

На правах рукописи



Реснянский Вячеслав Викторович

**ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ
У БЕЛОРЫБИЦЫ (*STENODUS LEUCISHTHYS GULDENSTADT, 1772*)
В ЛИЧИНОЧНЫЙ И МАЛЬКОВЫЙ ПЕРИОД РАЗВИТИЯ
ПРИ РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ ВЫРАЩИВАНИЯ.**

03.00.16 - экология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Махачкала 2004

Работа выполнена в Каспийском научно-исследовательском институте рыбного хозяйства и на кафедре гидробиологии и общей экологии Астраханского государственного технического университета

Научные руководители:

Заслуженный деятель науки РФ,
доктор сельскохозяйственных наук, профессор, **В.Ф. Зайцев**

доктор сельскохозяйственных наук, профессор, **В.М. Кычанов**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор **А. Р. Исуев**

доктор биологических наук,
ГЖ Магомедов.

Ведущая организация -

Краснодарский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства

Защита состоится 8 апреля 2004 г. в 14 часов на заседании диссертационного Совета Д 212.053.03 по присуждению ученой степени доктора наук при Дагестанском государственном университете по адресу: 367025, г. Махачкала, ул. Дахадаева, 21.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института прикладной экологии Дагестанского государственного университета.

Автореферат разослан « 7 » 03 2004 г.

Ваш отзыв, заверенный печатью, просим направлять по адресу: 367025, г. Махачкала, ул. Дахадаева, 21.

Ученый секретарь
диссертационного Совета,
к.б.н., доцент



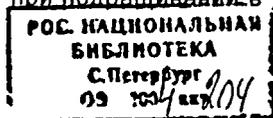
Теймуров А.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Приспособление биологической системы к изменившимся условиям внутренней или внешней среды имеет в своей основе "метаболическую адаптацию". Среди её механизмов - очень большое значение имеет индукция биосинтеза белков, в том числе ферментов. Вопросы, касающиеся влияния особенностей экологии рыб на интенсивность процессов пищеварения, и в частности на активность пищеварительных гидролаз, исследованы достаточно подробно (Уголев, Кузьмина, 1993; Абдурахманов и др., 2003). При этом основное внимание уделялось изучению ферментного спектра и соотношению активности разноименных энзимов у рыб, различающихся по характеру питания, изменению активности различных гидролаз на разных этапах онтогенеза рыб; а так же влиянию сезонных ритмов на уровень ферментной активности. В последнее время в связи с проблемой искусственного* рыборазведения интенсивно исследуется влияние состава кормов на активность пищеварительных гидролаз (Михайлова, 1995; Егорова, 1996; Михайлова и др., 2001; Кузьмина, 2001).

По данным исследований ряда авторов, экологические факторы, такие как температура воды, содержание кислорода и pH среды, в значительной степени способны влиять на гидролитические процессы, протекающие в кишечнике у рыб (Кузьмина, Неваленный, 1986; Неваленный и др., 1990; Nevalyonpu et. al., 1991; Егоров, 1995; Кузьмина, Голованова, 1997; Волкова.1999; Кузьмина, 1999; Абдурахманов и др., 2003). Кроме того, мероприятия, проводимые в прудах при индустриальном выращивании рыбы, также накладывают определенный отпечаток на реализацию пищеварительной функции, воздействуя на организм рыбы в течение всей жизни, причем, как на интенсивность потребления пищи, так и на эффективность утилизации питательных веществ, входящих в их состав (Киселев, 1985; Остроумова, 1986,1988; Зайцев, 1992; Уголев, Кузьмина, 1993). В связи с этим в данной работе предпринята попытка охарактеризовать эколого-физиологические особенности реализации пищеварительной функции у белорыбицы на ранних этапах онтогенеза при выращивании в разных условиях, на примере адсорбированных на слизистой оболочке кишечных ферментов, осуществляющих гидролиз углеводных и белковых компонентов пищи.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы являлось исследование эколого-физиологических особенностей реализации пищеварительной функции на примере кишечных ферментов у белорыбицы (*Stenodus Jeucichthys Guldenstadt, 1772*) в раннем онтогенезе в разных условиях.



В связи с этим в процессе работы предстояло решить следующие задачи:

1. Дать характеристику некоторых экологических факторов водной среды (температура, содержание кислорода, pH) при подращивании молоди белорыбицы в разных условиях.

2. Изучить динамику активности пищеварительных ферментов у белорыбицы на протяжении личиночного и малькового периодов развития, при подращивании в прудах.

3. Исследовать особенности циркадных ритмов активности пищеварительных ферментов у молоди белорыбицы на ранних этапах развития.

4. Изучить динамику активности пищеварительных ферментов у белорыбицы при выращивании на разных кормах.

б. Установить зависимость между возрастом и активностью пищеварительных гидролаз у белорыбицы при выращивании в прудах.

Научная новизна. Впервые получены материалы по влиянию некоторых экологических факторов на активность пищеварительных ферментов различных цепей гидролиза у белорыбицы в период раннего постэмбрионального развития. Получены материалы по исследованию активности пищеварительных ферментов, осуществляющих расщепление углеводной части пищи (общая амилолитическая, α - амилаза) и белковой (нейтральная протеаза) в личиночный и мальковый период развития у белорыбицы при выращивании в прудах и замкнутых системах с использованием разных видов кормов. Впервые у молоди белорыбицы обнаружен феномен зависимости уровня активности пищеварительных ферментов от становления синдрома покатной миграции, обусловленного возрастом.

Практическая значимость работы. Полученные данные могут использоваться для повышения эффективности индустриального воспроизводства белорыбицы, составления научно обоснованных рационов сбалансированных кормов. Работа вносит вклад в решение целого ряда проблем экологии и трофологии; связанных с особенностями физиологического состояния пищеварительной системы белорыбицы на ранних этапах постэмбрионального периодов развития. Знание особенностей циркадной ритмики активности пищеварительных гидролаз, позволяет совершенствовать метод транспортировки молоди белорыбицы. Данные регрессионного, корреляционного и дифференциального анализов могут использоваться в практике аквакультуры с целью научного обоснования стандартов при подращивании молоди белорыбицы в рыбоводных прудах.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы представлялись на IV Всероссийской конференции (Ярославль, 2000), AQUA 2000, Responsible Aquaculture in the new Millennium, (France. 2000), включены в результаты работ «Рыбохозяйственные исследования на Каспии», (КаспНИРХ. 2001), Международной конференции, посвященной 105-летию КаспНИРХа «Молодые ученые о будущем Каспийского моря», (Астрахань 2002)

Публикации По теме диссертации опубликовано 6 работ.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 130 страницах

машинописного текста, иллюстрирована 21 рисунком. Работа состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, указателя цитируемой литературы, включающего 184 источника, в том числе отечественных 131 и 53 иностранных, 1 приложения.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

Дается характеристика систематического положения исследуемого вида, современная концепция развития пищеварения у рыб, пищеварения у сиговых на ранних этапах постэмбрионального периода развития по литературным данным.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Период исследований охватил интервал с 1996 по 2003 годы. Было проанализировано 1285 личинок и 397 мальков белорыбицы (*Stenodus leucichthys* Guldenstadt, 1772). Полевые работы проводились на Александровском осетровом рыбоводном заводе и в условиях аквариального комплекса КаспНИРХа. Камеральную обработку материала осуществляли на кафедре «Гидробиология и общая экология» Астраханского государственного технического университета и в лаборатории «Индустриальных биотехнологий» КаспНИРХа. Уровень активности пищеварительных ферментов исследовали у молоди белорыбицы, подращенной в выростных прудах площадью 2 га. Плотность посадки личинок составила 70 тыс. на 1 га. Кроме этого изучали пищеварительную функцию у мальков, в аквариумах при кормлении различными кормами. Личинки и мальки белорыбицы отбирали на постэмбриональных этапах развития согласно классификации И.И. Смольянова (1957). В аквариальных условиях пробы отбирались начиная с 3 суток после выклева (1 этап). При изучении циркадианной (суточной) ритмики взятие проб на анализ проводили шесть раз в сутки начиная с 9.00 с интервалом в четыре часа, в соответствии с рекомендациями М.А. Щербина (Щербина и др., 1987). Характеристика циркадной ритмики изучалась на двух этапах - 6-том личиночном и 2-ом мальковом. У личинок и молоди белорыбицы, определяли активность адсорбированной на слизистой оболочке кишечника рыб панкреатической α -амилазы и собственно кишечных ферментов, таких как суммарная карбогидразная, нейтральная протеаза. Суммарную карбогидразную активность определяли по приросту гексоз при гидролизе растворимого крахмала методом Нельсона в модификации А.М. Уголева и Н.Н. Иезуитовой (1969). Колориметрирование проводили на ФЭКе (SPEKOL-11) при $\lambda=670$ нм. Активность α -амилазы определяли по убыли крахмала методом Smith Ros в модификации А.М. Уголева (1969). Активность нейтральной протеазы изучали с помощью модифицированного метода Лоури (Алейникова, Рубцова, 1988) по приросту тирозина при гидролизе казеина, приготовленного на фосфатном буфере (pH-7,4).

Определяли стандартные статистические характеристики: среднее ариф-

метическое, среднее квадратичное отклонение, коэффициент вариации, уровень надёжности, ошибку среднего квадратичного отклонения, ошибки средней арифметической. Достоверность различий между средними значениями устанавливали (по Стьюденту). Для определения характера связи между отдельными признаками использовали корреляционный, регрессионный, дифференциальный и многофакторный анализ (по Фишеру).

При решении уравнений регрессии вычисляли X_{\min} ; X_{\max} ; $X_{\text{критич.}}$. Математическую обработку результатов исследования проводили на IBM Pentium MMX 200, с использованием программных пакетов Microsoft Exel, Quadro Pro, Statistic.

ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ВОДНОЙ СРЕДЫ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ БЕЛОРЫБИЦЫ В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ.

Абиотические факторы внешней среды играют важную роль в жизни пойкилотермных животных, в том числе и рыб. Ряд авторов свидетельствуют о наличии различных температурных адаптации у пойкилотермных животных (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 1993; Коростелев, 1996; Кузьмина, Голованова, 1997; Волкова, 1999, Кузьмина, 2001 и др.). В частности, работы последних лет показывают влияние экологических факторов среды на реализацию пищеварительной функции у рыб разных таксономических групп (Кузьмина, Голованова, 1999; Волкова, 1999, Кузьмина, 2001 и др.).

Одним из ключевых этапов личиночного периода является начало перехода личинок на экзогенное питание, так как в это время еще не полностью резорбировался желточный мешок и происходит как бы «тренировка» пищеварительной системы к воздействию энзимов поступающих из вне (индуцируемый аутолиз).

На I этапе развития (3 сутки после выклева) температура воды составляла 5°C, что соответствует существующим нормативам (Летичевский, 1983). До IV этапа развития (27 сутки после выклева) наблюдался равномерный рост температуры воды до 10,7°C. VI этап личиночного развития (45 сутки после выклева) характеризовала увеличением температуры до 12,7°C. На мальковых этапах развития температура воды увеличивалась до 18,2 °C и 20,1°C соответственно. Это привело к сокращению длительности мальковых этапов развития до 4-х и 3-х суток соответственно вместо 11-ти и 7-ми на предыдущих этапах постэмбрионального периода развития.

Высокое содержание кислорода в воде регистрировалось на V и VI этапах личиночного (12,8 мг/л) и I этапе малькового периодов развития (13 мг/л), и более низкое на IV этапе личиночного периода (9,9 мг/л). Максимальная концентрация свободных ионов водорода отмечалась в пробах воды на V этапе личиночного развития (pH= 9,5). На протяжении всего изученного периода pH воды, слабощелочная, все её значения pH были расположены в диапазоне от 7,3 до 9,5. Отсутствие значительных колебаний в уровне pH в природных водах,

используемых в аквакультуре, обусловлено буферной системой с участием двуокси углерода и ионов бикарбоната.

Температурный режим в выростных прудах на начальных этапах постэмбрионального периода развития белорыбицы был достаточно низким, что повлияло на длительность личиночного периода развития. При переходе на мальковый период развития температура воды достигла оптимальных значений при выращивании молоди белорыбицы (18°C-20°C). По данным М.А. Лещевского (1963, 1983), температура воды оказывает значительное влияние на темп роста молоди белорыбицы. При температуре воды ниже 17°C мальковый период у белорыбицы наступает на 30 сутки после выклева при длине 37 мм и массе 0,34г. Повышение температурного режима влияет на увеличение массы молоди на 20-23% (Бирзнек, 1953; Михайлова, 1995; Васильченко, 2002).

Таким образом, температура воды оказывает значительное влияние на темп роста и длительность этапов постэмбрионального периода развития молоди белорыбицы, как в личиночный, так и в мальковый период развития.

Полученные данные показывают, что рыбы отличаются многообразием приспособлений к постоянно изменяющимся условиям окружающей среды и имеют высокую адаптационную пластичность.

При заводском воспроизводстве может специфично изменяться рН среды, окисляемость, содержание газов в воде и т.д., которые в свою очередь прямо влияют на растворимость и проникновение в тело рыб различных веществ. Особую роль играет содержание кислорода, известно, что интенсивность дыхания личинок изменяется по мере их роста (Дементьев, 1996). Среди экологических факторов для гидробионтов имеет изменение температуры в светлое и темное время суток. При исследовании суточной активности гидролаз, учитывались основные абиотические факторы водной среды и их флуктуация в течении суток.

Установлено, что температура воды в пруду в личиночный период в течении суток изменяется на 3,8°C, что отражается на реализации пищеварительной функции на данном этапе развития. В течении суток содержание кислорода в воде варьировало в пределах от 11,9 до 13,4 мг/л, активная реакция среды находилась на уровне 7,3 - 8,4.

Необходимо отметить, что на мальковом этапе развития разница между дневной и ночной температурами ниже, чем на личиночном этапе развития и среднесуточная температура значительно выше. Это приводит к усилению обменных процессов и изменению в питании и росте. В течении суток содержание кислорода в воде изменялось в пределах от 11,3 до 13,4 мг/л, а активная реакция среды находилась на уровне 7,5 - 8,5.

За весь период выращивания молоди белорыбицы в аквариумах нами отмечено увеличение температуры воды от 16,1 °C (I этап развития) до 21,5°C (V этап развития). На протяжении всего периода выращивания содержание кислорода в воде замкнутых систем изменялось в пределах 9,8-10,4 мг/л, активная реакция среды находилась в пределах от 7,1 до 7,8.

Полученные нами данные, показывают, что условия содержания молоди в аквариумах отличаются от выращивания белорыбицы в прудах. Более высокий температурный режим, при выращивании белорыбицы в аквариумах, оказал влияние на скорость развития пищеварительной системы и прохождения последующих этапов постэмбрионального развития. Изменение значений содержания кислорода и Hr среды изменялись в достаточно узком диапазоне.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ АКТИВНОСТИ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ У БЕЛОРЫБИЦЫ В ЛИЧИНОЧНЫЙ ПЕРИОД РАЗВИТИЯ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ.

4.1. Исследование динамики активности пищеварительных ферментов у белорыбицы в личиночный период развития при выращивании в прудах

Рядом авторов установлено, что становление гидролитических функций в значительной мере зависит от типа ферментативной цепи и видовой принадлежности рыб. Кроме того, известно, что на протяжении жизни рыб активность ферментов претерпевает значительные изменения. При этом наиболее существенное увеличение уровня ферментной активности приходится на личиночный период, где определяющее влияние на характер развития пищеварительной функции оказывает интенсивность и спектр питания рыб в первые месяцы постэмбрионального периода (Ильина, 1985; Плотников, Проскуряков, 1983, 1984; Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный, 1996; Волкова, 1999).

Результаты, полученные при исследовании активности ферментов, участвующих в гидролизе углеводов компонентов пищи, свидетельствуют о том, что общая амилолитическая активность и активность α -амилазы у белорыбицы неодинакова на всем периоде личиночного развития (рис. 1, 2). Более высокие показатели скорости гидролиза углеводов компонентов пищи наблюдаются у белорыбицы на II и V этапах развития (11 и 38 сутки после выклева соответственно), а минимальные на I этапе личиночного периода (3 сутки после выклева).

Довольно низкие значения скорости гидролиза белков у личинок белорыбицы можно объяснить тем, что они как и личинки других видов сиговых, в первый период экзогенного питания неспособны эффективно усваивать белки корма (рис.3). Их пищеварительный аппарат еще не полностью сформирован, не продуцирует необходимое количество пищеварительных ферментов для расщепления белкового субстрата. В условиях естественного питания процессы пищеварения у личинок зависят не только от ферментативного аппарата консументов и микрофлоры, населяющий их пищеварительный тракт, но и многочисленных гидролаз жертв (зоопланктон), которые вовлекаются в процессы индуцированного аутолиза (Курлыкин и др., 1986; Кузьмина, 1990; Василевский, Василевская, 1993; Уголев, Кузьмина, 1993). Этим можно объяснить увеличение активности нейтральной протеазы, которая происходит у белоры-

бицы к V этапу личиночного развития (38 сутки после выклева). Снижение активности нейтральной протеазы к VI этапу личиночного периода развития, вероятно, может быть связано со статистически достоверным снижением гидролаз (α -амилаза, $r=0.84$), и других цепей гидролиза.

Таким образом, при исследовании активности пищеварительных гидролаз у белорыбицы, установлено, что ферментативная активность обнаруживается на самых ранних этапах онтогенеза. Нами выявлено, что активность пищеварительных ферментов в процессе личиночного периода развития претерпевает значительные изменения и к переходу на мальковый период происходит перестройка процесса реализации пищеварительной функции, обусловленная переходом на тип питания, характерный для взрослых рыб (видовая особенность).

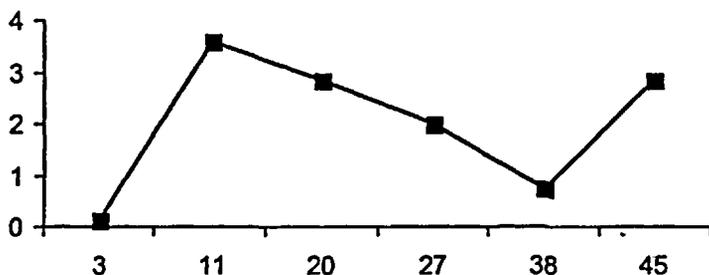


Рис. 1. Динамика общей амилолитической активности у белорыбицы на личиночных этапах развития.

Обозначения: по горизонтали - сутки после выклева
по вертикали - активность фермента, мкМоль/(г*мин) -

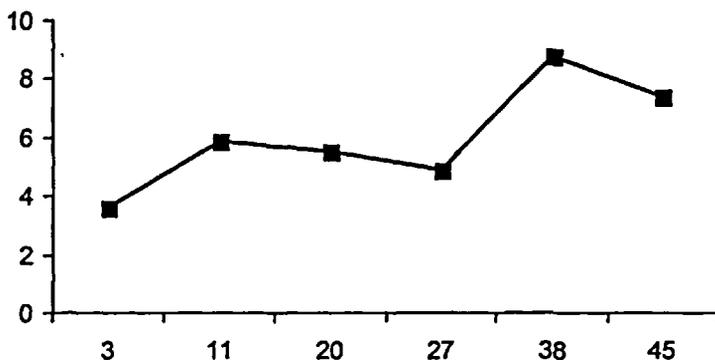


Рис. 2. Динамика активности α -амилазы у белорыбицы на личиночных этапах развития.

Обозначения: по горизонтали-сутки после выклева
по вертикали-активность фермента, мг/(г*мин)

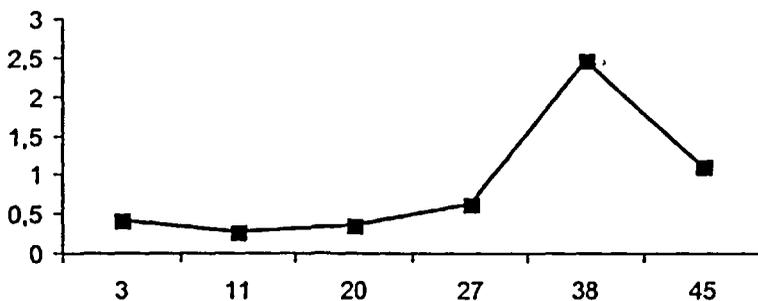


Рис. 3. Динамика активности нейтральной протеазы у белорыбицы на личиночных этапах развития. Обозначения, как на риунке 1.

4.2. Суточная динамика активности пищеварительных ферментов у белорыбицы на VI этапе личиночного периода развития.

Исследование мембранного пищеварения, за счет которого осуществляется расщепление 80-90% химических связей биополимеров, является одним из наиболее актуальных направлений развития современной гастроэнтерологии. В полной мере это относится к исследованию и циркадной адаптации гидролитических систем кишечника.

Полученные нами данные наглядно демонстрируют, что увеличение скорости гидролиза углеводов компонентов корма у белорыбицы на VI этапе личиночного периода развития происходит в ранние утренние (5.00) и вечерние (17.00) часы (рис.4,5). Белковые компоненты корма эффективно расщепляются в ранние утренние (5.00) и дневные (13.00) часы (рис.6). Снижение скорости гидролиза исследуемых ферментов в основном приходится на вечерние (21.00) и ночные (1.00) часы. По-видимому, это связано с изменением температуры воды и спектром питания в течение суток на VI этапе личиночного периода развития.

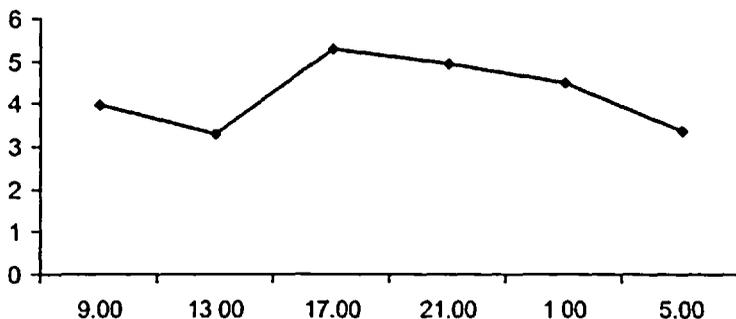


Рис. 4. Динамика общей амилолитической активности у белорыбицы на шестом этапе личиночного периода в течении суток. Обозначения: по горизонтали-время суток по вертикали-активность фермента, мкМоль/(г*мин)

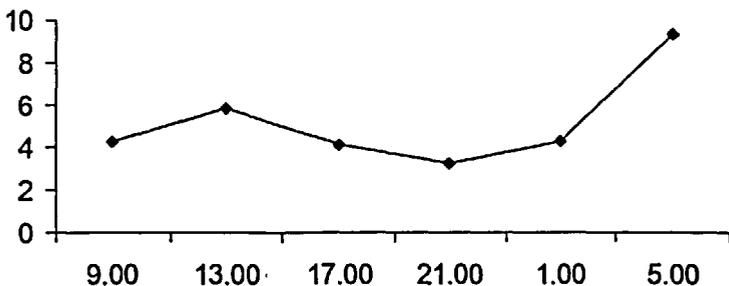


Рис. 5. Динамика суточной активности α -амилазы у белорыбицы на шестом этапе личиночного периода.

Обозначения: по горизонтали-времясуток по вертикали-активность фермента, мг/(г*мин)

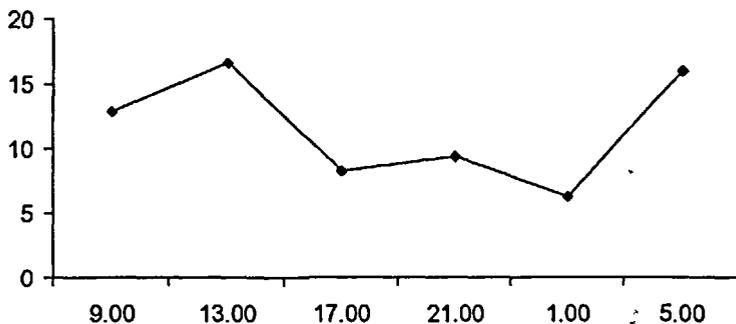


Рис. 6. Динамика суточной активности нейтральной протеазы у белорыбицы на шестом этапе личиночного периода.

Обозначения, - как на рисунке 4.

4.3. Исследование динамики активности пищеварительных ферментов у белорыбицы при кормлении разными кормами

Следует отметить, что состав корма играет немаловажную роль в обменных процессах на начальных этапах онтогенеза у разных видов рыб (Аmineва, Аржомбек, 1984; Смит, 1986; Михайлова, 1995; Федорова и др., 1996; Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2001).

Результаты проведенных экспериментальных исследований по выращиванию белорыбицы на трех видах корма (живом-*Artemia salina* и сухих-*Daphnia magna* и *Gammarus*) показали, что уровень её общей амилалитической активности у белорыбицы при кормлении живым кормом (*Artemia salina*) и сухим (*Daphnia magna* и *Gammarus*) неодинаков, и с возрастом он претерпевает значительные изменения (рис.7). Нами установлено, что на II этапе (7 сутки после выклева) скорость гидролиза исследуемого фермента достигает макси-

мального значения у личинок выращиваемых на сухом корме (*Daphnia magna*) и (*Gammarus*) ($0,595 \pm 0,194$ мкМоль/(гмин) до $1,227 \pm 0,399$ мкМоль/(гмин)) соответственно. При выращивании личинок на науплиях (*Artemia salina*) её максимальный уровень зарегистрирован на III этапе (14 сутки после выклева) постэмбрионального периода развития ($0,336 \pm 0,062$ мкМоль/(гмин)). Это свидетельствует о том, что при одинаковых условиях подращивания (объем, плотность посадки, температурный режим/pH и др.) скорость гидролиза углеводных компонентов пищи зависит от ее состава и формы.

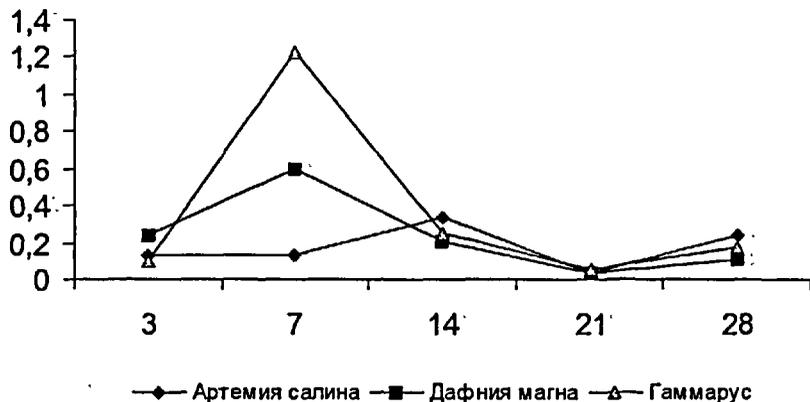


Рис.7. Динамика общей амилолитической активности у белорыбицы при кормлении различными кормами: Обозначения: по горизонтали-сутки после выклева по вертикали-активность фермента, мкМоль/(гмин)

При исследовании активности α-амилазы у белорыбицы было установлено, что максимального значения панкреатическая α-амилаза достигает при кормлении сухими (*Daphnia magna* и *Gammarus*) на II этапе развития (7 сутки после выклева) ($8,008 \pm 0,782$ мг/(гмин) и $10,202 \pm 0,236$ мг/(гмин)) соответственно. При кормлении науплиями (*Artemia salina*) оно отмечено на III этапе постэмбрионального развития (14 сутки после выклева) ($5,406 \pm 0,472$ мг/(г · мин) (рис.8).

Нами установлено, что динамика изменения скорости гидролиза исследуемого фермента на II этапе развития (7 сутки после выклева) совпадает с общей амилолитической активностью. У личинок выращиваемых на науплиях (*Artemia salina*) динамика изменения активности α-амилазы сопоставима с динамикой общей амилолитической активности. Это свидетельствует о том, что на ранних этапах развития у белорыбицы скорость гидролиза углеводной части пищи не зависит от поступающих из вне одноименных гидролаз жертвы и изменения абиотических факторов среды. Это связано с влиянием состава пищи на скорость гидролиза исследуемой гидролазы. Было отмечено, что при кормлении сухими кормами происходит значительное увеличение содержа-

ния амилазы. Процесс ферментной адаптации происходит не сразу после приема корма, а через несколько суток (Шманенков, 1978; Голиков, Патрушин, 1980; Костин и др., 1983). У молоди белорыбицы увеличение активности исследуемых гидролаз было зарегистрировано на 7 сутки после начала кормления сухими кормами.

Таким образом, в процессе развития белорыбицы уровень общей амилолитической активности и активности α -амилазы значительно варьирует в зависимости от состава и формы корма.

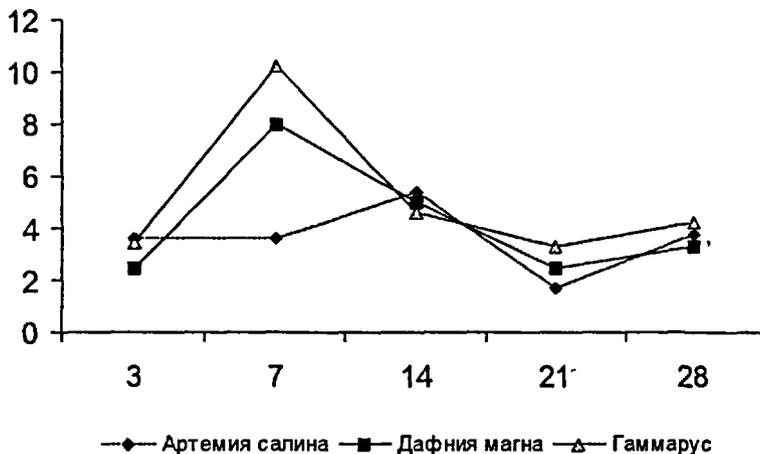


Рис.8. Динамика активности α -амилазы у белорыбицы при кормлении различными кормами.

Обозначения: по горизонтали-сутки после выклева
по вертикали-активность фермента, мг/(г*мин)

ГЛАВА. 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ АКТИВНОСТИ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ У БЕЛОРЫБИЦЫ В МАЛЬКОВЫЙ ПЕРИОД РАЗВИТИЯ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ В ПРУДАХ.

5.1. Исследование динамики активности пищеварительных ферментов у белорыбицы в мальковый период развития при выращивании в прудах

У белорыбицы с возрастом наблюдается возрастание протеазной активности (рН 7,4) на фоне становления и снижения скорости гидролиза углеводных компонентов пищи (α -амилазная и общая амилолитическая активность). Это демонстрирует наличие адаптационных перестроек ферментной системы, реализующей полостное и мембранное пищеварение (рис. 9,10,11).

По нашему мнению, такого рода становление пищеварительной функции обусловлено переходом на тип питания характерный для взрослых рыб и уве-

личением потребности в белковой пищи. Полученные данные сопоставимы с результатами исследований других авторов (Уголев, Кузьмина, 1993, Михайлова, 1995, Ершова, 2003).

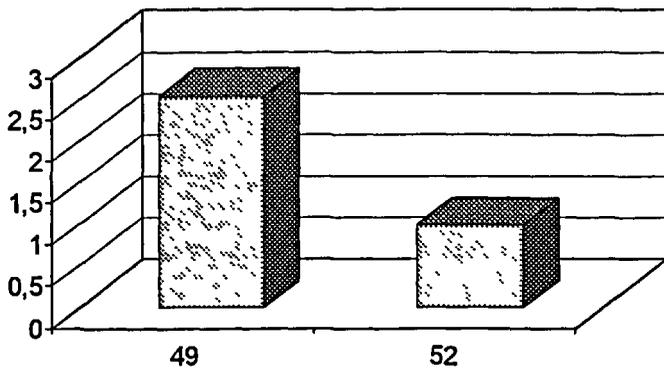


Рис.9. Динамика общей амилолитической активности у белорыбцы на втором этапе малькового периода.

Обозначения: по горизонтали-сутки после выклева
по вертикали-активность фермента, мкМоль/(г*мин)

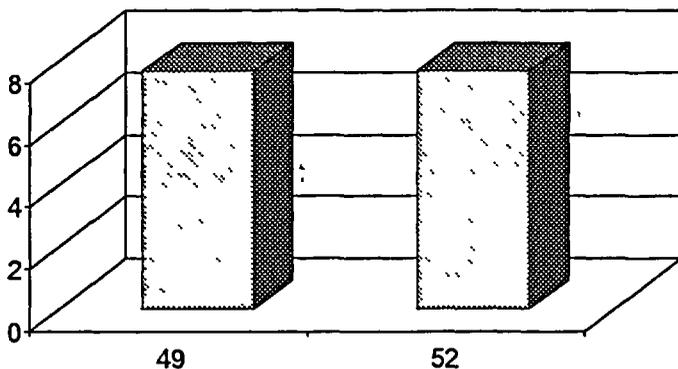


Рис.10. Динамика активности α -амилазы у белорыбцы на втором этапе малькового периода

Обозначения: по горизонтали-сутки после выклева
по вертикали-активность фермента, мг/(г*мин)

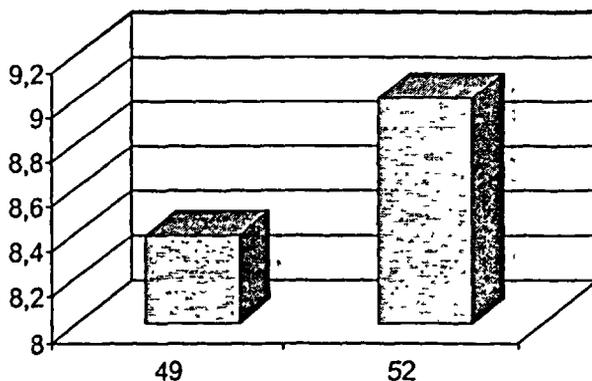


Рис. 11. Динамика активности нейтральной протеазы у белорыбцы на втором этапе малькового периода. Обозначения, как на риунке 9.

5.2. Циркадная ритмика активности пищеварительных ферментов у белорыбцы на II этапе малькового периода -

Скорость гидролиза углеводной и белковой части пищи у белорыбцы на II этапе мальковом периода развития в течении суток неодинакова и флуктуирует (рис. 12,13,14). Особенно сильные колебания активности ферментов происходят в ночные (1.00) и ранние утренние (5.00) часы. Это свидетельствует о связи активности пищеварительных ферментов с особенностями литания данного вида рыб и с влиянием абиотических факторов (температура воды). По мнению ряда авторов, исследовавших особенности питания сиговых рыб на ранних этапах онтогенеза, изменения в активности питания и развитии пищеварительной системы находятся в тесной зависимости от биотических и абиотических факторов и имеют видовую специфичность (Коровина, 1962; Волкова. 1964; Богданова, 1965, 1972; Михайлова. 1995; Михайлова и др., 2001 и др.; Кузьмина, 2001).

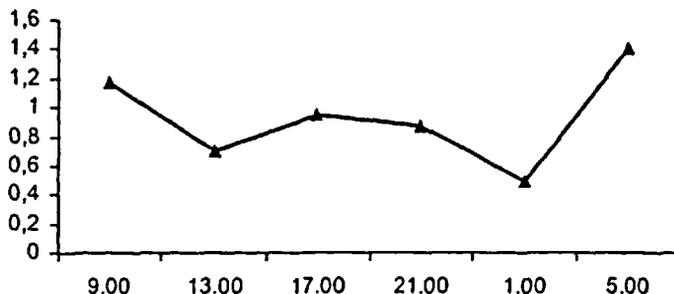


Рис. 12. Динамика общей амилолитической активности у оелорыбцы на втором этапе малькового периода в течении суток. Обозначения: по горизонтали-время суток по вертикали-активность фермента, $\mu\text{Mol}/(\text{г}^*\text{мин})$

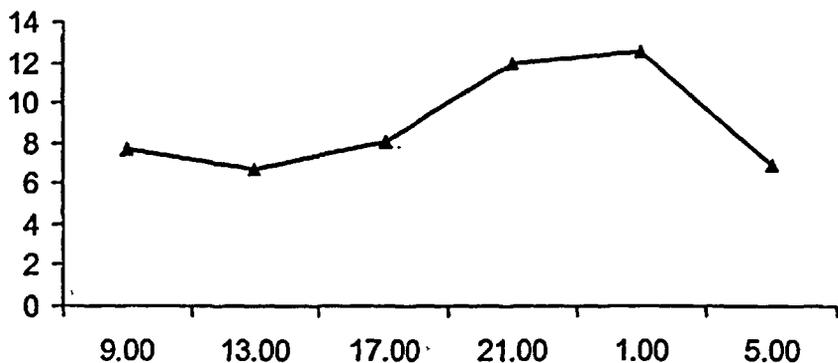


Рис. 13. Динамика суточной активности α -амилазы у белорыбицы на шестом этапе личиночного периода.
 Обозначения: по горизонтали-времясуток
 по вертикали-активность фермента, мг/(г*мин)

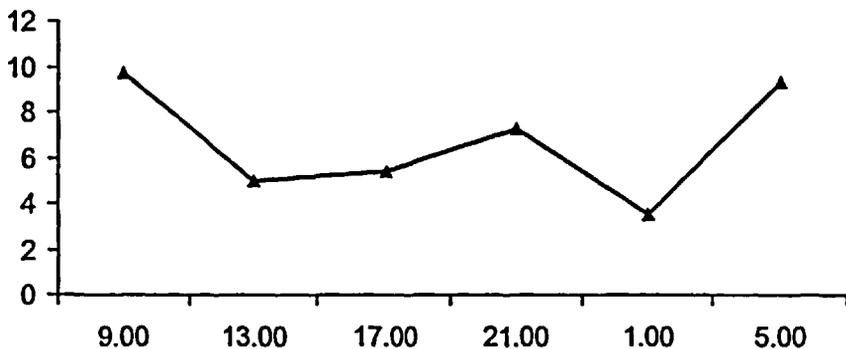


Рис. 14. Динамика суточной активности нейтральной протеазы у белорыбицы на шестом этапе личиночного периода.
 Обозначения, как на риунке 12.

ГЛАВА 6. ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ПЕРИОД ФОРМИРОВАНИЯ СИНДРОМА ПОКАТНОЙ МИГРАЦИИ У ПОДРАЩИВАЕМОЙ В ПРУДОВЫХ УСЛОВИЯХ МОЛОДИ БЕЛОРЫБИЦЫ.

Синдром покатной миграции определяется совокупностью эколого-физиологических признаков, свидетельствующих о становлении комплекса адаптивных и преадаптивных изменений. Адаптивные изменения повышают вероятность выживания покатников в речной период миграции, а преадаптивные – в ранний морской (Кычанов, 1998, 2003). Эта трансформация обусловлена значительными эндокринными и, как следствие, биохимическими изменениями. Это можно назвать специфическим «предвидением» смены экологической среды обитания. При задержке в пресной воде молодь лососёвых теряет преадаптационные признаки и вновь становится туводной, почти потерявшей комплекс функциональных признаков характерных для катадромных покатников.

В этой связи представлялось интересным охарактеризовать состояние пищеварительной функции молоди белорыбицы на протяжении подращивания в прудовых условиях, и выявить её особенности в период развития синдрома покатной миграции. Регрессионный ($y=f(x)$) и дифференциальный ($dy/dx=0$) анализы выявили наличие тесной связи между активностью исследуемых ферментов и возрастом молоди (рис.15). Границы качественного изменения скорости гидролиза углеводов и белковых компонентов корма находятся в следующих пределах (y): 4,489-1,85-0,636. Им соответствуют возрастные характеристики (x)- 29,3; 38,62; 24,3 суток, что в среднем составляет $30,9 \pm 6,43$ суток и соответствует массе молоди белорыбицы $0,96 \pm 0,3г$. Таким образом, нами установлено, что скорость гидролиза углеводов и белковых компонентов корма с одной стороны, находится в тесной зависимости от возраста молоди белорыбицы и является гомеостатическим показателем, с другой, демонстрируя высокую лабильность на определенных этапах раннего онтогенеза, может быть использована при определении периода становления синдрома покатной миграции.

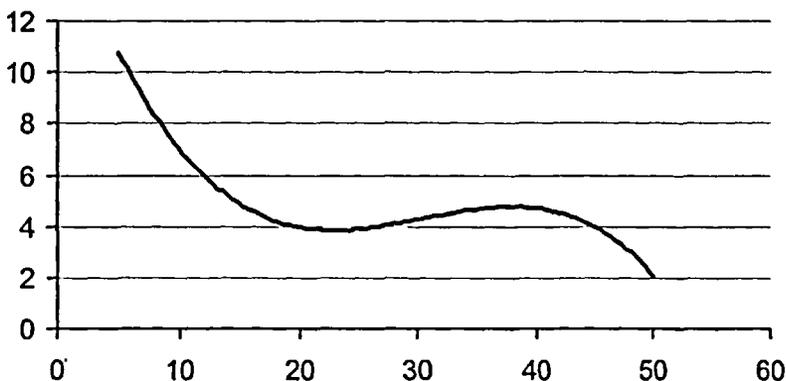


Рис. 15. Динамика изменения активности а-амилазы у белорыбицы в зависимости от возраста. Обозначения: по горизонтали-сутки после выклева по вертикали-мг/(г*мин)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Характерной чертой изменения активности нейтральной протеазы у белорыбицы на личиночном этапе развития является наличие неодинаковой скорости гидролиза субстрата при переходе от этапа к этапу. Снижение активности нейтральной протеазы у белорыбицы на втором этапе развития связано с тем, что, личинки находятся в периоде смешанного питания. После перехода на экзогенное питание, уменьшается скорость гидролиза протеиназ и увеличивается скорость гидролиза карбогидраз. К завершению формирования личинок белорыбицы отмечено снижение общей амилалитической и нейтральной протеазной активности. В это время наблюдается увеличение активности α -амилазы. Это является следствием влияния ферментов одной цепи гидролиза на энзимов других цепей гидролиза.

Активность ферментов расщепляющих углеводную часть пищи при выращивании на живых кормах (науплии *Artemia salina*) отличается от аналогичной при выращивании на неживых кормах (*Daphnia magna* и *Gammarus*).

Скорость гидролиза углеводных и белковых компонентов пищи у белорыбицы неодинакова как на VI этапе личиночного, так и на II этапе малькового периодов развития. Максимум активности исследуемых гидролаз на личиночном этапе развития приходится на утренние (9.00), дневные (13.00) и вечерние (17.00) часы. В мальковый период он зарегистрирован в ночные (1.00) и ранние утренние (5.00) часы. У сформировавшихся мальков протеолитическая активность выше, чем у личинок. Это связано с переходом на хищный тип питания.

Активность исследуемых гидролаз у белорыбицы зависит от этапа развития и тесно коррелирует с возрастом. Регрессионный и дифференциальный анализы полученных данных по активности ферментов расщепляющих углеводную и белковую часть пищи позволили определить критические возрастные параметры у покатников. Они ограничены $30,9 \pm 6,43$ суток, им соответствует масса мальков белорыбицы $0,96 \pm 0,3г$. По данным В.М.Кычанова (1998, 2003) возраст молодежи белорыбицы искусственной генерации, у которой появляются признаки готовности к кататромной миграции, (синдром ската) составляет 30,09 суток. В этот период происходят глубокие функциональные изменения, отражающие уровни преадаптационных и адаптационных изменений.

Таким образом, эколого-энзимотический и регрессионно-дифференциальный анализы могут быть составной частью определения временных границ миграционного окна. Выход за их пределы отрицательно скажется не только на функциональный статус покатников, но и на коэффициенте промыслового возврата.

ВЫВОДЫ.

1. Основные экологические факторы водной среды (температура воды, содержание кислорода, рН среды) находились в пределах обеспечивающих оптимальное подращивание белорыбицы на начальных этапах постэмбрионального периода развития в экспериментальных и производственных условиях.

2. При исследовании активности пищеварительных гидролаз у личинок белорыбицы выявлено, что уровень ферментативной активности проявляется на ранних этапах онтогенеза и изменяется в зависимости от развития пищеварительной системы.

3. У белорыбицы активность кишечных протеаз на всем протяжении личиночного периода испытывает значительную флуктуацию. Максимальная активность нейтральной протеазы приходится на V этап, а минимальная на II этапе личиночного периода.

4. Активность пищеварительных ферментов при формировании молоди белорыбицы претерпевает значительные изменения от личиночного к мальковому периоду развития. В это время функционально происходит перестройка активности пищеварительных ферментов, обусловленная переходом на тип питания, характерный для взрослых рыб.

5. Исследование активности пищеварительных ферментов у белорыбицы на VI этапе личиночного периода позволило обнаружить наличие одного пика активности нейтральной протеазы и общей амилолитической активности в дневные (13.00) и вечерние (17.00) часы. Для активности α -амилазы наличие пика характерно в ранние утренние часы (5.00).

6. На мальковых этапах развития у белорыбицы наблюдается увеличение протеазной активности (рН 7,4) на фоне стабилизации и снижения скорости гидролиза углеводных компонентов пищи (α -амилазная и общая амилолитическая активность). Это отражает наличие интегративных адаптационных перестроек ферментов, реализующих полостное и мембранное пищеварение, в зависимости от возраста и температуры воды.

7. На II этапе малькового периода развития выявлено наличие двух пиков активности нейтральной протеазы и общей амилолитической активности в зависимости от циркадных ритмов (в ранние утренние (5.00) и вечерние (17.00) часы) и одного пика активности α -амилазы в ночное (1.00) время.

8. Скорость гидролиза углеводной части пищи у белорыбицы на первых пяти этапах постэмбрионального развития не зависит от абиотических факторов среды. Она обусловлена влиянием состава пищи на скорость гидролиза исследуемых гидролаз.

9. Показатели активности пищеварительных ферментов могут служить биохимическими тестами оценки функционального состояния молоди белорыбицы. Они должны являться составной частью комплексного эколого-физиологи-

ческого определения параметров возникновения и угасания синдрома покатной миграции, рыбоводного стандарта заводской молоди рыб. Анализ результатов исследования позволил сделать заключение, что оптимальные сроки подращивания молоди белорыбицы находятся в интервале $30,9 \pm 6,43$ суток, соответственно масса мальков составляет $0,96 \pm 0,3г$.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Реснянский В.В. Циркадианная ритмика активности пищеварительных ферментов у молоди белорыбицы при прудовом выращивании // Каспийский Плавающий Университет: Науч. бюлл. / КаспНИРХ-Астрахань, 2000. - № 1. - с. 150 - 151.

2. Реснянский В.В., Егоров С.Н., Зайцев В.Ф. Циркадианная ритмика активности пищеварительных ферментов у молоди белорыбицы при прудовом выращивании // Тез. докл. IX Всероссийской конференции/Ярославль, май 2000г.

3. Реснянский В.В. Влияние факторов среды на пищеварительную функцию у молоди белорыбицы // КаспНИРХ. 2001. - №2 - с. 100 - 102.

4. Михайлова М.В., Реснянский В.В., Сафаралиев И.А. Материалы к рекомендациям по формированию репродуктивного стада белорыбицы в искусственных условиях // Рыбохозяйственные исследования на Каспии: Результаты НИР за 2000 год. - Астрахань: Изд-во КаспНИРХа, 2001. - 364 - 369.

5. Реснянский В.В. Физиолого-биохимическая характеристика статуса молоди белорыбицы // Современные проблемы Каспия: Материалы международной конф. Посвященной 105-летию КаспНИРХ, 24-25 дек. 2002г., - Астрахань, 2002-С. 280-281.

6. Zaitsev V.F., Shipulin S.V., Volkova I.V., Gorden J.V., Egorova V.I., Egorov S.N., Resnyansky V.V. Reseach of proximate and distant gradient of neutral protease activity of sturgeon producers.- AQUA 2000.- Nice, France.- May 2-6,2000.- p. 764.

Сдано в набор 24 01.2004. Подписано в печать 28.01.2004.
Гарнитура «Ара!»». Печать офсетная. Формат 60x84V₁₆.
Бумага офсетная. Усл. п. л 1,5 Тираж 100 экз.

Отпечатано с готовых диапозитивов в типографии
ООО «Издательско-полиграфическое объединение «Юпитер»
367025, г. Махачкала, ул. Пушкина, 6.

№ - 5100

3

Ray