

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт

Кафедра водных и наземных экосистем
кафедра

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

подпись инициалы, фамилия

« ____ » _____ 20 __ г

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Состав и содержание жирных кислот в биомассе протковой
ящерицы обитающей в прибрежной зоне водоема

Тема

Руководитель

подпись, дата

доцент, к.б.н. А. Е. Рудченко
должность, ученая степень, инициалы, фамилия

Выпускник

подпись, дата

Е.О. Богословская
инициалы, фамилия

Красноярск, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ	3
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Структура классификация и физиологическое значение жирных кислот в организме человека и животных.....	6
1.2 Жирные кислоты в трофических сетях внутренних водоемов.....	9
1.5 Характеристика объекта исследования.....	15
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	17
2.1 Район работ	17
2.2 Методика пробоподготовки образцов для проведения хроматографического анализа	17
2.3 Газовая хроматография и масс-спектрометрия.....	19
2.4 Статистическая обработка данных.....	20
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	Ошибка! Закладка не определена.
3.1 Питание прыткой ящерицы в прибрежной зоне озере Шира	Ошибка! Закладка не определена.
Рисунок 3 – Состав содержимого желудков (в % по массе) прытких ящериц отловленных в прибрежной зоне оз. Шира (июль, 2019; n - 7)	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Состав и содержание жирных кислот в мышечной ткани прыткой ящерицы	Ошибка! Закладка не определена.
3.3 Содержание полиненасыщенных жирных кислот в мышечной ткани прыткой ящерицы.....	Ошибка! Закладка не определена.
ВЫВОДЫ.....	22
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	23
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	24

ВВЕДЕНИЕ

Жирные кислоты выполняют множество необходимых функций для жизнедеятельности организма. Начиная от построения биомембран, заканчивая липидными медиаторами и передатчиками биологических сигналов. Так же жиры выполняют запасующую функцию, так как при распаде выделяют огромное количество энергии (Васьковский, 1997).

Самыми необходимыми являются полиненасыщенные жирные кислоты, потому что синтезировать их способны не все организмы. Основная масса этих жирных кислот синтезируется в водных экосистемах динофитовыми и диатомовыми водорослями (Гладышев, 2012).

Для человека и других позвоночных некоторые ПНЖК являются незаменимыми, то есть могут поступать только с пищей (Гладышев, 2012). Так же, для человека даже разработана система специальных дозировок, которые зависят от возраста и индивидуальных особенностей организма. Здоровый человек от 18 до 59 лет ежедневно должен потреблять 0,8-1,5 г (800-1 500 мг) жирных кислот. После 70 рекомендовано ежедневно принимать 1,5-2 г жирных кислот (Bell and Tocher, 2009).

Основные пути выноса водного органического вещества это водные птицы, прибрежные хищники, амфибионтные насекомые и океанический дрейф (Gladyshev et al. 2009). Но, дальнейшее перемещение жирных кислот по наземным цепям питания практически неизвестно.

Для нашего исследования была выбрана прыткая ящерица *Lacerta agilis* **Linnaeus, 1758**, поскольку она имеет широкий ареал обитания и часто встречается рядом с человеком (Чупров, 2013). Так же, по литературным данным известно, что прыткая ящерица входит в состав рациона хищных птиц таких как пустельга (Ganbold et al., 2017).

Одни из основных вопросов, которые мы хотим рассмотреть это будет ли отличаться жирнокислотный состав у ящериц с прибрежных территорий разных озер. И второе это будет ли жирнокислотный состав мышечной ткани ящериц из прибрежных зон отличаться от ящериц из степного биотопа.

Цель: Определить состав и содержание жирных кислот в мышечной ткани прытких ящериц (*Lacerta agilis* Linnaeus, 1758) обитающих в прибрежных зонах и вдалеке от водоема.

Задачи

1. Определить состав жирных кислот в мышечной ткани ящериц, обитающих в прибрежной зоне разных водоемов

2. Сравнить состав жирных кислот мышечной ткани ящериц, обитающих в прибрежной зоне и вдали от водоема

3. Определить количественное содержание длинноцепочечных ПНЖК в мышечной ткани ящериц из прибрежных и степных местообитаний.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Структура классификация и физиологическое значение жирных кислот в организме человека и животных

Липиды выполняют огромное количество функций в организме такие как: главные компоненты биомембран, наиболее калорийная часть пищи и важная составляющая пищевого рациона животных и человека, так же запасующая функция, так как липиды при распаде выделяют огромное количество энергии (Васьковский, 1997). Кроме того, переносчики ряда витаминов, регуляторы транспорта солей и воды, иммуномодуляторы, регуляторы активности некоторых ферментов, липидные медиаторы и передатчики биологических сигналов - это тоже липиды (Васьковский, 1997).

Но начнем с определения того, что же все таки такое - липиды? «Липиды -это жирные кислоты и их производные». В таком случае следующее определение которое нам понадобится, что же такое жирные кислоты (ЖК)? Если начинать сначала и вспоминать химию, то жирные кислоты это алифатические монокарбоновые кислоты, которые имеют формулу $R - COOH$. Однако с ЖК все не так просто, на самом деле их достаточно большое количество и они занимают очень важное место во всех живых организмах (Васьковский, 1997).

Рассмотрим классификацию жирных кислот. Все ЖК делятся на две группы: насыщенные(НЖК) - в цепях которых нет двойных связей, и ненасыщенные, которые содержат одну и более двойных связей. Ненасыщенные ЖК в свою очередь делятся еще на две группы: мононенасыщенные жирные кислоты (МНЖК), которые содержат одну двойную связь и полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), содержащие две и более двойных связей (Рудченко, 2018).

Номенклатура названий ЖК достаточно простая, допустим возьмём кислоту 16:1n-7, здесь 16 это количество атомов углерода в цепи, 1n -

количество двойных связей (в данном случае в соединении одна двойная связь), а 7 - это место расположения двойной связи, то есть двойная связь находится после седьмого атома углерода от метильной группы (Васьковский, 1997; Рудченко, 2018; Bell et al., 2008). Если же двойных связей несколько, как например в линолевой кислоте 18:2n-6, то 6 будет обозначать место двойной связи, которая находится ближе всего к метильной группе(Васьковский, 1997; Рудченко, 2018; Bell et al., 2008).

В организме животных и человека ЖК могут находиться как в свободном, так и связанном состоянии, то есть входят в состав триацилглицеринов (ТАГ) и фосфолипидов (ФЛ).(Рудченко, 2018; Васьковский, 1997).

В организме млекопитающих ТАГи в основном встречаются в адипоцитах, липопротеинах и липидных каплях в разнообразных органах и тканях. Основная функция ТАГ это источник энергии, в нужный момент происходит окисление и высвобожденная энергия в виде АТФ высвобождается (Васьковский, 1997). Помимо источника энергии, ТАГ так же является источником биоактивных метаболитов, которые могут функционировать в качестве кофакторов транскрипции и ферментных реакций (Рудченко, 2018).

Главная функция ФЛ - структурная, именно они являются главными элементами мембран животных клеток. Жирные кислоты в составе фосфолипидов участвуют в огромном количестве мембран-зависимых метаболических процессов, в том числе и в составе сигнальных молекул (Рудченко, 2018).

Двойные связи в молекулу ЖК вставляют специальные ферменты -десатуразы, каждая из которых способна вставить двойную связь в строго определенное место. Как например десатураза $\Delta 9$ (читается как «дельта 9») присоединяет двойную связь к девятому атому молекулы считая с карбонильного конца молекулы. Наличие и отсутствие различных десатураз у живых организмов объясняется генотипом. Так например высшие растения

и водоросли способны синтезировать ЖК с двойными связями в положениях n-6 и n-3, значит они имеют гены кодирующие десатуразы $\Delta 15$ и $\Delta 12$ соответственно. Но, к сожалению, позвоночные животные не способны кодировать эти десатуразы, то есть не могут синтезировать ЖК с двойными связями в 3 и 6 положении от метильного конца молекулы (Гладышев, 2012; Bell et al., 2009). ПНЖК которые необходимы организму, но при этом не синтезируемые им называются незаменимыми. К таким относят 18-ти атомные кислоты семейств n-3 и n-6 (омега-3 и омега-6), линолевая кислота с двумя двойными связями ($18:2n-6$) и альфа-линоленовая кислота с тремя двойными связями($18:3n-3$), которые часто обозначают аббревиатурами ЛК и АЛК соответственно. Животные и человек могут получать ЛК и АЛК только с пищей (Гладышев, 2012).

Основная роль ЛК и АЛК состоит в том, что они являются биохимическими предшественниками физиологически значимых длинноцепочечных жирных кислот, состоящих из 20-22 атомов углерода. Такие ПНЖК называют частично незаменимыми к ним относятся такие жирные кислоты, как арахидоновая (эйкозатетраеновая) кислота ($20:4n-6$ АРК), эйкозапентаеновая кислота($20:5n-3$ ЭПК) и докозагексаеновая кислота ($22:5n-3$ ДГК). Как было сказано ранее, только растения имеют десатуразы $\Delta 12$ и $\Delta 15$ и способны синтезировать исходные ПНЖК ЛК И АЛК (Гладышев, 2012).

АРК, ЭПК и ДГК вместе с остальными жирными кислотами входят в состав фосфолипидов клеточных мембран (Гладышев, 2012). Самая важная функция АРК и ЭПК, состоит в том, что они биохимические предшественники синтеза липидных медиаторов – эйкозаноидов (Bell et al., 2009). Из ЭПК синтезируются простагландины и тромбоксаны третьей серии, которые снижают артериальное давление. Так же из ЭПК образуются PG-3, которое обладает противовоспалительным эффектом и LT-5, который является антиаллергеном (Гладышев,2012).

Поскольку, как мы выяснили ранее, человек не способен производить важные ПНЖК, то должен получать их вместе с пищей. Учитывая, что в разном возрасте и при разном состоянии здоровья человеку нужно разное количество ПНЖК, то разработана система дозировок необходимых ЖК.

Здоровый человек от 18 до 59 лет ежедневно должен потреблять 0,8-1,5 г (800-1 500 мг) жирных кислот. После 70 рекомендовано ежедневно принимать 1,5-2 г жирных кислот. Определяя норму в день ненасыщенных жирных кислот для детей, нужно брать во внимание не только возраст, а и индивидуальные особенности (вес, энергетическую ценность употребляемой пищи) (Bell and Tocher, 2009). Всемирная организация здравоохранения рекомендуют потреблять 0,5 - 1 г ЭПК+ДГК в сутки (или 2 - 3 порции жирной рыбы в неделю) для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний и расстройств (Гладышев, 2012).

1.2 Жирные кислоты в трофических сетях внутренних водоемов

Известно, что длинноцепочечные ПНЖК семейства n-3, а именно ЭПК и ДГК являются незаменимыми физиологически ценными компонентами для всех животных, включая человека. Животные способны синтезировать ЭПК и ДГК из АЛК, однако скорость синтеза очень низкая и может обеспечить лишь 5% их физиологических потребностей (Гладышев, 2012, Махутова и др., 2014). Эффективно синтезировать ЭПК и ДГК в больших количествах способны лишь некоторые микроводоросли. Так, основным источником ЭПК в водных экосистемах являются диатомовые водоросли, способные синтезировать эту ЖК в больших количествах (Taipale et al., 2013). Динофитовые водоросли считаются главным продуцентом ДГК (Сущик, 2008). От водорослей ЖК передаются по пищевым цепям к организмам высших трофических уровней. Таким образом, водные экосистемы являются главным источником незаменимых ПНЖК для большинства животных,

включая всеядных и хищных обитателей наземных экосистем (Махутова и др., 2014).

Разные группы водорослей способны продуцировать не только важные для человека ПНЖК. Так диатомовые водоросли синтезируют в большом количестве такие ЖК как, 16:1n-7, 16ПНЖК с положением двойных связей n-7, n-4, n-1 (Sushchik et al., 2007). Зеленые водоросли синтезируют 16 ПНЖК серий n-6 и n-3. ЖК - 18:2n-6 и 18:3n-3 в больших количествах синтезируют цианобактерии и зеленые водоросли, а 18:4n-3 – динофитовые (Сущик, 2008). Кроме того, бактериопланктон в водоемах может синтезировать такие ЖК как, 18:1n-7 и C15-17 ЖК с разветвленной цепью атомов углерода (C15-17 РЖК) (Napolitano, 2009). Способность этих групп организмов синтезировать определенные ЖК используют для изучения питания гидробионтов. Если в биомассе консумента, особенно в мышечной ткани, накапливаются кислоты которые синтезирует определенная группа организмов, это свидетельствует о наличии этого организма в цепи питания консумента (Kelly and Scheibling, 2012).

1.3 Жирные кислоты в наземных трофических сетях

Жирные кислоты семейств омега-3 и омега-6 ПНЖК необходимы для многих животных и человека в том числе. В отличие от растений и высших грибов, у животных нет десатураз, которые нужны для синтеза ПНЖК. Главными предшественниками ЭПК и ДГК являются ленолевая и α -линоленовая кислоты, но у всеядных животных и человека только 5% этих кислот превращаются в ЭПК. Регулярное потребление ЭПК и ДГК может способствовать росту и здоровью потребителей (Ruess et al., 2019).

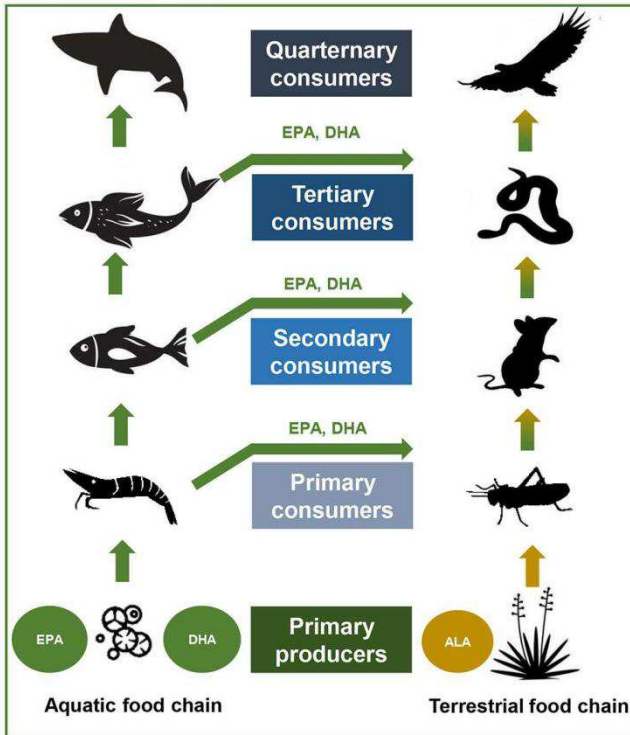
Поскольку как говорилось ранее, водные экосистемы истощаются (Гладышев, 2012), поэтому потребление ПНЖК, которые были синтезированы искусственно, полезно для человека. Так же, ПНЖК является неотъемлемой частью биологических мембран и поддерживают

соответствующую вязкость и избирательную проницаемость. Кроме того, γ -линоленовая кислота (ГЛК 18: 3 ω 6), арахидоновая кислота (АРК 20: 4 ω 6) и ЭПК служат в качестве предшественников тканевых гормонов, таких как эйкозаноиды, которые опосредуют воспалительные процессы, иммунный ответ или клеточный рост. Кроме того, ЭПК и ДГК концентрируются в нервной ткани, являясь доминирующими жирными кислотами головного мозга (Ruess et al., 2019).

До сих пор игнорируемый источник омега-3 ПНЖК в наземных экосистемах - это почвенная фауна (Рисунок 1). Весь набор десатураз и элонгаз для производства омега-3 ПНЖК встречаются у нематод *Caenorhabditis elegans*. Недавние молекулярные исследования доказали наличие десатуразы ω 3 ЖК ферменты в нескольких других таксонах свободноживущих почвенных нематод, а также у наземных олигохет и насекомых. Доля ЭПК в общем количестве жирных кислот составляет 3,5% для свободноживущих почвенных нематод, и выше до 17,4% для корма *Collembola*. В частности, дождевые черви (их тело, кишечник и норы) являются богатым источником Омега-3 ПНЖК, ЭПК составляет 7,5 раз выше, чем в насыпной почве. Это представляет собой значительный источник независимо от того, являются ли эти ПНЖК синтезированными самим животным или микробиотой кишечника.

По сравнению с водными пищевыми сетями, ЭПК, похоже, избирательно удерживается в пищевых цепях разложителями почвы, как предполагается встречаются у высших хищников, таких как многоножки и пауки. В общем, есть достаточно доказательств того, что подземная биота создает центральные отложения необходимых Омега-3 ПНЖК, которые могут подпитывать более высокие трофические уровни над землей (Рисунок 1) (Ruess et al., 2019).

Common opinion



Hypothesis

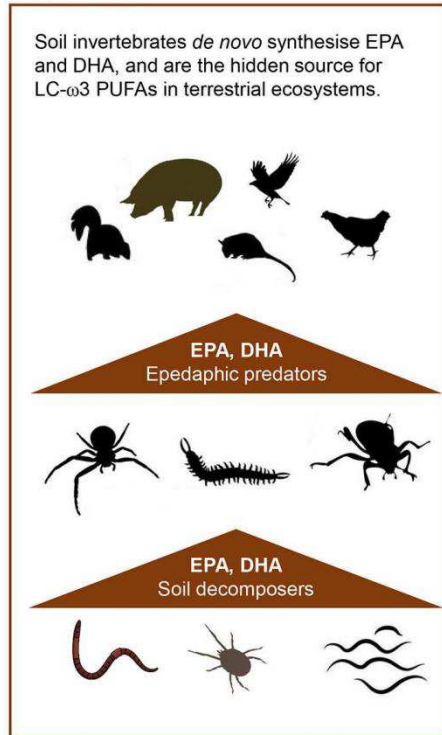


Рисунок 1 - Предполагаемое происхождение длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот в наземных экосистемах. Слева - переход на сушу через разные трофические уровни; справа - деструкторы почвы. Изображение предоставлено: <https://vecteezy.com>.

Остается вопрос, если все позвоночные требуют ЭПК и ДГК для выживания, почему они не развили универсальную способность синтезировать эти соединения или, наоборот, почему мы ее потеряли? Вероятно, это связано с доступом к водным ресурсам. Например, морским млекопитающим требуется более высокое содержание ЭПК и ДГК, чем скоту, чтобы выжить. Таким образом, способность синтезировать ЭПК и ДГК, вероятно, связана с доступом к этим ПНЖК. Организмы, не имеющие доступа к водным ресурсам, богатым ЭПК и ДГК вероятно, имеют лучшую способность синтезировать эти кислоты, в то время как те, кто имеет доступ к водным ресурсам имеют очень ограниченные возможности, потому что они доступны и потребляются с пищей. Люди, например, могли эволюционировать одновременно с доступностью в рационе ПНЖК из

водных ресурсов, так как наша способность синтезировать ЭПК и ДГК очень низкая. Основа береговой гипотезы эволюции человеческого мозга предполагает устойчивый доступ определенных групп ранних *Homo* к водным источникам пищи, которые были ключом к развитию человеческого мозга (Nixson et al., 2015).

И наоборот, выпас наземных млекопитающих, которые обычно не потребляют водные ресурсы или живут рядом с водными экосистемами все еще содержат заметное содержание ДГК в головном мозге, например, олень (8,9% общих жирных кислот), лось (9,6%), зебра (18%) и слон (25%), что предполагает, что эти организмы синтезируют ДГК из АЛК. Подводя итог, необходимость синтеза ЭПК и ДГК зависит от уровня доступа к предварительно сформированной ЭПК и ДГК в рационе. Это также указывает на то, что, возможно, независимо от среды обитания и трофических уровней, существуют очень сильные внутренние факторы в определенных таксонах, которые контролируют структуру их жирных кислот, посредством эндогенного синтеза некоторых жирных кислот, а именно ЭПК и ДГК (Nixson et al., 2015).

Доступность богатых источников ЭПК и ДГК имеет решающее значение для многих наземных позвоночных, время и количество также могут иметь значение. Например, известно, что кулики потребляют омега-3 ПНЖК для миграции на большие расстояния, то есть эти ЖК используются как «вещества, повышающие производительность», чтобы подготовить мышцы к миграции (Colombo et al., 2016).

1.4 Пути переноса жирных кислот из водных экосистем в наземные

В современном мире выявлено несколько путей выноса жирных кислот. На первом месте стоят водные птицы, поскольку обладают самым большим

объемом выносимого вещества, затем следуют амфибионтные насекомые, океанический дрейф и прибрежные хищники (Gladyshev et al. 2009).

Поскольку амфибионтные насекомые являются вторыми по объему выноса ЖК из водных экосистем в наземные, после водных птиц (Gladyshev et al. 2009), необходимо рассмотреть пути их распространения вокруг водоемов, чтобы знать на каком расстоянии они будут попадать в кормовую базу приткой ящерицы.

Рассмотрим распространение комаров-звонцов озера Ши́ра. Известно, что звонцы имеют несколько пиков вылета с конца мая до начала июля, которые обусловлены разной глубиной нахождения личинок (от 1 до 6 метров). Суммарный годовой вылет имаго хирономид из соленого оз. Ши́ра был около $0.5 \text{ г сухой массы} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{год}^{-1}$. Средневзвешенный поток ПНЖК, составил $1.78 \text{ мг} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{год}^{-1}$. Наиболее вероятно, что очень малая величина экспорта ЭПК и ДГК обусловлена низкой продуктивностью изученного степного озера, а также относительно коротким сибирским вегетационным сезоном (Борисова и др. 2019).

Хирономиды разных родов имеют разное распространение от места выплода. Например, представители родов *Glyptotendipes* и *Polypedilum* (~95 % от общей численности), среднее расстояние разлета хирономид от мест выплода для 50 % особей популяции составляет 13.3 м. Так же, известно, что разные виды со схожей морфологией крыла и размером тела, могут использовать разные методы перемещение, как активный полет, так и пассивное перемещение ветром. А представители рода *Chironomus*, которые обладают крупными размерами, способны распространяться вокруг водоема или водотока на расстояние более 300 метров, при поиске мест, подходящих для роения (Витковская и др. 2019).

1.5 Характеристика объекта исследования

Объектом данного исследования являлась прыткая ящерица *Lacerta agilis* **Linnaeus, 1758**. Прыткая ящерица имеет обширный ареал обитания, статьи по этому виду можно найти с привязкой из разных мест, Урал, Забайкалье и Прибайкалье, Волжский бассейн, Крымские заповедники, ну и конечно же Красноярский край (Щепина, 2009; Котенко и др., 2010; Литвинов, 2008; Галицын, 2012).

Считается достаточно крупной ящерицей длина тела без хвоста составляет около 11 см, а с хвостом достигает и 30 см. Окраска в основном бурая, желтовато-бурая или серовато-бурая. Основное отличие в том что по бокам тела идут две светлые (иногда прерывистые) полосы, а вдоль спины темная, часто прерывистая полоса. Самцы чаще окрашены в зеленоватый или серовато-зеленоватый цвет, а брюхо и внутренняя поверхность бедер окрашены в оранжевый или красновато-кирпичный цвет с мелкими темными пятнами. У самок брюхо светлое или желтоватое. Молодые ящерицы в отличии от взрослых имеют более темную окраску (Чупров, 2013).

Наиболее предпочитаемыми в рационе прыткой ящерицы считаются представители класса Aranei, личинки насекомых и отряд Coleoptera. Наименее популярными оказались представители отряда Lepidoptera и Diptera (Кулагина и др. , 2001).

Репродуктивный размер самок составляет 69,0-85,6 мм. Откладка яиц происходит со II декады июня по I декаду июля. В кладках от 2 до 8 яиц размером (10,2-17,7) (7,2-10,3) мм. С увеличением числа яиц в кладке снижается их длина ($r=-0,53$). Инкубацию яиц осуществляли в аппарате при температуре 28-30°C. Инкубация в искусственных условиях длится 42-54 сут, однако отмечен единичный случай развития яйца от откладывания до

вылупления на протяжении 78 суток, который может свидетельствовать о возможности замедления эмбрионального развития. Длина тела молоди при вылуплении составляет 29,6-34,8 мм, а масса 0,67-0,97 г. (Кидов и др., 2017).

Прыткая ящерица предпочитает в основном сухие и остепненные участки, в пригородской зоне их можно встретить на обочинах дорог. Считается более активной и подвижной по сравнению с живородящей ящерицей. Благодаря своей окраске практически не заметна в траве. Что характерно для рептилии, наиболее активна днем и степень активности зависит от температуры окружающей среды (Чупров, 2013).

Обычно выбор ящерицей места обитания во многом зависит от освещенности, влажности, высоты снегового покрова, определяющего промерзание почвы, температурных условий, наличия корма и убежищ, величины покрытия и высоты травостоя, характера почвы биотопа. Хорошо уживается рядом с человеком, на огородах, вблизи ферм или искусственных насыпей (Ручин и др. 2009).

Ящерицы довольно территориальные животные, площадь их индивидуальных участков доходит до 900 м² у самок и до 150 м² у самцов. Но при этом, ящерицы способны мигрировать на небольшие расстояния вслед за кормовыми объектами (Власова и др. 2013).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Район работ

1) Стационар института биофизики на озере Шира (Республика Хакасия, район поселка Жемчужный) ($54^{\circ}30'$ СШ, $90^{\circ}11'$ ВД) расположен в Республике Хакасия (Южная Сибирь), в 15 км от районного центра п. Шира. Озеро имеет эллиптическую форму 9.35×5.3 км, площадь водной поверхности 35.9 км², средняя глубина 11.2 м, максимальная глубина 24 м (2007–2009). Озеро замерзает в конце ноября, освобождается ото льда в мае. В настоящее время водоем является меромиктическим, средняя соленость в миксолимнионе в период летней стратификации 2002–2012 гг. составляла около 15 г л⁻¹, а в монимолимнионе – около 19 г л⁻¹ (Рогозин и др., 2016). Озеро Учум это соленое озеро закрытого бассейна расположено на юге Сибири (Красноярский Край, Россия) в 90 км к северу от озера Шира. Это небольшое озеро имеет овальную форму ($1,5 \times 4$ км); максимальная глубина не превышает $7,9$ м (2015 г.). Общая соленость в эпилимнионе около 24 г / л, в гиполимнионе - около 34 г / л (Belolipetskii et al., 2019).

2.2 Методика пробоподготовки образцов для проведения хроматографического анализа

Ящерицы отлавливались методом ловчих канавок и вручную.

Ловчие канавки представляют собой вырытые в земле траншеи длиной от 5 до 10 метров, шириной не менее 20 -ти сантиметров и глубиной около 40 - 50 сантиметров. Так же, для большего удобства сбора материала в дно траншеи вкапывались 5 -ти литровые пластиковые бутылки с отрезанным дном, расстояние между бутылками примерно $1,5$ метра. Попавшие в бутылки животные уже не могли выбраться.

Для отлова ящериц были выкопаны три траншеи длиной 5, 7 и 10 метров. Одна траншея была выкопана вдоль ручья (5 метров), вторая на склоне холма в отдалении от озера, а третья на берегу озера Шира примерно в 20-ти метрах от берега. Траншеи проверялись несколько раз за день примерно каждые четыре часа.

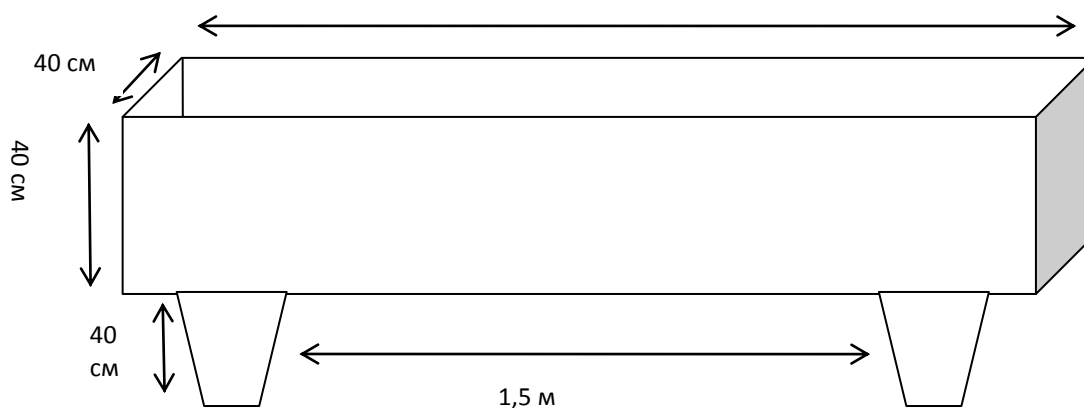


Рисунок 2 - Схема траншеи для ловли ящериц.

После отлова ящерицы были помещены в стеклянную банку вместе с ваткой смоченной в эфире. Затем производилось вскрытие, извлекались грудные и бедренные мышцы. Часть из них была помещена в раствор хлороформ-этанола для последующей газовой хроматографии, другая часть сушилась в фольге для анализа стабильных изотопов углерода и азота. Также извлекался желудок для анализа питания. Пробы, желудки и оставшиеся тушки были заморожены и в замороженном виде доставлены в лабораторию.

Всего для исследования ЖК состава было отобрано: 15 образцов мышечной ткани ящериц, отловленных по 5 особей с озер Шира, Учум и с территорий удаленных от водоемов (Таблица 1).

Таблица 1 - Характеристика отобранных проб.

Вид	Водоем	Удаление от водоема	Дата отбора	Выборка, экз.
Ящерица прыткая	Озеро Шира	0-100 м	23-27 июня 2020г.	6
		500-1000 м	23-27 июня 2020г.	5
	Озеро Учум	0-100 м	24 июня 2020г.	5

Для подготовки проб к газовой хроматографии была проведена экстракция липидов из тканей. Для этого ткани гомогенизировались в смеси растворителя (2:1 по объему хлороформ:этанол), обезвоживались (пропусканием через слой NaSO_4). Перед экстракцией в пробу добавляем внутренний стандарт (метиловый эфир 19:0, 2 мг/мл) для количественного определения липидов.

После удаления растворителей (на роторном испарителе) проводили двойной метанолиз (10 мин в щелочной среде с 8% NaOH в метаноле при 95°C , потом 10 мин в кислой среде с 3% H_2SO_4 в метаноле при 95°C). На этом этапе происходит переэтерификация сложных липидов с образованием летучих и термостабильных метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК). После метанолиза пробы отмывались гексаном и раствором NaCl (33%). Гексан с растворенными в нем МЭЖК отделяли от реакционной смеси в делительной колонке. Из очищенного экстракта выпаривали гексан на роторном испарителе (35°C).

2.3 Газовая хроматография и масс-спектрометрия

Газовая хроматография (ГХ) – вид хроматографии, в которой подвижной фазой служит газ (пар). Разделение компонентов в ГХ основано

на различии скоростей движения и размывания концентрационных зон исследуемых веществ, движущихся в потоке газовой фазы относительно слоя неподвижной фазы, причем эти вещества распределены между обеими фазами (Волова и др., 2012).

Масс-спектрометрия – это физико-химический метод измерения отношения массы ионов к их заряду. Приборы, которые используют в этом методе, называются масс-спектрометрами или масс-спектрометрическими детекторами, которые имеют дело с материальным веществом, состоящим, как известно, из мельчайших частиц – молекул и атомов. Масс-спектрометры устанавливают молекулярную массу вещества, ее атомарный и изотопный состав, а также пространственную структуру расположения атомов (Волова и др., 2012).

Масс-спектрометрия предоставляет сведения о молекулярной массе, элементном составе и других особенностях структуры, и позволяет рассматривать молекулу как субстанцию в целом. Полученные спектры сравниваются с уже зарегистрированными в базах данных и при совпадении идентифицируется без интерпритации масс-спектра. Эффективность таких масс-спектральных баз особенно высока, когда обнаруживается совпадение, в противном же случае возникает необходимость в интерпритации масс-спектра для установления его структуры (Заикин и др. 2001).

Определение состава МЭЖК из мышечной ткани ящериц проходило на газовом хроматографе, оснащенный спектрометрическим детектором (модель 6890/5975С; AgilentTechnologies, SantaClara, USA) и капиллярной колонкой HP-FFAP (длина колонки 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм).

2.4 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку проводили с помощью программ MicrosoftExcel и Statistica 9.0. Для характеристики материала использовалась описательная статистика, для всех показателей были рассчитаны средние

значения и стандартные ошибки средней SE. Состав жирных кислот в исследуемых образцах проводился с применением однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и мультивариантного анализа методом главных компонент.

ВЫВОДЫ

1. Мышечная ткань прыткой ящерицы, обитающей в прибрежной зоне водоемов (оз. Шира и оз. Учум) содержала высокие проценты жирных кислот водного происхождения (16:1n-7, 20:5n-3 - диатомовые водоросли).

2. Процентное содержание жирных кислот – биомаркеров диатомовых водорослей (16:1n-7, 20:5n-3) было достоверно выше у прыткой ящерицы, обитающей в прибрежной зоне оз. Учум.

3. В составе жирных кислот прыткой ящерицы из степного местообитания были обнаружены достоверно более высокие уровни жирных кислот, источниками которых были наземные экосистемы (18:1n-9, 18:2n-6), тогда как жирнокислотный состав прибрежных ящериц содержал больший процент жирных кислот водного происхождения (16:1n-7, 20:5n-3).

4. Содержание длинноцепочечных ПНЖК (ЭПК+ДГК) в мышечной ткани прыткой ящерицы, обитающей в прибрежной зоне оз Шира и оз. Учум составил $2,7 \pm 0,1$ мг /г и $3,1 \pm 0,1$ мг/г соответственно. Содержание ЭПК и ДГК в мышечной ткани прыткой ящерицы из степного биотопа было достоверно ниже и составило $1,3 \pm 0,1$ мг/г.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АЛК - альфа-линоленовая кислота

АРК - арахидоновая кислота

ДГК - докозагексаеновая кислота

ЖК - жирные кислоты

ЛК- линолевая кислота

МЭ - метиловый эфир

МЭЖК - метиловые эфиры жирных кислот

НЖК - ненасыщенные жирные кислоты

ПНЖК - полиненасыщенные жирные кислоты

ТАГ - триацилглицерины

ФЛ - фосфолипиды

ЭПК - эйкозапентаеновая кислота

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Борисова Е.В. Вылет хирономид (Chironomidae, Diptera) из соленого озера как источник органического углерода и незаменимых биохимических веществ для аридных экосистем юга Сибири// Е.В. Борисова, А.П. Толмеев, А.В. Дроботов, Н.Н. Сущик// Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Биология. - Т. 12. - №2. - 2019. - Стр. 196-215.
2. Васьковский В.Е. Липиды / В.Е. Васьковский // Соровский образовательный журнал №3 -1997. -32 - 37.
3. Витковская И.А. Распределение комаров-звонцов (Chironomidae, Diptera) на суше при вылете имаго из соленого озера Шира//И.А. Витковская, Е.В. Борисова , Н.Н. Сущик// Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Биология. - Т. 12. - №2. - 2019. - Стр. 216-226.
4. Волова Т.Г. Современная аппаратура и методы биологических систем. Большой практикум / Т. Г. ВоловаП. В. Миронов,С. В. Прудникова; Е. В. Немцева,Т. А. Зотина; А. С. Барон, Т. Н. Субботина; Н. Н. Сущик, А. Ю. Кучкина; А. Я. Болсуновский Д. Ю. Рогозин,Д. В. Дементьев;И. В. Исаков // Сибирский федеральный университет институт биофизики СО РАН - 2012. - Стр. 275-289.
5. Галицын Д.И. Пространственное распределение и морфология прыткой ящерицы Среднего Урала / Д.И. Галицын // Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина - 2012. - Стр. 100-104.
6. Гладышев М.И. Незаменимые полиненасыщенные жирные кислоты и их пищевые источники для человека/М.И. Гладышев// Институт биофизики СО РАН - 2012., Стр. 352-386

7. Заикин В.Г. Основы масс-спектрометрии органических соединений// В.Г. Заикин, А.В. Варламов, А.И. Микая, Н.С. Простаков// МАИК «Наука/Интерпериодика». - 2001.
8. Кидов А.А. Размножение прыткой ящерицы (*Lacerta Agilis* L.) на Ставропольской возвышенности / А.А. Кидов, К.А. Матушкина // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии - №4. - 2017. Стр - 56-69.
9. Котенко Т.И. Аннотированные списки земноводных и пресмыкающихся заповедников Крыма / Т.И. Котенко, О.В. Кукушкин // Научные записки природного заповедника «Мыс Мартьян» - 2010. - Вып. 1. - Стр. 225-261.
10. Кулагина Л.С. Некоторые аспекты питания прыткой ящерицы (*Lacerta agilis*) на Южном Урале / Л.С. Кулагина, В.Ф. Хабибуллин // Биоразнообразие и биоресурсы Урала и сопредельных территорий - 2001. - Стр. 281-282.
11. Литвинов Н.А. Температура тела и микроклиматические условия обитания рептилий Волжского бассейна / Н.А. Литвинов // Зоологический журнал - 2008. - Том 87, №1. - Стр. 62-74.
12. Рогозин Д.Ю. Динамика пурпурных серных бактерий в соленом меромиктическом озере Шира (Сибирь, Хакасия) в период 2007-2013 гг. / Д.Ю. Рогозин, В.В. Зыков, М.О. Тарновский // Микробиология - 2016. Том 85, №1. - Стр. 73-82.
13. Рудченко А.Е. Глава 1. Значение жирных кислот в организме рыб и человека: Обзор литературы / А.Е. Рудченко // Диссертация - 2018. - Стр. 1-51.
14. Ручин А.Б. О биотопах прыткой ящерицы *Lacerta agilis* (Reptilia, Lacertidae) в бассейнах рек Мокши и Суры/ А.Б. Ручин, В.С. Вечканов, М.К. Рыжов// Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. Самарская Лука - 2009., Т 18, №1. - Стр. 116-118.

15. Чупров С.М. Атлас земноводных и пресмыкающихся Красноярского края// С.М. Чупров// - 2013.
16. Щепина Н.А. Ящерицы Прибайкалья и Забайкалья / Н.А. Щепина // Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. Самарская Лука - 2009., Т 18, №1. - Стр.138-142.
17. Bell, M.V. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in aquatic ecosystems: general pathways and new directions/ M.V. Bell , D.R. Tocher // Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling, FK9 4LA, UK - Chapter 9. - 2009. - P. 211-236.
18. Belolipetskii V.M. One-dimensional model for studying seasonal changes of vertical structure of salt lake Uchum// Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Математика и физика. - Т. 12. - Вып. 1. - 2019. - Стр. 100–108.
19. Gladyshev M.I. Preliminary estimates of the export of omega-3 highly unsaturated fatty acids (EPA+DHA) from aquatic to terrestrial ecosystems//M.I.Gladyshev , M.T.Arts , N.N.Sushchik // - 2009. - p. 179-210.
20. Власова О.П. Пресмыкающиеся Центрально-Черноземного заповедника// О.П. Власова, Е.А. Власов, А.А. Власов// Вестник Тамбовского университета. Серия: естественные и технические науки. - Т. 18. - 2013. - Стр. 2988-2991.
21. Taipale S. Fatty acid composition as biomarkers of freshwater microalgae: analysis of 37 strains of microalgae in 22 genera and in seven classes / S. Taipale, U. Strandberg, E. Peltomaa, A. W. E. Galloway, A.Ojala, M. T. Brett // Aquatic Microbiol Ecology. – 2013. V. 71. – P. 165-178.
22. Сущик Н.Н. Роль незаменимых жирных кислот в трофометаболических взаимодействиях в пресноводных экосистемах (обзор)/Н.Н. Сущик// Журнал общей биологии. - 2008.Стр. 299-316.

23. Махутова О.Н. Сравнение жирнокислотного состава кладоцер и копепод из озер разных климатических зон / О.Н. Махутова, М.И. Гладышев, Н.Н. Сушик, О.П. Дубовская, Ж.Ф. Бусева, Е.Б. Фефилова, В.П. Семенченко, Г.С. Калачева, О.Н. Кононова, М.А. Батурина // Сибирский экологический журнал - 2014. - 4. - Стр. 627-638.
24. Sushchik N.N. Seasonal dynamics of fatty acid content of a common food fish from the Yenisei river, Siberian graylin/N.N. Sushchik, M.I. Gladyshev., G.S. Kalachova// *Thymallus arcticus* Food Chemistry - (2007). - P. 1353–1358.
25. Napolitano, G.E. Fatty acids as trophic and chemical markers infreshwater ecosystems. In: Arts, M.T., Wainman, B. C. (Eds.) / G.E.Napolitano // *Lipids in Freshwater Ecosystems*. New York: Springer-Verlag. - 2009. – P. 21-44.
26. Kelly J. R. Fatty acids as dietary tracers in benthic food webs / J. R. Kelly, R. E. Scheibling // *Marine Ecology Progress Series*. – 2012. V. 446. – P. 1-22.
27. Ruess L. Essential Biomolecules in Food Webs/ L. Ruess, D.C. Müller-Navarra/ *Frontiers in Ecology and Evolution*. - 2019. - P. 1-14.
28. Hixson S. Production, Distribution, and Abundance of Long-ChainOmega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: A Fundamental Dichotomy between Freshwater and Terrestrial Ecosystems/S.Hixson; B. Sharma, M. Kainz, A. Wacker, M. Arts// *Environmental Reviews*. - 2015. - P. 1-15.
29. Colombo S. A Fundamental Dichotomy in Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Abundance between and within Marine andTerrestrial Ecosystems /S.Colombo, A. Wacker, C. Parrish, M. Kainz, M. Arts// *Environmental Reviews*. - 2016. - P. 1-18.
30. Гончаров А.Г. О питании прыткой ящерицы (*Lacerta agilis*) в центральном черноземье/А.Г.Гончаров//*Вестник ТГУ*. - 2009.- т. 14. - Стр. 555-558.
31. Галицын Д.И. Экология питания прыткой ящерицы (*Lacerta agilis* L.)в популяциях Среднего Урала/ Д.И. Галицын// *ИзвестияСамарского научного центра Российской академии наук*. - 2014.- т. 16. - Стр. 413-417.

32. Макеева Е.Г. Материалы к флоре водорослей Bacillariophyta озера Шира (Россия, Хакасия)/Е.Г. Макеева, Ю.В. Науменко// Сибирский экологический журнал.- 2012. - Стр. 351-359.
33. Salem N.M. Distribution of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids in the whole rat body and 25 compartments/N.M. Salem a , Y.H. Lin, T. Moriguchi, S.Y. Lim, N. Salem Jr., J.R. Hibbeln//Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. - 2015. - P. 13-20.
34. Bell, M.V. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in aquatic ecosystems: general pathways and new directions/ M.V. Bell , D.R. Tocher // Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling, FK9 4LA, UK - Chapter 9. - 2009. - P. 211-236.
35. Ganbold O. Diet composition of lesser kestrels in Ikh Nart Nature Reserve, Mongolia//O. Ganbold, J. Azua, B. Suuri, I. Paik, O. Khuderchuluun, W. Kee Paek, R. P. Reading // Journal of Asia-Pacific Biodiversity. - V. 10. - 2017. P. 460-464.

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт

Кафедра водных и наземных экосистем
кафедра

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

подпись инициалы, фамилия

« ____ » _____ 20 __ г

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Состав и содержание жирных кислот в биомассе проточной
ящерицы обитающей в прибрежной зоне водоема

Тема

Руководитель



подпись, дата

доцент, к.б.н. А. Е. Рудченко

должность, ученая степень, инициалы, фамилия

Выпускник



подпись, дата

Е.О. Богословская

инициалы, фамилия

Красноярск, 2021