

DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen567956>

Оригинальное исследование



Способность продуктов фотохимического разложения гербицида Раундап индуцировать окислительный стресс в бактериальных клетках

Е.А. Саратовских¹, Э.А. Мачигов², А.И. Ярмоленко¹, Е.В. Штамм³, С.К. Абилов^{2, 4}¹ Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук, Черноголовка, Россия;² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия;³ Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва, Россия;⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Актуальность. Распространенный неселективный системный гербицид Раундап (глифосат, действующее вещество N-фосфонометилглицин, N-ФМГ) используется для борьбы с многолетними сорняками. Необходима оценка опасности продуктов фотохимического разложения N-ФМГ, образующихся под действием солнечного ультрафиолетового излучения и озона.

Цель — с помощью lux-биосенсоров на основе *Escherichia coli* исследование способности продуктов фотохимического разложения N-ФМГ индуцировать окислительный стресс в бактериальных клетках.

Материалы и методы. В работе использовали действующее вещество гербицида Раундап N-фосфонометилглицин (N-ФМГ), биосенсоры *E. coli* (pSoxS-lux) и *E. coli* (pKatG-lux). УФ-излучение, масс-спектрометрия.

Результаты. С помощью биосенсоров показано, что продукт фотохимического разложения N-ФМГ (2-(N-гидроксиметил-гидроксиамин) этановая кислота) вызывает увеличение концентрации супероксидного анион-радикала и H₂O₂ в клетках *E. coli*, что индуцирует в бактериальной клетке окислительный стресс.

Заключение. Продукт фотохимического разложения N-ФМГ (2-(N-гидроксиметил-гидроксиамин) этановая кислота) индуцирует в клетках бактерий образование супероксидного анион-радикала и H₂O₂.

Ключевые слова: глифосат (Раундап, N-фосфонометилглицин); фотохимическое разложение; масс-спектрометрия; *E. coli* биосенсоры pSoxS-lux, pKatG-lux; оксидативный стресс.

Как цитировать

Саратовских Е.А., Мачигов Э.А., Ярмоленко А.И., Штамм Е.В., Абилов С.К. Способность продуктов фотохимического разложения гербицида Раундап индуцировать окислительный стресс в бактериальных клетках // Экологическая генетика. 2024. Т. 22. № 2. С. 175–189.

DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen567956>

DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen567956>
Original Study Article

The ability of photochemical decomposition products of the Roundup to induce oxidative stress in bacterial cells

Elena A. Saratovskikh¹, Elbek A. Machigov², Andrey I. Yarmolenko¹,
Elena V. Shtamm³, Serikbai K. Abilev^{2, 4}

¹ Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, Russia;

² N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

³ N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

⁴ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: A common non-selective systemic herbicide Roundup (Glyphosate, active ingredient N-phosphonomethylglycine, N-PMG) is used to control perennial weeds. It is necessary to assess the hazard of the products of photochemical decomposition of N-FMG formed under the influence of solar UV and ozone.

AIM: Using lux-biosensors based on *Escherichia coli*, studying the ability of N-FMG photochemical degradation products to induce oxidative stress in bacterial cells.

MATERIALS AND METHODS: The work used the active substance of the herbicide Roundup N-phosphonomethylglycine (N-PMG), biosensors *E. coli* (pSoxS-lux), *E. coli* (pKatG-lux). UV radiation, Mass spectrometry.

RESULTS: Using biosensors, it was shown that the products of photochemical decomposition of N-PMG (2-(N-hydroxymethyl-hydroxyamine) ethanoic acid) cause an increase in the concentration of superoxide anion radical and H₂O₂ in *E. coli* cells, which induces oxidative stress in the bacterial cell.

CONCLUSIONS: The photochemical decomposition product of N-PMG (2-(N-hydroxymethyl-hydroxyamine) ethanoic acid) induces the formation of superoxide anion radical and H₂O₂ in bacterial cells.

Keywords: Glyphosate (Roundup, N-phosphonomethylglycine); photochemical degradation; Mass spectrometry; *E. coli* biosensors pSoxS-lux, pKatG-lux; oxidative stress.

To cite this article

Saratovskikh EA, Machigov EA, Yarmolenko AI, Shtamm EV, Abilev SK. The ability of photochemical decomposition products of the Roundup to induce oxidative stress in bacterial cells. *Ecological genetics*. 2024;22(2):175–189. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen567956>

Received: 02.08.2023

Accepted: 20.12.2023

Published online: 28.06.2024

АКТУАЛЬНОСТЬ

Вещество с тривиальным названием «глифосат (Гл)» входит в состав более чем 20 коммерческих препаратов, в частности в Раундап (Рп)*. Он является самым распространенным по объему производства и применения в практике сельского хозяйства в мире [1]. Это неселективный системный гербицид, который используется для борьбы с сорняками, особенно многолетними. Действующее вещество имеет систематическое название N-фосфометилглицин (N-ФМГ, N-phosphonomethylglycine) — фосфорорганическое вещество, относящееся к фосфонатам.

Согласно результатам многочисленных исследований, используемые гербициды и продукты их разложения загрязняют обрабатываемые территории [2, 3]. Причем Гл и его основные продукты распада, в частности аминотилфосфорная кислота (АМФК), ответственны за почти повсеместное загрязнение поверхностных и подземных вод [4]. По отношению к культурным растениям, например *Allium cepa* L. и *Zea mays* L., Рп показал высокую токсичность [5, 6]. Сорные виды растений, являющиеся объектом применения Рп или Гл, имеют способность быстро привыкать к нему, в связи с чем применяемые дозы периодически повышаются [7–10]. Ряд гербицидов, в том числе Рп, образует хелатные комплексы с металлами [11, 12] и взаимодействуют с оксидом алюминия [13]. Такого типа комплексы имеют значительно более высокие константы связывания с аденином, нуклеотидами и рядом других биологических молекул. В результате этого их химическая и биологическая устойчивость, а также токсикологические эффекты значительно возрастают [14, 15]. Остаточные количества Рп (Гл) и продукты его разложения содержатся в основных продуктах пищи, таких как сахар, кукуруза, соя и пшеница [16].

Как и другие гербициды, Рп негативно влияет на почвенные и водные организмы, проявляя высокую токсичность и резко снижая их численность [3, 14, 15]. Попадая с пищей в организм человека, Рп поражает органы пищеварительной и выделительной систем, становится причиной многих заболеваний [2, 3, 17–19]. В том числе Гл оказывает существенное влияние на окисление жиров и полипептидов. Характер воздействия меняется: при высоких концентрациях (10^{-3} – 10^{-6} моль/л) снижается интенсивность процессов перекисного окисления, а в низких — увеличивается интенсивность этих реакций для липидов и белков [20–22].

Одним из механизмов действия Рп является ингибирование холинэстеразных ферментов [23]. Зафиксировано подавление Рп активности мальтазы и пептидазы у гидробионтов, ингибирование активности фермента окислительно-восстановительной системы НАДН-оксидоредуктазы

in vitro гербицидами Лонтрел, Рп, Зенкор, Базагран, Кузаггард, Сетоксидим и комплексами Лонтрела с металлами [24, 25].

Ферменты цитохрома Р450 (СYP) играют решающую роль в метаболизме животных и растений. В частности, участвуют в детоксикации ксенобиотиков. Ингибирование Гл ферментов СYP — недооцененный компонент его токсичности для млекопитающих. Таким путем Гл усиливает повреждающее действие химических веществ и токсинов, попадающих в организм из окружающей среды. Негативное воздействие на организм коварно и проявляется медленно с течением времени, поскольку воспаление повреждает клеточные системы во всем организме. Кроме ингибирования ферментов СYP Гл нарушает биосинтез ароматических аминокислот кишечными бактериями и транспорт сульфата в сыворотке. Все эти процессы синергически усиливают друг друга и совокупное действие на организм в целом [16].

Гербициды вызывают серьезные нарушения в антиоксидантной системе и индуцируют окислительный стресс, перекисное окисление липидов и снижают уровни восстановленного глутатиона и антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионредуктазы в ткани печени, что является предполагаемым токсикодинамическим путем окислительного стресса [26]. Имеется ряд указаний на генотоксический потенциал гербицида Рп [26–31] как его наиболее опасное действие. Окислительная фрагментация ДНК является важным механизмом генетического повреждения [28–30]. Рп изменяет экспрессию генов в печени, в частности TP53. Образование апуриновых/апиримидиновых повреждений ведет к разрывам в цепи ДНК и неправильному свертыванию белков [27]. Установлены общие молекулярные механизмы, связанные с генерацией активных форм кислорода (АФК) при воздействии Гл или через его метаболит — АМФК [31, 32].

Как результат этих биохимических нарушений, происходящих в результате действия Рп (Гл), возникают эмбриотоксические, гемотоксические, цитотоксические и генотоксические изменения в организме человека и животных [17, 18, 33], снижается фертильность, наблюдаются канцерогенные и тератогенные нарушения [19, 34, 35]. По классификации Международного агентства по изучению рака (МАИР) Всемирной организации здравоохранения с 2015 г. Рп находится в группе канцерогенов 2А [36, 37].

Фитотоксический эффект гербицидов зависит от того, насколько долго они сохраняются на листьях. Это зависит от рецептуры гербицидов, которая, наряду с действующим веществом, содержит вспомогательные вещества, усиливающие смачиваемость листьев и проникновение молекул гербицида в клетки растений. Поэтому после обработки на листьях растений длительное время сохраняются капли гербицида, который, находясь под воздействием лучей солнца, подвергается разложению. В этой связи имеется

* Поскольку в коммерческие препараты вводят различные добавки, далее по тексту мы приводим те названия, которые использовали авторы в конкретной цитируемой статье.

ряд публикаций по изучению продуктов фоторазложения Гл [38–41]. Например, ранее нами показано, что при облучении раствора N-ФМГ светом с длин волн $\lambda = 250\text{--}600$ нм в течение 14 ч образуется генотоксичный продукт, способный индуцировать SOS-ответ у биосенсора K12 — MG1655 (pColD-lux). При этом необлученный раствор N-ФМГ не обладал такой активностью [41].

Несмотря на все имеющиеся данные, острейшими для ученых-экологов остаются вопросы: во-первых, каковы продукты разложения N-ФМГ; во-вторых, каковы наиболее эффективные способы очистки питьевой воды от N-ФМГ и продуктов его разложения.

Были исследованы различные процессы обработки природной и питьевой воды для снижения в ней концентрации гербицидов и сведения к минимуму потенциальных рисков для здоровья, связанных с воздействием этих химических веществ при потреблении загрязненной воды [42, 43]. Со временем исследователи пришли к выводу, что усовершенствованные процессы окисления являются ключевой технологией для решения проблем загрязнения гербицидами как при очистке питьевой воды, так и при очистке сточных вод [44]. В работах [45–47] в условиях воздействия УФ-излучения исследовалось параллельное влияние ряда других факторов, таких как катализатор, pH, введение H_2O_2 . В нашей предыдущей статье кроме УФ-излучения применялось воздействие озоном [41].

Следует подчеркнуть, что проведено очень мало исследований основных продуктов разложения Гл (Pn), но представленные результаты неоднозначны. В исследовании [45] утверждается, что АМФК — основной метаболит, обладающий высокой устойчивостью и низкой токсичностью. Микроядерным анализом *in vitro* на линии клеток яичника китайского хомячка (Chinese Hamster) CHO-K1 в работе [46] для Гл и АМФК показана цитогенетическая токсичность, которая увеличивалась в 100 раз после светового облучения. Оценка внутриклеточных АФК позволила предположить участие окислительного стресса в генотоксическом воздействии Гл.

Столь же противоречивые мнения высказываются о возможном пути фоторазложения N-ФМГ. В обзоре [47] анализируется значительное количество данных и приводятся два пути образования продуктов реакции. Однако устойчивыми соединениями называются глицин, саркозин, формальдегид, а не АМФК, и процесс их образования не сопряжен с ней. В нашей предыдущей статье методом хромато-масс-спектрометрии (МС) были установлены продукты

фоторазложения, среди которых не было идентифицировано АМФК [41]. С нашей точки зрения, это легко объяснить, поскольку существуют определенные трудности стабилизации фосфатной группы в составе молекул [48]. А продукты, образующиеся при гидролитическом отщеплении фосфатной группы, сильно стабилизируются за счет сопряжения [48].

В исследованиях причин возникновения и путей формирования генотоксичности веществ и гербицидов, в частности, эффективно использование lux-биосенсоров на основе штамма *E. coli* K12: MG1655 (pSoxS-lux) и MG1655 (pKatG-lux) [49–51], а также pColD-lux [52], несущих рекомбинантную плазмиду с lux-опероном люминесцирующей бактерии *Photorhabdus luminescens*, слитым с промоторами генов супероксиддисмутазы, каталазы и колицина соответственно. Промотор pKatG (белок-активатор OxyR) специфически реагирует на перекись водорода и другие пероксиды, тогда как промотор pSoxS (белок-активатор SoxR) специфически реагирует на супероксидный анионрадикал. Для SOS-биосенсора, реагирующего на повреждения ДНК, использован промотор pColD колицинового гена, входящего в SOS-регулон. Штаммы *E. coli*, несущие lux-оперон, под воздействием индукторов окислительного стресса или ДНК-повреждающих агентов начинают активно продуцировать люциферин-люциферазный комплекс, что приводит к повышению уровня биолюминесценции [53].

Цель настоящей работы — исследование с помощью lux-биосенсоров на основе *Escherichia coli* способности продуктов фотохимического разложения N-ФМГ индуцировать окислительный стресс в бактериальных клетках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали действующее вещество гербицида Раундап [Глифосат, N-фосфометилглицин (N-ФМГ, $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$)], очищенное двойной перекристаллизацией из бидистиллированной воды (рис. 1) [54].

В работе использовали бактериальные lux-биосенсоры: *E. coli* K12 MG1655 (pSoxS-lux) и *E. coli* K12 MG1655 (pKatG-lux) [55–57]. В тексте они обозначены как биосенсоры pSoxS-lux и pKatG-lux. Данные биосенсоры содержат рекомбинантную плазмиду, включающую промоторы генов супероксиддисмутазы soxS и каталазы katG, слитые с lux-опероном *Photorhabdus luminescens*. В клетке штамма pSoxS-lux ген супероксиддисмутазы транскрибируется при повышении концентрации супероксид-аниона, и, соответственно, транскрипции подвергается и lux-оперон, что приводит к люминесценции клетки с интенсивностью, пропорциональной концентрации супероксид-аниона. Аналогичным механизмом работы обладает и штамм pKatG-lux, где ген каталазы, слитый с lux-опероном, транскрибируется при повышении концентрации в клетке пероксида водорода, что приводит

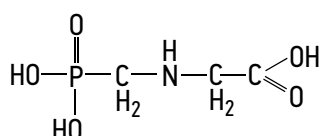


Рис. 1. Химическая формула N-фосфометилглицина
Fig. 1. Chemical formula of N-phosphonomethylglycine

к люминесценции с интенсивностью, пропорциональной его концентрации в клетке. Перечисленные биосенсоры предоставлены Г.Б. Завильгельским и И.В. Мануховым (ГосНИИгенетика, Москва).

Хранение и культивирование бактериальных культур осуществляли с помощью твердых, с добавлением агара, и жидких питательных сред LB (Луриа – Бертани). Среды содержали ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. Для опытов использовали культуры биосенсоров KatG-lux и pSoxS-lux в жидкой питательной среде LB.

Ночные культуры биосенсоров разбавляли в свежей жидкой среде LB, доводя содержание бактерий до концентрации 10^7 кл/мл, и инкубировали при 37 °C в течение 120 мин с аэрацией до достижения ранней экспоненциальной фазы. Далее культуры переносили в 96-луночный планшет по 180 мкл в каждую лунку. Ряд контрольного образца заполняли дистиллированной водой по 20 мкл в лунку. Следующие ряды лунок заполняли различными разведениями облученного N-ФМГ (N-ФМГобл). В последний ряд — по 20 мкл N-ФМГ в концентрации 0,01 М в качестве положительного контроля в lux-тесте. Далее культуры в заполненных планшетах культивировали течение 1 ч при 37 °C и определяли интенсивность люминесценции биосенсоров с помощью люминометра — микропланшетного ридера StatFax 4400 (Awareness Technology Inc., США), где за единицу измерения для люминесцентного ответа принимали условные единицы светового потока (RLU). Вышеперечисленные опыты проводили не менее трех раз с восемью повторениями в каждом.

Для пересчета люминесценции на 1000 жизнеспособных клеток были проведены эксперименты по одновременному определению люминесценции и выживаемости биосенсоров pSoxS-lux и pKatG-lux непосредственно в инкубационной смеси в лунках планшета в зависимости от разведения N-ФМГобл. Для этого по истечении времени инкубации экспериментальной смеси измеряли интенсивность биолюминесценции. Затем содержимое каждой лунки серийно разводили в 0,9 % растворе натрия хлорида до 10^{-6} , 10^{-5} и 10^{-2} для последующего высева в чашки Петри с агаризованной питательной средой LB. Через 19 ч инкубации при 37 °C учитывали число выросших колоний и пересчитывали на число колониеобразующих единиц в 0,2 мл суспензии бактерий. Значение люминесценции делилось на число КОЕ для соответствующей концентрации N-ФМГобл и умножалось на 1000. Полученный коэффициент показывал относительную люминесценцию 1000 КОЕ.

Все эксперименты выполнены в трех повторностях. Полученные в ходе опытов данные обработали стандартными статистическими методами. Вычисляли средние значения показателей. Значимость различий средних значений определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Для вывода о статистической значимости различий полученных данных считали достаточной вероятность ошибки $p < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетика и продукты разложения N-ФМГ под действием УФ-излучения и озона

Гербициды считаются безвредными для растений на том основании, что они разлагаются под действием УФ-компоненты солнечного излучения, почвенных микроорганизмов и в результате метаболизма внутри самого растения. Скорость разложения N-ФМГ под действием исключительно солнечного света, измеренная в наших экспериментальных условиях, составила $2,8 \times 10^{-4}$ М/ч [41].

Ранее нами была выполнена работа, в которой постарались смоделировать естественные природные условия, в которых оказывается гербицид после нанесения на растения: УФ-излучение солнца, влага (роса, дождь, поверхностные или подземные воды), озон (образующийся при грозовом разряде) [41]. Зарегистрировано разложение N-ФМГ под действием излучения ртутной лампы ДРШ-1000. Была обнаружена неаддитивность совместного действия УФ-излучения и озона на разложение N-ФМГ: скорость процесса во много раз превосходила скорости, регистрируемые при одном лишь облучении раствора или при одном барботаже озона через раствор реагента. Установлено, что реакция разложения N-ФМГ при совместном действии УФ-излучения и озона протекает со значительно более высокой скоростью (0,406 М/ч), чем при раздельном использовании УФ-излучения или озона [41].

Процесс разложения имеет сложный многоступенчатый характер. Как видно из рис. 2, на регистрируемых в процессе разложения N-ФМГ электронных спектрах прослеживается ряд промежуточных соединений, возникающих в разные периоды облучения. Так, через 1,0 ч от начала облучения в растворе появляется пик с $\lambda_2 = 195$ нм, который в дальнейшем присутствует во всех пробах. После 3,8 ч облучения идентифицируется пик $\lambda_4 = 258$ нм, который присутствует в пробах до 8,1 ч наблюдения. Однократно идентифицирован пик $\lambda_5 = 238$ нм через 5,3 ч. Пик $\lambda_3 = 286$ нм появляется через 2,8 ч, после этого через 1,0 ч исчезает и появляется вновь в пробе от 11,3 ч и так же более не идентифицируется. Это указывает на сложный многоступенчатый процесс разложения N-ФМГ.

Синергизм действия УФ-излучения и озона можно объяснить, приняв во внимание способность озона фотолизоваться при поглощении кванта УФ-излучения:



Возникающий при этом атомарный кислород может непосредственно взаимодействовать с N-ФМГ, индуцируя процесс его окисления, включающий многоступенчатую последовательность превращений, в которой возникают продукты, некоторые из которых идентифицированы нами.

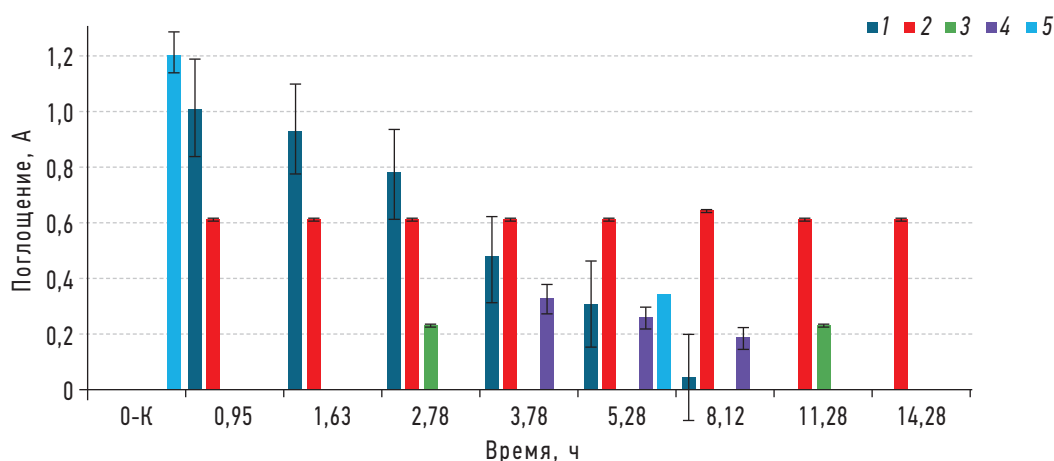


Рис. 2. Изменение спектра поглощения реакционной смеси в процессе фотохимического разложения водного раствора N-фосфонометилглицина при совместном воздействии УФ-излучения и озона от времени: 1 — интенсивность поглощения при $\lambda = 212$ нм; 2 — 195 нм; 3 — 286 нм; 4 — 258 нм; 5 — 238 нм. По данным работы [41]

Fig. 2. Change in the absorption spectrum of the reaction mixture during the photochemical decomposition of an aqueous solution of N-phosphonomethylglycine under the combined influence of UV radiation and ozone over time: 1 — absorption intensity at $\lambda = 212$ nm; 2 — 195 nm; 3 — 286 nm; 4 — 258 nm; 5 — 238 nm. According to work [41]

Для определения состава продуктов фотохимического разложения был выполнен анализ растворов N-ФМГобл с помощью МС [41]. Исходный N-ФМГ характеризовался пиком депротонированной молекулы с m/z 168, что соответствует составу $[C_3H_7NO_5P]^{-1}$. В образце, находившемся в темноте на воздухе при температуре 25 °C в течение 14,3 ч, появляются некие примеси, однако их существенно меньше, чем основного вещества — N-ФМГ. В пробе, содержащей облученный и озонированный раствор, даже следы N-ФМГ не были найдены, то есть N-ФМГ был полностью разрушен.

Использование МС высокого разрешения [58] позволило установить точные массы продуктов деструкции для образца (УФ + озон; 14,3 ч) и, как следствие, их элементные составы [41]. В табл. 1 приведены состав и наиболее вероятная структура фрагментов, образующихся в процессе фотохимического разложения под действием УФ-излучения и озона. Видно, что были зарегистрированы пики, соответствующие депротонированным молекулам продуктов разложения исходного N-ФМГ.

Активность систем окислительного стресса под действием продуктов фоторазложения N-ФМГ

Продукты фоторазложения N-ФМГ (N-ФМГобл) индуцировали интенсивную люминесценцию биосенсоров pKatG-lux и rSoxS-lux при инкубации в течение 90 мин (рис. 3). Это указывают на то, что N-ФМГобл прямо или опосредованно генерирует в бактериях *E. coli* такие окислительные соединения, как супероксид-анион и пероксид водорода. Данные вещества являются сильными источниками окислительного стресса для живых организмов. Окислительное повреждение клетки может носить не только цитотоксический характер, но и вызывать повреждения в ДНК бактерий.

Проведены эксперименты с целью определения выживаемости бактерий, то есть способности образовывать колонии (КОЕ), при воздействии N-ФМГобл в различных концентрациях. Для этого по истечении времени инкубации экспериментальной смеси аликвоту бактерий объемом 0,1 мл серийно разводили в 0,9 % растворе натрия хлорида до 10^{-6} . Затем по 0,1 мл из разных разведений высевали на агаризованную питательную среду LB в чашках Петри.

Через 19 ч инкубации при 37 °C учитывали число выросших колоний, являющееся показателем КОЕ (табл. 2).

Из данных, представленных в табл. 2, следует, что с увеличением концентрации N-ФМГобл значительно снижется число КОЕ в культуре клеток. Так, в случае биосенсора pKatG-lux в контроле число жизнеспособных бактерий составило $5,11 \times 10^7$, при воздействии разбавленного 1 : 10 раствора N-ФМГобл выживаемость бактерий не отличалась от контрольного значения. Более высокие концентрации N-ФМГобл, разбавленного 1 : 2 и неразбавленного, снижали выживаемость бактерий в 10 и более чем в 100 раз соответственно. Подобные же результаты были получены и в случае биосенсора rSoxS-lux.

С целью определения изменения интенсивности люминесцентного ответа в зависимости от концентрации N-ФМГобл для фиксированного количества бактерий был проведен опыт по одновременному определению люминесценции и выживаемости бактерий биосенсоров rSoxS-lux и pKatG-lux непосредственно в культивируемой суспензии в ячейках планшета. Для этого через 90 мин инкубации суспензии считывали данные по люминесценции. Затем содержимое каждой лунки (0,2 мл) серийно разводили 0,9 % раствором натрия хлорида до 10^{-6} , 10^{-5} и 10^{-2} для последующего посева в чашки Петри с агаризованной питательной средой LB. Через 19 ч инкубации

Таблица 1. Состав и структура фрагментов, образующихся в процессе фотохимического разложения N-фосфометилглицина, согласно данным масс-спектрометрии [41]

Table 1. Composition and structure of fragments formed during the photochemical decomposition of N-phosphonomethylglycine, according to mass spectrometry data [41]

Номер продукта	<i>m/z</i>	Состав	Структура
1	86,02510	C ₃ H ₄ O ₂ N	
2	100,00427	C ₃ H ₂ O ₃ N	
3	102,01995	C ₃ H ₄ O ₃ N	
4	104,03557	C ₃ H ₆ O ₃ N	
5	121,02968	C ₃ H ₇ O ₄ N	

Таблица 2. Зависимость выживаемости бактерий биосенсоров (число КОЕ в 0,1 мл культуры) от концентрации N-ФМГобл

Table 2. Dependence of the survival of biosensor bacteria (number of CFUs in 0,1 mL suspensions) at concentration of N-PMGirr

Lux-биосенсор	Вода (контроль)	Разведение N-ФМГобл		
		1 : 10	1 : 2	не разведен
pKatG-lux	5,11 ± 0,39 × 10 ⁷	4,67 ± 0,55 × 10 ⁷	4,73 ± 0,58 × 10 ⁶	3,14 ± 0,56 × 10 ^{5*}
pSoxS-lux	5,46 ± 0,16 × 10 ⁷	5,75 ± 0,08 × 10 ⁷	4,54 ± 0,35 × 10 ^{6*}	2,83 ± 0,55 × 10 ^{5**}

Статистически значимые различия между контролем и вариантами с N-ФМГобл: **p* ≤ 0,05; ***p* ≤ 0,001.
Statistically significant differences between the control and variants with N-PMGirr: **p* ≤ 0.05; ***p* ≤ 0.001.

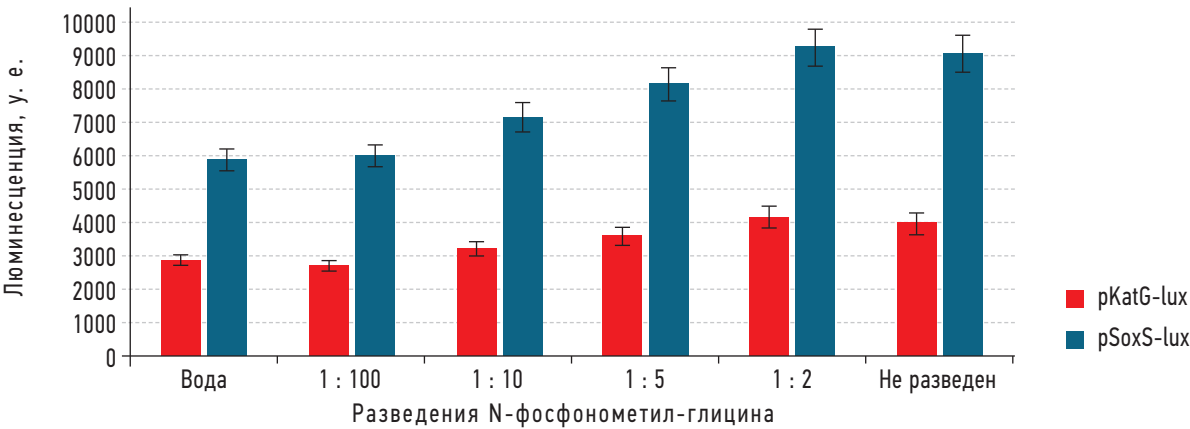


Рис. 3. Люминесценция pKatG-lux и pSoxS-lux с N-ФМГобл в условных единицах светового потока

Fig. 3. Luminescence of pKatG-lux and pSoxS-lux with N-PMGirr in arbitrary units of luminous flux

Таблица 3. Зависимость интенсивности люминесцентного ответа и выживаемости клеток биосенсоров pKatG-lux и pSoxS-lux от концентрации N-ФМГobl

Table 3. Dependence of the intensity of the luminescent response and cell survival of the biosensors pKatG-lux and pSoxS-lux on the N-PMGirr concentration

Lux-биосенсор	N-ФМГobl	Число КОЕ в 0,2 мл культуры	Люминесценция 0,2 мл культуры	Люминесценция на 1000 КОЕ
pKatG-lux	Вода (контроль)	$5,22 \pm 0,44 \times 10^8$	2938 ± 109	0,005
	1 : 10	$4,71 \pm 0,51 \times 10^8$	3328 ± 86	0,007
	не разведенный	$3,34 \pm 0,40 \times 10^6$	4092 ± 131	1,2*
pSoxS-lux	Вода (контроль)	$4,19 \pm 0,28 \times 10^8$	5932 ± 109	0,014
	1 : 10	$3,62 \pm 0,39 \times 10^8$	7157 ± 115	0,02
	не разведенный	$2,50 \pm 0,38 \times 10^6$	9137 ± 125	3,65*

*Наиболее значимые результаты.

*The most significant results.

при 37 °C учитывали число выросших колоний и пересчитывали на число колониеобразующих единиц в 0,2 мл суспензии бактерий. Полученные результаты приведены в табл. 3.

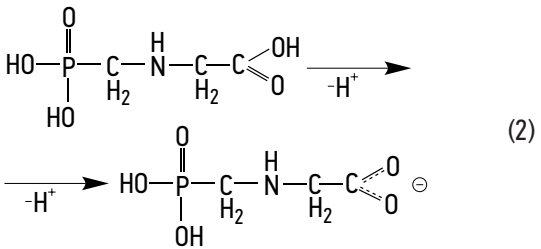
Для вычисления интенсивности люминесцентного ответа биосенсоров pSoxS-lux и pKatG-lux на 1000 жизнеспособных клеток был проведен следующий расчет. Показатель интенсивности люминесцентного ответа биосенсора при определенной концентрации N-ФМГobl делили на число КОЕ в лунке при этой концентрации и умножали на 1000. Полученный коэффициент показывал относительную люминесценцию 1000 КОЕ. В контрольном образце, не обработанном N-ФМГobl, люминесценция 1000 бактерий pKatG-lux и pSoxS-lux составляла 0,005 и 0,014 отн. ед. соответственно. Люминесценция 1000 КОЕ бактерий pKatG-lux и pSoxS-lux при добавлении неразведенного N-ФМГobl превышала контрольную в 240 и 261 раз, составляя 1,2 и 3,65 отн. ед. В варианте эксперимента с использованием N-ФМГobl в десятикратном разведении люминесценция 1000 клеток pKatG-lux и pSoxS-lux составляла 0,007 и 0,02 отн. ед. соответственно.

Из этих данных становится очевидно, что интенсивность экспрессии гена фермента оксидативного стресса супероксиддисмутазы в жизнеспособных клетках биосенсора с повышением концентрации N-ФМГobl не уменьшается, а растет. Таким образом, с ростом концентрации N-ФМГobl часть клеток гибнет, а у оставшейся наблюдается усиление активности систем окислительного стресса (табл. 3).

Химические реакции, приводящие к образованию супероксидного анион-радикала из N-ФМГ под действием УФ-излучения и озона

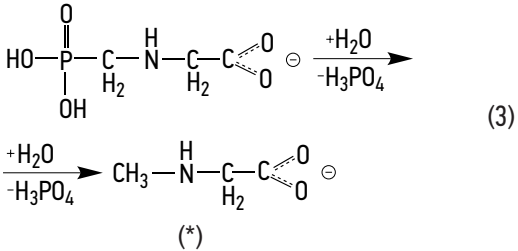
В табл. 1 приведены продукты фотохимического разложения N-ФМГ. Можно предположить нижеследующую схему их образования. В жестких окислительных условиях, в которых оказался N-ФМГ — водная среда при воздействии УФ и озона (продуцирующего как O₂⁻, так и O^{*}) — в возбужденное состояние переходит вся

молекула N-ФМГ. Электроны переходят с π-связывающих на π-разрыхляющие уровни молекулы, что ведет к ее распаду. На первой стадии происходит потеря протона (-H⁺) с образованием стабильного промежуточного аниона, который мы можем регистрировать с помощью МС (*m/z* 168,0 [C₃H₇NO₅P]⁻¹) и УФ-спектроскопии (λ = 195 нм). Стабильность этого аниона можно объяснить делокализацией электронов по всей молекуле с задействованием сопряженных двойных связей C=O, P=O и неподеленных электронных пар азота и кислорода (2).

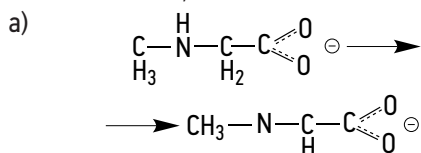


От какой из кислотных группировок — карбонильной или фосфорной — происходит отщепление протона можно только предполагать, но очевидна вероятность обоих путей. Скорее всего, обе частицы находятся в равновесном состоянии.

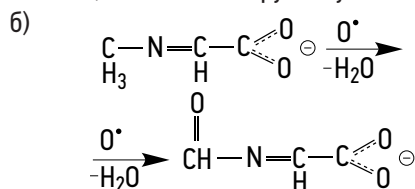
На следующей, наиболее вероятной, стадии связь фосфор – углерод достаточно легко гидролизуется, при этом атом фосфора окисляется в условиях среды от валентности формально (+4) в N-ФМГ (из-за делокализации электронов), до наиболее стабильной валентности (+5). В результате отщепляется фосфорная кислота H₃PO₄. Анионы PO₃⁻ с *m/z* 78,95941 и H₂PO₄⁻ с *m/z* 96,96990 идентифицировали в МС.



В образовавшемся интермедиате — анионе (*), атом азота своей неподеленной электронной парой участвует в сопряжении с карбоксильной группой. В результате облако π -электронов распределяется по всей молекуле. Этот анион достаточно стабилизирован и из него в условиях среды возможны последующие реакции по нескольким направлениям: а) из окислительного депротонирования атома азота образуется соединение № 1, идентифицируемое в МС с m/z 86,02510.

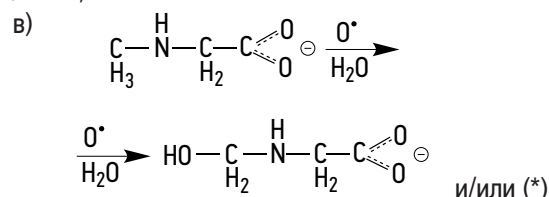


Из полученного соединения, при окислении метильной группы (б), связанной с атомом азота, образуется соединение № 2 с m/z 100,00427, альдегидная группировка которого сопряжена с неподеленной электронной парой атома азота, что стабилизирует эту частицу.

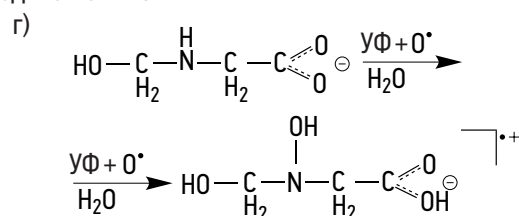


В условиях применяемой агрессивной окислительной среды идут дальнейшие окислительные реакции с образовавшимися интермедиатами по их легко окисляемым позициям — атому азота и метильной группировке, связанной с атомом азота.

В результате последовательно (в, г) образуются соединения № 4 с m/z 104,03557, а затем (г) № 5 с m/z 121,02968.



В указанных условиях, азот легко окисляется до гидроксиаминовой (N-OH) группировки, с образованием 2-(N-гидроксиметил-гидроксиамин) этановой кислоты, соединения № 5:



Возможны и другие параллельные пути реакции окисления интермедиатов. В том числе и окисление углерода, находящегося в α -положении по отношению к карбоксильной группе с образованием гидроксильной группы в этом положении — соединение № 3, имеющее m/z 102,01995, как показано на схеме (рис. 4).

Как видно из табл. 1, продукты фотохимического разложения № 1–4 имеют одну, две или даже три двойные связи. Значительные избыточные электронные плотности обуславливают их восстановительную природу.

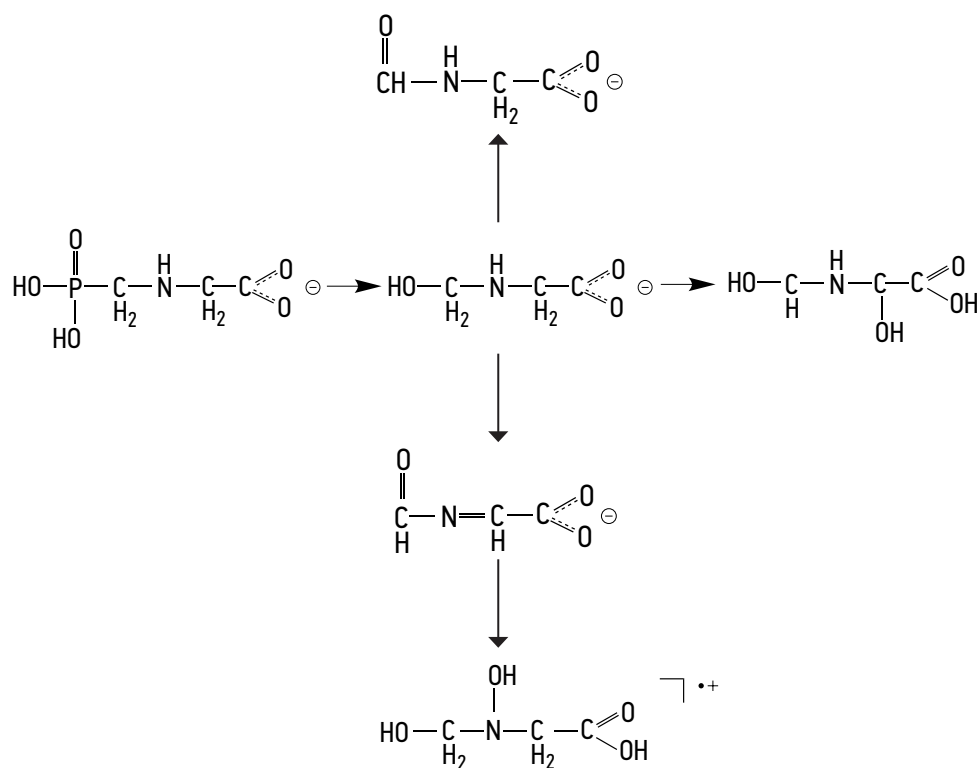
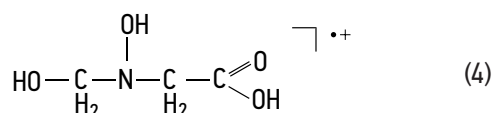
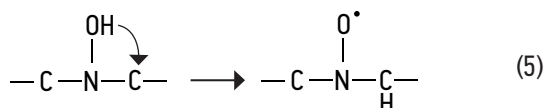


Рис. 4. Схема потенциальных реакций окисления N-ФМГ по α -углеродному атому
Fig. 4. Scheme of potential reactions of N-PMG oxidation at α -carbon atom

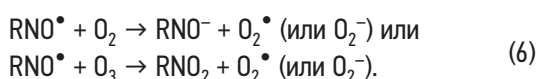
Особый интерес вызывает продукт № 5, имеющий m/z 121,02968 и состав $C_3H_7O_4N$.



Соединение № 5 — алифатический гидроксиамин: 2-(N-гидроксиметил-гидроксиамин) этановая кислота, является окислителем и способно к реакции диспропорционирования, приводящей к образованию короткоживущего и высоко активного нитрокислородного радикала.



В результате переноса протона (H^+) неспаренный электрон локализуется на разрыхляющей π^* -орбитали, образованной из $2p_z$ -орбиталей атомов азота и кислорода. Гибридизация связей атома азота близка к sp^2 . В литературе встречаются указания на то, что при отсутствии возможности делокализации неспаренного электрона, образуется крайне нестабильный молекулярный ион [59]. Алкильные радикалы быстро реагируют с кислородом [60, 61] с образованием супероксидного анион-радикала ($\text{O}^{\bullet-}$) — одной из самых активных форм кислорода, циркулирующих в организмах. Эта частица обладает очень высокой реакционной способностью, вследствие чего и время ее жизни и ее стационарная концентрация очень малы.



Однако имеются данные, указывающие, что из-за высокой мгновенной плотности излучения становится возможным взаимодействие между собой продуктов, образовавшихся под действием УФ-излучения [62]. Продукт(ы) диффундирует(ют) через мембрану клеток, проникая внутрь. В частности, при обработке $\lambda = 220$ нм происходит значительное снижение от pH 7,4 (биологически важных) до pH 2,5–3,0. Механизм снижения pH связан с образованием и последующим распадом пероксинитрита. При pH 7,4 существуют как ионная (ONOO^-), так и протонированная (пероксиазотистая кислота ONOOH ; $pK_a = 6,8$) формы. Протонированная форма имеет период полураспада ~1,3 с, в то время как ионная форма может сохраняться до 15 сут даже при комнатной температуре [62].

Иммунная система пользуется поражающим действием окислителей, превращая выработку окисляющих веществ в ключевой элемент механизма уничтожения патогенов. Так, активированные фагоциты продуцируют АФК и активные формы азота. К ним относятся супероксид ($\text{O}^{\bullet-}$), оксид азота ($\text{NO}^\bullet$) и особенно реакционноспособное производное — пероксинитрит (ONOO^-) [63]. В нормальных условиях внутриклеточное содержание АФК

поддерживается на низком уровне различными ферментными системами, участвующими в редокс-гомеостазе. Однако под влиянием различных условий, в частности в присутствии токсичных веществ (например, пестицидов), в клетках накапливается слишком много свободных радикалов — молекул без одного электрона (супероксидный радикал, гидроксильный радикал $\text{HO}^\bullet$ и H_2O_2), приводящих к возникновению состояния окислительного (оксидативного) стресса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования показали, что продукты фотохимического разложения N-ФМГ токсичны для клеток бактерий *coli*. С помощью системы биосенсоров pSoxS-lux и pKatG-lux N-ФМГобл вызывает оксидативный стресс с увеличением концентраций супероксидного аниона и пероксида водорода, что может привести к повреждению генетического материала. Методом МС установлено, что среди продуктов фотохимического окисления N-ФМГ идентифицируется соединение состава $C_3H_7O_4N$ с m/z 121,02968 [41]. В настоящей работе приведена последовательность химических реакций, доказывающих, что в результате переноса протона (H^+) и делокализации неспаренного электрона соединение 2-(N-гидроксиметил-гидроксиамин) этановая кислота способно продуцировать супероксид радикал ($\text{O}^{\bullet-}$), что может привести к повышению интенсивности экспрессии гена фермента оксидативного стресса супероксиддисмутазы в жизнеспособных клетках биосенсоров pSoxS-lux и pKatG-lux.

Предложен механизм трансформации молекулы N-ФМГ в новые химические соединения, способные в клетках бактерий генерировать АФК и устойчивые свободные радикалы. В свою очередь, свободные радикалы и накопление АФК в клетке приводит к повреждениям ДНК. Таким образом, рассмотрен весьма вероятный механизм возникновения генотоксического эффекта продуктов фотохимического распада N-ФМГ. Попадая в организм человека, N-ФМГ накапливается в мембранах клеток за счет взаимодействия с липидами; или же связываясь в устойчивые комплексные соединения с другими биологическими молекулами, как например АТФ. В определенных условиях — нервные перегрузки, повышенная солнечная радиация ($h\nu$ или $h\nu + \text{O}_3$) или другие факторы — из аккумулированных молекул N-ФМГ генерируется значительное количество супероксид радикалов ($\text{O}^{\bullet-}$). Мембрана(ы) разрываются и радикалы попадают в лимфу и кровоток. Их количество многократно превосходит потребности организма и то количество, которое организм способен использовать или детоксицировать в нормальных физиологических условиях. Избыточное количество радикалов приводит к повышенной активации свободнорадикальных процессов, что влечет за собой целый каскад негативных реакций и патологических процессов, лежащих в основе ряда заболеваний.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Все авторы внесли равный вклад в подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Вклад каждого автора: Е.А. Саратовских — идея исследования, анализ результатов и источников, написание первоначального текста; Е.А. Мачигов — биолюминесцентный анализ и обработка первичного экспериментального материала; А.И. Ярмоленко — создание схемы реакций фотохимического разложения; Е.В. Штамм — сбор литературных данных и написание литературного обзора; С.К. Абилов — доработка текста, интерпретация полученных результатов биолюминесцентного исследования.

Источник финансирования. Работа выполнена в соответствии с темой № FFSG-2024-0012 Государственного задания (рег. № 124020500019-2) и с темой № 0092-2022-0003 Государственного задания (рег. № 122022600163-7).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ADDITIONAL INFORMATION

Authors' contribution. All authors made an equal contribution to the preparation of the article, read and approved the final version before publication. Contribution of each author: E.A. Saratovskikh — the idea of research, analysis of results and sources, writing the original text; E.A. Machigov — bioluminescent analysis and processing of primary experimental material; A.I. Yarmolenko — creation of a reaction scheme for photochemical decomposition; E.V. Stamm — collection of literature data and writing the literature review; S.K. Abilev — revision of the text, interpretation of the results of bioluminescent research.

Funding source. This work was carried out in accord with state assignments No. FFSG-2024-0012 (State registration No. 124020500019-2) and with subject No. 0092-2022-0003 of the State Order (No. 122022600163-7).

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Benbrook Ch.M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally // *Environ Sci Eur*. 2016. Vol. 28, N. 1. ID 3. doi: 10.1186/s12302-016-0070-0
2. Яблоков А.В. Ядовитая приправа. Проблемы применения ядохимикатов и пути экологизации сельского хозяйства. Москва: Мысль, 1990. 125 с.
3. Юданова Л.А. Пестициды в окружающей среде: Аналитический обзор. Новосибирск: Изд. ГПНТБ СО АН СССР, 1989. 140 с.
4. Dubois A., Lacouture L. Bilan de présence des micropolluants dans les milieux aquatiques continentaux Période 2007–2009. Commissariat général au développement durable — Service de l'observation et des statistiques, 2011.
5. Эмирова Д.Э. Оценка фитотоксического и цитотоксического действия гербицида раундап // *Ученые записки Крымского инженерно-педагогического университета. Серия: Биологические науки*. 2021. № 1. С. 27–34. EDN: EVIUCB
6. Эмирова Д.Э. Фитотоксическое влияние пестицида раундап на проростки Zea mays // *Человек-Природа-Общество: Теория и практика безопасности жизнедеятельности, экологии и валеологии*. 2018. № 4. С. 93–96. EDN: YSRCXR
7. Спиридонов Ю.Я., Ларина Г.Е., Протасова Л.Д., и др. Многолетнее применение общеистребительного гербицида раундап в Центральном регионе Нечерноземья // *Агрохимия*. 2010. № 2. С. 29–36. EDN: MBYNAT
8. epa.gov [Электронный ресурс]. Glyphosate. U.S. Environmental Protection Agency. Режим доступа: <https://www.epa.gov>
9. Кузнецова Е.М., Чмиль В.Д. Раундап: поведение в окружающей среде и уровни остатков // *Современные проблемы токсикологии*. 2010. № 1. С. 87–95.
10. Министерство природных ресурсов и экологии РФ, ФС по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды, ФГБУ «НПО «Тайфун», ИПМ. Состояние загрязнения пестицидами объектов природной среды Российской Федерации в 2017 году. Обнинск: ФГБУ «НПО «Тайфун», 2018. 89 с.
11. Алиев З.Г., Атовмян Л.О., Саратовских Е.А., и др. Синтез, структура и спектральные характеристики комплексов меди с производными пиколиновой кислоты // *Известия АН СССР. Сер. хим.* 1988. № 11. С. 2495–2501.
12. Саратовских Е.А. Синтез бидентантных комплексов 3,6-дихлор-пиколиновой кислоты // *Известия АН СССР. Сер. хим.* 1989. № 10. С. 2327–2329.
13. Dick R.E., Quinn J.P. Glyphosate — degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation // *Appl Microbiol Biotechnol*. 1995. Vol. 43, N. 3. P. 545–550. doi: 10.1007/BF00218464
14. Саратовских Е.А., Бокова А.И. Влияние гербицидов на популяцию почвообитающих коллембол // *Токсикологический вестник*. 2007. № 5. С. 17–23. EDN: ICDSGH
15. Саратовских Е.А., Козлова Н.Б., Байкова И.С., Штамм Е.В. Корреляция между токсическими свойствами загрязняющих веществ и их константами комплексообразования с АТФ // *Химическая физика*. 2008. Т. 27, № 11. С. 87–92. EDN: JSKNNB
16. Samsel A., Seneff S. Glyphosate's suppression of cytochrome p450 enzymes and amino acid biosynthesis by the gut microbiome: Pathways to modern diseases // *Entropy*. 2013. Vol. 15, N. 4. P. 1416–1463. doi: 10.3390/e15041416
17. Davoren M.J., Schiestl R.H. Glyphosate-based herbicides and cancer risk: a post-IARC decision review of potential mechanisms, policy and avenues of research // *Carcinogenesis*. 2018. Vol. 39, N. 10. P. 1207–1215. doi: 10.1093/carcin/bgy105.
18. Séralini G.-E., Clair E., Mesnage R., et al. Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize // *Food Chem Toxicol*. 2012. Vol. 50, N. 11. P. 4221–4231. doi: 10.1016/j.fct.2012.08.005

19. Медведев О.С. Раундап и его потенциальное влияние на здоровье человека // Комбикорма. 2017. № 4. С. 61–63. EDN: YMZNGJ
20. Кузьмина В.В., Тарлева А.Ф., Шептицкий В.А. Влияние гербицида раундап на активность пептидаз в кишечнике у рыб разных видов // Вопросы ихтиологии. 2017. Т. 57, № 5. С. 607–613. EDN: ZFQGYX doi: 10.7868/S0042875217050113
21. Филиппов А.А., Голованова И.Л., Смирнов М.С. Влияние гербицида Раундап на температурные характеристики мальтазы слизистой оболочки кишечника молоди рыб // Биология внутренних вод. 2019. № 2–1. С. 93–98. EDN: XUWPBS doi: 10.1134/S0320965219020050
22. Зернова Е.Е. Действие раундапа на процессы перекисного окисления липидов и белков у лабораторных мышей. Развитие научной, творческой и инновационной деятельности молодежи. В кн.: Материалы VII Всероссийской научно-практической заочной конференции молодых ученых. Лесниково: КГСА им. Т.С. Мальцева, 2015. С. 150–151.
23. Грин Д., Гольдбергер Р. Молекулярные аспекты жизни / пер с англ. Москва: Мир, 1968. 400 с.
24. Саратовских Е.А., Коршунова Л.А., Гвоздев Р.И., Куликов А.В. Ингибирование НАДН-оксидоредуктазной реакции гербицидами и фунгицидами различного строения // Известия АН. Сер. хим. 2005. № 5. С. 1284–1289. EDN: HSPAWR
25. Саратовских Е.А., Коршунова Л.А., Рощупкина О.С., Скурлатов Ю.И. Ингибирование НАДН-оксидоредуктазы соединениями металлов // Химическая физика. 2007. Т. 26, № 8. С. 46–53. EDN: IAZOMP
26. Zaahkook S.A.M., Abd El-Rasheid H.G., Ghanem M.H., et al. Physiological and oxidative stress biomarkers in the freshwater catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to pendimethalin-based herbicide and recovery with EDTA // Int J Adv Res. 2016. Vol. 4, N. 10. P. 243–264. doi:10.21474/IJAR01/1784.
27. Mesnage R., Ibragim M., Mandrioli D., et al. Comparative toxicogenomics of glyphosate and roundup herbicides by mammalian stem cell-based genotoxicity assays and molecular profiling in sprague-dawley rats // Toxicol Sci. 2022. Vol. 186, N. 1. P. 83–101. doi: 10.1093/toxsci/kfab143
28. Саратовских Е.А., Личина М.В., Психа Б.Л., и др. О характере взаимодействия ди- и полинуклеотидов с некоторыми пестицидами // Известия АН СССР. Сер. хим. 1989. № 9. С. 1984–1989.
29. Саратовских Е.А., Глазер В.М., Костромина Н.В., Котелевцев С.В. Генотоксичность пестицидов в тесте Эймса и их способность к образованию комплексов с ДНК // Экологическая генетика. 2007. Т. 5, № 3. С. 46–55. EDN: KXHLYT
30. Marques A., Guilherme S., Gaivão I., et al. Progression of DNA damage induced by a glyphosate-based herbicide in fish (*Anguilla anguilla*) upon exposure and post-exposure periods — Insights into the mechanisms of genotoxicity and DNA repair // Comp Biochem Physiol C. 2014. Vol. 166. P. 126–133. doi: 10.1016/j.cbpc.2014.07.009.
31. Marino M., Mele E., Viggiano A., et al. Pleiotropic outcomes of glyphosate exposure: from organ damage to effects on inflammation, cancer, reproduction and development // Int J Mol Sci. 2021. Vol. 22, N. 22. ID12606. doi: 10.3390/ijms222212606
32. Strilbyska O.M., Tsiumpala S.A., Kozachyshyn I.I., et al. The effects of low-toxic herbicide roundup and glyphosate on mitochondria // EXCLI J. 2022. Vol. 21. P. 183–196. doi: 10.17179/excli2021-4478
33. Benachour N., Seralini G.-E. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells // Chem Res Toxicol. 2009. Vol. 22, N. 1. P. 97–105. doi: 10.1021/tx800218n
34. Swanson N.L., Leu A.F., Abrahamson J., Wallet B.C. Genetically engineered crops, glyphosate and the deterioration on health in the United States of America // J Org Syst. 2014. Vol. 9. P. 6–37.
35. Ericsson A. A case-control study of non-Hodgkin lymphoma and exposure to pesticides // Cancer. 1999. Vol. 85, N. 6. P. 1353–1360. doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19990315)85:6<1353::AID-CNCR19>3.0.CO;2-1
36. EFSA. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate // EFSA J. 2015. Vol. 13, N. 11. ID 4302. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4302
37. Guyton K.Z., Loomis D., Grosse Y., et al. Carcinogenicity of tetra-chlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate // Lancet. 2015. Vol. 16, N. 5. P. 490–491. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70134-8
38. Илюшина Н.А., Аверьянова Н.С., Масальцев Г.В., Ревазова Ю.А. Сравнительное исследование генотоксической активности технических продуктов глифосата в микроядерном тесте *in vivo* // Токсикологический вестник. 2018. № 4. С. 24–28. EDN: XYGVRB doi: 10.36946/0869-7922-2018-4-24-28
39. Егорова О.В., Илюшина Н.А., Аверьянова Н.С., и др. Генотоксические свойства некоторых фосфорорганических пестицидов // Медицинская генетика. 2020. Т. 19, № 9. С. 72–73. EDN: LNQHPW doi: 10.25557/2073-7998.2020.09.72-73
40. Hishov A.S., Makarov D.A., Kish L.K. Toxic properties and maximum residue levels of glyphosate in food and feed products // J Agric Environ. 2023. Vol. 3, N. 31. P. 1–9. doi: 10.23649/jae.2023.31.3.002
41. Vakhterova Ya.V., Avdeeva L.V., Zimens M.E., et al. Roundup (glyphosate): Products of photochemical decomposition and their toxicity and genotoxicity // Sustain Chem Pharm. 2023. Vol. 32. ID100957. doi: 10.1016/j.scp.2022.100957
42. Bamba D., Atheba P., Robert D., et al. Photocatalytic degradation of the diuron pesticide // Environ Chem Lett. 2008. Vol. 6. P. 163–167. doi: 10.1007/s10311-007-0118-x
43. Feng J., Zheng Z., Luan J., et al. Degradation of diuron in aqueous solution by ozonation // J Environ Sci Health B. 2008. Vol. 43, N. 7. P. 576–587. doi: 10.1080/03601230802234450
44. Mahalakshmi M., Arabindoo B., Palanichamy M., et al. Photocatalytic degradation of carbofuran using semiconductor oxides // J Hazard Mater. 2007. Vol. 143, N. 1–2. P. 204–245. doi: 10.1016/j.jhazmat.2006.09.008
45. Assalin M.R., De Moraes S.G., Queiroz S.C.N., et al. Studies on degradation of glyphosate by several oxidative chemical processes: Ozonation, photolysis and heterogeneous photocatalysis // J Environ Sci Health B. 2010. Vol. 45, N. 1. P. 89–94. doi: 10.1080/03601230903404598
46. Roustan A., Aye M., De Meo M., Di Giorgio C. Genotoxicity of mixtures of glyphosate and atrazine and their environmental transformation products before and after photoactivation // Chemosphere. 2014. Vol. 108. P. 93–100. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.02.079
47. Manassero A., Passalia C., Negro A.C., et al. Glyphosate degradation in water employing the H₂O₂/UVC process // Water Res. 2010. Vol. 44, N. 13. P. 3875–3882. doi: 10.1016/j.watres.2010.05.004
48. Ленинджер А.Л. Биохимия / под ред. А.А. Баяева, Я.М. Варшавского. Москва: Мир, 1974. 957 с.
49. Свиридова Д.А., Мачигов Э.А., Игонина Е.В., и др. Изучение механизма генотоксичности диоксида с помощью lux-биосенсоров *Escherichia coli* // Радиационная биология. Радиоэкология. 2020. Т. 60, № 6. С. 595–603. EDN: OBOOSR doi: 10.31857/S0869803120060223

50. Мачигов Э.А., Игонина Е.В., Свиридова Д.А., и др. Генотоксическое действие радиомиметика параквата на бактерии *Escherichia coli* // Радиационная биология. Радиоэкология. 2022. Т. 62, № 3. С. 240–249. EDN: BCRAAY doi: 10.31857/S0869803122030055
51. Смирнова С.В., Абилов С.К., Игонина Е.В., и др. Влияние действия на индукцию ада-регулона алкилирующими веществами в клетках *Escherichia coli* // Генетика. 2018. Т. 54, № 8. С. 915–921. EDN: XVWOWD doi: 10.1134/S001667581808012X
52. Abilev S.K., Igonina E.V., Sviridova D.A., Smirnova S.V. Bacterial lux biosensors in genotoxicological studies // Biosensors. 2023. Vol. 13, N. 5. ID511. doi: 10.3390/bios13050511
53. Игонина Е.В., Марсова М.В., Абилов С.К. Lux-биосенсоры: скрининг биологически активных соединений на генотоксичность // Экологическая генетика. 2016. Т. 14, № 4. С. 52–62. EDN: XWJLMR doi: 10.17816/ecogen14452-62
54. Мельников Н.Н. Пестициды. Химия, технология и применение. Москва: Химия, 1987. 712 с.
55. Snyder C.A., Garte S.J., Sellakumar A.R., Albert R.E. Relationships between the levels of binding to DNA and the carcinogenic potencies in rat nasal mucosa for three alkylating agents // Cancer Lett. 1986. Vol. 33, N. 2. P. 175–181. doi: 10.1016/0304-3835(86)90022-4
56. Котова В.Ю., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. Lux-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса // Биотехнология. 2009. № 6. С. 16–25. EDN: OFVFXL doi: 10.1134/S0003683810080089
57. Завильгельский Г.Б., Котова В.Ю., Манухов И.В. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе lux-оперонов для детекции токсичных веществ // Химическая физика. 2012. Т. 31, № 10. С. 15–20. EDN: PDTYIF
58. Lebedev A.T., Mazur D.M., Artaev V.B., Tikhonov G.Y. Better screening of non-target pollutants in complex samples using advanced chromatographic and mass spectrometric techniques // Environ Chem Lett. 2020. Vol. 18. P. 1753–1760. doi: 10.1007/s10311-020-01037-2
59. Шолле В.Д., Розанцев Э.Г., Прокофьев А.И., и др. Исследование 2,2,6,6-тетраметил-4-оксо-1-пиперидильного радикала методом электронного парамагнитного резонанса // Известия АН СССР. Сер. хим. 1967. № 12. С. 2628–2631.
60. Джирард Дж.Е. Основы химии окружающей среды. Москва: Физматлит, 2008. 640 с.
61. Фомин В.М. Радикально-цепное окисление органических соединений и его торможение ингибиторами фенольного типа. Электронное учебное пособие. Нижний Новгород: ННГУ, 2010. 37 с.
62. Пискарев И.М., Иванова И.П., Трофимова С.В., и др. Образование пероксинитрита под действием излучения плазмы искрового разряда // Химия высоких энергий. 2014. Т. 48, № 3. С. 253–256. doi: 10.7868/S0023119714030132
63. Nathan C., Shiloh M.U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens // PNAS USA. 2000. Vol. 97, N. 16. P. 8841–8848. doi: 10.1073/pnas.97.16.8841

REFERENCES

1. Benbrook ChM. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci Eur.* 2016;28(1):3. doi: 10.1186/s12302-016-0070-0
2. Yablokov AV. *Poisonous seasoning. Problems of application of poison chemicals and ways of ecologization of agriculture.* Moscow: Mysl, 1990. 125 p. (In Russ.)
3. Yudanov LA. *Pesticides in the environment: analytical review.* Novosibirsk: GPNTB SB AS USSR, 1989. 140 p. (In Russ.)
4. Dubois A, Lacouture L. *Bilan de présence des micropolluants dans les milieux aquatiques continentaux Période 2007–2009. Commissariat général au développement durable — Service de l'observation et des statistiques*, 2011. (In French)
5. Emirova DE. Evaluation of the fitotoxic and cytotoxic effects of roundup herbicide. *Scientific notes of the Crimean Engineering and Pedagogical University. Series: Biological sciences.* 2021;(1):27–34. EDN: EVIUCB
6. Emirova DE. Phytotoxic effect of the pesticide roundup to seedlings of Zeamays. *Man-Nature-Society: Theory and practice of life safety, ecology and valeology.* 2018;(4):93–96. EDN: YSRCXR
7. Spiridonov YuYa, Larina GE, Protasova LD, et al. Long-term application of the herbicide roundup in the central Nonchernozemic zone. *Eurasian Soil Science.* 2010;(2):29–36. EDN: MBYNAT
8. epa.gov [Internet]. Glyphosate. U.S. Environmental Protection Agency. Available at: <https://www.epa.gov>
9. Kuznetsova EM, Chmil VD. Roundup: environmental behavior and residue levels. *Modern problems of toxicology.* 2010;(1):87–95. (In Russ.)
10. Ministry of natural resources and ecology of the Russian Federation, Federal Service for hydrometeorology and environmental monitoring, Federal State Budgetary Institution "NPO „Typhoon”, IPM. *State of pesticide pollution of natural environment objects of the Russian Federation in 2017.* Obninsk: FGBU NPO Typhoon, 2018. 89 p. (In Russ.)
11. Aliev ZG, Atovmyan LO, Saratovskikh EA, et al. Synthesis, structure and spectral characteristics of copper complexes with picolinic acid derivatives. *Izvestia AS USSR. Series of chemical sciences.* 1988;(11):2495–2501. (In Russ.)
12. Saratovskikh EA. Synthesis of bidentate complexes of 3,6-dichloro-picolinic acid. *Izvestia AS USSR. Series of chemical sciences.* 1989;(10):2327–2329. (In Russ.)
13. Dick RE, Quinn JP. Glyphosate — degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1995;43(3):545–550. doi: 10.1007/BF00218464
14. Saratovskikh EA, Bokova AI. Influence of herbicides on the population of soil-dwelling collembola. *Toxicological review.* 2007;(5): 17–23. EDN: ICDSGH
15. Saratovskikh EA, Kozlova NB, Baikova IS, Stamm EA. Correlation between toxic properties of pollutants and their complexation constants with ATP. *Russian Journal of Physical Chemistry B.* 2008;27(11):87–92. (In Russ.) EDN: JSKNNB
16. Samsel A, Seneff S. Glyphosate's suppression of cytochrome p450 enzymes and amino acid biosynthesis by the gut microbiome: Pathways to modern diseases. *Entropy.* 2013;15(4):1416–1463. doi: 10.3390/e15041416
17. Davoren MJ, Schiestl RH. Glyphosate-based herbicides and cancer risk: a post-IARC decision review of potential mechanisms, policy and avenues of research. *Carcinogenesis.* 2018;39(10):1207–1215. doi: 10.1093/carcin/bgy105.

18. Séralini G-E, Clair E, Mesnage R, et al. Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(11):4221–4231. doi: 10.1016/j.fct.2012.08.005
19. Medvedev OS. Roundup and its potential impact on human health. *Combi-feeds.* 2017;(4):61–63. (In Russ.) EDN: YMZNGJ
20. Kuz'mina VV, Tarleva AF, Sheptitskii VA. Influence of roundup herbicide on the activities of peptidases in the intestines of various fish species. *Journal of ichthyology.* 2017;57(5):607–613. EDN: ZFQGYX doi: 10.7868/S0042875217050113
21. Filippov AA, Golovanova IL, Smirnov MS. Effect of roundup herbicide on the temperature characteristics of maltase of the intestinal mucosa in juvenile fish. *Inland Water Biology.* 2019;(2–1):93–98. EDN: XUWPBS doi: 10.1134/S0320965219020050
22. Zernova EE. Effect of Roundup on the processes of lipid and protein peroxidation in laboratory mice. Development of scientific, creative and innovative activity of youth. In: *Proceedings of the VII All-Russian science and practice extramural conference of young scientists.* Lesnikovo: T.S. Maltsev KGSA, 2015. P. 150–151. (In Russ.)
23. Green D, Goldberger R. Molecular aspects of life. Transl. from Eng. Moscow: Mir, 1968. 400 p. (In Russ.)
24. Saratovskikh EA, Korshunova LA, Gvozdev RI, Kulikov AV. Inhibition of the nicotinamide adenine dinucleotide-oxidoreductase reaction by herbicides and fungicides of various structures. *Russian Chemical Bulletin.* 2005;(5):1284–1289. EDN: HSPAWR
25. Saratovskikh EA, Korshunova LA, Roschupkina OS, Skurlatov Yul. Inhibition of NADH-oxidoreductase by metal compounds. *Russian Journal of Physical Chemistry B.* 2007;26(8):46–53. (In Russ.) EDN: IAZOMP
26. Zaahkook SAM, Abd El-Rasheid HG, Ghanem MH, et al. Physiological and oxidative stress biomarkers in the freshwater catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to pendimethalin-based herbicide and recovery with EDTA. *Int J Adv Res.* 2016;4(10):243–264. doi: 10.21474/IJAR01/1784.
27. Mesnage R, Ibragim M, Mandrioli D, et al. Comparative toxicogenomics of glyphosate and roundup herbicides by mammalian stem cell-based genotoxicity assays and molecular profiling in sprague-dawley rats. *Toxicol Sci.* 2022;186(1):83–101. doi: 10.1093/toxsci/kfab143
28. Saratovskikh EA, Lichina MV, Psyha BL, et al. On the nature of interaction of di- and polynucleotides with some pesticides. *Izvestia AS USSR. Series of chemical sciences.* 1989;(9):1984–1989. (In Russ.)
29. Saratovskikh EA, Glaser VM, Kostromina NYu, Kotelevtsev SV. Genotoxicity of the pesticides in Ames test and the possibility to formate the complexes with DNA. *Ecological genetics.* 2007;5(3):46–55. EDN: KXHLYT
30. Marques A, Guilherme S, Gaivão I, et al. Progression of DNA damage induced by a glyphosate-based herbicide in fish (*Anguilla anguilla*) upon exposure and post-exposure periods — Insights into the mechanisms of genotoxicity and DNA repair. *Comp Biochem Physiol C.* 2014;166:126–133. doi: 10.1016/j.cbpc.2014.07.009.
31. Marino M, Mele E, Viggiano A, et al. Pleiotropic outcomes of glyphosate exposure: from organ damage to effects on inflammation, cancer, reproduction and development. *Int J Mol Sci.* 2021;22(22):12606. doi: 10.3390/ijms222212606
32. Strilbyska OM, Tsiumpala SA, Kozachyshyn II, et al. The effects of low-toxic herbicide roundup and glyphosate on mitochondria. *EXCLI J.* 2022;21:183–196. doi: 10.17179/excli2021-4478
33. Benachour N, Seralini G-E. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chem Res Toxicol.* 2009;22(1):97–105. doi: 10.1021/tx800218n
34. Swanson NL, Leu AF, Abrahamson J, Wallet BC. Genetically engineered crops, glyphosate and the deterioration on health in the United States of America. *J Org Syst.* 2014;9:6–37.
35. Ericsson A. A case-control study of non-Hodgkin lymphoma and exposure to pesticides. *Cancer.* 1999;85(6):1353–1360. doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19990315)85:6<1353::AID-CNCR19>3.0.CO;2-1
36. EFSA. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA J.* 2015;13(11):4302. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4302
37. Guyton KZ, Loomis D, Grosse Y, et al. Carcinogenicity of tetra-chlorovinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet.* 2015;16(5):490–491. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70134-8
38. Ilyushina NA, Averianova NS, Masaltsev GV, Revazova YuA. Comparative investigation of genotoxic activity of glyphosate technical products in the micronucleus test *in vivo*. *Toxicological review.* 2018;(4): 24–28. EDN: XYGVRB doi: 10.36946/0869-7922-2018-4-24-28
39. Egorova OV, Ilyushina NA, Averianova NS, et al. Genotoxic properties of some organophosphate pesticides. *Medical Genetics.* 2020; 19(9):72–73. EDN: LNQHPW doi: 10.25557/2073-7998.2020.09.72-73
40. Hishov AS, Makarov DA, Kish LK. Toxic properties and maximum residue levels of glyphosate in food and feed products. *J Agric Environ.* 2023;3(31):1–9. doi: 10.23649/jae.2023.31.3.002
41. Vakhterova YaV, Avdeeva LV, Zimens ME, et al. Roundup (glyphosate): Products of photochemical decomposition and their toxicity and genotoxicity. *Sustain Chem Pharm.* 2023;32:100957. doi: 10.1016/j.scp.2022.100957
42. Bamba D, Atheba P, Robert D, et al. Photocatalytic degradation of the diuron pesticide. *Environ Chem Lett.* 2008;6:163–167. doi: 10.1007/s10311-007-0118-x
43. Feng J, Zheng Z, Luan J, et al. Degradation of diuron in aqueous solution by ozonation. *J Environ Sci Health B.* 2008;43(7):576–587. doi: 10.1080/03601230802234450
44. Mahalakshmi M, Arabindoo B, Palanichamy M, et al. Photocatalytic degradation of carbofuran using semiconductor oxides. *J Hazard Mater.* 2007;143(1–2):204–245. doi: 10.1016/j.jhazmat.2006.09.008
45. Assalin MR, De Moraes SG, Queiroz SCN, et al. Studies on degradation of glyphosate by several oxidative chemical processes: Ozonation, photolysis and heterogeneous photocatalysis. *J Environ Sci Health B.* 2010;45(1):89–94. doi: 10.1080/03601230903404598
46. Roustan A, Aye M, De Meo M, Di Giorgio C. Genotoxicity of mixtures of glyphosate and atrazine and their environmental transformation products before and after photoactivation. *Chemosphere.* 2014;108:93–100. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.02.079
47. Manassero A, Passalia C, Negro AC, et al. Glyphosate degradation in water employing the H₂O₂/UVC process. *Water Res.* 2010;44(13):3875–3882. doi: 10.1016/j.watres.2010.05.004
48. Lehninger AL. *Biochemistry.* Ed. by Baev AA, Varshavsky YaM. Moscow: Mir, 1974. 957 p. (In Russ.)
49. Sviridova DA, Machigov EA, Igonina EV, et al. Study of the mechanism of dioxidine genotoxicity using lux-biosensors of *Escherichia coli*. *Radiation biology. Radioecology.* 2020;60(6):595–603. EDN: OBOOSR doi: 10.31857/S0869803120060223
50. Machigov EA, Igonina EV, Sviridova DV, et al. Genotoxic effect of paraquat radiomimetic on *Escherichia coli* bacteria. *Radiation*

biology. Radioecology. 2022;62(3):240–249. EDN: BCRAAY
doi: 10.31857/S0869803122030055

51. Smirnova SV, Abilev SK, Igonina EV, et al. The effect of deuterium on induction of the ada-regulon with alkylating compounds in the cells of *Escherichia coli*. *Russian Journal of Genetics.* 2018;54(8): 915–921. EDN: XWOWD doi: 10.1134/S001667581808012X

52. Abilev SK, Igonina EV, Sviridova DA, Smirnova SV. Bacterial lux biosensors in genotoxicological studies. *Biosensors.* 2023;13(5):511. doi: 10.3390/bios13050511

53. Igonina EV, Marsova MV, Abilev SK. Lux biosensors: screening biologically active compounds for genotoxicity. *Ecological genetics.* 2016;14(4):52–62. EDN: XWJLMR doi: 10.17816/ecogen14452-62

54. Melnikov NN. *Pesticides. Chemistry, technology and application.* Moscow: Khimiya, 1987. 712 p. (In Russ.)

55. Snyder CA, Garte SJ, Sellakumar AR, Albert RE. Relationships between the levels of binding to DNA and the carcinogenic potencies in rat nasal mucosa for three alkylating agents. *Cancer Lett.* 1986;33(2):175–181. doi: 10.1016/0304-3835(86)90022-4

56. Kotova VY, Manukhov IV, Zavlilgelskii GB. Lux-biosensors for detection of SOS-response, heat shock, and oxidative stress. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2009;(6):16–25. EDN: OFVFXL doi: 10.1134/S0003683810080089

57. Zavlilgelsky GB, Kotova VY, Manukhov IV. Sensor bioluminescent systems based on lux operons for detection of toxic substances. *Russian Journal of Physical Chemistry B.* 2012;31(10): 15–20. EDN: PDTYIF (In Russ.)

58. Lebedev AT, Mazur DM, Artaev VB, Tikhonov GY. Better screening of non-target pollutants in complex samples using advanced chromatographic and mass spectrometric techniques. *Environ Chem Lett.* 2020;18:1753–1760. doi: 10.1007/s10311-020-01037-2

59. Scholle VD, Rozantsev EG, Prokofiev AI, et al. Study of 2,2,6,6-tetramethyl-4-oxo-1-piperidyl radical by electron paramagnetic resonance method. *Izvestia AS USSR. Series of chemical sciences.* 1967;(12):2628–2631. (In Russ.)

60. Girard JE. *Fundamentals of environmental chemistry.* Moscow: Fizmatlit, 2008. 640 p. (In Russ.)

61. Fomin VM. *Radical-chain oxidation of organic compounds and its inhibition by phenol type inhibitors. Electronic textbook.* Nizhny Novgorod: NNGU, 2010. 37 p. (In Russ.)

62. Piskarev IM, Ivanova IP, Trofimova SV, et al. Formation of peroxynitrite induced by spark plasma radiation. *High Energy Chemistry.* 2014;48(3):253–256. doi: 10.7868/S0023119714030132

63. Nathan C, Shiloh MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *PNAS USA.* 2000;97(16):8841–8848. doi: 10.1073/pnas.97.16.8841

ОБ АВТОРАХ

***Елена Анатольевна Саратовских**, д-р биол. наук;
адрес: Россия, 142432, Московская обл., Черноголовка,
пр. Семенова, д. 1; ORCID: 0000-0003-1841-0641;
e-Library SPIN: 4183-7660; e-mail: easar@icp.ac.ru

Эльбек Альбертович Мачигов; ORCID: 0000-0003-2811-6374;
e-mail: elbek_machigov@mail.ru

Андрей Иванович Ярмоленко; ORCID: 0009-0008-2736-4118;
e-mail: andr.yar@bk.ru

Елена Валентиновна Штамм, д-р хим. наук;
ORCID: 0000-0003-2537-2751; e-mail: ekochem@yandex.ru

Серикбай Каримович Абилов, д-р биол. наук;
ORCID: 0000-0001-8636-6828; Scopus Author ID: 8723003000;
eLibrary SPIN: 4692-4311; e-mail: abilev@vigg.ru

AUTHORS' INFO

***Elena A. Saratovskikh**, Dr. Sci. (Biology);
address: 1 Semyonova av., 142432, Chernogolovka, Moscow
Region, Russia; ORCID: 0000-0003-1841-0641;
e-Library SPIN: 4183-7660; e-mail: easar@icp.ac.ru

Elbek A. Machigov; ORCID: 0000-0003-2811-6374;
e-mail: elbek_machigov@mail.ru

Andrey I. Yarmolenko; ORCID: 0009-0008-2736-4118;
e-mail: andr.yar@bk.ru

Elena V. Shtamm, Dr. Sci. (Chemistry);
ORCID: 0000-0003-2537-2751; e-mail: ekochem@yandex.ru

Serikbai K. Abilev, Dr. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0001-8636-6828; Scopus Author ID: 8723003000;
eLibrary SPIN: 4692-4311; e-mail: abilev@vigg.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author