

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологий  
институт

Кафедра водных и наземных экосистем  
кафедра

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
\_\_\_\_\_ В.И. Колмаков  
подпись    инициалы, фамилия  
« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г.

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**

\_\_\_\_\_ 020400.62 Биология

код и наименование специальности

Активность пищеварительных ферментов рыб озера Чаны и кормовая  
ценность их основных объектов питания.

тема

Научный руководитель	_____	<u>доцент, к.б.н.</u>	<u>Чупров С.М.</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Научный руководитель	_____	<u>с.н.с., к.б.н.</u>	<u>Соловьев М.М.</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник	_____		<u>Калюжная Н.И.</u>
	подпись, дата		инициалы, фамилия

Красноярск 2016

## Содержание

Введение.....	3
Глава 1. Обзор литературы.....	7
1.1. Биохимический состав гидробионтов.....	7
1.2. Краткая характеристика пищеварительных ферментов рыб.....	7
1.3. Связь активности пищеварительных ферментов с типом питания рыб	11
1.4. Методы определения биохимического состава и калорийности.....	13
1.4.1. Определение белков.....	13
1.4.2. Определение липидов.....	14
1.4.3. Определение углеводов.....	15
1.4.4. Методы расчета калорийности.....	16
1.5. Роль гидробионтов питания рыб.....	17
1.6. Питание рыб озера Чаны.....	19
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	21
2.1. Определение концентрации белков по методу Лоури.....	23
2.2. Определение концентрации липидов по методу Фолча.....	24
2.3. Определение концентрации углеводов по методу Дюбуа.....	24
2.4. Определение содержания воды и расчет калорийности.....	25
2.5. Определение активности пищеварительных ферментов.....	25
2.5.1. Щелочные протеазы.....	26
2.5.2. Амилаза.....	26
2.5.3. Неспецифические липазы.....	26
2.5.4. Концентрация белка по Бредфорд.....	27
2.6. Статистическая обработка данных.....	28
Глава 3 . Результаты.....	29
3.1. Спектр питания.....	29
3.2. Биохимический состав и калорийность гидробионтов.....	29
3.3. Активность пищеварительных ферментов.....	29
Выводы:.....	30
Список использованных источников.....	31

## Введение

Кормовая база водоема является одним из основополагающих факторов оказывающих значительное влияние на темпы роста и развития рыб. В зависимости от действия ряда факторов (температурный режим, химический состав воды, глубина, трофность и пр.) структура кормовой базы может меняться. Одним из критериев при оценке биологической продуктивности того или иного водоема и создании искусственных кормов должно складываться из изучения пищевой ценности кормовых объектов (Маликова, 1956). При оценке качества кормовой базы основной упор делается на анализ видового состава, численности и биомассы, составляющих ее гидробионтов. Однако определение только этих параметров бывает недостаточно для правильной оценки пригодности водоема для проведения рыбоводных мероприятий. В этом случае немаловажным показателем является биохимический состав и калорийность гидробионтов. Хорошо известно, что пищевая и энергетическая ценность кормового объекта определяется преимущественно соотношением и спектром белков, липидов и углеводов. Биохимический состав кормовых объектов рыб изучался многими авторами и отражен в ряде публикаций (Маликова, 1956; Гаджиева, 1974; Кузьмина и др., 1979, 1980, 2008; Кузьмина, Перевозчикова, 1989; Tadesse, 1999). Кроме того, есть сведения о биохимическом составе (Винберг; Ventura, 2006) и калорийности (Гаджиева, 1974) отдельных групп гидробионтов, потенциально входящих в спектр питания различных видов рыб. Например, известно, что многие личинки представителей сем. *Chironomidae* могут содержать значительную концентрацию сахаров, в то время как мышцы рыб - богаты белками. Несмотря на имеющиеся данные в литературе, провести их сравнительный анализ зачастую бывает очень сложно из-за различий в методах определения концентраций, способах пробоподготовки и хранения, используемых разными авторами. Также, различия в исследуемых параметрах могут объясняться высокой вариабельностью исследуемых

показателей, как между разными группами гидробионтов, так и внутри одной группы, но взятой из разных мест обитания.

Другим немаловажным фактором, напрямую влияющим на темп роста рыб, это эффективность процессов пищеварения и всасывания в желудочно-кишечном тракте, что в первую очередь определяется активностью и спектром пищеварительных ферментов. В настоящее время общепринятым фактом считается прямая связь уровня активности пищеварительных ферментов и биохимическим составом объектов питания (Кузьмина 2008, 2015). Так хорошо известно, что хищные рыбы, в питании которых много белка, имеют более высокую активность щелочных протеаз в кишечнике по сравнению с растительноядными и всеядными. В то время как для фермента гидролизующего сахара отмечена обратная зависимость: более высокий уровень активности в кишечнике всеядных и растительноядных и меньший у хищных.

На территории Западной Сибири находится значительное количество водоемов потенциально пригодных для организации рыбоводных мероприятий. Озеро Чаны является крупнейшим водоемом на территории Западной Сибири и имеющим огромное рыбопромысловое значение для региона. Комплексный анализ биохимического состава кормовых объектов рыб для данного региона приводится впервые.

Цель работы –оценить связь активности некоторых пищеварительных ферментов массовых видов рыб озера Чаны и изучить биохимический состав их основных объектов питания.

Для достижения заданной цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить концентрацию белков, липидов и углеводов кормовых объектов рыб озера Чаны
2. Определить калорийность основных объектов питания, исследуемых видов рыб;

3. Определить активность щелочных протеаз, трипсина, химотрипсина, альфа-амилазы и неспецифической липазы в кишечнике исследуемых видов рыб;

4. Проанализировать научную литературу по данной тематике.

## **Благодарности**

Выражаю искреннюю благодарность с.н.с. Поповой Ольге Николаевна за помощь в определении личинок стрекоз, с.н.с. Зинченко Вадиму Константиновичу за помощь в определении имаго и личинок водных жуков, н.с. Белевич Ольге Эдуардовне за помощь в определении водных клопов, н.с. Кашинской Елене Николаевне за помощь в определении спектров питания рыб.

## **Глава 1. Обзор литературы**

### **1.1. Биохимический состав гидробионтов**

Информация о концентрации белков, липидов и углеводов в некоторых пресноводных и морских гидробионтов отражена в ряде работ (Гаджиева, 1974; Кузьмина и др., 1979, 1980, 2008; Tadesse, 1999). Поскольку в рационе хищных видов рыб преобладают белковые компоненты, а в рационе мирных видов – углеводы, принято считать, что для хищных рыб характерна более высокая активность протеолитических ферментов и более низкая активность карбогидраз по сравнению с растительноядными и всеядными видами (Кузьмина, 2005). Более того, переваривание углеводов идет одинаковыми путями у растительноядных, хищных и всеядных рыб, что определяется наличием одинаковых группы пищеварительных ферментов (Кузьмина, 2015). Известно, что сухое вещество кормовых объектов бентофагов содержит 39.3–73.1% белка, планктофагов – 35.5–45%, а ихтиофагов – 55.6–78.5% белка. Личинки комаров сем. Chironomidae могут содержать до 53.9% белка, моллюски класса Gastropoda – от 39.3% до 73.1% белка. Доля сухого вещества в мышцах рыб разных видов колеблется от 21.2 до 23.1, белка – от 16.2 до 19.6, липидов – от 1.2 до 3.1, углеводов – от 0.4 до 2.5 г/100 г сырой массы (Кузьмина, 2008 а). Содержание белка в пище растительноядных рыб меньше, поскольку, например, макрофиты состоят на 14.8–20.4% из белка по сухому веществу, а нитчатая водоросль *Maugeotia* только на 11.1% (Кузьмина, 2008 а).

### **1.2. Краткая характеристика пищеварительных ферментов рыб**

Установлено, что способность организма гидролизовать пищевую субстрат зависит от наличия соответствующих ферментов в пищеварительном тракте (Уголев, 1985; Уголев, Кузьмина, 1993). Процесс гидролиза пищевых компонентов, входящих в рацион рыб, осуществляется совокупностью пищеварительных ферментов, относящихся к классу гидролаз, и совершается в несколько этапов. К настоящему времени

выделяют 6 звеньев пищеварения: полостное, мембранное (пристеночное), внутриклеточное, симбионтное, индуцированный аутолиз и всасывание (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005). На начальном этапе – этапе полостного пищеварения происходит расщепление макромолекул белков, жиров и углеводов на более короткие фрагменты (олигомеры) в полостях желудка и кишечника за счет пищеварительных гидролаз, продуцируемых клетками и действующими за их пределами. Этот процесс в основном осуществляется ферментами желудка и поджелудочной железы, а также лизосомальными ферментами самих жертв (аутолиз) (Уголев, Кузьмина, 1993). Затем, дальнейший процесс гидролиза олигопептидов, глицеридов, олигосахаров и др осуществляется с помощью мембранно-связанных ферментов на щеточной кайме энтероцитов и структурах гликокаликса - пристеночное пищеварение. На мембране щеточной каймы энтероцитов, как заключительный этап, также происходит всасывание продуктов гидролиза. Возможна также еще одна стадия пищеварения - внутриклеточное, осуществляемое внутриклеточными гидролазами, локализованными в лизосомах и цитоплазме энтероцитов, путем фаго- и пиноцитоза (Уголев, 1985). Симбионтные микроорганизмы населяющие пищеварительный тракт также способны продуцировать ряд пищеварительных ферментов, в том числе и ферменты неспособные синтезироваться в организме хозяина, и таким образом осуществлять симбионтное пищеварение (Уголев, 1985; Кузьмина, 2005; *The Physiology of Fishes*, 2005).

Пищеварительная система рыб разных таксономических групп способна синтезировать широкий спектр гидролаз, функционирующих на разных этапах гидролиза пищевых субстратов.

Одной из основных групп пищеварительных гидролаз – протеазы (К.Ф. 3.4.) ферменты гидролизующие пептидные связи в белковых молекулах. Большая часть кишечных протеаз относится к группе сериновых протеиназ (Natalia et al., 2004; Castillo-Yaneza et al., 2004). Основные протеазы кишечника – трипсин, химотрипсин, эластаза, коллагеназа и



карбоксипептидазы А и В, которые отличаются между собой по способности гидролизовать связи между определенными аминокислотами в белках (Уголев, 1985; Уголев, Кузьмина, 1993; Kishimura et al., 2006). Для многих видов рыб щелочные протеазы кишечника сохраняют активность в широком диапазоне значений рН8–10 (Alarcon et al., 1998; Natalia et al., 2004; Castillo-Yaneza et al., 2004 Siringana et al., 2006). Температурный оптимум функционирования щелочных протеаз в основном находится в диапазоне 50 – 60°С (Кузьмина и др., 2008 б; Кузьмина, Стрельникова, 2008 в; Garcga-Carreno et al., 2002). Трипсин (К.Ф. 3.4.21.4) – одна из основных протеаз кишечника, способная активировать другие кишечные протеазы из неактивных форм - проферментов. В свою очередь, сам трипсин активируется энтерокиназой из предшественника профермента - протрипсина. Трипсин обладает специфичностью к гидролизу пептидных связей между основными аминокислотами аргинином и лизином (Диксон, Уэбб, 1982). Другой, не менее важной протеазой, является химотрипсин (К.Ф. 3.4.21.1), который как и трипсин, активируется энтерокиназой или трипсином из прохимотрипсина. Химотрипсин гидролизует пептидные связи между ароматическими аминокислотами фенилаланином и тирозином (Уголев, 1985). Эластаза (К.Ф. 3.4.21.11) гидролизует пептидные связи ароматических аминокислот. Молекулярный вес щелочных протеаз обычно варьирует в диапазоне 20-30кДа (Уголев, 1985) На структурах щеточной каймы энтероцитов олигопептиды гидролизуются различными пептидазами, наиболее изученным ферментом из которых является N-аминопептидаза. Внутриклеточное пищеварение осуществляется преимущественно лейцин-аланин пептидазой дающей до 90% активности (Zambonino-Infante, Cahu 2001; Gisbertetal., 2009).

Гликозидазы составляют еще одну группу ключевых ферментов пищеварительного тракта многих видов рыб (Уголев, Кузьмина, 1993; Голованова, 2000). Все исследованные виды рыб обладают способностью к гидролизу и абсорбции простых и более сложных углеводов однако разные

виды рыб могут значительно отличаться по этой способности (Krogdahl et al., 2005). Основной гликозидазой кишечника рыб является альфа-амилаза в результате воздействия которой сахара гидролизуются на олигосахара, а те в свою очередь расщепляются мембранно-связанными экзогидролазами в кишечнике и пилорических придатках: мальтазой (К.Ф. 3.2.1.20), изомальтазой (К.Ф. 3.2.1.10), сахаразой (К.Ф. 3.2.1.48) и  $\gamma$ -амилазой (К.Ф. 3.2.1.3) (Диксон, Уэбб, 1982). Пищеварение продолжается внутриклеточно в энтероцитах, которые обладают различными ферментами с дисахаридазной активностью (Уголев, 1985). Значения оптимума функционирования рН  $\alpha$ -амилазы разных видов рыб варьируют в основном в пределах 6.0 – 9.0 (Clark et al., 1984; Fernandez et al., 2001). Значения температурного оптимума работы  $\alpha$ -амилазы также может носить видоспецифичный характер и меняться в пределах от 25 до 55°C (Munilla-Moran, Stark, 1989).

Гидролиз липидов в кишечнике рыб осуществляют липазы и эстеразы (К.Ф. 3.1.1). Группы липидов, имеющих основное значение для пищеварения рыб и поступающие с пищей, относятся к глицеридам (образованные глицерином) и сфингозидам (образованные сфингозином), а также к различным фосфолипидам. Начальный этап гидролиза липидов происходит под воздействием панкреатической триацилглицерол-липазы (К.Ф. 3.1.1.3), которая гидролизует триглицериды с образованием в конечном итоге глицерина и жирных кислот (Кузьмина, 2005). Панкреатическая липаза расщепляет преимущественно длинноцепочечные триглицериды, находящиеся в крайнем положении 1 и 3 (Сорвачев, 1982). Значения оптимума рН липазы для атлантической трески *Gadus morhua* и королевской дорады *Sparus aurata* находятся в районе 8 (Lazo et al., 2007). Завершает процесс гидролиза на структурах щеточной каймы энтероцитов щелочная фосфатаза (Gisbert et al., 2009).

### **1.3. Связь активности пищеварительных ферментов с типом питания рыб**

Многие исследователи по типу питания рыб разделяют на хищных, растительноядных, детритоядных и всеядных (Chakrabarti*et al.*, 1995; The Physiology of Fishes, 2005). В свою очередь, по разнообразию потребляемой пищи рыб можно разделить на стенофагов, питающихся ограниченным набором кормовых объектов, и эврифагов, способных питаться широким спектром кормовых организмов (Сорвачев, 1982). По совокупности организмов, к которым относится жертвы, рыб разделяют на планктофагов (зоопланктофаги и фитопланктофаги), бентофагов, перифитонофагов и т.д. (Pavlov, 2002: цит. по: Кузьмина, 2005). Подобное разделение рыб достаточно условно, поскольку один и тот же вид в разных водоемах, на разных стадиях своего развития, в разные сезоны года может менять свои пищевые предпочтения (Никольский, 1974). Хорошо известно, что большинство рыб могут адаптировать свой режим питания к доступной кормовой базе (Chakrabarti*et al.*, 1995; Debnath*et al.*, 2007; Páez-Jiménez*et al.*, 2009).

Современные представления о связи активности и спектра пищеварительных ферментов рыб с их типом питания предполагают, что существует строгая корреляция между спектром и активностью пищеварительных ферментов и химическим составом потребляемой пищи. Эта зависимость выражается в преобладании у растительноядных и всеядных видов более высокого уровня активности карбогидраз (например,  $\alpha$ -амилазы) по сравнению с хищными, хотя и у тех и у других гидролиз углеводов идет одинаковыми путями. Хищные рыбы в свою очередь имеют более высокую активность протеаз (например, трипсин) по сравнению с растительноядными. Подобная зависимость активности пищеварительных ферментов в желудочно-кишечном тракте рыб связана с гидролизом пищевых субстратов богатых углеводами или белками соответственно (Harpaz, Uni, 1999; Кузьмина, 2005; Krogdahl*et al.*, 2005).

На примере таких гликозидаз как  $\alpha$ -амилаза (Hendriksetal., 1990), и некоторые дисахаридазы (Harraz, Uni, 1999; Krogdahletal., 2005) показана корреляция их активности с содержанием сахаров в пище. Увеличение содержания крахмала в пище для морского волка *Dicentrarchuslabrax*, карпа *Cyprinuscarpio*, обыкновенной тиляпии *Oreochromismossambicus*, пятнистого клариса *Clariasbatrachus*, ленточного брикона *Bryconmelanopterus* и черного паку *Piaractusmesopotamicus* привело к увеличению активности амилазы (Debnathetal., 2007; Corrikaetal., 2007). Другая гликозидаза, которая правда, как правило, не синтезируется организмом рыбы, а продуцируется симбионтной микрофлорой - хитиназа также показывала высокую активность при интенсивном питании рыб ракообразными (Harraz, Uni, 1999; Krogdahletal., 2005). В некоторых случаях также отмечена положительная взаимосвязь между активностью липазы и содержанием липидов в потребляемой рыбами пищи (Esheletal., 1993). Предполагается, что активность липазы более важна для хищных рыб, так как они питаются пищей богатой жирами (Debnathetal., 2007).

В подтверждение этой теории существует множество экспериментальных данных показывающих влияние изменения концентрации специфических субстратов на активность пищеварительных гидролаз на примере разных видов рыб (Chakrabartietal., 2006). Так для ферментов группы эстераз отмечен эффект изменения активности при изменении содержания субстрата. Для липолитических ферментов поджелудочной железы (липаза и фосфолипаза A2) показана стимуляция активности при увеличении концентрации триглицеридов и фосфолипидов в корме показана на примере морского волка *Dicentrarchuslabrax* и красного горбыля *Sciaenopsocellatus* (ZamboninoInfante, Cahu, 2001). На возможность индуцирования активности пищеварительных гидролаз, видимо, может влиять также структура субстрата. Так, в отличие от трипсина, активность химотрипсина увеличивается при использовании кормов, содержащих

короткие пептиды или гидролизованный протеин, но не изменяется при использовании нативного белка (ZamboninoInfante, Cahu, 2001).

#### **1.4. Методы определения биохимического состава и калорийности.**

При исследовании биохимического состава гидробионтов, как правило, исследователям не удастся оценить массу органических компонентов как простою сумму масс белков, липидов и углеводов (Conover 1978).

##### **1.4.1. Определение белков**

Для количественного определения белка используют колориметрические и спектрофотометрические методы, также существуют способы определения белка по азоту. Часто гидробиологи в своих работах используется метод Къельдаля (Вербицкий, 1990; Маликова, 1956). Принцип метода заключается в определении количества азота, при умножении которого на коэффициент 6.25(который соответствует процентному содержанию азота в белках) получают количество белка. Но использование этого метода дает условные значения, так как определяется не только белковый азот, но и тот, который содержится в других органических веществах (Винберг, 1968).

В последнее время часто используются колориметрические методы, т. к наиболее точны и дают возможность работать с небольшими навесками. Основаны они на специфических цветных реакциях белков, образующаяся при этом окраска соответствует концентрации белка.

Самым простым является биуретовый метод, основанный на реакции белков с  $\text{CuSO}_4$  в щелочной среде. Быстрый, доступный и может быть использован для сравнительных анализов, но сейчас почти не применяется из-за низкой чувствительности (Jagadeesanetal., 2010; Madhupratapetal., 1979; Morris, 1984)

Для определения низких концентраций белка одним из наиболее распространенных и точных является метод Лоури (Lowry,1951). Принцип

этого метода основывается на совместном применении биуретового метода и реактива Фолина. Ошибка метода составляет 3-5%(Винберг, 1968) Но как и любой другой метод также имеет свои недостатки, интенсивность окрашивания у разных белков различна и может не соответствовать общей концентрации белка в растворе.

Также как метод Лоури широкое применение в научных исследованиях имеет метод Бредфорд (Bradford, 1976). Основывается на определении белка с помощью красителя Кумасси. Преимуществом этого метода является возможность измерять концентрацию белков с высокой молекулярной массой. Он не дает окраску со свободными аминокислотами и низкомолекулярными олигопептидами.

Также некоторые авторы используют расчетный метод в результате вычитания из 100% концентрацию углеводов, липидов и золы (Кузьмина и др., 1979, 1980)

#### **1.4.2. Определение липидов**

Многие методы определения содержания жира в биологических объектах основываются на способности липидов растворяться в органических растворителях.

Некоторые авторы (Гаджиева, 1974; Вербицкий, 1990; Маликова, 1956) в своих исследованиях для экстракции липидов используют метод Сокслета, основанный на экстракции жиров растворителем в аппарате Сокслета, далее производится отгонка растворителя и взвешивание жира. В качестве растворителя чаще всего используют этиловый эфир. При использовании метода Сокслета извлекаются не только липиды, но и значительное количество таких веществ как фосфатиды, стеринны, свободные жирные кислоты, которые мешают анализу.

Также часто используют метод Фолча(Folch et al., 1957), согласно которому экстракцию проводят хлороформ-метанольной смесью (2:1) до получения разведения ткани 1:20. Этот метод позволяет выделить как

полярные так и неполярные липиды в том числе и входящие в состав мембран, и получить достаточно высокий выход липидов. Однако для удаления нелипидных составляющих, исследуемые образцы промывают водой или слабыми солевыми растворами, что приводит к частичной потере липидов (Кузьмина и др., 1979; Jagadeesanetal., 2010; Madhupratapetal., 1979; Morris, 1984). Сравнение фракционного состава липидов, выделенных из сырых тканей методами Сокслета и Фолча, показало, что в первом случае выделяется незначительное количество холестерина, триглицеридов и особенно фосфолипидов. Также использование высушенного материала может приводить к потере некоторой части липидов (Кузьмина и др., 1979, 1980).

Согласно методу Мукерджи (Mukerjee, 1956), (цит. по Г.Г. Винберг, 1968) липиды омываются щелочным раствором этилового спирта и затем обрабатываются пинацианоловым реактивом. Образовавшийся при этом окрашенный комплекс экстрагируется бромбензолом. Недостатком этого метода является светочувствительность окрашенного комплекса.

Также используются разные способы экстракции липидов методом настаивания. Такие методы рекомендуют при работе с макронавесками. Навеска исследуемого вещества заливается растворителем (серный эфир, хлороформ, петролейный эфир и др) и оставляется на длительное время. Растворитель за это время испаряется, и оставшиеся липиды определяются по разнице веса тарированной посуды. Но эти методы, как и метод Мукерджи, практически не встречаются в гидробиологических исследованиях.

### **1.4.3. Определение углеводов**

Наиболее точными методами определения содержания углеводов, используется методы с применением концентрированной серной кислоты такие как фенол-серно-кислый и антроновый. Антроновый метод основан на гидролизе углеводов в концентрированной серной кислоте, с образованием

производных фурфурола, которые при взаимодействии с антроном дают окрашенный продукт. Метод достаточно чувствителен и позволяет регистрировать до 10 мкг/мл сахаров в пробе. Фенол-серноокислый метод Дюбуа (Dubois et al. 1956) также сводится к кислотному гидролизу сахаров концентрированной серной кислотой с последующим добавлением фенола измерением оптической плотности получившегося раствора. Поскольку данный метод определения сахаров достаточно простой, относительно дешевый то этим методом пользуются многие исследователи. Преимуществом этого метода также является его высокая чувствительность, позволяющая определять сахара в концентрации 1-10 мкг/мл (Jagadeesan et al., 2010; Madhupratap et al., 1979; Morris, 1984). Также некоторые авторы в своих работах устанавливают содержание углеводов как разность между 100% и процентным содержанием белков, липидов и золы (Гаджиева, 1974; Вербицкий, 1990; Маликова, 1956).

#### **1.4.4. Методы расчета калорийности**

Объем энергии запасенный в биомассе гидробионтов или их пище, называют калорийностью. Калорийность можно определить с помощью калориметра или рассчитать по химическому составу, также применяется метод мокрого сжигания.

Что бы определить калорийность калориметрическим методом используют калориметрическую бомбу, в которой сжигается проба в избытке кислорода. По разнице температуры определяют количество тепла, которое выделяется при полном окислении органического вещества. Метод довольно точный, но недостатком является термическое разложение солей, что может сказаться на результатах. Также этот метод применяется при работе с навесками от 0.5-1.5г сухого веса, что ограничивает его применение (Винберг, 1968).

Для того что бы определить калорийность методом мокрого сжигания, пробу обрабатывают сильным окислителем и по количеству кислорода



затраченного на окисление органического вещества определяют калорийность. Количество кислорода рассчитывается как разность между начальным количеством окислителя и оставшимся после окисления. Самым популярным из этих методов, является бихроматное окисление в концентрированной серно-хромовой смеси (Халько, 1987; Романова, 1996; Романова, Бондаренко, 1984; Голубков, Власова, 1982).

Расчет калорийности по химическому составу является самым распространенным (Вербицкий, 1990). Энергетическая ценность организма определяется по процентному содержанию белков жиров и углеводов. Как уже было сказано, органические вещества имеют определенную теплоту сгорания. Так при сжигании белков в среднем выделяется 5,65 ккал/г, углеводов 4,10 ккал/г, жиров 9,45 ккал/г. Если соотношение этих веществ представлено в процентах, калорийность рассчитываю по формуле:

$$\frac{5,65B + 4,10У + 9,45Ж}{100} = \text{ккал/г}$$

Где, Б, У, Ж – процентное содержание соответственно белков, углеводов и жиров (Винберг, 1968).

### **1.5. Роль гидробионтов питания рыб**

Кормовые ресурсы водоема представлены всеми животными и растительными организмами, включая тех, которые потребляются после распада в виде детрита. Кормовая база рыб – количество организмов и продуктов их распада (детрита), которое может быть использовано в качестве пищи в условиях, существующих в водоеме абиотических и биотических взаимоотношений (Кузьмина, 2008). Кормовая база рыб может меняться за счет смены доминирующих групп организмов в течение года и в свою очередь приводить к изменению в спектре питания рыб.

Известно, что кормовые объекты рыб могут обладать различной пищевой ценностью и должны “отвечать” некоторым критериям, как например, быть легкодоступными, находиться в нужной концентрации,

отвечать определенным вкусовым качествам, легко перевариваться, а также содержать необходимые для организма вещества. Таким образом, в процессе адаптации к условиям обитания, у разных видов рыб сформировался определенный характер питания, они питаются теми кормовыми организмами, которые удовлетворяют их пищевые потребности. Полноценность естественного рациона обеспечивается комплексом питательных веществ, поступающих в организм рыбы от различных групп беспозвоночных животных (Маликова, 1956).

На ранних стадиях развития многие рыбы питаются зоопланктонными ракообразными, преимущественно ветвистоусыми (Cladocera) и веслоногими ракообразными (Copepoda). Зоопланктонные ракообразные могут обладать высокой концентрацией белков и липидов в достаточном количестве для рыбы (Ventura, 2006). Также на разных этапах своего развития рыбы питаются водной растительностью пищевая ценность которой, как правило ниже чем у беспозвоночных, поскольку содержание белков и липидов обычно заметно ниже (Кузьмина, 2005).

Наравне с зоопланктоном, зообентос также является одним из основных компонентов кормовой базы для рыб в водоеме. Основу питания многих видов рыб составляют личинки и куколки амфибионтных насекомых (особенно хирономид), олигохеты, моллюски и пр. Так, например, в спектр питания леща входит до 70 видов гидробионтов, такие как олигохеты, личинки хирономид, моллюски, гаммариды, мизиды, веслоногие и ветвистоусые ракообразные, личинки ручейников, водоросли, макрофиты, а так же детрит. У плотвы в пищевом рационе зарегистрировано более 40 видов беспозвоночных: веслоногие и ветвистоусые ракообразные, личинки ручейников и хирономид, моллюски, макрофиты, водоросли, высшая водная растительность и молодь рыб (Кузьмина, 2005).

В спектре питания рыб наряду с планктонными организмами, олигохетами, хирономидами, обнаруживается значительное количество детрита. Детрит - это взвешенные частицы органического вещества

совместно с обитающими на них микроорганизмами (грибами, бактериями, простейшими) (Винберг, 1968). Таким образом, детрит, несмотря на свою низкую пищевую ценность, является концентратом биологически активных веществ, микроэлементов, бактерий и играет большую роль в питании многих видов рыб.

### **1.6. Питание рыб озера Чаны**

Показано, что по характеру питания плотва и серебряный карась в оз. Чаны - эврифаги и могут питаться как животной, так и растительной пищей соотношение которой может меняться в зависимости от возраста. Так, на 4-м году жизни плотва наиболее всеядна, а процентное соотношение в пище различных групп животных и фитопланктона практически выравнивается. К возрасту 5+ начинают преобладать данные организмы, а в возрасте 5+–8+ лет в основном растительные компоненты (Воскобойников и др., 1986). К сожалению, опубликованных данных по питанию половозрелых особей ельца в оз. Чаны нет. Однако известно, что в других водоемах елец питается в основном беспозвоночными – личинки комаров, ручейников, поденок и др., а также нитчатые водоросли и попадающие на поверхность воды насекомые (Атлас пресноводных рыб России, 2002). Окунь по типу питания также относится к эврифагам, поскольку взрослые особи питаются широким спектром зообентосных организмов и рыбой (Воскобойников и др., 1986). Пищу взрослого судака составляют мелкие массовые виды рыб (Воскобойников и др., 1986). Также хорошо известно, что в питание многих видов рыб входит детрит (Bowen, 1976). В оз. Чаны это характерно в большей степени для серебряного карася и сазана и в меньшей степени для ельца и плотвы. У окуня и судака присутствие детрита в пищевом комке не обнаружено.

Рыбы, питающиеся детритом, помимо самого детрита поглощают и значительное количество различных бактерий. Бовен (Bowen, 1984) подтвердил это заключение и выделил две формы органического детрита: частички, представленные остатками предыдущей клеточной структуры и

маленькие бесструктурные частички. Водный детрит состоит из кусочков растений и аморфной органической материи, представленной гетеротрофными и автотрофными организмами (Mann, 1972 цит по Bitterlich, 1985 а). Согласно Бовену, аморфный детрит содержит меньше грубой органики и лучше подходит для переваривания. В природных условиях до 40% белкового детрита может состоять из бактерий. Например, для популяции карповых в Темзе присутствие детрита в рационе имеет большое значение (Mann, 1972; цит по Bitterlich, 1985 а). Хотя многие виды потребляют большое количество детрита, его пищевое значение для безжелудочных рыб остается неоднозначным. Обнаружено, что пищевая ценность детрита зависит от его качества (Opuszynski, 1979).

## Глава 2. Материалы и методы исследования

Сбор материала проводили в летний период 2012, 2014 и 2015 гг. в эстуарной зоне реки Каргат – озеро Малые Чаны (54°50'N 77°40'E, Западная Сибирь). Объектом исследования служили компоненты питания и половозрелые особи массовых видов рыб из озера Чаны.



Рисунок 1 – Озеро Чаны (фото <http://yablor.ru>)

Отлов рыб в озере осуществляли при помощи рыболовных сетей с размером ячеи от 25 до 40 мм, которые ставились с лодки на глубину 1.5–2 метра. Из сетей рыб извлекали в утреннее и вечернее время 2–3 раза в сутки, в зависимости от улова. Обработка ихтиологического материала проводили по стандартным методикам (Правдин, 1979).

Для биохимического анализа сбор зообентоса осуществлялись помощью кругового скребка Дулькейта (площадь захвата  $1/9 \text{ м}^2$ ), а зоопланктона при помощи малой сети Апштейна. Пробы грунта собирали с помощью дночерпателя и для анализа использовали верхние 1-2 см слоя. Также гидробионтов (личинки амфибионтных насекомых, моллюски, олигохеты, зоопланктонные ракообразные и пр.) и растения собирали с помощью сачков различного размера, а также вручную. Мышцы у рыб вырезали ножницами в районе спинного плавника. Всего на биохимический

анализ было отловлено четыре вида рыб (серебряный карась *Carassius gibelio* (Bloch, 1782), обыкновенный карась *Carassius carassius* (Linnaeus, 1758), сазан *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758), окунь *Percfluviatilis* (Linnaeus, 1758)) по 6-8 экземпляров. Все собранные образцы доставлялись в лабораторию Чановского стационара ИСиЭЖ СО РАН, где проводилась их сортировка и определение до минимально возможного таксономического уровня. Все образцы были заморожены в жидком азоте до последующего биохимического анализа.

Концентрацию белка определяли согласно методу Лоури (Lowry et al., 1951), липидов по методу Фольча (Folch et al., 1957) и углеводов согласно методу Дюбуа (Dubois et al. 1956) в некоторых модификациях.

Для определения активности пищеварительных ферментов в июне-июле проводили отлов половозрелых особей сазана (*C. carpio*), карасей обыкновенного (*C. carassius*) и серебряного (*C. gibelio*), окуня (*P. fluviatilis*), судака (*S. Lucioperca*), ельца (*L. leuciscus*), плотвы (*R. Rutilus*) и яза (*L. idus*) в озере Малые Чаны ставными жаберными сетями с ячейей 25-40 мм. Пойманных, живых рыб в пластиковых контейнерах с водой доставляли в лабораторию, где проводили измерение длины тела, вскрытие и извлечение пищеварительного тракта. Пищеварительный тракт освобождали от содержимого и замораживали в жидком азоте до последующего определения активности пищеварительных ферментов в лаборатории. Для анализа активности пищеварительных ферментов использовали данные полученные от 8-12 экземпляров каждого вида.

Анализ спектров питания исследованных видов рыб проводился согласно стандартным методам исследования. Содержимое желудка (для желудочных рыб) и кишечника (для безжелудочных рыб) фиксировали 70% раствором этанола до последующего определения в лаборатории. Определение компонентов питания проводилось в большинстве случаев до уровня отрядов и семейств.

## 2.1. Определение концентрации белков по методу Лоури

К навеске образца (20-30 мг) добавляли дистиллированную воду в отношении 1:10 (w/v). Образец сначала гомогенизировали механическим гомогенизатором Ultra-Turrax T 10 (Ika®) в течение 60 секунд и затем ультразвуковым гомогенизатором (BANDELINSONOPULS) еще 30 секунд. Далее, 0.4 мл образца разбавляли добавлением 7.6 мл дистиллированной воды и размешивали на вортексе BIOSANFVL-2400N. Из приготовленного таким образом образца забирали 0.5 мл и добавляли 0.5 мл 1N NaOH (3 повторности) и ставили на инкубацию в термостат при 30 °C на 24 часа. После инкубации к 0.01 мл образца добавляли 0.09 мл дистиллированной воды и 0.5 мл специально приготовленного раствора А:В (где, А : 125 мл H<sub>2</sub>O + 2.5 гр. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; В : 100 мл H<sub>2</sub>O + 0.5 CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O + 1 гр. KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>\*4H<sub>2</sub>O) и выдерживали при комнатной температуре 10 минут. Затем добавляли 0.05 мл 1 N реактива Фолина, и ставили на инкубацию в течение трех часов при комнатной температуре в темноте. Интенсивность появившейся окраски измеряли на планшетном спектрофотометре BioTek (PowerWaveXS2) при 750 нм против контрольной пробы, которая содержала вместо опытного образца 0.5 М NaOH. Для построения калибровочной кривой использовали раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) концентрацией 1 мг/мл (Рис.1).

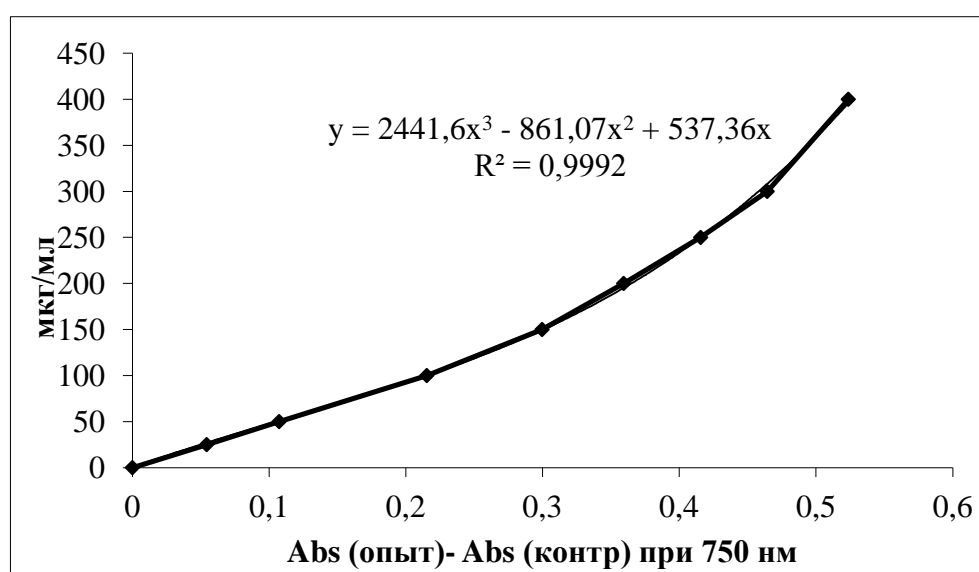


Рисунок 2 - Калибровочная кривая для определения концентрации белка по БСА.

## **2.2. Определение концентрации липидов по методу Фолча.**

К навеске образца (70–80 мг) добавляли хлороформ-метанольную смесь (2:1 v/v) в отношении 1:20 (w/v). Затем образец гомогенизировали ультразвуковым гомогенизатором в течение 15 секунд, далее инкубировали 2 ч при комнатной температуре. После инкубации образец центрифугировали на скорости 2000 оборотов в минуту 5 минут, забирали супернатант и к осадку добавляли новую порцию хлороформ-метанольной смеси (2:1 v/v) в отношении 1:10 (w/v), затем фильтровали через воронку из фильтровальной бумаги. Затем оба супернатанта смешивали и добавляли 0.89% KCl (4:1 v/v) и снова центрифугировали на скорости 2000 оборотов в минуту в течение 5 минут, после чего забирали супернатант и высушивали в пенициллиновых флакончиках под вытяжкой в течение суток при комнатной температуре. Концентрацию липидов определяли по отношению массы осадка к исходной массе образца.

## **2.3. Определение концентрации углеводов по методу Дюбуа**

Концентрацию углеводов определяли согласно методу (Dubois et al. 1956) К навеске образца (20–30 мг) добавляли дистиллированную воду в отношении 1:10 (w/v). Затем образец гомогенизировали механическим гомогенизатором Ultra-Turrax T 10 (Ika®) в течение 60 секунд и затем ультразвуковым гомогенизатором еще 30 секунд. Далее забирали 0.4 мл гомогената и добавляли 7.6 мл дистиллированной воды. Из полученного раствора брали 0.06 мл гомогената добавляли 0.06 мл фенола и 0.32 мл концентрированной серной кислоты, содержащей гидразин сульфат. В качестве стандарта использовали раствор крахмала (Рис. ).



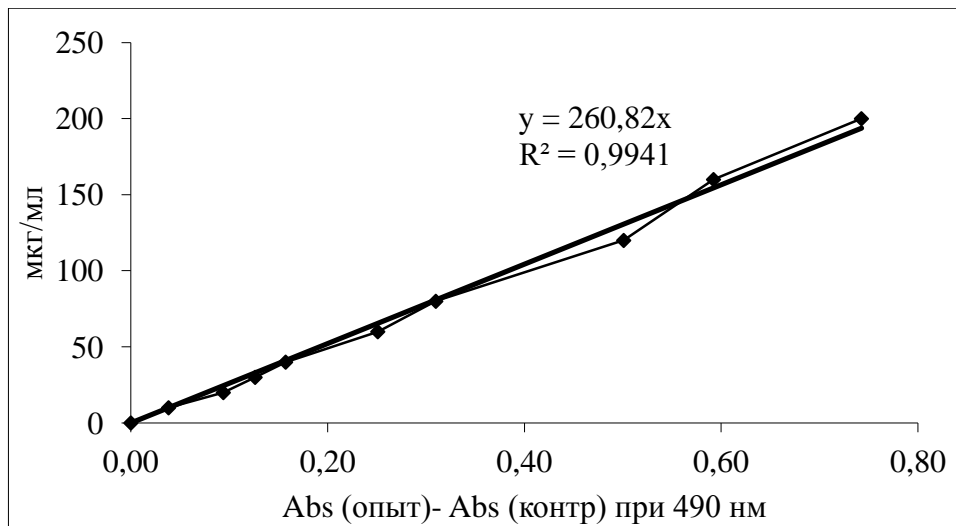


Рисунок 3 - Калибровочная кривая для определения концентрации углеводов.

#### 2.4 Определение содержания воды и расчет калорийности

Процент содержания воды рассчитан как разница в весе образца до и после лиофилизации.

Калорийность пищевых ресурсов рассчитана по формуле:

$K = B \cdot 4 + U \cdot 4 + L \cdot 9$ , где  $K$  – калорийность, ккал;  $B$  – процентное содержание белков;  $U$  – процентное содержание углеводов;  $L$  – процентное содержание липидов.

#### 2.5. Определение активности пищеварительных ферментов

К навеске кишечника добавлялся дистиллированная вода из расчета 5 мл на 1 гр массы кишечника. Далее кишечник гомогенизировали механическим гомогенизатором Ultra-Turrax T 10 (Ika®) в течение 60 секунд и затем ультразвуковым гомогенизатором (BANDELINSONOPULS) еще 30 секунд. После гомогенизации образец центрифугировали на скорости 10000 g в течение 5 минут. Супернатант аликвотировали и замораживали при -70 С до последующего определения активности пищеварительных ферментов.

### **2.5.1. Щелочные протеазы**

Активность щелочных протеаз (активность трипсина К.Ф. 3.4.21.4, химотрипсина К.Ф.3.4.21.1, и дипептидаз К.Ф. 3.4.13.18) определяли методом Гарсия-Каррено и Хаарда (Garcia-Careno and Haard 1993). К 10-20 мкл супернатанта добавляли 500 мкл раствора азо-казеина (0.5%) и 500 мкл 50 мМ трисового буфера (pH 8) и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем реакцию останавливали добавлением 20% раствора трихлоруксусной кислоты. Получившуюся смесь оставляли в холодильнике на 10 минут и затем центрифугировали на скорости 10000 g, в течение 10 минут при 4 С. Получившийся супернатант использовали для определения активности фермента по конечной точке на планшетном спектрофотометре при длине волны 340 нм. Специфическую активность ферментов выражали в условных единицах на 1 мг растворенного белка  $(Abs(\text{опыт}) - Abs(\text{контроль})) / 30 \text{ минут} * \text{мг белка}$ .

### **2.5.2. Амилаза**

Активность альфа-амилазы (К.Ф.3.2.1.1) оценивали методом Дегуара с соавторами (Deguara et al. 2003). К 5 мкл супернатанта добавляли 50 мкл 0.5% раствора растворимого крахмала в 1%  $Na_2HPO_4$  pH 7.4. Смесь инкубировали 5-30 минут и затем реакцию останавливали добавлением 30% раствора 3,5-динитросалициловой кислоты. Затем раствор выдерживали на водяной бани при 100 С в течение 10 минут. Получившийся супернатант использовали для определения активности фермента по конечной точке на планшетном спектрофотометре при длине волны 540 нм. Специфическую активность ферментов выражали в условных единицах на 1 мг растворенного белка  $(Abs(\text{опыт}) - Abs(\text{контроль})) / 5-30 \text{ минут} * \text{мг белка}$ .

### **2.5.3. Неспецифические липазы**

Активность неспецифических липаз (К.Ф.3.1.1) оценивали по методу Гавлички с соавторами (Gawlicka et al. 2000). К 10 мкл супернатанта

добавляли 250 мкл 0.4 мМ раствора п-нитрофенилмеристата в 24 мМNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> рН 7.8.Смесь инкубировали 5 минут, определяя оптическую плотность раствора каждые 40 секунд (кинетика) на планшетном спектрофотометре при длине волны 405 нм. Специфическую активность ферментов выражали в условных единицах на 1 мг растворенного белка (Abs(опыт)-Abs(контроль))/5 минут\*мг белка.

#### 2.5.4. Концентрация белка по Бредфорд

Для определения растворенного белка и расчета специфической активности пищеварительных ферментов использовали метод Бредфорд (Bradford 1976). К 270 мкл реактива Бредфорд (кумасси G250, этанол 95%, ортофосфорная кислота, дистиллированная вода) добавляли 30 мкл супернатанта, инкубировали 5 минут и определяли оптическую плотность раствора при длине волны 595 нм.

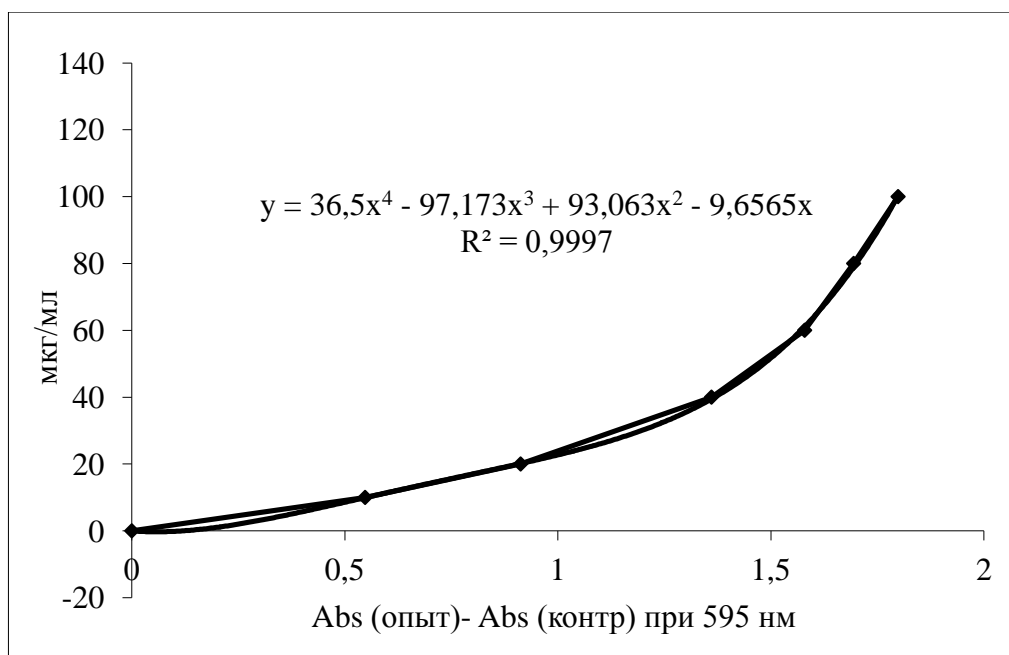


Рисунок 4 - Калибровочная кривая для определения концентрации белка.

## **2.6. Статистическая обработка данных**

Результаты представлены в виде средних и их ошибок. Различия между выборками определяли по t-критерию Стьюдента при  $p \leq 0.05$ . Для определения достоверных влияний факторов использовали двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). Дендрограмма сходства выборок на основе активности пищеварительных ферментов построена с помощью метода кластерного анализа (полное присоединение), в качестве меры сходства использовали эвклидово расстояние (Плохинский, 1970). Для анализа степени сходства спектра питания разных видов рыб рассчитан индекс Мористы-Хорна. Статистические расчеты выполнены в программе STATISTICA 7.0.

## **Глава 3 . Результаты**

### **3.1.Спектр питания**

### **3.2.Биохимический состав и калорийность гидробионтов**

### **3.3.Активность пищеварительных ферментов**

### **Выводы:**

1. Исследуемые рыбы озера Чаны по спектру сходства питания разделяются на три группы. В первую группу объединяются серебряный карась, обыкновенный карась и сазан (индекс Мористы-Хорна составляет  $0.7 < D_{M-H} < 0.85$ ), во вторую – плотва, елец и язь ( $0.66 < D_{M-H} < 0.89$ ), в третью – окунь и судак ( $D_{M-H} = 0.75$ ).
2. Биохимический состав (белки, липиды, углеводы) кормовых объектов рыб озера Чаны значительно варьирует в зависимости от вида гидробионта. Наибольшую концентрацию белков имеют позвоночные (рыбы) и беспозвоночные (личинки и куколки хирономид, пиявки, пауки, моллюски и личинки стрекоз). Высокое содержание углеводов отмечено в растениях. Наименьшее содержание белка и липидов отмечено в детрите.
3. Расчет калорийности объектов питания рыб показал, что доминирующие в рационе рыб гидробионты имеют и наибольшую калорийность.
4. Активность ферментов в зависимости от типа питания у разных видов рыб различна. Более высокая активность протеаз зарегистрирована у хищных рыб (судак, окунь), что связано с преобладанием в их питании белковой пищи. У мирных рыб отмечена более высокая активность карбогидраз (альфа-амилаза) в связи с доминированием в питании растительной пищи. Уровень активности неспецифической липазы у разных видов рыб не отличается.

### Список использованных источников

1. Атлас пресноводных рыб России: в 2 т. Т. 2 / под ред. Ю.С.Решетникова.- М.: Наука, 2003. 253 с.
2. Атлас пресноводных рыб России: в 2 т. Т.1 / под ред. Ю.С.Решетникова.- М.: Наука, 2003. 379 с.
3. Вербицкий В.Б. Кормовая ценность ветвистоусого рачка *Bosminalongirostris* для личинок рыб. Общий химический состав и калорийность тела. Биол. внутр. вод. 1990, № 87, с. 38-40.
4. Винберг Г.Г. Методы определения продукции водных животных. Метод, руководство и материалы. - Минск: Вышэйш. школа, 1968. - 245 с.
5. Гаджиева С.Б. Биохимическая характеристика кормовой ценности планктона и бентоса Мингечаурского и Варавинского водохранилищ. Автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. биол. наук. Баку, 1974.- 26с.
6. Голованова И.Л. Влияние природных и\* антропогенных факторов на: активность карбогидраз: молоди рыб / И.Л. Голованова // Биол. внутр. вод. -2000.-Т. 1.-С. 143-148.
7. Голубков С.М., Власова В.Г. Скорость энергетического обмена и калорийность тела у личинок ручейников (*Trichoptera*). Биология внутр. вод, 1982. № 54, с. 29-34.
8. Диксон М. Ферменты, / М. Диксон, Э. М. Уэбб: Мир;1982. -1118 с
9. Комова Н.И., Халько В.В. Сезонная динамика общего биохимического состава молоди леща на речных и устьевых воспроизводственных участках притоков Рыбинского водохранилища. Биология внутренних вод: Информ. бюл. 1992. JL: Наука. № 95, с. 72-80.
10. Кузьмина В.В., Баканов А.И., Поддубный А.Г. К методике определения энергетической ценности кормовых объектов рыб. Биол. внутр. вод (Ленинград). 1980, № 48, с. 67-70.
11. Кузьмина В.В., Лисицкая Н.Б., Половкова С.Н., Силкина Н.И., Баканов А.И. Биохимический состав некоторых кормовых объектов рыб

Рыбинского водохранилища. Биол. внутр. вод (Ленинград). 1979, № 44, с. 58-61.

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

13. Кузьмина, В.В. Влияние суточных ритмов питания на общую амилолитическую активность и активность щелочной фосфатазы кишечникау молоди рыб / В.В. Кузьмина, А.П. Стрельникова // Биология внутренних вод. 2008 в. - № 2. - С. 81-90.

14. Кузьмина В.В. Трофология рыб; (физиолого-биохимические аспекты) / В.В. Кузьмина // Биол. внутр. вод. 1996. - Т. 1. - С. 14-23.

15. Маликова Е.М. Пищевая ценность некоторых беспозвоночных как корма для рыб. Биохимия. 1956. Т. 21 (2). с. 173-181.

16. Никольский Г.В. Частная ихтиология / Г.В. Никольский. — М.: — Советская наука. -1974. 458 с.

17. Кузьмина В.В., Перевозчикова О.Б. Содержание гексоз и некоторых аминокислот в кормовых объектах рыб. Биология внутр. вод, 1989. № 81, с. 55-57.

18. Плохинский Н.А. Биометрия. Учебник для вузов. 2-е издание. – М.: Изд-во МГУ, 1970. – 368 с.

19. Попов П.А. Рыбы озера Чаны / П.А. Попов, В.А. Воскобойников, В.А. Щенев // Сибирский экологический журнал. 2005. - Т. 2. - С. 279-293.

20. Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб: руководство/ И.Ф. Правдин; под. ред. К.М.Дерюгина. –Издание Ленинградского государственного университета, Ленинград: Печатный двор,1939. -125с

21. Романова Е.П. Калорийность зоопланктона Куйбышевского водохранилища. Биол. внутр. вод. 1996, № 100, с. 30-34.

22. Романова Е.П., Бондаренко Л.Ф. Калорийность ракообразных Куйбышевского водохранилища. Биол. внутр. вод. 1984, № 63, с. 37-42.

23. Сорвачев К.Ф. Основы биохимии питания рыб. – М.: Легкая и пищевая промышленность`, 1982г.- 248 с



24. Уголев А.М. Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций: Элементы современного функционализма. Л.: Наука, 1985. 544 с.
25. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб; Отв. ред. А. Г. Поддубный; Рос. АН, Ин-т биологии внутр. вод им. И. Д. Папанина, 238 с. ил. 22 см, СПб. Гидрометеиздат 1993
26. Халько В. В. Биотопическая изменчивость калорийности молоди рыб в озере Плещеево. Биол. внутр. вод (Ленинград). 1988, № 78, с. 32-35. ISSN 0320-9652
27. Халько В. В. Биотопическая изменчивость калорийности молоди рыб в Рыбинском водохранилище. Биол. внутр. вод (Ленинград). 1987, № 76, с. 32-36. ISSN 0320-9652
28. Bowen S.H. Mechanism for digestion of detrital bacteria by the cichlid fish *Sarotherodon mossambicus* (Peters.) / S.H. Bowen // Nature. – 1976. – V. 260. – P. 137–138.
29. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. – 1976. - 72:248–254
30. Chakrabarti I. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation / I. Chakrabarti, Md. A. Gani, K. K. Chaki, R. Sur, K. K. Misra // Comp. Biochem. Physiol. 1995. - V. 112 A. - P. 167-177.
31. Clark J. Metabolism in marine flatfish. 1. Carbohydrate digestion in Dover sole (*Solea solea* L.) / J. Clark, J. McNaughton, J. R. Stark // Comparative Biochemistry and Physiology. 1984. - V. 77 B. - P. 821-827.
32. Conover R. J. 1978. Transformation of organic matter, p. 221-499. In O. Kinne [ed.], Marine ecology. V. 4. Wiley.
33. Deguara S, Jauncey K, Agius C Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream. J Fish Biol. – 2003. - 62:1033–1043.

34. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J., Robers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // *Analyt. Chem.* 1956. V. 28. P. 350-356
35. Folch J. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues // *J. Biol. Chem.* – 1957. – V. 226 (1). – P. 497–509
36. Garcia-Careno F.L., Haard N.F. (1993) Characterization of pro-teinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *J Food Biochem* 17:97–113
37. Gawlicka A, Parent B, Horn MH, Ross N, Opstad I, Torrissen OJ. (2000). Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. *Aquaculture* 184:303–314.
38. Harpaz, S. Activity of intestinal mucosal brush border membrane enzymes in relation to the feeding habits of three aquaculture fish species / S. Harpaz, Z. Uni // *Comparative Biochemistry and Physiology.* 1999. - V. 124 A. - P. 155-160.
39. Jagadeesan L., Arivuselvan N., Thirumaran G., Anantharaman P., Balasubramanian T. Biomass and Biochemical Composition of Zooplankton along the Arabian Sea, West Coast of India. *Advance Journal of Food Science and Technology* 2(2): 96-99, 2010.
40. Krogdahl, A. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages / A. Krogdahl, G.-I. Hemre, T.P. Mommsen // *Aquaculture Nutrition.*-2005.-V. 11.-P: 103-122.
41. Lazo, J.P. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum. (*Sciaenops ocellatus*) / J.P. Lazo, R. Mendoza, G.J. Holt, C. Aguilera, C.R. Arnold // *Aquaculture.* 2007. - V. 265. - P. 194-205.
42. Lowry H.. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry.* — 1952. — V. 193. — P.265-275.

43. Madhupratap M., Venugopal P., Haridas P. Biochemical studies on some tropical estuarine zooplankton species. *Indian journal of Marine Science*. 1979. Vol. 8. 155-158.
44. Mann, K. H. 1972. Macrophyte production and detritus food chains in coastal waters. *Mcm. Ist. Ital. Idrobiol.* 29(suppl.): 353-383
45. Morris R. J. The Endemic Faunae of Lake Baikal: Their General Biochemistry and Detailed Lipid Composition. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 1984. Vol. 222, pp. 51-78
46. Natalia, Y. Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae) / Y. Natalia, R. Hashim, A. Ali, A. Chong // *Aquaculture*. 2004. - V. 233. - P. 305-320.
47. Пйрез-Жимйнез, А. Digestive enzymatic profile of *Dentex dentex* and response to different dietary formulations / А. Пйрез-Жимйнез, G. Cardenete, A. E. Morales
48. *The physiology of fishes* / Edited by H.D. Evans, J.B. Claiborne. Boca Raton, London, New York - CRC Press. - 2005. - 601 P.
49. Ventura M. Linking biochemical and elemental composition in freshwater and marine crustacean zooplankton. *Marine Ecology Progress Series*. Vol. 327: 233–246, 2006
- Zambonino Infante, J.L. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae / J.L. Zambonino Infante, C.L. Cahu // *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2001. - V. 130. Part C. - P. 477-487.