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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологий
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____В.А. Кратасюк

«____»_____2016г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

03.03.02 Физика

Ископаемые фотопигменты в донных отложениях озер Учум и Утичье-3

Пояснительная записка

Руководитель _____ с.н.с., д.б.н. Рогозин Д.Ю.

Красноярск 2016

Выпускник _____ Матвиенко В.С.

Оглавление

Введение.....2

Литературный обзор.....2

1.1. Стратификация водоемов.....2

1.1.1. Сезонная стратификация.....2

1.1.2. Меромиктические водоемы.....2

1.2. Аноксигенные фототрофы.....2

1.2.1. Зеленые серные бактерии.....2

1.2.2. Зеленые нитчатые бактерии.....2

1.2.3. Пурпурные серные бактерии.....2

1.2.4. Несерные пурпурные бактерии.....2

1.3. Фотопигменты.....2

1.4. Палеолимнология.....2

Материалы и методы.....2

2.1 Подбор озер.....2

2.2 Озеро Утичье-3.....2

2.3 Озеро Учум.....2

2.4 Образцы.....2

2.5 Экстракция каротиноидов.....2

2.6 Хроматографический анализ каротиноидов.....2

2.7 Анализ вертикальной структуры водоема.....2

Результаты и обсуждение.....2

3.1 Анализ вертикальной структуры озер Утичье-3 и Учум.....2

3.2 Озеро Утичье-3.....2

3.3 Озеро Учум.....2

Результаты.....2

Выводы.....2

Список литературы.....2

Введение

Фотосинтетические пигменты (хлорофиллы и каротиноиды), захороненные в донных отложениях водоемов, являются следами фототрофных организмов, обитавших в данном водоеме в прошлом. В процессе седиментации пигменты попадают в донные отложения из фотической зоны вместе с отмершими клетками, пеллетами зоопланктона, остатками растительности и пр. и могут сохраняться на протяжении сотен и тысяч лет благодаря отсутствию света, низкой температуре и отсутствию кислорода. Поэтому вертикальное распределение и качественный состав пигментов в слоях донных отложений могут служить индикаторами видового состава, активности и величины продукции фототрофных организмов в соответствующие периоды истории данного водоема. А изменения видового состава и продукционных характеристик, в свою очередь, служат индикаторами изменений условий обитания фототрофных организмов.

Слоистая структура донных отложений наилучшим образом сохраняется в меромиктических озерах, поскольку устойчивая стратификация водной толщи препятствует взмучиванию и переосаждению осадочного материала. Кроме того, постоянный анаэробиоз и высокие концентрации сульфида в придонных водах препятствуют деятельности бентосных беспозвоночных, т.е. отсутствует биотурбация, следовательно – первоначальная последовательность отложений сохраняется ненарушенной [1]. Именно такая слоистость характерна для отложений замерзающих водоемов умеренной зоны, в которых теплый и холодный периоды резко различаются по продукции аллохтонной органики и условиям осаждения минеральных компонент. Поэтому донные отложения меромиктических озер хорошо поддаются датировке и являются хорошими “архивами” климатических изменений, и, следовательно, могут быть

использованы для хронологической реконструкции климатических сценариев, вызвавших изменения в экосистеме озера. Реконструкции климатических изменений, происходивших в прошлом без явного антропогенного влияния, позволяют определить некий базовый, фоновый диапазон вариаций климата в данной местности и дают ценную информацию для прогноза возможных изменений.

Для бессточных озер, расположенных в полуаридных климатических зонах, характерны значительные изменения уровня воды в зависимости от баланса осадков и испарения в данной местности, если нет антропогенных стоков-притоков. В полуаридной зоне северной части Минусинской котловины (Хакасия) озера испытывали значительные изменения уровня на протяжении последнего столетия. В частности, в июне 1926 года наблюдалось усыхание оз. Утичье - 3 до минимального уровня, около 25см. Минерализация озера менялась в обратной зависимости от объема воды и при минимуме уровня составляла около 83 г*л$^{-1}$ [2]. Аналогичные синхронные изменения уровня испытывали все озера данного региона. Резкие изменения уровня озер в начале прошлого века коррелируют с изменением годового количества атмосферных осадков в данной местности. Таким образом, хронология колебаний воды в озерах отражает хронологию сухих и влажных периодов в данной местности и при наличии соответствующих маркерных характеристик может быть реконструирована по донным отложениям.

Изменения уровня воды могут сильно влиять на экосистему озера. Так, минерализованные водоемы могут менять режим сезонной циркуляции в зависимости от уровня воды: при относительно низком уровне воды озеро становится голомиктическим, т.е. подвергается полному перемешиванию от поверхности до дна один или два раза в год (весной и/или осенью). При повышении уровня воды озеро может стать меромиктическим, т. е. весеннее и осеннее перемешивания будут захватывать только верхние слои озера (миксолимнион), в то время как придонные слои (монимолимнион) остаются неперемешанными. В монимолимнионе развивается анаэробиоз и, как правило,

накапливается сероводород или метан. Такие переходы из голомиктического состояния в меромиктическое и обратно описаны для ряда озер в разных частях мира. Кроме того, при снижении уровня и объема воды в озере происходит увеличение солености, и наоборот, что отражается на составе биоты и осадочного материала.

Отличительной особенностью меромиктических озер является наличие плотных скоплений аноксигенных фототрофных бактерий (АФБ) на границе ана- и аэробных условий (металимнион). Для существования данной группы бактерий необходимо одновременное присутствие сероводорода и света. Именно такие условия формируются в хемоклине меромиктических водоемов, в том числе и в оз. Утичье-3 и Учум. Молекулярные остатки АФБ, такие как каротиноиды, бактериохлорофиллы и их производные (фео-пигменты), а также ДНК могут сохраняться в донных отложениях озер в течение многих лет и служить индикаторами анаэробных условий в фотической зоне озера в тот или иной период его истории.

Цель настоящей работы – проанализировать динамику ископаемых фотопигментов донных отложений озер Утичье-3 и Учум, а так же оценить возможность их использования в качестве индикаторов состояния экосистемы водоема в прошлом.

Для достижения цели были поставленны следующие задачи:

1. Отобрать пробы донных отложений из центральной части озер Утичье-3 и Учум;
2. Экстрагировать фотопигменты из кернов донных отложений;
3. Провести хроматографический анализ полученных экстрактов;
4. Проанализировать пигментый состав донных отложений и его вертикальное распределение.

Литературный обзор

1.1. Стратификация водоемов

1.1.1. Сезонная стратификация

Многие озера регулярно показывают вертикальную стратификацию их водных масс, по крайней мере, в течение некоторого длительного периода времени на протяжении года. Различия плотности в водоемах способствует разделению водоема на вертикальные страты, что оказывает влияние на живые организмы водоемов. Температура и растворенные вещества определяют различие плотности воды. Верхние слои воды прогреваются как солнечным излучением, так и атмосферной конвекцией, формируя слой теплой перемешанной воды в верхней части озера. На основании вертикального распределения температуры в это время в озерах можно выделить:

1. поверхностный слой воды, имеющий почти одинаковую температуру по глубине;
2. слой, в котором наблюдается очень резкое падение температуры с глубиной;
3. слои, в которых понижение температуры с глубиной очень незначительно, а сама температура низка и соответствует температуре всей толщи воды к концу весенней циркуляции.

В большинстве озер, температурная стратификация проявляется до тех пор, пока прохладные осенние и зимние температуры не заставят воду циркулировать по всей глубине. Теплый поверхностный слой воды, называется эпилимнионом, в то время как холодная вода под слоем, который не был смешан с эпилимнионом в течение периода стратификации, называется гиполимнион. Резкий градиент температуры в зоне контакта между двумя слоями называется термоклин [3].

В результате, температурная стратификация может сформироваться в теплое время года, если озеро достаточно глубоко. Осенью холодная вода с поверхности озера может разрушить стратификацию в водоеме. Если

температура поверхности падает сильно, то эпилимнион и гиполимнион могут быть смешаны, и всё озеро гомогенизирует в так называемый миксолимнион. Это происходит когда температура воздуха и, соответственно, эпилимниона становится равной температуре гиполимниона.

В начале зимнего периода, при понижении температуры воды ниже +4˚ С, плотность воды уменьшается, и, следовательно, более легкая холодная вода будет находиться у поверхности. Стратификация по температуре будет обратная летней стратификации: теплая вода находится у дна, а более холодная на поверхности. Как только вся поверхность озера покроется льдом, водоем станет похож на гиполимнион в период летней стратификации. Сразу под льдом температура будет около 0˚ С, затем резкое повышение до +3˚ С, а еще глубже идет постепенное повышение до +4˚ С.

Весеннее перемешивание является аналогией осенней, только в обратном порядке. После перемешивания формируется тонкий слой, который в течение лета постепенно приобретает толщину. Длительность осенней и весенней циркуляций зависит от погодных условий.

Озеро не всегда показывают одинаковую циркуляцию каждый год. Неожиданный шторм или засуха могут разрушить монимолимнион. В зависимости от условий, озеро снова может стать меромиктическим. В некоторых случаях, циркуляционные модели озер изменяются навсегда.

1.1.2. Меромиктические водоемы

В некоторых случаях, озеру не удается перемешаться полностью, и градиент растворенных веществ может сохраниться гораздо дольше, чем в течение одного годового цикла. Такие озера не испытывают полного перемешивания. Градиент может быть следствием притока внешних или грунтовых вод. Кроме того, фотосинтез на поверхности озера и последующее разложения органического вещества в глубоких слоях озера может поддерживать градиент растворенных веществ. Постоянная стратификация

оказывает сильное влияние на распределение растворенных веществ, таких как соли, биогенные элементы и кислород, и, следовательно, формирует биоценоз, который может образовывать в озере [3].

Эпилимнион постоянно обменивается с атмосферой теплом и газом. Кроме того, эпилимнион эпизодически перемешивается ветром, или за счет температурной циркуляции. Гиполимнион напротив, изолирован от обмена с атмосферой в течение периода стратификации. Перенос растворенного вещества по вертикальному градиенту плотности, как правило, мал. В большинстве озер, только осаждение частиц переносит большие количества материи в монимолимнион.

Соль вносит вклад в плотность воды. Градиент плотности подразумевает различие солености из-за впадающих рек или испарения и осадков. Во многих случаях, градиенты плотности из-за солености вносит больший вклад, чем вклад теплового градиента. Количество соли увеличивает плотность холодной воды намного больше, чем температура. Следовательно, температура максимальной плотности уменьшается с увеличением солености [3, 4].

Благодаря резкому градиенту, металимнион может создать особую среду обитания. Организмы, которые могут регулировать свою плотность могут располагаться в зоне сильного градиента плотности. Также неживые частицы могут накапливаться на уровне, который соответствует их плотности. Кроме того, подвижные организмы могут жить в термоклине (извлекая пользу из преимуществ обоих слоев), одновременно в эпилимнионе и гиполимнионе. Следовательно, отдельный слой можно идентифицировать из-за его собственной характеристики. Такой слой называют металимнион.

Классификация озер в соответствии с их циркуляцией [4]:

1. Голомиктические озера - это озера, которые перемешиваются и гомогенизируются, по крайней мере, раз в год.
2. Меромиктические озера - это озера, в которых перемешивание не распространяется на весь водоем.

3. Амиктические озера не подвергаются глубокому перемешиванию. Как правило, это постоянно покрытые льдом озера.

Озеро называют меромиктическим, если химически отличающийся нижний слой, называемый монимолимнион, постоянно присутствует, по крайней мере, в течение одного годового цикла. Высокие концентрации растворенных веществ настолько увеличивают плотность, что это затрудняет перемешивание. Скорость обмена с миксолимнионом достаточно мала, по этому, химически различные условия поддерживаются непрерывно.

Монимолимнион не поддерживает газообмен с атмосферой в течение многих лет. В большинстве случаев, недостаток кислорода устанавливается после достаточного промежутка времени. Нитраты и сульфаты могут функционировать в качестве акцепторов электронов для микробного окисления органического материала. В этой зоне могут быть получены вещества, которые не являются химически устойчивыми в зоне миксолимниона и быстро окисляются в кислородных условиях. Монимолимнион постоянно подвергается гидростатическому давлению столба воды выше. Следовательно, газы (CO_2, H_2S и другие) могут накапливаться в концентрациях выходящих далеко за пределы концентраций в миксолимнионе [4, 5].

Меромиктические озера классифицируются в соответствии с причинами, приводящими к меромиксии. Общепринятая классификация, предложенная Хатчинсоном [6] выглядит следующим образом:

- **Эктогенная меромиксия** возникает в результате поступления в озеро значительных количеств воды другой солености, чем изначальная.

Эктогенная меромиксия бывает двух типов:

1. В пресное озеро попадает соленая вода. Например, в озерах, отделенных от морского побережья узкой полосой суши, меромиксия возникает при эпизодических поступлениях морской воды. Более соленая

(следовательно – более тяжелая) морская вода опускается на дно водоема, и остается там в течение нескольких лет.

2. В соленое озеро попадает пресная вода. Пресная вода поступает в соленое озеро и, смешиваясь с соленой водой, образует на поверхности слой пониженной солености.

Также эктогенная меромиксия может создаться искусственно. Примером могут служить искусственные озера, образованные в результате затопления заброшенных шахт и карьеров. Таким образом, в придонных областях вода имеет повышенную соленость, а в поверхностном слое вода будет пресной.

- **Креногенная меромиксия** возникает за счет поступления минерализованных подземных вод в глубинные слои изначально пресного озера. В таких водоемах, как правило, разность солености между монимолимнионом и миксолимнионом невелика, хотя и достаточна для поддержания перманентной стратификации.
- **Эндогенная (биогенная) меромиксия** поддерживается внутренними биологическими и геохимическими механизмами.

Данный тип меромиксии может вызываться следующими способами: деструкция органики в придонных водах [7, 8], выпадение в осадок солей с последующим их растворением в придонных областях [9, 10].

Во многих меромиктических озерах, глубокое перемешивание разрушает монимолимнион, оставляя резкий переходный градиент в конце периода перемешивания. Зона перехода из миксолимнион в монимолимнион занимает всего несколько дециметров по глубине. Такой резкий градиент называют галоклин, хемоклин или пикноклин, в зависимости от того, градиент солености, химического вещества или плотности для нас наиболее важен. Из наблюдений известно, что некоторые виды планктона обитают вблизи зоны образованной переходами этих градиентов [5].

1.2. Аноксигенные фототрофы

Аноксигенные фототрофные бактерии (АФБ) представляют собой филогенетически разнородную группу микроорганизмов, содержащих несколько типов хлорофиллов, которые принято называть

бактериохлорофиллами. К настоящему времени известны бактериохлорофиллы a, b, c, d, e, g, отличающиеся от хлорофилла а незначительными заменами в боковых радикалах магний-порфиринового кольца [11]. Фотосинтез АФБ отличается от фотосинтеза цианобактерий, водорослей и высших растений тем, что вода не может служить донором электронов и кислород не образуется в процессе фотосинтеза. Фотоассимиляция CO_2 происходит при участии только одной фотосистемы и зависит от использования внешних доноров электронов, таких как восстановленные соединения серы, молекулярный водород или органические соединения. АФБ подразделяют на следующие филогенетические группы: зеленые серобактерии, зеленые нитчатые (несерные) бактерии, гелиобактерии, серные пурпурные бактерии, несерные пурпурные бактерии, аэробные бактериохлорофилл а - содержащие бактерии (АБС). Представители этих групп различны по морфологии, цитологии, пигментному составу и физиологии.

Для первых пяти групп АФБ, которые являются анаэробами, фотосинтез - основной тип метаболизма. Аэробные бактериохлорофилл а - содержащие бактерии (АБС) принципиально отличаются от типичных АФБ тем, что для них респираторный метаболизм является главным энергетическим процессом, а фотосинтез дает не более 10-50 % дополнительной энергии.

Фототрофные серные бактерии относятся к двум большим группам: *Chromatiaceae* (пурпурные серные бактерии, ПСБ) и *Chlorobiaceae* (зеленые серные бактерии, ЗСБ). Пурпурные серные бактерии – анаэробные микроорганизмы, осуществляющие аноксигенный фотосинтез, содержат в качестве основного светопоглощающего пигмента бактериохлорофилл *a* и каротиноиды спириллоксантин и окенон (последний характерен только для этого семейства) [12, 13]. Все ПСБ используют восстановленные соединения серы в качестве доноров электрона, в первую очередь сульфид (сероводород) и элементную серу, а также тиосульфат. Окисление сероводорода происходит в два этапа: сначала до элементной серы, которая трансформируется в полисульфиды и откладывается в виде глобул внутри клеток, а затем до

сульфата [12]. Некоторые виды ПСБ могут существовать в присутствии малых концентраций кислорода [14].

Зеленым серным бактериям, так же как и ПСБ, требуется свет и сероводород для активной жизнедеятельности, но филогенетически они с ПСБ в родстве не состоят. Главными фотосинтетическими пигментами у них являются бактериохлорофиллы *c*, *d* и *e*, каротиноиды хлоробактин и изорениератин [13]. Данное семейство подразделяется на так называемые «зеленые» ЗСБ, содержащие хлоробактин, и «коричневые» ЗСБ,. содержащие изорениератин. В отличие от ПСБ, ЗСБ окисляют сероводород только до элементной серы, которую откладывают не внутри клеток, а снаружи. ЗСБ не способны фиксировать углекислоту в рибулозо-бифосфатном цикле, для этого они используют восстановительный цикл трикарбоновых кислот [15].

1.2.1. Зеленые серные бактерии

Зеленые серобактерии (ЗСБ) представлены одноклеточными микроорганизмами. Все виды неподвижны. Размножение происходит путем бинарного деления клеток. Клетки не имеют внутриклеточных мембран, содержащих пигменты. Часть пигментов локализуется в цитоплазматической мембране, а часть в особых структурах - хлоросомах. Пигментами фотосинтеза являются бактериохлорофилл c, d или e и небольшое количество бактериохлорофилл a, а также каротиноиды. Основными каротиноидами зеленых серобактерий являются соединения, содержащие ароматические кольца (хлоробактин, β-изорениератин, изорениератин). У всех зеленых серобактерий присутствуют цитохромы типа c (c-551, c-553, c-555). Все зеленые серобактерии являются строгими анаэробами и облигатными фототрофами. Растут фотолитоавтотрофно на среде с сульфидом или серой в качестве донора электронов [11].

1.2.2. Зеленые нитчатые бактерии

Зеленые нитчатые бактерии (ЗНБ) считают наиболее древними фототрофными микроорганизмами. Их клетки имеют нитчатое строение. Передвигаются скольжением. Нити - трихомы некоторых видов окружены слизистым чехлом. Клетки зеленых нитчатых бактерий способны к фототаксису, хемотаксису и аэротаксису. По организации клеточной стенки и фотосинтетического аппарата эти микроорганизмы похожи на зеленых серобактерий, но имеют иной тип строения реакционного центра. Пигментами фотосинтеза являются бактериохлорофилл а, с, а так же каротиноиды. Основными каротиноидами нитчатых бактерий являются β-, γ- каротин или миксобактин. Фотосинтетический аппарат локализован в хлоросомах и на цитоплазматической мембране. Хлоросомы связаны с ЦПМ и образуют хорошо выраженные скопления. Синтезируют на свету и в темноте, но в отсутствии кислорода. Способны к фотоавтотрофии, но предпочитают фотогетеротрофный или иногда хемогетеротрофный образ жизни. Среди зелёных несерных бактерий есть мезофильные и термофильные формы [11].

1.2.3. Пурпурные серные бактерии

По морфологии – кокки, палочки и извитые формы, неподвижные и подвижные за счет жгутиков. Размножаются делением и почкованием. Подвижные виды обладают активным фототаксисом. Некоторые виды могут образовывать цисты и экзоспоры. Предпочитают расти на свету в анаэробных условиях. Содержат бактериохлорофилл *a,* реже – бактериохлорофилл *b.* В клетках большинства пурпурных бактерий содержатся только алифатические каротиноиды, многие из которых принадлежат к группе ксантофиллов. У некоторых пурпурных серобактерий обнаружен уникальный арильный моноциклический каротиноид окенон. Используют широкий спектр соединений азота, многие способны к азотофиксации. Источником углерода могут быть углекислый газ или органические вещества. В темноте роль органических

веществ как источника энергии увеличивается, происходят брожения разного типа. Энергия также может получаться путём анаэробного дыхания с сульфатом, серой, Fe^{3+}, CO и органическими соединениями в качестве акцепторов электронов [16].

1.2.4. Несерные пурпурные бактерии

Имеют ферменты защиты от O_2. В микроаэрофильных и аэробных условиях, способны расти в темноте. Имеют склонность к фотоорганогетеротрофному образу жизни, предпочитая в качестве доноров электронов и источника углерода органические вещества, однако могут быть и фотолитоавтотрофами. У подвижных форм есть жгутики, есть и неподвижные формы. Нуждаются в некоторых витаминах [16].

1.3. Фотопигменты

Способность организмов существовать за счет энергии света, в первую очередь, связана с наличием у них специфических фоторецепторных молекул – пигментов. У аноксигенных фототрофных бактерий встречаются хлорофиллы, характерные только для этой группы организмов. Их называют бактериохлорофиллами. Выделяют шесть основных видов бактериохлорофиллов [16]:

- бхл a – пик поглощения при 850-890 нм;
- бхл в – пик поглощения при 1020-1040 нм и до 1100 нм;
- бхл c – пик поглощения при 750-760 нм;
- бхл d – пик поглощения при 720-740 нм;
- бхл e – пик поглощения при 710-720 нм;
- бхл g – пик поглощения при 770-790 нм.

Вспомогательными пигментами фототрофных организмов являются каротиноиды. Поглощают свет с длиной 400-550 нм. Большинство каротиноидов построено на основе конденсации изопреноидных остатков.

Каротиноиды бывают [17]:

1. Алифатические – у них полиизопреноидная цепь открытая и не содержит циклических группировок.
2. Аарильные – на одном или обоих концах полиизопреноидной цепи расположено по ароматическому кольцу.
3. Алициклические – на одном или обоих концах полиизопреноидной цепи расположено по β-ионовому кольцу.

Выделяют также каротиноиды, не содержащие в молекуле кислорода, и кислородсодержащие каротиноиды – ксантофиллы.

Наиболее разнообразен состав каротиноидных пигментов у пурпурных бактерий (свыше 50). В клетках большинства пурпурных бактерий содержатся только алифатические каротиноиды, принадлежащие к группе ксантофиллов. У зеленых бактерий основные каротиноиды – арильные [17].

Каротиноиды выполняют две функции [17]:

1. Поглощают кванты света в коротковолновой части спектра и передают энергию света на хлорофилл;
2. Предохраняют хлорофилл от фотоокисления (защищают клетку от токсического действия синглентного кислорода).

Встречающиеся в работе фотопигменты:

1. Аллоксантин ((3R,3'R) - 7,8,7',8' – Tetradehydro - β,β – carotene - 3,3' - diol) [18].

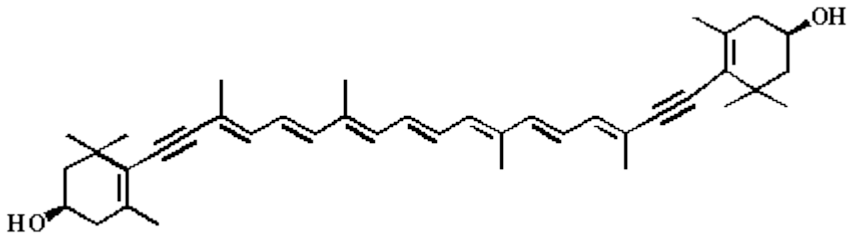


Рисунок 1 - Структура аллоксантина

Аллоксантин является фотопигментом криптофитовых водорослей.

2. Лороксантин ((3R,3'R,6'R) - β,β - Carotene - 3,19,3' - triol) [18].

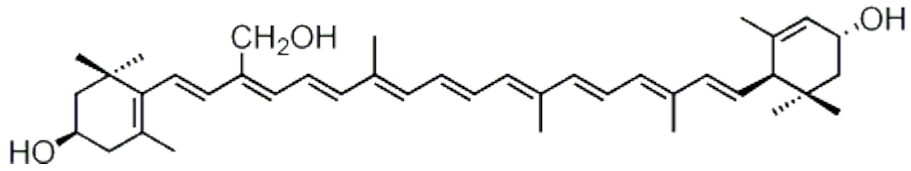


Рисунок 2 - Структура лороксантина

Лороксантин является фотопигментом зеленых водорослей.

3. Лютеин ((3R,3'R,6'R) - β,β – Carotene - 3,3' - diol) [18].

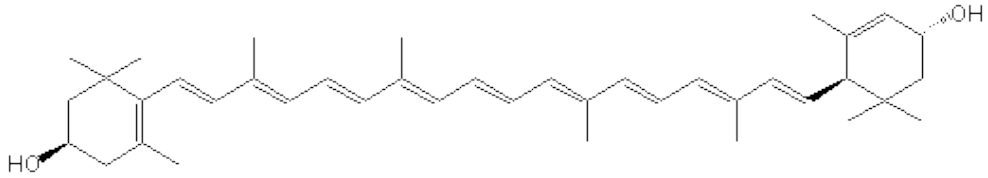


Рисунок 3 - Структура лютеина

Лютеин является фотопигментом зеленых водорослей.

4. Зеаксантин ((3R,3'R) - β,β - Carotene - 3,3' - diol) [18].

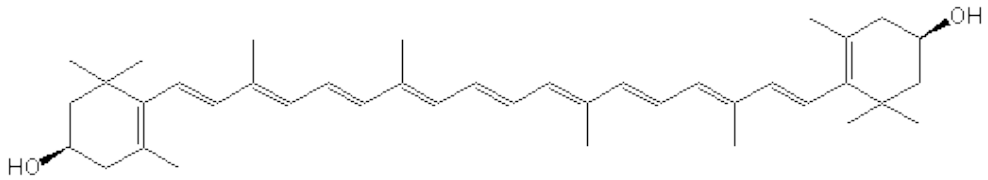


Рисунок 4 - Структура зеаксантина

Зеаксантин является фотопигментом сине - зеленых водорослей.

5. β-каротин (β,β - Carotene) [18].

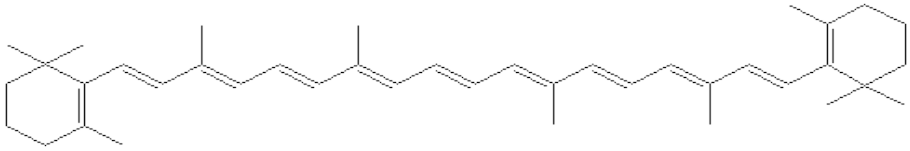


Рисунок 5 - Структура β - каротина

β-каротин является пигментом растений.

6. Хлорофилл А [18].

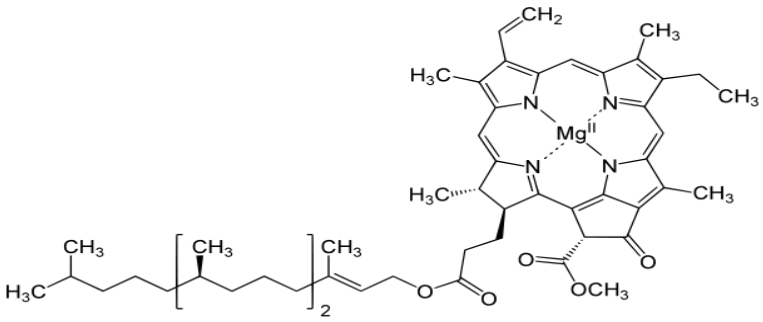


Рисунок 6 - Структура хлорофилла А

7. Хлоробактин (ϕ,ψ - Carotene) [18].

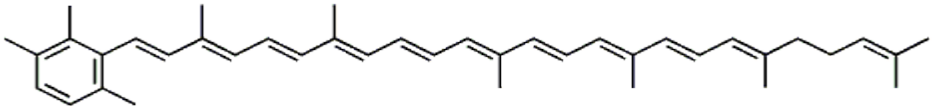


Рисунок 7 - Структура хлоробактина

Хлоробактин является фотопигментом зеленых серных бактерий. Идентификация пигмента производилась с помощью экстракта пигментов чистой культуры ЗСБ, выделенной из хемоклина озера Шунет и справочной литературы [19].

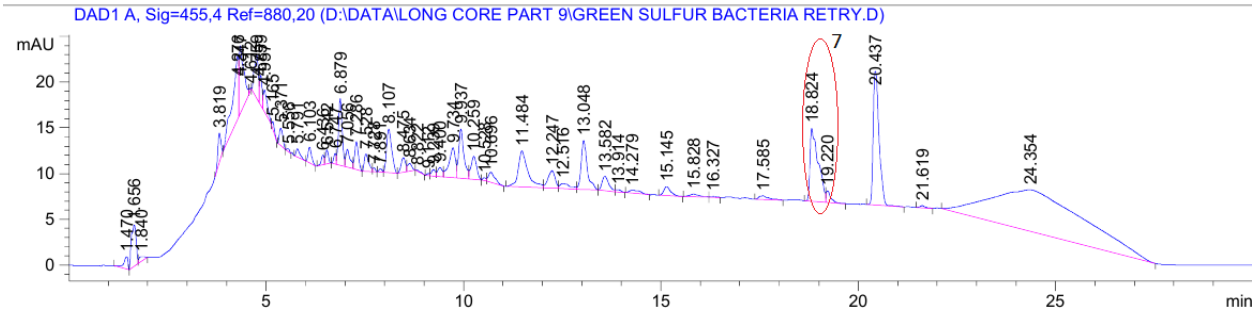


Рисунок 8 - Хроматограмма экстракта фотопигментов культуры зеленых серных бактерий выделенной из хемоклина озера Шира, характерный пигмент – хлоробактин, время выхода 18,8 мин. Сигнал DAD 455 нм, ширина оптической щели 4 нм, сравнительная длина волны 880 нм, ширина оптической щели 20 нм.

8. Окенон (1' - Methoxy - 1',2' - dihydro – χ, ψ - carotene - 4 ' - one) [18].

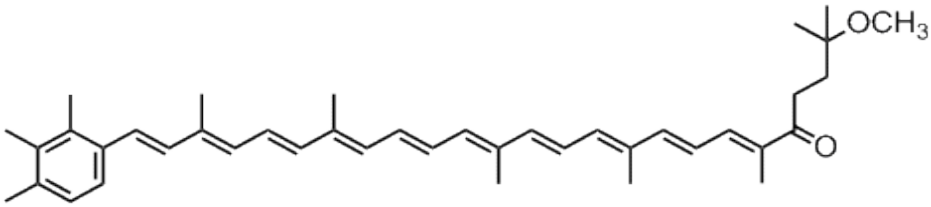


Рисунок 9 - Структура окенона

Окенон является фотопигментом пурпурных серных бактерий. Идентификация пигмента производилась с помощью экстракта пигментов чистой культуры ПСБ, выделенной из хемоклина озера Шира и справочной литературы [20].

1.4. Палеолимнология

Ископаемые пигменты водорослей и бактерий используются палеолимнологами для решения широкого спектра научных вопросов, касающихся исследования эволюции экосистем водоемов и мест их расположения. Основная цель таких исследований - анализ донных отложений, химических следов, и биомаркеров различных трофических групп озер и близлежащих биомов. Наиболее ценными архивами являются донные отложения с выраженной сезонной слоистостью, которая формируется в виде

горизонтальных годичных слоев (“варв”) и позволяет делать реконструкции с годичным разрешением.

Одним из биомаркеров изменений в озере являются фотосинтетические пигменты, образованные в результате деятельности фототрофного сообщества озера. Эти следы хороши тем, что они образуются только в результате процессе фотосинтеза и могут отражать продукцию экосистемы озера. Так же, специфические пигменты аноксгенного фотрофного сообщества могут быть использованы как индикаторы наличие анаэробных условий в озере в прошлом. Так как гидрологический режим водоемов напрямую зависит от внешних условий, этот маркер позволяет нам реконструировать климат региона в прошлом.

Материалы и методы

2.1 Подбор озер

Озера подбирались по следующим принципам:

1. Озеро должно являться бессточным водоемом, существующим в течение длительного времени (сотни лет);
2. Озеро должно быть стратифицированным либо постоянно (меромиктическим), либо в летний период (именно по этому в донных отложениях сохраняется ненарушенная слоистость).

2.2 Озеро Утичье-3

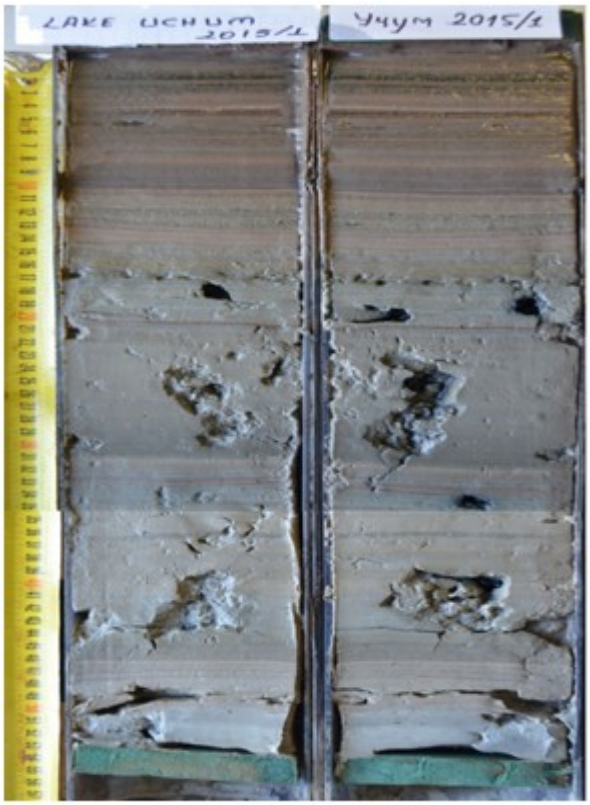
Озеро Утичье-3 (54°31’ с. ш., 90°28’ в. д.) расположено в северной части Республики Хакассия в 23 км восточнее от оз. Шира. Это солоноватый, эвтрофный водоем, акватория озера вытянута в северо-восточном направлении на 2.1 км при ширине 1.2 км. Площадь озера составляет 1.41 км^2; это самое большое из группы Утичьих озер. Средняя глубина 2.5 м, максимальная около 5.5 м. Озеро относится к бессточным: его питание осуществляется за счет грунтовых, подземных и атмосферных вод. Начиная с 1921 г. отмечается постоянное увеличение площади водного зеркала озера и его глубины. Такие колебания уровня и объема вод обусловили значительные вариации степени минерализации озерной воды. В течение полувека концентрация растворимых солей в воде озера снизилась от 159 г/л (крепкий рассол) до 7,9 г/л (солоноватая вода). В течение лета в придонных слоях формируются анаэробные условия с присутствием сероводорода [2].

2.3 Озеро Учум

Озеро Учум (55°06′ с. ш., 89°43′ в. д), расположено в северо-западной части Чулымо-Енисейской котловины, в 38 км южнее города Ужура, в 80 км севернее озера Утичье-3. Это соленое, меромиктическое озеро, имеет овальную форму, акватория озера вытянута в северо-восточном направлении на 4.1 км при ширине 1.4 км, площадь водной поверхности ок. 4.6 км^2, соленость ок. 32 г/л (март, 2016г). Глубина ок. 7.7м. Озеро относится к бессточным: его питание осуществляется за счет грунтовых, подземных и атмосферных вод.

2.4 Образцы

Для анализа каротиноидов использовали керн длиной 620 мм (Утичье-3), отобранный в марте 2014г. (рис. 9), и керн длиной 530 мм (Учум), отобранный в августе 2015 (рис. 10) с помощью гравитационной трубы со съемной пластиковой рабочей трубкой внутренним диаметром 90 мм. В лаборатории керн разрезали вдоль на две половины и разделяли пополам с помощью двух тонких пластин из нержавеющей стали, вставленных в разрез. После разделения керна пластины удаляли сдвигом в поперечном направлении, что позволяло сохранить ненарушенными поверхности разреза с видимыми горизонтальными слоистыми неоднородностями. Одну половину керна разрезали на поперечные образцы с шагом 1 см, которые использовали для анализа каротиноидов и содержание органики. После разрезания образцы



хранили в холодильнике при температуре -20^{0}С.

Рисунок 10 – Керн озера Утичье-3

Рисунок 11 – Керн озера Учум.

2.5 Экстракция каротиноидов

Образцы донных отложений оттаивали при комнатной температуре, затем из внутренней части образца (соприкасавшиеся с воздухом поверхности не брали) извлекали около 1,5г вещества, гомогенизировали с помощью шпателя, разделяли на три части и каждую часть взвешивали. Одну часть использовали для определения доли сухого вещества в образце, две другие – для анализа каротиноидов в двух повторностях.

Для определения доли сухого вещества в образце пробу взвешивали после сушки при 105ºС в течение ночи, затем для определения массы органики образец взвешивали после прокаливания при температуре 550ºС в течение 5 часов.

Для экстракции каратиноидов две части оставшегося образца разводили в 5 мл 90% ацетона и выдерживали сутки в холодильнике. Далее смесь

центрифугировали 10 мин при 10 000g, 5 мл супернатанта использовали для ВЭЖХ анализа фотопигментов.

2.6 Хроматографический анализ каротиноидов

Анализ проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на установке Agilent 1200 (Agilent Technologies, Калифорния, США) с масс-спектрометрическим (MS) и диодно-матричным (DAD) детекторами, на колонке Eclipse XDB-C-18, средний диаметр частиц 5 микрон, размеры 4,6–150 мм. Элюенты и пробы предварительно проходили через предколонку Eclipse XDB C18, средний диаметр частиц 5 микрон, размеры 4,6 х 12,5 мм, разделение проводилось при температуре 40ºС.

Для ВЭЖХ были использованы следующие растворители [21]:

- Растворитель А: 80:20 метанол: 0,5 М ацетат аммония (водный; pH 7,2 v/v);
- Растворитель В: ацетонитрил 90:10: вода (v/v);
- Растворитель С: этилацетат (хч).

Используемый протокол разделения приведен в таблице 1.

Таблица 1 - Программа для системы растворителей ВЭЖХ

Время (мин)	Скорость протока (мл/мин)	%A	%B	%C	Состояние
0	1,0	100	0	0	Введение
4	1,0	0	100	0	Линейный градиент
18	1,0	0	20	80	Линейный градиент
21	1,0	0	100	0	Линейный градиент
24	1,0	100	0	0	Линейный градиент

29	1,0	100	0	0	Доведение до равновесного состояния

2.7 Анализ вертикальной структуры водоема

Анализ вертикального распределения температуры, электропроводности (соленость), редокс потенциала (растворенный кислород) измерялись с помощью погружного многоканального зонда *YSI* 6600 (USA).

Принцип действия канала измерения удельной электрической проводимости (УЭП) основан на измерении силы тока и напряжения между электродами в четырёхэлектродной (два токовых и два потенциальных электрода) кондуктометрической ячейке. [22]

Принцип действия канала измерения массовой концентрации растворенного в воде кислорода амперометрическим методом основан на измерении силы тока между платиновым катодом и серебряным анодом в первичном преобразователе (мембраной ячейке Кларка) посредством специально созданным фирмой YSI независящим от скорости перемешивания среды датчиком «Рапид-Пульс»™. [22]

Принцип действия канала измерения температуры основан на преобразовании электрического сопротивления, поступающего в электронный блок от первичного преобразователя, пропорционально измеряемой величине. [22]

Зонд погружали с шагом в 0.5 метра и записывали показания с датчиков.

Результаты и обсуждение

3.1 Анализ вертикальной структуры озер Утичье-3 и Учум

В результате измерения вертикальной структуры водоема были получены следующие данные.

Для озера Утичье-3:

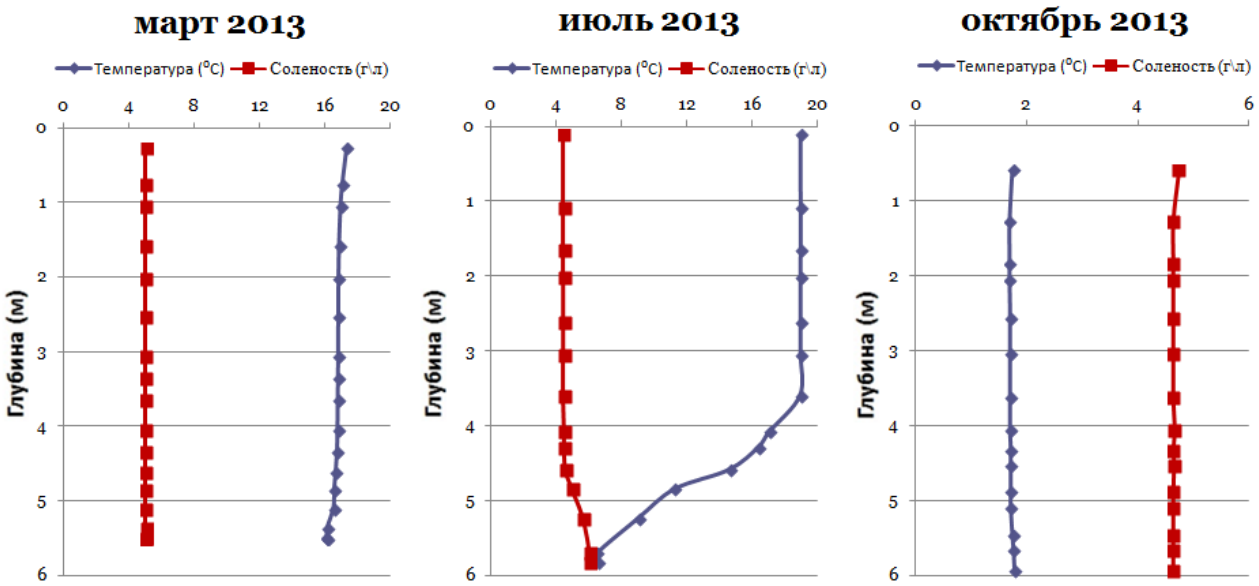


Рисунок 12 – Профили вертикального распределения температуры и солености в озере Утичье-3.

Для озера Учум:

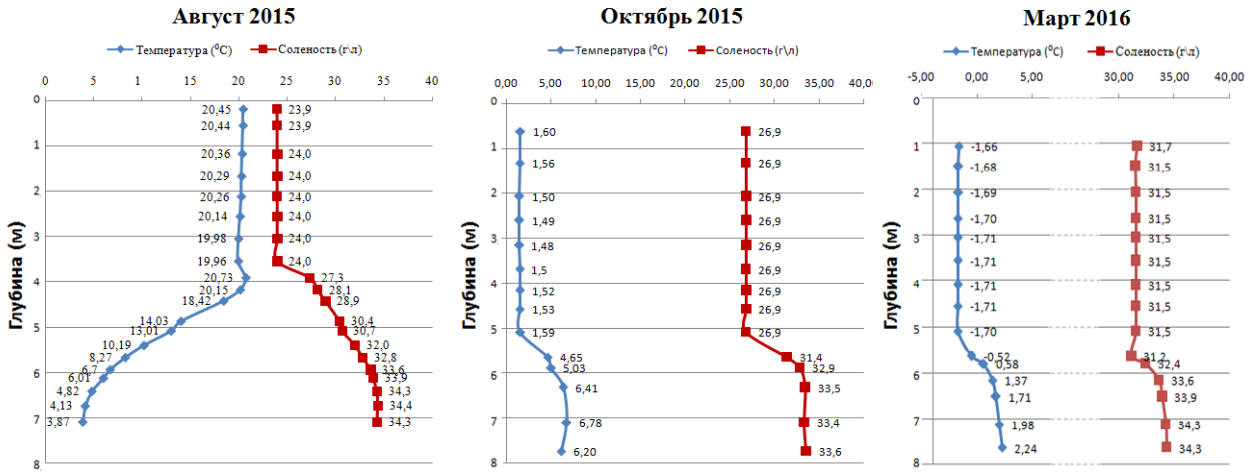


Рисунок 13 - Профили вертикального распределения температуры и солености в озере Учум.

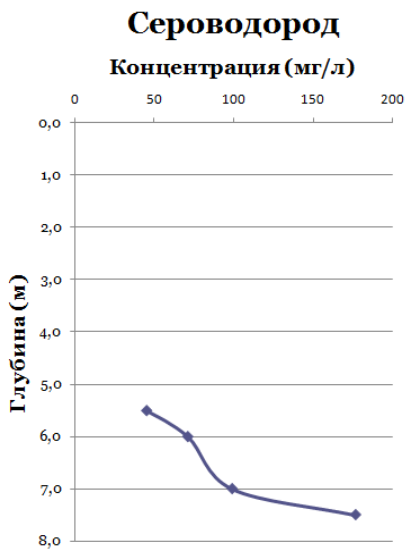


Рисунок 14 – Распределение сероводорода в озере Учум (март 2016)

По профилям озера Утичье-3 можно сказать, что озеро стратифицировано только в летний период. Это видно благодаря присутствию зоны термо- и хемоклина в июле и отсутствия данных зон в другие месяцы.

В озере Учум же наблюдаются зоны термо- и хемоклина во все времена года, что говорит о стратифицированном состоянии водоема круглый год. Начиная с глубины 5 метров присутствует сероводород, что также говорит об устойчивой меромиксии озера.

3.2 Озеро Утичье-3

В результате ВЭЖХ анализа фотопигментов из проб керна озера Утичье-3 были обнаружены следующие пигменты:

1. Аллоксантин, время выхода 7.1 мин. (рис. 15)
2. Лороксантин, время выхода 7.5 мин. (рис. 15)
3. Лютеин, время выхода 7.9 мин. (рис. 15)
4. Зеаксантин, время выхода 8 мин. (рис. 15)
5. β-каротин, время выхода 21 мин. (рис. 15)
6. Хлорофилл А, время выхода 17,5 мин. (рис. 16)
7. Хлоробактин, время выхода 18,8 мин. (рис. 15)

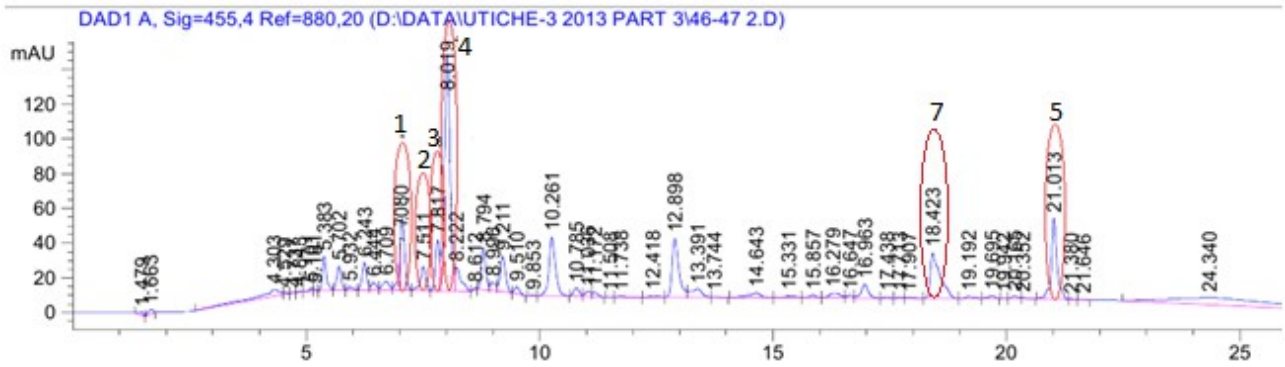


Рисунок 15 - Хроматограмма экстракта фотопигментов из донных отложений озера Утичье-3. Сигнал DAD 455 нм, ширина оптической щели 4 нм, сравнительная длина волны 880 нм, ширина оптической щели 20 нм

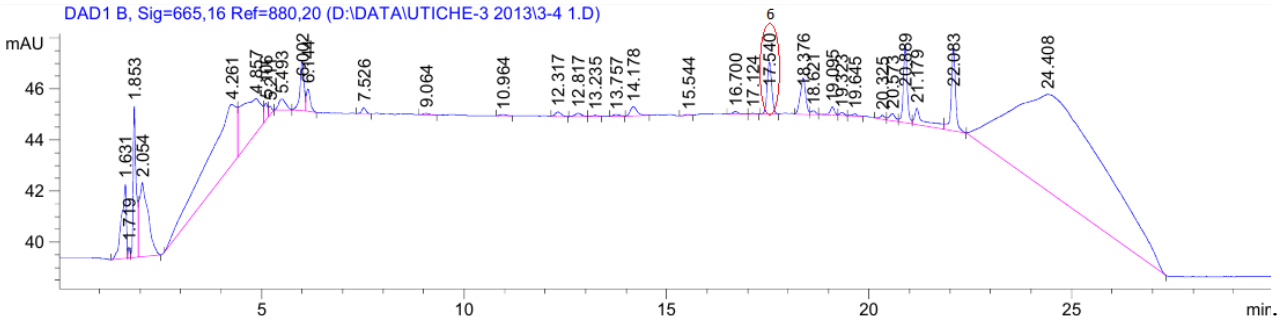
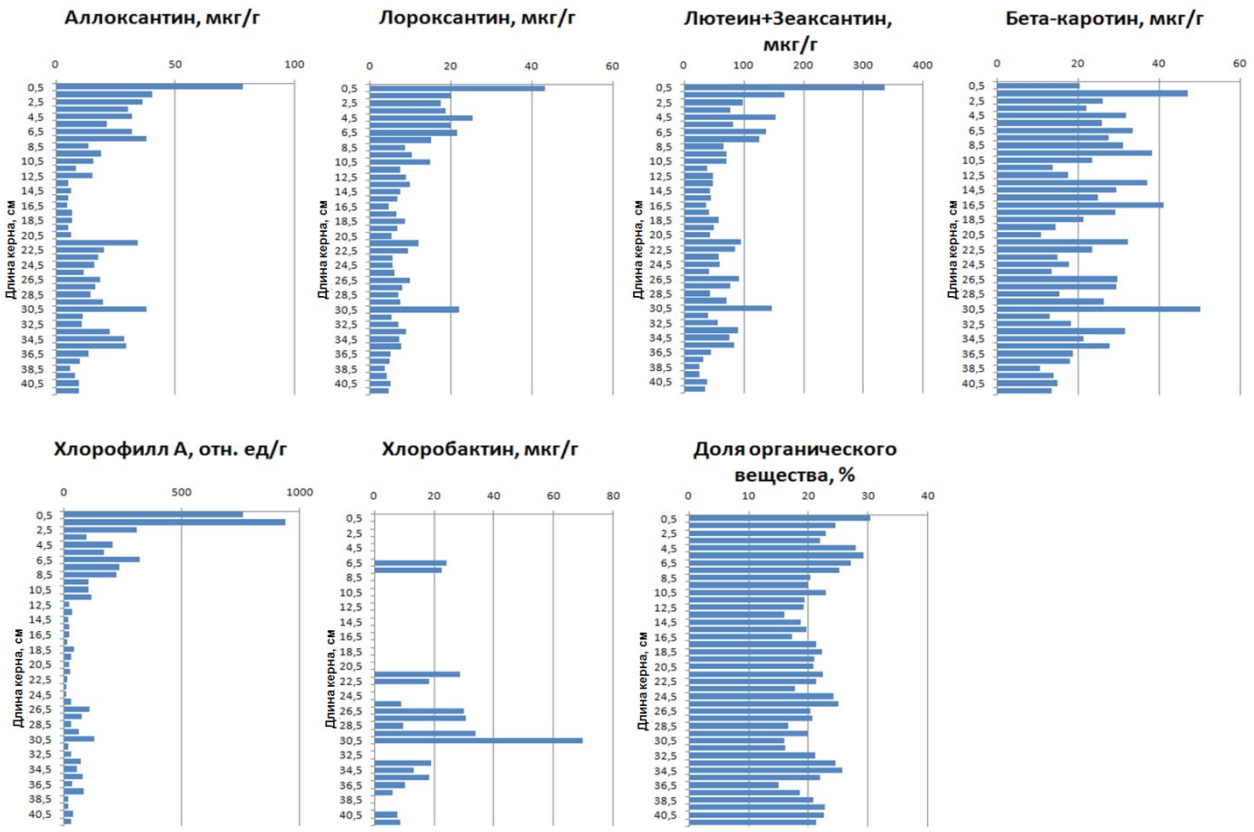


Рисунок 16 - Хроматограмма экстракта фотопигментов из донных отложений озера Утичье-3, характерный пигмент – хлорофилл А, время выхода 17,5 мин. Сигнал DAD 455 нм, ширина оптической щели 4 нм, сравнительная длина волны 880 нм, ширина оптической щели 20 нм.

По полученным данным были построены профили вертикального распределения пигментов в донных отложениях озера Утичье-3 (рис. 17, 18).

Профили показали, что за всю историю формирования керна в озере присутствовали зеленые водоросли, цианобактерии, криптофитовые, а так же вероятно происходил смыв в озеро остатков растений с прилегающих территорий. Содержание же хлоробактина в донных отложениях показало себя неравномерным. Он присутствует только на участках с 4 по 8 см, с 21 по 37 см и с 40 по 42 см. Это указывает на неустойчивый характер стратификации водоема, в частности на неустойчивость сероводородной зоны в придонных областях. Из такой картины мы можем сделать предположение о том, что сероводород может



отсутствовать годами, однако у нас пока мало данных для более четкой интерпретации.

Рисунок 17 - Профили вертикального распределения каротиноидов в донных отложениях озера Утичье-3. По оси ординат указана глубина пробы, по оси абсцисс – концентрация пигментов в мкг/г сухого вещества.

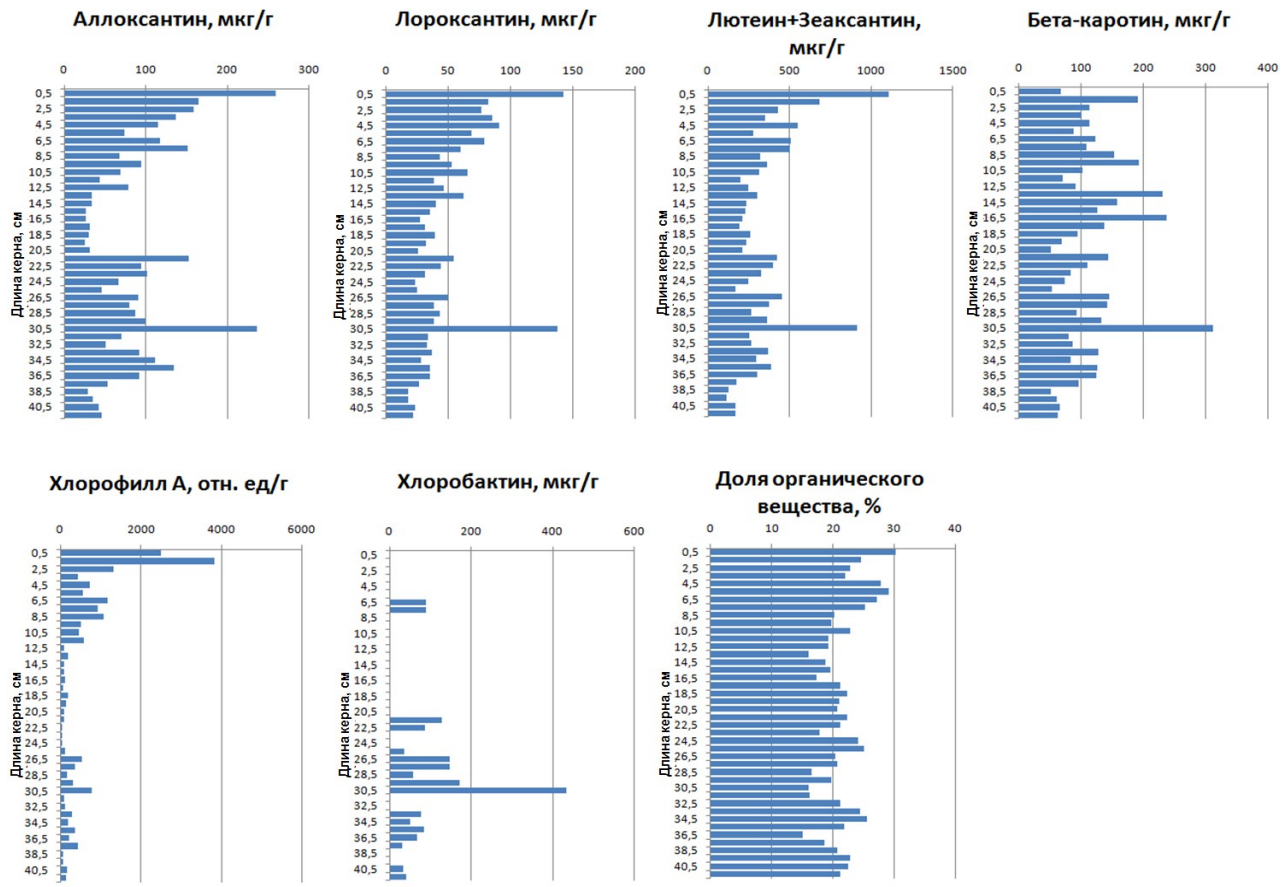


Рисунок 18 - Профили вертикального распределения каротиноидов в донных отложениях озера Утичье-3. По оси ординат указана глубина пробы, по оси абсцисс – концентрация пигментов в мкг/г органического вещества.

3.3Озеро Учум

В результате ВЭЖХ анализа фотопигментов из проб керна озера Учум были обнаружены следующие пигменты:

1. Аллоксантин, время выхода 7.1 мин. (рис. 19)
2. Лороксантин, время выхода 7.7 мин. (рис. 19)
3. Лютеин, время выхода 8.2 мин. (рис. 19)
4. Зеаксантин, время выхода 8.2 мин. (рис. 19)
5. Окенон, время выхода 13.1 мин. (рис. 19)
6. β-каротин, время выхода 21.2 мин. (рис. 19)
7. Хлорофилл А, время выхода 17,1 мин. (рис. 20)

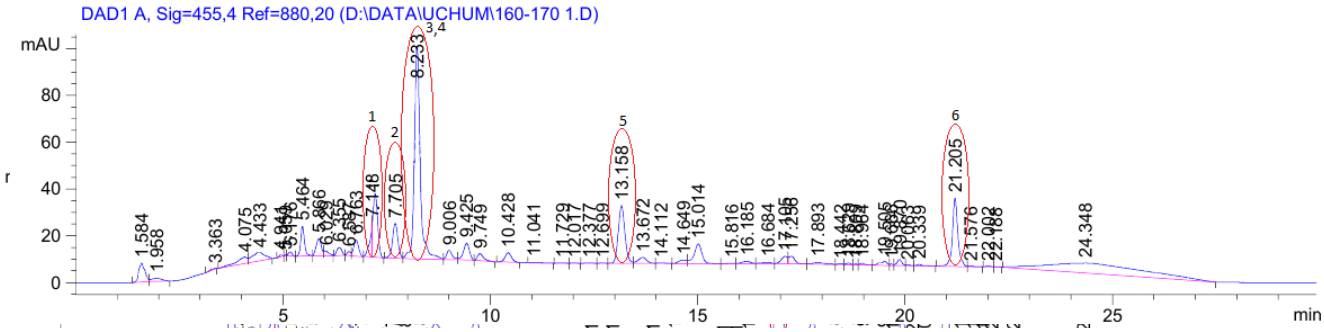


Рисунок 20 - Хроматограмма экстракта фотопигментов из донных отложений озера Учум, характерный пигмент – хлорофилл А, время выхода 17,5 мин. Сигнал DAD 455 нм, ширина оптической щели 4 нм, сравнительная длина волны 880 нм, ширина оптической щели 20 нм.

По полученным данным были построены профили вертикального распределения пигментов в донных отложениях озера Учум (рис. 21,22). Аналогично озеру Утичье-3, профили показывают смыв в озеро остатков растений с прилегающих территорий, присутствие зеленых водорослей, цианобактерий, криптофитовых на всем временном промежутке формирования керна. Синхронные пики указывают либо на хорошие условия жизни для сообществ, либо на хорошие условия сохранности для пигментов в данные периоды формирования керна. По содержанию окенона можно сказать, что на протяжении практически всего времени формирования исследованных участков керна в озере имелась сероводородная зона.

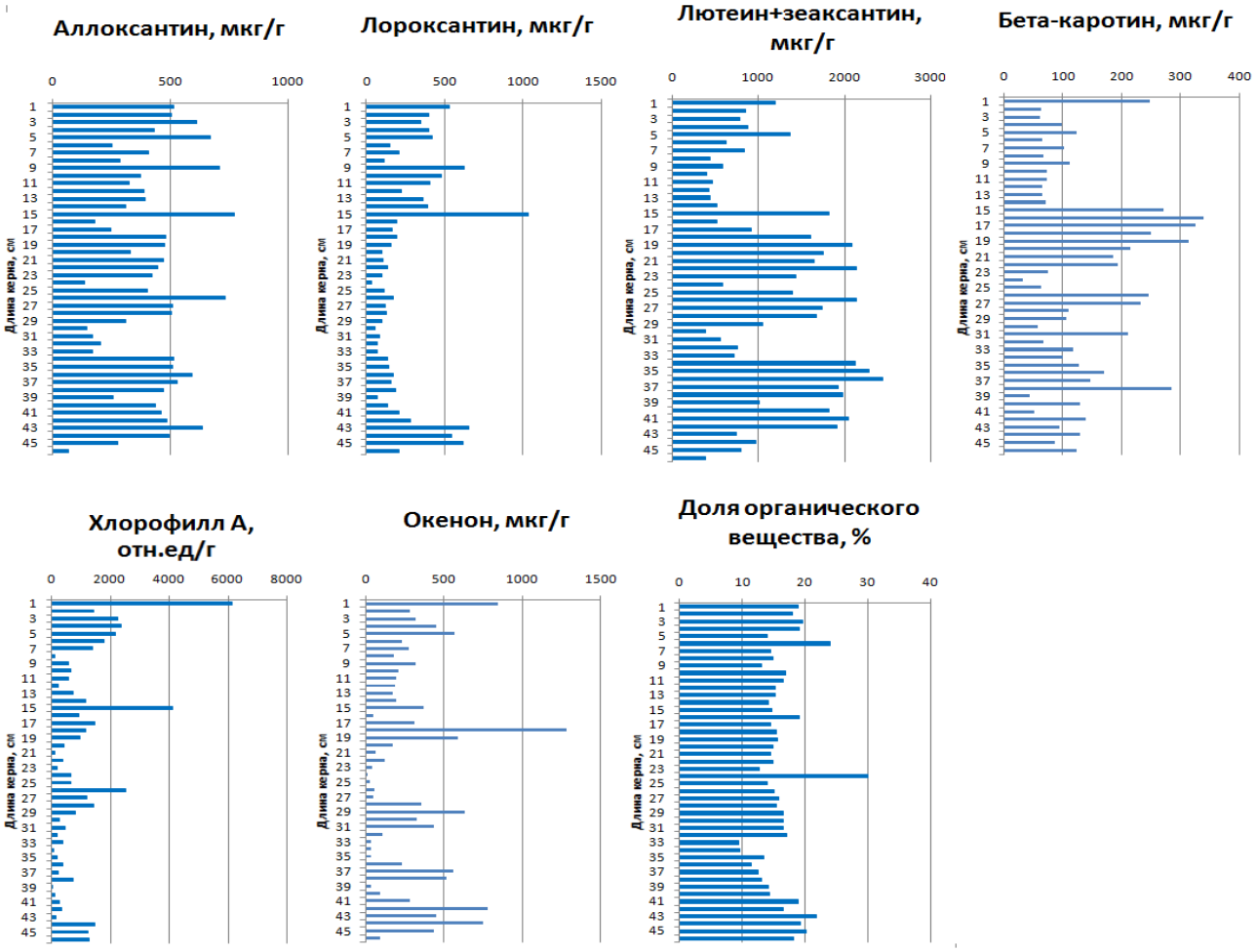


Рисунок 21 - Профили вертикального распределения каротиноидов в донных отложениях озера Учум. По оси ординат указана глубина пробы, по оси абсцисс – концентрация пигментов в мкг/г сухого вещества.

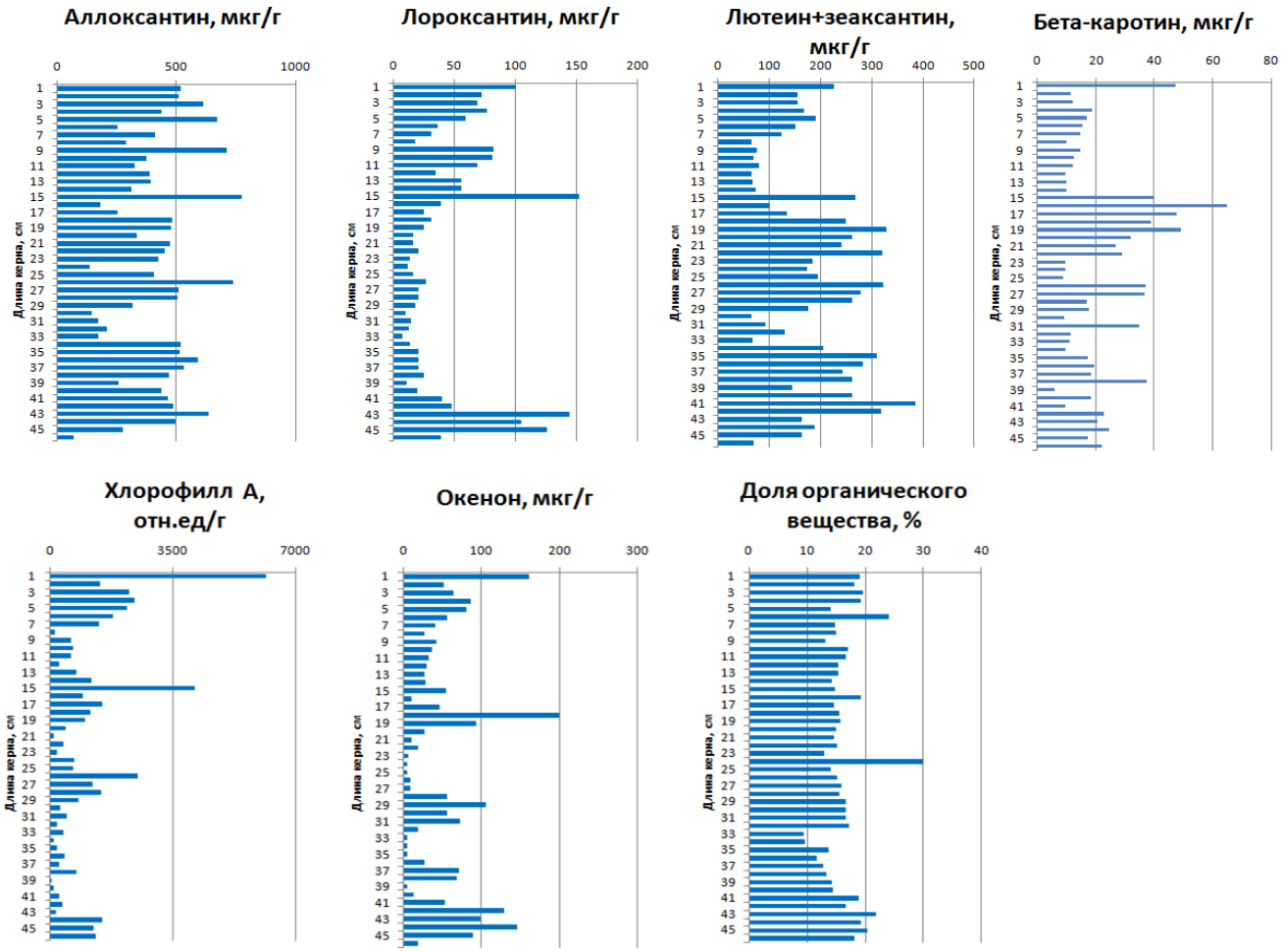


Рисунок 22 - Профили вертикального распределения каротиноидов в донных отложениях озера Учум. По оси ординат указана глубина пробы, по оси абсцисс – концентрация пигментов в мкг/г органического вещества.

Результаты

1. В кернах донных отлождений обоих озер были выявлены неравномерные распределения как фотосинтетических пигментов оксигенных организмов, характерных для любых водоемов, так и специфических пигментов фототрофных серных бактерий, характерных для водоемов с сероводородной зоной;
2. На всем исследованном участке керна донных отложений озера Учум присутствует окенон – специфический каротиноид пурпурных серных бактерий, населяющих озеро и в настоящее время;
3. На отдельных участках донных отложениий озера Утичье-3 обнаружен хлоробактин – специфический каротиноид зеленых серных бактерий, отсутствующих в озере в настоящее время.

Выводы

1. Наличие окенона на всех глубинах донных отложений свидетельствует, что озеро Учум было меромиктическим на всем исследуемом временном интервале;
2. Наличие хлоробактина в более древних слоях донных отложений озера Утичье-3 свидетельствует о более устойчивой стратификации озера, чем в настоящее время;
3. Неравномерное распределение всех пигментов свидетельствует об изменениях в экосистемах исследуемых озер на протяжении исследуемого периода.

Список литературы

1. *Каротиноиды фототрофных организмов в донных отложениях меромиктического озера Шира (Россия, Сибирь) как индикатор стратификации озера в прошлом.* **Д. Ю. Рогозин, В. В. Зыков, И. А. Калугин, А. В. Дарьин.** Докл. АН. - т. 439, № 2, с. 282-285.

2. *Эколого-геохимическое состояние оз. Утичье-3 и его окрестностей (республика Хакасия).* **Н.В. Архипова, В.П. Парначев, Н.А. Макаренко, Н.Г. Клопотова.**

3. *Stratification of lakes.* **Bertram Boehrer, Martin Schultze.**

4. **С.И. Кузнецов.** *Микрофлора озер и её геохимическая деятельность.* Ленинград : "Наука", 1970.

5. **В.М. Горленко, Г.А. Дубинина, С.И. Кузнецов.** *Экология водных микроорганизмов.* Москва : "Наука", 1977.

6. **Hutchinson, G.E.** *Treatise on Limnology, vol. 1. Geography, Physics and Chemistry.* New York : John Wiley and Sons, Inc., 1957.

7. **Wetzel, R.G.** *Limnology: Lake and River Ecosystems.* Calif. : 3rd ed. Academic. San Diego., 2001.

8. **Schlesinger, W.H.** *Biogeochemistry. Vol. 8 in: Treatise on Geochemistry.* Oxford, UK : Elsevier Science, 2005.

9. **Rawson D. S., Moore J. E.** *The saline lakes of Saskatchewan.* б.м. : Can. J. Res. Sect. D., 1944.

10. **Hammer, U.T.** *Life and times of five Saskatchewan saline meromictic lakes.* б.м. : Int. Rev. Gesamten Hydrobiol, 1994.

11. **Е.Н., Болдарева.** Аэробные аноксигенные фототрофные бактерии щелочных местообитаний.

12. **Truper, H. и Pfennig, N.** *Anoxygenic phototrophic bacteria. In: Bergey's manual of systematic bacteriology.* б.м. : Eds. Staley J.T. Bryant, Pfennig. N. and Holt. Baltimore: Williams and Wilkins. , 1989.

13. **Takaichi, S.** *Carotenoids and Carotenogenesis in Anoxygenic Photosynthetic Bacteria.* Netherlands : H. A. Frank, A. J. Young, G. Britton, R. J. Cogdell (Eds.)// The Photochemistry of Carotenoids.; Kluwer Academic Publishers., 1999.

14. **De Wit, R. и Van Gemerden, H.** *Growth and metabolism of the purple sulfur bacterium Thiocapsa roseopersicina under combined light/dark and oxic/anoxic regimens.* б.м. : Arch Microbiol, 1990.

15. **Шлегель, Г.** *Общая микробиология.* б.м. : Мир ., 1987.

16. **Е.Н., Кондратьева.** *Фотосинтезирующие бактерии и бактериальный фотосинтез.* б.м. : Издательство Московского Университета, 1972.

17. *Signature pigments of green sulfur bacteria in lower Pleistocene deposits from the Banyoles lacustrine area (Spain).* **N. Mallorquıґ, J.B. Arellano, C.M. Borrego and L.J. Garcia-Gil.**

18. lipidbank. [В Интернете] http://lipidbank.jp/.

19. *Сезонные изменения структуры сообщество аноксигенных фототрофных бактерий озера Шунет (Хакасия).* **Лунина, О. Н., и др.** 3, б.м. : Микробиология, 2007 г., Т. 76.

20. *Каротиноиды в донных отложениях озера Шира как палеоиндикатор для реконструкции состояний озера (Россия, Хакасия).* **В. В. Зыков, Д. Ю. Рогозин, И. А. Калугин, А. В. Дарьин, А. Г. Дегерменджи.** б.м. : Сибирский экологический журнал, 2012 г.

21. *Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton.* **S. W. Wright, S. W. Jeffrey, R. F. C. Mantoura, C. A. Llewellyn, T. Bjornland.**

22. Описание типа средста измерения. *Зонды гидрологические YSI 6600* . 2015 г.

23. **В.П. Семерной.** *Общая гидробиология.* Ярославль : Ярославский государственный университет, 2008.