

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт
Кафедра наземных и водных экосистем
кафедра

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ М.И. Гладышев
подпись, инициалы, фамилия

«_____» _____ 20__ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Состав и содержание полиненасыщенных жирных кислот в
мышечной ткани прыткой ящерицы *Lacerta agilis* (Linnaeus, 1758)
обитающей в прибрежной зоне водоема
Направление подготовки 06.04.01 – Биология
Профиль 06.04.01.04 – Гидробиология и ихтиология

Руководитель	_____	<u>доцент, к.б.н.</u>	<u>А.Е. Рудченко</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник	_____		<u>Е.О. Богословская</u>
	подпись, дата		инициалы, фамилия
Рецензент	_____	<u>зав.лаборатории, к.б.н.</u>	<u>Ю.К. Чугунова</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия

Красноярск, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Строение классификация и физиологическое значение жирных кислот в организме человека и животных	6
1.2 Жирные кислоты в трофических сетях внутренних водоемов	9
1.3 Жирные кислоты в наземных трофических сетях	10
1.4 Пути переноса жирных кислот из водных экосистем в наземные	13
1.5 Распространение жирных кислот по наземным цепям питания	14
1.6 Характеристика объекта исследования	15
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	18
2.1 Район работ	18
2.2 Методика пробоподготовки образцов для проведения хроматографического анализа	18
2.3 Газовая хроматография и масс-спектрометрия	21
2.4 Статистическая обработка данных	22
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	23
3.1 Питание прыткой ящерицы в околородных и степных биотопах озер Ширы и Учум	23
3.2 Состав и содержание жирных кислот в мышечной ткани прыткой ящерицы из степных и околородных биотопов озер Учум и Ширы.	26
3.3 Содержание полиненасыщенных жирных кислот в мышечной ткани прыткой ящерицы из степных и околородных биотопов озер Учум и Ширы.	30
3.4 Обсуждение полученных результатов	32
ВЫВОДЫ.....	36

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	38
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	39

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).

Основная гипотеза, которую мы хотим проверить, это то, что в околотовных биотопах благодаря наличию в кормовой базе амфибионтных

насекомых, в мышечной ткани ящериц будет содержаться больше ЭПК и ДГК, по сравнению с ящерицами из степных биотопов.

Цель: изучить влияние типа биотопа и вылета амфибионтных насекомых на состав и содержание жирных кислот в мышечной ткани прытких ящериц *Lacerta agilis* (Linnaeus, 1758) обитающих в околородных и степных биотопах оз. Шира и оз. Учум.

Задачи

1. Провести анализ питания прыткой ящерицы из околородных и степных биотопов оз. Шира и оз. Учум.
2. Провести анализ состава жирных кислот и содержания ЭПК и ДГК в мышечной ткани прыткой ящерицы из околородных и степных биотопов оз. Шира и оз. Учум.
3. Провести анализ динамики питания прыткой ящерицы и содержания ЭПК и ДГК в мышечной ткани ящериц из околородного биотопа оз. Шира в период до и после вылета амфибионтных насекомых.

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 запасающая 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 источников

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 деструкторами почвы. Как предполагается, встречаются это 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).

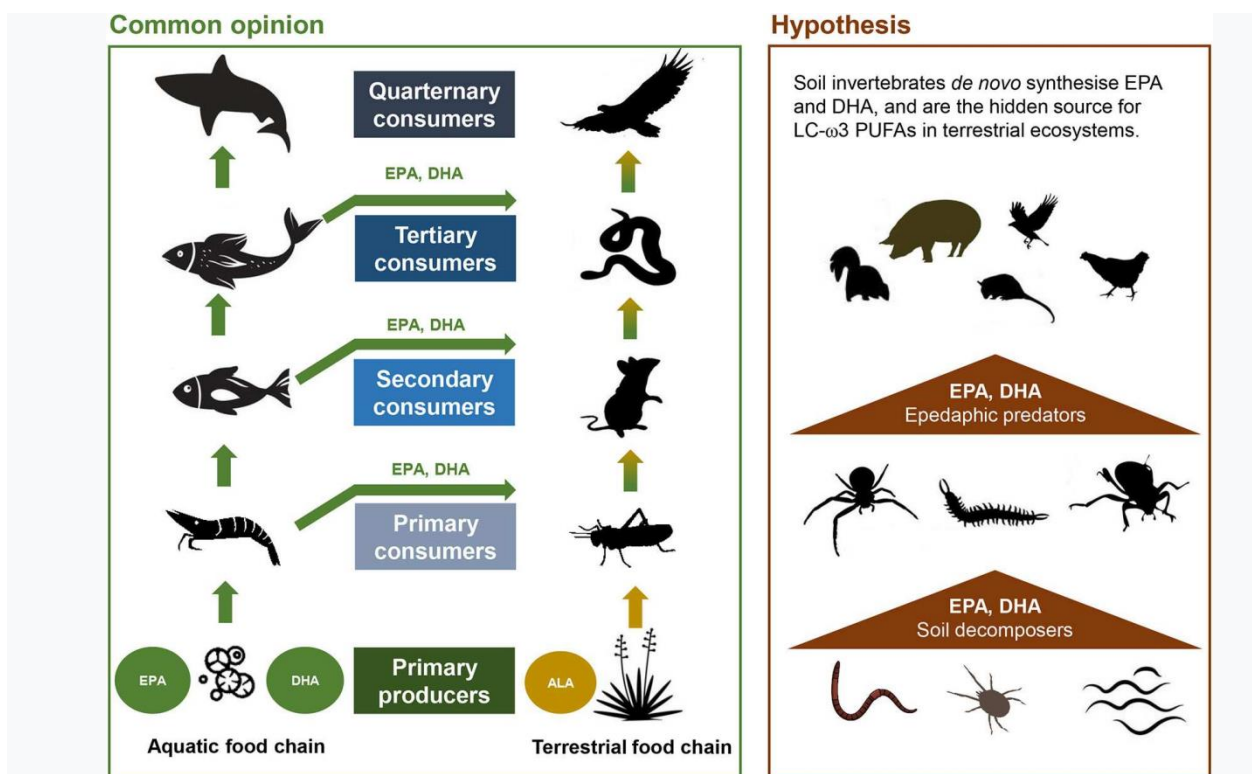


Рисунок 1 - Предполагаемое происхождение длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот в наземных экосистемах. Слева - переход на сушу через разные трофические уровни; справа - деструкторы почвы. Изображение предоставлено: <https://vecteezy.com>.

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 прыткой 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 вышлота. Например, представители родов *Glyptotendipes* и *Polypedilum* (~95 % от общей численности), среднее расстояние разлета хирономид от мест вышлота 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 Распространение жирных кислот по наземным цепям питания

После преодоления барьера между водоемом и сушей, жирные кислоты через наземные цепи питания переносятся к разным организмам.

Поскольку, то, что прыткая ящерица является потребителем органического вещества водного происхождения, мы подтвердили в прошлых работах, необходимо рассмотреть пути передачи жирных кислот на другие трофические уровни.

Рептилиями питаются некоторые млекопитающие и птицы. Например, в работе Савонина (Савонин и др. 2015) с соавторами от 2015 года отмечено, что у американской норки, инвазионный вид европейской части России, одна из частей питания включает рептилий. А в статье за 2014 год указано, что именно прыткая ящерица, которая в больших количествах обитает в районе волгоградского водохранилища, является основным представителем рептилий, по многолетней динамике амфибионтных позвоночных в питании американской норки (Савонин и др. 2014).

Так же небольшой процент (3,8) прыткая ящерица составила в питании пустельги. При чем в данной статье Турчина (Турчин 2009) указана именно прыткая ящерица.

1.6 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 отличие 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, при городской 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).

При выборе места обитания для прятких ящериц важен микрорельеф участка и наличие зон, лишенных растительности. Они необходимы для того, чтобы ящерицы могли инсолировать, то есть повышать температуру тела методом нагревания от солнца (Belousova et al. 2020).

Так же ящерицы способны изменять свое местообитания при наличии неблагоприятных условий. Молодые ящерицы предпочитают не селиться на местах бывших пожаров и занимать не тронутые огнем территории (Bakiev et al. 2019).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Район работ

Отлов ящериц проходил в районе двух озер.

1) Озеро Ши́ра (Республика Хакасия, район поселка Жемчужный) (54°30' СШ, 90°11' ВД) расположен в Республике Хакасия (Южная Сибирь), в 15 км от районного центра п. Ши́ра. 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).

2) Озеро Учум это соленое озеро закрытого бассейна расположено на юге Сибири (Красноярский Край, Россия) в 90 км к северу от озера Ши́ра. Это небольшое озеро имеет овальную форму (1,5 × 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).

3) Степные биотопы на расстоянии от 500 до 10 000 метров от озер Ши́ра и Учум.

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.

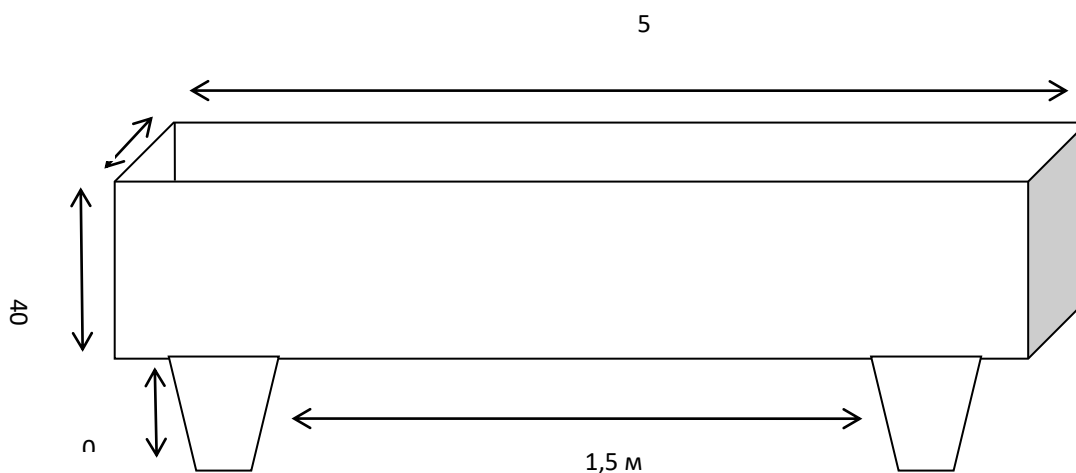


Рисунок 2 Схема траншеи для ловли ящериц.

После отлова ящерицы были помещены в стеклянную банку вместе с ваткой, смоченной в эфире. Затем производилось вскрытие, извлекались грудные и бедренные мышцы, которые были помещены в раствор хлороформ-этанола для последующей газовой хроматографии. Так же 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). Так же было отобрано 40 желудков для исследования питания прыткой ящерицы около разных озер и в степных биотопах.

Таблица 1 - Характеристика отобранных проб.

Озера	Биотопы	Период пробоотбора	Выборка на ЖК	Выборка на питание
Учум	Степной биотоп	Июль 2021 г	5	10
	Околоводный биотоп	Июль 2021 г	5	15
Шира	Степной биотоп	Май, июль 2022 г.	5	10
	Околоводный биотоп	Май, июль 2022 г.	5	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 добавляли 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 интерпретации масс-спектра. Эффективность таких масс-спектральных баз особенно высока, когда обнаруживается совпадение, в противном же случае возникает необходимость в интерпретации 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.

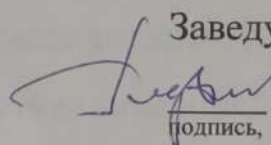
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт

Кафедра наземных и водных экосистем
кафедра

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой



М.И. Гладышев
подпись, инициалы, фамилия

«___» _____ 20__ г.


МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Сезонная динамика состава и содержания жирных кислот в
мышечной ткани прыткой ящерицы *Lacerta agilis* (Linnaeus, 1758)
обитающей в прибрежном и степном биотопах

Направление подготовки 06.04.01 – Биология

Профиль 06.04.01.04 – Гидробиология и ихтиология

Руководитель

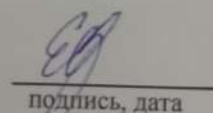


подпись, дата

доцент, к.б.н.
должность, ученая степень

А.Е. Рудченко
инициалы, фамилия

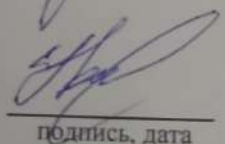
Выпускник



подпись, дата

Е.О. Богословская
инициалы, фамилия

Рецензент



подпись, дата

зав.лаборатории, к.б.н.
должность, ученая степень

Ю.К. Чугунова
инициалы, фамилия

Красноярск, 2023