

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

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ М.И. Гладышев
« ____ » _____ 2023 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА
06.03.01 – Биология

Влияние полостных паразитов на состав и содержание жирных кислот в
мышечной ткани карповых рыб из Красноярского водохранилища

Руководитель	_____	доцент, к. б. н.	А.Е. Рудченко
	подпись, дата	должность, ученая	инициалы, фамилия
		степень	
Выпускник	_____		Н.П. Зотченко
	подпись, дата		инициалы, фамилия

Красноярск 2023

Содержание

Введение	4
Глава 1. Обзор литературы	6
1.1. Классификация и синтез жирных кислот	6
1.2. Роль жирных кислот и их источники	7
1.3 Синтез жирных кислот у бактерий	10
1.4 Синтез ЖК у водорослей	13
1.4 Синтез ЖК у рыб	15
1.5 Передача по цепям питания	15
1.6 Влияние паразитов на состав жирных кислот в рыбе	17
1.7 Содержание жирных кислот в паразитах	19
Глава 2. Материалы и методы	21
2.1 Объект исследования	21
2.1.1 Плотва сибирская <i>Rutilus rutilus</i> (Pallas, 1814).....	21
2.1.2 Лещ <i>Abramis brama</i> (Linnaeus, 1758)	22
2.1.3 Лигула <i>Ligula intestinalis</i> (Linnaeus, 1758) и диграмма <i>Digamma interrupta</i> (Rudolphi, 1810)	22
2.2 Район исследования	24
2.3 Отбор проб.....	24
2.3.1 Отлов	24
2.3.2 Общий биологический анализ рыб и морфометрия	26
2.3.3 Метод газовой хроматографии, подготовка проб к биохимическому анализу	26
2.3.4 Обработка проб на газовой хроматографии и методом масс-спектрометрии	28

2.3.5 Извлечение и определение паразитов	30
2.4 Статистическая обработка данных.....	30
Глава 3. Результаты и обсуждения.....	32
3.1 Процентное содержание жирных кислот в мышечной ткани.....	32
3.2 Содержание ЭПК и ДГК в мышечной ткани	37
Глава 4. Заключение.....	41
Вывод.....	42
Список сокращений	43
Список литературы	44

Введение

Одними из наиболее необходимых компонентов для функционирования растительных и животных организмов являются липиды и их производные. Например, полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), нужны для построения клеточных мембран в процессе роста, а мононенасыщенные жирные кислоты (МНЖК) используются как источник энергии метаболических процессов [23].

Как известно, длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты семейства омега-3 (ПНЖК), такие как эйкозапентаеновая кислота (ЭПК, 20:5n-3) и докозагексаеновая кислота (ДГК, 22:6n-3), являются незаменимыми компонентами питания человека. Основным пищевым источником ЭПК и ДГК служит рыба [2].

На содержание жирных кислот (ЖК) в тканях рыб оказывают влияние большое количество факторов - тип и рацион питания, температура воды, репродуктивная стадия, генетически детерминированная способность к синтезу ЖК. При этом немаловажное влияние на качество рыбопродуктов, как источника ценных ЭПК и ДГК, может оказывать зараженность рыб внутриполостными паразитами. Интенсивная зараженность рыбы паразитами может значительно влиять на состав ПНЖК, а именно ЭПК и ДГК. Плотва сибирская *Rutilus rutilus*(Pallas, 1814) и лещ *Abramis brama*(Linnaeus, 1758) в водоемах Красноярского края являются одними из промысловых видов рыб. В Красноярском водохранилище плотва заражена ремнецом – лигулой *Ligula intestinalis*, (Linnaeus, 1758), в то время как лещ подвержен заражению диграммой *Digramma interrupta* (Rudolphi, 1810). Данные паразиты могут использовать липиды рыбы - хозяина для накопления жира в собственном теле. По этой причине выбранные мной рыбы из Красноярского водохранилища, зараженные ремнецами, могут иметь более низкую пищевую ценность, как источник ПНЖК.

Целью работы было установить, как заражения ремнецом влияет на состав и содержание жирных кислот в мышечной ткани плотвы сибирской и леща из Красноярского водохранилища.

Задачи:

1. Изучить состав жирных кислот в мышечной ткани, зараженных ремнецом и здоровых плотвы сибирской и леща из Красноярского водохранилища.

2. Определить количественное содержание липидов и длинноцепочечных омега 3 полиненасыщенных жирных кислот в мышечной ткани, зараженных ремнецом и здоровых сибирской плотвы и леща из Красноярского водохранилища.

3. Сравнить количественное содержание липидов и длинноцепочечных омега 3 полиненасыщенных жирных кислот в тканях ремнецов.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Классификация и синтез жирных кислот

Липиды, которые являются органическими соединениями, малорастворимы в воде, но легко растворимы в неполярных растворителях, таких как ацетон, спирт и хлороформ [6]. Жирные кислоты (ЖК) составляют основную часть липидов. Молекула жирной кислоты имеет углеродную цепь, на одном конце которой есть карбоксильная (кислотная) группа (COOH), а на другом — метильная группа атомов (CH₃). ЖК отличаются друг от друга количеством атомов углерода в цепи и количеством двойных связей между атомами углерода. Широко используется система аббревиатур ЖК, такая как 16:0, 18:1, 20:4, где первая цифра обозначает количество атомов углерода в кислоте, включая карбоксильную группу, а число после указывает на количество двойных связей. Ненасыщенные соединения имеют информацию о расположении и структуре двойной связи. Все основные ЖК содержат только цис-связи. Другая литературная форма для обозначения жирных кислот также используется [23].

Таким образом, 18:3n-3 линоленовую кислоту получают следующим образом:

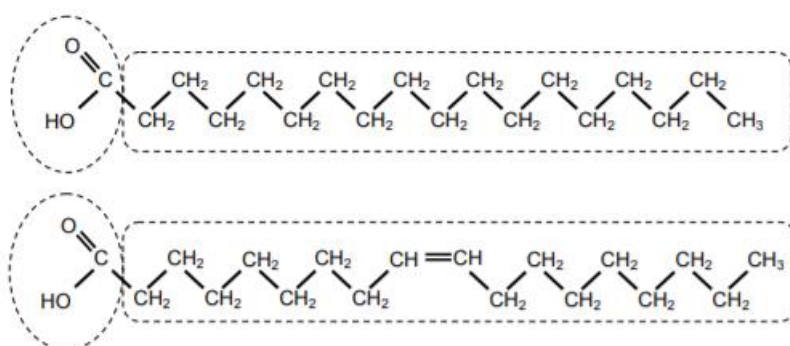


Рис.1. Структурная формула насыщенной стеариновой кислоты 18:0 (вверху) и мононенасыщенной олеиновой кислоты 18:1n-9

Жирные кислоты могут быть насыщенными (не имеющая двойных связей; 18:0 на рис. 1) или ненасыщенными (имеющая двойные связи; 18:1n-9 на

рис. 1), и последние могут иметь полиненасыщенные свойства.

Для внедрения двойных связей в жирные кислоты используются ферменты, такие как десатуразы. Только растения могут синтезировать исходные кислоты в этих семействах с помощью десатуразы $\Delta 5$ и $\Delta 12$, животные же не могут сами синтезировать полиненасыщенные жирные кислоты, а только получать их извне, вместе с пищей. Важные полиненасыщенные жирные кислоты включают кислоты семейства омега-6 и омега-3. Синтез полиненасыщенных жирных кислот у животных и человека невысокой эффективности, даже если эти кислоты важны для жизнедеятельности организма.

ПНЖК, необходимые животным (и человеку), но не синтезирующиеся в их организме, называются незаменимыми. Важные ПНЖК включают в себя семейства кислот n-6 и n-3, таких как ЛК и АЛК.

Частично незаменимые ПНЖК – это АРК (омега-6), ЭПК (омега-3) и ДГК (омега-3)[11].

1.2. Роль жирных кислот и их источники

Полиненасыщенные жирные кислоты относятся к группе жирных кислот, которые выполняют важную роль в питании человека. Они являются необходимыми для нормального функционирования многих органов и систем в организме, а также для поддержания здоровья.

Один из ключевых эффектов полиненасыщенных жирных кислот заключается в их способности снижать уровень холестерина в крови. При этом они не только уменьшают количество вредного ЛПНП-холестерина, но и повышают уровень полезного ЛПВП-холестерина. Это особенно важно при профилактике и лечении сердечно-сосудистых заболеваний, таких как атеросклероз и ишемическая болезнь сердца [12].

Кроме того, полиненасыщенные жирные кислоты улучшают функции мозга и нервной системы, способствуя повышению когнитивных функций и улучшению настроения. Также они уменьшают воспаление в организме и снижают риск развития различных заболеваний, связанных со воспалением, таких как артрит, сахарный диабет и онкологические заболевания.

Млекопитающие не способны производить ЛК и АЛК из олеиновой кислоты эффективно, но могут поглощать готовые кислоты для образования арахидоновой кислоты, докозагексаеновой кислоты и эйкозопентаеновой кислоты [9].

ДГК и ЭПК являются предшественниками синтеза эйкозаноидов, которые играют важную роль в физиологических и биохимических процессах организма [15]. С высвобождением ПНЖК из фосфолипидов клеточных мембран под действием фосфолипазы А2 начинается синтез эндогормонов, циклооксигеназы и липоксигеназы синтезируют из свободных ПНЖК различные эйкозаноиды. Противоположные гормоны получаются из ДГК и ЭПК. Ферменты циклооксигеназы и фосфолипаза А2 участвуют в синтезе эндогормонов из ДГК и ЭПК.

Избыток ДГК может привести к избыточному синтезу простагландинов, тромбоксанов и лейкотриенов, что вызывает опасные заболевания, воспаления, отеки, аллергии и боли. Фосфолипаза и циклооксигеназа могут также превращать ДГК в нейропротектин D [23].

Некоторые питательные функции ПНЖК заключаются в следующем:

1. Ингибирование синтеза вазоагрессивных липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и ускорение элиминации ЛПНП. Однако они не оказывают никакого влияния на вазопротекторный ЛПВП или даже на увеличение продукции ЛПВП [15];

2. Снижение тромбоцитов, увеличение времени кровотечения и снижение артериального давления [15];

3. ПНЖК $\omega 3$ также оказывают благотворное влияние на заболевания, не связанные с сердцем или кровеносными сосудами. Заболевания включают кожные заболевания, астму, артрит, нефрит, красную волчанку и рассеянный склероз [15];

4. Основной компонент большинства фосфолипидов биологических мембран, важный для их структуры и функции [15];

5. ДГК имеет высокую концентрацию в сетчатке и головном мозге человека и других млекопитающих и необходима для нормальной работы зрения и мозга [15];

6. Способствует текучести мембраны (мембранному порядку), что может влиять на функцию мембранных рецепторов, таких как родопсин [15];

7. Регуляция мембраносвязанных ферментов (Na/K-зависимая АТФаза) и играет роль в передаче сигнала, воздействуя на инозитолфосфаты, диацилглицерин (ДАГ) и протеинкиназу С [15];

8. ДГК напрямую влияет на биосинтез нейротрансмиттеров, передачу сигналов, поглощение серотонина, связывание β -адренергических и серотонинергических рецепторов и активность моноаминоксидазы [15];

9. Регуляция продукции эйкозаноидов из АК, посредством чего ЭПК конкурирует с АК за продукцию различных эйкозаноидов, таких как простагландины трех серий, простациклин и тромбоксан, и пять серий лейкотриенов [15];

10. Профилактика сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и рака; воспалительные, тромботические и аутоиммунные заболевания; ишемическая болезнь сердца; артериальная гипертензия; диабет 2 типа, заболевания почек;

ревматоидный артрит; язвенный колит; болезнь Крона; хроническая обструктивная болезнь легких [15].

Линоленовая кислоты в больших количествах синтезируются в растениях, тогда как у человека и других млекопитающих они не вырабатываются, поэтому жирные кислоты должны поступать из внешних источников. Хотя люди могут синтезировать ПНЖК, такие как АК, ДГК и ЭПК, с помощью ряда ферментов десатуразы и элонгазы из предшественника ЛК [22]. Но сама по себе эффективность преобразования у людей низкая, поэтому прямое поглощение оказывается значительно более эффективным. У млекопитающих отсутствует активность $\Delta 12$ и $\Delta 15$ -десатуразы, поэтому они не могут синтезировать ЛК и АЛК из предшественника олеиновой кислоты (18:1 $\Delta 9$) [16].

1.3 Синтез жирных кислот у бактерий

Жирные кислоты являются важной составляющей многих биологических молекул, от мембран и липидов до гормонов и других биоактивных молекул. Они также являются источником энергии для организмов и поэтому являются необходимым компонентом общей метаболической активности живых организмов.

Бактерии способны синтезировать жирные кислоты из углеводов при помощи процесса бета-окисления. Этот процесс начинается с разложения глюкозы или другого углеводорода на молекулы ацетил-КоА. Далее ацетил-КоА преобразуется в ацетат, который уходит из клетки в качестве прошедшего бета-окисления продукта, и некоторая часть используется для синтеза жирных кислот.

Синтез жирных кислот происходит в клеточной жидкости бактерий, в присутствии активных форм малонил-КоА и других биохимических факторов. В результате этого процесса образуются цепи жирных кислот различной длины

и намеренной структуры. Эти компоненты могут дальше метаболизироваться в бактериях или использоваться для синтеза более сложных молекул.

Синтез жирных кислот у бактерий зависит от многих факторов, включая доступность углеводов и наличие необходимых ферментов и других компонентов. Он также может быть регулирован другими факторами, такими как окружающая среда и наличие других веществ.

Таким образом, синтез жирных кислот у бактерий является важным биохимическим процессом, который позволяет этим организмам обеспечивать свои энергетические и пластические потребности. Кроме того, он может играть ключевую роль в адаптации бактерий к различным условиям окружающей среды и выживанию в ней.

В основном у бактерий встречаются следующие группы жирных кислот: насыщенные, мононенасыщенные, разветвленные (изо- и антизо-кислоты), циклопропановые и оксикислоты с углеродными цепями от 10 до 19 атомов.

Общая концентрация жирных кислот во всех веществах определяется путем повторения ряда реакций. Различают два типа синтеза жирных кислот:

- первый — у нефотосинтезирующих эукариот;
- второй - с прокариотами и фотосинтезирующими эукариотами.

В таблице ниже показаны кислоты различных групп бактерий. Различные группы микроорганизмов сильно различаются по синтезу ЖК [31].

Табл. 1. Жирные кислоты, встречающиеся у микроорганизмов.

Грамотрицательные эубактерии	
16:1 ω 7c	Mancuso et al., 1990;
пальмитолеиновая кислота	Bertone et al., 1996;
16:1 ω 7t	Desvilettes et al., 1997;

пальмитолеиновая кислота	Sundh et al., 1997
16:1 ω 5c	
пальмитолеиновая кислота	
18:1 ω 7c	
вакценовая кислота	Sundh et al., 1997
18:1 ω 7t	
вакценовая кислота	
Анаэробные грамотрицательные бактерии и грамположительные зубактерии	
Изокислоты с 14-18 атомами С	Mancuso et al., 1990; Bertone et al., 1996; Desvilettes et al., 1997; Sundh et al., 1997
Антеизокислоты с 15 и 17 атомами С	
Метан-окисляющие бактерии	
16:1 ω 8	Mancuso et al., 1990; Bertone et al., 1996;
Моноеновая пальмитолеиновая кислота	
18:1 ω 8	Desvilettes et al., 1997; Sundh et al., 1997
Моноеноваявакценовая кислота	
Сульфатредуцирующие бактерии и актиномицеты	
10Me16:0	Mancuso et al., 1990; Bertone et al., 1996; Desvilettes et al., 1997; S undh et al., 1997
10Me18:0	
i17: ω 7	
Грамположительные бактерии	
i15:0	Shaw, 1971 Komagata Suzuki, 1988 Findlay, Dobbs, 1993 Navarrete et al., 2000
Изопентадекановая кислота	
ai15:0	
Антеизопентадекановая кислота	
15:0	Navarrete et al., 2000
Пентадекановая кислота	

ai17:0 Антеизогептадекановая кислота	Wang et al., 2014
i17:1 Изопентадеценовая кислота	
ai17:1 Антеизопентадеценовая кислота	
16:1n-9 Гексадеценовая кислота	
16:1n-5	

1.4 Синтез ЖК у водорослей

Основным источником жирных кислот являются водоросли. Разные таксономические группы могут продуцировать разные ЖК. Это связано с тем, что в организме есть несколько ферментов и десатураз, которые влияют на жир, который будет производиться [31].

Синтез начинается с ацетилкофермента, с помощью которого образуется ацил-АКП (коэнзим А) при участии ферментов. Затем происходит карбоксилирование, при котором к молекуле ацил-АКП добавляется углекислый газ, образуя молекулу жирной кислоты.

Синтез жирных кислот у водорослей может происходить по нескольким путям, в зависимости от условий окружающей среды. Например, при отсутствии углекислого газа, водоросли могут производить много одноатомных жирных кислот. Кроме того, при повышенной температуре и недостатке питательных веществ, водоросли могут производить жирные кислоты, которые служат запасной энергией.

В целом, синтез жирных кислот является важным процессом для жизни водорослей, который позволяет им адаптироваться к условиям окружающей среды и выживать в неблагоприятных условиях. Большинство видов

водорослей находятся в активном поиске новых методов синтеза жирных кислот для оптимизации их производства в качестве биотоплива или других коммерческих продуктов.

Табл. 2. Жирные кислоты, встречающиеся у водорослей.

Зеленые водоросли (<i>Chlorophyta</i>)	
18:2n-6 линолевая кислота	Ahlgren et al., 1992; Viso, Marty, 1993; Napolitano, 1999; Petkov, Garcia, 2007; Kelly, Scheibling, 2012
18:3n-3 α -линоленовая кислота	
18:3n-6 гамма-линоленовая кислота	
Эвгленовые водоросли (<i>Euglenophyta</i>)	
15:3n-1	Taipaleetal., 2013 *являются маркерными, специфичные, короткоцепочечные ЖК *доминирующие ЖК
15:4n-3	
16:0	
17:2n-7	
17:2n-5	
17:3n-2	
20:2n-6 эйкозодиеновая кислота	
18:3n-3 α -линоленовая кислота	
Динофитовые водоросли (<i>Dinophyta</i>)	
18:3n-3 α -линоленовая кислота	Napolitano, 1999 Bergé, Barnathan, 2005 Kelly, Scheibling, 2012
18:5n-3	
22:6n-3 докозагексаеновая кислота	
20:5n-3 эйкозапентаеновая кислота	

Диатомовые водоросли (<i>Bacillariophyceae</i>)	
16:2n-7	Najdek et al., 2002 Dijkman, Kromkamp, 2006
16:2n-4	
16:3n4	
16:4n-1	
20:5n-3эйкозапентаеновая кислота	

1.4 Синтез ЖК у рыб

В отличие от описанных выше организмов, синтез ЖК у рыб имеет свои особенности. Позвоночные рыбы не содержат десатуразы $\Delta 12$ и $\Delta 15$, и поэтому не способны синтезировать ЛК и АЛК, но они вполне могут получать жирные кислоты из растительной пищи, которую потребляют, и через биосинтез ЭПК и ДГК. Эти кислоты являются полезными для рыб и могут быть переданы человеку при потреблении рыбьего мяса.

В отличие от беспозвоночных животных, у рыб обнаружены десатуразы 4 и 8, участвующие в синтезе длинноцепочечных ПНЖК. $\Delta 4$ десатураза позволяет напрямую синтезировать 22:5n-6 (ДГК), 22:6n-3, 22:4n-6 (адреновая (докозотетраеновая) кислота), 22:5n-3. $\Delta 6$ десатураза необходима для синтеза 18:3n-6 (α -ЛК) и 18:4n-3 из незаменимых ЛК и АЛК.

Жирнокислотный состав рыб состоит из потребленных ЖК, которые они получают вместе с пищей [3].

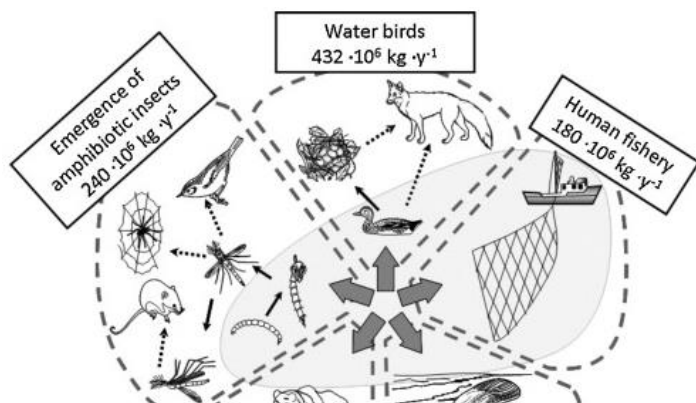


Рисунок 2 - Пути передачи ЭПК и ДГК из водных экосистем в наземные: цифры в квадратах.

1.5 Передача по цепям питания.

Существует несколько основных путей передачи продукции водных экосистем, в том

числе ПНЖК, в наземные экосистемы (рис. 2). Первый путь – непосредственное поедание водной добычи прибрежными хищниками. Передача водных ПНЖК наземным хищникам – медведям, потребляющим нерестового лосося, оценивался в месте их наибольшей активности, в Тихоокеанском регионе, и составил 2×10^6 кг ЭПК + ДГК в год в глобальном масштабе (рис. 2).

Еще одним путем экспорта ПНЖК является появление амфибиотических насекомых. Личинки и куколки этих насекомых растут и развиваются в воде. Например, стрекозы, комары подёнки являются амфибиотическими насекомыми. Их личинки питаются микроводорослями и другими водными организмами, а когда взрослые насекомые (имаго) выходят из куколок и вылетают на сушу, они приносят в своем организме ПНЖК, синтезируемые микроводорослями. Взрослых амфибиотических насекомых поедают различные наземные животные (рис. 2). Важно подчеркнуть, что в отличие от амфибиотических насекомых, большинство наземных насекомых не содержат или содержат незначительное количество ЭПК и ДГК. Глобальный экспорт ЭПК и ДГК в результате вылета насекомых оценивается примерно в 240×10^6 кг/год (рис. 2), т. е. на два порядка выше, чем у прибрежных хищников.

Водоплавающие птицы также являются важным проводником ЭПК и ДГК из водных экосистем в наземные. Они поедают водную добычу, зоопланктон, зообентос и рыбу, а птиц и их яйца, в свою очередь, поедают наземные хищники. Глобальный экспорт ПНЖК через водоплавающих птиц оценивается примерно в 432×10^6 кг/год.

Другим путем выноса ПНЖК, происходящим преимущественно в океанах, является береговой занос падали и водорослей. Экспорт ЭПК и ДГК через дрейф оценивается примерно в 24×10^6 кг/год (рис. 2).

Таким образом, общий глобальный естественный экспорт ЭПК и ДГК из водных экосистем в наземные составляет около 698×10^6 кг/год (рис. 2)[24].

1.6 Влияние паразитов на состав жирных кислот в рыбе

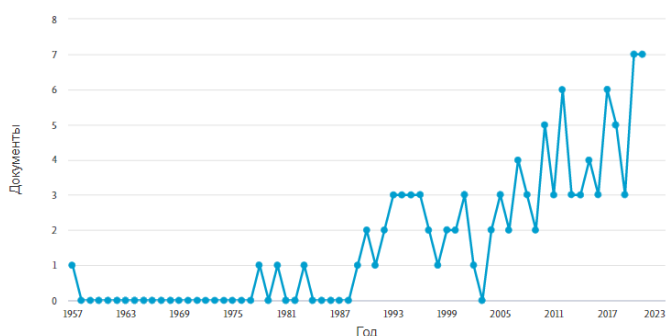


Рисунок 2 - Анализ в базе данных Scopus, по ключевым словам: рыба, ЖК, паразиты.

Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), особенно семейства ω -3 и ω -6, представляют собой пищевые соединения со значительным иммуномодулирующим

потенциалом. Механизмы, предложенные для объяснения их влияния на иммунную функцию,

включают:

1. Прямое влияние на функцию лейкоцитов и мембран эпителиальных клеток [6];
2. Регуляцию экспрессии генов, связанных с иммунитетом, и их продуктов[10];
3. Механизмы, опосредованные эйкозаноидами[2].

Эйкозаноиды представляют собой иммунные эффекторные молекулы, играющие ключевую роль в регуляции воспалительной реакции [2]. Через циклооксигеназный (ЦОГ) или липоксигеназный (ЛОГ) пути арахидоновая кислота (АК, 20:4n-6), полученная из мембранных фосфолипидов, метаболизируется до простагландинов и тромбоксанов 2-го ряда и лейкотриенов 4-го ряда, тогда как эйкозапентаеновая кислота (ЭПК, C20:5n-6) - 3) метаболизируется до простагландинов и тромбоксанов серии 3 и лейкотриенов серии 5[3].

Паразиты являются одним из главных факторов, влияющих на состав жирных кислот и уровень ЭПК и ДГК в рыбе. Это связано с тем, что многие

виды паразитов используют рыбу в качестве своего хозяина, размножаясь и питаясь ее тканями.

При наличии паразитов в теле рыбы происходит изменение биохимического состава ее тканей. В первую очередь это затрагивает обмен жирных кислот. Так, некоторые виды паразитов могут вызывать увеличение содержания НЖК и снижение уровня ЭПК и ДГК в мясе рыбы. Это связано с тем, что паразиты используют эти вещества для своего собственного питания.

Кроме того, паразиты могут вызывать нарушение обмена веществ у рыбы, что приводит к провалу метаболических процессов. Это может приводить к снижению уровня жирных кислот в мышечной ткани рыбы.

Заражение кишечными паразитами может привести к значительному снижению темпов роста в результате изменения потребления корма, функции желудочно-кишечного тракта, белкового, энергетического и минерального обмена и состава тела. У паразитированных животных питательные вещества отклоняются от анаболических процессов, таких как рост скелета и отложение мышц, в сторону. Процессы, необходимые для поддержания гомеостаза, такие как синтез белков плазмы и крови, образование слизи, восстановление целостности слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта и поддержание защитных сил хозяина [14].

В целом, влияние паразитов на состав жирных кислот и уровень ЭПК и ДГК в рыбе является неоднозначным и зависит от многих факторов, среди которых можно выделить вид паразита, степень поражения рыбы и ее вида. Таким образом, употребление рыбы, пораженной паразитами, может оказывать негативное воздействие на здоровье человека, особенно при употреблении в больших количествах. Поэтому рекомендуется выбирать свежую рыбу высокого качества, чтобы избежать возможности попадания нежелательных веществ в организм.

1.7 Содержание жирных кислот в паразитах

Определенное внимание уделялось изучению содержанию жирных кислот в паразитов в связи с такими физиологическими функциями, как рост, размножение и защитные механизмы. Жирные кислоты играют важную роль в жизненном цикле паразитов, помогая им выживать в условиях определенных организмов-хозяев.

Среди наиболее распространенных жирных кислот, обнаруженных в паразитах, можно выделить ЛК - играет важную роль в метаболизме кальция и обеспечивает правильное формирование клеток.

Кроме этого, паразиты также могут содержать другие жирные кислоты, такие как пальмитиновая кислота и стеариновая кислота. Они участвуют в процессе транспорта жирных молекул и помогают удерживать вещества, необходимые для жизнедеятельности паразитов.

Более того, исследования показали, что жирные кислоты, содержащиеся в теле паразитов, могут использоваться человеком в качестве источника питания. Они являются важными компонентами диет, поскольку содержат множество полезных веществ для организма [21, 30].

Какие факторы обуславливают эту разницу? Их несколько — это и генетический (видовая специфика), диета хозяина, но главный — термический режим среды обитания (температура хозяина) гельминтов. Именно под ее влиянием изменяются жирнокислотные составы всех мембранных структур клеток эктотермных организмов от синезеленых водорослей до рыб [30]

В целом, жирные кислоты играют важную роль в жизни паразитов, обеспечивая им необходимые ресурсы для выживания и роста. В то же время, эти кислоты могут быть использованы человеком в качестве источника питания и оказывать положительное влияние на здоровье и благополучие организма.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Объект исследования

2.1.1 Плотва сибирская *Rutilus rutilus*(Pallas, 1814)

Плотва может достигать до 32 см длиной и весить до 950 г, в то время как обычные размеры составляют 10-25 см и масса 110-200 г. Средний возраст обычно 15-16 лет. Одной из характерных особенностей плотвы является оранжевая окраска глазной радужки. В сибирской плотве спинной плавник составляет около 20-24% длины тела.

Плотва - вид рыб, который обитает в различных водоемах и протоках Красноярского края. Он может быть найден в реках, озерах, ручьях, водохранилищах и прудах. Обычно она предпочитает пребывание в зарослях водных растений, где находится между травой и открытой водой. Природа плотвы не позволяет ей жить в холодных и быстро текущих участках рек. Она больше живет на плесах с теплой и более спокойной водой, где редко поднимается к поверхности, плавает в толще воды или в придонных слоях.

Отмечается, что плотва сибирская - рыба, которая живет в том же водоеме на протяжении всей жизни. Нерест происходит в мае при температуре воды, не ниже 8°C, а икра откладывается в растительность на берегу. Развитие икры происходит в течение 9-14 дней, молодь питается зоопланктоном, а взрослые рыбы питаются бентосными беспозвоночными и водорослями. Даже в зимний период рыбы продолжают есть, хотя и менее интенсивно.

Плотва широко используется в индустрии рыболовства. Этот вид играет важную роль в питании хищных рыб, таких как таймень, щука, окунь и налим[25, 28-29].

2.1.2 Лещ *Abramis brama* (Linnaeus, 1758)

В 60-х годах лещ был впервые завезен в бассейн Енисея и на данный момент встречается вдоль всей реки, в основном в Красноярском и Саяно-Шушенском водохранилищах. Лещ является промысловым видом, а некоторые авторы не считают целесообразным отделять леща, обитающего в водоемах Сибири, в подвид *Abramis brama orientalis* Berg, 1949.

Высокое и сжатое с боков тело является основной особенностью леща, которого легко отличить от других рыб Енисея. Лещ может достигать длины до 50 см и весить более 5 кг, но обычно размеры составляют 30-35 см и вес 1,0-1,5 кг. Лещ предпочитает медленные воды и избегает быстрого течения. Обычно он обитает у дна на иловых, песчано-илистых или глинистых грунтах. Периодически в водохранилищах лещ перемещается на большие расстояния в поисках пищи и во время нереста. Половозрелость наступает у леща в возрасте 5-8 лет при длине тела 25 см. Самцы становятся половозрелыми на 1-2 года раньше самок и при меньших размерах тела.

Нерест леща происходит в середине июня на мелководьях на глубине около 1 метра, икра откладывается на водную растительность. Сроки нереста зависят от температуры воды и подъема уровня воды. В первые 15 лет после создания Красноярского водохранилища, численность леща была высокой, и масса тела рыбы превышала 5 кг. Однако, последнее время популяция леща стала значительно уменьшаться, а средняя масса особей теперь составляет около 1 кг, иногда достигая 2 кг [25, 28-29].

2.1.3 Лигула *Ligula intestinalis* (Linnaeus, 1758) и диграмма *Digramma interrupta* (Rudolphi, 1810)

Рыбы семейства карповых, обитающие в водоемах бассейна Енисея, подвержены заболеваниям, которые вызывают плоские черви – ремнецы – лигула *Ligula intestinalis* и диграмма *Digramma interrupta*.

Лигула и диграмма имеют мускулистое, ремневидное тело. У половозрелых червей в окончательном хозяине на небольшом участке переднего конца тела образуется ложная членистость, не соответствующая внутренней организации. Вдоль всей поверхности червя с вентральной и дорсальной сторон проходит по одной медианной продольной борозде (у диграммы их две), которые у плероцеркоидов выражены более четко, чем у взрослых червей. Взрослый паразит – плоский червь желтоватого цвета, тело которого «состоит» из небольших сегментов. Длина паразита от 10 до 120 см, шириной тела до 2 см, паразитирует в кишечнике рыбы и рыбадных птиц – окончательного хозяина.

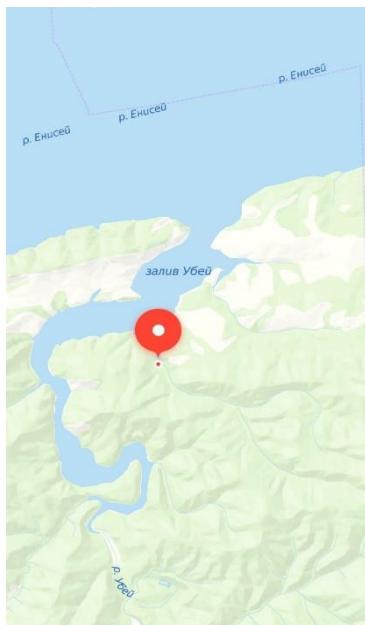
Яйца развиваются в воде, из них вылупляются свободноплавающие ресничные личинки – корацидии. Корацидиев заглатывают планктонные веслоногие рачки, в желудке которых онкосферы освобождаются от оболочек корацидия, проникают в полость тела рачка, где и развиваются в процеркоидов. Вместе с веслоногими рачками процеркоидов заглатывают рыбы. В полости тела последних процеркоиды развиваются в крупных инвазионных плероцеркоидов. На фазе плероцеркоида у ремнецов происходит основной рост и органогенез половой системы.

Птицы являются окончательными, а рыбы – промежуточными хозяевами ремнецов. Личинки ремнецов живут в кишечнике рыбы несколько лет. Большая рыба обычно держится у поверхности воды, брюшко ее вздуто. В теле паразита большое количество жира, являющегося своеобразным поплавком, не позволяющим рыбе уйти на глубину.

Заболевания лигулез и диграмоз, которые вызывают ремнецы, для человека опасности не представляют [20].

2.2 Район исследования

Плотва и лещ отлавливалась в период с июня 2022 на базе учебных практик «Политехник» расположенном на берегу Красноярского водохранилища в заливе реки Убей. Убей — река в Новоселовском и Идринском районах Красноярского края, правый приток Енисея.



Общая длина реки 104 км, площадь 1650 км². Впадает от устья в Енисей на 2644 км, ныне впадает в губу Убей Красноярского водохранилища, расположенную на дне долины.

Рисунок 3 - Район работ (Красноярское водохранилище, залив Убей). Фото взято с googlemaps.

2.3 Отбор проб

2.3.1 Отлов

Невод используется для ловли крупной рыбы в речных, озерных, пляжных и океанских (морских) промыслах. Как правило, принцип основан на забросе лески, ее ловле и вытягивания улова на берег или в лодку. Метод имеет множество преимуществ перед другими способами ловли, представляет из себя специальную снасть, состоящую из плавника, косы и ловушки.

Одним из главных преимуществ невода является то, что он позволяет ловить множество видов рыбы, которую сложно поймать другими способами, например, карасей или лещей. Также невод позволяет поймать большое количество рыбы за один заход, что экономит время и силы.

Невод можно использовать в любое время года, что является еще одним преимуществом. Например, летом его можно использовать при рыбалке на открытых водах, а зимой – при зимней рыбалке.

Еще одно преимущество невода – это то, что он не требует особого мастерства или знаний со стороны рыбака. Достаточно просто установить его на воде и ждать, пока рыба сама не попадет в ловушку.

Кроме того, невод не влияет на экосистему водоема, так как он не травит воду и не портит дно. Это является еще одним преимуществом невода перед другими способами ловли, которые могут нанести вред окружающей среде.

Табл.3. Общее количество проб плотвы, взятых для анализа.

Объект	Длина, см			Масса, г			Выборка, экз
	m	±	SE	m	±	SE	
Плотва без лигулеза	17,6	±	3,9	102,8	±	15,3	5
Плотва с лигулезом	16,9	±	4,6	89,2	±	10,9	5
Лигула	9,3	±	5,6	3,6	±	1,2	3

Примечание: m – среднее значение; SE – стандартная ошибка

Табл.4. Общее количество проб леща, взятых для анализа.

Объект	Длина, см			Масса, г			Выборка, экз
	m	±	SE	m	±	SE	
Лещ без диграммоза	18,2	±	2,2	140,7	±	48,0	4

Лещ с диграммомозом	18,3	±	1,1	124,4	±	15,9	3
Диграмма	8,6	±	0,9	2,3	±	0,2	3

Примечание: m – среднее значение; SE – стандартная ошибка

2.3.2 Общий биологический анализ рыб и морфометрия

Главное требование для измерения рыб — это использование материала, который сохраняет естественную форму.

Метод фиксации рыбы также оказывает значительное влияние на результаты измерения. Для фиксации рыбы используют 2% водный раствор формалина, в который только что пойманную рыбу опускают на несколько часов. Это позволяет сохранить естественный вид рыбы, и избежать их раскрытия. Обработка материалов проводилась в соответствии с общепринятыми методами.

Для измерения выбранной рыбы измеряли ее длину, вес, пол и степень жирности. Для определения степени жирности использовали пятибалльную шкалу Прозоровской. Кроме того, отбирались навески икры у самок для определения плодовитости [27].

Все данные были внесены в чешуйные книжки.

2.3.3 Метод газовой хроматографии, подготовка проб к биохимическому анализу

Для последующего анализа ЖК нам необходимо провести подготовку и очистку липидов. Это проводится в несколько этапов, которые мы и рассмотрим далее.

На первом этапе мы разрушаем клеточные стенки и высвобождаем липиды, тем самым подготавливая материал к последующему метанолизу.

Для количественного определения липидов необходимо добавить в пробу внутренний стандарт (метиловый эфир 19:0, 2 мг/мл). В первую очередь нам потребуется взять 20 мг чистой 19:0 (МЭ) и высыпать в круглодонную мерную колбу объемом 10 мл стандарта. Данную процедуру следует выполнять, соблюдая меры предосторожности и используя воронку. После всего в колбу через воронку наливаем хлороформ, доводя до отметки 10 мл и смывая хлороформом остатки стандарта с фольги и воронки. Таким образом, мы отмерили навеску, необходимую для получения 10 мл внутреннего стандарта с концентрацией 2 мг/мл.

Данный раствор храним при низких температурах и в подписанном флаконе (концентрация и дата приготовления).

Далее нам понадобится механическая обработка пробы с использованием стеклянных бус. Переливаем раствор стандарта и пробы в ступку и добавляем стеклянные шарики. Перетираем до образования однородной массы. При необходимости можно разбавить пробу 1 - 2 мл растворителя - хлороформ:этанола (2:1). Растворитель сливаем через воронку со слоем NaSO_4 в колбу для сбора экстракта липидов. Оставшуюся в ступке массу растираем 2- 3 мин без растворителя. Затем добавляем 2 мл хлороформ-этанола (2:1) и сливаем через воронку в колбу. Промываем слой NaSO_4 2 мл растворителя. И в завершении выпариваем хлороформ на роторном испарителе (35 °C).

Далее мы будем проводить смешанный метанолит с последующей реакцией переэтерификации. Для этого в колбу с экстрактом липидов (без растворителей) добавляем 1 мл NaOH в метаноле. Необходимо с помощью лакмусовой бумаги проверить pH на предмет щелочной среды. Нам нужно получить 30 мл. раствора, для чего мы навешиваем 240 мг NaOH с последующим растворением его в 30 мл метанола и остыванием. Далее помещаем колбу на водяную баню, температура которой должна составлять 95 °C, с обратным холодильником и оставляем ровно на 10 мин. Тщательно протираем холодильник бумажным фильтром при снятии колбы, чтобы не допустить попадания воды в пробу.

Следующим шагом мы добавляем в пробу 1 мл H_2SO_4 в метаноле. Обязательно проверяем pH на предмет кислотной среды. Далее к 30 мл метанола добавляем 900 мкл концентрированной H_2SO_4 . Так как будет происходить активное нагревание раствора, необходимо дать ему остыть. Пробу с раствором возвращаем на водяную баню еще на 10 мин. После снятия с бани, пробу охлаждаем.

Далее необходимо залить в пробу 1 мл насыщенного солевого раствора и 2 мл гексана и перелить пробу в делительную колонку, с последующей промывкой соленой водой. Оставшийся органический слой промываем дистиллированной водой и пропускаем через воронку со слоем Na_2SO_4 . Потом промываем делительную колонку и воронку с Na_2SO_4 гексаном. Из очищенного экстракта выпариваем гексан на ротаторном испарителе при температуре в $35\text{ }^\circ\text{C}$. Полученную пробу необходимо хранить в морозильной камере до анализа.

Таким образом, осуществив процесс смешанного метанолиза мы разрушили сложные эфиры, которые после реакции переэтерификации образуют метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК). Именно МЭЖК используется для газовой хроматографии, так как он летучий и при этом термостабильный.

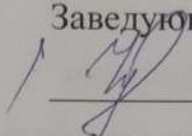
2.3.4 Обработка проб на газовой хроматографии и методом масс-спектрометрии

Метод газовой хроматографии предназначен для разделения термостабильных соединений, используя инертный газ-носитель в качестве подвижной фазы. При этом выбирают водород, гелий, азот, аргон или углекислый газ в качестве газ-носителя. Обычно предпочитают использовать азот, так как он доступнее и дешевле. Газ-носитель приводит к перемещению разделяемых компонентов по хроматографической колонке и не взаимодействует с разделяемыми веществами или неподвижной фазой.

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 М.И. Гладышев

« » 2023 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Влияние полостных паразитов на состав и содержание жирных кислот в
мышечной ткани карповых рыб из Красноярского водохранилища

Руководитель



подпись, дата

доцент, к. б. н.

должность, ученая степень

А.Е. Рудченко

инициалы, фамилия

Выпускник



подпись, дата

Н.П. Зотченко

инициалы, фамилия

Красноярск 2023