*, 2013, no. 1, pp. 129–134.
28. Boznak E. I. Goloveshka-rotan Percottus glenii (Eleotridae) iz basseina reki Vychehda [Amur sleeper Percottus glenii (Eleotridae) from the basin of the river Vychehda]. *Voprosy ikhtiologii*, 2004, vol. 44, no. 2, pp. 712–713.
29. Ruchin A. B., Lobachev E. A., Ryzhov M. K. Vliianie abioticheskikh faktorov na skorost' rosta rotana Percottus glenii Dybowski, 1877 [Influence of abiotic factors on the growth rate of amur sleeper Percottus glenii (Eleotridae)]. *Biologiya vnutrennikh vod*, 2004, no. 4, pp. 79–83.
30. Golovanova I. L. Vliianie prirodnykh i antropogennykh faktorov na gidroliz uglevodov u ryb i ob'ektov ikh pitaniia. *Avtoreferat dis. dok. biol. nauk* [Influence of natural and anthropogenic factors on hydrolyse of carbohydrates of fish and their feeding objects]. Saint-Petersburg, IEFB im. I. M. Sechenova RAN, 2006. 43 p.

The article submitted to the editors 20.03.2015

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Golovanova Irina Leonidovna – Russia, 152742, Yaroslavl region, Borok; Institute of Biology of Inland Waters named after I. D. Papanin, Russian Academy of Sciences; Doctor of Biology, Senior Researcher; Major Research Scientist; golovanova5353@mail.ru.

Aminov Alexander Ivanovich – Russia, 152742, Yaroslavl region, Borok; Institute of Biology of Inland Waters named after I. D. Papanin, Russian Academy of Sciences; Postgraduate Student of the Laboratory of Fish Ecology; alexsis89@rambler.ru.

Kapshay Dmitriy Sergeevich – Russia, 152742, Yaroslavl region, Borok; Institute of Biology of Inland Waters named after I. D. Papanin, Russian Academy of Sciences; Postgraduate Student of the Laboratory of Fish Ecology; kapsh@ibiw.yaroslavl.ru.

Golovanov Vladimir Konstantinovich – Russia, 152742, Yaroslavl region, Borok; Institute of Biology of Inland Waters named after I. D. Papanin, Russian Academy of Sciences; Doctor of Biology, Senior Researcher; Major Research Scientist; vkgolovan@mail.ru.

