

УДК 597-11:632.954
ББК 28.903

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

**ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ
И ТЕМПЕРАТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
СЕГОЛЕТКОВ РОТАНА
ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ РАУНДАПА**

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

**PHYSIOLOGICAL BIOCHEMICAL
AND TEMPERATURE PARAMETERS
IN AMUR SLEEPER JUVENILE
UNDER CHRONIC ACTION OF ROUNDUP**

Изучено 30-суточное действие гербицида Раундап в концентрации 2 мкг/л (2 ПДК) на физиолого-биохимические и температурные характеристики молоди ротана *Perccottus glenii*. Установлено негативное влияние гербицида на амилолитическую активность в кишечнике рыб, особенно в условиях повышения температуры воды. Активность мальтазы не меняется, однако увеличение K_m гидролиза мальтозы отражает снижение фермент-субстратного сродства при хроническом действии гербицида. Термоустойчивость рыб (по значению критического термического максимума) не меняется. Однако более высокие значения окончательно избираемой температуры свидетельствуют о влиянии Раундапа на терморегуляционное поведение рыб.

Ключевые слова: ротан, пищеварительные гликозидазы, амилолитическая активность, мальтаза, окончательно избираемая температура, критический термический максимум, гербицид Раундап.

30-days effect of Roundup herbicide in concentration 2 mg/L on the physiological-biochemical and temperature parameters in Amur sleeper *Perccottus glenii* juvenile is studied. The negative impact of herbicide on the fish intestinal amylolytic activity, especially under increasing water temperatures is shown. Maltase activity does not change, but the increase in the K_m maltose hydrolyze reflects a decrease in the enzyme-substrate affinity under chronic action of herbicide. Temperature resistance of fish (by value of the critical thermal maximum) does not change. However, higher final preferred temperatures testify the impact of Roundup on the thermoregulatory behavior of fish.

Key words: Amur sleeper, digestive glycosidase, amylolytic activity, maltase, final preferred temperature, critical thermal maximum, Roundup herbicide.

Введение

Головешка-ротан *Perccottus glenii* для бассейна Верхней Волги является видом-вселенцем. Его нативный ареал расположен на Дальнем Востоке, в Китае и Северной Корее, в настоящее время он широко распространен в водоемах Северной Евразии [1]. Проявляя высокую адаптивность к действию природных и антропогенных факторов [2–4], ротан угнетающе действует на многие популяции аборигенных видов рыб. По температурным характеристикам (окончательно избираемой и верхней летальной температуре) ротан относится к наиболее теплолюбивым видам рыб, обитающих в пресных водоемах России [4]. Изучение активности пищеварительных ферментов выявило большую устойчивость гликозидаз ротана к действию *in vitro* низкой температуры, кислых pH и ионов тяжелых металлов (медь, цинк), а также к действию высокой скорости нагрева воды по сравнению с рыбами сем. *Cyprinidae* [5]. В последние годы появились данные о негативном влиянии гербицида Раундап, широко применяемого для уничтожения сорной растительности в коллекторно-дренажных каналах, оросительных системах и прудах, на активность пищеварительных гликозидаз кишечника [6] и ацетилхолинэстеразы (АХЭ) мозга и мышц рыб [7]. Снижение активности АХЭ, играющей важную роль в синаптической передаче нервного импульса, приводит к нарушению поведения и ориентации рыб в пространстве [7] и, вероятно, может изменять терморегуляционное поведение рыб. Отметим, что действие загрязнителей органической природы на физиолого-биохимические показатели ротана и его температурные характеристики ранее не исследовалось.

Цель работы состояла в изучении хронического действия гербицида Раундап на активность гликозидаз в кишечнике молоди ротана, а также его температурные характеристики.

Материалы и методы исследования

В ходе работы, выполненной в осенний период 2012 г., исследовались сеголетки ротана, отловленные в одном из прудов Некоузского района Ярославской области. В течение 1 месяца перед экспериментом рыб содержали в аквариумах вместимостью 200 л с постоянной аэрацией, 12-часовым периодом освещения, при температуре воды $15,5 \pm 1$ °С. Масса сеголетков составила $3,12 \pm 0,17$ г, длина тела – $5,44 \pm 0,10$ см. Затем рыб разделили на 2 группы: 50 экз. поместили в аквариум с чистой водой, 50 экз. – в аквариум с водой, содержащей Раундап в концентрации 2 мкг/л (2 ПДК). Смену воды в аквариумах производили 2 раза в неделю без отсадки рыб. По истечении 30 суток по 12 экз. из контрольной и опытной групп были взяты для определения активности пищеварительных гликозидаз, по 12 экз. были помещены в термоградиент (с диапазоном значений температуры от 14 до 31 °С) для определения окончательно избираемой температуры (ОИТ), по 12 экз. были посажены в аквариумы, температуру воды в которых повышали со скоростью 8 °С/ч до потери рыбами равновесия (переворот на бок), сублетальное значение температуры фиксировали как критический термический максимум (КТМ). В качестве критерия ОИТ была выбрана среднесуточная избираемая температура, значение которой в течение 3-х суток варьирует незначительно ($p > 0,05$). Более подробно методика определения температурных характеристик описана в [4]. В период акклимации, во время эксперимента с Раундапом и в условиях термоградиента рыб кормили 1 раз в сутки личинками хирономид из расчёта 4 % от общей массы тела.

Активность гликозидаз (мальтаза и амилолитическая активность) определяли в гомогенатах медиального отдела кишечника. 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 [8]. Для определения активности мальтазы применяли набор 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). Кинетические характеристики гидролиза мальтозы – значения кажущейся константы Михаэлиса K_m и максимальной скорости реакции V – определяли графическим методом Лайнуивера – Берка. Для приготовления раствора токсиканта (2 мкг/л) использовали коммерческий препарат гербицида, имеющий торговое название «Раундап» (произведен и расфасован ЗАО «Август» (Россия) по лицензии фирмы «Монсанто Европа С. А.» (Бельгия)). При определении чувствительности гликозидаз к действию Раундапа *in vitro* гомогенаты предварительно инкубировали в присутствии токсиканта в течение 60 минут. Концентрации Раундапа, рассчитанные по содержанию глифосата, составляли 0,1; 1; 10; 25 и 50 мкг/л. 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

Через 30 суток действия Раундапа в концентрации 2 мкг/л масса и длина тела рыб контрольной и опытной групп достоверно не различались (табл. 1). Хроническое действие гербицида снижает амилолитическую активность в кишечнике ротана на 27 % по сравнению с рыбами контрольной группы. Активность мальтазы и максимальная скорость реакции гидролиза мальтозы у рыб опытной группы достоверно не изменяются. В то же время значения K_m гидролиза мальтозы возрастают на 37 %, отражая снижение фермент-субстратного сродства при хроническом действии низких концентраций Раундапа.

После 30-ти суток действия гербицида чувствительность гликозидаз к действию Раундапа *in vitro* снижается (табл. 2). Так, торможение амилолитической активности в кишечнике у рыб контрольной группы в присутствии Раундапа в концентрации 0,1–50 мкг/л составило 47–64 %, а у рыб опытной группы – лишь 13–21 % от контроля. Зависимости величины эффекта от концентрации гербицида не выявлено.

Таблица 1

**Физиолого-биохимические характеристики ротана контрольной и опытной групп
после 30 суток воздействия Раундапом в концентрации 2 мкг/л**

Показатель	Контроль	Опыт
Масса рыб, г	4,86 ± 0,48	5,07 ± 0,39
Длина тела, см	6,10 ± 0,15	6,17 ± 0,13
Амилолитическая активность, мкмоль/(г · мин)	5,56 ± 0,07	4,06 ± 0,06*
Активность мальтазы, мкмоль/(г · мин)	6,21 ± 0,15	5,95 ± 0,08
V гидролиза мальтозы, мкмоль/(г · мин)	8,03 ± 0,12	8,01 ± 0,10
K _m гидролиза мальтозы, ммоль/л	8,99 ± 0,24	12,3 ± 0,31*
Амилолитическая активность после ОИТ и КТМ, мкмоль/(г · мин)	2,70 ± 0,08	1,73 ± 0,24*
Активность мальтазы после ОИТ и КТМ, мкмоль/(г · мин)	5,01 ± 0,15	5,56 ± 0,06*
Активность мальтазы после КТМ, мкмоль/(г · мин)	5,11 ± 0,21	6,92 ± 0,22*

* Различия показателей у рыб опытной и контрольной групп статистически достоверны, $p < 0,05$.

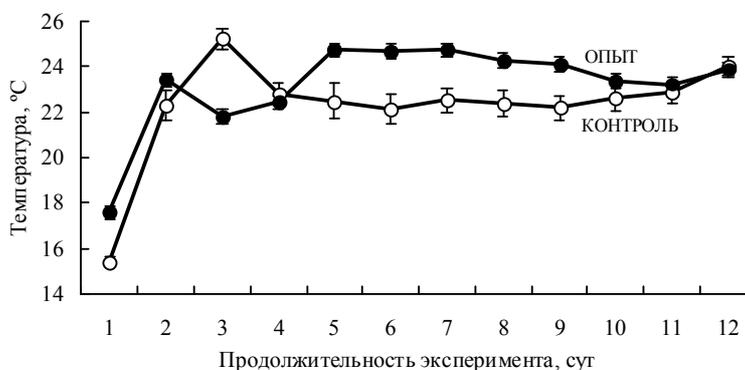
Таблица 2

Чувствительность гликозидаз к действию Раундапа *in vitro* *

Группа	Концентрация Раундапа, мкг/л					
	0	0,1	1	10	25	50
Контроль	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
Опыт	2,82 ± 0,11 ^a	2,45 ± 0,04 ^b	2,44 ± 0,02 ^{b,b}	2,22 ± 0,10 ^b	2,38 ± 0,07 ^{b,b}	2,39 ± 0,08 ^{b,b}

* Разные надстрочные индексы указывают на статистически достоверные различия между показателями в каждой строке (ANOVA, LSD-тест), $p < 0,05$.

По истечении 30 суток опыта по 12 рыб из обеих групп отсадили в отсек термоградиента с температурой 15 °С и предоставили им возможность свободного температурного выбора. По-видимому, в первые несколько суток, когда устойчивых различий в выборе температуры не наблюдается, происходит адаптация организма к новым условиям в градиенте (рис.). В то же время с 5-х по 9-е сутки значения ОИТ у рыб опытной группы были стабильно выше ($24,4 \pm 0,1$ °С) по сравнению с рыбами контрольной группы ($22,3 \pm 0,1$ °С), $p < 0,0002$. Эти данные свидетельствуют о кратковременном влиянии гербицида на терморегуляционное поведение рыб, а выбор более высокой температуры может быть обусловлен необходимостью ускорения процессов метаболизма для вывода токсиканта из организма. Затем различия в уровне избираемой температуры сглаживаются, и на 12-е сутки они составили $24,0 \pm 0,5$ и $23,9 \pm 0,3$ °С у рыб контрольной и опытной групп соответственно.



Избираемая температура у молоди ротана контрольной (в отсутствие Раундапа) и опытной (после 30-и суток действия Раундапа в концентрации 2 мкг/л) групп

Термоустойчивость ротана после 30-и суток действия Раундапа не меняется, о чем свидетельствует равенство значений КТМ у рыб контрольной ($31,3 \pm 0,1$ °C) и опытной ($31,0 \pm 0,2$ °C) групп. После 12-суточного пребывания рыб в термоградиенте значения КТМ были достоверно выше: $35,9 \pm 0,42$ и $36,4 \pm 0,37$ °C, что хорошо согласуется с данными о повышении значений КТМ с ростом температуры акклимации [9], но они также не различались у рыб контрольной и опытной групп.

У рыб опытной группы, находившихся в термоградиенте и затем подверженных нагреву, амилолитическая активность на 36 % меньше по сравнению с амилолитической активностью рыб контрольной группы (см. табл. 1). Активность мальтазы у рыб опытной группы, наоборот, выше на 11 %. Кроме того, у ротана опытной группы при нагреве без нахождения в термоградиенте она также выше на 35 %. Ранее, при исследовании взрослых особей ротана, было показано, что повышение температуры воды в зимний период со скоростью 10 °C/ч снижает амилолитическую активность в 1,5 раза, негативно влияя на скорость гидролиза углеводов [10]. У рыб контрольной группы, находившихся в термоградиенте и затем подверженных нагреву, амилолитическая активность снижается на 51 %, активность мальтазы – на 20 %, у рыб опытной группы – на 57 и 7 % соответственно по сравнению с ферментативной активностью, измеренной сразу после 30-и суток действия Раундапа. Наибольшее снижение амилолитической активности – на 69 % от контроля – показано у рыб после хронического действия Раундапа, последующего нахождения в термоградиенте и последующего нагрева. Активность мальтазы снижается лишь на 10 %. Эти данные свидетельствуют о негативном влиянии хронического действия Раундапа на суммарную активность ферментов, расщепляющих полисахарид крахмал, которое усиливается с повышением температуры воды, а также о разном влиянии скорости нагрева воды на активность панкреатических (α -амилаза, входящая в состав ферментов, гидролизующих крахмал) и собственно мембранных (мальтаза) ферментов.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о негативном влиянии хронического действия гербицида Раундап (2 мкг/л) на амилолитическую активность в кишечнике молоди ротана. Активность мальтазы не меняется, однако увеличение K_m гидролиза мальтозы отражает снижение фермент-субстратного сродства при хроническом действии гербицида. Хроническое действие Раундапа снижает чувствительность гликозидаз к *in vitro* действию гербицида. Термоустойчивость рыб (по КТМ) при 30-суточном действии гербицида не меняется. Однако значения ОИТ на 2 °C выше по сравнению с контролем, что свидетельствует о влиянии Раундапа на терморегуляционное поведение рыб. Повышение температуры воды со скоростью 8 °C/ч усиливает негативный эффект хронического действия Раундапа на амилолитическую активность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Решетников А. Н. Современный ареал ротана *Percottus glenii* Dybowski, 1877 (Odontobutidae, Pisces) в Евразии / А. Н. Решетников // Российский журнал биологических инвазий. 2009. № 3. С. 22–35.
2. Голованова И. Л. Влияние температуры на активность пищеварительных карбогидраз ротана *Percottus glenii* Dyb. в зимний период / И. Л. Голованова, А. К. Смирнов, И. В. Шляпкин // Биол. внутр. вод. 2009. № 2. С. 90–92.
3. Каранова М. В. Состав свободных аминокислот крови и мышц ротана *Percottus glenii* в период подготовки и завершения гибернации / М. В. Каранова // Журнал эволюц. биохимии и физиол. 2009. Т. 45, № 1. С. 59–67.
4. Голованов В. К. Термоизбирание и термоустойчивость молоди головешки-ротана *Percottus glenii* в осенний сезон года / В. К. Голованов, Д. С. Капшай, Ю. В. Герасимов, И. Л. Голованова, Д. П. Карабанов, А. К. Смирнов, И. В. Шляпкин. // Вопр. ихтиологии. 2013. Т. 53, № 2. С. 227–232.
5. Голованова И. Л. Влияние природных и антропогенных факторов на гидролиз углеводов у рыб и объектов их питания / И. Л. Голованова: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб.: ИЭФБ им. И. М. Сеченова РАН, 2006. 43 с.
6. 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. Сер.: Рыбное хозяйство. 2013. № 1. С. 129–134.
7. Gluszczak L. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*) / L. Gluszczak, D. dos S. Miron, M. Crestani, M. B. Fonseca, F. de A. Pedron, M. F. Duarte, V. L. P. Vieira // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2006. Vol. 65. N 2. P. 237–241.

8. 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.
9. Капшай Д. С. Верхняя летальная температура у молоди теплолюбивых видов рыб в зависимости от температуры акклимации / Д. С. Капшай, В. К. Голованов // Тр. Карел. НЦ РАН. Сер.: Эксперим. биология. 2013. № 3. С. 185–189.
10. Голованова И. Л. Влияние температуры на активность пищеварительных карбогидраз ротана *Perccottus glenii* Dyb. в зимний период / И. Л. Голованова, А. К. Смирнов, И. В. Шляпкин // Биология внутр. вод. 2009. № 2. С. 106–108.

REFERENCES

1. Reshetnikov A. N. Sovremennyi areal rotana *Perccottus glenii* Dybowski, 1877 (Odontobutidae, Pisces) v Evrazii [Present area of Amur sleeper *Perccottus glenii* Dybowski, 1877 (Odontobutidae, Pisces) in Eurasia]. *Rossiiskii zhurnal biologicheskikh invazii*, 2009, no. 3, pp. 22–35.
2. Golovanova I. L., Smirnov A. K., Shliapkin I. V. Vliianie temperatury na aktivnost' pishchevaritel'nykh karbogidraz rotana *Perccottus glenii* Dyb. v zimnii period [Influence of temperature on activity of digestive carbohydrase of Amur sleeper *Perccottus glenii* Dyb. in winter period]. *Biologiya vnutrennikh vod*, 2009, no. 2, pp. 90–92.
3. Karanova M. V. Sostav svobodnykh aminokislot krovi i myshts rotana *Perccottus glenii* v period podgotovki i zaversheniia gibernatsii [Content of free amino acids of blood and muscle of Amur sleeper *Perccottus glenii* during the period of preparation and completion of hibernation]. *Zhurnal evoliutsionnoi biokhimi i fiziologii*, 2009, vol. 45, no. 1, pp. 59–67.
4. Golovanov V. K., Kapshai D. S., Gerasimov Iu. V., Golovanova I. L., Karabanov D. P., Smirnov A. K., Shliapkin I. V. Termoizbiranie i termoustoichivost' molodi goloveshki-rotana *Perccottus glenii* v osennii sezon goda [Thermopreference and thermoresistance of Amur sleeper *Perccottus glenii* juvenile in autumn period]. *Voprosy ikhtiologii*, 2013, vol. 53, no. 2, pp. 227–232.
5. Golovanova I. L. Vliianie prirodnykh i antropogennykh faktorov na gidroliz uglevodov u ryb i ob"ektov ikh pitaniia. Avtoreferat diss. dokt. biol. nauk [Influence on natural and anthropogenic factors on hydrolyze of carbohydrates in fish and objects of the feeding]. Saint Petersburg, IEFB im. I. M. Sechenova RAN, 2006. 43 p.
6. 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 [Impact of Roundup herbicide on the activity of glycosidase of juvenile and their feeding objects at different values of temperature and pH]. *Vestnik Astrakhanskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Rybnoe khoziaistvo*, 2013, no. 1, pp. 129–134.
7. Gluszcak L., Miron D. dos S., Crestani M., Fonseca M. B., Pedron F. de A., Duarte M. F., Vieira V. L. P. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2006, vol. 65, no. 2, pp. 237–241.
8. Уголев А. М., Иезуитова Н. Н. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз [Determination of activity of invertase and other disaccharidase]. *Issledovanie pishchevaritel'nogo apparata u cheloveka*. Leningrad, Nauka Publ., 1969, pp. 192–196.
9. Капшай Д. С., Голованов В. К. Verkhniaia letal'naia temperatura u molodi teploliubivyykh vidov ryb v zavisimosti ot temperatury akklimatsii [High lethal temperature of juvenile of thermophilic species of fish depending on the acclimation temperature]. *Trudy Karel'skogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk. Seriya: Eksperimental'nai biologiya*, 2013, no. 3, pp. 185–189.
10. Golovanova I. L., Smirnov A. K., Shliapkin I. V. Vliianie temperatury na aktivnost' pishchevaritel'nykh karbogidraz rotana *Perccottus glenii* Dyb. v zimnii period [Influence of the temperature on the activity of digestive carbohydrase of Amur sleeper *Perccottus glenii* Dyb. in winter period]. *Biologiya vnutrennikh vod*, 2009, no. 2, pp. 106–108.

Статья поступила в редакцию 30.08.2013

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

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

Golovanova Irina Leonidovna – I. D. Papanin Institute of Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok, Yaroslavl region; Doctor of Biology, Senior Research Worker; Major Research Scientist of the Laboratory of Fish Ecology; golovanova5353@mail.ru.

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

Aminov Alexander Ivanovich – I. D. Papanin Institute of Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok, Yaroslavl region; Laboratory of Fish Ecology, Postgraduate Student; Alexsis89@rambler.ru.

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

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

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

Golovanov Vladimir Konstantinovich – I. D. Papanin Institute of Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok, Yaroslavl region; Doctor of Biology, Senior Research Scientist; Principal Research Scientist of the Laboratory of Fish Ecology; vkgolovan@mail.ru.