

УДК 639.3:595.771:547.56:612.015.35:577.15

**ВЛИЯНИЕ ФЕНОЛА НА ТЕМПЕРАТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
ПЕПТИДАЗ У ЛИЧИНОК ХИРОНОМИД – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ
ПИТАНИЯ РЫБ-БЕНТОФАГОВ**

¹Кузьмина В.В., ²Чорная Е.Ю., ¹Куливацкая Е.А., ²Шептицкий В.А.

¹ *Институт биологии внутренних вод им. И.Д.Папанова РАН, Борок
Ярославской обл., Российская Федерация;* ² *Приднестровский государственный
университет им. Т.Г. Шевченко, Тирасполь, Молдова.*

Известно, что характер и степень влияния ферментов объектов питания на процессы пищеварения у рыб в значительной мере зависит от вида консумента и жертвы, температуры и рН гастральной и энтеральной сред. В последние десятилетия значительное влияние на активность пищеварительных гидролаз оказывают различные антропогенные факторы, в том числе производные фенола. Цель данной работы – изучение влияния фенола на температурные характеристики казеин- и гемоглоблинитических пептидаз, функционирующих в организме личинок хирономид. Эффекты фенола исследовали в гомогенате личинок хирономид *Chironomus sp.* в диапазоне температур 0-70°C, рН 7.4. Соотношение объемов гомогената и фенола с начальной концентрацией 0.1 ммоль/л (9.41 мг/л) – 1:1; конечная концентрация фенола в процессе прединкубации – 0.025 ммоль/л (2.35 мг/л). Через 1 ч после начала прединкубации добавляли субстрат (казеин или гемоглобин, рН 7.4) и смесь инкубировали 30 мин в термостатируемых камерах. Активность пептидаз оценивали по увеличению концентрации тирозина. В диапазоне температур 0-30°C определяли температурные коэффициенты (Q_{10}) и графическим способом (по данным температурной зависимости) определяли величины энергии активации. Под влиянием фенола активность казеин- и гемоглоблинитических пептидаз при температуре 20°C увеличивается в 1.2 и 1.9 раза, соответственно. Фенол не влияет на величину температурного оптимума активности казеин- и гемоглоблинитических пептидаз личинок хирономид в диапазоне 0-30°C, но изменяет форму кривых температурной зависимости за счет резкого увеличения ферментативной активности при 40°C ($P < 0.05$). Отмечены изменения величин Q_{10} и энергии активации ($E_{акт}$) под влиянием фенола. В присутствии фенола значения $E_{акт}$ гидролиза гемоглобина в зоне 0-20°C при более высокой температуре изменяются разнонаправленно – при низких температур увеличиваются в 1.2 раза, в зоне более высоких температур уменьшаются в 1.3 раза. Полученные данные свидетельствуют о значительном влиянии фенола на активность и температурные характеристики пептидаз личинок хирономид, что может отрицательно влиять на процессы пищеварения рыб-бентофагов, активно потребляющих личинки хирономид.

Ключевые слова: личинки хирономид, фенол, активность пептидаз, температурные эффекты

Проблемы биологии продуктивных животных, 2017, 4: 47-55

Введение

После описания А.М. Уголевым (1985) механизма индуцированного аутолиза и симбионтного пищеварения стало ясно, что процессы пищеварения у рыб нельзя рассматривать без учета ферментов объектов питания и симбионтной микрофлоры (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2000, 2015). Если в процессах пищеварения желудочных рыб важную роль играют лизосомальные гидролазы различных тканей жертвы, то в процессах аутодеградации объектов питания бентофагов в основном участвуют ферменты, синтезируемые их пищеварительной системой (панкреатические и мембранные гидролазы). При исследовании различных гидробионтов в качестве потенциальных жертв показано, что их ферменты могут компенсировать

низкую активность одноимённых гидролаз консументов при низких значениях температуры и pH (Кузьмина, 2015; Кузьмина и др., 2016).

При изучении активности казеинлитических пептидаз в целом организме ряда видов пресноводных гидробионтов, относящихся к типам Mollusca, Annelida и Arthropoda показано, что она в 5-15 раз ниже таковой слизистой оболочки кишечника рыб (Уголев, Кузьмина, 1993). Позднее было установлено, что активность пептидаз и гликозидаз в тканях кормовых объектов леща *Abramis brama* с учетом доли каждого вида жертвы в рационе рыб из Рыбинского водохранилища в зависимости от pH может составлять до 50%, у синца *A. ballerus* – до 25% активности ферментов консумента (Кузьмина и др., 1999).

Сведения о температурной зависимости пептидаз, функционирующих в организме объектов питания молоди рыб и взрослых бентофагов, обитающих в пресноводных водоемах, единичны (Кузьмина, 1999; Кузьмина и др., 2014; Скворцова и др., 2016). При этом известно, что величина вклада ферментов объектов питания в процессы пищеварения рыб в значительной мере зависит от вида консумента и жертвы, температуры и pH гастральной и энтеральной сред (Кузьмина, 2015). В последние десятилетия значительное влияние на активность пищеварительных гидролаз оказывают различные антропогенные факторы, в том числе производные фенола.

В естественных условиях фенолы образуются в процессе метаболизма водных организмов, а также при биохимическом распаде и трансформации органических веществ, протекающих в воде и в донных отложениях, не представляя опасности для экосистем (Запрометов, 1974; Michałowicz, Duda, 2007; Ali et al., 2011). Однако при увеличении концентрации фенол и, особенно, его производные становятся опасными. Наибольшую опасность представляет загрязнение водоёмов в результате попадания в воду отходов промышленного производства, особенно предприятий нефте- и сланцеперерабатывающей, коксо- и лесохимической, а также анилиноокрасочной промышленности (Майстренко, Клюев, 2004; Michałowicz, Duda, 2007).

Фенол, относящийся к группе нервно-паралитических ядов, вызывает резкие нарушения функций центральной нервной системы (Лукьяненко, 1983; Флеров, 1989), вследствие блокирования ионных каналов (Michałowicz, Duda, 2007). Помимо этого, фенол вызывает некроз кожи (Clayton, Clayton, 1994), повреждает почки (Флерова (Назарова), Заботкина, 2012), мышцы (Ford et al., 2001), глаза (Michałowicz, Duda, 2007) и иммунную систему (Taysse et al., 1995). Известно о влиянии фенола на активность пищеварительных ферментов у рыб (Кузьмина и др., 2015, 2017). Сведения о влиянии фенола на температурные характеристики ферментов, способных разрушать белковые компоненты тканей потенциальных объектов питания рыб, в доступной литературе отсутствуют.

Цель данной работы – изучение влияния фенола на температурные характеристики пептидаз, функционирующих в организме личинок хирономид.

Материал и методы

Объект исследования: тип членистоногие Arthropoda, кл. насекомые Insecta, сем. Chironomidae, комары рода *Chironomus*, личинки комаров *Chironomus sp.* (суммарно). Средняя масса одной личинки – 7.5 мг. Для определения активности и характеристик ферментов использовали метод смешанных проб (Егорова и др., 1974). В качестве ферментативно активных препаратов использовали гомогенаты предварительно размельчённых и тщательно перемешанных десятков экземпляров личинок. Все операции проводили на холоду. Аликвоты проб (0.5-1.0 г) 1 гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с небольшим количеством раствора Рингера для холоднокровных животных (103 mM NaCl, 1.9 mM KCl, 0.45 mM CaCl₂, pH 7.4) при температуре 2-4°C. Для этого стеклянный гомогенизатор помещали в стакан со льдом. Затем гомогенат дополнительно разводили раствором Рингера до конечного разведения – 1:99.

Для оценки влияния фенола на активность пептидаз личинок хирономид предварительно инкубировали 0.25 мл гомогената и 0.25 мл фенола в начальной концентрации 0.1

ммоль/л (9.41 мг/л). Через 1 ч после начала прединкубации в пробирки добавляли 0.5 мл 1 % субстрата (казеина или гемоглобина, рН 7.4), приготовленного на том же растворе Рингера, и смесь инкубировали ещё 30 мин в специальных термостатируемых камерах. После разведения раствора фенола в процессе прединкубации и инкубации его конечная концентрация составляла 0.025 ммоль/л или 2.35 мг/л). Все операции проводили при температуре 20°C и непрерывном перемешивании. Активность пептидаз (преимущественно активность трипсина, КФ 3.4.21.4 или химотрипсина КФ 3.4.21.1) оценивали по увеличению концентрации тирозина методом Ансона (Anson, 1938) в некоторой модификации. Активность ферментов определяли в 5 повторностях с учётом фона (количество тирозина в исходном гомогенате). Об уровне ферментативной активности судили по приросту продуктов реакции за 1 мин инкубации субстрата и ферментативно активного препарата с учётом фона (количество тирозина в исходном гомогенате) в расчёте на 1 г сырой массы ткани, мкмоль/(г·мин). Интенсивность окрашивания определяли на фотоколориметре (КФК-2) при красном светофильтре, $\lambda=670$ нм. Кроме того, вычисляли температурные коэффициенты (Q_{10}) в диапазоне температур 0-30°C и графическим способом Аррениуса (по данным температурной зависимости) определяли величины энергии активации (см. предыдущую статью).

Результаты и обсуждение

Влияние фенола на температурную зависимость активности пептидаз в гомогенате личинок хирономид по казеину, рН 7.4, в отсутствие фенола. Активность пептидаз в гомогенатах контрольных личинок хирономид по казеину, рассчитанная стандартным способом, при 20 и 40°C составляла 0.81 ± 0.14 и 1.65 ± 0.13 , в присутствии фенола – 0.94 ± 0.20 и 3.72 ± 0.21 мкмоль/(г·мин) соответственно, $P < 0.001$ лишь при 40°C. Исследование активности пептидаз в широком диапазоне температур позволило выявить различия в форме кривых температурной зависимости казеинлитических пептидаз, функционирующих в отсутствие и в присутствии фенола (рис. 1).

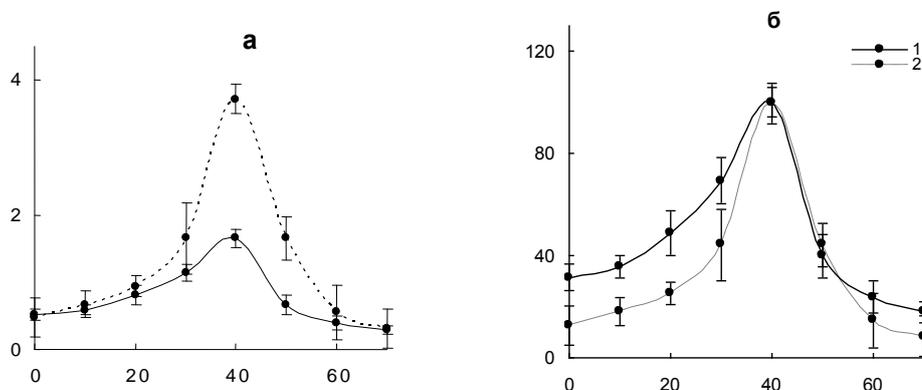


Рис. 1. Влияние фенола на температурную зависимость казеинлитических пептидаз в гомогенате личинок хирономид. Обозначения: по оси абсцисс: температура, °C, по оси ординат: а – активность ферментов, мкмоль/(г·мин); б – относительная активность, % от максимальной активности; 1 – в отсутствие фенола, 2 – в присутствии фенола.

Особого внимания заслуживает значительное повышение активности казеинлитических пептидаз в зоне температур 30-50°C, при 40 и 50°C. В диапазоне жизнедеятельности личинок хирономид (20°C и ниже), а также в зоне 60-70°C, напротив, величины активности казеинлитических пептидаз исключительно схожи. Относительная активность казеинлитических пептидаз в зоне 0-30°C в присутствии фенола значительно ниже, чем в контроле.

Влияние фенола на температурную зависимость активности пептидаз по гемоглобину в гомогенате личинок хирономид, рН 7.4. Активность пептидаз по гемоглобину, рассчитанная стандартным способом, при 20 и 40°C составляла 0.74 ± 0.19 и 3.10 ± 0.53 , в присутствии фенола – 1.37 ± 0.08 и 4.08 ± 0.22 мкмоль/(г·мин) соответственно, $P < 0.05$ лишь при 20°C. Исследование активности пептидаз в широком диапазоне температур также позволило выявить различия в форме кривых температурной зависимости гемоглобинлитических пептидаз, функционирующих в отсутствие и в присутствии фенола (рис. 2).

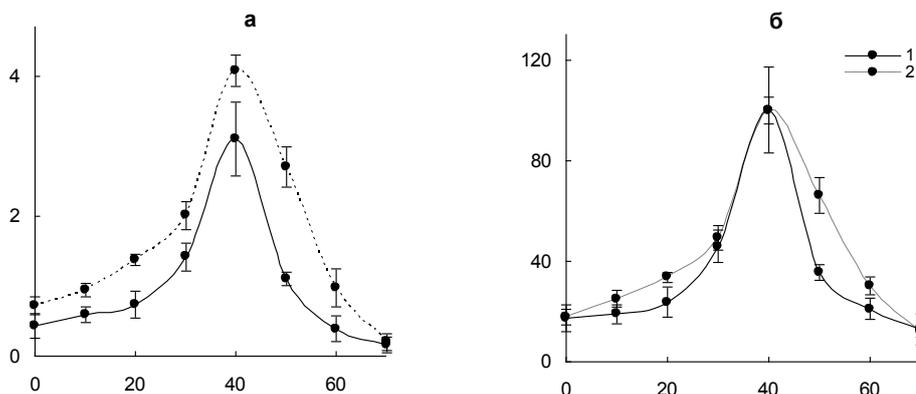


Рис. 2. Влияние фенола на температурную зависимость активности гемоглобинлитических пептидаз в гомогенате личинок хирономид. Обозначения: а – активность, мкмоль/(г·мин), б – относительная активность, % от максимальной активности; 1 – в отсутствие фенола, 2 – в присутствии фенола.

В отличие от казеинлитических пептидаз абсолютные значения активности под влиянием фенола увеличиваются в более широком диапазоне температур (0–60°C). Вместе с тем нельзя не заметить, что кривые температурной зависимости активности пептидаз в опыте и контроле исключительно схожи, о чём свидетельствует совпадение значений относительной активности гемоглобинлитических пептидаз практически во всём диапазоне исследованных температур.

Влияние фенола на температурные коэффициенты (Q_{10}) пептидаз в гомогенате личинок хирономид. Данные, касающиеся температурных коэффициентов активности пептидаз личинок хирономид в широком диапазоне температур, свидетельствуют о том, что величины Q_{10} в большинстве случаев ниже 2.0, причем в зоне постмаксимальных температур они ниже 1.0 (табл. 1). При этом в контроле в случае казеинлитических пептидаз наиболее высокие значения показателя выявлены в зоне 10–40°C, в опыте резкий подъем отмечен в зоне 20–40°C. В случае гемоглобинлитических пептидаз в контроле наиболее высокие значения показателя выявлены в зоне 20–40°C, в опыте – при 40°C.

Таблица 1. Температурные коэффициенты (Q_{10}) пептидаз в гомогенате личинок хирономид в отсутствие и в присутствии фенола.

Субстрат	0-10°C	10-20°C	20-30°C	30-40°C	40-50°C	50-60°C	60-70°C
Казеин, 1	1.1	1.4	1.4	1.4	0.4	0.6	0.7
Казеин, 2	1.4	1.4	1.8	2.3	0.4	0.3	0.6
Гемоглобин, 1	1.4	1.3	1.9	2.2	0.4	0.4	0.4
Гемоглобин, 2	1.3	1.5	1.5	2.0	0.6	0.4	0.2

Примечания: здесь и в табл. 2: 1 – в отсутствие фенола; 2 – в присутствии фенола (опыт).

Важно отметить, что в зоне температур жизнедеятельности (10–30°C, оптимальная температура для личинок хирономид 17–18°C) для всех препаратов характерны незначительные вариации средних величин Q_{10} казеин- и гемоглобинлитических пептидаз (в случае казе-

инлитических пептидаз 1.4 и 1.6, в случае гемоглобинлитических пептидаз 1.6 и 1.5 в контроле и опыте соответственно).

Влияние фенола на энергию активации гидролиза казеина и гемоглобина пептидазами в гомогенате личинок хирономид. Данные, касающиеся $E_{\text{акт}}$ пептидаз, функционирующих в составе тканей личинок хирономид в диапазоне температур 0-30°C, свидетельствуют о зависимости величины показателя от субстрата и наличия фенола (табл. 2).

Таблица 2. Энергия активации пептидаз ($E_{\text{акт}}$, ккал/моль) в гомогенате личинок хирономид в отсутствие и в присутствии фенола.

Субстрат	0-10°C	10-20°C	20-30°C	30-40°C	точка изгиба
Казеин 1	3.5	3.5	6.5	6.5	20°C
Казеин 2	5.5	5.5	12.6	12.6	20°C
Гемоглобин 1	4.2	4.2	13.2	13.2	20°C
Гемоглобин 2	5.1	5.1	10.1	10.1	20°C

Также важно отметить наличие изгиба на графике Аррениуса при 20°C. При этом в контроле значения $E_{\text{акт}}$ гидролиза казеина в диапазоне 0-20°C ниже, чем в зоне более высоких температур в 1.9 раза. В присутствии фенола значения $E_{\text{акт}}$ в этих зонах увеличиваются в 1.6 и 1.9 раза соответственно. При исследовании в качестве субстрата гемоглобина также выявлен изгиб на графике Аррениуса при 20°C. При этом в контроле значения $E_{\text{акт}}$ процесса гидролиза гемоглобина в диапазоне 0-20°C ниже, чем в зоне более высоких температур в 3.1 раза. В присутствии фенола значения $E_{\text{акт}}$ в этих зонах изменяются разнонаправлено – в зоне низких температур увеличиваются в 1.2 раза, в зоне более высоких температур уменьшаются в 1.3 раза.

При анализе полученного материала следует отметить, что нами исследован интегративный показатель, отражающий активность ряда эндопептидаз (действующих по типу трипсина, химотрипсина и эластазы), экзопептидаз (различные карбоксипептидазы) и, возможно, катепсинов G, L и H, оптимум pH которых находится при 7.0 (Кузьмина, 2015). Наибольшее значение имеют трипсиноподобные пептидазы, разрывающие связи, образуемые карбоксильными группами аргинина и лизина (казеинлитические пептидазы), и химотрипсиноподобные (гемоглобинлитические) пептидазы, действующие на связи, образуемые карбоксильными группами тирозина, триптофана и фенилаланина (Антонов, 1983; Кузьмина, 2015). Данные, касающиеся активности казеин- и гемоглобинлитических пептидаз в тканях личинок хирономид при стандартной температуре (20°C) и pH (7.4) в расчете на 1 г влажной массы тканей, а также в области температурного оптимума (40°C), в значительной степени близки полученным ранее результатам (Скворцова и др., 2016). Также подтверждены сведения о том, что в присутствии фенола активность пептидаз увеличивается (Кузьмина и др., 2016). Действительно, в присутствии фенола и его производных (2-хлорфенола, 4-хлорфенола, 2-нитрофенола и 2-аминофенола) в концентрациях 31.3-250 мг/л активность казеинлитических пептидаз в целом организме личинок хирономид значительно увеличивается, особенно при повышенных концентрациях. Важно отметить, что в присутствии фенола уровень ферментативной активности по обоим субстратам наиболее сильно увеличивается в зоне температурного оптимума. При этом относительная активность казеинлитических пептидаз личинок хирономид в зоне 0-30°C в присутствии фенола значительно снижается, а гемоглобинлитических пептидаз в зоне 10-30°C – незначительно увеличивается.

Ранее было показано, что под влиянием модификаторов (трибутирина и L-фенилаланина) характер кривых температурной зависимости ферментов рыб (общая амилолитическая активность, активность ферментов группы мальтаз и щелочная фосфатаза) в значительной мере сохраняется. Однако уровень ферментативной активности изменяется, причём в зависимости от вида рыб и структуры модификатора возможно как торможение, так и стимуляция активности. Так, уровень общей амилолитической активности слизистой оболочки кишечника у леща *Abramis brama* и плотвы *Rutilus rutilus* практически во всём диапа-

зоне исследованных температур снижается, у щуки *Esox lucius* – увеличивается. При 0 и 70°C модификаторные эффекты отсутствуют или слабо выражены.

Данные, полученные при исследовании влияния трибутирина на активность ферментов группы мальтаз, свидетельствуют о меньшем по величине, но схожем по характеру эффекте. Уровень щелочно-фосфатазной активности также значительно изменяется в присутствии трибутирина. Для леща и плотвы характерен эффект стимуляции ферментов, для щуки и налима *Lota lota* – меньший по величине эффект торможения. При этом в разных температурных зонах возможны изменения характера эффекта, например, ингибирование активности фермента в зоне низких и физиологических температур, но стимуляция – в зоне высоких температур (Кузьмина, 1989).

Данные, касающиеся температурных коэффициентов пептидаз тканей личинок хирономид, подтверждают классические представления о резком уменьшении величин Q_{10} в зоне постмаксимальных температур в результате денатурации белковых глобул ферментов. Вычисление величин $E_{\text{акт}}$ гидролиза белковых компонентов личинок хирономид позволило выявить их значительную зависимость от субстрата – у контрольных особей значения $E_{\text{акт}}$ казеинлитических пептидаз в зоне низких температур ниже по сравнению с таковыми гемоглобинлитических пептидаз в 1.2 раза, в зоне высоких температур – в 1.9 раза. Особого внимания заслуживает тот факт, что значения $E_{\text{акт}}$ казеинлитических пептидаз в присутствии фенола в диапазоне температур 0–40°C увеличиваются, следовательно, эффективность процесса снижается. Значения $E_{\text{акт}}$ гемоглобинлитических пептидаз в присутствии фенола увеличиваются лишь в зоне более низких температур, в то время как в зоне более высоких температур снижаются. Следовательно, эффективность процесса гидролиза белковых компонентов тканей личинок хирономид трипсиноподобными пептидазами в присутствии фенола снижается во всем диапазоне температур, гемоглобинлитическими пептидазами – лишь в зоне температур, не превышающих 20°C.

Ранее подчеркивалось, что при исследовании $E_{\text{акт}}$ пойкилотермных животных необходимо учитывать фактор, который обычно не учитывается при описании ферментов теплокровных животных – изменение регуляторных свойств в широких пределах температуры среды обитания (Уголев, Кузьмина, 1993). Это обстоятельство особенно важно, так как для ряда ферментных систем пойкилотермных животных установлено, что понижение температуры окружающей среды выступает в роли положительного модулятора ферментативной активности (Ночачка, Somero, 1973). В результате этого конформация активного центра фермента изменяется не только вследствие взаимодействия с веществами-модификаторами, но и вследствие непосредственного воздействия температуры на молекулы фермента. Вместе с тем, значительная вариабельность исследуемых характеристик связана, по всей вероятности, с большей гибкостью ферментов пойкилотермных животных, по сравнению с таковой гомойотермных животных (Александров, 1975; Уголев, Кузьмина, 1993). Полученные данные важны для понимания роли объектов питания в процессах пищеварения рыб и разработки новых подходов к кормлению рыб в условиях аквакультуры.

Заключение

Активность пептидаз, функционирующих в тканях личинок хирономид *Chironomus sp.* – объектов питания бентофагов при pH 7.4 и температуре 20°C по казеину несколько выше, чем по гемоглобину (0.81 ± 0.14 и 0.74 ± 0.19 мкмоль/г·мин соответственно). Температурный оптимум пептидаз личинок хирономид в обоих случаях соответствует 40°C. В зоне температурного оптимума активность казеинлитических пептидаз ниже, чем гемоглобинлитических пептидаз в 1.9 раза. В зоне температур жизнедеятельности личинок хирономид (10–30°C) для всех препаратов характерно незначительное колебание средних величин Q_{10} казеин- и гемоглобинлитических пептидаз. Значения энергии активации гидролиза казеина в присутствии фенола увеличиваются во всем диапазоне температур жизнедеятельности личинок хирономид, гемоглобина – лишь в зоне более низких температур. Полученные данные важны для понима-

ния роли объектов питания в процессах пищеварения рыб и разработки новых подходов к кормлению рыб в условиях аквакультуры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров В. Я. Клетки, макромолекулы и температура. – Л.: Наука, 1975. – 330 с.
2. Егорова В.В., Иезуитова Н.Н., Тимофеева Н.М., Туляганова Е.Х., Гурман Э.Г., Щербаков Г.Г., Уголев А.М. Некоторые температурные характеристики и температурные адаптации ферментов, обеспечивающих мембранное пищеварение у пойкилотермных и гомойотермных животных // Журн. эвол. биохим. физиол. – 1974. – Т. 10. – № 3. – С. 223-231.
3. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. – М.: Высшая школа, 1974. – 214 с.
4. Кузьмина В.В. Влияние температуры на пищеварительные гидролазы беспозвоночных животных // Журн. эвол. биохим. физиол. – 1999. – Т. 35. – № 1. – С. 15-19.
5. Кузьмина В.В., Голованова И.Л., Скворцова Е.Г. Вклад ферментов кормовых объектов в процессы пищеварения рыб // Вопр. ихтиологии. – 1999. – Т. 39. – № 3. – С. 384-393.
6. Кузьмина В.В. Вклад индуцированного аутолиза в процессы пищеварения вторичных консументов на примере гидробионтов // Доклады РАН. – 2000. – Т. 373. – № 1. – С. 132-134.
7. Кузьмина В.В., Скворцова Е.Г., Лузанова К.А., Лебедев Д.С., Николаичев К.А. Влияние температуры на активность пептидаз потенциальных объектов питания рыб разных экологических групп // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2014. – № 4. – С. 35-45.
8. Кузьмина В.В. Процессы экзотрофии у рыб. Организация. Регуляция. Адаптации. – М.: Полиграф-Плюс, 2015. – 260 с.
9. Кузьмина В.В., Грачева Е.Л., Тарлева А.Ф. Влияние фенола и его производных на активность пептидаз слизистой оболочки и химуса у рыб // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2015. – № 3. – С. 59-67.
10. Кузьмина В.В., Заведенкова Л.В., Грачева Е.Л. Влияние фенола и его производных на активность казеинлитических пептидаз у личинок хирономид – потенциальных объектов питания рыб // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2016. – № 4. – С. 37-45.
11. Кузьмина В.В., Тарлева А.Ф., Грачева Е.Л. Влияние различных концентраций фенола и его производных на активность пептидаз кишечника рыб // Биология внутренних вод. – 2017. – № 2. – С. 104-111.
12. Лукьяненко В.И. Общая ихтиотоксикология. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. – 320 с.
13. Майстренко В.Н., Ключев Н.А. Эколого-аналитический мониторинг стойких органических загрязнителей. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2004. – 328 с.
14. Скворцова Е.Г., Егорова А.А., Кузьмина В.В. Влияние температуры и кислотности среды на активность пептидаз у личинок хирономид – потенциальных объектов питания рыб-бентофагов // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2016. – № 4. – С. 46-56.
15. Уголев А.М. Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций. – Л.: Наука, 1985. – 544 с.
16. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. – СПб.: Гидрометеиздат, 1993. – 238 с.
17. Флеров Б.А. Эколого-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных. – СПб.: Наука, 1989. – 144 с.
18. Флерова (Назарова) Е.А., Заботкина Е.А. Токсическое действие сублетальных концентраций фенола и нафталина на мезонефрос серебряного карася // Токсикол. вестник. – 2012. – № 4. – С. 49-51.
19. Alabaster J.S., Lloyd R. Water quality criteria for freshwater fish. – London: Butterworths, FAO. United Nations, 1980. – 297 p.
20. Ali S.M., Sabac S.Z., Fayez M., Moniband M., Hegazi N.A. The influence of agro-industrial effluents on River Nile pollution // J. Adv. Res. – 2011. – Vol. 2. – P. 850-895.
21. Anson M. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin // J. Gen. Physiol. – 1938. – Vol. 22. – P. 79-83.
22. Clayton G.D., Clayton F.E. Patty's industrial hygiene and toxicology. – New York: John Wiley & Sons Inc. Publ., 994. – 132 p.
23. Ford M.D., Delaney K.A., Ling L.J., Erickson T. Clinical Toxicology. – Philadelphia: W.B. Saunders Company Publ., 2001. – 753 p.
24. Hochachka P.W., Somero G.N. Strategies of biochemical adaptation // Philadelphia, London, Toronto: W.B. Saunders Company Publ., 1973. – 418 p.

25. Michałowicz J., Duda W. Phenols – sources and toxicity // Polish J. Environ. Stud. – 2007. – Vol. 16. – No. 3. – P. 347-362.
26. Taysse L., Troutaud D., Khan N.A., Deschaux P. Structure-activity relationship of phenolic compounds (phenol, pyrocatechol and hydroquinone) on natural lymphocytotoxicity of carp (*Cyprinus carpio*) // Toxicology. – 1995. – Vol. 98. – P. 207-214.

REFERENCES

1. Alabaster J.S., Lloyd R. *Water quality criteria for freshwater fish*. London: Butterworths, FAO. United Nations, 1980, 297 p.
2. Alexandrov V. Ya. *Kletki, makromolekuly i temperatura* (Cells, macromolecules and temperature). Leningrad: Nauka Publ., 1975, 330 p.
3. Ali S.M., Sabac S.Z., Fayed M., Moniband M., Hegazi N.A. The influence of agro-industrial effluents on River Nile pollution. *J. Adv. Res.* 2011, 2: 850–895.
4. Anson M. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 1938, 22: 79-83.
5. Clayton G.D., Clayton F.E. *Patty's industrial hygiene and toxicology*. New York: John Wiley & Sons Inc. Publ., 1994, 132 p.
6. Ford M.D., Delaney K.A., Ling L.J., Erickson T. *Clinical Toxicology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company Publ., 2001, 753 p.
7. Egorova V.V., Iezuitova N.N., Timofeeva N.M., Tulyaganova E.Kh., Gurman E.G., Shcherbakov G.G., Ugolev A.M. *Zhurnal evolyutsionnoi biokhīmii i fiziologii* - *J. Evol. Biochem. Physiol.* 1974, 10(3): 223-231.
8. Flerov B.A. *Ekologo-fiziologicheskie aspekty toksikologii presnovodnykh zhitovnykh* (Ecological and physiological aspects of freshwater animals toxicology). St. Petersburg: Nauka Publ., 1989, 144 p.
9. Flerova (Nazarova) E.A., Zabolotkina E.A. *Toksikologicheskiy vestnik - Toxicological Review.* 2012, 4: 49-51.
10. Hochachka P.W., Somero G.N. *Strategies of biochemical adaptation*. Philadelphia, London, Toronto: W.B. Saunders Company Publ., 1973, 418 p.
11. Kuz'mina V.V. *Zhurnal evolyutsionnoi biokhīmii i fiziologii* - *J. Evol. Biochem. Physiol.* 1999, 35(1): 15-19.
12. Kuz'mina V.V., Golovanova I.L., Skvortsova Ye.G. *Voprosy Ichthyology - Journal of Ichthyology.* 1999, 39(3): 384-393.
13. Kuz'mina V.V. *Doklady Rossiiskoi Akademii Nauk - Proc. Russ. Acad. Sci.* 2000, 339(1): 172-174.
14. Kuz'mina V.V., Skvortsova E.G., Luzanova K.A., Lebedev D.S., Nikolaitchev K.A. *Problemy biologii produktivnykh zhitovnykh - Problems of Productive Animal Biology.* 2014, 4: 35-45.
15. Kuz'mina V.V. *Protsessi eksotrofii u ryb. Organizatsiya. Regulatsiya. Adaptatsii* (Exotrophic processes in fish. Organization. Regulation. Adaptations). Moscow: Polygraph Plus Publ., 2015, 259 p.
16. Kuz'mina V.V., Gracheva E.L., Tarleva A.F. *Problemy biologii produktivnykh zhitovnykh - Problems of Productive Animal Biology.* 2015. 3: 59-67.
17. Kuz'mina V.V., Zavedenkova L.V., Gracheva E.L. *Problemy biologii produktivnykh zhitovnykh - Problems of Productive Animal Biology.* 2016. 4: 37-45.
18. Kuz'mina V.V., Tarleva A.F., Gracheva E.L. [Influence of various concentrations of phenol and its derivatives on the activity of fish intestinal peptidases]. *Biologiya vnutrennikh vod – Biology of Inland Waters.* 2017, 2: 104-111.
19. Luk'yanenko V.I. *Obshchaya ikhtiotoksikologiya* (Total fish toxicology). Moscow: Legkaya i pishchevaya promyshlennost' Publ., 1983, 320 p.
20. Maistrenko V.N., Klyuev N.A. *Ekologo-analiticheskiy monitoring stoykikh organicheskikh zagryazniteley* (Ecological and analytical monitoring of persistent organic pollutants). Moscow: Binom. Laboratoriya znaniy Publ., 2004, 328 p.
21. Michałowicz J., Duda W. Phenols – Sources and Toxicity. *Polish J. Environ. Stud.* 2007, 16(3): 347-362.
22. Skvortsova E.G., Egorova A.A., Kuz'mina V.V. *Problemy biologii produktivnykh zhitovnykh - Problems of Productive Animal Biology.* 2016, 4: 46-56.
23. Taysse L., Troutaud D., Khan N.A., Deschaux P. Structure-activity relationship of phenolic compounds (phenol, pyrocatechol and hydroquinone) on natural lymphocytotoxicity of carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicology.* 1995, 98: 207-214.
24. Ugolev A.M. *Evolutsiya pishchevareniya i printsipy evolyutsii funktsii* (Evolution of digestion and principles of functions's evolution). Leningrad: Nauka Publ., 1985, 544 p.
25. Ugolev A.M., Kuz'mina V.V. *Pishchevaritel'nye protsessy i adaptatsii u ryb* (Digestion processes and adaptations in fishes). St. Petersburg: Gidrometeoizdat Publ., 1993, 238 p.

26. Zaprometov M.N. *Osnovy biokhimii fenol'nykh soedinenii* (Foundation of phenolic compounds biochemistry). Moscow: Visshaya shkola Publ., 1974, 214 p.

Influence of phenol on the temperature characteristics of peptidase in chironomid larvae – potential food for fish-benthophages

¹Kuzmina V.V., ²Chornaya E.Yu., ¹Kulivatskaya E.A., ²Sheptytsky V.A.

¹*Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS, 152742 Borok, Yaroslavl oblast*
²*Shevchenko State University, PO 3300, Tiraspol, Moldova*

ABSTRACT. It is known that the effect of enzymes of food objects on the digestive processes in fish largely depends on the type of consumer and prey, temperature and pH of the gastric and enteral media. In recent decades, various anthropogenic factors, including phenol derivatives, have a significant effect on the activity of digestive hydrolases. The aim of this work was to study the effect of phenol on the temperature characteristics of casein-lytic and hemoglobin-lytic peptidases that function in the body of chironomid larvae. Effects of phenol studied in the homogenate of larvae of chironomids *Chironomus* sp. in the temperature range 0-70 °C, pH 7.4. The ratio of volumes of homogenate and phenol with an initial concentration of 0.1 mM (9.41 mg/l) is 1: 1. The final concentration of phenol during preincubation and incubation is 0.025 mM (2.35 mg/l). One hour after the start of the pre-incubation, a substrate (casein or hemoglobin, pH 7.4) was added and the mixture was incubated for 30 minutes in thermostatically controlled chambers. The activity of peptidases was assessed by the increase in the concentration of tyrosine. In the temperature range 0-30°C, the temperature coefficients (Q₁₀) were determined and the values of the activation energy were determined graphically (according to temperature dependence). Under the influence of phenol, the activity of casein and hemoglobin-lytic peptidases at 20°C increases by 1.2 and 1.9 times, respectively. Phenol did not affect the value of the temperature optimum for the activity of casein- and hemoglobinlytic peptidases of chironomid larvae in the range 0-30 °C, but changed the shape of the temperature dependence curves due to a sharp increase in enzymatic activity at 40°C (P<0.05). Changes in Q₁₀ and the energy of activation (E_{act}) under the influence of phenol are noted. In the presence of phenol, the values E_{act} of hydrolysis of hemoglobin in the 0-20°C zone vary at a higher temperature in different directions: at low temperatures they increase by 1.2 times, in the zone of higher temperatures they decrease by 1.3 times. The data obtained indicate a significant effect of phenol on the activity and temperature characteristics of peptidases of chironomid larvae, which can affect the digestive processes of benthophagous fish actively consuming chironomid larvae.

Keywords: chironomid larvae, peptidases activity, phenol, temperature effects

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2017, 4: 47-55

Поступило в редакцию: 19.08.2017

Получено после доработки: 05.10.2017

Кузьмина Виктория Вадимовна, д.б.н., проф., г.н.с., тел. 8(485)472-45-26,
vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru;

Чорная Елена Юрьевна, асп.;

Куливацкая Екатерина Алексеевна, ст. лаб. (с высш. образ.);

Шептицкий Владимир Александрович, д.б.н., проф., тел. 0(0373)533-79-558.