

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

**Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
кафедра біохімії та біотехнології**

**ПРОТЕОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ ТКАНИН ЛИЧИНОК СТЕРЛЯДІ
ПРІСНОВОДНОЇ ЗА УМОВ ВИГОДОВУВАННЯ АРТЕМІЄЮ,
ЗБАГАЧЕНОЮ *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* IMB B-7279**

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконала:

студентка 4 курсу, 407 групи

Притула Юлія Василівна

Керівник:

к.б.н., доц. кафедри біохімії та
біотехнології Худа Л.В.

До захисту допущено

на засіданні кафедри

протокол № _____ від _____ 2023 р.

Зав. кафедрою _____ проф. Копильчук Г.П.

Чернівці – 2023

Анотація

Ключові слова: *протеолітична активність, стерлядь прісноводна, артемія, Lactobacillus acidophilus*

Бакалаврська робота присвячена визначенню загальної протеолітичної активності в тканинах личинок стерляді прісноводної за умов годівлі наупліями артемії, збагаченими пробіотичним штамом *L. acidophilus* IMV B-7279.

Встановлено, що протеолітична активність личинок стерляді протягом перших двох тижнів від переходу на екзогенне живлення наупліями артемії забезпечується функціонуванням переважно нейтральних та лужних протеїназ. Збагачення артемії пробіотичним штамом *L. acidophilus* IMV B-7279 призводить до зростання активності кислих протеїназ гомогенату личинок стерляді у порівнянні з контролем протягом двотижневого періоду вигодовування, нейтральних - протягом 7 діб. Застосування пробіотику не викликає змін протеолітичної активності гомогенату личинок стерляді при рН 9,0.

Annotation

Keywords: *proteolytic activity, freshwater sterlet, artemia, Lactobacillus acidophilus*

The bachelor's thesis is devoted to the determination of the total proteolytic activity in the tissues of freshwater sterlet larvae under the conditions of feeding with artemia nauplii enriched with the probiotic strain *L. acidophilus* IMV B-7279.

It has been established that the proteolytic activity of sterlet larvae during the first two weeks after the transition to exogenous nutrition with artemia nauplii is provided by the functioning of mainly neutral and alkaline proteinases. Enrichment of artemia with the probiotic strain *L. acidophilus* IMV B-7279 leads to an increase in the activity of acidic proteinases of sterlet larvae homogenate compared to the control during a two-week feeding period, and neutral proteinases - during 7 days. The use of the probiotic does not cause changes in the proteolytic activity of sterlet larvae homogenate at pH 9.0.

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів наукових досліджень інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ Ю.В. Притула
(підпис)

Зміст

Зміст	3
Вступ	4
Розділ I. Огляд літератури	6
1.1. Застосування пробіотичних мікроорганізмів роду <i>Lactobacillus</i> в аквакультурі.....	6
1.2. Особливості розвитку травної системи личинок риб при переході на екзогенне живлення ..	12
1.3. Ферменти травної системи личинок риб.....	19
1.4.Протеолітична активність шлунково-кишкового тракту личинок риб	21
Розділ II. Матеріали та методи дослідження	27
2.1. Матеріали та об'єкти досліджень	27
2.2. Методи досліджень	27
2.2.1. Визначення рівня протеолітичної активності модифікованим методом Ансона.....	28
2.2.2 Кількісне визначення вмісту загального білка за методом Лоурі	30
Розділ III. Результати досліджень та їх обговорення	32
Висновки	37
Список використаної літератури	38
ДОДАТКИ	44

Вступ

Центральним питанням штучного вирощування риби є підбір поживних кормів, особливо на ранніх етапах вигодовування при переході на екзогенне живлення. Такі корми мають не лише забезпечувати організм необхідними нутрієнтами, а й покращувати його адаптивні властивості. Незбалансовані дієти призводять до сповільнення росту та високої смертності на ранніх стадіях розвитку личинок. Насамперед, причиною масової загибелі на цьому етапі є незрілість травної системи личинок, зокрема функціональна незрілість шлунку. Гідролітичне перетворення поживних речовин забезпечується, в основному панкреатичними ферментами, проте їх активність є вкрай низькою. За таких умов травлення у личинок риби при переході на зовнішнє живлення переважно забезпечується гідролітичними ферментами спожитого живого корму. Активність екзогенних ферментів, отриманих із зоопланктону, може складати 70–80% загальної активності ферментів у травному тракті риби. Тому виникає необхідність включати у раціон живі корми, які, окрім ензимів, також містять кишкові нейропептиди та харчові «фактори росту», що покращують травлення.

Надзвичайно важливим фактором, який впливає на ріст риби та розвиток їх внутрішніх органів, є засвоюваність білка. Саме протеолітичні ферменти кормових організмів забезпечують первинну активацію зимогенів травних ензимів личинок риби. Оцінка активності протеолітичних ферментів використовується для оптимізації раціону живлення, корегування рівня білка в аквакормі.

Питання застосування кормів в аквакультури завжди йдуть поруч із проблемою підвищення опірності організму молоді риби. Перспективним в цьому плані виявляється застосування пробіотичних мікроорганізмів, зокрема лактобактерій. Технологія насичення живого корму, зокрема науплій артемії, лактобацилами може забезпечити личинок риби не лише нутрієнтами та екзогенними гідролазами, а й сприяти підвищенню резистентності личинок

риб.

Враховуючи вищевказане, метою роботи було визначити загальну протеолітичну активність в тканинах личинок стерляді прісноводної за умов годівлі наупліями артемії, насиченими пробіотичним штамом *L. acidophilus* ІМВ В-7279.

Задля досягнення мети були поставлені такі завдання:

1. Визначити рівень загальної протеолітичної активності в тканинах личинок стерляді прісноводної в кислому, нейтральному та лужному діапазонах рН на початку, через 7 та 14 діб вигодовування наупліями артемії.

2. Дослідити рівень активності кислих протеїназ (рН 4,8) в тканинах личинок стерляді за умов застосування *L. acidophilus* ІМВ В-7279, біоінкапсульованого в науплії артемії протягом двох тижнів вигодовування.

3. Визначити рівень казеїнолітичної активності в нейтральному діапазоні (рН 7,4) в тканинах личинок стерляді за умов застосування *L. acidophilus* ІМВ В-7279, біоінкапсульованого в науплії артемії.

4. Визначити протеолітичну активність при рН 9,0 в тканинах личинок стерляді за умов застосування *L. acidophilus* ІМВ В-7279, біоінкапсульованого в науплії артемії.

Розділ I. Огляд літератури

1.1. Застосування пробіотичних мікроорганізмів роду *Lactobacillus* в аквакультури

У світі зростає попит на тваринний білок, особливо важливим джерелом якого є риба. Однак нераціональна експлуатація людиною природних ресурсів призвела до скорочення популяцій риб в океанах на 80%. Тому перспективним є нарощення обсягів виробництва в штучних умовах. Для цього аквакультурний сектор повинен вирішити такі проблеми як : отримання нових територій розведення, доступ до високоспоживчих кормів, розробка нових технологій вирощування, прогнозування та оптимізація вирощування риб. [23]

Пробіотичні мікроорганізми, які почали активно використовуватись в аквакультури, включають специфічні штами дріжджів, водоростей і бактерій. Найпоширенішими є представники родин *Bacillus*, *Lactococcus*, *Micrococcus* sp, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* і *Weissella*. Бактерії, що належать до роду *Lactobacillus*, вважаються безпечними і можуть синтезувати природні сполуки з антимікробним потенціалом, а також стимулювати імунну систему риб. Таким чином, більшість досліджень проводяться зі штамами молочнокислих бактерій. Серед досліджень, які продемонстрували переваги використання пробіотиків, було відзначено різні механізми дії, що відрізняються видовою специфічністю та умовами навколишнього середовища, з якими стикається мікроорганізм. [26]

Пробіотичні штами можуть функціонувати, блокуючи патогенні мікроорганізми через конкуренцію на поверхні клітин-господарів. Використання пробіотиків у кормах позитивно впливає на фізіологічні процеси водних тварин, та не спричиняє негативних наслідків. Використання пробіотиків у аквакультури, зменшує популяції хвороботворних мікроорганізмів та перешкоджає розвитку захворювань.[23]

Lactobacillus – це рід мікроорганізмів, які використовують у біотехнології як пробіотики. У рибній промисловості найчастіше використовуються такі штами: *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. plantarum* і *L. rhamnosus*. Головною перевагою використання цього роду є захист аквакультурних видів від патогенних інфекцій.[26]

Адгезія є бажаною властивістю для пробіотичного штаму, оскільки вона сприяє збереженню пробіотиків у кишечнику та їх взаємодії з епітеліальними та імунними клітинами хазяїна. Слизова оболонка кишечника складається з одного або кількох шарів епітеліальних клітин, які перекривають шар пухкої сполучної тканини. Слизова оболонка вкрита захисним шаром слизу. У штамів *Lactobacillus* досліджена адгезія до слизу та епітеліальних клітин кишечника. Білки клітинної стінки, які зв'язують слиз, відіграють важливу роль у прикріпленні лактобацил до кишечника, а також у взаємодії з господарем.

Штами *Lactobacillus* використовують для покращення активності ферментів, імунної відповіді, розвитку, збільшення ваги та навіть для покращення якості води. Пробіотики можуть стимулювати вироблення травних ферментів, таких як амілаз, протеаз, ліпаз та лізоциму, які у здорових риб забезпечують засвоюваність поживних речовин. [24]

Отже, *Lactobacillus* як пробіотики в аквакультурі використовують для :

- Покращення засвоюваності корму.

Включення *Lactobacillus sp.* і *Lb. pentosus* у різних концентраціях супроводжується зростанням активності травних ферментів у *Litopenaeus vannamei*. Включення *Lb. plantarum* значно посилює активність амілази, ліпази та протеази нільської тілапії (*Oreochromis niloticus*). Значне підвищення активності ліпаз, амілаз, трипсину, лужної фосфатази також зафіксовано у коропа звичайного (*Cyprinus carpio*), камбали оливкової (*Paralichthys olivaceus*) і райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*), яких годували кормом з додаванням *Lb. plantarum* у поєднанні з β -глюканом, *Bacillus sp.* і *Citrobacter*. [26]

- Покращення продуктивності.

Пробіотики є одними із найперспективніших харчових добавок, які використовують для підтримки нормального росту та здоров'я аквакультурних видів, які вирощують на фермах. Вони є джерелом поживних речовин, вітамінів і травних ферментів, таким чином інтенсифікуючи ростові процеси. Введення пробіотиків в раціон покращує апетит та засвоюваність поживних речовин шляхом підтримки активності кишкових мікроорганізмів. [23]

- Підвищення стійкості до захворювань.

Пробіотики є ефективним засобом профілактики захворювань в аквакультурі. Пробіотики взаємодіють з іншими кишковими бактеріями або протидіють їм, таким чином, що вони перешкоджають колонізації або безпосередньо пригнічують та знижують кількість умовно-патогенних мікроорганізмів. Пробіотики мають здатність синтезувати сполуки, які володіють бактерицидною дією на кишкові патогенні бактерії хазяїна. Бактерицидна дія зумовлена утворенням антибіотиків, бактеріоцинів, ферментів та перекису водню, а також органічних кислот, які змінюють рН кишечника.[27] Найчастіше використовують *Lb. plantarum* в аквакультурі. Під час введення в раціон *Lb. plantarum* підвищується стійкість тихоокеанської білої креветки до *Vibrio* spp. і звичайного коропа проти *Aeromonas hydrophila*. Також часто використовують *Lb. pentosus*, яка підвищує стійкість тихоокеанської білої креветки проти *Vibrio vulnificus*, *Vibrio rotiferianus*, *Vibrio campbellii*. Поєднання *Lb. plantarum* і *Lac. lactis* призвело до підвищення стійкості тихоокеанських білих креветок проти *V. parahaemolyticus*. Також використовують багаторазове застосування *Lactobacillus* з іншими пробіотиками та імуностимуляторами для покращення стійкості від захворювань у багатьох видів риби.[26].

Деякі лактобактерії і біфідобактерії здатні виробляти антимікробні пептиди, відомі як бактеріоцини, які запобігають розмноженню окремих патогенів. Бактеріоцини – це невеликі катіонні молекули, що складаються з 30-60 амінокислот. Досліджено, що деякі з цих сполук, вироблених *L.*

plantarum і *L. acidophilus*, пригнічують ріст *Helicobacter*, *C. difficile*, ротавірусів і мультирезистентних *Shigella* spp. і *E. coli* .[24]

Основні пробіотичні механізми дії включають посилення епітеліального бар'єру, підвищення адгезії до слизової оболонки кишечника та супутнє пригнічення адгезії патогенів, конкурентне виключення патогенних мікроорганізмів та модуляцію імунної системи.

Кишковий бар'єр є основним захисним механізмом, який використовується для підтримки цілісності епітелію та захисту організму від навколишнього середовища. При порушенні цієї бар'єрної функції, бактеріальні та харчові антигени можуть досягати підслизової оболонки і викликати запальні реакції, які можуть призвести до кишкових розладів. Пробиотики можуть ініціювати відновлення бар'єрної функції після пошкодження. Глікопротеїни муцину (муцини) є основними високомолекулярними складовими епітеліального слизу. Пробиотики можуть сприяти секреції слизової оболонки як одному з механізмів поліпшення бар'єрної функції та виключення патогенів. Деякі види *Lactobacillus* підвищують експресію муцину в клітинних лініях кишечника. Однак цей захисний ефект залежить від адгезії *Lactobacillus* до моношару клітини, яка, ймовірно, не виникає *in vivo*. [26]

Адгезія до слизової оболонки кишечника розглядається як обов'язкова умова колонізації і має важливе значення для взаємодії між пробіотичними штамами і господарем. Адгезія пробіотиків до слизової оболонки кишечника також важлива для модуляції імунної системи і антагонізму проти патогенів.

Таким чином, адгезія є одним з основних критеріїв відбору нових пробіотичних штамів. Молочнокислі бактерії демонструють різні поверхневі детермінанти, які беруть участь у їх взаємодії з епітеліальними клітинами кишечника і слизом. Додатково в слизовому шарі присутні ліпіди, вільні білки, імуноглобуліни і солі. Ця специфічна взаємодія утворює зв'язок між поверхневими білками пробіотичних бактерій і конкурентним виключенням патогенів зі слизу. Бактерії продукують поверхневі адгезини, які забезпечують

прикріплення до слизового шару. Цей процес в основному опосередковується білками, хоча і ліпотейхоєві кислоти також задіяні. Найбільш вивченим прикладом бактеріальних адгезинів, орієнтованих на слиз, є MUB (білок, який зв'язує слиз), що виробляється *Lactobacillus reuteri*. У слизовій адгезії лактобактерій беруть участь в основному секретовані і поверхнево-асоційовані білки, які або закріплені на мембрані через ліпідну частинку, або вбудовані в клітинну стінку. Здатність біфідобактерій пригнічувати адгезію патогенів до слизу, як правило, пригнічується підвищенням кислотності. В цілому, стійкість до змін рН у біфідобактерій є стратегією вибору штамів, які сприяють їх потенційній функціональності в якості пробіотиків проти конкретних патогенів.[27]

Механізми, що використовуються одним видом бактерій для виключення або зменшення росту іншого виду, різноманітні, включаючи наступні механізми: ліквідація доступних ділянок бактеріальних рецепторів, виробництво і секреція антимікробних речовин і селективних метаболітів, конкурентне виснаження необхідних поживних речовин. Конкурентне виключення кишковими бактеріями засноване на їх взаємодії, опосередкованої конкуренцією за доступні поживні речовини і за місця адгезії слизової оболонки. Щоб отримати конкурентну перевагу, бактерії також можуть змінювати своє середовище, щоб зробити його менш придатним для своїх конкурентів. Виробництво антимікробних речовин, таких як молочна і оцтова кислоти, є одним із прикладів такого типу модифікації навколишнього середовища. Загалом, штами пробіотиків здатні пригнічувати приєднання патогенних бактерій за допомогою стеричної перешкоди на рецепторах збудника ентероцитів.[23]

Ще одним з механізмом дії пробіотиків є утворення органічних кислот та синтез антибактеріальних речовин, які називаються бактеріоцинами. Зокрема оцтова і молочна кислоти, надають сильну інгібуючу дію відносно грамнегативних бактерій, і вони вважаються основними антимікробними сполуками, які відповідають за інгібуючу активність пробіотиків проти

патогенних мікроорганізмів. Недисоційована форма органічної кислоти потрапляє в бактеріальну клітину і дисоціює всередині її цитоплазми. Зниження внутрішньоклітинного рН або внутрішньоклітинне накопичення іонізованої форми органічної кислоти може призвести до загибелі збудника.[26]

Багато лактобацил виробляють антибактеріальні пептиди, включаючи бактеріоцини і невеликі АМФ. Бактеріоцини, що продукуються грампозитивними бактеріями (зазвичай лактобактеріями) мають вузький спектр активності і діють тільки проти близькоспоріднених бактерій. Загальні механізми бактеріоцин-опосередкованого інгібування включають руйнування клітин-мішеней шляхом пригнічення синтезу клітинної стінки. Кілька досліджень показали, що виробництво бактеріоцину надає штамам конкурентну перевагу в складних мікробних середовищах як наслідок пов'язаної з ними антимікробної активності. Виробництво бактеріоцину може дозволити встановити і збільшити поширеність продукуючих штамів, а також забезпечити пряме пригнічення росту патогенів у шлунково-кишковому тракті.[27]

Біфідобактерії і лактобактерії також виробляють різноманітний набір жирних кислот, наприклад, кон'юговану лінолеву кислоту, яка має антиканцерогенну дію.

Нарешті, пробіотичні бактерії здатні виробляти так звані декон'юговані жовчні кислоти, які є похідними солей жовчних кислот, які демонструють більш сильну антимікробну активність порівняно з солями жовчних кислот, синтезованими організмом господаря.

Загальновідомо, що деякі штами пробіотиків виробляють метаболіти, які пригнічують ріст інших видів бактерій чи грибів. Деякі дослідники повідомляють, що *Lactobacillus* може виробляти фунгіцидні речовини, такі як бензойна кислота, метилгідантоїн, мевалонолактон і коротколанцюгові жирні кислоти [23].

1.2. Особливості розвитку травної системи личинок риб при переході на екзогенне живлення

У травному тракті риб перетравлення їжі здійснюється ферментами, як і у інших сільськогосподарських тварин. Проте їх кількість та тип залежить від фізіологічних, анатомічних і поведінкових відмінностей.[21]

Личинковий період розвитку триває з моменту виходу сформованого зародка з яйцеклітини до тих пір, поки організм не нагадує дорослу особину. Одразу після вилуплення настає фаза вільного ембріона. [5]

Під час личинкового періоду змінюється форма тіла, зникають ембріональні органи (наприклад, ембріональна складка, жовтковий мішок), з'являються органи, характерні для дорослих риб (наприклад, плавники, зябра, плавальний міхур), а інші перебудовуються. У заключній фазі личинкового періоду відбуваються найбільш швидкі зміни в будові організму(метаморфози). Потім настає початок періоду мальків - мальки відрізняються від дорослих риб тільки незрілістю статевих залоз. [28]

Личинкові стадії риб мають морфофізіологічні особливості, які відрізняють їх від дорослих особин. Онтогенетичні зміни органів травлення зумовлюють обмежену здатність перетравлювати певні корми. Оптимізація травлення залежить від нервової та гормональної регуляції. Для розробки дієт для личинок риб та їх адаптації до умов навколишнього середовища необхідне цілісне розуміння процесів травлення, щоб оптимізувати умови вирощування та сформувати раціон. [15]

Личинки риб отримують інформацію про наявність їжі з навколишнього середовища завдяки органам чуття. Тип та інтенсивність їх відповідей залежать від характеру подразника, стадії розвитку і виду. Наявність їжі визначається за допомогою широкого спектру стимулів: хімічних (нюхові та смакові рецептори), зорових (очі) та механічних (бічна лінія). Найвіддаленіший подразник риби виявляють завдяки нюху, а найближчий - дотику і смаку. Відомі види, харчова поведінка яких не залежить від світла.

Ці види знаходять їжу завдяки нюховому епітелію та смаковим брунькам (хімічні подразники), бічній лінії та ампулярним (електричним) органам. Крім того, скотопічний зір, тобто зір при слабкому освітленні, відрізняється у представників одного виду на різних стадіях розвитку відповідно до розвитку рецепторів сприйняття світла. Зміни спектру світла можуть впливати на харчову поведінку та ріст личинок.[34]

Зорова система риб може розрізняти різну довжину хвилі, має високу просторову гостроту. Зір може мати скотопічний (низька інтенсивність світла) і фотопічний (висока інтенсивність світла) характер, але кожен вид має свої особливості. Очі личинок риб зазвичай функціонують на початку живлення, принаймні сітківка оснащена одиночними колбочками, які чутливі до зеленого світла. Ця структура забезпечує відносно гарний зір при яскравому освітленні. Подвійні та мозаїчні конусні структури та стрижневі фоторецептори зазвичай з'являються пізніше в розвитку. Після завершення формування структури сітківки, личинки можуть бачити при низькій інтенсивності світла та здатні виявляти рух здобичі. Під час розвитку діаметр ока збільшується, що забезпечує ширший кут зору та сприйняття на великій відстані. [29]

Під час вилуплення диференціюються перші нюхові сенсорні клітини, нюх забезпечує виявлення здобичі у більшості личинок після першого годування. Орган нюху складається з різних типів сенсорних клітин. Нюхові рецептори разом з бічною лінією, яка визначає напрям течії, дозволяють визначити джерело запаху. [35]

Також у личинок риб наявні хеморецептори, які залучені до харчової поведінки. Одними з таких є система смакових рецепторів, які викликають рефлекторні реакції, такі як кусання. У той час як нюхові рецептори беруть участь у виявленні їжі на великій відстані, смакові рецептори відповідають за визначення смакових якостей. Зовнішні смакові рецептори визначають придатність їжі до споживання.[13]

Ротовий апарат - це орган, який забезпечує подрібнення, захоплення і ковтання їжі. Риби-личинки поглинають їжу в основному шляхом прямого

ковтання частинок, які ідентифіковані органами чуття як їжа, оскільки у культивованих видів зуби та здатність кусати формується на пізніх стадіях личинкової фази. Вибір здобичі здійснюється шляхом вибору оптимальних розмірів, які личинка може проковтнути. Ротовий отвір і діаметр стравоходу є визначальними факторами під час вибору харчових частинок. Доступність даної їжі визначається шляхом співвідношення розмірів здобичі до ротової щілини. Таким чином, личинки риб здатні ковтати жертви, які за розміром подібні до ротової щілини у співвідношенні від 25% до 60%. [36] Розмір доступних частинок, які може захопити личинка збільшується відповідно до інтенсивності її росту. Зростаючі личинки намагаються проковтнути максимальну кількість здобичі, щоб отримати достатню кількість поживних речовин, необхідних для стабільного росту, зберігаючи при цьому співвідношення між енергією, отриманою при поглинанні здобичі, та енергією, витраченою на її захоплення. [1]

Руховий потенціал на ранніх личинкових стадіях залежить від довжини тіла та розвитку анатомічних особливостей, таких як хорда, плавці та м'язова система тулуба, які поступово розвиваються. Коли відбувається збільшення загальної довжини, відбувається згинання хорди, згодом первісна складка, яка наявна на момент вилуплення, протягом кількох тижнів змінюється бічними, середніми та хвостовим плавцями. Диференційовані хребці замінюють хорду для підтримки тіла, плавальний міхур роздувається, а розмір та кількість м'язових волокон збільшується. Здатність до плавання залежить від гідродинамічних умов і форми тіла личинки. У перші дні годування, коли загальна довжина тіла личинок риби коливається від 2 до 4 мм, домінують сили тертя, а швидкість і тривалість плавання обмежені. Сили інерції стають більш актуальними після згинання хорди та розвитку хвостового плавця, зазвичай на 5-6 мм загальної довжини. [14]

Протягом перших днів годівлі, обмежена рухова активність перешкоджає активному захопленню та пошуку здобичі. У свою чергу, коли

здатність до плавання стає кращою, личинки активно шукають їжу та переслідують здобич.[29]

Плавальну роботу забезпечують ритмічні скорочення сегментарно розташованих міотомів. Обмеження годівлі та незбалансований раціон негативно впливають на функціонування цих структур, зменшуючи здатність до пересування та пошуку їжі. Негативний вплив на окостеніння призводить до неправильного розвитку кісток. Проблеми розвитку хребта та плавних променів спостерігаються коли у раціоні недостатня кількість певних класів ліпідів, вітамінів А та D та незбалансований амінокислотний склад. [25]

Отже, на структуру міотома негативно впливає незбалансована дієта, яка призводить до затримки росту, яка часто спостерігається у личинок, які залишились без їжі у перші дні личинкового періоду. У деяких видів недостатнє ліпідне харчування викликає функціональні розлади плавального міхура. [32]

Ритм годування залежить від наявності освітлення. Цикли день/ніч визначають ритмічність годування личинок риби. Дикі популяції харчуються переважно на сході та заході сонця, коли демонструється найвища активність травних ферментів. Це пояснюється особливою інтенсивністю світла цих сутінкових годин і міграцією зоопланктону. Таким чином, розрізняють такі типи годування : безперервне, денне, нічне або переважно сутінкове. Схема живлення може змінюватися в процесі розвитку, і деякі види демонструють різні моделі до і після метаморфозу. Личинки можуть мати ендогенні ритми, на які сильно впливають екзогенні фактори, такі як рівень освітлення або час, коли їжа стає більш доступною.[10]

Центр регуляції ковтання та гомеостазу у риби, розташований у гіпоталамусі. Сигнали ситості шлунково-кишкового тракту, впливають на апетит як у молодих, так і в дорослих риби. Наприклад, у райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*) відчуття голоду з'являється, коли 80–90% вмісту шлунка від попереднього прийому їжі переміщено вниз за течією до проксимального відділу кишечника. Центр регуляції апетиту отримує

аферентні сигнали щодо енергії, накопиченої в організмі. У печінці виробляється пептидний гормон - лептин, який відіграє важливу роль у цій сигнальній функції у риби.[17]

Від активності травних ферментів та функціональності органів травлення залежить добовий раціон і ритм годівлі у личинок риби. Забезпечення достатньою кількістю їжі є пріоритетним питанням.[18]

Після того, як личинки захопили і проковтнули їжу, травна система забезпечує її розщеплення до простих молекул та транспортування через епітелій кишечника у кров.[4]

Личинки риби класифікують відповідно до наявності шлунка: риби у яких відсутній шлунок не розвинули його навіть на стадії дорослої особини, у інших видів риби з раннього віку розвивається функціональний шлунок.[20]

Під час розвитку личинок внутрішня та зовнішня морфологія різко змінюється, зазнаючи найбільших змін під час метаморфозу. Зокрема, морфологія та структура деяких органів, а саме кишечника, шлунка та стравоходу, значно змінюються. Під час метаморфозу відбувається загальна перебудова відповідних органів, таких як печінка, підшлункова залоза та нирки. Виділяють три стадії онтогенезу травної системи личинок риби:

- 1) Ріст і реорганізація кишечника з простої прямої трубки.
- 2) Утворення та ріст травних залоз (підшлункова залоза та печінка).
- 3) Розвиток шлункових залоз і формування справжнього функціонального шлунка. [2]

На початку екзогенного живлення шлунково-кишковий тракт має такі відділи: щічно-глотковий, стравохід, закладку шлунка, кишківник і задній прохід. Також використовується інша термінологія, за якою ці різні ділянки поділяють на передню, середню та задню кишки. На початку екзогенного живлення довжина кишечника менша половини довжини тіла. Середня кишка відокремлена від передньої та задньої м'язовими сфінктерами. За кількома винятками кишка згортається в петлю перед початком зовнішнього живлення. На наступному етапі розвитку, шлунково-кишковий тракт збільшує

свою абсорбційну здатність за рахунок подовження та складчастості слизової оболонки. Стінки ШКТ збільшуються в товщину за рахунок епітелію та дозрівання ентероцитів. Відбувається розвиток кишкової щіткової облямівки з мікроворсинками.[35]

Під час перехідного періоду від личинки до малька епітелій шлунка структурно диференціюється, також розвиваються залози і до кінця цього періоду налагоджується шлункове травлення. [11]

Пілоричні придатки розвиваються під час розвитку шлункових залоз. Сліпа кишка збільшує об'єм передньої частини середньої кишки, а також абсорбційну зону травного тракту, яка є важливою для всмоктування білків та жирів. У деяких видів спостерігаються зміни в ентероцитах під час онтогенезу, які включають посилену травну здатність щіткової облямівки внаслідок підвищення активності мембраноасоційованих ферментів, які сприяють зміні травної здатності організму. У європейського морського окуня цей процес відбувається через 3–4 тижні після вилуплення, і вважається, як перехід до дорослого способу травлення. На личинкових стадіях відбувається подовження травного тракту. Існують невеликі зміни в морфології кишечника після метаморфозу, і вони можуть включати подальше збільшення його відносної довжини та, можливо, адаптацію до змін у дієті.[12]

Анатомічний і функціональний онтогенез шлунково-кишкового тракту подібний у більшості костистих, але існують міжвидові варіації ферментативної активності. Найсуттєвішою відмінністю є час розвитку шлунка. Момент, коли з'являються перші шлункові залози, коливається від кількох днів до кількох місяців після першого годування, навіть в одній родині. Однак, у *Solea senegalensis*, незважаючи на наявність шлункових залоз, активність кислих протеаз не була виявлена ні в молоді, ні в дорослих особин. Видові відмінності спричинені еволюційними адаптаціями до дієт, з якими вони стикаються у своєму природному середовищі.[19]

Печінка, підшлункова залоза та жовчний міхур диференціюються ще на стадії ембріона та жовткового мішка та функціонують на початку екзогенного

живлення, яке зазвичай відбувається за деякий час до повного поглинання жовткового мішка. Наприклад, підшлункова залоза атлантичної тріски є окремим органом на початку першого годування. Під час онтогенезу підшлункова залоза розвивається з компактного органу в подовжений і розгалужений орган уздовж середньої кишки. Перший острівець Лангерганса зазвичай можна спостерігати з першого годування. Додаткові острівці з'являються пізніше, хоча з високою міжвидовою мінливістю. [22]

У личинок зрілі гепатоцити печінки містять глікоген та білкові гранули у цитоплазмі. Основною функцією печінки є вироблення жовчі, яка необхідна для травлення ліпідів. Синтез жовчовивідних продуктів відбувається з початку трофічного життя личинок.[37]

Кишковий епітелій здатний до постійного самовідновлення, він забезпечує кишечнику пластичність, яка необхідна для адаптації до змін умов годування, і відіграє ключову роль у гомеостазі. Розвиток кишечника відбувається заздалегідь запрограмованими внутрішніми факторами та зовнішніми сигналами, але стресові умови можуть перешкоджати механізмам регуляції, які задіяні у розвитку епітелію, тим самим порушуючи його цілісність та впливаючи на його здатність до самовідновлення. Перехід на незбалансоване харчування, коли моторика шлунково-кишкового тракту та всмоктування ще не повністю розвинені, може призвести до епітеліальних розладів, які пригнічують ріст. Для запобігання затримки розвитку та майбутніх вад необхідно ідентифікувати фактори, які впливають на проліферацію епітелію. [32]

Ремоделювання вимагає постійної проліферації, диференціації та апоптозу. Під час розвитку кишечник вистелений моношаром швидко оновлюваних клітин, у якому клітинна проліферація та апоптоз координуються та регулюються подіями клітинної сигналізації між епітеліальним та мезенхімальним шарами. Дорослі епітеліальні клітини розташовані у перехідному шарі між епітелієм і сполучною тканиною .

Для розробки кормів та раціонів харчування необхідне розуміння ознак проліферації та ремоделювання епітелію в кишечнику риб, оскільки під час розвитку харчових звичок, вони змінюються від зоопланктоїдних до м'ясоїдних, рослинної або всеїдних, з більшою чи меншою перевагою м'яса чи рослинного матеріалу.[6]

1.3. Ферменти травної системи личинок риб

Процес травлення охоплює серію послідовних процесів у травному тракті, починаючи з прийому їжі, включаючи секрецію ферментів, травлення за допомогою механічних і ферментативних процесів, всмоктування, та регуляцію. Ефективність травлення залежить від надходження і засвоєння поживних речовин. Під час першого годування травний тракт більшості видів риб містить ферменти, пов'язані з метаболізмом, травленням, всмоктуванням і засвоєнням таких молекул, як білки, ліпіди та глікоген. Кожен фермент розвивається незалежно протягом онтогенезу, з варіаціями, пов'язаними з видом риби та температурою. Жива їжа, тобто зоопланктон, який споживають личинки, сприяють процесу травлення, завдяки їх травним ферментам або шляхом автолізу, або у вигляді зимогенів, які активують ендogenousні травні ферменти личинок. Живі організми також містять кишкові нейропептиди, які покращують травлення. Крім того, сухі корми для личинок містять білки та інші інгредієнти, які важко перетравлювати, особливо тому, що складені раціони містять 60–90% сухої речовини, тоді як зоопланктон становить лише 10%. Включення різних травних ферментів, особливо протеаз, у раціон для личинок риб покращує засвоєння поживних речовин.[35]

Личинки риб, мають недостатню кількість ендogenousних травних ферментів, і тому у травленні беруть участь екзогенні ферменти. Екзогенні ферменти, отримані із зоопланктону, можуть складати 70–80% загальної активності ферментів у травному тракті риб. Незбалансовані дієти призводять до сповільнення росту та високої смертності на ранніх стадіях розвитку личинок. Тому виникла необхідність включати екзогенні ферменти у раціон.

Дослідження протягом останніх десятиліть виявили, що риби, розвиток яких відбувався у природних умовах, мають достатній рівень ендогенних травних ферментів, щоб дозволити перетравлювати відповідний живий корм. У свою чергу, риби вирощені у штучних умовах, потребують введення екзогенних ферментів у раціон. [16]

Роль карбогідраз у процесах травлення на ранніх стадіях розвитку риб приділяється менше уваги, ніж протеазам і ліпазам. Проте, у личинок риб є активна α -амілаза, яка є ключовим ферментом для перетравлення складних вуглеводів. Оскільки, слинних залоз у риби немає, α -амілаза синтезується лише в підшлунковій залозі. Відповідно, що її активність виявляється тоді, коли підшлункова залоза починає функціонувати. На різних стадіях розвитку личинок спостерігаються різні моделі активності α -амілази. Високий рівень активності спостерігається після першого годування, який надалі має тенденцію до зниження протягом наступних тижнів. У представників з м'ясоїдним типом живлення, як правило, знижується активність амілази, коли шлунок починає функціонувати, тоді як травоїдні та всеїдні види, демонструють збільшення активності, коли вони наближаються до стадії малька.[12]

Функція амілази у перші моменти життя личинок, під час яких споживається дуже мала кількість вуглеводів, залишається незрозумілою. Було припущено, що її відносно високий рівень активності пов'язаний з необхідністю ефективного перетравлення потенційних джерел вуглеводів, щоб оптимізувати енергію, отриману з їжі, необхідну для підтримки швидкого росту в цей критичний період.[21]

Активність ліпаз виявляється під час першого годування. Вона може зменшуватись, або залишатись стабільною протягом раннього личинкового періоду в залежності від виду риб. Дослідження активності ліпази під час онтогенезу личинок має велике значення, оскільки вони пов'язані зі засвоєнням харчових ліпідів. Личинки не можуть синтезувати *de novo* n-6 лінолеву та n-3 ліноленову жирні кислоти, тому вони повинні додаватись в

раціони залежно від типу і концентрації необхідних поліненасичених жирних кислот, які відрізняються між видами риб і здатністю личинок до травлення. [5]

Ферменти, які виробляються ентероцитами, сприяють остаточному перетравленню білків і пептидів. Ферменти облямівки, які розташовані в апікальній клітинній мембрані - амінопептидази, гідролізують малі пептиди, які є результатом розщеплення панкреатичними протеазами, на вільні амінокислоти. Лейцинамінопептидаза ентероцитів малоактивна під час першого годування, але активність збільшується з розвитком травної системи личинок. Активність цитозольних (внутрішньоклітинних) пептидаз, таких як лейцин-аланін-пептидаза, яка бере участь у деградації білка після піноцитозу, є високою у деяких видів під час першого годування, але має тенденцію до зниження в міру розвитку личинок, одночасно з підвищенням рівня лужної фосфатази.[21]

1.4.Протеолітична активність шлунково-кишкового тракту личинок риб

Активність травних ферментів у личинок нижча, ніж у дорослих особин того ж виду. Крім того, травні залози личинок найчастіше спочатку не виробляють повного набору ферментів, необхідних для повноцінного травлення. Дефіцит протеолітичних травних ферментів компенсується екзогенними ферментами, які отримують з проковтнутого зоопланктону. З розвитком шлунково-кишкового тракту значення ферментів екзогенного походження значно знижується. Шлунково-кишковий тракт, який у личинок менш розвинений, ніж у дорослих риб, зумовлює нижчу активність ферментів, що є причиною низької засвоюваності зоопланктону. Недостатньо розвинений травний тракт і відсутність деяких травних ферментів у личинок викликають серйозні труднощі при годуванні штучними кормами. [7]

Протеолітичні ферменти підшлункової залози є важливими на ранніх стадіях життя риб через відсутність функціонального шлунка та пепсину.

Трипсин є одним з найважливіших протеолітичних ферментів на ранній стадії личинок морських риб. Трипсин - це серинова протеаза, яка гідролізує білки, а також відіграє ключову роль в активації інших ферментів підшлункової залози. Трипсин виробляється у вигляді неактивного попередника трипсиногену, і розщеплює пептидні ланцюги, головним чином на карбоксильному боці амінокислот лізину або аргініну. [38] Висока потреба личинок в білках зумовлена швидким ростом та розвитком на ранніх стадіях життя. Коли вони споживають білкові джерела їжі, трипсин виробляється в підшлунковій залозі та виділяється в кишечник, для перетравлення. У процесі розвитку личинки можуть змінювати свій раціон.[14] Цей перехід потребує збільшення активності трипсину для забезпечення ефективного травлення та засвоєння білків з нових джерел їжі.

На активність трипсину в личинках риб впливає безліч факторів, зокрема температура води, рН, та тип і кількість доступної їжі. Оптимальний діапазон активності трипсину в личинках риб залежить від виду, але зазвичай коливається між рН=7 та рН=9.[20]

Відома «чотирифазна модель» онтогенетичного розвитку трипсинової активності в личинках риб від вилуплення до метаморфозу. Фаза I відбувається при переході на екзогенне живлення, коли рівень трипсину підвищується. Фаза II - «критична» стадія, для якої характерно зниження трипсинової активності, тому може спостерігатися слабкий ріст і високий рівень смертності. У III фазі спостерігається стабільна активність трипсину, але основною умовою є оптимальне харчування. У фазі IV, яка відбувається на початку метаморфозу, трипсинова активність знову знижується, оскільки вона частково замінюється активністю пепсину в шлунку, що розвивається. Активність трипсину зменшується на пізніх личинкових стадіях, коли шлунок стає функціональним, а активність пепсину поступово зростає.[22]

Хімотрипсин - серинова лужна протеаза, яка виробляється підшлунковою залозою та секретується у вигляді попередника хімотрипсиногену в просвіт кишечника. Активація ферменту відбувається розщепленням невеликого пептидного ланцюга. Хімотрипсин гідролізує пептидні зв'язки на карбоксильному боці ароматичних бічних ланцюгів тирозину, триптофану та фенілаланіну, а також великих гідрофобних залишків, таких як метіонін. Його активність доповнює активність трипсину. Хімотрипсин сприяє перетравленню білків на ранніх стадіях розвитку личинок. Активність хімотрипсину залежить від типу їжі, температури та рівня кисню у воді. Зі збільшенням температури води, зростає його активність. [28]

Пепсин виробляється і виділяється слизовою оболонкою шлунка деяких видів риб. Пепсин найкраще працює в кислих умовах, тому він активний у шлунку при низьких значеннях рН. Активність пепсину може змінюватися залежно від таких факторів, як тип корму, вік і стадія розвитку личинок, а також умов навколишнього середовища, в яких вони ростуть. Дослідження активності пепсину використовують для оптимізації годівлі, щоб покращити ріст та зменшити рівень смертності риб.

Пепсин міститься у функціональному шлунку і активний у кислому середовищі при рН 1,5–2,0. Оскільки, на ранніх стадіях розвитку відсутній функціональний шлунок, під час метаморфозу повільно розвивається пепсиноподібна ферментативна активність і здатність до підкислення. На відміну від хімотрипсину та трипсину, які мають специфічні місця дії, пепсин має широкий спектр активних центрів. Перетравлення пепсином зумовлює утворення поліпептидів різноманітних розмірів. HCl і пепсин у комбінації робить шлунок високоефективним органом для розщеплення складних білків. Саме тому, активність трипсину, зменшується, коли шлунок починає функціонувати. Забезпечення функціонального протеолітичного травлення в шлунку дозволяє включати ширший спектр інгредієнтів у рибні

раціони. Відсутність функціонального шлунка обмежує засвоюваність харчових білків на наймолодших стадіях личинок риб. [31]

Розвиток травного тракту та зміни активності протеолітичних ферментів у личинок залежить від віку та темпів розвитку. Шлунок і пілоричний сфінктер формуються найчастіше на 13 день після вилуплення і формуються до 17-го дня. Високий рівень піноцитозної активності наявний в клітинах прямої кишки на 6 та 14 день життя личинок. рН передньої кишки до формування шлунка на ранніх стадіях личинки є лужним (рН 7,7 на 8 добу), а на 17 день рН шлунка стає кислим (рН 5,0) і спостерігається мінімальна активність пепсину. До 22 дня кислотність шлунка стає більш вираженою (рН 3,7) і активність ферментів пепсину зростає. Одразу після вилуплення активність ферментів трипсिनного типу найчастіше спостерігається доволі високою, але починає знижуватись на 8-9 день. Активність трипсину знижується після 17 дня, хоча рН у кишечнику залишається лужним.[34]

Різниця активності пепсину та інших протелітичних ферментів пов'язана з видовою специфічністю. Травні ферменти личинок риб малоактивні перед початком екзогенного живлення та їх активність зростає до при переході на екзогенне живлення. Специфічна активність ферментів залежить від морфологічної диференціації травного тракту та розвитку травних залоз.[33]

Зниження рівня активності для більшості травних ферментів, при переході від личинкової стадії до малька пов'язані з фізіологічними змінами, які відбуваються під час розвитку личинок. Оскільки, добре відомо, що травні ферменти відіграють важливу роль у катаболізмі жовткової оболонки, процесах енергетичного обміну і регуляції росту на стадіях ембріонального розвитку, тому, ці ферменти забезпечують важливі зв'язки між поживними речовинами та основним метаболізмом і ростом.

Хімотрипсин, лейцинамінопептидаза і карбоксипептидаза А здатні гідролізувати пептидні зв'язки (функціонують як ендопептидази або екзопептидази), утворюючи амінокислоти, які, в свою чергу, легко засвоюються личинками та необхідні для повноцінного метаморфозу. Крім

того, різні взаємодії між лужними ферментами, такими як трипсин і хімотрипсин вважають хорошими показниками для визначення рівня засвоюваності та функціонування травної системи.[34]

Функціонують лейцинамінопептидази та карбоксипептидази А в ентероцитах. У багатьох видів риб амінопептидаза була виявлена в кишечнику безпосередньо перед першим годуванням.

Експресія трипсину та хімотрипсину залежить від внутрішніх (етапу життя) та зовнішніх (голодування, годівля, температура) факторів, що впливають на швидкість росту. Зростання активності стимулюється підвищенням температури. Активність трипсину залежить від температури води на початку годування. Специфічна активність трипсину та співвідношення активності трипсину до хімотрипсину (співвідношення Т/С) збільшується, коли відбувається стимуляція росту. З іншого боку, специфічна активність хімотрипсину підвищується, коли знижується швидкість росту. [33]

Трипсин є чутливою протеазою в умовах, що сприяють росту риби, тоді як хімотрипсин відіграє важливу роль, коли ріст обмежений або пригнічений. На відміну від трипсину, вища хімотрипсиносспецифічна активність спостерігається, коли ріст обмежений через голодування або дефіцит їжі. Під час голодування специфічна активність трипсину знижується, а хімотрипсину збільшується, що призводить до нижчого значення співвідношення Т/С. [34]

Ферментативна активність залежить від достатнього та збалансованого раціону риб. У личинок, яких годували кожні 4 години, протеолітична активність була значно вищою ніж у риб, яких годували лише один раз на добу.

Отже, загальна активність протеаз змінюється залежно від стадії розвитку, часу годування, кількості їжі та значень рН. [10]

Кислі протеази стабільні при кислому рН, і їх активність знижується зі збільшенням рН. На відміну від цього, лужні протеази стабільні при лужному рН і стійкі до злегка кислого рН. Однак у хижих та всеїдних риб, кислі

протеази деякий час є стабільними до лужного рН. Кислі протеази втрачають активність при нейтральному або лужному рН. Однак ця втрата активності компенсується гідролізом лужних протеаз при кислому рН у кишечнику. Таким чином, лужні травні протеази можуть почати діяти з моменту потрапляння їжі в кишечник навіть при кислому рН.

Слід зазначити, що лужні протеази більш стабільні при різних значеннях рН, оскільки у них наявна більша кількість ізоформ (трипсин, хімотрипсин, 1-амінопептидаза і карбоксипептидаза А.[34]

Розділ II. Матеріали та методи дослідження

2.1. Матеріали та об'єкти досліджень

Досліджували ефективність застосування пробіотичного препарату *Lactobacillus acidophilus* ІМВ В-7279, наданого Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Експеримент проводили на личинках стерляді прісноводної (*Acipenser ruthenus*) віком 8 діб та середньою масою $0,014 \pm 0,0006$ г, яких утримували в умовах рециркуляційної системи у ємностях об'ємом 35 л.

Личинок було поділено на 2 групи – контрольну та дослідну (по 100 особин в кожній). Для особин дослідної групи як живий корм використовували науплій артемії, збагачених лактобактеріями *L. acidophilus* ІМВ В-7279. Контрольна група риб отримувала необроблену артемію.

Вигодовування живим кормом тривало 14 діб.

Зразки відбирали на початку експерименту, 7-у та 14-у доби та заморожували. Для проведення визначення протеолітичної активності використовували збірні проби

Культивування живого корму (заморожені цисти артемії) здійснювалось 24 години у апаратах Вейса за температури 28°C у сольовому розчині (30 г/л) при постійній аерації та освітленні. Після викльову артемію пропускали кілька разів через сито для позбавлення від стулок та нежиттєздатних цист.

Збагачення артемії пробіотиком проводили шляхом розподілення його у культуральному середовищі в концентрації 5×10^5 КУО/л ти утриманні у ньому артемії протягом 12 годин. Артемія, внаслідок специфіки функціонування фільтраційного апарату живлення, накопичує пробіотик у своєму організмі та служить вектором доставки останнього в організм личинки риби.

2.2. Методи досліджень

2.2.1. Визначення рівня протеолітичної активності модифікованим методом Ансона

Загальну протеолітичну активність визначали за модифікованим методом Ансона в трьох діапазонах рН (4,8; 7,4 та 9,0) з використанням в якості субстратів казеїну для нейтральних та лужних протеїназ та гемоглобіну для кислих протеаз .

Цей метод заснований на гідролізі білка протеазами до пептидів і амінокислот з подальшим їх визначенням. За одиницю протеолітичної активності прийнята здатність ферменту перетворювати казеїн в неосаджуваний стан трихлороцтовою кислотою за 1 хв при температурі 30°C в кількості, що відповідає 1 мкмоль тирозину.

Реактиви:

- Універсальний буфер (рН 4,8; 7,4; 9,0)
- Розчин казеїну 2%
- Розчин гемоглобіну 1%
- Трихлороцтова кислота (ТХО) 5%
- Розчин карбонату натрія (Na_2CO_3) 0,5 М
- Реактив Фоліна (1:1)
- Розчин сечовини 6%

Для приготування універсального буферного розчину 0,1 моль / дм^3 готували розчини концентрацією 0,1 моль / дм^3 : оцтової кислоти (розчин А), ортофосфорної кислоти (розчин В) і борної кислоти (розчин С) і змішували їх в рівних співвідношеннях. Отримували буферний розчин з рН 1,8. Додавали до цієї суміші різні об'єми розчину гідроксиду натрію концентрацією 1 моль / дм^3 отримували буферні розчини:

- а) рН 4,8 (для кислих протеаз);
- б) рН 7,4 (для нейтральний протеаз);
- в) рН 9,0 (для лужних протеаз).

Для визначення казеїнолітичної активності як субстрат

використовували казеїн. Для цього 2 г сухого казеїнату натрію розчиняли в 90 мл універсального буферу при рН 7,4 на водяній бані при 60-70 °С. Потім розчин охолоджували до кімнатної температури, переносили в мірну колбу місткістю 100 см³ і доводили обсяг до мітки буферним розчином.

Для визначення гемоглобінолітичної активності як субстрат використовували гемоглобін. Для цього до 0,6 мл калібрувального розчину гемоглобіну (концентрація 150 г/л) додавали 8,4 мл універсального буферу при рН 4,8 та 0,54 мл розчину сечовини 6%. Інкубували 1 год при кімнатній температурі.

Для дослідної проби до 0,125 мл субстрату додавали 0,25мл гомогенату та ставили в термостат для інкубування на 30 хв при температурі 30 ° С. Після інкубування додавали 0,5 мл 5% розчину ТХО, щоб зупинити ферментативну реакцію і осадити білок та високомолекулярні продукти гідролізу.

Для контрольної проби до 0,125 мл субстрату додавали 0,25мл гомогенату та 0,5 мл 5% розчину ТХО та ставили в термостат для інкубування на 30 хв при температурі 30 °С.

Вміст епандорфів центрифугували 15 хв при 15 тис. g.

Відбирали 0,5 мл надосадового розчину додавали 2,5 мл 0,5 М розчину карбонату натрію та 0,5 мл розведеного 1:1 реактиву Фоліна, після чого вміст пробірок струшували та ставили в темне місце для інкубування. Холості проби робили аналогічно, як і досліди, але замість надосадового розчину додавали 0,5 мл буферу з певним рН.

Колориметрування дослідних та контрольних проб проводили фотоелектричним колориметром при довжині хвилі 670 нм в кюветах з товщиною поглинаючого світло шару 10 мм проти холостих проб.

Розрахунок проводили за формулою:

$$ПА = \frac{D \times 0,1 \times V \text{ із тхо}}{0,25 \times V_{\text{поч}} \times 30 \times \text{мг білку}} \times 3 ,$$

Де:

ПА – протеолітична активність, мкмольТур / хв×мг білку;

D – величина оптичної щільності, $D = D_{\text{дос.}} - D_{\text{кон.}}$;

0,1 - об'єм епіндорфу, мл;

$V_{\text{із тхо}} - 0,5$ мл;

0,25 мл-

$V_{\text{поч.}}$ - об'єм гомогенату, 0,25мл;

3 – розведення;

30 – час інкубації при 30°C, хв;

0,1 - об'єм епіндорфу, мл

2.2.2 Кількісне визначення вмісту загального білка за методом Лоурі

Принцип методу: у лужному середовищі іони Cu^{+2} утворюють комплекс з пептидними зв'язками, що переходять в Cu^+ . Одновалентні іони міді, радикальні групи тирозину, триптофану, та цистеїну вступають в реакцію з реактивом Фоліна, утворюючи нестабільний продукт, що переходить в молібденову синь, з максимальним поглинанням при 750 нм. Метод дуже чутливий до наявності в розчині інших речовин, що затрудняє його використання при визначенні білка в неочищених препаратах.

Реактиви:

Реактив А: 2 % розчин Na_2CO_3 у 0,1 н NaOH.

Реактив В : 0,5 % розчин $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1 % розчині натрій цитрату.

Реактив С: 50 см³ реактиву А та 1 см³ реактиву В.

Реактив Е: розведений реактив Фоліна дистильованою H_2O у співвідношенні 1:1.

Хід роботи

1. Дослідна проба: до 0,1 мл гомогенату додати 0,9 мл H_2O та 2 мл реактиву С.

Контрольна проба: до 0,1 мл H_2O додати 2 мл реактиву С.

Вміст пробірок ретельно перемішали та інкубували 10хв при

кімнатній температурі.

2. Додали 0,2 мл реактиву Е та витримали 30 хв в темряві.

3. Колориметрування дослідних проб проводили фотоелектричним колориметром при довжині хвилі 750 нм в кюветах з товщиною поглинаючого світла шару 0,5 мм проти контролю.

Вміст білка розраховували в мг/мл на основі побудови калібрувального графіка за бичачим сироватковим альбуміном.

Статистичну обробку даних здійснювали з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel, зокрема пакету аналізу даних. Достовірність різниці визначали за t-критерієм Стьюдента згідно двовибіркового t-тесту. ($p \leq 0.05$)

Розділ III. Результати досліджень та їх обговорення

Перехід на екзогенне живлення має вирішальне значення на ранньому етапі росту риби. Потреби в харчуванні личинок риби відрізняються на різних стадіях розвитку, головним чином через морфологічні та фізіологічні зміни, що відбуваються під час раннього онтогенезу. На цьому етапі здатність личинок риби до перетравлення нутрієнтів вважається обмеженою, особливо це стосується гідролізу складних білків, які зазвичай використовуються в кормах для риби. Власні травні ферменти личинок риби мають недостатню активність, і тому у травленні беруть участь екзогенні ферменти, зокрема отримані із природного корму. Внесені ензими зоопланктону можуть складати 70–80% загальної активності у травному тракті риби. Саме це є основною причиною використання зоопланктону як стартового корму.

У дослідженні як живий корм використовували нижчих ракоподібних роду *Artemia*, які, з одного боку, є джерелом поживних речовин, а з іншого - ферментів, які забезпечують ефективне травлення.

Артемія є одним з найпоширеніших типів корму для личинок риби, проте, навіть застосування живого корму замість гранульованого часто не може забезпечити високий рівень виживаності на ранніх етапах вигодовування. Вирішення цієї проблеми криється в можливості додаткового долучення в раціон личинок імуномодулюючих та протекторних сполук, зокрема пробіотиків.

Лактобацили, окрім колонізуючої, антимікробної, імуномодулюючої дії також можуть бути додатковим джерелом гідролітичних ферментів для артемії та личинок риби. Попередніми роботами на кафедрі показано зростання протеолітичної активності артемії за умов її інкапсуляції лактобацилами. Відповідно, подібні ефекти можна очікувати і при введенні інкапсульованих ними артемій личинкам риби. Це може бути корисним для промислового вирощування риби, оскільки забезпечення оптимальної протеолітичної активності може покращити ефективність травлення та збільшити приріст риби.

Крім того, пробіотики можуть допомогти зменшити використання антибіотиків у вирощуванні риби, що є важливим екологічним аспектом.

Одним з факторів, який може впливати на протеолітичну активність личинок риби є значення рН. Відомо, що різні типи протеїназ мають свій оптимальний рівень рН активності. Наприклад, трипсин має оптимальний рівень рН близько 8,0, а пепсин - близько 2,0. Відповідно, дослідження загальної протеолітичної активності проводили у трьох діапазонах рН – кислому (рН 4,8), нейтральному (рН 7,4) та лужному (рН 9,0)

Результати проведених досліджень показали тенденцію підвищення загальної протеолітичної активності при застосуванні артемії, збагаченої *L. acidophilus*.

Так, в кислому діапазоні рН протеолітична активність тканин личинок стерляді починає зростати лише на другий тиждень вигодовування артемією (рис. 3.1)

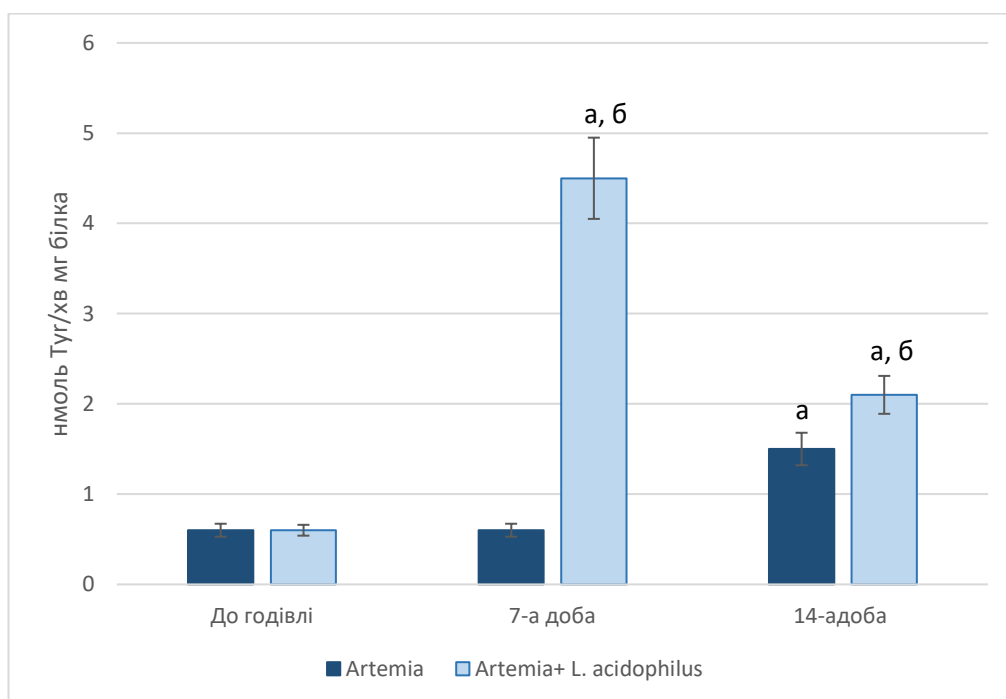


Рис 3.1. Рівень загальної протеолітичної активності при рН=4,8 гомогенату личинок стерляді прісноводної за умов вигодовування артемією, збагаченою *L. acidophilus*

Примітка: а - різниця достовірна порівняно зі значенням до початку

годівлі; б - різниця достовірна порівняно з групою тварин, що вигодовувались артемією без пробіотика ($p \leq 0,05$)

До початку годування активність кислих протеїназ дорівнювала $0,6 \pm 0,08$ нмоль Тур/хв \times мг білка, причому перші 7 днів годування артемією не призвели до суттєвих змін досліджуваного показника. Найімовірніше, це зумовлено недорозвинутістю шлунку у личинок на цьому етапі розвитку. Як підтверджують літературні дані, шлунок та гідролази, що забезпечують етапи травлення у ньому, формуються на 13-17 день розвитку личинок стерляді [34]. У свою чергу, після 14 днів годування протеолітична активність зросла у 2,5 рази.

При годуванні личинок риб наупліями *Artemia*, в яких інкапсулювали *Lactobacillus acidophilus* спостерігали різке зростання активності у 7,5 раз на 7 день, та у 1,4 рази на 14 день в порівнянні з контролем без пробіотику. Ймовірно, таке зростання зумовлено привнесенням екзогенних кислих протеїназ пробіотичним штамом лактобактерій.

Рівень загальної протеолітичної активності у нейтральному та лужному діапазонах рН відрізнявся вищими значеннями у порівнянні з кислим, що узгоджується з літературними даними щодо закономірностей розвитку шлунково-кишкового тракту у мальків стерляді. Так, до початку остаточного формування шлунку, провідну роль у гідролізі протеїнів беруть на себе нейтральні та лужні (трипсин, хімотрипсин) протеїнази, які функціонують у кишечнику.

Результати досліджень показали, що до початку вигодовування нейтральні протеїнази показали майже утричі вищу активність у порівнянні з кислими (рис. 3.2.), що сягала $1,75 \pm 0,245$ нмоль Тур/хв \times мг білка.

Двотижневе вигодовування нативною артемією супроводжувалось зростанням досліджуваного показника, причому різниця істотно проявилась лише на 14й день експерименту. Натомість, додавання пробіотичного препарату призвело до триразового збільшення рівня казеїнолітичної

активності вже через тиждень вигодовування.

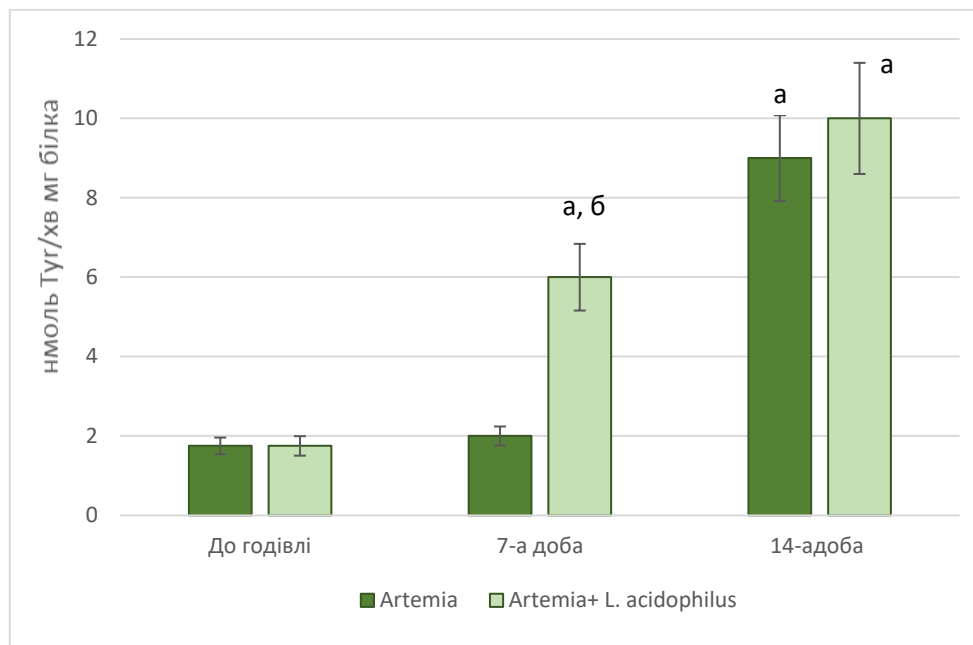


Рис 3.2. Рівень загальної протеолітичної активності при рН=7,4 гомогенату личинок стерляді прісноводної за умов вигодовування артемією, збагаченою *L. acidophilus*

Примітка: а - різниця достовірна порівняно зі значенням до початку годівлі; б - різниця достовірна порівняно з групою тварин, що вигодовувались артемією без пробіотика ($p \leq 0,05$)

На 14й день експерименту різниці між контрольними та дослідними групами вже не прослідковували.

Істотні відмінності в динаміці рівня протеолітичної активності у порівнянні з попередніми варіантами спостерігали для лужних протеїназ (рис. 3.3.). Насамперед, їх активність зростає вже через 7 діб після переходу на зовнішнє живлення – більше як утричі порівняно зі значенням до початку годівлі. Це пов'язане з тим, що саме протеїназам кишечника належить головна роль у перетравленні білків у період ендogenous живлення та на початкових етапах розвитку травного тракту.

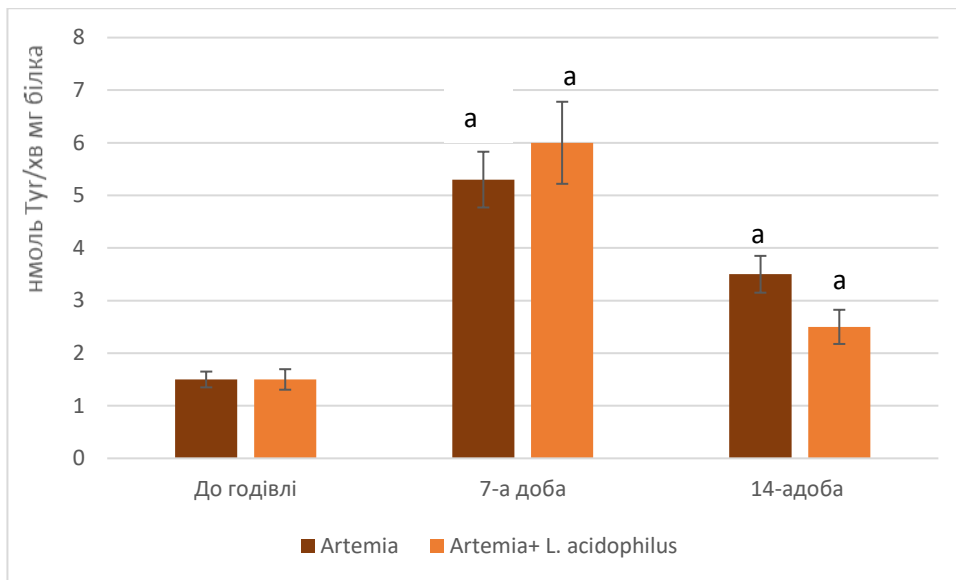


Рис 3.3. Рівень загальної протеолітичної активності при рН=9,0 гомогенату личинок стерляді прісноводної за умов вигодовування артемією, збагаченою *L. acidophilus*

Примітка: а - різниця достовірна порівняно зі значенням до початку годівлі; б - різниця достовірна порівняно з групою тварин, що вигодовувались артемією без пробіотика ($p \leq 0,05$)

В свою чергу, після 14 дня годівлі спостерігається тенденція до зменшення протеолітичної активності як у контрольній, так і в дослідній групах. Це можна пояснити тим, що на цьому етапі онтогенезу в личинок закінчує формуватись шлунок, в якому остаточно формується кисле рН, починає функціонувати пепсин. Роль трипсиноподібних протеїназ зменшується внаслідок активації роботи пепсину. Дійсно, в цей період ми спостерігали зростання протеолітичної активності в кислому діапазоні рН (рис. 3.1.). Слід відмітити, що інкапсуляція артемії пробіотиком не спричинила змін активності лужних протеїназ порівняно з контролем.

Отже, збагачення артемії пробіотичним штамом *L. acidophilus* ІМВ В-7279 призводить до зростання рівня протеолітичної активності гомогенату стерляді при кислих та нейтральних значеннях рН та не викликає змін активності лужних протеїназ.

Висновки

1. Протеолітична активність личинок стерляді протягом перших двох тижнів від переходу на екзогенне живлення наупліями артемії забезпечується функціонуванням переважно нейтральних та лужних протеїназ.
2. Збагачення артемії пробіотичним штамом *L. acidophilus* ІМВ В-7279 призводить до зростання активності кислих протеїназ гомогенату личинок стерляді у порівнянні з контролем протягом двотижневого періоду вигодовування, нейтральних - протягом 7 діб.
3. Збагачення артемії пробіотичним штамом *L. acidophilus* ІМВ В-7279 не викликає змін протеолітичної активності гомогенату личинок стерляді при рН 9,0.

Список використаної літератури

1. Alveal, K., Silva, A., Lohrmann, K. B., & Viana, M. T. (2019). Morphofunctional characterization of the digestive system in the palm ruff larva, *Seriolella violacea* under culture conditions. *Aquaculture*, 501, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.020>
2. Andoh, T. (2020). Dilution of digestive fish proteases with protein-free blocking reagents prevents loss of catalytic activity during microquantification. *Fisheries Science*, 86(3), 543–550. doi:10.1007/s12562-020-01422-4
3. Anyanwu, N.G. and Ariole, C.N. (2019) Probiotic potential of an indigenous marine *Bacillus thuringiensis* on shrimp (*Penaeus monodon*) culture infected with *Vibrio mimicus*. *J Applied Sci* 19, 173–179. 10.3923/jas.2019.173.179.
4. Chemello, G., Renna, M., Caimi, C., Guerreiro, I., Oliva-Teles, A., Enes, P., ... Gasco, L. (2020). Partially Defatted *Tenebrio molitor* Larva Meal in Diets for Grow-Out Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): Effects on Growth Performance, Diet Digestibility and Metabolic Responses. *Animals*, 10(2), 229. doi:10.3390/ani10020229
5. Cordova-de la Cruz SE, Riesco MF, Martínez-Bautista G, Calzada-Ruiz D, Martínez-Burguete T, Peña-Marín ES, Álvarez-Gonzalez CA, Fernández I. Larval Development in Tropical Gar (*Atractosteus tropicus*) Is Dependent on the Embryonic Thermal Regime: Ecological Implications under a Climate Change Context. *Fishes*. 2022; 7(1):16. <https://doi.org/10.3390/fishes7010016>
6. Coutinho, F., Castro, C., Guerreiro, I., Rangel, F., Couto, A., Serra, C. R., ... Enes, P. (2021). Mealworm larvae meal in diets for meagre juveniles: Growth, nutrient digestibility and digestive enzymes activity. *Aquaculture*, 535, 736362. doi:10.1016/j.aquaculture.2021.736362
7. Diken G, Demir O, Naz M. The Inhibitory Effects and Positive Contributions of Live Foods on Protease Activities of Meagre, *Argyrosomus regius* (Asso

- 1801), Larvae In Vitro Assay. *Fishes*. 2019; 4(1):5. <https://doi.org/10.3390/fishes4010005>
8. Diken, G., Demir, O., & Naz, M. (2016). The inhibitory effects of different diets on the protease activities of *Argyrosomus regius* (Pisces, Scianidae) larvae as a potential candidate species. *Journal of Applied Animal Research*, 46(1), 94–99. doi:10.1080/09712119.2016.1263200
 9. Gewaily, M. S., Abdo, S. E., Moustafa, E. M., AbdEl-kader, M. F., Abd El-Razek, I. M., El-Sharnouby, M., ... Dawood, M. A. O. (2021). Dietary Synbiotics Can Help Relieve the Impacts of Deltamethrin Toxicity of Nile Tilapia Reared at Low Temperatures. *Animals*, 11(6), 1790. doi:10.3390/ani11061790
 10. Gilannejad N, de las Heras V, Martos-Sitcha JA, Moyano FJ, Yúfera M, Martínez-Rodríguez G. Ontogeny of Expression and Activity of Digestive Enzymes and Establishment of gh/igf1 Axis in the Omnivorous Fish *Chelon labrosus*. *Animals*. 2020; 10(5):874. <https://doi.org/10.3390/ani10050874>
 11. Hernández-López, I. A., Ibarra-Castro, L., Álvarez-González, C. A., Martínez-Brown, J. M., Maytorena-Verdugo, C. I., & Peña-Marín, E. S. (2021). Characterization of digestive enzymes during early ontogeny of white Snook (*Centropomus viridis*). *Aquaculture*, 535, 736399. doi:10.1016/j.aquaculture.2021.7
 12. Khoa, T. N. D., Mai, N. T., Linh, N. K., Mi, L. T. Y., & Shaharom-Harrison, F. (2019). Ontogenic Development of Digestive Enzymes of Mud Crab (*Scylla paramamosain*) During Larval Stages. *Thalassas: An International Journal of Marine Sciences*. doi:10.1007/s41208-019-00143-5
 13. L.A. Jawad, F. Mutlak, A.R.M. Mohamed, J.M. Al-Mamry, E.K. Hameed and M. Ibrahim (2021). 7.5 Juveniles and larvae of eleven fish species collected from three countries of the Arabian Gulf and the Arabian Sea. DOI:10.31610/trudyzin/2021.325.4.457
 14. Magouz, F. I., Dawood, M. A. O., Salem, M. F. I., El-Ghandour, M., Van Doan, H., & Mohamed, A. A. I. (2020). The role of a digestive enhancer in

- improving the growth performance, digestive enzymes activity, and health condition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under suboptimal temperature. *Aquaculture*, 735388. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.73
15. Malzahn, A. M., Ribičić, D., Hansen, B. H., Sarno, A., Kjørsvik, E., Aase, A. S. N., et al. (2022). First feed matters: The first diet of larval fish programmes growth, survival, and metabolism of larval ballan wrasse (*Labrus bergylta*). *Aquaculture* 561 (738586), 738586. doi: 10.1016/j.aquaculture.2022.738586
 16. McKay, W.; Jeffs, A. Optimization of Artemia Feed Regimes for Larval Giant Kōkopu (*Galaxias argenteus*). *Fishes* 2023, 8, 183. <https://doi.org/10.3390/fishes8040183>
 17. Mello, P. H., Lundstedt, L. M., Moraes, G., Cavalheiro Araújo, B., Leite Venturieri, R. L., & Guimarães Moreira, R. (2021). Ontogeny of the digestive system and the profile of proteases in larvae of cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum* Siluriformes: Pimelodidae) and its hybrid (*Pseudoplatystoma corruscans* × *Pseudoplatystoma reticulatum*). *Journal of Fish Biology*, 99(3), 1135–1139. doi:10.1111/jfb.14771
 18. Neda Gilannejad , Verónica de las Heras ,Juan Antonio Martos-Sitcha Francisco J. Moyano, Manuel Yúfera and Gonzalo Martínez-Rodríguez.(2020)Ontogeny of Expression and Activity of Digestive Enzymes and Establishment of gh/igf1 Axis in the Omnivorous Fish *Chelon labrosus*. doi: 10.3390/ani10050874
 19. Nolasco-Soria, H., Nolasco-Alzaga, H., & Gisbert, E. (2020). The importance of pepsin-like acid protease quantification in aquaculture studies: a revision of available procedures and presentation of a new protocol for its assessment. *Reviews in Aquaculture*. doi:10.1111/raq.12417
 20. Nowosad, J., Kupren, K., Biegaj, M., & Kucharczyk, D. (2021). Allometric and ontogenetic larval development of common barbel during rearing under optimal conditions. *Animal*, 15(2), 100107. <https://doi.org/10.1016/j.animal>

21. Palińska-Żarska, K., Woźny, M., Kamaszewski, M., Szudrowicz, H., Brzuzan, P., & Żarski, D. (2020). Domestication process modifies digestion ability in larvae of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*), a freshwater Teleostei. *Scientific Reports*, 10(1). doi:10.1038/s41598-020-59145-6
22. Peña, R., Tovar-Ramírez, D., Contreras-Olguín, M., & Hinojosa-Baltazar, P. (2021). Variations in digestive enzyme activity during larval development of cultured Pacific red snapper *Lutjanus peru*. *Aquaculture Research*. doi:10.1111/are.15291
23. Pereira, W.A.; Mendonça, C.M.N.; Urquiza, A.V.; Marteinsson, V.P.; LeBlanc, J.G.; Cotter, P.D.; Villalobos, E.F.; Romero, J.; Oliveira, R.P.S. Use of Probiotic Bacteria and Bacteriocins as an Alternative to Antibiotics in Aquaculture. *Microorganisms* 2022, 10, 1705. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091705>
24. Pierre Pepin (2023) Feeding by larval fish: how taxonomy, body length, mouth size, and behaviour contribute to differences among individuals and species from a coastal ecosystem. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsac215>
25. Ribeiro, L.; Hubert, F.N.; Rodrigues, V.; Rojas-Garcia, C.; Dinis, M.T. Understanding Fish Larvae's Feeding Biology to Improve Aquaculture Feeding Protocols. *Oceans* 2022, 3, 94-113. <https://doi.org/10.3390/oceans3010009>
26. Ringø, E., Doan, H. V., Lee, S. H., Soltani, M., Hoseinifar, S. H., Harikrishnan, R., & Song, S. K. (2020). Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*. doi:10.1111/jam.14628
27. Ringø, E., Hoseinifar, S. H., Ghosh, K., Doan, H. V., Beck, B. R., & Song, S. K. (2018). Lactic Acid Bacteria in Finfish—An Update. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.01818
28. Rodjaroen, S., Thongprajukaew, K., Khongmuang, P., Malawa, S., Tuntikawinwong, K., & Saekhow, S. (2020). Ontogenic Development of Digestive Enzymes in Mealworm Larvae (*Tenebrio molitor*) and Their

- Suitable Harvesting Time for Use as Fish Feed. *Insects*, 11(6), 393. doi:10.3390/insects11060393
29. Rodrigues, S.M.; Sousa, L.; Silva, D.; Cunha, J.; Freitas, V.; Almeida, C.M.R.; Ramos, S. Bioavailability and Ingestion of Microplastics by Fish Larvae in the Douro Estuary . *Biol. Life Sci. Forum* 2022, 13, 54. <https://doi.org/10.3390/blsf2022013054>
30. Roel M., Maas, Yale Deng, Yueming Dersjant-Li, Jules Petit, Marc C., J.Verdegem, JohanW., Schrama, Fotini Kokou. Exogenous enzymes and probiotics alter digestion kinetics, volatile fatty acid content and microbial interactions in the gut of Nile tilapia.
31. Tejpal, C. S., Vijayagopal, P., Elavarasan, K., Prabu, D. L., Lekshmi, R. G. K., Anandan, R., ... Ravishankar, C. N. (2021). Evaluation of pepsin derived tilapia fish waste protein hydrolysate as a feed ingredient for silver pompano (*Trachinotus blochii*) fingerlings: Influence on growth, metabolism, immune and disease resistance. *Animal Feed Science and Technology*, 272, 114748. doi:10.1016/j.anifeedsci.2020.114748
32. Trochine, C., Risholt, C., Schou, M. O., Lauridsen, T. L., Jacobsen, L., Skov, C. Jeppesen, E. (2022). Diet and food selection by fish larvae in turbid and clear water shallow temperate lakes. *Science of The Total Environment*, 804, 150050. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.150050
33. Volkoff, H., & Rønnestad, I. (2020). Effects of temperature on feeding and digestive processes in fish. *Temperature*, 7(4), 307–320. doi:10.1080/23328940.2020.176595
34. Wang S, Han Z, Turchini GM, Wang X, Fang Z, Chen N, Xie R, Zhang H and Li S (2022) Effects of Dietary Phospholipids on Growth Performance, Digestive Enzymes Activity and Intestinal Health of Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*) Larvae. *Front. Immunol.* 12:827946. doi: 10.3389/fimmu.2021.827946
35. Xu B, Li D, Wei K, Zhu X, Xu J, Ma B. Allometric Growth Patterns and Ontogenetic Development during Early Larval Stages of *Schizothorax*

- waltoni Regan and Percocypris retrodorslis in Southwest China. *Water*. 2023; 15(4):824. <https://doi.org/10.3390/w15040824>
36. Xu, L., Guan, N. N., Huang, C.-X., Hua, Y., & Song, J. (2021). A neuronal circuit that generates the temporal motor sequence for the defensive response in zebrafish larvae. *Current Biology*, 31(15), 3343-3357.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.20>
37. Yanes-Roca, C., Toledo-Cuevas, M. E., Sánchez, L. J., Born-Torrijos, A., Rhody, N., & Main, K. L. (2017). Digestive Enzyme Activity during Larval Development of Black Snook, *Centropomus nigrescens*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 49(3), 612–624. doi:10.1111/jwas.12466
38. Zamani A, Khajavi M, Abedian Kenari A, Haghbin Nazarpak M, Solouk A, Esmaili M, Gisbert E. Physicochemical and Biochemical Properties of Trypsin-like Enzyme from Two Sturgeon Species. *Animals*. 2023; 13(5):853. <https://doi.org/10.3390/ani13050853>

Охорона праці та безпека у надзвичайних ситуаціях

Дозволяється працювати лише на заземлених об'єктах.

Приміщення хімічних лабораторій обладнуються вентиляцією, а місця можливого накопичення шкідливих хімічних речовин – відсмоктувачами.

Підлоги лабораторій повинні мати рівну, неслизьку, зручну для очищення поверхню, бути стійкими до дії механічних навантажень, вологи і агресивних середовищ.

Кожен працівник у лабораторії повинен мати закріплене за ним робоче місце.

Перед початком роботи слід одягти спецодяг (халат).

У спецодязі забороняється знаходитись за межами лабораторії.

При можливості скляний посуд і скляні частини заміняють пластиковими.

Нагріваючи рідину в пробірці або інших посудинах, їх тримають спеціальними утримувачами так, щоб отвір був спрямований від себе і працюючих поруч.

При перенесенні посудин із гарячою рідиною користуються рушником, посудину при цьому тримають обома руками: однією за дно, а другою за горловину.

При переливанні рідин (крім тих, що містять біологічний матеріал) користуються лійкою.

При розведенні речовин, що супроводжуються виділенням тепла, користуються термостійким хімічним посудом.

При роботі з кислотами та лугами виконують такі заходи безпеки:

- усю роботу з концентрованими кислотами та лугами проводять у витяжній шафі, користуючись при цьому окулярами, гумовими рукавичками та фартухом;

- концентровану кислоту відбирають із посудини тільки за допомогою спеціальної піпетки з грушею або сифоном;
- при приготуванні розчинів кислот спочатку в посудину наливають необхідну кількість води, а потім додають кислоту. Забороняється додавати воду в кислоту;
- при приготуванні розчинів лугів наважку лугу опускають у велику широкогорлу посудину, заливають необхідною кількістю води і старанно перемішують. Шматки лугу варто брати тільки щипцями;
- концентровані кислоти і луги виливають у раковину після попередньої їх нейтралізації.

При роботі з легкозаймистими речовинами (ефір, бензин, бензол, ацетон, спирт та ін.) дотримуються такої вимоги:

- усі роботи проводяться у витяжній шафі при ввімкненій вентиляції, вимкнутих газових пальниках і нагрівальних електроприладах.

Категорично забороняється:

- доручати проведення робіт із вогненебезпечними речовинами недосвідченому співробітнику;
- під час роботи в приміщенні запалювати сірники, палити, включати прилади, при роботі яких може виникнути іскра.

Після закінчення роботи із шкідливими речовинами необхідно:

- привести в порядок робоче місце;
- залишки шкідливих речовин здати на зберігання;
- старанно вимити руки з милом.

Забороняється використовувати речовини без етикеток та із закінченим терміном зберігання;

Після закінчення роботи необхідно вимити та висушити посуд, прибрати робоче місце, провітрити приміщення, відключити всі нагрівальні та освітлювальні прилади, закрити водопровідні та газові крани.

Категорично забороняється працювати в лабораторії одному.

Виходячи з лабораторії, обов'язково перевірити, чи вимкнені газ, вода,

електроенергія.

Надання першої допомоги

При виникненні пожежі в лабораторії необхідно негайно вимкнути газ та нагрівальні прилади, прибрати легкозаймисті рідини, вогонь засипати піском. Великий вогонь гасять за допомогою вогнегасника. Не можна задувати палаючу рідину або заливати її водою. Якщо на людині палає одяг, її треба швидко закутати в ковдру, халат або покласти на підлогу і, перекочуючи, збивати полум'я.

У всіх лабораторіях у доступному постійному місці має бути аптечка з набором необхідних матеріалів і медикаментів.

При теплових опіках роблять примочку з розчином 2 %-го KMnO_4 , а потім наносять мазь від опіків.

При хімічних опіках шкіри необхідно насамперед видалити речовину, що викликала опік, відповідним розчинником, а потім уражену ділянку обробити етиловим спиртом і змастити маззю від опіків.

При опіках кислотами ушкоджене місце обмивають водою з крану, а потім 3 %-вим розчином натрій гідрогенкарбонату (питної соди); при опіках їдкими лугами – водою, а потім 2 %-вим розчином оцтової або борної кислоти і знову водою.

При опіках очей кислотою необхідно промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у розчині питної соди, і знову змити водою; при опіках очей лугом – промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у 2 %-му розчині борної кислоти, і знову промити водою. Після цього необхідно звернутись до лікаря.

При порізах склом у першу чергу необхідно пінцетом, попередньо промитим спиртом, видалити з рани видимі шматочки скла, рану промити дистильованою водою або протерти тампоном, змоченим в етиловому спирті, а далі змастити 5 %-вим розчином йоду та забинтувати. Невеликі порізи можна

заклеїти антисептичним пластиром.

При ураженні електрострумом насамперед необхідно відключити електроенергію, а потім, якщо необхідно, зробити штучне дихання та викликати швидку допомогу.

При інгаляційних ураженнях потрібно негайно вийти на свіже повітря.