

На правах рукописи

СОЛОВЬЕВ

Михаил Марьянович

ХАРАКТЕРИСТИКА ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ РЫБ
ОЗЕРА ЧАНЫ НА РАННИХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА

03.02.04 – зоология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2011

Работа выполнена в лаборатории патологии насекомых

Учреждения РАН Института систематики и экологии животных СО РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук
Извекова Галина Игоревна
(Институт биологии внутренних вод РАН, пос. Борок)

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор
Глушов Виктор Вячеславович
(Институт систематики и экологии животных СО РАН,
г. Новосибирск)

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Кузьмина Виктория Вадимовна
(Институт биологии внутренних вод РАН, пос. Борок)

кандидат биологических наук

Зуйкова Елена Ивановна

(Институт систематики и экологии животных СО РАН,
г. Новосибирск)

Ведущее учреждение: Сибирский федеральный университет, г. Красноярск

Защита диссертации состоится 25 января 2011 года в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 003.033.01 при Институте систематики и экологии животных СО РАН по адресу: 630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, 11.

Факс: (383)2170-973, e-mail: dis@eco.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института систематики и экологии животных СО РАН

Автореферат разослан « » декабря 2010 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
к.б.н.



Л.В. Петрожицкая

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследований

Пищеварение – ключевой процесс в метаболизме большинства видов животных, поскольку обеспечивает организм всеми необходимыми веществами для нормального роста и развития (Уголев, 1985). В первую очередь успешность процессов пищеварения связана с наличием подходящего спектра пищеварительных гидролаз, способных обеспечить расщепление всех необходимых компонентов пищи (Уголев, 1985; Уголев, Кузьмина, 1993).

В процессе эволюции рыбы приспособились к питанию широким спектром кормовых объектов. Подобная адаптация отражает, прежде всего, физиологическую и анатомическую пластичность пищеварительного аппарата в целом (Кузьмина, 2005). Для многих рыб умеренных широт характерна частичная или полная смена рациона в течение года, что не может не повлиять на характер функционирования пищеварительной системы. В частности, это связано с возможностью синтеза дополнительных изоформ пищеварительных гидролаз при изменениях кормовой базы или условий внешней среды (температуры, pH и солености воды), для более успешного расщепления пищевых субстратов (Гельман, 1976; Кузьмина, 1985; Голованова, 1997). Подобные изменения рациона затрудняют классификацию рыб по пищевым предпочтениям.

В Чановской системе озер в течение вегетационного периода происходят существенные изменения численности и биомассы различных комплексов водных беспозвоночных, входящих в рацион многих видов рыб (Тимофеева и др., 1991). Такие изменения создают условия для смены рациона разных видов рыб. В Чановской системе озер обитает 14 видов пресноводных костистых рыб, которых можно условно разделить на хищных (судак, щука, окунь) и мирных (восточный лещ, верховка, сазан, плотва, сибирский елец, язь, линь, озерный голянь, сибирский пескарь, золотой карась и серебряный карась). При дальнейшем разделении пищевой специализации также возможно выделение облигатных и факультативных хищников, планктофагов, бентофагов и всеядных рыб (Попов и др., 2005).

Наличие специализированных по питанию групп рыб в пределах одного водоема – удобная модель для изучения связи активности и спектра кишечных гидролаз с типом питания рыб. К настоящему времени существует большое количество работ, посвященных анализу взаимосвязи активности различных групп пищеварительных гидролаз и пищевой специализации рыб (Уголев, Кузьмина, 1993; Chakrabarti *et al.*, 1995; Кузьмина, 1996, 2001, 2005). Однако, многие работы выполнены на видах рыб, содержащихся на несвойственных им в природных условиях кормах (объекты аквакультуры) (Clark *et al.*,

1986; Gawlicka *et al.*, 2000; Gisbert *et al.*, 2009). Исследования изменений активности пищеварительных ферментов в онтогенезе проводились либо в период раннего развития рыб, либо уже на половозрелых особях (Уголев, Кузьмина, 1993), или же имеются лишь фрагментарные данные по разным этапам развития одного вида. Изучение функционирования пищеварительной системы рыб на ранних стадиях онтогенеза в условиях одного водоема поможет глубже понять связь состава и активности пищеварительных ферментов с типом питания рыб.

Цель работы – изучение активности и спектра кишечных гидролаз в онтогенезе некоторых пресноводных костистых рыб с различной пищевой специализацией, обитающих в оз. Чаны.

Задачи исследования:

- 1) выяснить состав доминирующих групп кормовых объектов, входящих в рацион исследуемых видов рыб на ранних этапах онтогенеза;
- 2) оценить активность основных гидролаз, принимающих участие в пищеварении, на ранних этапах онтогенеза у исследуемых видов рыб;
- 3) установить спектр щелочных протеаз у исследуемых видов рыб;
- 4) определить этап развития молоди, на котором устанавливается соотношение пищеварительных гидролаз, характерное для рыб с разным типом питания.

Научная новизна

Впервые исследовано становление активности пищеварительных ферментов рыб в условиях оз. Чаны. Впервые показано, что дифференциация активности пищеварительных ферментов у рыб с различным типом питания происходит на этапе поздней личинки.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты вносят вклад в понимание закономерностей формирования и становления ферментативной активности в природных условиях при естественном рационе. Некоторые виды рыб оз. Чаны относятся к ценным видам (судак, сазан) и имеют промысловое значение (судак, сазан, плотва, серебряный карась, окунь и др.). Поэтому изучение процессов, связанных со становлением пищеварительной системы в естественных условиях, и в соответствии с этим разработка и приготовление адекватных искусственных кормов могут найти применение при разведении и выращивании этих видов рыб.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на Международном симпозиуме “Паразиты Голарктики” (Петрозаводск, 2010), XLVIII Международной научной студенческой конференции студентов и молодых ученых “Студент и научно-технический

прогресс” (Новосибирск, 2010), X Съезде гидробиологического общества при РАН (Владивосток, 2009), XI Международной научной школы-конференции студентов и молодых ученых “Экология Южной Сибири и сопредельных территорий” (Абакан, 2007), а также, на межлабораторных и рабочих семинарах лаборатории патологии насекомых ИСиЭЖ СО РАН.

Публикации

По материалам диссертации опубликованы две работы в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК для публикации основных материалов диссертации.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста; состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 34 рисунками и 2 таблицами. Список литературы включает 158 работ, из которых 128 на английском языке.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность д.б.н. Г.И. Извековой за руководство научной работой; Е.Н. Кашинской и к.б.н. И.М. Дубовскому за помощь при проведении исследований; д.б.н., проф. В.В. Глупову за помощь в постановке экспериментов, обсуждение рукописи и ценные критические замечания; к.б.н. Е.Н. Ядренкиной за помощь в определении личинок и мальков рыб.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В главе представлены сведения о строении желудочно-кишечного тракта костистых рыб. Рассматриваются ключевые аспекты развития и становления пищеварительных функций в онтогенезе и основные звенья пищеварения у рыб.

Глава 2. Материалы и методы

Объектом исследования служила молодь следующих видов рыб: ельца сибирского (*Leuciscus leuciscus baicalensis*) – 180 экз., плотвы обыкновенной (*Rutilus rutilus*) – 209 экз., серебряного карася (*Carassius auratus gibelio*) – 170 экз., окуня речного (*Perca fluviatilis*) – 102 экз. и судака обыкновенного (*Sander lucioperca*) – 128 экз. из природных популяций.

Район и метод сбора молоди рыб

Сбор материала проводили в апреле–августе 2008–2009 гг. и апреле–сентябре 2010 года. Отлов предличинок и личинок рыб осуществляли сачком из мельничного газа. Отлов ранних мальков и сеголеток проводили мальковым бреднем.

Анализ типа питания молодежи рыб

Для анализа пищевых предпочтений молодежи химус собирали сразу после вскрытия и фиксировали в 70% спирте до последующего определения. Крупные объекты (молодь рыб, крупные пиявки), входящие в пищевой рацион рыб, учитывали непосредственно во время вскрытия желудочно-кишечного тракта. Дальнейшее определение кормовых объектов проводили с использованием бинокля (Zeiss, DV4).

Оценка активности ферментов в кишечнике исследуемых видов рыб

Для определения активности ферментов кишечник рыб полностью вырезали, освобождали от пищевого комка, и затем гомогенизировали ручным гомогенизатором в 100 мкл 0.1 М Tris-HCl буфера (pH 9). На этапах развития В, С1 и С2 готовили суммарную пробу из 30–50 кишечников, на этапе D2 – из 3–6 кишечников. Для разбавления гомогената добавляли 900 мкл 0.1 М Tris-HCl буфера (pH 9). Гомогенаты кишечников центрифугировали при 10000 g в течение 10 минут. Супернатант использовали для определения активности ферментов.

Суммарную активность протеиназ (КФ 3.4.) определяли, как описано у Аларкон с соавторами (Alarcón *et al.*, 2002) с 800 мкл 0.3% азо-казеина в 0.1 М Tris-HCl буфере (pH 9) в качестве субстрата, при температуре 25°C, в течение 30–60 минут. Идентификацию различных групп протеиназ проводили ингибиторным анализом с прединкубацией супернатанта с ингибитором в течение 20 минут. Для подавления активности различных групп протеиназ использовали следующие ингибиторы: PMSF (фенилметилсульфонилфлуорид) и SIT (соевый ингибитор трипсина) для сериновых протеаз; EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) для металлопротеаз; E-64 (N-(транс-эпоксисукцинил)-L-лейцин-4-гуанидинобутиламид) для цистеиновых протеаз.

Активность α -амилазы (КФ 3.2.1.1) определяли методом Бернфелда (Deguara *et al.*, 2003) с растворимым крахмалом (1% в буфере Tris-HCl, pH 9) в качестве субстрата, инкубацию проводили при температуре 25°C в течение 5–60 минут в зависимости от размера рыб.

Активность липазы (неспецифические липазы КФ 3.1.1) определяли методом Албро с соавторами (Gawlicka *et al.*, 2000) с 4-нитрофенил-мирилатом (0,4 мМ) в качестве субстрата в 600 мкл аммоний бикарбонатном буфере 24 мМ (pH 9) с добавлением тритона X-100 (0.5%) при температуре 25°C в течение 10–40 минут.

Активность эстераз (неспецифические эстеразы КФ 3.1.1) определяли как описано у Прабхакаран (Prabhakaran, Kamble, 1995) с p-нитрофенилацетатом (0.27 мМ в 0.1М фосфатном буфере с 150 мМ NaCl, pH 9) в качестве субстрата при температуре 25°C в течение 5–25 минут.

Удельную активность ферментов выражали как специфическую активность в единицах изменения оптической плотности (ΔA) инкубационной смеси в ходе реакции в расчете на 1 минуту и 1 мг белка. Для щелочных протеаз – A_{440} нм/мг×мин, для α -амилазы – A_{540} нм/мг×мин, для неспецифических липаз – A_{405} нм/мг×мин, для неспецифических эстераз – A_{410} нм/мг×мин. Далее на графиках специфическая активность обозначена как условные единицы. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда (Bradford, 1976) при 595 нм. Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин.

SDS-PAGE электрофорез

Разделение протеаз проводили в 15% полиакриламидном геле с включением азоказеина в качестве субстрата в гель, согласно методике Гарсия-Каррено (Garcia-Carreno *et al.*, 1993).

Статистическая обработка материала

Полученные результаты представлены как средняя арифметическая и ее ошибка. Для проверки нормальности распределения данных использовали W -критерий Шапиро-Уилка. Для сравнения активности ферментов у молоди разных размерных групп использовали непараметрический тест Вилконсона, различия считались достоверными при $p < 0.05$. Дендрограмма сходства выборок на основе активности пищеварительных ферментов построена с помощью метода кластерного анализа (полное присоединение), в качестве меры сходства использовали евклидово расстояние (Плохинский, 1970). Статистические расчеты выполнены в программе STATISTICA 7.0

Глава 3. Особенности питания мирных и хищных рыб в раннем онтогенезе

3.1. Мирные рыбы

На разных этапах развития для мирных рыб (серебряный карась, плотва и елец) характерно наличие в пищевом комке представителей зоопланктонных организмов, детрита, моллюсков, личинок и куколок хирономид, незначительное количество нитчатых водорослей и фрагментов личинок водных насекомых. Кроме того, в пищевом комке особей ельца отмечено присутствие единичных личинок стрекоз, ручейников и других водных насекомых, определение которых затруднено из-за сильной поврежденности фрагментов. Из зоопланктонных организмов также встречаются дафнии. Особенно большое количество детрита отмечено в питании серебряного карася в размерных группах 40–60 мм (этап G). Вместе с детритом в рацион серебряного карася попадают эфипиальные яйца дафний, диатомовые водоросли, ракушковые рачки, дафнии, моллюски, а также личинки насекомых.

3.2. Хищные рыбы

В питании хищных рыб (окунь и судак) доминируют зоопланктонные организмы, молодь разных видов рыб, а также личинки и куколки хирономид. В питании судака на этапах E, F (l = 15–20 мм) по количеству преобладают дафнии, а также куколки и личинки хирономид. В старших размерных группах 40–70 мм (этап G) в питании судака доминируют зоопланктонные организмы (в основном крупные дафнии и представители Copepoda), составляющие до 87% численности, в то время как доля зообентосных не превышает 10%. У судаков с длиной тела 40 мм и более, часто отмечается присутствие в пищевом комке молоди других видов рыб. В рационе судаков также отмечены гаммариды. У окуней с длиной тела 40–50 мм (этап G) в пищевом комке присутствуют молодь карповых рыб, гаммариды и представители зоопланктона (р. *Leptodora* и р. *Bythotrephes*). В старших размерных группах окуня (30–50 мм, этап G) до 70% рациона составляют зоопланктонные организмы, а 30% – зообентосные (в основном личинки хирономид).

3.3. Отношение длины кишечника к длине тела молоди у хищных и мирных рыб

С возрастом у разных видов рыб отношение длины кишечника к длине тела (К/Т) изменяется различным образом. Отношение длины кишечника к длине тела на начальных этапах онтогенеза у ельца, плотвы и серебряного карася одинаковое и К/Т составляет 0.5. В старших группах коэффициент К/Т у разных видов рыб различается. Для плотвы, ельца, окуня и судака при средней длине 17–18 мм – коэффициент К/Т примерно одинаковый и составляет 0.65–0.71, в более старших размерных группах у судака К/Т снижается.

Глава 4. Гидролазы мирных и хищных рыб

4.1. Гидролазы мирных рыб

4.1.1. Протеазы

Для исследуемых видов мирных рыб установлены сходные закономерности развития и становления активности щелочных протеаз кишечника. На этапах развития В–Е активность щелочных протеаз кишечника незначительна, затем у серебряного карася на этапах E–F и у плотвы и ельца на этапах E–G (размерная группа 20–30 мм) происходит ее резкое увеличение, а в дальнейшем стабилизация или некоторое снижение (рис. 1).

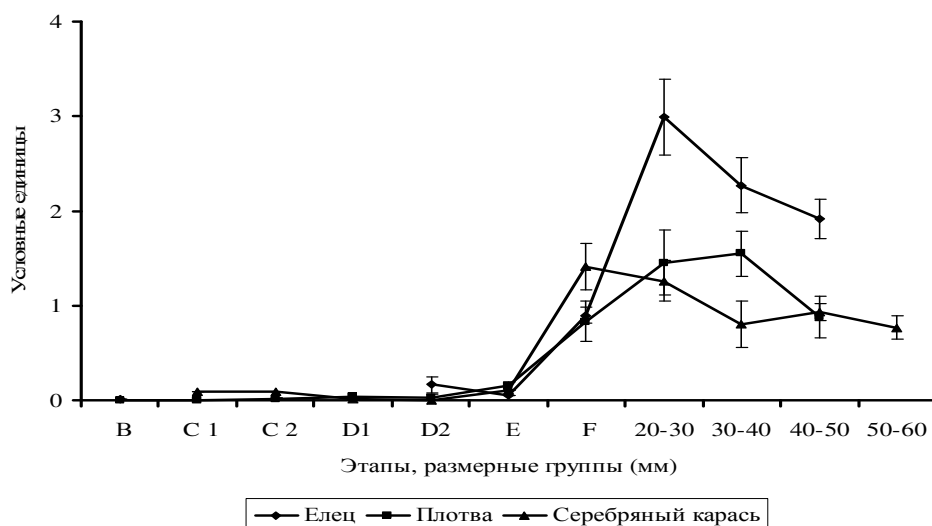


Рис. 1. Общая активность щелочных протеаз в кишечнике мирных рыб на разных этапах онтогенеза в оз. Чаны.

Однако существуют и отличия, связанные с неодинаковой активностью протеаз у исследуемых видов мирных рыб на разных этапах развития. Так, достоверно более высокая активность щелочных протеаз отмечена в следующих случаях: на этапе В у ельца по сравнению с плотвой; на стадии ранней личинки у серебряного карася по сравнению с плотвой; на этапе F у серебряного карася по сравнению с ельцом и плотвой; в размерных группах 20–30 мм, 30–40 мм и 40–50 мм у ельца по сравнению с плотвой и серебряным карасем; в размерной группе 30–40 мм у плотвы по сравнению с серебряным карасем. В размерных группах 20–30 мм и 40–50 мм активность щелочных протеаз у плотвы и серебряного карася достоверно не отличалась.

Использование ингибиторов, специфичных для различных групп пищеварительных протеаз, показало сходные результаты для исследованных видов мирных рыб. В гидролизе белков принимают участие все группы щелочных протеаз: сериновые, цистеиновые и металлопротеазы. Ингибитор SIT у мирных рыб подавляет активность щелочных протеаз на 86–94%. При использовании ингибитора PMSF с увеличением размеров мирных рыб снижается процент ингибирования щелочных протеаз кишечника. Ингибиторы EDTA и E-64 снижают активность щелочных протеаз кишечника в среднем на 3–12% (рис. 2).

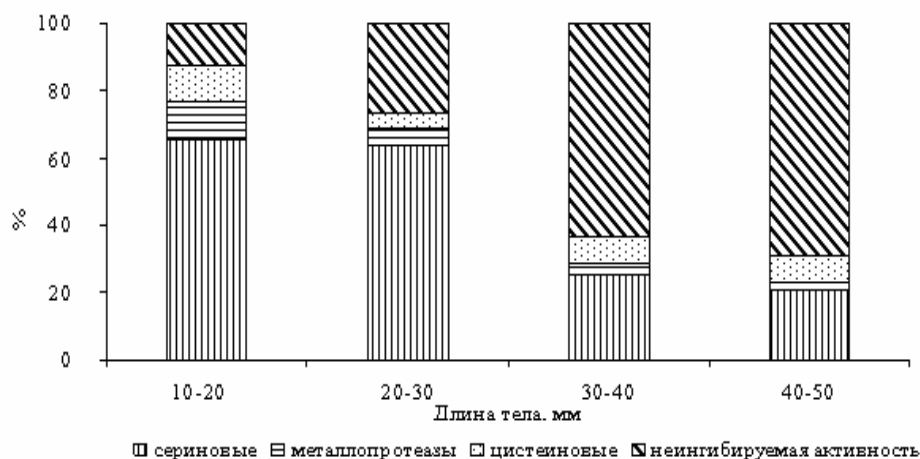


Рис. 2. Соотношение пищеварительных протеаз в кишечнике ельца разного размера, %
Использование метода анализа электрофоретической подвижности протеолитических ферментов позволяет выделить ряд мажорных и минорных групп протеаз, участвующих в гидролизе белковых компонентов пищи у исследованных видов мирных рыб. Так, у ельца определяется около 4, у плотвы – около 5, а у серебряного карася – около 6 полос, соответствующих протеазам с различной молекулярной массой.

4.1.2. α -амилаза

Для мирных видов рыб, как и в случае щелочных протеаз, установлены сходные закономерности развития и становления активности α -амилазы кишечника. Для ельца, плотвы и серебряного карася характерна незначительная активность α -амилазы на этапах В–Е. Следует отметить, что у серебряного карася не выявлена активность α -амилазы на этапах С1, С2 и D2. Начиная с этапа Е у всех рыб значительно увеличивается активность α -амилазы. У ельца это происходит в размерной группе 30–40 мм, у плотвы и серебряного карася – в группе 20–30 мм. Затем наблюдается стабилизация или незначительное снижение активности α -амилазы (рис. 3).

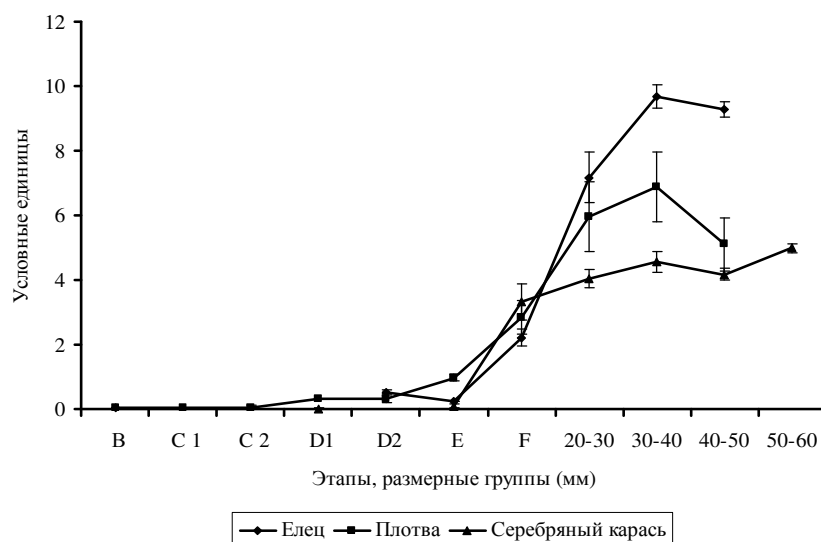


Рис. 3. Активность α -амилазы в кишечнике мирных рыб на разных этапах онтогенеза в оз.Чаны.

Как и в случае со щелочными протеазами, для α -амилазы отмечены вариации в уровнях активности у разных видов рыб на разных этапах онтогенеза. На этапе F активность α -милазы у ельца, плотвы и серебряного карася достоверно не отличалась. В размерных группах 20–30, 30–40 и 40–50 мм активность этого фермента достоверно выше у ельца, чем у серебряного карася, а в размерных группах 20–30 и 30–40 мм у плотвы – выше, чем у серебряного карася. В размерной группе 40–50 мм достоверных отличий в активности α -амилазы у плотвы и серебряного карася не обнаружено (рис. 3).

4.1.3. Эстеразы

4.1.3.1. Неспецифические эстеразы

В развитии и становлении активности неспецифических эстераз мирных рыб отмечены особенности, аналогичные описанным выше для протеаз и α -амилазы. Незначительная активность неспецифических эстераз у ельца и серебряного карася обнаруживается на этапах В–Е, у плотвы – на этапах В–D2. На этапе D2 у плотвы и этапе Е у ельца и серебряного карася происходит рост активности неспецифических эстераз. Достоверное увеличение активности у плотвы и ельца отмечено до этапа G (размерная группа 20–30 мм), затем происходит стабилизация или незначительное снижение активности (рис. 4).

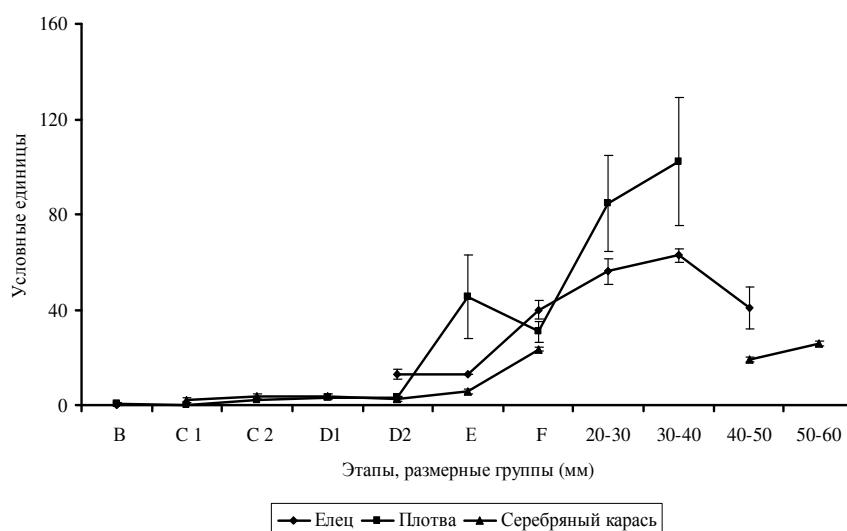


Рис. 4. Активность неспецифических эстераз в кишечнике мирных рыб на разных этапах онтогенеза в оз.Чаны.

Достоверно более высокая активность неспецифических эстераз отмечена у ельца на этапе F и в размерной группе 40–50 мм, а также у плотвы на этапе Е по сравнению с таковой у серебряного карася (рис. 4).

4.1.3.2. Неспецифические липазы

Изменения активности неспецифических липаз у ельца и плотвы на разных этапах онтогенеза аналогичны описанным выше для изменений активности других групп ферментов. Однако у серебряного карася изменение активности носит более сложный характер, выражающийся в высокой активности неспецифических липаз на этапах С2 и D1 (рис. 5).

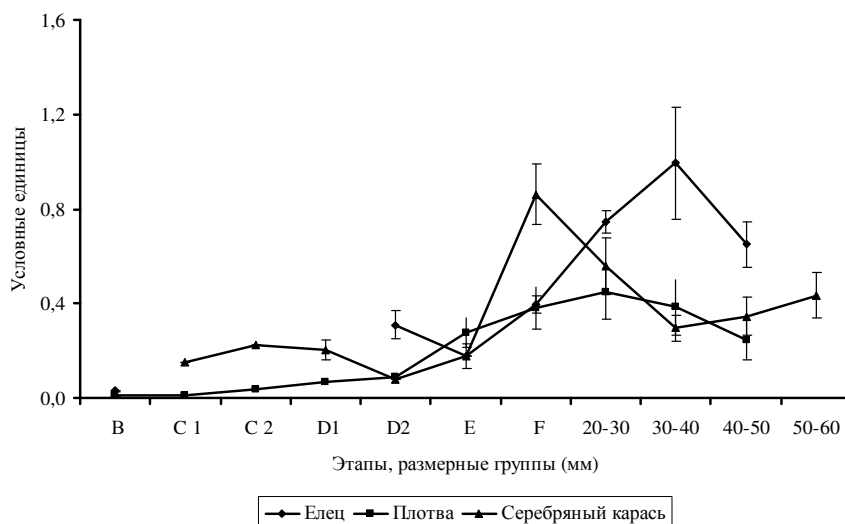


Рис. 5. Активность липазы в кишечнике мирных рыб на разных этапах онтогенеза в оз.Чаны.

Активность липазы в размерных группах 20–30 мм, 30–40 мм и 40–50 мм у ельца достоверно выше, чем у плотвы и серебряного карася. На этапах F, D1 и в размерных группах 20–30 мм, 30–40 мм и 40–50 мм у плотвы и серебряного карася специфическая активность липазы достоверно не отличается (рис. 5).

4.2. Гидролазы хищных рыб

4.2.1. Протеазы

У судака начиная с этапа E и окуня с этапа F до этапа G (размерная группа 30–40 мм) наблюдается значительное увеличение активности щелочных протеаз (рис. 6).

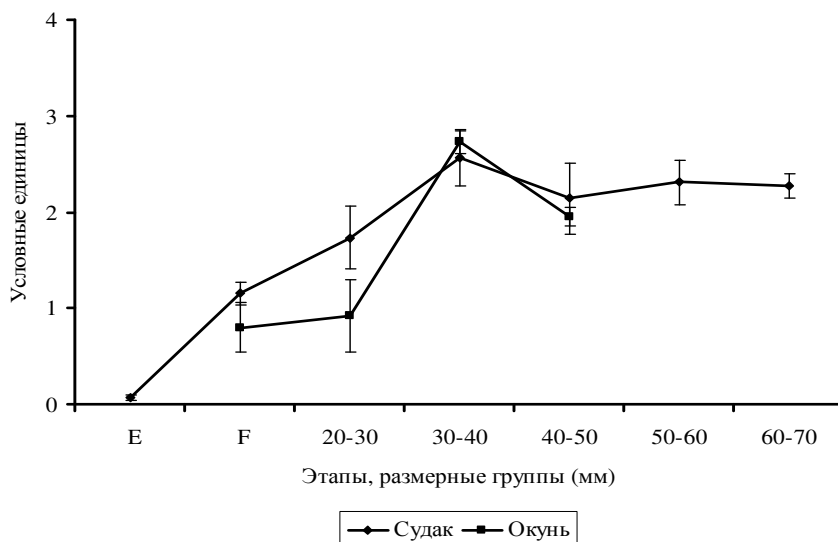


Рис. 6. Общая активность щелочных протеаз в кишечнике хищных рыб на разных этапах онтогенеза в оз. Чаны.

На этапе развития F и в размерной группе 20–30 мм активность щелочных пртеаз у окуня достоверно ниже, чем у судака (рис. 6).

При использовании ингибиторного анализа протеаз у окуня и судака во всех размерных группах обнаружено присутствие сериновых, цистеиновых и металлопротеаз. Для окуня и судака PMSF снижает общую протеолитическую активность на разных этапах на 22–52%, E-64 – на 3–15%, EDTA – на 1–18%.

С помощью электрофоретической оценки подвижности белков у окуня определяется около 8, а у судака около 7 полос, соответствующих протеазам с различной молекулярной массой.

4.2.2. α -амилаза

У хищных видов рыб установлены сходные, с рассмотренными выше для протеиназ закономерности развития и становления активности α -амилазы кишечника. Следует отметить, что у окуня наблюдается резкое увеличение активности α -амилазы начиная с этапа G (размерная группа 20–30 мм), в то время как у судака увеличение активности α -амилазы носит более плавный характер (рис. 7).

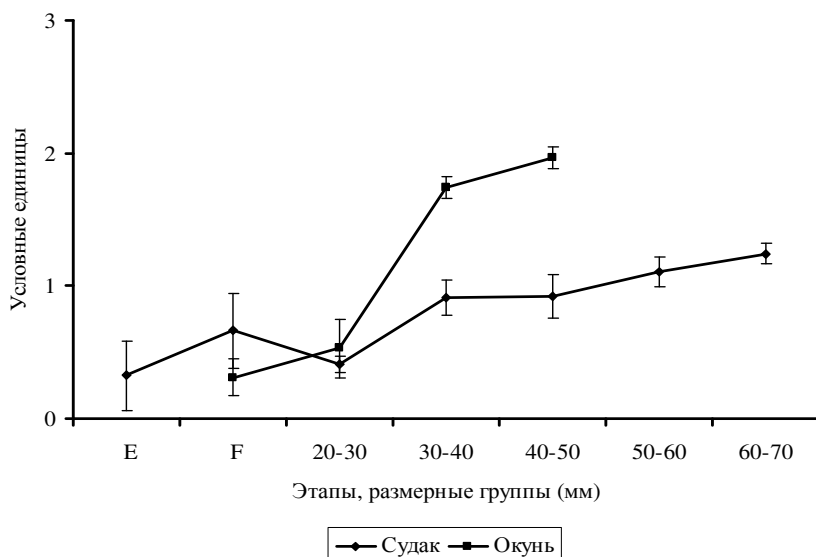


Рис. 7. Активность α -амилазы в кишечнике хищных рыб на разных этапах онтогенеза в оз. Чаны.

В размерных группах 30–40 мм и 40–50 мм активность α -амилазы у окуня достоверно выше, чем у судака (рис. 7).

4.2.3. Эстеразы

4.2.3.1. Неспецифические эстеразы

При переходе с этапа E на F у судака отмечается достоверный рост активности неспецифических эстераз, затем происходит ее достоверное снижение. Начиная с размерной группы 30–40 мм отмечается рост активности неспецифических эстераз (рис. 8.). У окуня с этапа F по этап G (размерные группы 20–30 и 40–50 мм) активность неспецифических эстераз достоверно не отличается.

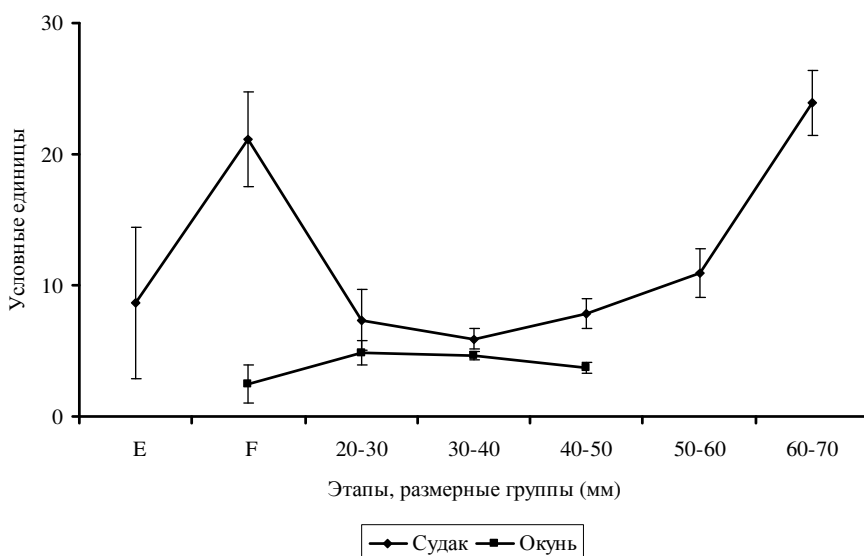


Рис. 8. Активность неспецифических эстераз в кишечнике хищных рыб на разных этапах онтогенеза в оз. Чаны.

Активность неспецифических эстераз на этапе F и в размерной группе 40–50 мм у судака достоверно выше, чем у окуня (рис. 8).

4.2.3.2. Неспецифические липазы

При переходе с этапа E на F у судака активность неспецифической липазы имеет тенденцию к увеличению. На этапе G (размерная группа 20–30 мм) активность липазы достоверно снижается и к размерной группе 30–40 мм стабилизируется (рис. 9).

На этапах F и G у окуня активность липазы достоверно не отличается. В размерных группах 30–40 мм и 40–50 мм наблюдается достоверное снижение активности (рис. 9).

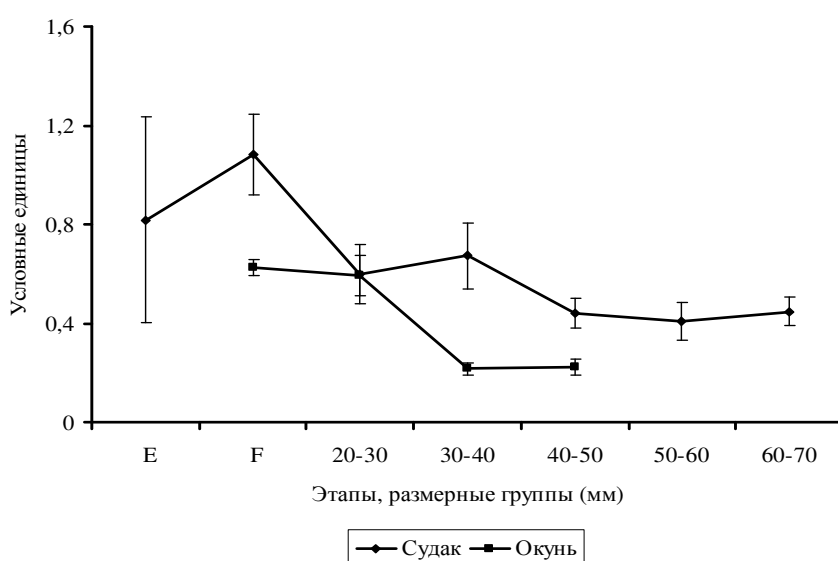


Рис. 9. Активность липазы в кишечнике хищных рыб на разных этапах онтогенеза в оз. Чаны.

На этапе развития F и размерных группах 30–40 мм и 40–50 мм активность липазы в кишечнике у судака достоверно выше, чем у окуня (рис. 9).

Глава 5. Связь активности пищеварительных гидролаз с типом питания

Анализ полученных данных показал зависимость уровней активности кишечных гидролаз от типа питания рыб. Особенно наглядно эта зависимость прослеживается на примере щелочных протеаз и α -амилазы.

У мирных рыб на всех исследованных этапах развития отношение активности α -амилазы к щелочным протеазам (А/П) оказалось больше 1. Для хищных рыб характерны значения А/П меньше 1. У судака, как типичного хищника, отношение А/П значительно меньше единицы. Однако у окуня – факультативного бентофага – активность щелочных протеаз лишь незначительно превышает активность α -амилазы и отношение А/П немного меньше 1 практически для всех размерных групп (таблица). Таким образом, уже на ранних этапах онтогенеза отношение активности α -амилазы к активности щелочных протеаз у мирных рыб больше 1, а у хищных рыб меньше 1.

Таблица.

Отношение активности α -амилазы к активности щелочных протеаз у рыб с разным типом питания

Этап/размерная группа	B	C1	C2	D1	D2	E	F	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70
Вид												
Елец	6.7	–	–	–	3.3	4.3	2.5	2.4	4.3	4.8	–	–
Плотва	10.1	5.9	4.9	8.6	10.2	6.3	3.4	4.1	4.4	5.7	–	–
Серебряный карась	–	–	–	1.2	–	2.5	3.2	–	5.6	4.5	6.5	–
Окунь	–	–	–	–	–	–	0.4	0.6	0.6	1	–	–
Судак	–	–	–	–	–	–	0.6	0.3	0.4	0.4	0.5	0.5

– – нет данных

Изменения активности неспецифической липазы в кишечнике мирных и хищных рыб в онтогенезе носят сходный характер, а уровни их активностей имеют близкие значения. В связи с этим по уровню активности липазы на ранних этапах онтогенеза нельзя судить о типе питания рыб. В то же время активность неспецифических эстераз на большинстве исследуемых стадий развития у мирных рыб достоверно выше по сравнению с хищными.

Для классификации исследуемых видов рыб по активности основных групп кишечных гидролаз (щелочные протеазы, α -амилаза и липаза) использован метод кластерного анализа. Согласно его результатам, на этапе F исследуемые виды рыб разбиваются на две группы, в одну из которых входят плотва, елец и серебряный карась, а в другую – судак и окунь (рис. 10).

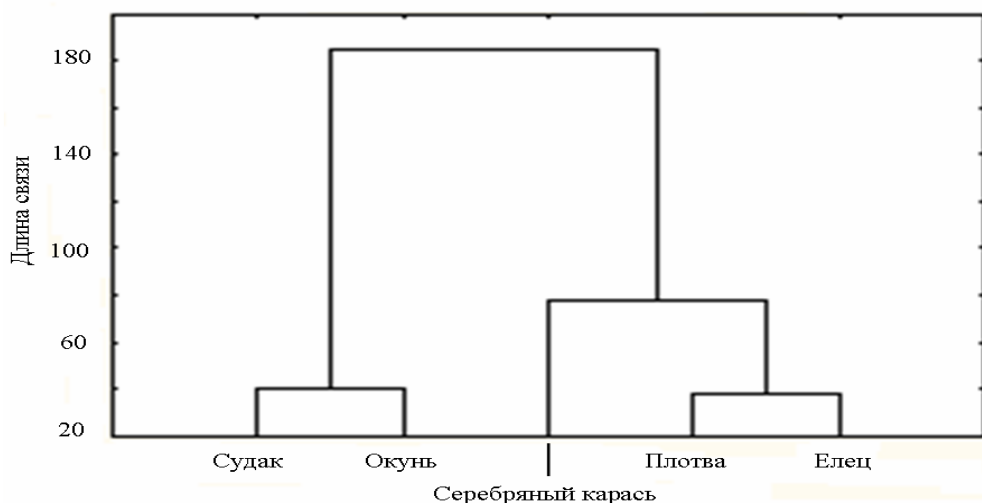


Рис. 10. Группировка рыб на кластеры, этап F

На этапе G (размерные группы 20–30 мм и 30–40 мм) также выделяются две группы: 1) плотва, елец, серебряный карась и 2) судак+окунь (рис. 11).

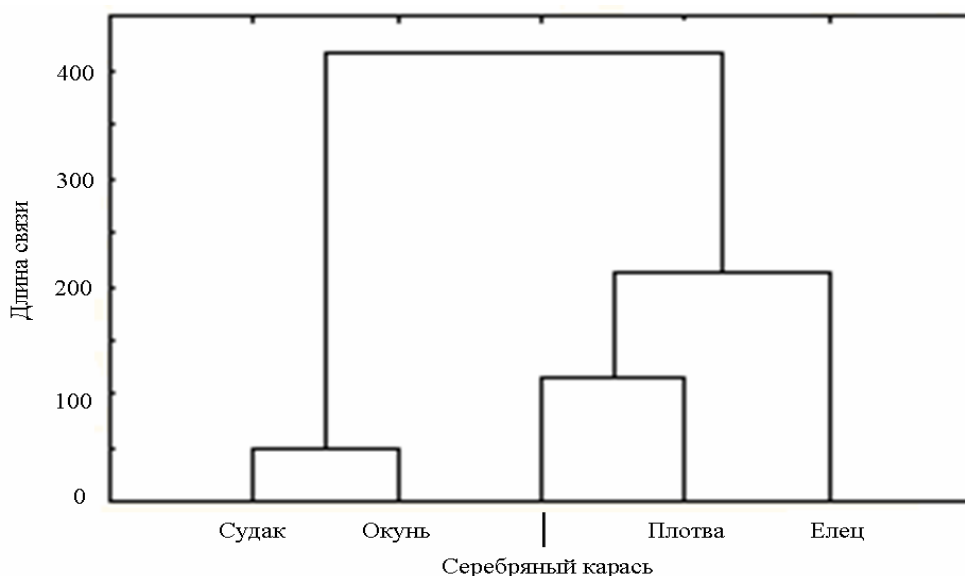


Рис. 11. Группировка рыб на кластеры, этап G (размерные группы 20–30 и 30–40 мм)

Из представленных данных видно, что исследуемые виды рыб в соответствии с типом питания разбиваются на два кластера, начиная с этапа ранних мальков (этап F).

Глава 6. Обсуждение

6.1. Кормовые ресурсы водоема и типы питания рыб

Исследование пищевых отношений рыб оз. Чаны и рек Чулым и Каргат ведутся sporadически и в доступной научной литературе такие сведения практически отсутствуют (Тимофеева и др., 1991; Канава *et al.*, 2009). Известно, что по характеру питания сибирская плотва и серебряный карась в оз. Чаны относятся к эврифагам и потребляют как животную, так и растительную пищу (Воскобойников и др., 1986). Опубликованных данных по питанию ельца в оз. Чаны нет. Опираясь на собственные данные и опубликованные материалы других исследователей, мы можем констатировать, что молодь серебряного карася, ельца и плотвы относится к всеядным видам.

Окунь по типу питания также относится к эврифагам: его молодь питается планктоном и мелкими формами зообентоса, а взрослые особи зообентосом и рыбой (Воскобойников и др., 1986). Однако нами в пищевом комке молоди окуня не обнаружены детрит и водоросли. Поэтому мы не можем отнести окуня к эврифагам. Окунь в первый год жизни в оз. Чаны по типу питания проявляет себя как зоопланкто-бентофаг и факультативный хищник.

Молодь судака в оз. Чаны питается молодь плотвы и окуня, в то время как пищу взрослого судака составляют мелкие массовые виды рыб (Воскобойников и др., 1986). По

нашим данным, судак в оз. Чаны, как и окунь, относится к зоопланкто-бентофагам факультативным хищникам.

Таким образом, бентосные организмы в достаточном количестве присутствуют в химусе, как у хищных, так и у мирных рыб. Хорошо известно, что у многих видов рыб в рацион входит детрит (Bowen, 1976). В оз. Чаны это характерно в большей степени для серебряного карася и в меньшей степени для ельца и плотвы. У окуня и судака детрит в пищевом комке не обнаружен.

Отношение длины кишечника к длине тела характеризует морфологические особенности желудочно-кишечного тракта рыб с различным типом питания. По нашим данным, наибольшим значением этого показателя отличается серебряный карась, а наименьшим – судак. Окунь, елец и плотва имеют промежуточные значения. Однако плотва по этому показателю ближе к серебряному карасю, а окунь и елец к судаку. Подобные различия, видимо, связаны с особенностями питания половозрелых особей этих видов, что особенно хорошо заметно на примере судака, как типичного хищника, и серебряного карася – типичного эврифага. У карася, в отличие от других исследуемых видов рыб, значительную долю в рационе занимает детрит, что может затруднять переваривание и требует увеличения размеров кишечника.

6.2. Изменения спектра кишечных гидролаз в онтогенезе

У ельца и плотвы на этапе развития В обнаружен весь спектр исследуемых пищеварительных гидролаз кишечника. Наличие широкого спектра кишечных гидролаз на начальных этапах развития характерно для многих видов рыб (Zambonino Infante, Cahu, 2001; Srivastava *et al.*, 2002; Alvarez-Gonzalez *et al.*, 2006; Lazo *et al.*, 2007; Gisbert *et al.*, 2009).

Различия в активности конкретных групп пищеварительных гидролаз и у разных видов рыб позволяют оценить степень важности той или иной группы пищеварительных ферментов на разных стадиях онтогенеза (Уголев, Кузьмина, 1993). Так у ельца и плотвы на этапе развития В неспецифические эстеразы и α -амилаза обладают большей активностью по сравнению со щелочными протеазами. У серебряного карася на этапах развития С1 и С2 наибольший вклад в гидролиз пищевых компонентов вносят щелочные протеазы и неспецифические эстеразы, в то время как активность α -амилазы не обнаружена. По нашим данным, у исследованных видов рыб при переходе с этапа Е на этап F наблюдается резкое увеличение специфической активности всех исследуемых групп ферментов как у мирных (серебряный карась, плотва, елец), так и у хищников (судак). Подобное явление свойственно многим видам рыб и может характеризовать становление пищеварительной функции желудочно-кишечного тракта. Известно, что в

течение первых 3 недель жизни внутриклеточное пищеварение белков цитозольными пептидазами осуществляется чрезвычайно активно, тогда как ферменты панкреатической железы и щеточной каймы пока еще плохо функционируют (Zambonino Infante, Cahu, 2001). Один из наиболее часто используемых методов для типизации групп протеаз – ингибиторный анализ. В кишечнике основные протеолитические ферменты принадлежат к сериновому типу протеаз и в меньшей степени металлопротеазам (Garcia-Carreño *et al.*, 2002). Этот факт нашел подтверждение при исследовании протеаз на ранних этапах развития рыб в оз. Чаны.

6.3. Тип питания и становление активности пищеварительных гидролаз в онтогенезе

Хорошо известно, что способность организма переваривать предлагаемый субстрат зависит от наличия подходящих ферментов в желудочно-кишечном тракте (Smith, 1980; цит. по: Uys, Necht, 1987; Уголев, Кузьмина, 1993). Поскольку в рационе хищных видов рыб преобладают белковые компоненты, а в рационе мирных видов – углеводы, принято считать, что для хищных рыб характерна более высокая активность протеолитических ферментов и более низкая активность карбогидраз по сравнению с растительноядными и всеядными видами (Кузьмина, 1996, 2001). По нашим данным наиболее высокой активностью щелочных протеиназ характеризуются судак и окунь, что объясняется типом питания половозрелых особей как облигатных и факультативных хищников. У плотвы и серебряного карася, как всеядных рыб, отмечена относительно низкая активность щелочных протеиназ по сравнению с хищными видами (судак, окунь). Однако не менее высокая протеолитическая активность обнаружена нами и у ельца. Елец по типу питания не относится к облигатным или факультативным хищникам, но, несмотря на это, имеет высокую активность щелочных протеиназ, сопоставимую с активностью щелочных протеиназ окуня и судака. Результаты, свидетельствующие о высокой активности протеиназ в кишечнике рыб независимо от их типа питания, получены и другими исследователями (Chakrabarti *et al.*, 1995).

Наибольшая активность α -амилазы отмечена у ельца, плотвы и серебряного карася, что характерно для мирных рыб. У судака и окуня активность α -амилазы значительно ниже, что может быть связано с особенностями их питания на более поздних стадиях развития. При этом у окуня по сравнению с судаком отмечена более высокая активность α -амилазы, что объясняется присутствием большого количества беспозвоночных в рационе. Известно, что разные виды рыб показывают сходные зависимости активности пищеварительных ферментов от спектра питания, в отличие от зависимостей от окружающих условий или таксономического положения (Кузьмина, 1996, 2001, 2005). Таким образом, пищеварительные ферменты могут служить эффективным индикатором

типа питания (Кузьмина, 1996). Активность неспецифических эстераз у мирных рыб выше, чем у хищных, однако, для активности липазы такой зависимости не обнаружено.

Заключение

Костистые рыбы обитают в разнообразных климатических зонах и занимают всевозможные пищевые ниши. Поэтому, из-за чрезвычайно разнообразного рациона и мест обитания, связь состава и активности пищеварительных гидролаз с типом питания по-прежнему остается неоднозначной и далеко не всегда очевидной. Известно, что процесс развития пищеварительных ферментов на разных этапах онтогенеза генетически запрограммирован (Peres *et al.*, 1998). Кроме того, убедительно доказано влияние биохимического состава потребляемой пищи и условий окружающей среды в водоеме на состав и активность пищеварительных гидролаз на разных стадиях онтогенеза (Dabrowski, Glogowski, 1977; Уголев, Кузьмина, 1993, Krogdahl *et al.*, 2005; Debnath *et al.*, 2007). В природных популяциях воздействие окружающей среды на организм носит комплексный характер и определить степень влияния того или иного фактора достаточно сложно. Эксперимент же позволяет выделить определенный фактор и оценить степень его воздействия на ферментативную активность. Однако результаты, полученные в лабораторных условиях, не всегда возможно экстраполировать на популяции, обитающие в естественной среде. Работы, посвященные процессу становления пищеварительной системы в онтогенезе на рыбах из природных популяций, в научной литературе редки (Уголев, Кузьмина, 1993).

Мы проследили связь активности кишечных гидролаз с типом питания разных видов рыб из природных популяций на ранних этапах онтогенеза. Эти данные согласуются с результатами, полученными другими исследователями на более поздних этапах онтогенеза (Кузьмина, 2005). Установленное нами разделение исследуемых видов рыб на мирных и хищных по активности пищеварительных ферментов уже на этапе развития поздней личинки (этап F), свидетельствует о важных изменениях в функционировании ферментативной системы кишечника, связанных с типом питания. Начиная с этапов предличинки и ранней личинки для мирных видов рыб пресных водоемов, в том числе озера Чаны, мы отмечаем разный вклад щелочных гидролаз в процессы пищеварения, что объясняется различной значимостью состава рациона для разных видов рыб. Таким образом, установленные нами закономерности показывают принципиальное сходство в развитии и становлении функционирования ферментативных систем кишечника исследуемых видов рыб оз. Чаны с рыбами других видов из других водоемов. Кроме того, полученные данные доказывают необходимость изучения

процессов, связанных со становлением пищеварительной системы в естественных условиях, для рационального природопользования.

Выводы

1. Установлены особенности типов питания рыб оз. Чаны на ранних этапах развития: молодь серебряного карася, плотвы и ельца относится к эврифагам, молодь окуня и судака – к зоопланкто-бентофагам-факультативным хищникам.
2. Отношение длины кишечника к длине тела на ранних этапах онтогенеза у разных видов рыб оз. Чаны достаточно стабильно. Исключение составляет серебряный карась, длина кишечника которого увеличивается значительно быстрее длины тела, что связано с составом кормовых объектов.
3. Активность основных групп ферментов, принимающих участие в пищеварении рыб, обнаруживается уже на ранних этапах онтогенеза. Однако у конкретных видов рыб активность тех или иных групп ферментов проявляется на разных этапах развития, что может быть связано с составом потребляемой пищи и свидетельствует о степени важности различных гидролаз на каждом из этапов.
4. Разделение рыб на мирных и хищных по уровням активности пищеварительных гидролаз происходит на этапе поздней личинки. Активность всех исследованных пищеварительных гидролаз в это время повышается, однако уровни их активности зависят от типа питания рыб.
5. На всех этапах развития мирных и хищных рыб наибольший вклад в активность щелочных протеиназ вносит группа сериновых протеиназ (до 70–80%). Доля цистеиновых протеиназ и металлопротеаз значительно меньше и не превышает 10–12%. У мирных рыб выявлено 4–6 изоформ, у хищных 7–8 изоформ щелочных протеаз.
6. На ранних этапах онтогенеза для мирных рыб (плотвы, ельца, серебряного карася) характерна более высокая активность α -амилазы по сравнению со щелочными протеазами. Для хищных рыб (окуня, судака) отмечена обратная зависимость. Это находит отражение в соотношении активности амилаз и протеаз: у мирных рыб оно больше 1, в то время как у хищных – меньше 1.

Список публикаций по теме диссертации

Журналы из списка ВАК

1. Соловьев, М.М. Зараженность метацеркариями сем. Diplostomidae и активность пищеварительных ферментов молоди ельца сибирского *Leuciscus leuciscus baicalensis* (Dyb) в реке Каргат бассейна озера Чаны / М.М. Соловьев, Е.Н. Кашинская, В.В. Глупов // Сибирский экологический журнал. – 2010. – Т. 5. – С. 763–771.
2. Извекова, Г.И. Влияние *Caryophyllaeus laticeps* (Cestoda, Caryophyllidea) на активность пищеварительных ферментов леща / Г.И. Извекова, М.М. Соловьев, Е.И. Извеков // Известия РАН. Серия биологическая. – 2011. – Т. 1. – С. 61–67.

Другие издания

3. Извекова, Г.И. Влияние *Caryophyllaeus laticeps* (Cestoda, Caryophyllidea) на активность пищеварительных ферментов леща / Г.И. Извекова, М.М. Соловьев // Сборник научных статей Международного симпозиума “Паразиты Голарктики”. Петрозаводск, 11–14 декабря, 2010. – Т. 1. – С. 116–119.
4. Кашинская, Е.Н. Изменение активности пищеварительных ферментов молоди пресноводных костистых рыб в онтогенезе, в условиях озера Чаны / Е.Н. Кашинская, М.М. Соловьев // Материалы XLVIII Международной научной студенческой конференции “Студент и научно-технический прогресс”. Новосибирск, 10–14 апреля, 2010. – Биология. – С. 93.
5. Соловьев, М.М. Влияние паразитарных инвазий на активность пищеварительных ферментов у ельца сибирского *Leuciscus leuciscus baicalensis* (Dyb) / М.М. Соловьев, И.М. Дубовский, В.В. Глупов // Тезисы докладов X Съезда гидробиологического общества при РАН. Владивосток, 28 сентября – 2 октября, 2009. – С. 376.
6. Соловьев, М.М. Особенности питания и активность протеолитических ферментов рыб в осенний период (бассейна озера Чаны) / М.М. Соловьев // Материалы XI международной научной школы-конференции студентов и молодых ученых “Экология Южной Сибири и сопредельных территорий”. Абакан, 14–17 ноября, 2007. – С. 53.