

На правах рукописи

Базарсадуева Сэлмэг Владимировна

**ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ СРЕДЫ НА ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ
И НАКОПЛЕНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В ГИДРОБИОНТАХ ОЗЕРА
БАЙКАЛ И ЕГО БАССЕЙНА**

03.02.08 – экология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Улан-Удэ – 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Байкальский институт природопользования Сибирского отделения Российской академии наук.

Научный руководитель: **Раднаева Лариса Доржиевна**
доктор химических наук, профессор

**Официальные
оппоненты:** **Сандакова Светлана Линховоевна**
доктор биологических наук, доцент,
Бурятский государственный университет

Ситникова Татьяна Яковлевна
доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник,
Лимнологический институт СО РАН

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт природных ресурсов, экологии и криологии Сибирского отделения Российской академии наук

Защита состоится «10» апреля 2012 г. в 15⁰⁰ часов на заседании Диссертационного совета Д 212.022.03 при Бурятском государственном университете по адресу: 670000, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а, Биолого-географический факультет, конференц-зал.

Факс: (3012)210588

e-mail: d21202203@mail.ru, bselmeg@gmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Бурятского государственного университета

Автореферат разослан «7» марта 2012 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

 Шорноева Н.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Озеро Байкал - участок мирового природного наследия, старейший (25 млн. лет) и самый большой (23000 км³) пресноводный водоем в мире. Ихтиофауна оз. Байкал уникальна и весьма разнообразна и в настоящее время представлена 55 видами из 15 семейств, из которых 33 вида эндемичные. Важной и сложной задачей является исследование биологических объектов, применяемых для индикационной оценки природной среды. Так, рыбы дают интегральную характеристику состояния водного объекта, являясь объективными индикаторами уровня загрязнения водной среды в целом. Наибольший интерес представляют такие гидробионты как губки, которые практически не меняют место обитания. Они ассоциированы с широким спектром микроорганизмов, содержат большое количество вторичных метаболитов, которые играют важную роль в развитии приспособительных реакций у организмов при экологических модуляциях. Микроорганизмы являются не только хорошими индикаторами, но и единственными компонентами в экосистеме, преобразующие вещества антропогенной природы.

Многочисленными исследованиями показано участие липидов в адаптивных реакциях гидробионтов в ответ на изменение самых разнообразных условий окружающей среды (Carballeira, 1987; Rajendran, 1992; Simoneit, 2004). Поэтому изменения состояния среды могут быть прослежены при сравнительном анализе жирных кислот (ЖК) различных организмов.

В связи с этим исследование формирования липидов гидробионтов различных районов оз. Байкал является актуальным для разработки биоиндикаторных характеристик оценки состояния природной среды.

Цель диссертационной работы – выявление влияния экологических условий среды на формирование и трансформацию липидного состава тканей гидробионтов оз. Байкал.

В соответствии с целью исследования были поставлены следующие

задачи:

1. оценить количественное содержание тяжелых металлов (Mn, Zn, Pb, Cd, Co и Hg) в тканях рыб различного уровня трофической цепи;
2. изучить липидный состав байкальских губок и определить специфические маркеры, позволяющие идентифицировать различные группы микроорганизмов;

Список сокращений: б. – бухта; ГХ-МС – газо-хромато-масс-спектрометрия; ЖК – жирные кислоты; м. – мыс; МГК – метод главных компонент; МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты; МЭ – метиловые эфиры; ТМСЭ – триметилсилильные эфиры; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты.

3. охарактеризовать особенности биоразнообразия микробного сообщества губок оз. Байкал в зависимости от экологических условий среды;
4. выявить зависимость состава ЖК тканей байкальских гидробионтов разных систематических групп от пищевой базы.

Защищаемые положения:

1. Содержание тяжелых металлов Mn, Zn, Pb, Cd, Co и Hg в мышечной ткани рыб р. Кичера различных систематических групп не превышает принятых санитарных нормативов. Установлены различия в депонировании металлов в разных тканях рыб и в зависимости от пола рыб.
2. Методом ГХ-МС изучен состав липидной фракции глубоководных губок и донных осадков. Обнаружено свыше 100 соединений (ЖК, альдегиды и стеринны). По липидным маркерам выявлен состав микроорганизмов губок и донных осадков оз. Байкал, в котором основными микроорганизмами являются представители филумов *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Cyanobacteria*.
3. Распределение основных групп микроорганизмов глубоководных губок и донных осадков оз. Байкал зависит от экологических условий среды. В губках, обитающих в различных районах оз. Байкал на глубинах около 300 м, доминируют микроорганизмы, относящиеся к *Actinobacteria*, на 400-450 м (зона гидротермальной разгрузки б. Фролиха) – *Actinobacteria* и *Proteobacteria*, на 1100-1500 м – *Proteobacteria*.
4. ЖК байкальских гидробионтов зависит от таксономического положения и пищевой базы. Анализ ЖК состава тканей байкальских гидробионтов в ряду «амфиподы-рыбы-нерпа» позволяет проследить взаимосвязь в ряду «добыча – хищник».

Научная новизна. Впервые изучен ЖК состав глубоководных байкальских амфипод Amphipoda (*Crustacea*). Выявлено распределение ЖК, альдегидов и стериннов в глубоководных губках и донных осадках оз. Байкал. Впервые методом ГХ-МС по количественному содержанию липидных маркеров определен состав микроорганизмов глубоководных губок и донных осадков оз. Байкал. Получены новые данные по составу микробного сообщества, ассоциированного с глубоководными губками. Микроорганизмы, принадлежащие родам *Nitrobacter*, *Propionibacterium*, *Pseudonocardia*, *Thiobacillus*, *Anabaena* доминируют в составе губок и не обнаружены в донных осадках, что указывает на то, что они являются симбиотическими. Тогда как во всех образцах донных осадков преобладают микроорганизмы рода *Methylomonas*. Общая численность микроорганизмов в губках выше, чем в донных осадках.

Практическая значимость. Полученные данные могут быть использованы для создания оперативной и эффективной системы мониторинга изменения природных сред и биоты во времени и пространстве, что будет способствовать решению проблемы сохранения

уникального озера планеты, являющегося общемировым природным наследием, источником качественной питьевой воды. Новые данные по липидным маркерам имеют значение для идентификации ряда таксонов, родов и видов микроорганизмов. В губках обнаружен широкий спектр биологически активных веществ, в том числе стерина, которые в перспективе могут быть использованы в качестве лекарственного сырья.

Апробация работы. Результаты и основные положения диссертационного исследования были представлены в докладах на V и VI школе-семинаре молодых ученых России «Проблемы устойчивого развития региона» (Улан-Удэ, 2009, 2011), 7-ом Международном симпозиуме "Современные методы анализа многомерных данных" (WSC-7) (Санкт-Петербург, 2010), Международной научной конференции «Дельты Евразии: происхождение, эволюция, экология и хозяйственное освоение» (Улан-Удэ, 2010), V Международной научно-практической конференции "Приоритеты Байкальского региона в азиатской геополитике России" (Улан-Удэ, 2011), VIII Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды ЭКОАНАЛИТИКА 2011, посвященной 300-летию со дня рождения М.В. Ломоносова (Архангельск, 2011).

Публикации. По результатам диссертационной работы опубликовано 15 работ, из них 2 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобразования РФ.

Работа выполнена в рамках исследований по проектам:

- Программа Президиума РАН № 20.9 "Фундаментальные проблемы океанологии: физика, геология, биология, экология". Подпрограмма «Глубоководные исследования озера Байкал», «Комплексные исследования зон активных разгрузок глубинных флюидов на озере Байкал с помощью автономных необитаемых аппаратов, обитаемых аппаратов «МИР», а также дистанционных пробоотборников» (2008-2011 гг.);
- Международная экспедиция ««Миры» на Байкале» при поддержке Фонда содействия сохранению озера Байкал (2008-2010 гг.);
- РФФИ № 08-05-98029-р_сибирь_a «Формирование и трансформация липидов гидробионтов оз. Байкал в зависимости от эколого-биологических факторов» (2008-2010 гг.).

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста и состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего 206 библиографических ссылок, в том числе 127 на иностранных языках. Диссертационная работа содержит 11 таблиц, 23 рисунка.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Литературный обзор

В главе обобщены и представлены сведения о липидном составе гидробионтов, занимающих различные трофические уровни. Показано, что содержание липидных компонентов могут служить достоверным таксономическим признаком и использоваться для идентификации микроорганизмов. Рассмотрены экологические условия среды, определяющие состав микроорганизмов в губках и донных осадках озера Байкал. Рассмотрено содержание и роль тяжелых металлов в организме рыб различных систематических групп.

Глава 2. Районы, объекты и методы исследований

Районы исследований. Во время Международной экспедиции «Мирь» на Байкале» в 2008-2010 гг. были собраны образцы тканей глубоководных губок, амфипод и донных осадков в различных районах оз. Байкал. Во время погружений на дно озера гидронавтами определено, что полная видимость исчезает уже на глубине 100 м и средняя температура воды составляет около 3.3 – 3.4°C. Далее дано краткое описание дна исследуемых районов.

Бухта Фролиха характеризуется выходами гидротермальной разгрузки. Дно сверху покрыто весьма тонким слоем современных мягких илов, ниже которых залегают валунно-галечный материал, пески и плотные глины, отложившиеся в последний ледниковый период. На поверхности донных осадков развиваются бактериальные обрастания – микробные маты. Температура воды с приближением ко дну увеличивается, что говорит о том, что происходит разгрузка термальных вод (Голубев, 1993, 2007). Места отбора проб представлены на рис. 1.

Близ устья р. Турка во время погружений на дно оз. Байкал были обнаружены древние валунно-галечные пляжи на склонах байкальской впадины (Тулохонов, 2011). Донные осадки представлены плотными алеврито-пелитовыми биогенными илами, смешанными с валунно-галечным материалом.

Посольская банка. Донные отложения в районе газового сипа на Посольской банке представлены тонкими плотными алевритопелитовыми биогенно-терригенными илами, серого, почти оливково-черного цвета.

Мыс Ижимей. Западная часть оз. Байкал в районе мыса Ижимей – это полностью вертикальная стенка каньона. Донные осадки представлены мягкими илами, населенными бентосными организмами – амфиподами.

Баргузинский залив – крупнейший залив оз. Байкал, место поперечного разлома Баргузинского хребта, который отделил от хребта полуостров Святой Нос с южной стороны. Осадки представлены мелкоалевритовыми илами.

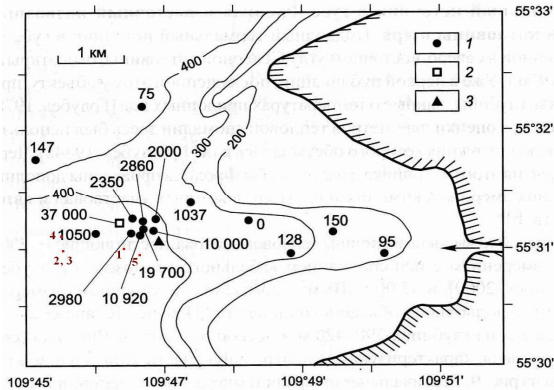


Рис. 1. Распределение тепловых потоков в районе Фролихинского субаквального выхода термальных вод по данным измерений 1976, 1991 и 1993 гг. с теплохода «Академик Бардин»: 1 – пункты и значения тепловых потоков ($\text{МВт}/\text{м}^2$); 2 – пункт, где в июле 1990 г. с подводного обитаемого аппарата «Пайсис» измерен тепловой поток, равный $37000 \text{ МВт}/\text{м}^2$; 3 – место гидротермальной разгрузки, согласно первоначальному его обнаружению в 1976 г. (Голубев, 2007)

Мыс Толстый является одним из уникальных районов озера Байкал, где располагаются места естественного высачивания нефти. Донные осадки представлены тонкими алевритопелитовыми биогенно-терригенными илами, имеют небольшой окисленный слой (0.5–1.0 см).

Объекты исследования

Для исследований были собраны донные осадки и гидробионты оз. Байкал и р. Кичера (бассейн оз. Байкал) различных трофических уровней.

- Гидробионты оз. Байкал. Амфиподы *Amphipoda* (*Crustacea*) ($N=40$) были отобраны с помощью манипуляторов в районе б. Фролиха с глубины 430 м с места выхода гидротермальной разгрузки. Образцы рыб байкальские голомянки (большая и малая) *Comephorus baicalensis* P., *C. dybowski* K. ($N=15$), байкальский омуль *Coregonus migratorius* G. ($N=14$), сиг *C. baicalensis* D. ($N=10$) и хариус *Thymallus baicalensis* D. ($N=7$) были пойманы сетью в Чивыркуйском заливе на восточном побережье озера Байкал ($53^{\circ}40'N$, $109^{\circ}00'E$). Особи байкальской нерпы *Phoca Sibirica* G. были выловлены во время промыслового лова в 2008 г., общее число животных - 11.

- Губки оз. Байкал видов* *Baikalospongia intermedia* ($N=17$), *Baikalospongia intermedia profundalis* ($N=15$), *Baikalospongia bacilifera* ($N=2$), *Baikalospongia martinsoni* ($N=2$), *Lubomirskia abietina* ($N=3$) и

* – определение видовой принадлежности губок выполнено Семитуркиной Н.А. в лаборатории биологии водных беспозвоночных ЛИН СО РАН (зав., д.б.н. Тимошкин О.А.).

Baikalospongia fungiformis (N=4) были отобраны с помощью манипуляторов в летний период 2008 – 2010 гг.

- Донные осадки (6 трубок) оз. Байкал были отобраны в летний период 2008 – 2010 гг. с помощью переносного грунтоотборника и разбирались методом пошагового анализа с частотой 0-2 см.
- Рыбы р. Кичера плотва *Rutilus rutilus* Linnaeus (N=14), окунь *Perca fluviatilis* Linnaeus (N=17) и щука *Esox lucius* Linnaeus (N=4) были собраны в июле 2008 г. (сетной лов).

Методы исследования

Анализ липидных компонентов. Для получения метиловых эфиров ЖК образцы гидробионтов метилировали одноступенчатым методом (Grahl-Nielsen, 1985) обработкой 2 н. раствором хлороводорода в метилом спирте в течение 2 ч. при 90°C. Полученную смесь экстрагировали трижды гексаном.

Для получения триметилсилильных эфиров ЖК образцы губок и донных осадков обрабатывали 1 н. раствором соляной кислоты в метилом спирте и выдерживали в течение 45 минут при 80°C, а затем обработали N,O-бис(триметил-силил)-трифторацетамидом.

Эфиры ЖК далее исследовали методом хромато-масс-спектрометрии на газовом хроматографе Agilent Packard HP 6890 с квадрупольным масс-спектрометром HP MSD 5973N в качестве детектора. Для хроматографирования МЭЖК использовали колонку DB-Wax с внутренним диаметром 0.25 мкм, а для ТМСЭ – колонку HP-5MS с внутренним диаметром 0.25 мкм. Процентный состав смеси вычисляли по площади ГХ пиков. Качественный анализ основан на сравнении времен удерживания, наличии стандартов (Bacterial Acid Methyl Esters (CP Mix, Supelco, Bellefonte, PA, USA), дейтерометилового эфира тридекановой кислоты) и полных масс-спектров соответствующих чистых компонентов, представленных в машинном каталоге.

Хромато-масс-спектрометрическое исследование маркерных компонентов состава микроорганизмов. Метод детектирования микроорганизмов по видоспецифичным высшим ЖК клеточной стенки сходен с генетическим анализом (полимеразная цепная реакция, определение последовательности нуклеотидов 16sРНК и пр.), поскольку ЖК состав детерминирован в ДНК и воспроизводится путем репликации участка генома транспортными РНК и последующего синтеза ЖК по матричным РНК. Для реализации метода использовали хромато-масс-спектрометрию с мультиионным селективным детектированием структурных ЖК – маркеров микроорганизмов. Метод ГХ-МС позволяет детектировать в исследуемых образцах маркеры – клеток широкого спектра микроорганизмов губок и донных осадков (Stead et al., 1992; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1984; Вейант и др., 1999).

По сравнению с традиционными методами бактериологического исследования использование хемодифференциации микроорганизмов с помощью ГХ-МС позволяет сократить время и стоимость исследования, минуя стадии повторных пересевов первичных колоний и тестовых ферментаций, которые особенно сложны, трудоемки и длительны для анаэробов (White, 1988; Турова, Осипов, 1996; Osipov, Turova, 1997).

Для количественного определения химических маркеров микроорганизмов использовали режим регистрации селективных ионов (SIM). Для идентификации всего компонентного состава выполняли полное сканирование по полному ионному току (SCAN). Временные интервалы скорректировали под параметры хроматографической колонки и ГХ-МС прибора. Расчет концентрации маркеров и отнесение их к конкретным микроорганизмам проводили по программному продукту (Осипов, 1993).

Анализ тяжелых металлов. Для определения содержания Pb, Cd, Zn, Mn и Co разложение проводили по ГОСТ 26929-94 «Сырье и продукты пищевые. Подготовка проб. Минерализация для определения содержания токсичных элементов» на атомно-абсорбционном спектрофотометре «SOLAAR». Для определения содержания ртути деструкцию «закрытым способом» проводили по ГОСТ 26927-86 «Сырье и продукты пищевые. Методы определения ртути» на ртутном анализаторе «Юлия 2К».

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку всех экспериментальных данных проводили методом вариационно-статистического анализа. Данные по содержанию липидных компонентов обработали методом главных компонент (МГК) (программный пакет Sirius version 6.0, Pattern Recognition Systems, a/s, Норвегия).

Глава 3. Влияние условий среды на накопление тяжелых металлов в тканях рыб реки Кичера (бассейн оз. Байкал)

Исследовано содержание тяжелых металлов (Pb, Cd, Zn, Mn, Co и Hg), которые являются наиболее опасными и хорошо изученными поллютантами, в печени и мышцах рыб: плотва, окунь и щука. В большем количестве в печени накапливаются цинк, марганец, свинец, кадмий и кобальт, что объясняется функцией печени - органа, где происходит детоксикация ксенобиотиков. На основании данных по количественному содержанию тяжелых металлов в тканях рыб построен ГК-график, из которой видно, что отдельные области соответствуют разным по типу питания рыбам (рис. 2): планктонобентософаги (плотва), весь цикл онтогенеза которых в основном проходит в поверхностных слоях воды, и хищники – окунь и щука (в питании первого наряду с рыбой важное место принадлежит бентосным организмам; рацион щуки состоит исключительно из рыбы).

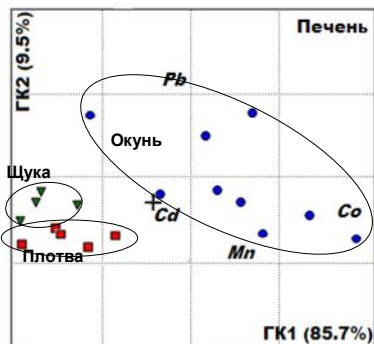


Рис. 2. Распределение образцов рыб по накоплению металлов в печени

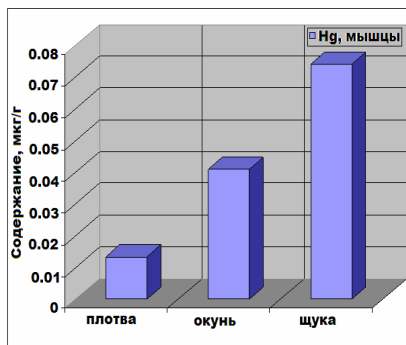


Рис. 3. Содержание ртути в мышцах рыб

Увеличение концентрации токсиканта при переходе от низших трофических уровней к высшим, в нашем случае наблюдается только по ртути, наиболее выражено это в мышечной ткани (рис. 3). Концентрации тяжелых металлов, в том числе и ртути, в исследуемых видах рыб не превышают принятых санитарных нормативов для мышечной ткани рыб, что позволяет сделать вывод о том, что при исследовании содержания тяжелых металлов гидробионтов в остальных районах оз. Байкал полученные результаты можно использовать как фоновые.

Глава 4. Особенности разнообразия микробного сообщества глубоководных губок и донных осадков оз. Байкал: использование липидных компонентов как маркеров определения систематического состава

Губки, являясь мощными тонкими фильтраторами, практически нацело извлекают из воды бактерио- и фитопланктон, служащие им источником питания. Поэтому в губках обитает огромное количество микроорганизмов, которые играют существенную роль в жизнедеятельности губок (Сорокин, 1990; Sponga et al., 1999; Webster et al., 2001).

4.1. Определение разнообразия микроорганизмов губок *Baikalospongia intermedia profundalis* по их липидному составу

Губки вида *Baikalospongia intermedia profundalis* были отобраны в районе м. Толстый, Больших Котов, Посольской банки, м. Ижимей, Баргузинского залива и в районе устья р. Турка. В составе липидной фракции губок *Baikalospongia intermedia profundalis* обнаружено и идентифицировано 92 соединения (различные ЖК, альдегиды и стеринны).

Содержание ЖК достигает 46.6 %. В липидах губок обнаружен ряд насыщенных ЖК от C12 до C24, среди которых доминирующими являются кислоты 14:0, 16:0, 18:0 (до 3.7 %). В образцах губок найдены разветвленные *изо*- и *антеизо*-кислоты с общим числом атомов углерода от C13 до C20, которые имеют бактериальное происхождение (Dalsgaard, 2003; Gillan, 1988). Количество мононенасыщенных ЖК составляет от 11.9 до 14.8 %. МНЖК ряда C20 – C23 и C27 обнаружены практически во всех губках *Baikalospongia intermedia profundalis*. Их содержание ниже, чем C16 и C18 МНЖК. Длинноцепочечная мононенасыщенная кислота 24:1 обнаружена во всех губках в значительном количестве. В губках, отобранных в районе м. Толстый, содержится 6.8 % полиненасыщенных кислот, в губках Больших Котов и Баргузинского залива – от 13.7 до 15.1 % и в губках Посольской банки, Турки и Ижимея – от 21.2 до 25.5 %. Во всех образцах губок преобладает сверхдлинноцепочечная кислота 26:3 от 5.1 до 22.1 %. Определены две циклопропановые кислоты и 5 насыщенных гидроксикислот бактериального происхождения, которые содержатся в минорных количествах.

Суммарное содержание альдегидов составляет 2.5 – 6.0 %. Основным альдегидом в образцах губок Турки, м. Ижимей, м. Толстый и Больших Котов является сверхдлинноцепочечный альдегид 24:1d11a, в губках Баргузинского залива – 16a и i17a, в губках Посольской банки – 16a и 17a, а также длинноцепочечные альдегиды 22:1a и 24:1a.

Количество стеринов колеблется от 38.1 до 65.2 %. Основным компонентом стеринов во всех исследуемых образцах губок является β -ситостерол (11.2-24.6 %). В губках м. Толстый холестерин составляет 22.6 %, однако в губках, отобранных в районе устья р. Турка и Большие Коты, он не был обнаружен и в значительных количествах были определены его производные.

По липидным маркерам определен состав микроорганизмов губок *Baikalospongia intermedia profundalis*. Обнаружено свыше 50 таксонов видового ранга из домена *Bacteria*. Ведущую роль в формировании качественного состава сообщества играют представители филумов *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Cyanobacteria*, но имеются некоторые различия по количественному составу (рис. 4). В губках Баргузинского залива основной вклад в микробный состав вносят *Nocardia carnea* и *Pseudonocardia*, которые относятся к филуму *Actinobacteria*. В губках Ижимея и Посольской банки основной вклад в микробный состав вносят протеобактерии *Nitrobacter*, *Thiobacillus* и *Acetobacterium*. Суммарное содержание актинобактерий в губках, обитающих в районе устья р. Турка, немного больше, чем протеобактерий; преобладают микроорганизмы рода *Pseudonocardia*. Состав микроорганизмов губок, обитающих в Южном Байкале, отличается от микробного состава губок,

обитающих в других местах; основными микроорганизмами являются представители филума *Firmicutes*.

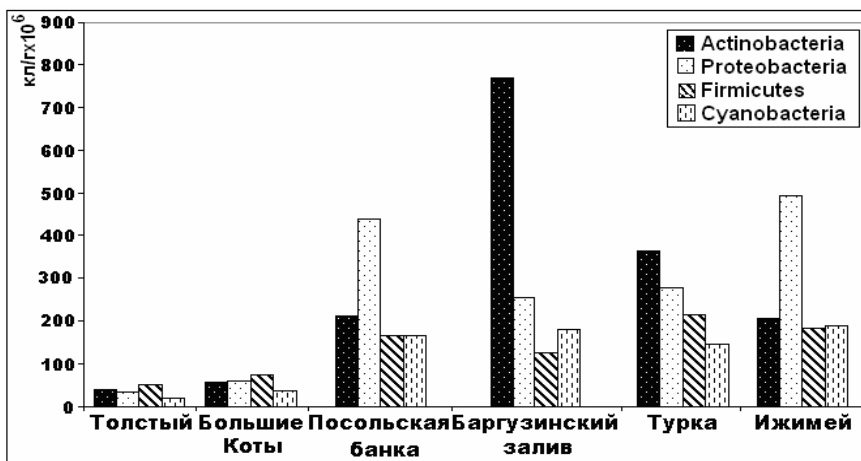


Рис. 4. Распределение групп микроорганизмов в губках *Baikalospongia intermedia profundalis*

При сравнительном анализе состава микроорганизмов образцов губок *Baikalospongia intermedia profundalis* по классам *Proteobacteria* видно, что во всех образцах основными являются β -*proteobacteria* (рис. 5).

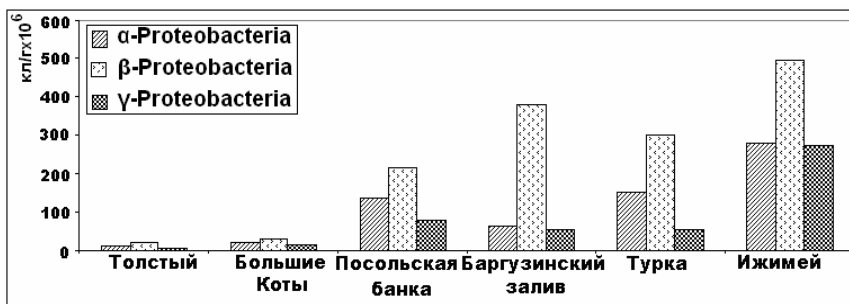


Рис. 5. Распределение классов *Proteobacteria* в губках *Baikalospongia intermedia profundalis*

При обработке данных методом МГК выявлено, что губки одного вида *Baikalospongia intermedia profundalis* с разных районов оз. Байкал, отличаются по составу микроорганизмов, хотя губки, обитающие в одной котловине оз. Байкал, близки по составу, что на ГК-графике отражено близким расположением (Большие Коты и м. Толстый, расположенные в Южном Байкале) (рис. 6).

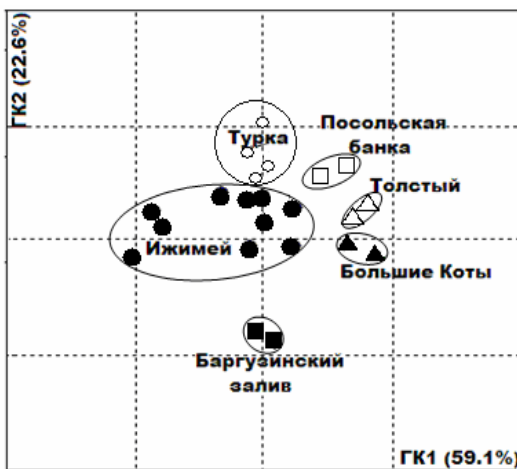


Рис. 6. Распределение губок *Baikalospongia intermedia profundalis* по составу микроорганизмов в зависимости от места обитания

4.2. Определение разнообразия микроорганизмов губок *Baikalospongia intermedia* (б. Фролиха) по их липидному составу

Губки *Baikalospongia intermedia* были отобраны в зоне гидротермальной разгрузки с полей губок и бактериальных матов. В составе липидной фракции обнаружено и идентифицировано 104 соединения. Определен широкий спектр кислот – 64 ЖК различной степени ненасыщенности, которые составляют 60 – 62 %. Сумма насыщенных ЖК составляет 15.9-19.2 %, МНЖК – 21.2-22.4 % и ПНЖК – 17.8-20.2 %. Содержание альдегидов колеблется от 4.0 до 4.5 %, а стеринов – от 26.4 до 30.5 %.

Анализ маркерных компонентов показал, что в микробном составе губок *Baikalospongia intermedia* основными являются микроорганизмы филумов *Actinobacteria* и *Proteobacteria* (рис. 7). Наличие разветвленных гидроксикислот с 15-ю и 17-ю атомами углерода указывает на наличие родов *Azospirillum*, *Cytophaga*. Разветвленные кислоты, в том числе четные (изомиристиновая i14:0, изопальмитиновая i16:0, изонанодекановая i19:0), с учетом их соотношения, указывает на наличие бактерий родов *Streptomyces*, *Bacillus*, *Cellulomonas*. Следует отметить, что в составе биомассы присутствует уникальная изо-гептадеценная кислота (i17:1), известная у сульфатредуцирующих бактерий рода *Desulfovibrio*, однако она также может принадлежать и некоторым *Actinobacteria*. Из других редких ЖК можно отметить эйкозановую (20:1d9), которая присутствует в клетках *Actinobacteria* и *Thiobacillus*. Для *Bacteroidetes* и *Cyanobacteria* маркерными являются оксипальмитиновая (h16) и оксистеариновая (h18) кислоты.

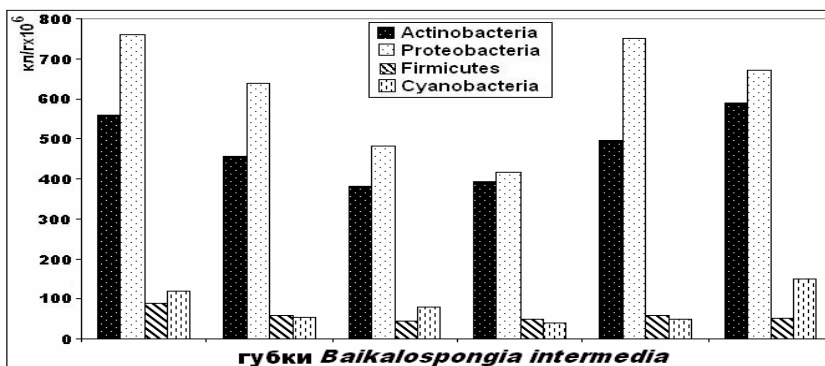


Рис. 7. Распределение основных групп микроорганизмов в губках *Baikalospongia intermedia*

4.3. Определение разнообразия микроорганизмов губок *Baikalospongia intermedia*, *Lubomirskia abietina*, *Baikalospongia intermedia profundalis* и *Baikalospongia fungiformis* по их липидному составу

Губки видов *Baikalospongia martinsoni*, *Baikalospongia intermedia profundalis*, *Lubomirskia abietina* и *Baikalospongia fungiformis* были отобраны в районе древних валунно-галечных пляжей (близ устья р. Турка). В составе липидной фракции обнаружено и идентифицировано 92 соединения. ЖК составляют около 26 % в губках *Baikalospongia martinsoni*, 41 % - в *Baikalospongia intermedia profundalis*, 31 % и 34 % - в *Baikalospongia fungiformis* и *Lubomirskia abietina*, соответственно. Суммарное количество ПНЖК исследуемых видов губок примерно в 3 раза меньше в отличие от губок, отобранных в б.Фролиха, доминирующей кислотой во всех образцах губок также является сверхдлинноцепочечная кислота 26:3.

Содержание альдегидов, входящих в состав липидов исследуемых губок, составляет от 5.3 % в *Baikalospongia fungiformis* до 8.8 % в *Baikalospongia intermedia profundalis*, при этом основным во всех образцах является сверхдлинноцепочечный альдегид 24:1d1a.

Анализ липидной фракции показал, что образцы губок *Baikalospongia martinsoni*, *Baikalospongia fungiformis* и *Lubomirskia abietina* содержат больше стерина, чем *Baikalospongia intermedia profundalis*. Их количество составляет около 40 % в *Baikalospongia intermedia profundalis* и около 50-57 % в остальных губках. Основным компонентом стерина является β -ситостерол (16.0 – 23.8 %). Также выявлено высокое содержание холестерил хлорида в количестве от 7.5 до 11.8 %, хотя сам холестерин не обнаружен в *Baikalospongia martinsoni* и *Baikalospongia intermedia profundalis*. Кампестерол определен в существенных количествах во всех образцах, кроме *Baikalospongia fungiformis*.

По липидным маркерам выявлен состав микроорганизмов губок, обитающих в районе устья р. Турка (рис. 8). Во всех исследуемых губках основными являются микроорганизмы филума *Actinobacteria*, однако в губках *Baikalospongia intermedia profundalis* и *Baikalospongia martinsoni* преобладают не только *Actinobacteria*, но и *Proteobacteria*.

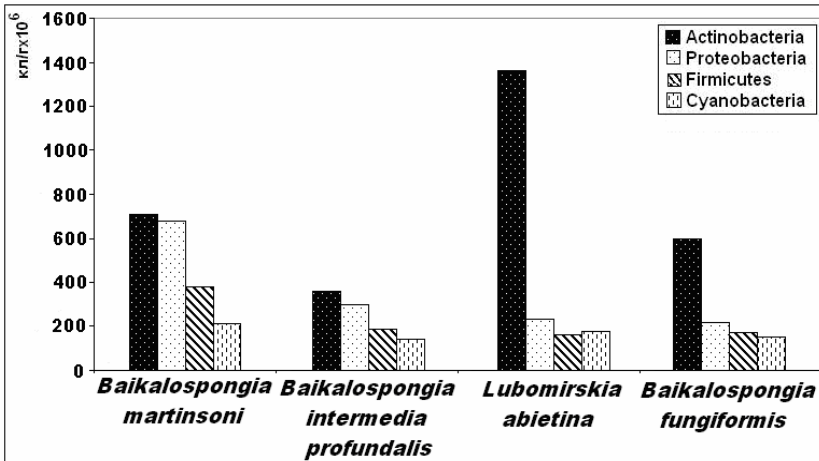


Рис. 8. Распределение основных групп микроорганизмов губок (район устья р. Турка)

При распределении микроорганизмов по классам *Proteobacteria* выявлено, что во всех исследуемых губках преобладают β -*proteobacteria*, кроме губки *Lubomirskia abietina*, в которых наряду с β -*proteobacteria* основными также являются и α -*proteobacteria* (рис. 9).

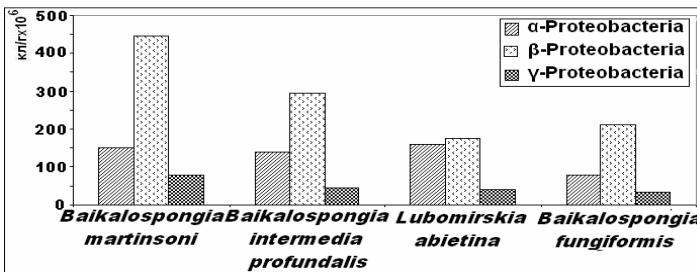


Рис. 9. Распределение классов *Proteobacteria* в губках (район устья р. Турка)

Обработка данных по составу микроорганизмов губок разных видов, отобранных в районе устья р. Турка, указывает на видовую специфичность формирования состава микроорганизмов и, таким образом, позволяет сделать вывод о том, что губки разного вида, но обитающие в одном месте, обладают различным составом микробных сообществ (рис. 10).

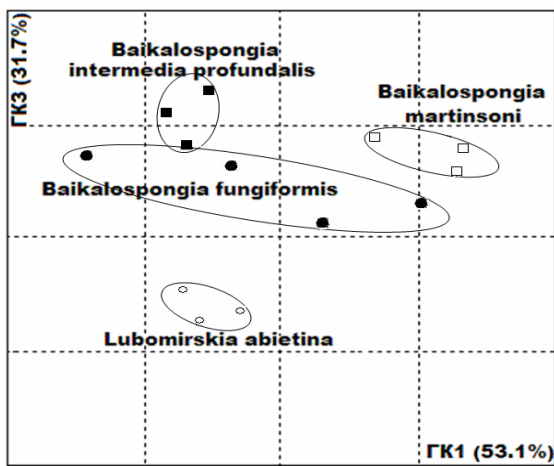


Рис. 10. Распределение губок по составу микроорганизмов (район устья р. Турка)

4.4. Влияние экологических условий среды на систематический состав микроорганизмов губок и донных осадков оз. Байкал

Микробное сообщество донных осадков. Озеро Байкал находится в своеобразной котловине, со всех сторон окружённой горными хребтами и сопками. Образцы донных осадков были отобраны в котловинах оз. Байкал: Южный Байкал - район м. Толстый и Больших Котов; в Среднем Байкале - недалеко от устья р. Турка и м. Ижимей; в Северном Байкале - б. Фролиха.

В составе липидной фракции донных осадков оз. Байкал обнаружено и идентифицировано около 140 соединений (ЖК, альдегидов и стерин). По липидным маркерам определен состав микроорганизмов, по которому выявлено, что во всех образцах донных осадков преобладают микроорганизмы, относящиеся к филуму *Proteobacteria* (рис. 11), в частности родов *Methylomonas* и *Aeromonas*, которые относятся к *γ-proteobacteria* (рис. 12). Маркерными кислотами, по наличию и соотношению которых были определены данные микроорганизмы, являются такие гидроксикислоты как оксисальмитиновая h16 и гидроксимиристиновая 3h14, а также гексадеценвая кислота 17:1.

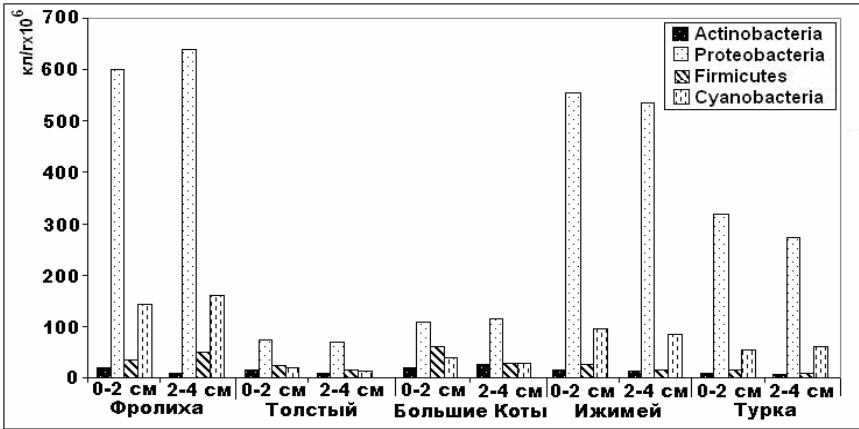


Рис. 11. Распределение микроорганизмов в образцах донных осадков оз. Байкал

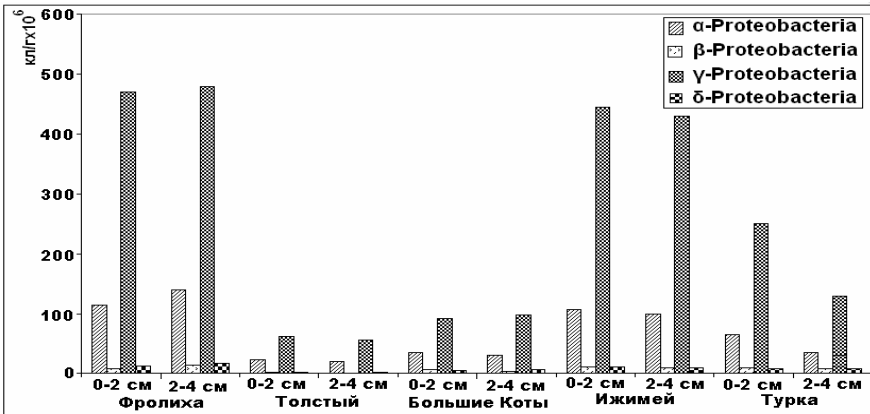


Рис. 12. Распределение классов *Proteobacteria* в образцах донных осадков оз. Байкал

В донных осадках б. Фролиха наблюдается больше микроорганизмов по сравнению с другими исследованными районами, что находится в соответствии с данными более ранних исследований (Черницына, 2003; Namsaraev, Zemskaya et al., 2006).

Статистическая обработка данных методом МГК выявила различия в составе микроорганизмов донных осадков, отобранных в различных районах оз. Байкал: Южный Байкал (Большие Коты, м. Толстый); Средний Байкал (м. Ижимей, район близ устья р. Турка); Северный Байкал (б. Фролиха) (рис. 13). Образцы донных осадков, отобранных из одной котловины оз. Байкал, близки по составу, что на графике ГК указано близким расположением.



Рис. 13. Распределение донных осадков оз. Байкал по составу микроорганизмов

Особенности разнообразия микробного сообщества губок и донных осадков в зависимости от экологических условий среды.

Сравнительный анализ видового разнообразия микробного сообщества губок выявил различия в зависимости от экологических условий среды. В образцах губок, отобранных в районе устья р. Турка на глубине около 300 м, преобладает группа микроорганизмов, относящихся к *Actinobacteria*, в частности микроорганизмы рода *Pseudonocardia*. Тогда как в образцах губок м. Ижмей с глубины около 1100-1500 м преобладают микроорганизмы филума *Proteobacteria*, основными из которых являются *Acetobacterium*, *Nitrobacter* и *Pseudonocardia*. Аналогичная зависимость наблюдается по микробному распределению в толще воды Южного Байкала. Так было выявлено, что на различных глубинах преобладали различные группы микроорганизмов: в поверхностном слое – цианобактерии, на глубине 400 м – актинобактерии, на глубине 1200 м были выявлены представители практически всех подгрупп протеобактерий (Денисова и др., 1999).

В образцах губок, отобранных в б. Фролиха на глубине 400-450 м, основными являются не только актинобактерии (род *Pseudonocardia*), но и протеобактерии (рода *Acetobacterium*, *Nitrobacter* и *Thiobacillus*). Вероятно, это связано с тем, что в б. Фролиха, известной богатым биологическим сообществом, расположен подводный термальный источник, который создает особую экологическую обстановку (Кузнецов, 1991; Crane, 1991; Monastersky, 1991; Гебрук, 1993) и способствует богатому биологическому разнообразию.

Во всех образцах донных осадков оз. Байкал доминируют микроорганизмы, относящиеся к филуму *Proteobacteria*, в частности микроорганизмы рода *Methylomonas*, которые по данным В.Ф. Гальченко

(2001) абсолютно доминируют в донных отложениях пресноводных озер. Также наблюдаются значительные количества микроорганизмов родов *Aeromonas* и *Riemirella*.

При сравнительном анализе микробного состава глубоководных губок и донных осадков, отобранных в одних и тех же районах оз. Байкал, обнаружено, что одни микроорганизмы присутствуют только в составе губок, другие – только в составе донных осадков и большая часть – и в губках, и в донных осадках. Губки становятся убежищами для эндосимбионтов - микроорганизмов, обитающих внутри губок (Dalsgaard, 2003). Так, микроорганизмы, принадлежащие родам *Propionibacterium*, *Pseudonocardia*, *Thiobacillus*, *Anabaena*, которые являются доминирующими в составе губок, не обнаружены в донных осадках, что позволяет сделать вывод о том, что они являются симбиотическими. Основные микроорганизмы донных осадков, *Methylomonas*, не обнаружены в губках. Те микроорганизмы, которые были обнаружены и в губках, и в донных осадках, вероятно, поступают в тело губки во время фильтрации окружающей воды. Выявлено, что общая численность микроорганизмов, ассоциированных с губкой, выше, чем в донных осадках, так как губки практически нацело извлекают из окружающей среды бактерио- и фитопланктон, служащие им источником питания (рис. 14).

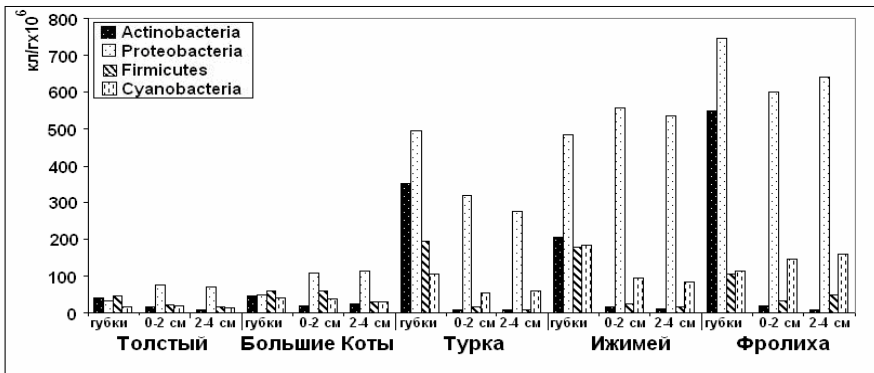


Рис. 14. Распределение микроорганизмов в губках и донных осадках оз. Байкал

Глава 5. Изменения липидов в пищевой цепи «амфиподы-рыбы-нерпа» в оз. Байкал

Для исследования трансформации ЖК по трофической цепи проведен сравнительный анализ ЖК состава глубоководных байкальских амфипод *Amphipoda* (*Crustacea*), мышечной ткани некоторых рыб озера: байкальских голомянок (большая и малая) *Comephorus baicalensis* P., *C. dybowski* K., байкальских омуля *Coregonus migratorius* G., сига *C. baicalensis* D. и хариуса *Thymallus baicalensis* D., а также и липидов

подкожной жировой ткани байкальской нерпы *Phoca sibirica* G., замыкающего звена трофической цепи оз. Байкал.

Несмотря на низкую относительную биомассу, амфиподы составляют существенный компонент в системе обмена вещества и энергии, поскольку являются важным кормовым объектом для многих гидробионтов (Ткач, 2007). Так, на стадии мальков пищевыми объектами практически всех рыб является фитопланктон и амфиподы (Гурова, 1974). В образцах амфипод определено 40 ЖК различной степени насыщенности. Амфиподы были отобраны из глубоководной части оз. Байкал, где температура воды в среднем составляет 3.3–3.4°C. Высокое содержание ненасыщенных ЖК и низкое содержание насыщенных ЖК связано, по-видимому, с низкой температурой и необходимостью поддерживать на определенном уровне «жидкокристаллическое» состояние мембранных структур (Крепс, 1981; Смирнов, 2005).

На основании всех выявленных ЖК гидробионтов был построен МГК график. На ГК-модели можно выделить на плоскости отдельные области, соответствующие разным видам гидробионтов (рис. 15). При этом выявлена наибольшая близость состава липидов байкальских голомянок и подкожного жира нерпы, поэтому байкальские голомянки являются основным пищевым объектом нерпы. Полученные результаты находятся в соответствии с литературными данными, полученными по традиционной методике (Т.М. Иванов, 1936, 1938).

Полученные данные позволяют проследить пищевые взаимоотношения в цепи «амфиподы–рыбы–нерпа». Установлена наибольшая близость ЖК состава амфипод и большой голомянки, малой голомянки и лососевидных рыб (сиг, хариус, омуль); различие состава ЖК в ряду амфиподы – омуль, амфиподы – нерпа. Близость ЖК состава тканей гидробионтов свидетельствует о том, что амфиподы являются основным пищевым объектом для голомянок и в значительной мере для хариуса и сига. Голомянки, в свою очередь, являются пищевым объектом для лососевидных рыб. Данные выводы подтверждаются гидробиологическими исследованиями (Тугарина, 1977; Волерман, 1983; Пронин, 2007). Так, одним из основных компонентов питания омуля является молодь голомянко-бычковых рыб, амфиподы играют незначительную роль. Пищевыми объектами байкальского сига являются амфиподы, моллюски, личинки хирономид и ручейников, а также рыбы.

Основу пищевой базы байкальского хариуса составляют амфиподы, ручейники, моллюски, коттоидные рыбы. Следует отметить некоторую общность рациона хариуса и сига, что также прослеживается и на графике МГК ЖК состава образцов изученных видов. Таким образом, несмотря на различие в концентрациях отдельных кислот в ряду амфиподы – малая голомянка, хариус и сиг, обработка данных методом МГК позволяет

выявить положительную корреляцию, т.е. схожесть состава изученных объектов.

Полученные данные дают представление о сложном механизме формирования ЖК состава тканей гидробионтов, определяющимся не только составом пищи, но и таксономической специфичностью формирования состава ЖК. Использование современных методов статистической обработки данных позволяет выявить основные закономерности формирования липидного состава.



Рис. 15. Принципиальный компонентный анализ ЖК состава липидов рыб и байкальских амфипод, подкожного жира байкальской нерпы.

Выводы

1. Выявлено, что содержание тяжелых металлов Mn, Zn, Pb, Cd, Co и Hg в тканях рыб р. Кичера не превышает санитарных нормативов. При исследовании накопления тяжелых металлов гидробионтов в относительно незагрязненных районах оз. Байкал полученные результаты можно использовать как фоновые.
2. Выявлен липидный состав (около 100 соединений) и определены маркерные компоненты микроорганизмов (ЖК, альдегиды, стерины) в глубоководных губках и донных осадках оз. Байкал методом ГХ-МС.
3. Выявлены особенности распределения основных групп микроорганизмов, которыми являются *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Cyanobacteria*, в глубоководных губках в зависимости от условий обитания. Так, в губках, обитающих на глубине около 300 м, доминируют микроорганизмы, относящиеся к *Actinobacteria*, тогда как в образцах губок с глубины около 1100-1500 м – *Proteobacteria*. В губках, обитающих в районе выходов гидротермальной разгрузки на глубине 400-450 м, преобладают не только актинобактерии, но и протеобактерии.

4. Микроорганизмы, принадлежащие родам *Nitrobacter*, *Propionibacterium*, *Pseudonocardia*, *Thiobacillus*, *Anabaena*, являются доминирующими в составе губок; они не обнаружены в донных осадках, что позволяет сделать вывод, что они являются симбиотическими. Основными микроорганизмами донных осадков являются *Methylomonas*. Общая численность микроорганизмов, ассоциированных с губкой, выше, чем в донных осадках.

5. Впервые изучен ЖК состав глубоководных амфипод *Amphipoda* (*Crustacea*). Обнаружено высокое содержание ненасыщенных и низкое содержание насыщенных ЖК, что, вероятно, обусловлено процессами биохимической адаптации ракообразных к низкой температуре. Установлено, что формирование ЖК состава гидробионтов определяется составом пищи и таксономической специфичностью.

Основные публикации по теме диссертации

Статьи в изданиях, включенных в список ВАК

1. Аверина Е. С. Трансформация жирных кислот гидробионтов оз. Байкал по пищевой цепи / Е. С. Аверина, О. Грахл-Нилсен, С. В. Базарсадуева, Л. Д. Раднаева // Химия природных соединений. – 2010. – №6. – С. 727-731.

2. Пинтаева Е. Ц. Содержание и характер накопления металлов в рыбах р. Кичеры (приток оз. Байкал) / Е. Ц. Пинтаева, С. В. Базарсадуева, Л. Д. Раднаева, Е. А. Петров, О. Г. Смирнова // Сибирский экологический журнал. – №1. – 2011. – С. 87 – 92.

Публикации в материалах конференций

3. Базарсадуева С.В. Изучение жирнокислотного состава и содержания металлов в мышечной ткани рыб реки Кичера республики Бурятия // Ломоносов-2009: материалы междунар. конф. студентов, аспирантов, молодых ученых. – Москва, 2009.

4. Базарсадуева С.В. Изучение состава липидов и содержания металлов в мышечной ткани рыб реки Кичера (Северобайкальский район республики Бурятия) // V школа-семинар молодых ученых России «Проблемы устойчивого развития региона» – Улан-Удэ, 2009.

5. Базарсадуева С.В. Изучение жирнокислотного состава и содержания металлов в органах и тканях рыб р. Кичера республики Бурятия. // Материалы второй международной научно-практической конференции «Экология биосистем: Проблемы изучения, индикации и прогнозирования» – ИД: «Астраханский университет», 2009.

6. Pintaeva E.Ts. Study of heavy metals distribution in organs and tissues of freshwater fishes from Kichera river (Lake Baikal feeder) using PC-analysis / E.Ts. Pintaeva, S.V. Bazarsadueva, L.D. Radnaeva, E.A. Petrov // 7-ой Международный симпозиум "Современные методы анализа многомерных

данных" (WSC-7) – Санкт-Петербург, 2010.

7. Базарсадуева С.В. Содержание и характер накопления тяжелых металлов в печени, почках и мышцах леща *Abramis Brama* Linnaeus оз. Котокель (бассейн оз. Байкал) / С.В. Базарсадуева, Д.В. Попов, Л.Д. Раднаева, Н.Б. Болданова // Тезисы IV Международной научно-практической конференции "Приоритеты Байкальского региона в азиатской геополитике России" – Улан-Удэ, 2010.

8. Грахл-Нильсен О. Жирнокислотный состав глубоководных гидробионтов оз. Байкал. / О. Грахл-Нильсен, Л.Д. Раднаева, С.В. Базарсадуева, Д.В. Попов, Е.С. Аверина // Тезисы докладов Международной научной конференции «Дельты Евразии: происхождение, эволюция, экология и хозяйственное освоение» – Улан-Удэ, 2010.

9. Bazarsadueva S.V. Accumulation of heavy metals by organs and tissues of bream *Abramis Brama* Linnaeus from lake Kotokel / S.V. Bazarsadueva, L.D. Radnaeva, N.B. Boldanova // 3rd EuCheMS Chemistry Congress – Nürnberg (Germany), 2010.

10. Pintaeva E.Ts. Heavy metal contaminants and fatty acid profiles of freshwater fish species in the Severobaikalskiy sor of Lake Baikal: benefit or risk of fish consumption. / E.Ts. Pintaeva, S.V. Bazarsadueva, E.S. Averina, L.D. Radnaeva // 3rd EuCheMS Chemistry Congress, Nürnberg (Germany), 2010.

11. Базарсадуева С.В. Металлы в органах и тканях леща *Abramis Brama* Linnaeus / С.В. Базарсадуева, Д.В. Попов, Н.Б. Болданова, Л.Д. Раднаева // Экологические последствия биосферных процессов в экотонной зоне Южной Сибири и Центральной Азии: Труды Международной конференции – Улан-Батор (Монголия), 2010.

12. Базарсадуева С.В. Исследование липидов губок *Baikalospongia intermedia* и их симбионтов / С.В. Базарсадуева, Л.Д. Раднаева, В.В. Тараскин // Тезисы V Международной научно-практической конференции "Приоритеты Байкальского региона в азиатской геополитике России" – Улан-Удэ, 2011.

13. Базарсадуева С.В. Липиды губок бухты Фролиха оз. Байкал / С.В. Базарсадуева, Ц.Ж. Базаржапов Л.Д. Раднаева, В.В. Тараскин // V школа-семинар молодых ученых России «Проблемы устойчивого развития региона» – Улан-Удэ, 2011.

14. Radnaeva L.D. Study of benthic organisms as bioindicators of ecosystem of Lake Baikal. / L.D. Radnaeva, S.V. Bazarsadueva, V.V. Taraskin, G.A. Osipov. // International Forum on Regional Sustainable Development of Northeast and Central Asia – Beijing (China), 2011.

15. Базарсадуева С.В. Анализ липидной фракции губок *Baikalospongia intermedia* / С.В. Базарсадуева, В.В. Тараскин // VIII Всероссийская конференция по анализу объектов окружающей среды ЭКОАНАЛИТИКА 2011, посвященная 300-летию со дня рождения М.В. Ломоносова – Архангельск, 2011.