

# ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ГИДРОБИОНТОВ

УДК 519.237:[597-1.044:597.423-113.32]

*Д. А. Бедняков, А. Н. Неваленный, А. С. Мартьянов*

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ ВОЗДЕЙСТВИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ ИНКУБАЦИИ НА УРОВЕНЬ АКТИВНОСТИ $\alpha$ -АМИЛАЗЫ ЛЕНСКОГО ОСЕТРА, РУССКОГО ОСЕТРА И РОЛО

Исследуется воздействие температуры инкубации на  $\alpha$ -амилазу слизистой оболочки кишечника годовиков русского осетра, ленского осетра и их гибрида – РОЛО, полученных и выращенных в искусственных условиях. Лабораторные эксперименты проводились с помощью стандартных физиолого-биохимических методик. Впоследствии выполнялся сравнительный анализ реакций ферментов на изменения температуры инкубации. В качестве основного инструмента сравнительного анализа применен метод иерархической кластеризации. Результат обработки данных заключался в построении иерархически организованных классификаций, графически отображаемых в виде дендрограмм, анализируя которые можно судить о степени сходства и различия элементов сравниваемых множеств. В качестве способа определения расстояния между объектами было выбрано расстояние городских кварталов, объединение кластеров осуществлялось методом невзвешенного попарного среднего. При анализе дендрограмм, построенных в результате кластеризации, выявлено, что во всем диапазоне исследуемых значений температуры хорошо просматривается соседство данных, относящихся к русскому осетру, с данными по гибриду, в основном такое соседство наблюдается для одинаковых температурных условий. На втором этапе анализа были исключены данные, относящиеся к крайним точкам исследуемого диапазона значений температуры, после чего алгоритм сгруппировал данные в три кластера, соответствующие трем объектам исследования. В результате было установлено, что ферменты гибрида в ответных реакциях проявляют существенно большее сходство с аналогичными ферментами русского осетра. Наиболее выражено данное сродство адаптивных реакций в диапазоне значений температуры от 10 до 40 °С.

**Ключевые слова:** осетровые, гибриды, мембранное пищеварение, пищеварительные ферменты, температура, кластерный анализ.

### **Введение**

Из факториальных воздействий, значимых для процессов пищеварения холоднокровных гидробионтов, важнейшую роль играют воздействия температурные [1, 2]. Температурные воздействия на процессы пищеварения, и в частности на уровень активности пищеварительных ферментов рыб, подробно исследованы в [2–4]. На протяжении последних двух десятилетий данные аспекты физиологии и экологии пищеварения были изучены для большинства хозяйственно ценных видов рыб, искусственно выращиваемых и промысловых, и в частности для ряда представителей осетровых [4–6]. Однако к настоящему времени остается практически неизученным влияние факторов среды, в том числе температуры, на особенности процессов мембранного пищеварения искусственно выращиваемых в хозяйственных целях гибридов осетровых. Такое исследование, помимо выяснения особенностей факториальных воздействий как таковых, потенциально может выявить характер наследуемости адаптивных реакций гибридов.

Целью наших исследований являлось изучение особенностей влияния температуры среды на уровень активности  $\alpha$ -амилазы слизистой оболочки кишечника русского осетра, ленского осетра и их гибрида РОЛО.

### Материал и методы исследования

Объектами исследования служили годовики двух видов осетровых – русского и ленского осетров и их гибрида – РОЛО в количестве 306, 318 и 340 особей соответственно. Исследование проводилось с помощью стандартных физиолого-биохимических методик [7, 8]. Гомогенат слизистой оболочки кишечника, содержащий исследуемый фермент, инкубировался с субстратом в диапазоне значений температуры от 0 до 60 °С, а также при температуре 25 °С.

В качестве инструмента обработки данных экспериментов для последующего сравнительного анализа использовался метод автоматической классификации – кластерный анализ. Результат работы данного метода заключался в построении иерархически организованных классификаций, графически отображаемых в виде дендрограмм, анализируя которые можно судить о степени сходства и различий элементов сравниваемых множеств [9]. Способы расчета расстояния между отдельными элементами и кластерами данных, а также способ объединения кластеров на каждом этапе работы алгоритма настраивались предварительно. При кластеризации в качестве способа определения расстояния между объектами было выбрано расстояние городских кварталов, определяемое как

$$d_{st} = \sum_{j=1}^n |x_{sj} - x_{tj}|,$$

где  $d_{st}$  – расстояние;  $x_{sj}, x_{tj}$  – координаты объектов  $s$  и  $t$ .

Объединение кластеров осуществлялось методом невзвешенного попарного среднего в соответствии с формулой

$$d(r, s) = \frac{1}{n_r n_s} \sum_{i=1}^{n_r} \sum_{j=1}^{n_s} dist(x_{rj}, x_{sj}).$$

### Результаты исследований

Для анализа полученной совокупности данных был использован метод автоматической классификации, относящийся к группе методов иерархической кластеризации. С помощью данного метода совокупность экспериментальных данных была представлена в виде иерархически структурированной схемы, отражающей взаимное расположение данных и степень их сходства.

Результаты кластеризации данных об изменении уровня активности  $\alpha$ -амилазы под воздействием температуры иллюстрируют дендрограммы на рис. 1 и 2.

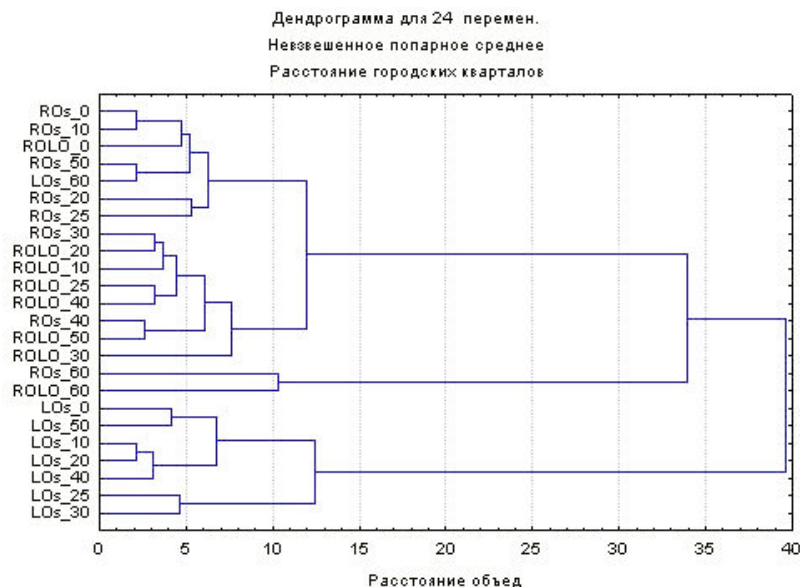
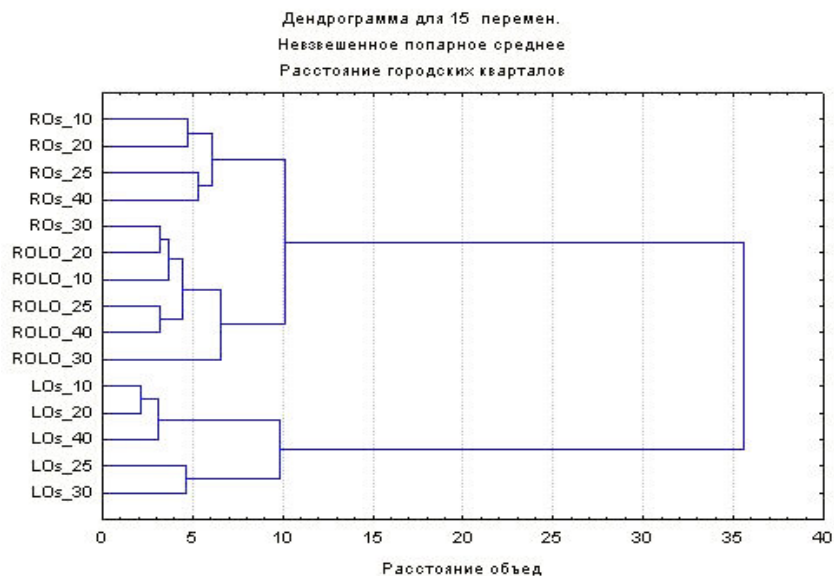


Рис. 1. Результаты кластеризации, полученные для  $\alpha$ -амилазы при разных значениях температуры инкубации (для 24 переменных)

Экспериментальные данные по ленскому осетру образовали отдельный кластер, расположенный на значительном расстоянии от прочих данных. Данные по русскому осетру и РОЛО в целом располагаются достаточно близко друг к другу. На небольших расстояниях происходит объединение данных сходного диапазона значений температуры инкубации. Анализ структур сформированных кластеров при выбранном расстоянии 10 показывает, что данные исследований РОЛО при умеренных значениях температуры формируют единый кластер, аналогичным образом сформирован кластер данных по ленскому осетру, включающий показатели по низким, средним и высоким температурным воздействиям, за исключением 60 °С. Данные по русскому осетру разнесены по разным кластерам, что еще более отчетливо видно при анализе дендрограммы на расстоянии 7. Отметим, что на всем диапазоне исследуемых значений температуры хорошо просматривается соседство данных, относящихся к русскому осетру, с данными по гибриду, в основном такое соседство наблюдается для одинаковых температурных условий.

Переменные ROs, LOs и ROLO содержат результаты по исследованию воздействия температуры инкубации на уровень активности  $\alpha$ -амилазы русского осетра, ленского осетра и РОЛО соответственно, в конце наименования переменных цифрами обозначена соответствующая температура инкубации.

После исключения данных, относящихся к крайним точкам исследуемого диапазона значений температуры, все данные были сгруппированы в три кластера, соответствующие трем объектам исследования. При анализе структур кластеров более существенное сродство к данным по гибриду выявлено для результатов по русскому осетру. Данные по гибриду, так же как и в предыдущем случае, формируют отдельный кластер на значительном удалении. Русский осетр и РОЛО при этом группируются в отдельные кластеры (за исключением объединившейся с кластером РОЛО переменной по 30-градусному температурному воздействию на фермент русского осетра). Кластеры русского осетра и РОЛО расположены на расстоянии примерно равном 10, тогда как данные по ленскому осетру удалены как от кластера русского осетра, так и от кластера РОЛО на расстояние примерно 37.



Данная картина вполне согласуется с полученными ранее результатами с использованием методов неметрического многомерного шкалирования [10].

### Заключение

В целом сравнительный анализ результатов воздействия температуры на уровень активности  $\alpha$ -амилазы слизистой оболочки кишечника русского осетра, ленского осетра и РОЛО показывает, что гибридная форма сочетает адаптивные особенности обоих родительских видов. Однако более существенно сходство реакций гибрида с реакциями материнского вида, особенно в диапазоне значений температуры от 10 до 40°C (рис. 2). Соответственно, с учетом ранее полученных результатов для данных видов [10], можно сделать предварительный вывод о том, что характер и особенности адаптивных реакций мембранного пищеварения у гибрида, по крайней мере на уровне элементарных физиолого-биохимических функций, наследуется в большей степени от русского осетра, в первую очередь для такого фермента, как  $\alpha$ -амилаза.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузьмина В. В. Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб / В. В. Кузьмина. М.: Наука. 2005. 300 с.
2. Кузьмина В. В. Физиология питания рыб. Влияние внешних и внутренних факторов / В. В. Кузьмина. Борок: Изд-во ИБВВ РАН, 2008. 276 с.
3. Кузьмина В. В. Температурные адаптации ферментов, осуществляющих мембранное пищеварение у пресноводных костистых рыб / В. В. Кузьмина // Журнал общей биологии. 1985. Т. XLVI, № 6. С. 824–837.
4. Кузьмина В. В. Влияние температуры на активность  $\alpha$ -амилазы у пресноводных костистых рыб / В. В. Кузьмина, Е. Н. Морозова // Вопросы ихтиологии. 1977. Т. 17, № 5. С. 922–929.
5. Кузьмина В. В. Уровень активности пищеварительных ферментов карпа при акклимации рыб к высоким температурам / В. В. Кузьмина, Е. А. Поддубная // Биология внутренних вод. 1986. № 71. С. 35–38.
6. Левченко О. Е. Влияние температуры инкубации на уровень активности некоторых пищеварительных ферментов лососевых видов рыб / О. Е. Левченко, А. Н. Неваленный, С. Г. Коростелёв // Естественные науки: журнал фундаментальных и прикладных исследований. Астрахань: Изд. дом «Астраханский университет». 2004. № 3 (9). С. 8–12.
7. Неваленный А. Н. Функциональная организация и адаптивная регуляция процессов пищеварения у рыб: моногр. / А. Н. Неваленный, А. В. Туктаров, Д. А. Бедняков. Астрахань: Изд-во АГТУ, 2003. 152 с.
8. Неваленный А. Н. Энзимология: учеб. пособие / А. Н. Неваленный, Д. А. Бедняков, И. С. Дзержинская. Астрахань: Изд-во АГТУ, 2005. 84 с.
9. Шитиков В. К. Количественная гидроэкология: методы системной идентификации / В. К. Шитиков, Г. С. Розенберг, Т. Д. Зинченко. Тольятти: ИЭВБ РАН, 2003. 463 с.
10. Бедняков Д. А. Сравнительный анализ воздействия температуры инкубации на активность комплекса пищеварительных ферментов русского осетра, ленского осетра и их гибрида методом многомерного шкалирования / Д. А. Бедняков, А. С. Мартьянов // Вестн. Астрахан. гос. техн. ун-та. Сер.: Рыбное хозяйство. 2013. № 1. С. 118–123.

Статья поступила в редакцию 27.05.2014

### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**Бедняков Дмитрий Андреевич** – Россия, 414056, Астрахань; Астраханский государственный технический университет; канд. биол. наук, доцент; зав. лабораторией «Физиология питания рыб»; bednyakovd@rambler.ru.

**Неваленный Александр Николаевич** – Россия, 414056, Астрахань; Астраханский государственный технический университет; д-р биол. наук, профессор; профессор кафедры «Гидробиология и общая экология»; nevalennyu@rambler.ru.

**Мартьянов Александр Сергеевич** – Россия, 414056, Астрахань; Астраханский государственный технический университет; канд. биол. наук; младший научный сотрудник лаборатории физиологии питания рыб; martalex.84@list.ru.



D. A. Bednyakov, A. N. Nevalenny, A. S. Martyanov

**COMPARATIVE ANALYSIS  
OF THE PECULIARITIES OF THE INFLUENCE  
OF INCUBATION TEMPERATURE ON THE LEVEL OF THE ACTIVITY  
OF THE  $\alpha$ -AMYLASE OF RUSSIAN STURGEON,  
SIBERIAN STURGEON AND THEIR HYBRID - ROLO**

**Abstract.** The article is devoted to the research of the incubation temperature on the  $\alpha$ -amylase of the intestinal mucous tunic of Russian sturgeon, Siberian sturgeon and their hybrid ROLO. The objects of the research were yearlings of the above-named species and hybrid obtained and grown in the artificial conditions. During the work, the standard physiological and biochemical methods were used. Subsequently the comparative analysis of the enzyme reactions on the changes of incubation temperature was executed. The method of hierarchical clustering was used as the main instrument of the comparative analysis. The result of the data processing was the construction of the hierarchically organized classifications, graphically displayed in the form of dendrograms, which can be analysed in order to judge about the extent of similarities and differences of the compared sets of elements. As a method of determining the distance between the objects the distance of city districts was taken, the unification of the clusters was made with the unweighted pair-group average method. While analyzing the clustering dendrogram, it has been revealed that within the whole range of the studied temperatures, the proximity of the data relating to the Russian sturgeon and the data on hybrid is clearly seen, basically, such a neighborhood is observed in identical temperature conditions. At the second stage of the analysis, the data relating to the end points of the researched temperature range were excluded, after this, the algorithm grouped the data into three clusters, corresponding to three objects of the study. As a result it was established that the enzymes of hybrid in responsive reactions show maximum similarity with the same enzymes of the Russian sturgeon. This similarity of the adaptive reactions was registered in the temperature range from 10 to 40 °C.

**Key words:** sturgeons, hybrids, membrane digestion, digestive enzymes, temperature, cluster analysis.

REFERENCES

1. Kuz'mina V. V. *Fiziologo-biokhimicheskie osnovy ekzotrofii ryb* [Physiological and biochemical bases of the fish exotrophy]. Moscow, Nauka Publ., 2005. 300 p.
2. Kuz'mina V. V. *Fiziologiya pitaniia ryb. Vliianie vneshnikh i vnutrennikh faktorov* [Physiology of fish diet. Influence of external and internal factors]. Borok, Izd-vo IBVV RAN, 2008. 276 p.
3. Kuz'mina V. V. *Temperaturnye adaptatsii fermentov, osushchestvliayushchikh membrannoe pishchevarenie u presnovodnykh kostistykh ryb* [Temperature adaptations of enzymes effecting the membrane digestion of freshwater bony fishes]. Zhurnal obshchei biologii, 1985, vol. XLVI, no. 6, pp. 824–837.
4. Kuz'mina V. V., Morozova E. N. Vliianie temperatury na aktivnost'  $\alpha$ -amilazy u presnovodnykh kostistykh ryb [Influence of the temperature on the activity of  $\alpha$ -amylase of freshwater bony fishes]. *Voprosy ikhtiologii*, 1977, vol. 17, no. 5, pp. 922–929.
5. Kuz'mina V. V., Poddubnaia E. A. Uroven' aktivnosti pishchevaritel'nykh fermentov karpa pri akklimatsii ryb k vysokim temperaturam [The level of the activity of digestive enzymes of the carp while acclimation of fish to high temperatures]. *Biologiya vnutrennikh vod*, 1986, no. 71, pp. 35–38.
6. Levchenko O. E., Nevalenny A. N. Vliianie temperatury inkubatsii na uroven' aktivnosti nekotorykh pishchevaritel'nykh fermentov lososevykh vidov ryb [Influence of the temperature of incubation on the level of the activity of some digestive enzymes of salmon]. *Estestvennye nauki: zhurnal fundamental'nykh i prikladnykh issledovaniy*. Astrakhan, Izdatel'skii dom «Astrakhanskii universitet», 2004, no. 3 (9), pp. 8–12.
7. Nevalenny A. N., Tuktarov A. V., Bedniakov D. A. *Funktsional'naiia organizatsiia i adaptivnaia regulatsiia protsessov pishchevareniiia u ryb* [Functional organization and adaptive regulation of the processes of fish digestion]. Astrakhan, Izd-vo AGTU, 2003. 152 p.
8. Nevalenny A. N., Bedniakov D. A., Dzerzhinskaia I. S. *Enzimologiya* [Enzymology]. Astrakhan, Izd-vo AGTU, 2005. 84 p.
9. Shitikov V. K., Rozenberg G. S., Zinchenko T. D. *Kolichestvennaia gidroekologiya: metody sistemnoi identifikatsii* [Quantitative hydroecology: methods of system identification]. Togliatti, IEVB RAN, 2003. 463 p.
10. Bedniakov D. A., Mart'ianov A. S. Sravnitel'nyi analiz vozdeistviia temperatury inkubatsii na aktivnost' kompleksa pishchevaritel'nykh fermentov russkogo osetra, lenskogo osetra i ikh gibrida meto-dom mnogomer-

nogo shkalirovaniia [Comparative analysis of the influence of the incubation temperature on the activity of the complex of digestive enzymes of the Russian sturgeon, Siberian sturgeon and their hybrid using the method of multidimensional scaling]. *Vestnik Astrakhanskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta. Seriya: Rybnoe khoziaistvo*, 2013, no. 1, pp. 118–123.

The article submitted to the editors 27.05.2014

### **INFORMATION ABOUT THE AUTHORS**

**Bednyakov Dmitriy Andreevich** – Russia, 414056, Astrakhan; Astrakhan State Technical University; Candidate of Biology, Assistant Professor; Head of the Laboratory "Physiology of Fish Nutrition"; bednyakovd@rambler.ru.

**Nevalenny Alexander Nickolaevich** – Russia, 414056, Astrakhan; Astrakhan State Technical University; Doctor of Biology, Professor; Professor of the Department "Hydrobiology and General Ecology"; nevalenny@rambler.ru.

**Martyanov Alexander Sergeevich** – Russia, 414056, Astrakhan; Astrakhan State Technical University; Candidate of Biology; Junior Researcher of the Laboratory "Physiology of Fish Nutrition"; martalex.84@list.ru.

