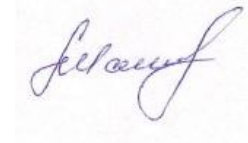


*На правах рукописи*



ШАЛЫГИН

Максим Владимирович

РОЛЬ ПРОТЕИНАЗ ОБЪЕКТОВ ПИТАНИЯ И ЭНТЕРАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ В  
ТЕМПЕРАТУРНЫХ АДАПТАЦИЯХ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ РЫБ РАЗНЫХ  
ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ГРУПП

03.02.08 – экология (биология)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Борок – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Ярославская государственная сельскохозяйственная академия»

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор  
**Кузьмина Виктория Владимовна**

**Официальные оппоненты:**

**Извекова Галина Игоревна**

доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, главный научный сотрудник лаборатории экологической паразитологии.

**Пономарев Василий Иванович**

кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Коми УрО РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории ихтиологии и гидробиологии.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Кар НЦ РАН

Защита состоится «17» декабря 2013 г. в 10 часов на заседании специализированного ученого совета ДМ 002.036.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН по адресу: 152742, Ярославская обл., Некоузский р-н, п. Борок  
Тел./факс: (48547) 24042  
e-mail: dissovet@ibiw.yaroslavl.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН.

Автореферат разослан «\_\_\_» ноября 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета



Л.Г.Корнева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Проблема адаптации животных к различным факторам среды является одной из актуальных задач экологии. Как известно, синэкологические связи животных, в том числе рыб, в значительной степени базируются на эффективности их трофических взаимоотношений (Одум, 1975; Поддубный, 1971; Розенберг и др., 2000). В последние десятилетия показано, что эффективность трофических взаимоотношений, связанных с переносом вещества с одного трофического уровня на другой, во многом зависит от особенностей функционирования ферментных систем трофических партнеров и энтеральной микробиоты (Уголев, 1980, 1985; Кузьмина, 2005). При этом особая роль принадлежит протеиназам (Лысенко и др., 2011). Показано, что тотальная активность протеиназ в целом организме объектов питания рыб, относящихся к разным таксономическим группам, может в 5–10 раз превышать тотальную активность желудочных протеиназ консумента за счет индуцированного аутолиза, происходящего в тканях жертвы. При исследовании активности ферментов, функционирующих в кишечнике рыб, вклад ферментов объектов питания в процессы пищеварения рыб не выявлен (Уголев, Кузьмина, 1988; Кузьмина, 1993, 2000, 2005; Кузьмина, Скворцова, 2002; Kuz'mina, Golovanova, 2004; Kuz'mina, 2008). Вклад ферментов симбионтной микрофлоры в процессы пищеварения рыб в настоящее время из-за технических трудностей корректно оценить невозможно. Вместе с тем известно, что многие штаммы микроорганизмов продуцируют гидролазы, участвующие в симбионтном пищеварении (Лубянскене и др., 1989; Шивокене, 1989; Кузьмина, 2005; Извекова, 2008; Извекова, Соловьев, 2012). Также установлено, что состав энтеральной микробиоты рыб близок таковому среды обитания. Микроорганизмы, поступая в пищеварительный тракт в момент начала экзогенного питания личинок, формируют индигенную микрофлору, а затем в процессе развития рыб – транзиторную микрофлору, поступающую в пищеварительный тракт рыб с пищей или водой на протяжении всего онтогенеза (Buddington et al., 1997; Kolkovski et al., 1993; Kolkovski, 2002; Кузьмина, 2005). Поскольку видовой состав энтеральной микробиоты рыб в значительной мере зависит от биотопа, на котором проходил личиночный этап их развития, характеристики ферментов микробиоты у рыб одного и того же вида могут быть различными. При этом значительное влияние на активность ферментов потенциальных объектов питания и энтеральной микробиоты может оказывать температура.

Хорошо известно, что у рыб, как у эктотермных животных, скорость физиолого-биохимических процессов зависит от температуры (Строганов, 1962; Шульман, 1972; Hochachka, Somero, 1976, 2002; Шатуновский, 1980; Уголев, Кузьмина, 1993; Озернюк, 2000; Неваленный и др., 2003; Немова, Высоцкая, 2004; Кузьмина, 2005 и др.). Однако ранее в большинстве работ активность пищеварительных ферментов у рыб исследовалась при стандартной, «летней», температуре. Наиболее полно влияние температуры на активность пищеварительных ферментов изучено на примере гидролаз, осуществляющих мембранное пищеварение (Кузьмина, 1985, 2005; Пономарев, 1993, 1995; Gelman et al., 1992, 2008; Уголев, Кузьмина, 1993; Ugolev, Kuz'mina, 1993; Неваленный и др., 2003; Kuz'mina, 2008 и др.). Было показано, что в условиях низкой температуры эффективно функционировать могут только ферменты консументов, обеспечивающие начальные этапы гидролиза биополимеров, в частности, панкреатическая по происхождению  $\alpha$ -амилаза (Кузьмина, 1985, 2005; Пономарев, 1993) и протеиназы, синтезирующиеся в желудке рыб (Кузьмина, 1990). Поскольку протеиназы, функционирующие в кишечнике консументов, не обладали адаптациями к низкой температуре, было высказано предположение о возможной компенсаторной роли ферментов объектов питания и энтеральной микробиоты (Уголев, Кузьмина, 1993). Вместе с тем сведения, касающиеся

влияния температуры на ферментные системы потенциальных объектов питания рыб (Кузьмина, 1999) и энтеральной микробиоты, до начала данной работы были фрагментарными (Кузьмина, Первушина, 2003, 2004).

**Цель работы** – изучение температурно-зависимых характеристик протеиназ, функционирующих в кишечнике пресноводных костистых рыб, относящихся по типу питания к разным экологическим группам (ферменты слизистой оболочки, объектов питания рыб и энтеральной микробиоты).

**Задачи исследования:**

1. Сравнить активность трипсина- и химотрипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты у рыб разных видов, относящихся по типу питания к планкто-, бенто- и ихтиофагам;
2. Изучить влияние температурного фактора на активность трипсина- и химотрипсиноподобных протеиназ химуса, слизистой оболочки кишечника и энтеральной микробиоты у рыб, относящихся по типу питания к разным экологическим группам, в широком диапазоне температур;
3. Рассчитать температурные коэффициенты  $Q_{10}$  и величины энергии активации трипсина- и химотрипсиноподобных протеиназ химуса, слизистой оболочки кишечника и энтеральной микробиоты у рыб, относящихся по типу питания к разным экологическим группам;
4. Оценить влияние температуры на активность, коэффициенты  $Q_{10}$  и величины энергии активации казеинлитических и гемоглобинлитических протеиназ потенциальных объектов питания рыб-ихтиофагов;
5. Исследовать активность трипсина- и химотрипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты, а также влияние температуры на коэффициенты  $Q_{10}$  и значения величин энергии активации протеиназ у карпа, выращенного в условиях аквакультуры в норме и под влиянием препаратов, влияющих на физиологическое состояние рыб.

**Научная новизна работы.** Впервые при сопоставлении в единых методических условиях температурно-зависимых характеристик ферментов (активность, температурная зависимость, температурные коэффициенты  $Q_{10}$  и величины энергии активации), – трипсина- и химотрипсиноподобных протеиназ химуса, слизистой оболочки кишечника и энтеральной микробиоты у ряда массовых видов рыб, – а также активности и температурных характеристик казеинлитических и гемоглобинлитических протеиназ у потенциальных объектов питания ихтиофагов выявлена возможность адаптивных изменений свойств протеиназ объектов питания и энтеральной микробиоты. Впервые выявлены различия температурных характеристик трипсина- и химотрипсиноподобных протеиназ, функционирующих в составе химуса у рыб одного вида, принадлежащих по типу питания к разным экологическим группам. На примере карпа, иммунизированного авирулентной культурой *Aeromonas hydrophila*, впервые установлено стимулирующее влияние антибактериального препарата Антибак-100 и ингибирующее влияние пробиотика СУБ-ПРО на активность протеиназ в диапазоне температур жизнедеятельности рыб.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Выполненная работа направлена на решение теоретических проблем трофологии гидробионтов. Полученные результаты вносят вклад в раскрытие закономерностей трофических взаимоотношений рыб и их объектов питания, а также понимание роли ферментов жертв и энтеральной микробиоты в температурных адаптациях пищеварительной системы рыб, способствующих эффективному питанию консументов, особенно ихтиофагов, при низкой температуре. Изучение температурных характеристик ферментов позволяет выявить внутривидовые различия рыб по типу питания и установить их принадлежность к соответствующей экологической группе. Полученные данные могут быть использованы для подбора видов рыб, наиболее перспективных для рыборазведения в бореальной зоне.

**Фактический материал.** В работе представлены данные по уровню протеолитической активности слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты у 9 видов рыб, относящихся к 4 семействам: щука *Esox lucius* L., налим *Lota lota* (L.), окунь *Perca fluviatilis* L., судак *Stizostedion lucioperca* (L.), карп *Cyprinus carpio* L., лещ *Abramis brama* (L.), синец *Abramis ballerus* (L.), плотва *Rutilus rutilus* (L.) и карась *Carassius carassius* (L.). Всего исследовано 333 экз. рыб (14112 определений активности протеиназ и гликозидаз). В качестве потенциальных объектов питания типичных и факультативных ихтиофагов исследована молодь 4-х видов рыб, относящихся к 4 семействам: стерлядь *Acipenser ruthenus* L., черноморско-каспийская тюлька *Clupeonella cultriventris* (Nordmann), плотва *Rutilus rutilus* (L.) и окунь *Perca fluviatilis* L. Всего исследовано 70 экз. рыб (560 определений активности протеиназ).

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Протеиназы энтеральной микробиоты у рыб разных видов, относящихся по типу питания к планкто-, бенто- и ихтиофагам, а также тканей потенциальных объектов питания ихтиофагов способны наравне с ферментами консументов участвовать в гидролизе белковых компонентов пищи.
2. Температурные характеристики протеиназ химуса у бентофагов и ихтиофагов, питающихся в придонных слоях воды, значительно отличаются от таковых пелагических рыб. Характер температурной зависимости гемоглобинлитических протеиназ химуса у рыб одного и того же вида зависит от принадлежности рыб к пелагической или литоральной группе. Адаптивные изменения энтеральной микробиоты реализуются за счет трипсиноподобных протеиназ.
3. Адаптивные изменения температурно-зависимых характеристик протеиназ объектов питания рыб и энтеральной микробиоты могут компенсировать низкую активность ферментов слизистой оболочки кишечника, что способствует уменьшению энергетических затрат консументов на синтез собственных пищеварительных гидролаз.

**Апробация работы.** Материалы были представлены и доложены на конференциях: «НИРС – первая ступень в науку» (Ярославль, 2008); «Ярославль на пороге тысячелетия». (Ярославль, 2009); XIII международная научно-практическая конференция «Инновационные направления развития АПК и повышение конкурентоспособности предприятий, отраслей и комплексов – вклад молодых учёных» (Ярославль, 2010); Всероссийская конференция с международным участием «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов» (Петрозаводск, 2010); Всероссийская конференция с международным участием «Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов» (Борок, РГАУ-МСХА им. К.А.Тимирязева, 2011); XVIII Всероссийская молодежная научная конференция «Актуальные проблемы биологии и экологии» (Сыктывкар, 2011); Материалы всероссийской конференции с международным участием «Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптаций гидробионтов» (Борок, 2012); VIII Всероссийская конференция с международным участием «Механизмы функционирования висцеральных систем», посвященная 220-летию со дня рождения К.М. Бэра (Санкт-Петербург, 2012).

**Личный вклад автора.** Сбор материала, определение активности и температурной зависимости ферментов, расчет температурных коэффициентов  $Q_{10}$  и величин энергии активации, а также статистическая обработка материала выполнены лично автором в ФГБУН Институте биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН. Доля личного участия автора в совместных публикациях пропорциональна числу авторов.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из 4 глав, общего заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 178 страницах машинописи, проиллюстрирована 13 таблицами и 12 рисунками. Список литературы включает 300 наименований, из которых 147 на иностранных языках.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую благодарность д.б.н., проф. В.В. Кузьминой за руководство диссертационной работой на всех этапах ее выполнения, д.с.-

х.н, проф. В.Ю. Лобкову за доброжелательную поддержку, д.б.н. Ю.В. Герасимову за предоставление возможности проведения экспериментальных работ в лаб. экологии рыб ФГБУН Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, к.б.н., доц. Е.Г. Скворцовой за сотрудничество при оформлении некоторых статей и докладов, к.б.н. Д.В. Микрякову за совместное проведение ряда экспериментов, к.б.н. Д.В. Гариной за помощь при оформлении диссертации, а также сотрудникам лаб. экологии рыб ФГБУН Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН и лаб. генетического маркирования ФГБОУ ВПО «Ярославская ГСХА» за помощь во время проведения экспериментов и обсуждение материалов диссертации.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

В главе «Обзор литературы» рассмотрены подходы к изучению пищевых взаимоотношений рыб, описаны экологические группы рыб по типу питания и охарактеризован спектр питания рыб разных экологических групп. Приведены данные, касающиеся содержания основных энергетических компонентов в пище рыб разных экологических групп. Представлена краткая характеристика процессов пищеварения. Описаны ферментные системы, обеспечивающие гидролиз белковых компонентов пищи у рыб, различающихся по характеру питания. Дана характеристика протеиназ потенциальных объектов питания рыб. Рассмотрено влияние типа и интенсивности питания на активность протеиназ у рыб. Подробно описано влияние температуры и pH на активность пищеварительных ферментов у рыб. Охарактеризованы видовой состав, численность и протеолитическая активность микробиоты пищеварительного тракта, а также зависимость этих показателей от спектра питания рыб и от температуры. Приведены сведения о микробиоте водных беспозвоночных и ее ферментативной активности.

### **2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Работа проведена в 2007–2012 гг. в ФГБУН Институте биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН. Материал собран в Рыбинском водохранилище и р. Волга, а также в прибрежных прудах, или получен на экспериментальной базе ИБВВ РАН «Сунога» и ООО «Рыбхоз Нарские острова» Московской обл. В качестве консументов исследовали рыб, относящихся по типу питания к разным экологическим группам: типичные ихтиофаги (щука, судак), ихтиофаги-факультативные бентофаги (налим, окунь), бентофаги (каarp, лещ, плотва, карась) и планктофаги (синец). В качестве потенциальных объектов питания исследовали молодь бентофагов (стерлядь, плотву и окуня) и планктофага – черноморско-каспийскую тюльку. Определяли уровень активности и характеристики (температурную зависимость, температурные коэффициенты  $Q_{10}$  и величины энергии активации) трипсино- и химотрипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты у консументов, а также уровень активности и характеристики (температурную зависимость, температурные коэффициенты  $Q_{10}$  и величины энергии активации) казеин- и гемоглоблилитических протеиназ в целом организме потенциальных объектов питания.

Активность трипсиноподобных (преимущественно активность трипсина), КФ 3.4.21.4) и химотрипсиноподобных (преимущественно активность химотрипсина, КФ 3.4.21.1) протеиназ, а также казеинлитическую (преимущественно активность катепсина D, КФ 3.4.23.5) и гемоглоблилитическую активность (преимущественно активность катепсинов B, КФ 3.4.22.1, D, КФ 3.4.23.5 и E, КФ 3.4.23.34) определяли по приросту тирозина методом Ансона (Anson, 1938) в некоторой модификации (Кузьмина, Егорова,

1988). Амилолитическую активность (активность  $\alpha$ -амилазы, КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы, КФ 3.2.1.3 и ферментов группы мальтаз, КФ 3.2.1.20) определяли при помощи метода Нельсона в модификации А.М. Уголева и Н.Н. Иезуитовой (1969). Сбор материала для микробиологического анализа кишечника рыб проводили по методу Матейса (Mattheis, 1964), а также Рихтера-Отто и Фермана (Richter-Otto, Fehrmann, 1956). Для оценки влияния препаратов Антибак-100 и СУБ ПРО, применяемых для профилактики аэромоназа, карпов иммунизировали авирулентной агаровой культурой *Aeromonas hydrophila* (1 млрд. микробных тел на особь массой 150 г). Антибак-100 и СУБ ПРО вводили с кормом согласно инструкции (Гаврилин и др., 2010).

Результаты обработаны статистически при помощи стандартного пакета программ (Microsoft Office' 2007, приложение Excel). Степень различия средних арифметических двух рядов распределения рассчитывали с помощью t-критерия Стьюдента для малых выборок при  $p < 0.05$  (Бейли, 1962).

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1. Активность протеиназ слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микрофлоры у рыб, относящихся по типу питания к разным экологическим группам

*Активность трипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки кишечника и химуса у рыб разных видов.* У типичных и факультативных ихтиофагов активность трипсиноподобных протеиназ при 20°C колеблется от  $2.23 \pm 0.06$  у судака до  $7.57 \pm 0.17$  мкмоль/(г•мин) у щуки, при 0°C – от  $0.44 \pm 0.07$  у окуня до  $2.29 \pm 0.13$  мкмоль/(г•мин) у щуки. Относительная активность трипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки при 0°C (от таковой при 20°C, принятой за 100%) у налима составила 32.8, у щуки – 30.3, у судака – 28.3, у окуня – 12.4%. При изучении активности протеиназ химуса установлено, что при 20°C максимальный уровень ферментативной активности характерен для налима –  $6.57 \pm 0.20$  мкмоль/(г•мин). У судака, щуки и окуня активность протеиназ была ниже в 2.5, 3.1 и в 3.4 раза соответственно. При 0°C относительная активность трипсиноподобных протеиназ химуса у щуки составила 17, у судака – 27, у окуня – 46.6, у налима – 46.3% от уровня ферментативной активности при 20°C.

В группе планкто- и бентофагов при 20°C минимальная активность трипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки кишечника выявлена у карася, максимальная у плотвы –  $1.64 \pm 0.11$  и  $8.36 \pm 0.13$  мкмоль/(г•мин) соответственно. При 0°C ферментативная активность колеблется от  $0.50 \pm 0.07$  у карася до  $1.15 \pm 0.08$  мкмоль/(г•мин) у плотвы. Относительная активность трипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки кишечника при 0°C у карася составила 30.5, у леща – 26.8, у синца – 25.2, у плотвы – 13.8%. Минимальный уровень активности протеиназ химуса при 20°C характерен для синца, максимальный для леща –  $1.40 \pm 0.18$  и  $6.56 \pm 0.54$  мкмоль/(г•мин) соответственно. При 0°C относительная активность трипсиноподобных протеиназ химуса у плотвы составила 45, у леща – 30.8, у карася – 21.8, у синца – 15% от уровня ферментативной активности при 20°C.

*Активность химотрипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки кишечника и химуса у рыб разных видов.* У типичных и факультативных ихтиофагов активность химотрипсиноподобных протеиназ ниже таковой трипсиноподобных протеиназ. При 20°C минимальная активность протеиназ слизистой оболочки кишечника выявлена у окуня, максимальная – у щуки  $0.90 \pm 0.062$  и  $4.8 \pm 0.09$  мкмоль/(г•мин), при 0°C –  $0.25 \pm 0.041$  и  $3.7 \pm 0.08$  мкмоль/(г•мин), у судака и щуки соответственно. Относительная активность химотрипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки при 0°C у окуня составила 62.2, у щуки – 55.2, у налима – 28, у судака – 23.4%. Максимальный уровень активности протеиназ химуса при 20°C характерен для налима –  $2.29 \pm 0.21$  мкмоль/(г•мин). При 0°C

относительная активность химотрипсиноподобных протеиназ химуса у щуки составила 53.8, у остальных видов – 42–44% от уровня активности при 20°С, принятой за 100%.

В группе планкто- и бентофагов при 20°С минимальная активность протеиназ слизистой оболочки выявлена у карася, максимальная – у плотвы –  $0.19 \pm 0.03$  и  $3.32 \pm 0.10$  мкмоль/(г•мин), при 0°С – у карася и леща:  $0.13 \pm 0.01$  и  $1.08 \pm 0.04$  мкмоль/(г•мин) соответственно. При этом относительная активность химотрипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки при 0°С у карася составила 68.4, у синца – 60, у леща – 57.4, у плотвы – 27.1% от уровня активности при 20°С. Минимальный уровень химотрипсиноподобных протеиназ химуса при 20°С характерен для синца, максимальный – для плотвы:  $0.14 \pm 0.02$  и  $1.42 \pm 0.07$  мкмоль/(г•мин) соответственно. При 0°С относительная активность химотрипсиноподобных протеиназ химуса у синца составила 31.1 %, у остальных видов – 42–47% от уровня ферментативной активности при 20°С.

**Активность трипсиноподобных и химотрипсиноподобных протеиназ энтеральной микробиоты у рыб разных видов.** У типичных и факультативных ихтиофагов при 20°С активность трипсиноподобных протеиназ энтеральной микробиоты колеблется от  $0.36 \pm 0.06$  у окуня до  $3.58 \pm 0.12$  мкмоль/(г•мин) у налима, при 0°С – от  $0.14 \pm 0.07$  у судака до  $0.75 \pm 0.17$  мкмоль/(г•мин) у налима. При 0°С относительная активность трипсиноподобных протеиназ энтеральной микробиоты у окуня составила 75, у щуки – 48.2, у налима – 21, у судака – 35% от активности протеиназ при 20°С.

При изучении активности химотрипсиноподобных протеиназ энтеральной микробиоты было установлено, что максимальный уровень ферментативной активности также характерен для налима. При 20°С уровень протеолитической активности у рыб этого вида составил  $1.25 \pm 0.10$  мкмоль/(г•мин). Минимальная активность выявлена у судака –  $0.33 \pm 0.07$  мкмоль/(г•мин). При 0°С относительная активность химотрипсиноподобных протеиназ энтеральной микробиоты у щуки составила 72.4, у налима – 53.6, у окуня – 43, у судака – 6.1% от уровня ферментативной активности при 20°С.

Активность трипсиноподобных протеиназ энтеральной микробиоты при 20°С у плотвы значительно ниже таковой типичных и факультативных ихтиофагов, у карася близка таковой налима –  $0.17 \pm 0.10$  и  $1.09 \pm 0.07$  мкмоль/(г•мин) соответственно. При этом относительная активность трипсиноподобных протеиназ энтеральной микробиоты у плотвы при 0°С составила 58.8, у карася 78.8 % от уровня активности при 20°С. Активность химотрипсиноподобных протеиназ энтеральной микробиоты у плотвы при 20°С существенно не отличалась от таковой трипсиноподобных протеиназ. При 0°С относительная активность протеиназ составила 11.8% от уровня ферментативной активности при 20°С.

**Активность казеинлитических и гемоглобинлитических протеиназ объектов питания рыб.** Исследованные виды рыб обладают относительно низким уровнем активности казеинлитических и гемоглобинлитических протеиназ. Минимальная активность ферментов при 20°С с использованием в качестве субстрата казеина обнаружена у стерляди –  $0.26 \pm 0.13$ , максимальная у тюльки –  $0.68 \pm 0.10$  мкмоль/(г•мин). При 0°С минимальная активность казеинлитических протеиназ отмечена у рыб сем. карповых, максимальная – у тюльки:  $0.10 \pm 0.06$  и  $0.26 \pm 0.05$  мкмоль/(г•мин) соответственно. Относительная активность казеинлитических протеиназ при 0°С у рыб сем. карповых составила 17.5, у тюльки – 38.2, у окуня – 40.4, у стерляди – 61.5% от уровня ферментативной активности при 20°С, принятого за 100%.

Минимальная активность гемоглобинлитических протеиназ при 20°С выявлена у рыб сем. карповых, максимальная у стерляди –  $0.47 \pm 0.10$  и  $1.98 \pm 0.25$  мкмоль/(г•мин) соответственно. При 0°С наиболее низкий уровень ферментативной активности характерен для окуня, наиболее высокий для стерляди –  $0.26 \pm 0.10$  и  $0.57 \pm 0.18$



мкмоль/(г•мин) соответственно. Относительная активность гемоглоблилитических протеиназ у рыб сем. карповых при 0°C составила 66, у окуня – 55.3, у тюльки – 46.5, у стерляди 28.8% от уровня активности ферментов при 20°C.

### 3.2. Влияние температуры на активность протеиназ слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микрофлоры у рыб, относящихся по типу питания к разным экологическим группам

*Влияние температуры на активность трипсиноподобных и химотрипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки кишечника, химуса, и энтеральной микрофлоры у типичных и факультативных ихтиофагов.* При исследовании температурной зависимости трипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки кишечника максимальная активность у щуки и судака отмечена в диапазоне температур 50–60°C, у налима и окуня – при 50°C. В случае протеиназ химуса зона значений активности, достоверно не отличающиеся от величины температурного оптимума, как правило, значительно шире: у щуки – 30–40°C, у судака – 40–60°C, у налима – 20–40°C. Максимальная активность протеиназ энтеральной микрофлоры у щуки находится в диапазоне температур 50–60°C, у судака, налима и окуня соответствует 50°C. При этом относительная активность протеиназ химуса у всех видов рыб в диапазоне температур 0–30°C выше таковой слизистой оболочки кишечника и энтеральной микрофлоры.

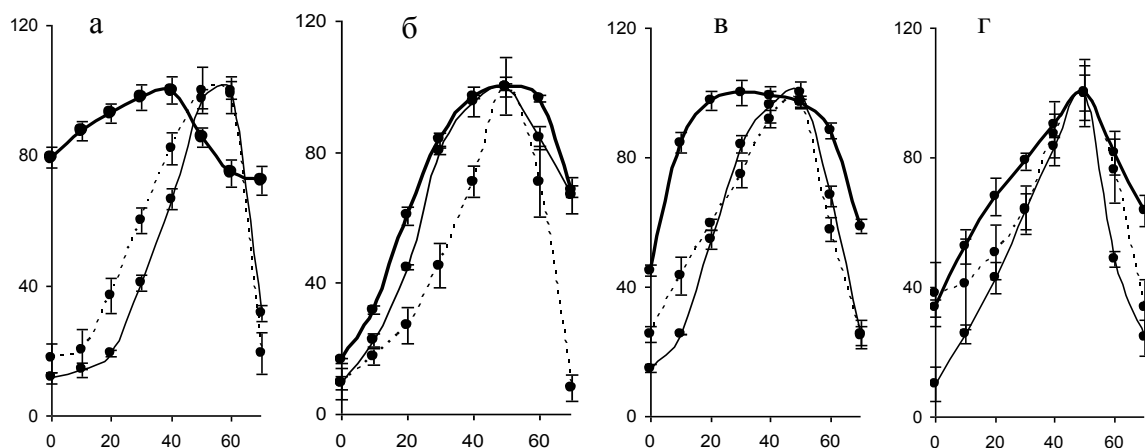


Рис. 1. Влияние температуры на активность трипсиноподобных протеиназ химуса (—●—), слизистой оболочки кишечника (—○—) и энтеральной микрофлоры (- - ● - -) у щуки (а), судака (б), налима (в) и окуня (г)

Обозначения: по оси абсцисс – температура, °С; по оси ординат – относительная активность, % максимальной активности, принятой за 100.

Поскольку в Рыбинском водохранилище выявлены две внутривидовые группы окуня (пелагическая и литоральная), различающиеся по размеру и характеру питания, а на рис. 1 представлены данные, касающиеся характеристик трипсиноподобных протеиназ окуня из пелагической группы, дополнительно исследовали рыб, отловленных в литоральной части водохранилища (рис. 2).

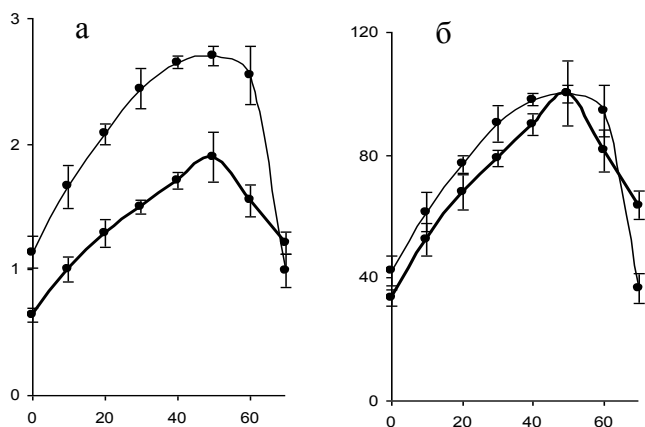


Рис. 2. Влияние температуры на активность трипсиноподобных протеиназ химуса окуня из пелагической (—●—) и литоральной (—●—) группы.

Обозначения: по оси абсцисс – температура, °С; по оси ординат: на а – абсолютная активность, мкмоль/(г·мин), на б – относительная активность, % от максимальной принятой за 100%.

Максимальная активность протеиназ химуса у окуня из литоральной группы отмечена при 50°C ( $2.70 \pm 0.08$  мкмоль/(г·мин)). При 0°C активность трипсиноподобных протеиназ составила  $1.14 \pm 0.13$  мкмоль/(г·мин), а относительная активность – 42.2%, в то время как у рыб пелагической группы – лишь 35% максимальной активности.

Форма кривых температурной зависимости химотрипсиноподобных протеиназ, функционирующих в составе разных препаратов у рыб одного вида, несмотря на разный уровень ферментативной активности, близка. Температурный оптимум протеиназ слизистой, химуса и энтеральной микрофлоры у большинства видов рыб равен 50°C (протеиназ химуса окуня и слизистой оболочки кишечника щуки 60°C). При этом значения активности протеиназ энтеральной микрофлоры, достоверно не отличающаяся от таковых температурного оптимума, у щуки находятся в диапазоне температур 50–60°C, у судака, налима и окуня соответствуют 50°C. Максимальная активность химотрипсиноподобных протеиназ химуса у окуня литоральной группы отмечена при 50°C ( $0.78 \pm 0.05$  мкмоль/(г·мин)), а при 0°C составляет  $0.26 \pm 0.05$  мкмоль/(г·мин). При этом относительная активность равна 33.3%, в то время как у рыб пелагической группы – менее 15% максимальной активности.

**Влияние температуры на активность трипсиноподобных протеиназ химуса, слизистой оболочки кишечника и энтеральной микрофлоры планкто- и бентофагов.** Форма кривых температурной зависимости трипсиноподобных протеиназ, функционирующих в составе разных препаратов, у рыб разных видов различна (рис. 3). Как показывает рис. 2, температурный оптимум протеиназ слизистой оболочки у плотвы и карася соответствует 50, у синца – 60°C. Значения ферментативной активности химуса, достоверно не отличающиеся от таковых температурного оптимума, у плотвы находятся в диапазоне температур 40-50°C. У синца и карася температурный оптимум протеиназ равен 50°C. Для протеиназ химуса плотвы характерны более высокие значения ферментативной активности в зоне низких температур, чем у синца и карася. При этом протеиназы химуса плотвы более устойчивы к действию высоких температур (60–70°C), чем таковые слизистой оболочки кишечника и энтеральной микрофлоры. Особо следует отметить, что у карася протеолитическая активность энтеральной микрофлоры в зоне низких температур значительно выше таковой слизистой оболочки кишечника и химуса. Действительно, при 0°C относительная активность трипсиноподобных протеиназ энтеральной микрофлоры у карася составляет 45%, у плотвы не превышает 15% от максимального уровня активности, принятого за 100%.

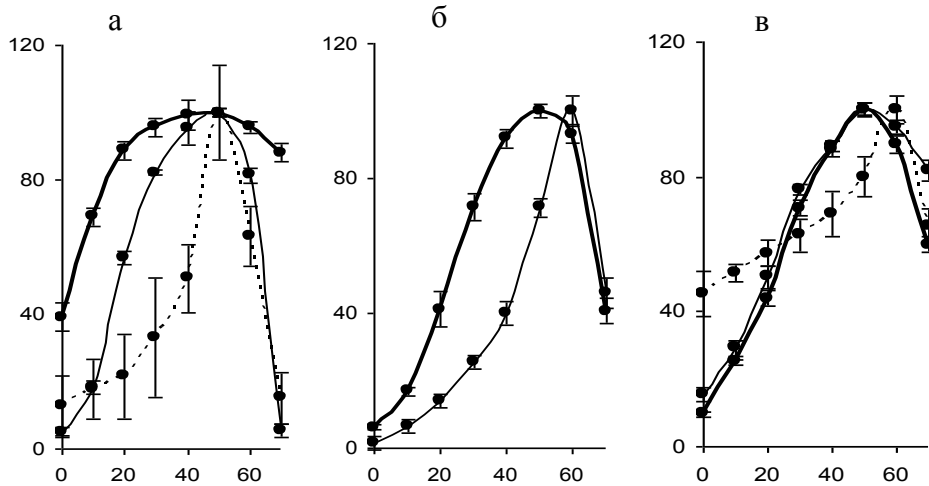


Рис. 3. Влияние температуры на активность трипсиноподобных протеиназ химуса (—●—), слизистой оболочки кишечника (—■—) и энтеральной микробиоты (- - ● - -) у плотвы (а), синца (б) и карася (в).

Обозначения: по оси абсцисс – температура, °С; по оси ординат – относительная активность, % максимальной активности, принятой за 100.

Поскольку в Рыбинском водохранилище выявлены две внутривидовые группы плотвы (пелагическая и литоральная), различающиеся по размеру и характеру питания, а на рис. 3 представлены характеристики трипсиноподобных протеиназ плотвы из литоральной группы, дополнительно исследовали рыб, отловленных в озерной части Волжского плеса Рыбинского водохранилища (рис. 4).

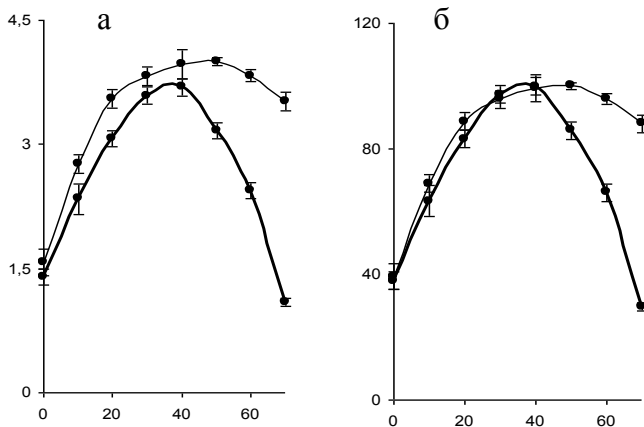


Рис. 4. Влияние температуры на активность трипсиноподобных протеиназ химуса плотвы из пелагической (—●—) и литоральной (—■—) группы.

Обозначения: по оси абсцисс – температура °С; по оси ординат: на а – абсолютная активность, мкмоль/(г•мин), на б – относительная активность, % от максимальной принятой за 100%.

Максимальная активность протеиназ химуса у плотвы из пелагической группы отмечена при 40°C ( $3.69 \pm 0.10$  мкмоль/(г•мин)), что значительно отличается от таковой у рыб из литоральной группы, характеризующейся широким диапазоном температур, достоверно не отличающихся от температурного оптимума (30–60°C). При 0°C активность трипсиноподобных протеиназ плотвы из пелагической группы соответствовала  $1.40 \pm 0.10$  мкмоль/(г•мин). При этом относительная активность при 0°C составляла 37.9% (у рыб из литоральной группы – 40%) максимальной активности.

**Влияние температуры на активность химотрипсиноподобных протеиназ химуса, слизистой оболочки кишечника и энтеральной микробиоты у бенто- и планктофагов.** Максимальные значения ферментативной активности слизистой оболочки кишечника у плотвы и синца выявлены при 60°C, у карася – при 50°C (рис. 5).

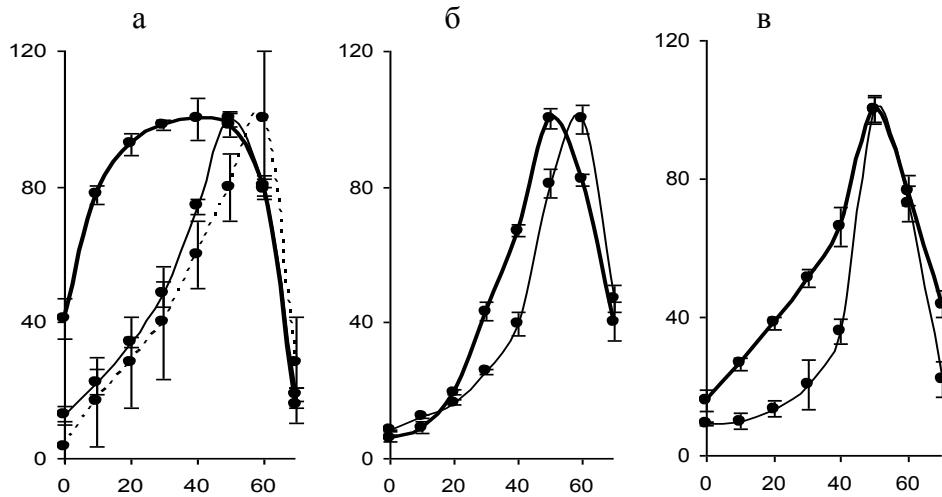


Рис. 5. Влияние температуры на активность трипсиноподобных протеиназ химуса (—●—), слизистой оболочки кишечника (—■—) и энтеральной микрофлоры (- - ● - -) у плотвы (а), синца (б) и карася (в).

Обозначения: по оси абсцисс – температура, °С; по оси ординат – относительная активность протеиназ, % максимальной активности, принятой за 100.

Значения ферментативной активности химуса, достоверно не отличающиеся от таковых температурного оптимума, у плотвы находятся в диапазоне температур 30-50°С. У синца и карася температурный оптимум протеиназ равен 50°С. Относительная активность химотрипсиноподобных протеиназ химуса плотвы значительно выше, чем у двух других видов рыб – 40% (у синца составляет около 10%, у карася – около 20%) от максимальной активности, принятой за 100. Температурный оптимум химотрипсиноподобных протеиназ энтеральной микрофлоры у плотвы выше по сравнению с таковым слизистой и химуса – 60 и 50°С соответственно. Эти данные свидетельствуют о том, что у исследованных видов рыб только химотрипсиноподобные протеиназы химуса обладают адаптивными свойствами.

Поскольку на рис. 5 представлены данные, касающиеся характеристик химотрипсиноподобных протеиназ плотвы из литоральной группы, дополнительно исследовали рыб пелагической из группы (рис. 6). Если максимальная активность протеиназ химуса у плотвы из литоральной группы выявлена в диапазоне 30–60°С, то у рыб из пелагической группы отмечена при 50°С ( $1.04 \pm 0.08$  мкмоль/(г•мин)). При 0°С активность химотрипсиноподобных протеиназ химуса плотвы из пелагической группы соответствовала  $0.21 \pm 0.08$  мкмоль/(г•мин). Если относительная активность протеиназ химуса плотвы из литоральной группы составляла 40%, то у рыб из пелагической группы – 20.2% максимальной активности.

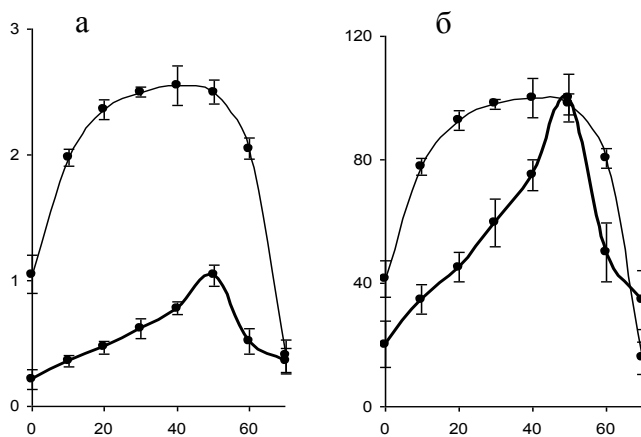


Рис. 6. Влияние температуры на активность химотрипсиноподобных протеиназ химуса плотвы из пелагической (—●—) и литоральной (—■—) группы.

Обозначения: по оси абсцисс – температура, °С; по оси ординат: на а – абсолютная активность, мкмоль/(г•мин), на б – относительная активность, % от максимальной принятой за 100%.

**Влияние температуры на активность казеинлитических и гемоглобинлитических протеиназ объектов питания рыб.** Исследование активности казеинлитических протеиназ всех тканей рыб в широком диапазоне температур при рН 5.0 позволило выявить существенные видовые различия в форме кривых их температурной зависимости (рис. 7).

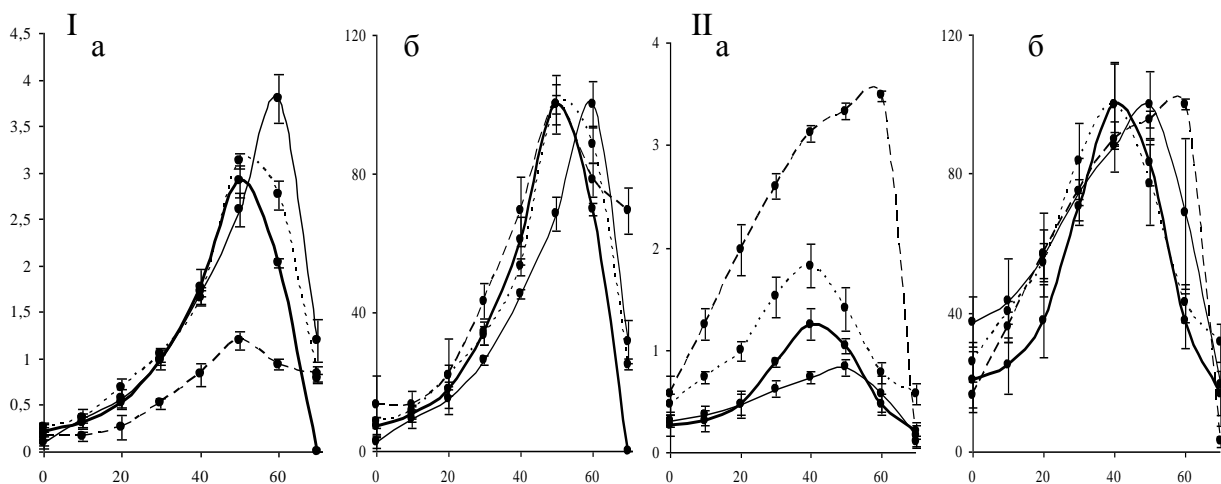


Рис. 7. Влияние температуры на активность казеинлитических (I) и гемоглобинлитических (II) протеиназ всех тканей объектов питания ихтиофагов

Обозначения: по оси абсцисс – температура °С; по оси ординат: на а – абсолютные значения активности, мкмоль/(г·мин), на б – относительная активность, % максимальной активности, принятой за 100. Окунь (—●—), молодь рыб сем. карповых (---●---), тюлька (- - ● - -), стерлядь (—●—).

Так, температурный оптимум ферментов стерляди, тюльки и окуня находится в зоне 50°C, у молоди рыб сем. карповых – при 60°C. В зоне постмаксимальных температур наблюдаются большие различия абсолютных и относительных величин активности. При 70°C относительная активность протеиназ окуня близка к 0, тюльки составляет 25, молоди карповых – 31.6, стерляди – 69.2% максимального уровня активности, принятого за 100. Форма кривых температурной зависимости гемоглобинлитических протеиназ тканей объектов питания ихтиофагов при рН 3.0 варьирует значительно, чем казеинлитических протеиназ. Так, температурный оптимум ферментов тюльки и окуня находится при 40°C, молоди рыб сем. карповых – при 50°C, стерляди – при 60°C. В зоне постмаксимальных температур также наблюдаются значительные видовые различия абсолютных и относительных величин активности. При этом термостабильность гемоглобинлитических протеиназ значительно ниже, чем казеинлитических. Действительно, при 70°C относительная активность протеиназ стерляди составляет – 2.9, окуня – 16.8, молоди карповых – 19.3, тюльки – 31.3% максимального уровня активности, принятого за 100.

**3.3. Влияние температуры на температурные коэффициенты  $Q_{10}$  и величины энергии активации трипсиноподобных и химотрипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки кишечника, химуса, энтеральной микрофлоры рыб и потенциальных объектов их питания.**

**Влияние температуры на температурные коэффициенты  $Q_{10}$  трипсиноподобных и химотрипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки кишечника, химуса, энтеральной микрофлоры консументов и всех тканей потенциальных жертв ихтиофагов.** При исследовании температурных коэффициентов  $Q_{10}$  трипсиноподобных и химотрипсиноподобных протеиназ не выявлены общие для всех

видов рыб закономерности. Так, у 4-х исследованных видов рыб при повышении температуры в диапазоне температур 0–40°C наблюдается последовательное снижение значений коэффициента  $Q_{10}$  трипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки, у 3-х видов рыб – неравномерное. При исследовании химуса у всех видов рыб при повышении температуры обнаружено снижение значений коэффициента  $Q_{10}$  трипсиноподобных протеиназ. Величины  $Q_{10}$  химотрипсиноподобных протеиназ химуса у рыб одного и того же вида, как правило, изменяются неравномерно. У плотвы, карпа и карася повышение температуры на 10°C вызывает равномерное уменьшение показателя. Характер изменения величин  $Q_{10}$  трипсиноподобных и химотрипсиноподобных протеиназ энтеральной микрофлоры у рыб разных видов также различен. Важно отметить, что минимальные значения коэффициента  $Q_{10}$  трипсиноподобных протеиназ энтеральной микрофлоры в диапазоне температур 0–10°C выявлены у окуня и щуки, активно питающихся в зимний период. У плотвы значения  $Q_{10}$  химотрипсиноподобных протеиназ уменьшаются в диапазоне 0–30°C, у судака и окуня – в диапазоне 0–40°C. У щуки и налима значения  $Q_{10}$  сохраняются на близком уровне в диапазоне 0–30°C.

Данные, касающиеся температурных коэффициентов активности трипсино- и химотрипсиноподобных протеиназ всех тканей исследованных видов рыб в диапазоне температур среды обитания, свидетельствуют о том, что величины  $Q_{10}$  в большинстве случаев ниже в 2.5. Лишь для молоди карповых характерны большие величины  $Q_{10}$ , а также значительные, более, чем в 2 раза, различия  $Q_{10}$  протеиназ по казеину в диапазоне 0–10°C и 10–20°C. При этом меньшие значения показателя выявлены при изучении гемоглобинлитических протеиназ, особенно у рыб сем. карповых. Видовые различия наиболее отчетливо проявляются при сопоставлении  $Q_{10}$  протеиназ по казеину и гемоглобину, особенно в зоне низких температур. Действительно, у стерляди и тюльки соотношение коэффициентов  $Q_{10}$  по казеину /  $Q_{10}$  по гемоглобину меньше 1 (0.7– 0.9), у окуня и рыб сем. карповых – больше (1.1– 3.0).

***Влияние температуры на энергию активации процесса гидролиза казеина и гемоглобина протеиназами слизистой оболочки кишечника, химуса, энтеральной микрофлоры и всех тканей потенциальных жертв ихтиофагов.*** Данные, касающиеся  $E_{акт}$  протеиназ, функционирующих в составе разных препаратов, свидетельствуют как о некоторых видовых различиях показателя, так и о его зависимости от температуры и субстрата. При исследовании  $E_{акт}$  трипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки кишечника излом на графике Аррениуса в большинстве случаев не отмечен. У щуки и окуня излом на графике Аррениуса отмечен при 20°C, у налима – при 10°C. Наиболее низкие величины  $E_{акт}$  трипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки кишечника до точки перегиба на графике Аррениуса выявлены у щуки – 4.0, наиболее высокие – у синца и плотвы – 12.5 ккал/моль. У типичных и факультативных ихтиофагов, как правило, значения  $E_{акт}$  протеиназ слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микрофлоры до точки перегиба оказываются ниже таковых у планкто- и бентофагов. Для трипсиноподобных протеиназ химуса и энтеральной микрофлоры при температуре 10°C отмечен излом на графике Аррениуса у всех исследованных рыб за исключением плотвы. Минимальные величины  $E_{акт}$  протеиназ химуса отмечены у щуки – 1.4, энтеральной микрофлоры – у окуня – 1.1 ккал/моль. При этом в большинстве случаев значения  $E_{акт}$  в зоне высоких температур ниже, чем в зоне низких температур.

При гидролизе гемоглобина протеиназами слизистой оболочки кишечника и химуса излом на графике Аррениуса в большинстве случаев наблюдается при 10°C. В диапазоне 0–10°C наиболее низкие величины  $E_{акт}$  гидролиза белка протеиназами слизистой оболочки характерны для карася (1.4 ккал/моль), наиболее высокие – судака (10.8 ккал/моль). В случае химуса излом на графике Аррениуса в большинстве случаев отсутствует. Наиболее низкие величины  $E_{акт}$  гидролиза белка протеиназами химуса в зоне низких температур характерны для щуки (4.4 ккал/моль), наиболее высокие – синца (9.8 ккал/моль). При

гидролизе гемоглобина протеиназами энтеральной микрофлоры в большинстве случаев излом на графике Аррениуса наблюдается при 20°C, у налима и плотвы – при 30 и 10°C соответственно. До точки перегиба величины  $E_{акт}$  гемоглоблинитических протеиназ энтеральной микрофлоры у рыб разных видов варьируют от 2.6 ккал/моль у щуки до 24.7 ккал/моль у плотвы.

При исследовании  $E_{акт}$  казеинлитических протеиназ всех тканей потенциальных объектов питания рыб в большинстве случаев излом на графике Аррениуса отмечен при 10°C, у стерляди – при 20°C. В зоне низких температур для казеинлитических протеиназ окуня характерны в 1.7 раза более низкие значения  $E_{акт}$ , для рыб сем. карповых – в 2.2 раза более высокие по сравнению с зоной более высоких температур. Существенное отличие процесса гидролиза гемоглобина – более низкие значения  $E_{акт}$  у рыб сем. карповых и окуня во всем диапазоне жизнедеятельности рыб. Наиболее высокие величины  $E_{акт}$  гидролиза гемоглобина в зоне 0–10°C отмечены для стерляди. Вместе с тем это единственный вид, у которого в зоне 10–30°C значения  $E_{акт}$  в 2 раза ниже, чем в зоне 0–10°C (у остальных видов – в 1.3–3.2 раза выше).

#### 3.4. Характеристика трипсиноподобных и химотрипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микрофлоры прудового карпа.

##### *Активность и характеристики трипсино- и химотрипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микрофлоры прудового карпа.*

Активность трипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки кишечника, химуса, а также энтеральной микрофлоры у карпа существенно различалась. Так, при 20°C протеолитическая активность слизистой оболочки кишечника составила  $2.46 \pm 0.09$ , химуса –  $6.36 \pm 0.13$ , энтеральной микрофлоры –  $3.24 \pm 0.22$  мкмоль/(г•мин). При этом относительная активность трипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки при 0°C составила 47.2, химуса – 36.6, энтеральной микрофлоры – 15.4% от уровня активности при 20°C, принятого за 100. Активность химотрипсиноподобных протеиназ всех исследованных препаратов карпа ниже таковых трипсиноподобных протеиназ. При 20°C ферментативная активность слизистой оболочки кишечника с использованием в качестве субстрата гемоглобина составила  $1.54 \pm 0.17$ , химуса –  $2.45 \pm 0.19$ , энтеральной микрофлоры –  $1.37 \pm 0.08$  мкмоль/(г•мин). При этом гемоглоблинитическая активность была ниже таковой казеинлитической активности в 2.6, 2.4, 1.6 раза соответственно. Относительная активность протеиназ слизистой оболочки при 0°C составила 30, химуса – 49.4, энтеральной микрофлоры – 27% от уровня ферментативной активности при 20°C.

Изучение активности протеиназ химуса, слизистой оболочки кишечника и энтеральной микрофлоры у карпа в широком диапазоне температур при pH 7.4 с использованием в качестве субстрата казеина и гемоглобина позволило выявить существенные различия в форме кривых их температурной зависимости (рис. 8).

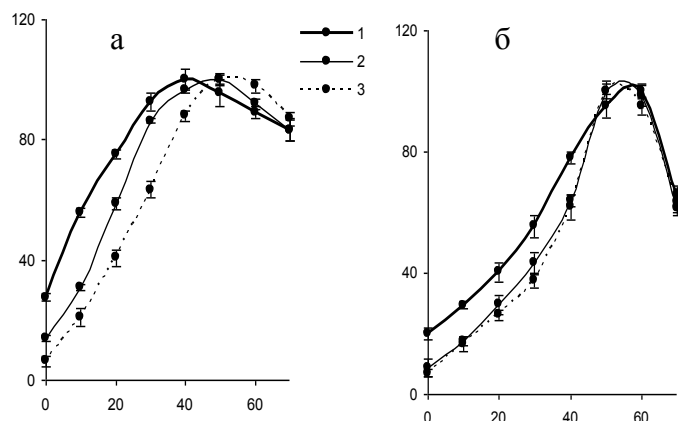


Рис. 8. Влияние температуры на активность трипсиноподобных (а) и химотрипсиноподобных (б) протеиназ 1 – химуса, 2 – слизистой оболочки кишечника и 3 – энтеральной микрофлоры у карпа.

Обозначения. По оси абсцисс – температура, °C; по оси ординат – относительная активность, % максимальной, принятой за 100.

Температурный оптимум ферментов химуса отмечен при 40°C, слизистой оболочки – при 50°C, энтеральной микробиоты – в зоне 50-60°C. Относительная активность протеиназ химуса при 0°C составила 28, слизистой оболочки – 14, энтеральной микробиоты 6% максимальной активности. При 70°C относительная активность протеиназ всех препаратов находится в районе 80% максимальной активности, принятой за 100. Температурный оптимум химотрипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки кишечника и энтеральной микробиоты карпа находится в зоне 50–60°C, химуса – 60°C. Относительная активность протеиназ химуса при 0°C составила 20, слизистой оболочки и энтеральной микробиоты около 10% от максимальной активности. При этом характер кривых температурной зависимости ферментов, функционирующих в составе разных препаратов, отличается в меньшей степени по сравнению с таковой трипсиноподобных протеиназ. При 70°C относительная активность ферментов всех исследованных препаратов близка 60%.

Значения коэффициентов  $Q_{10}$  протеиназ карпа в зоне 0-10°C (1.5–3.3) значительно выше, чем в зоне 10–40°C (1.0–1.7). При этом варибельность коэффициентов  $Q_{10}$  трипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки кишечника и энтеральной микробиоты в зоне 10–40°C выше по сравнению с таковыми химуса: 1.1–1.9 и 1.4–2.0, а также 1.1–1.4 соответственно. При этом диапазон колебания коэффициентов  $Q_{10}$  химотрипсиноподобных протеиназ тех же препаратов ниже, чем трипсиноподобных протеиназ (1.2–1.4, 1.4–1.6 и 1.5–1.7 соответственно).

Величины энергии активации трипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки кишечника карпа до точки перегиба на графике Аррениуса (20°C) составили 11.3, после точки перегиба – 6.9 ккал/моль. Значения  $E_{акт}$  протеиназ химуса и энтеральной микробиоты до точки перегиба (10°C) составили 10.6 и 18.4, после точки перегиба – 4.3 и 9.4 ккал/моль соответственно. Величины  $E_{акт}$  химотрипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки соответствовали 9.9 и 6.9 ккал/моль до и после точки перегиба (20°C). При исследовании химотрипсиноподобных протеиназ химуса карпа излом на графике Аррениуса не отмечен – значения  $E_{акт}$  во всем диапазоне температур составили 5.9 ккал/моль. Величины  $E_{акт}$  ферментов энтеральной микробиоты до точки перегиба (10°C) соответствовали 13.1, после точки перегиба – 6.9 ккал/моль.

***Влияние препаратов Антибак-100 и СУБ ПРО, применяемых для профилактики и борьбы с аэромоназом рыб, на активность трипсиноподобных протеиназ и гликозидаз слизистой оболочки кишечника в диапазоне температур жизнедеятельности карпа.*** Поскольку температура воды в прудах значительно варьирует в течение годового цикла рыб, исследовали степень ее влияния на характеристики ферментов у карпов, получавших препараты Антибак-100 и СУБ-ПРО в диапазоне температур жизнедеятельности карпа. У интактных рыб уровень активности трипсиноподобных протеиназ при 20°C соответствовал  $7.28 \pm 1.50$  мкмоль/г·мин (табл.1).

Таблица 1. Влияние температуры на активность трипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки кишечника до и после обработки препаратами Антибак-100 и СУБ-ПРО в диапазоне температур жизнедеятельности карпа.

Группа рыб	Протеолитическая активность, мкмоль/(г•мин)				
	0°	10°	20°	30°	40°
Интактные	1.75±0.14	2.93±0.35	7.28±1.50	10.72±0.93	11.98±0.42
Антибак100	6.28±0.29	10.36±0.95	17.47±1.03	24.52±1.25	28.14±1.28
СУБ-ПРО	0.65±0.19	1.22±0.09	1.87±0.65	2.55±0.20	3.58±0.19



У рыб, подвергшихся вакцинации авирулентной агаровой культурой *Aeromonas hydrophila*, а также антибактериальным препаратом Антибак-100, уровень активности трипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки кишечника значительно повышался по сравнению с интактными особями. Опыты показали, что у рыб, которые получали Антибак-100, уровень трипсиноподобных протеиназ при 20°C увеличивается до  $17.47 \pm 1.03$  мкмоль/(г•мин), что выше активности протеиназ у интактных карпов в 2.4 раза. При 0°C активность трипсиноподобных протеиназ у рыб, получавших Антибак-100, увеличивается в 3.6 раза по сравнению с интактными карпами. При 40°C – температуре, близкой к летальной (верхняя граница жизнедеятельности карпа) активность трипсиноподобных протеиназ у этих рыб увеличивается в 2.3 раза. У рыб, получавших СУБ-ПРО, при 0°C активность трипсиноподобных протеиназ уменьшается в 2.7 раза, при 20°C – в 3.9 раза, при 40°C – в 3.3 раза по сравнению с интактными рыбами. Вместе с тем уменьшение температуры на 10°C (от 20 до 10°C) у интактных рыб приводит к большему снижению уровня ферментативной активности (в 2.5 раза, чем у рыб, получавших Антибак-100 и СУБ-ПРО, (в 1.7 и 1.5 раза соответственно).

Поскольку характер влияния исследованных препаратов на уровень активности трипсиноподобных протеиназ оказался неожиданным, у тех же особей (в тех же пробах) определили уровень амилолитической активности. Определения показали, что у интактных рыб при 20°C амилолитическая активность слизистой оболочки кишечника соответствовала  $3.70 \pm 0.70$  мкмоль/г•мин (табл. 2).

Таблица 2. Влияние температуры на амилолитическую активность слизистой оболочки кишечника до и после обработки препаратами Антибак-100 и СУБ-ПРО в диапазоне температур жизнедеятельности карпа.

Группа рыб	Амилолитическая активность, мкмоль/(г•мин)				
	0°	10°	20°	30°	40°
Интактные	0.88±0.10	1.94±0.12	3.70±0.70	6.91±0.65	10.34±0.94
Антибак-100	0.41±0.08	0.73±0.12	1.40±0.30	2.84±0.42	4.23±0.34
СУБ-ПРО	0.14±0.05	0.32±0.08	0.50±0.10	0.91±0.13	1.95±0.23

Из таблицы видно, что у рыб, получавших Антибак-100 и СУБ-ПРО, уровень амилолитической активности значительно снижается по сравнению с интактными особями. При 0°C амилолитическая активность у рыб, получавших Антибак-100, снижается в 2.1 раза, у рыб получавших СУБ-ПРО – в 6.3 раза по сравнению с интактными карпами, при 20°C – в 2.6 и 2.8 раза соответственно. При 40°C амилолитическая активность у рыб, получавших Антибак-100, уменьшается в 2.4 раза, у рыб, получавших СУБ-ПРО, – в 5.3 раза по сравнению с интактными особями.

#### 4. ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поскольку синэкологические связи рыб в значительной степени базируются на эффективности их трофических взаимоотношений (Поддубный, 1971; Одум, 1975; Розенберг и др., 2000), важно отметить, что полученные данные существенно дополняют сведения о молекулярных механизмах отношений консументов и их потенциальных жертв. При этом эффективность трофических взаимоотношений, связанных с переносом вещества с одного трофического уровня на другой зависит не только от особенностей функционирования

ферментных систем трофических партнеров, но и энтеральной микробиоты. Адаптивные изменения характеристик пищеварительных ферментов у рыб разных экологических групп были обнаружены при изучении кишечных гликозидаз (Кузьмина, 1985; Уголев, Кузьмина, 1993; Kuz'mina, Gelman, 1997; Кузьмина, 2005; Голованова, 2006) и желудочных протеиназ (Кузьмина, 1990; Уголев, Кузьмина, 1993). В данной работе продемонстрированы адаптивные изменения температурных характеристик протеиназ, функционирующих в кишечнике. Наиболее значительные адаптивные перестройки касаются температурных характеристик (температурной зависимости, термостабильности и энергии активации) протеиназ тканей потенциальных объектов питания рыб и энтеральной микробиоты. Полученные результаты подтверждают предположение о том, что отсутствие адаптивных перестроек протеиназ, синтезируемых пищеварительной системой рыб, компенсируется адаптациями ферментов энтеральной микробиоты и объектов питания рыб (Уголев, Кузьмина, 1993). Действительно, характер температурной зависимости трипсиноподобных и химотрипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки кишечника у рыб разных видов достаточно близок. Температурный оптимум, как правило, находится при 50°C, а относительная активность при 0°C не превышает 5–15 % от максимальной активности, что хорошо согласуется с данными литературы (Кузьмина, 1990; Pavlisko et al., 1997a,b; Kishimura et al., 2006). Однако у ряда видов (щука, налим, плотва) «зона температурного оптимума» трипсиноподобных протеиназ химуса шире (20–60°C). Особого внимания заслуживает тот факт, что относительная активность трипсиноподобных протеиназ химуса при 0°C колеблется от 20 до 80% максимальной активности, причем у щуки, налима, окуня и плотвы из литоральной группы близка или значительно превышает 40%. Вместе с тем относительная активность химотрипсиноподобных протеиназ при 0°C у большинства видов рыб не превышает 20% и лишь у плотвы литоральной группы составляет 40% от максимальной активности.

Особо следует отметить, что температурные характеристики протеиназ у рыб одного и того же вида, но принадлежащим к разным экологическим группам, могут существенно различаться, что было продемонстрировано при исследовании протеиназ химуса окуня и плотвы. У обоих видов были выявлены различия в форме кривых температурной зависимости химуса рыб пелагической и литоральной групп. При этом наиболее важными представляются различия в относительной активности протеиназ в зоне низких температур. Так, у плотвы из пелагической группы относительная активность протеиназ химуса по казеину при 0°C равна 38%, по гемоглобину – 20% максимальной активности, у плотвы из литоральной группы – 39 и 41% соответственно. Кроме того, у рыб из пелагической группы «зона оптимальных значений температуры» значительно уже, чем у рыб из литоральной группы. Это может свидетельствовать о большем разнообразии характеристик протеиназ у объектов питания и энтеральной микробиоты плотвы из литоральной группы.

Несмотря на то, что форма кривых температурной зависимости протеиназ энтеральной микробиоты достаточно близка таковым сериновым протеиназ рыб, их относительная активность в зоне низких температур значительно выше таковой одноименных гидролаз слизистой оболочки (20–40 и 5–15% максимальной активности), а величины энергии активации значительно ниже. Температурный оптимум казеин- и гемоглобинлитических протеиназ, гидролизующих те же субстраты у разных видов потенциальных жертв колеблется от 40 до 60°C, а относительная активность гемоглобинлитических составляет 20–40% максимальной активности. Высокий уровень относительной активности гемоглобинлитических протеиназ в зоне низких температур также хорошо сочетается с низкими значениями их энергии активации. Эти факты подтверждают предположение о том, что ферменты микробиоты и объектов питания, особенно гемоглобинлитические протеиназы, способны компенсировать относительно низкую активность протеиназ, синтезируемых пищеварительной системой рыб, при низкой температуре. Поскольку характеристики протеиназ слизистой оболочки кишечника не обладают адаптивными свойствами, представленные данные подтверждают предположение о важной роли биоценологических адаптаций (Кузьмина, 1990 б, 2001, 2005), реализуемых протеиназами энтеральной микробиоты и объектов питания, в трофических взаимоотношениях рыб, относящихся по типу питания к разным экологическим группам. Полученные данные, подтверждая сведения о

значительном вкладе ферментов жертвы в процессы пищеварения консументов, изменяют представление о требованиях к качеству жертвы, которое определяется не только ее биохимическим составом и калорийностью, но также способностью к аутодеградации (Кузьмина, 2005). При этом и протеиназы объектов питания, и гидролазы энтеральной микробиоты способствуют снижению энергетических затрат консументов на синтез собственных ферментов, участвующих в деградации белковых компонентов пищи рыб.

## ВЫВОДЫ

1. Протеиназы энтеральной микробиоты у рыб разных видов, относящихся по типу питания к планкто-, бенто- и ихтиофагам, а также тканей потенциальных объектов питания ихтиофагов способны наравне с ферментами консументов участвовать в гидролизе белковых компонентов пищи.
2. При стандартной температуре (20°C) активность трипсиноподобных (казеинлитических) протеиназ химуса и слизистой оболочки кишечника, как правило, в 1.5–10 раз, энтеральной микробиоты у рыб разных видов в 1.5–2 раза выше таковой химотрипсиноподобных (гемоглобинлитических) протеиназ. Активность казеинлитических протеиназ тканей потенциальных объектов питания рыб в зависимости от вида рыб равна или в 1.5–8 раз ниже таковой гемоглобинлитических протеиназ.
3. Температурные характеристики протеиназ химуса у бентофагов и ихтиофагов, питающихся в придонных слоях воды, значительно отличаются от таковых пелагических рыб. Относительная активность трипсиноподобных протеиназ при температуре 0°C у рыб, питающихся в придонных слоях воды, колеблется от 20 до 80%, у рыб, питающихся в толще и у поверхности воды, – не превышает 15% максимальной активности, что характерно для слизистой оболочки кишечника. Относительная активность трипсино- и химотрипсиноподобных протеиназ энтеральной микробиоты при 0°C составляет 20–40% максимальной активности. Адаптивное изменение трипсиноподобных протеиназ энтеральной микробиоты выявлено лишь у окуня и карася.
4. Температурные характеристики казеинлитических протеиназ целого организма потенциальных объектов питания ихтиофагов в зоне температур жизнедеятельности у рыб разных видов близки – относительная активность при 0°C составляет 5–15%, гемоглобинлитических – варьирует от 20 до 40% максимальной активности.
5. Величины  $Q_{10}$  протеиназ слизистой оболочки и химуса у планкто- и бентофагов, как правило, ниже таковых у ихтиофагов. У типичных и факультативных ихтиофагов, особенно у щуки, значения  $E_{\text{акт}}$  процесса гидролиза казеина протеиназами слизистой оболочки кишечника (4.0 ккал/моль), химуса (1.4 ккал/моль) и энтеральной микробиоты (2.1 ккал/моль) в зоне низких температур ниже, чем у планкто- и бентофагов (8.5–12.5, 8.6–15.3, 5.9 ккал/моль соответственно), а эффективность гидролиза белковых компонентов пищи у первых, напротив, выше, чем у вторых.
6. Минимальные значения  $E_{\text{акт}}$  казеинлитических протеиназ, функционирующих в составе тканей объектов питания ихтиофагов, в зоне низких температур характерны для тюльки (5.3 ккал/моль), гемоглобинлитических протеиназ – для молоди рыб сем. карповых (преимущественно плотва) и окуня (2.5–2.7 ккал/моль), доминирующих в пище рыб.
7. У рыб одного и того же вида из пелагической группы характер температурной зависимости гемоглобинлитических протеиназ химуса значительно отличается от такового у рыб из литоральной группы. У окуня из пелагической группы относительная активность гемоглобинлитических протеиназ в диапазоне температур жизнедеятельности составляет 20–40%, из литоральной – 40–70%, у плотвы – 20–60 и 40–90% максимальной активности соответственно.
8. Характер температурной зависимости трипсино- и химотрипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты у прудового карпа, питающегося комбикормом, близок таковому рыб из естественных водоемов. Препарат

Антибак-100 на фоне иммунизации агаровой культурой *Aeromonas hydrophila* в диапазоне температур жизнедеятельности карпа положительно влияет на гидролиз белковых компонентов пищи, пробиотик СУБ-ПРО оказывает отрицательное действие.

9. Адаптивные изменения температурно-зависимых характеристик протеиназ объектов питания рыб и энтеральной микробиоты могут компенсировать низкую активность ферментов слизистой оболочки кишечника, что способствует уменьшению энергетических затрат консументов на синтез собственных пищеварительных гидролаз.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации Работы, входящие в список ВАКа

1. Кузьмина В.В., Скворцова Е.Г., **Шалыгин М.В.** Влияние температуры на активность протеиназ химуса и слизистой оболочки кишечника рыб разных экологических групп // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2008. Т. 44. № 5. С. 482-487.
2. Кузьмина В.В., Микряков Д.В., **Шалыгин М.В.**, Гаврилин К.В. Влияние антибактериальных препаратов и пробиотиков на активность ферментов слизистой оболочки кишечника карпа *Cyprinus carpio* L. Гликозидазы. // Проблемы биологии продуктивных животных. 2011. № 2. С. 101-105.
3. Кузьмина В.В., Микряков Д.В., **Шалыгин М.В.**, Гаврилин К.В. Влияние антибактериальных препаратов и пробиотиков на активность ферментов слизистой оболочки кишечника карпа *Cyprinus carpio* L. Протеиназы. // Проблемы биологии продуктивных животных. 2011. № 4. С. 18-22.
4. Кузьмина В.В., **Шалыгин М.В.**, Скворцова Е.Г. Влияние температуры на активность протеиназ энтеральной микробиоты и слизистой оболочки кишечника рыб разных экологических групп. // Журн. эволюц. биохим. физиол. 2012. Т. 48. № 2. С. 120-125.
5. Kuzmina V.V., **Shalygin M.V.**, Skvortsova E.G. The effect of temperature on chime proteinase activities in perch *Perca fluviatilis* L. and roach *Rutilus rutilus* (L). // Inland Water Biology. 2012. V. 5. № 1. P. 155-156.
6. Кузьмина В.В., **Шалыгин М.В.**, Скворцова Е.Г. Влияние температуры на активность протеиназ слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты у налима и щуки // Проблемы биологии продуктивных животных. 2012. № 3. С. 22-29.
7. Кузьмина В.В., **Шалыгин М.В.**, Скворцова Е.Г. Влияние температуры на активность протеиназ химуса, слизистой оболочки кишечника и энтеральной микробиоты у карпа *Cyprinus carpio* L. // Проблемы биологии продуктивных животных. 2012. № 3. С. 52-59.

### Работы, опубликованные в других изданиях

1. **Шалыгин М.В.** Влияние температуры на активность пищеварительных ферментов рыб // Сборник научных трудов по материалам конференции «НИРС – первая ступень в науку». Ярославль. Изд. ФГОУ ВПО ЯГСХА. 2008. С. 107-111.
2. **Шалыгин М.В.** Влияние температуры на активность протеиназ химуса и слизистой оболочки кишечника рыб разных экологических групп // Сборник лучших студенческих научных работ городского конкурса «Ярославль на пороге тысячелетия». Ярославль. Изд. «Канцлер». 2009. С. 68-72.
3. **Шалыгин М.В.**, Скворцова Е.Г. Влияние температуры на активность протеиназ энтеральной микробиоты и слизистой оболочки кишечника рыб разных экологических групп // Сборник научных трудов по материалам XIII международной научно-практической конференции «Инновационные направления развития АПК и

- повышение конкурентоспособности предприятий, отраслей и комплексов – вклад молодых учёных». Ярославль. Изд. ФГОУ ВПО ЯГСХА. 2010. С. 94-98.
4. Кузьмина В.В., Скворцова Е.Г., **Шалыгин М.В.** Температурные характеристики гидролаз консументов, жертв и энтеральной микробиоты (на примере рыб) // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Петрозаводск: Изд. КарНЦ РАН. 2010. С. 94–95.
  5. Кузьмина В.В., **Шалыгин М.В.**, Микряков Д.В. Влияние антибактериальных препаратов и пробиотиков на активность гликозидаз и протеиназ слизистой оболочки кишечника карпа *Cyprinus carpio* L. // Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов. Изд. РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева. 2011. С. 129-133.
  6. **Шалыгин М.В.**, Скворцова Е.Г. Влияние температуры на активность протеиназ химуса, слизистой оболочки кишечника и энтеральной микробиоты у плотвы и судака // Сборник научных трудов по материалам XVIII Всероссийской молодежной научной конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии», Сыктывкар. 2011. С. 140 -142.
  7. Кузьмина В.В., **Шалыгин М.В.**, Золотарева Г.В., Скворцова Е.Г., Шептицкий В.А. Роль протеиназ объектов питания и энтеральной микробиоты в адаптациях пищеварительной системы рыб и условиям функционирования // Механизмы функционирования висцеральных систем. Тезисы докладов VIII Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 220-летию со дня рожд. К.М. Бэра. 2012. Санкт Петербург. С. 125-126.
  8. Кузьмина В.В., **Шалыгин М.В.**, Золотарева Г.В., Скворцова Е.Г., Шептицкий В.А. Влияние типа питания рыб на характеристики протеиназ энтеральной микробиоты // Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптации гидробионтов. Материалы Всероссийской конференции с международным участием 2012. Борок. С. 210-214.