УДК 595.121-113 + 597-113

# РОЛЬ КАРБОГИДРАЗ СИМБИОНТНОЙ МИКРОФЛОРЫ В ПРОЦЕССАХ ПИЩЕВАРЕНИЯ У ЦЕСТОД И ИХ ХОЗЯЕВ — РЫБ

© Г. И. Извекова

Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН
пос. Борок, Некоузский р-н, Ярославская обл., 152742
E-mail: izvekov@ibiw.yaroslavl.ru
Поступила 21.05.2007

Установлено, что со слизистой кишечника рыб и тегументом цестод ассоциированы бактерии, способные продуцировать ферменты, гидролизующие углеводы различной степени сложности — от полисахарида крахмала до дисахарида сахарозы. Присутствие бактерий, обладающих сахаразной активностью, особенно важно для макроорганизмов, поскольку образующуюся глюкозу могут использовать все члены складывающегося сообщества. Наибольший вклад в гидролиз углеводов как у хозяина, так и у паразита, очевидно, вносят микроорганизмы, более тесно связанные с их пищеварительно-транспортными поверхностями и труднее удаляемые из кишечника перистальтикой. Уровни общей амилолитической активности ферментов и активности α-амилазы бактерий в условиях опыта сопоставимы с аналогичными характеристиками ферментов, принимающих участие в мембранном пищеварении у хозяина и паразита, что может свидетельствовать о значительном вкладе ферментов симбионтной микрофлоры в процессы пищеварения макроорганизмов.

К настоящему времени доказано, что существование высших организмов невозможно без постоянного взаимодействия с микроорганизмами, причем многие физиологические процессы у человека, животных и растений неразрывно связаны с соответствующими процессами у населяющих их бактерий (Уголев, 1985; Tannock, 1999). Микроорганизмы, заселяющие кишечник, обладают набором специфических ферментов, позволяющих гидролизовать субстраты, недоступные ферментам макроорганизма. Нормальная микрофлора пищеварительного тракта играет важную роль в жизнедеятельности макроорганизма, в частности в формировании иммунитета хозяина, синтезе ряда ферментов и витаминов, утилизации пищевых субстратов с выделением незаменимых аминокислот (Шивокене, 1989; Sugita et al., 1991). Существенный аспект изучения кишечной микрофлоры — оценка ее роли в питании макроорганизма, которое осуществляется за счет выделения бактериями внеклеточных ферментов, способных принимать участие в гидролизе биополимеров.

Одна из важнейших сторон деятельности кишечной микрофлоры растительноядных рыб — расщепление углеводов (Шивокене, 1989). В кишечнике 7 видов морских рыб обнаружено более 1500 штаммов бактерий, из кото-

рых 21.5 % продуцировали амилазу (Sugita et al., 1996). Высказано предположение о важной роли продукции амилазы бактериями в переваривании крахмала у пресноводных рыб (Sugita et al., 1997).

Пищевые полисахариды относятся к 2 основным классам: структурные полисахариды, в большинстве случаев не перевариваемые позвоночными (целлюлоза, лигнин, агар, хитин и др.), и универсальные пищевые полисахариды — крахмал и гликоген. Гидролиз углеводов начинается под действием α-амилазы, действующей на α-1.4-глюкозидные связи в молекулах крахмала и гликогена. Олигосахариды подвергаются дальнейшему расщеплению с помощью дисахаридаз — мальтазы, изомальтазы, сахаразы, лактазы, трегалазы — до мономеров, которые могут всасываться (Уголев, 1985).

Хозяин, паразит и симбионтная микрофлора представляют собой микробиоценоз со сложившимися за время совместной эволюции тесными взаимоотношениями, исследование которых важно для понимания происходящих в нем процессов (Чахава, Горская, 1982). Работы, касающиеся участия микрофлоры в пищеварении рыб и обитающих в их кишечнике цестод, ограничены серией наших исследований (Извекова, Лаптева, 2002; Извекова, 2005; Извекова, Комова, 2005).

Цель работы — исследование способности бактерий, ассоциированных с тегументом червей класса Cestoda и слизистой кишечника их хозяев — рыб, выделять комплекс карбогидраз, осуществляющих различные этапы гидролиза углеводов, и установление возможной роли микроорганизмов в пищеварении паразита и хозяина.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектами исследований служили черви класса Cestoda (*Triaenophorus nodulosus* (Pallas, 1781); *Eubothrium rugosum* (Batch, 1786); *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781)), паразитирующие в кишечнике широко распространенных видов рыб, обитающих в Рыбинском водохранилище (щука, *Esox lucius* L.; налим, *Lota lota* (L.), лещ, *Abramis brama* (L.)).

По типу питания щука — типичный хищник, налим — хищник—факультативный бентофаг, лещ — бентофаг. Щуку и налима, а также их паразитов исследовали в зимне-весенний период (январь—май). В этот период хищные рыбы активно питаются. Налим наиболее активно питается в январе—феврале, щука — с различной интенсивностью в течение всего года, лещ — в июне—июле (Кузьмина, 2005).

Для изучения микрофлоры, ассоциированной с пищеварительно-транспортными поверхностями рыб и цестод, использовали фрагменты кишечника рыб и целых червей. В каждой серии опытов из одной рыбы исследовали всех червей и отрезок кишечника длиной 1—2 см из участка с наибольшей концентрацией паразитов. В случае *T. nodulosus* и *E. rugosum* одну пробу составляли 5—10 червей, в случае *C. laticeps* — 15—30.

Кишечники для стерилизации их внешней поверхности протирали 96%-ным этиловым спиртом, затем вскрывали в стерильных условиях. Смывы получали с отрезков кишечников рыб и целых червей по схеме, описанной ранее (Извекова, Лаптева, 2002). Все работы со смывами и микробиологические посевы проводили в стерильных условиях в боксе над газовой горелкой. Из вскрытых кишечников удаляли хорошо оформленное содержимое. Для микробиологических исследований использовали фракции Д1, Д3, Д5 и Д7. При этом прочность ассоциации микроорганизмов с

пищеварительно-транспортными поверхностями возрастает в ряду Д1—Д7. При исследовании активности сахаразы в паре щука—*T. nodulosus* использованы фракция Д1, полученная после 30-секундного встряхивания, и суммарная фракция Д2—Д7, полученная после 1.5-часового смыва и обозначенная как Д2. Из указанных фракций для определения общей амилолитической активности (ОАА), активности α-амилазы и сахаразы проводили посевы в пробирки, содержащие по 10 мл жидкой питательной среды (3.5 г рыбопептонного бульона и 10 г растворимого крахмала в 1 л раствора Рингера). Посевы культивировали в течение 3 сут при температуре 25 °С, после чего определяли активность ферментов бактерий. ОАА и активность сахаразы определяли методом Нельсона (Исследование..., 1969). Активность α-амилазы оценивали по убыли крахмала методом Смита и Роя (Исследование..., 1969). В качестве субстрата для определения ОАА использовали 1.8%-ный раствор растворимого крахмала, для определения активности сахаразы — 100 мМ раствор сахарозы, приготовленные на растворе Рингера для холоднокровных животных, pH 7.4. Активности исследованных ферментов выражали в мкмоль/г × ч. В качестве субстрата для определения активности α-амилазы использовали 0.1%-ный раствор растворимого крахмала. Активность α-амилазы выражали в мг/г × ч. Интенсивность развивающегося окрашивания, пропорционального активности ферментов, измеряли на спектрофотометре СФ-46.

Результаты обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента. Каждая задача отработана на 5—18 рыбах одной размерно-возрастной группы для исключения влияния этих показателей на получаемые характеристики.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

После выращивания на жидкой питательной среде бактерий, смытых с пищеварительно-транспортных поверхностей кишечников рыб и тегументов паразитирующих в них цестод, исследована способность этих бактерий выделять в среду ферменты, гидролизующие углеводы различной степени сложности.

### Общая амилолитическая активность ферментов бактерий

Установлено, что во все полученные фракции смываются бактерии, продуцирующие ферменты, проявляющие общую амилолитическую активность (рис. 1). Уровень ОАА ферментов бактерий зависит от объекта, с которого они смыты. Сравнение ОАА ферментов бактерий, полученных с каждого объекта, показало, что от фракции Д1 до фракции Д7 ОАА ферментов бактерий, смытых с тегумента *T. nodulosus*, достоверно падает ($P < 0.05$) (рис. 1, А). Также достоверно от фракции Д1 к фракции Д3 уменьшается ОАА ферментов бактерий, смытых с тегумента *C. laticeps* (рис. 1, *Б*). Не отмечено достоверных различий в ОАА ферментов бактерий, смытых из разных фракций с пищеварительно-транспортных поверхностей щуки, налима, леща и *E. rugosum*. При сравнении ОАА ферментов бактерий в паре хозяин—паразит достоверные различия установлены для уровней активности ферментов бактерий, смытых во фракцию Д1 со слизистой кишечника щуки и тегумента *T. nodulosus*, а также леща и *C. laticeps* ($P < 0.05$). В остальной

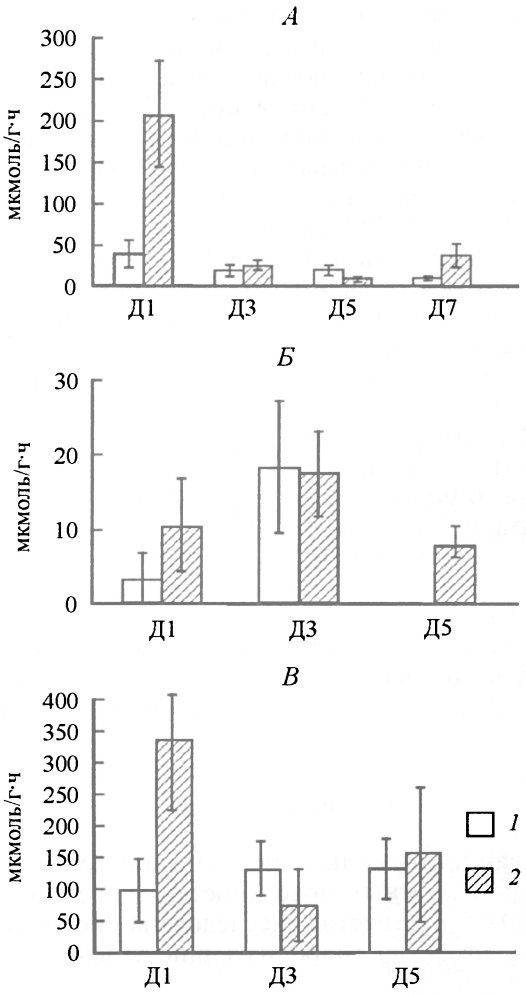


Рис. 1. ОАА ферментов бактерий, смытых с пищеварительно-транспортных поверхностей кишечников рыб (*1*) и паразитирующих в них цестод (*2*).

*А* — щука — *T. nodulosus*, *Б* — налим — *E. rugosum*, *В* — лещ — *C. laticeps*. По оси абсцисс — смытые с пищеварительно-транспортных поверхностей фракции; по оси ординат — ОАА, мкмоль/г × ч.

Fig. 1. Total amylolytic activity (TAA) of the enzymes produced by the bacteria washed off from the digestive-transport surfaces of fish intestines (*1*) and cestodes parasitizing in the intestines (*2*).

ных фракциях достоверных различий в значениях ОАА ферментов бактерий в паре хозяин—паразит не установлено. Значимые различия активности ферментов бактерий из некоторых фракций при ее сопоставлении между различными парами хозяин—паразит приведены в таблице.

## Активность α-амилазы бактерий

Бактерии, вырабатывающие α-амилазу, также смываются во все исследованные фракции со всех изученных объектов (рис. 2). Установлен одинаковый уровень ее активности во всех фракциях, смытых со слизистой кишечника каждого вида рыб и тегумента паразитирующих в них цестод.

Значимые различия активности ферментов (А и Б) бактерий, смытых с пищеварительно-транспортных поверхностей рыб и цестод

Significant differences in activity of the enzymes (A vs. B) produced by the bacteria washed off from the digestive-transport surfaces of fishes and cestodes

| Фракция | Объект исследования | Активность ферментов А | Объект исследования | Активность ферментов Б |
|---|---|---|---|---|
| | | ОАА, мкмоль/г × ч | | |
| Д1 | *T. nodulosus* | 205.51 ± 66.42 | *E. rugosum* | 10.31 ± 6.32** |
| Д1 | *C. laticeps* | 334.39 ± 101.08 | То же | 10.31 ± 6.32** |
| Д5 | Щука | 6.04 ± 1.11 | Налим | 0 ± 0* |
| Д5 | Лещ | 127.67 ± 48.05 | Щука | 6.04 ± 1.11* |
| Д5 | » | 127.67 ± 48.05 | Налим | 0 ± 0* |
| | | α-амилаза, мг/г × ч | | |
| Д1 | *C. laticeps* | 336.26 ± 46.65 | *E. rugosum* | 174.21 ± 17.66** |
| Д5 | То же | 337.07 ± 42.60 | То же | 164.76 ± 15.77** |
| | | Сахараза, мкмоль/г × ч | | |
| Д1 | Лещ | 298.43 ± 64.72 | Щука | 7.63 ± 6.85** |
| Д1 | » | 298.43 ± 64.72 | Налим | 15.68 ± 9.10** |
| Д5 | » | 351.44 ± 73.14 | Щука | 1.84 ± 5.75** |
| Д5 | » | 351.44 ± 73.14 | Налим | 14.37 ± 11.32** |
| Д1 | *C. laticeps* | 981.11 ± 21.91 | *T. nodulosus* | 44.63 ± 28.64** |
| Д1 | То же | 981.11 ± 21.91 | *E. rugosum* | 58.05 ± 40.50** |

Примечание. * — $P < 0.05$; ** — $P < 0.01$.

Достоверно различается активность α-амилазы бактерий, смытых со слизистой кишечника налима и тегумента *E. rugosum* ($P < 0.05$) (рис. 2, *Б*), а также слизистой кишечника леща и тегумента *C. laticeps* ($P < 0.01$) (рис. 2, *В*), в то время как аналогичная активность бактерий, смытых с пищеварительно-транспортных поверхностей щуки и *T. nodulosus*, достоверно не различалась. Различия в активности α-амилазы бактерий из разных пар хозяин—паразит установлены только для двух случаев (см. таблицу).

## Активность сахаразы бактерий

Так же как ОАА и активность α-амилазы, сахаразная активность зарегистрирована во всех фракциях, смытых с исследованных объектов (рис. 3). Достоверное уменьшение активности сахаразы бактерий отмечено только для бактерий, смытых с тегумента *C. laticeps* ($P < 0.01$) (рис. 3, *В*). Значимые различия, установленные для активности сахаразы бактерий некоторых фракций из различных пар хозяин—паразит, приведены в таблице.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что с пищеварительно-транспортных поверхностей кишечников рыб и тегумента цестод смываются бактерии, способные продуцировать ферменты, гидролизующие углеводы различной степени сложности.

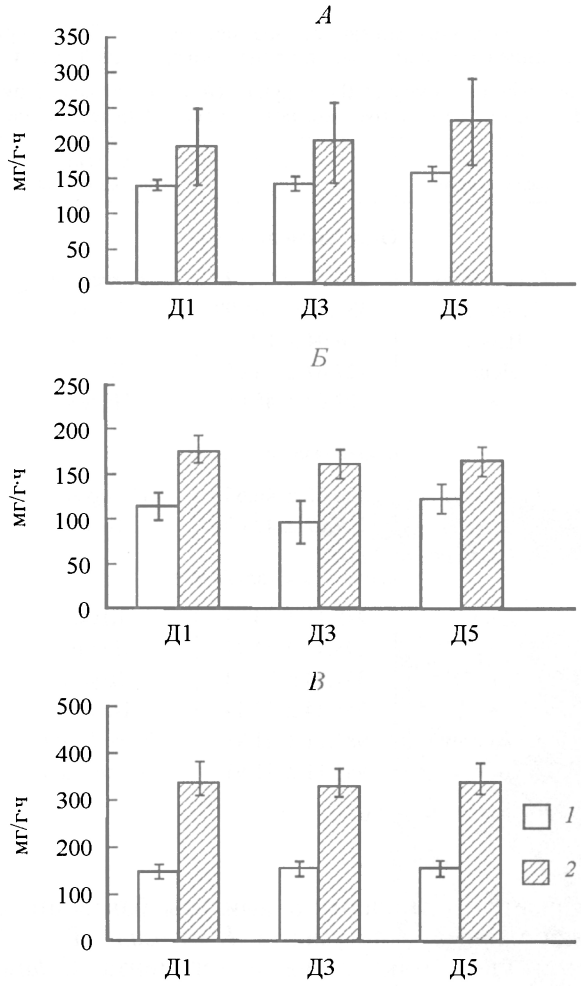


Рис. 2. Активность α-амилазы бактерий, смытых с пищеварительно-транспортных поверхностей кишечников рыб (*1*) и паразитирующих в них цестод (*2*).

По оси ординат — активность α-амилазы, мг/г × ч. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Fig. 2. Activity of α-amylase produced by the bacteria washed off from the digestive-transport surfaces of fish intestines (*1*) and cestodes parasitizing in the intestines (*2*).

## ОБСУЖДЕНИЕ

К числу важных функций бактерий, населяющих кишечник рыб, относится их участие в деградации сложных молекул, таких как крахмал, целлюлоза, фосфолипиды, хитин, коллаген, что свидетельствует о вкладе ферментов бактерий в пищеварительные процессы рыб (Austin, 2002). В результате проведенных нами исследований получен ряд количественных характеристик активности, разрушающих углеводы ферментов микрофлоры, ассоциированной с пищеварительно-транспортными поверхностями рыб и цестод. Ферменты, продуцируемые бактериями, вносят свой вклад в деградацию углеводов ферментами кишечника. В результате высвобождаются мономеры, которые могут транспортировать в клетки тела как хозяин, так и паразит. Колонизация большим количеством видов бактерий существенно затруд-

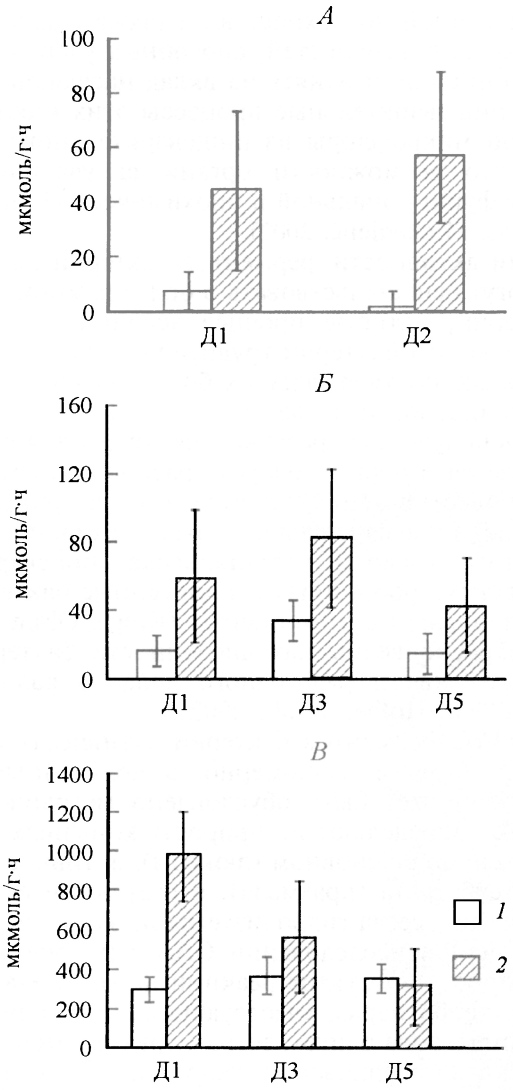


Рис. 3. Активность сахаразы бактерий, смытых с пищеварительно-транспортных поверхностей кишечников рыб (*1*) и паразитирующих в них цестод (*2*).

По оси ординат — активность сахаразы, мкмоль/г · ч. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Fig. 3. Sucrase activity of the bacteria washed off from the digestive-transport surfaces of fish intestines (*1*) and cestodes parasitizing in the intestines (*2*).

няет изучение вклада каждого вида в симбионтное взаимодействие, поэтому важное значение приобретает оценка суммарной деятельности бактерий. При этом известно, что состав и биомасса микрофлоры различаются в зависимости от экологических особенностей водоема, интенсивности питания и некоторых других факторов как у рыб разных видов, так и у представителей одного и того же вида (Ringø et al., 1995; Austin, 2002).

Следует отметить, что в некоторых случаях активность ферментов бактерий, смытых с тегумента, была выше, чем аналогичная активность ферментов бактерий, ассоциированных со слизистой кишечника. Это может быть обусловлено существованием специфической микрофлоры, избирательно

связанной с той или иной поверхностью, а также с адсорбционными свойствами исследованных поверхностей, способных удерживать различное количество микроорганизмов и влиять на вклад населяющих кишечник и тег умент бактерий в пищеварительные процессы этих макроорганизмов. Изучение симбионтной микрофлоры из пищеварительного тракта гидробионтов показывает, что возможности организма увеличиваются благодаря широкому спектру функциональной и биохимической активности микроорганизмов (Šyvokienė, Mickėnienė, 2002).

Высокие уровни активности ферментов бактерий во фракциях Д5 с тегумента червей могут свидетельствовать о более важной роли в питании паразитов тех бактерий, которые прочнее ассоциированы с поверхностью гельминта. К тому же эти бактерии труднее удаляются из кишечника перистальтикой, что также подтверждает их большую роль в пищеварительных процессах как хозяина, так и паразита.

Нестабильность полученных результатов отражается в значениях ошибки средней и объясняется в первую очередь разнообразием бактерий, смытых с исследованных поверхностей. Считается, что на прикрепление и колонизацию микробиотой пищеварительного тракта влияют такие факторы, как кислотность, желчные кислоты, перистальтика, пищеварительные ферменты, иммунный ответ макроорганизма, индигенные бактерии и продуцируемые ими антибактериальные компоненты (Ringø, Olsen, 1999). Отмечается значительный разброс в величинах численности бактерий в кишечниках разных рыб одного вида и рыб одного вида из разных мест обитания (Spanggaard et al., 2000; Holben et al., 2002).

В отличие от ОАА ферментов бактерий активность α-амилазы распределена по фракциям более равномерно, а полученные ее значения более стабильны. Это может быть обусловлено методическими подходами. В то время как ОАА определяют по приросту конечных продуктов реакции (редуцирующих сахаров, в основном глюкозы), активность α-амилазы определяют по убыли субстрата (крахмала), в результате его ферментативного гидролиза. Крахмал не всегда гидролизуется до конечного продукта — глюкозы, определяемой при исследовании ОАА. При оценке ферментативной активности по приросту продуктов реакции помимо α-амилазы выявляется активность других карбогидраз, участвующих в гидролитическом разрушении крахмала (разного рода олиго-, тетра-, три- и димергидролазы, включающие группу мальтаз, завершающих гидролиз). Роль последних особенно велика в процессах мембранного пищеварения, так как содержание гликозидаз в полости кишечника относительно небольшое (Кузьмина, 2005).

Присутствие ферментов бактериального происхождения может снижать энергетические затраты макроорганизмов на синтез одноименных ферментов, повышая их содержание в зоне гидролиза пищевых субстратов.

Полученные результаты согласуются с данными других авторов, показавших способность кишечной микрофлоры аю (*Plecoglossus altivelis*), карпа (*Cyprinus carpio*), канального сомика (*Ictalurus punctatus*), японского речного угря (*Anguilla japonica*) и тилапии (*Oreochromis niloticus*) продуцировать амилазу (Sugita et al., 1997). Процент продукции различался среди представителей различных семейств и родов бактерий, а также в зависимости от видов рыб (56 % анаэробов и 20 % аэробов продуцировали амилазу). Высказано предположение о важной роли продукции амилазы бактериями в переваривании крахмала у пресноводных рыб.

Заключительные этапы гидролиза углеводов осуществляются с помощью дисахараз. Установлено, что ферменты бактерий способны гидролизовать

углеводы различной степени сложности — от полисахарида крахмала до дисахарида сахарозы. Сахараза — фермент, принимающий участие в заключительных этапах гидролиза углеводов и гидролизующий сахарозу до глюкозы. Активность сахаразы — типичного фермента щеточной каймы — на 97—100 % связана со слизистой кишечника рыб (Кузьмина, 2005). Поэтому представляется важным исследование способности бактерий, ассоциированных с пищеварительно-транспортными поверхностями кишечника рыб и тегументом цестод, продуцировать сахаразу, что может увеличить концентрацию глюкозы в непосредственной близости от этих поверхностей.

Сахараза синтезируется в кишечных клетках, переносится в зону щеточной каймы и локализуется на мембранах микроворсинок. Она структурно связана с мембранами энтероцитов и не подвергается десорбции (Кузьмина, Куперман, 1983). Активность сахаразы в полости кишечника рыб практически не регистрируется. У большинства видов она связана исключительно со слизистой кишечника. У бенто- и планктофагов в полости кишечника может быть обнаружено до 5 % суммарной активности сахаразы. Соотношение активности фермента в полости и слизистой кишечника в значительной мере зависит от его места в ферментативной цепи. Активность α-амилазы, реализующей начальные этапы гидролиза углеводов, как правило, выше в полости, чем в слизистой кишечника. Активность ферментов, осуществляющих заключительные этапы гидролиза, связана преимущественно со слизистой оболочкой кишечника рыб (Кузьмина, 2005).

Обнаружение активности сахаразы, продуцируемой бактериями, с различной степенью прочности ассоциированными с кишечником рыб и тегументом червей, наряду с локализацией фермента в кишечнике и тегументе, позволяет предположить ее важную роль в цепи гидролиза углеводов от полимеров до мономеров. Поскольку активность собственной сахаразы у рыб и цестод невысока (Кузьмина, Куперман, 1983), присутствие ферментов симбионтных бактерий, обладающих сахаразной активностью, может быть особенно важным для хозяина и паразита, так как образующуюся в результате гидролитической деятельности ферментов бактерий глюкозу могут использовать все члены складывающегося сообщества. Способность бактерий, населяющих пищеварительно-транспортные поверхности хозяина и паразита, продуцировать сахаразу увеличивает содержание глюкозы в непосредственной близости от этих поверхностей, что, во-первых, снижает энергетические затраты макроорганизмов на получение этого мономера из других источников, а во-вторых, повышает концентрацию глюкозы вблизи транспортных поверхностей.

Известно, что уровень активности карбогидраз, принимающих участие в деградации углеводов различной степени сложности, выше у бенто- и планктофагов и ниже у хищников. В частности, исследованные нами рыбы по уровням активности карбогидраз, функционирующих в кишечнике, в порядке убывания располагаются следующим образом: лещ—налим—щука (Кузьмина, 2005). Для ферментов бактерий, ассоциированных со слизистой кишечника этих рыб и паразитирующих в них цестод, такой четкой закономерности не выявлено. Прежде всего это может быть связано с методикой определения активности собственно кишечных ферментов и ферментов, продуцируемых бактериями: первую определяют непосредственно в гомогенатах слизистой, в то время как вторую — после выращивания микроорганизмов на специфической питательной среде, стимулирующей рост бактерий. В то же время присутствие бактерий, выделяющих различные

карбогидразы, повышает доступность компонентов пищи, не составляющей основу питания таких рыб, как щука и налим.

Ранее нами определены уровни активности ферментов, осуществляющих мембранное пищеварение у рыб и цестод (Извекова, 1990; Извекова, Комова, 2005). Сопоставление уровней активности одноименных ферментов в смывах с пищеварительно-транспортных поверхностей со значениями активности ферментов бактерий указывают на существенную роль ферментов симбионтной микрофлоры в пищеварении рыб и цестод. Необходимо также учитывать, что расчеты ферментативной активности велись на 1 г влажной навески ткани, «активная» составляющая которой у паразита и хозяина сильно различается по отношению ко всей навеске. Для кишечников рыб соотношения навески кишечника без слизистой оболочки к навеске слизистой относятся примерно как 4 : 1 «неактивной» в плане пищеварения ткани к «активной». Аналогичные данные по весовому соотношению «неактивной» ткани червей к «активной» отсутствуют. Однако известно, что длина микротрихий тегумента («активной» пищеварительно-транспортной поверхности) измеряется в микронах (мкм) (Куперман, 1988), в то время как толщина червя — в миллиметрах, т. е. размерное соотношение «неактивной» ткани к «активной» выражается как $10^3$ : 1, что примерно соответствует и их весовому соотношению. Следовательно, если вести расчет активности ферментов бактерий на навеску «активной» ткани, то значение ее для пищеварительных процессов цестод станет еще больше по сравнению с кишечником, чем при расчете этой активности на навеску всей ткани. Это усиливает роль адсорбированных ферментов и бактерий в процессе пищеварения цестод по сравнению с кишечником хозяина. С другой стороны, в реальных условиях обитания (кишечник) микроорганизмы не сталкиваются с настолько высокой концентрацией углеводов, как в средах, используемых для их культивирования in vitro. Тем не менее обнаружение бактерий, ассоциированных с пищеварительно-транспортными поверхностями хозяина и паразита и способных синтезировать различные карбогидразы, может свидетельствовать о потенциальном вкладе ферментов бактерий в общую ферментативную активность, хотя вычленение этого вклада затруднительно.

Наряду со сходством в свойствах бактерий, колонизирующих пищеварительно-транспортные поверхности хозяина и паразита, отмечаются и различия, очевидно, связанные с особенностями структуры слизистой кишечника и тегумента цестод.

Пищеварительная активность кишечника рыб зависит от многих факторов, в том числе от структуры пищеварительного тракта, возраста и типа питания рыб, сезона года и т. д. (Кузьмина, 2005). Интересно, что кишечная микрофлора рыб столь же существенно зависит от этих факторов (Шивокене, 1989; Austin, 2002, и др.). Все это, несомненно, свидетельствует о существенном вкладе микрофлоры в продукцию амилаз в пищеварительном тракте рыб, однако источник различных амилаз определить достаточно трудно (Sugita et al., 1997). Активность бактериальных ферментов вносит в процессы переваривания пищевых субстратов тем больший вклад, чем теснее бактерии связаны с пищеварительно-транспортными поверхностями. Можно предположить, что продукты гидролитической деятельности бактерий, теснее связанных с пищеварительно-транспортными поверхностями, с большей вероятностью используются макроорганизмами в мембранном пищеварении. Известно, что бактериальная флора кишечной слизистой существенно отличается от полостной как по составу, так и по

биохимическим характеристикам. В процессе эволюции многоклеточные организмы адаптировались к симбиозу с определенными типами бактерий (Уголев, 1985).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что с пищеварительно-транспортными поверхностями кишечника рыб и тегументом цестод с различной степенью прочности ассоциированы бактерии, способные продуцировать ферменты, гидролизующие как поли-, так и дисахариды. Использование гидролизованных бактериями пищевых веществ снижает энергетические затраты макроорганизмов на переваривание высокомолекулярных субстратов. Учитывая низкую активность собственных дисахаридаз хозяина и паразита, присутствие бактерий, обладающих сахаразной активностью, особенно важно для макроорганизмов, поскольку глюкозу, образующуюся в результате гидролитической деятельности бактериальных ферментов, могут использовать все члены складывающегося сообщества. Наибольший вклад в гидролиз углеводов как у хозяина, так и у паразита, очевидно, вносят микроорганизмы, более тесно связанные с их пищеварительно-транспортными поверхностями и труднее удаляемые из кишечника в ходе перистальтики. Уровни общей амилолитической активности ферментов и активности α-амилазы бактерий в условиях опыта сопоставимы с аналогичными характеристиками ферментов, десорбируемых с исследованных поверхностей и принимающих участие в процессах мембранного пищеварения у хозяина и паразита, что может свидетельствовать о значительном вкладе ферментов симбионтной микрофлоры в пищеварение рыб и паразитирующих в их кишечнике цестод.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 06-04-48410).

## Список литературы

Извекова Г. И. 1990. Динамика десорбции карбогидраз с поверхности кишечника рыб и паразитирующих в них цестод. Паразитология. 24 (6) : 485—492.

Извекова Г. И. 2005. Активность карбогидраз симбионтной микрофлоры и их роль в процессах пищеварения у рыб и паразитирующих в них цестод (на примере щуки и Triaenophorus nodulosus). Журн. эвол. биох. физиол. 41 (4) : 325—331.

Извекова Г. И., Комова А. В. 2005. Роль α-амилазы симбионтной микрофлоры в процессах пищеварения у низших цестод и их хозяев — рыб. Изв. РАН. Сер. биол. 2 : 208—213.

Извекова Г. И., Лаптева Н. А. 2002. Микрофлора пищеварительно-транспортных поверхностей кишечника щуки и паразитирующего в нем Triaenophorus nodulosus (Cestoda, Pseudophyllidea). Биол. внутр. вод. 4 : 75—79.

Исследование пищеварительного аппарата у человека (обзор современных методов). 1969. Л.: Наука. 260 с.

Кузьмина В. В. 2005. Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб. М.: Наука. 300 с.

Кузьмина В. В., Куперман Б. И. 1983. Сравнительная характеристика мембранного пищеварения у цестод и их хозяев — рыб. Паразитология. 17 (6) : 436—442.

Куперман Б. И. 1988. Функциональная морфология низших цестод. Л.: Наука. 168 с.

Уголев А. М. 1985. Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций. Л.: Наука. 544 с.
Чахава О. В., Горская Е. М. 1982. Гнотобиологический принцип исследования взаимоотношений паразита с хозяином. В кн.: Паразиты и паразитозы человека и животных. Киев: Наукова Думка. С. 57—63.
Шивокене Я. 1989. Симбионтное пищеварение у гидробионтов и насекомых. Вильнюс: Мокслас. 223 с.
Austin B. 2002. The bacterial microflora of fish. The Scientific Word Journ. 2 : 558—572.
Holben W. E., Williams P., Saarinen M., Särkilahti L. K., Apajalahti J. H. A. 2002. Phylogenetic analysis of intestinal microflora indicates a novel mycoplasma phylotype in farmed and wild salmon. Microbial ecology. 44 (2) : 175—185.
Ringø E., Olsen R. E. 1999. The effect of diet on aerobic bacterial flora associated with intestine of Arctic charr (Salvelinus alpinus L.). Journ. Appl. Microbiol. 86 (1) : 22—28.
Ringø E., Strøm E., Tabachek J.-A. 1995. Intestinal microflora of salmonids: a review. Aquaculture Research. 26 : 773—789.
Spanggaard B., Huber I., Nielsen J., Nielsen L., Applel K., Gram L. 2000. The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification. Aquaculture. 182 : 1—15.
Sugita H., Miyajima G., Deguchi Y. 1991. The vitamin $B_{12}$-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. Aquaculture. 92 : 267—276.
Sugita H., Kawasaki J., Kumazawa J., Deguchi Y. 1996. Production of amylase by the intestinal bacteria of Japanese coastal animals. Letters in Applied Microbiol. 23 : 174—178.
Sugita H., Kawasaki J., Deguchi Y. 1997. Production of amylase by the intestinal microflora in cultured freshwater fish. Lett. Appl. Microbiol. 24 (2) : 105—108.
Šyvokienė J, Mickėnienė L. 2002. Effects of heavy metals on the bacteriocenoses of the digestive tract of fish. Chemia i inżynieria ekologiczna. 9 (9) : 1033—1038.
Tannock G. W. 1999. Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. Antonie van Leeuwenhoek. 76 : P. 265—278.

## THE CONTRIBUTION OF CARBOHYDRASES PRODUCED BY SYMBIOTIC MICROFLORA TO THE DIGESTIVE PROCESSES IN CESTODES AND THEIR HOST FISHES

G. I. Izvekova

*Key words*: cestodes, fishes, bacteria, enzymes, carbohydrates, symbiotic digestion.

SUMMARY

The bacteria capable of producing the enzymes hydrolyzing carbohydrates of various degrees of complexity (from starch to sucrose) were found to be associated with the intestinal mucosa of fishes and tegument of cestodes. Presence of the bacteria displaying the sucrase activity is especially important for macroorganisms, as bacteriogenous glucose can be used by all members of the arising community. The greatest contribution to the hydrolysis of carbohydrates (both in host and parasite) is obviously made by those microorganisms which are more closely connected with the digestive-transport surfaces and are hardly removable from the intestines by peristalsis. The levels of total amylolytic activity of bacteriogenous enzymes and activity of their α-amylase under the experimental conditions are comparable to those of the enzymes involved in membrane digestion of the host and parasite, which can be evidence of the significant contribution of enzymes produced by symbiotic microflora to the digestive processes in macroorganisms.