

Метаболиты **ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ** в ЖЕЛЧИ ЛЕЩА *Abramis brama* КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ЗАГРЯЗНЕНИЯ РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА

Проведено определение метаболитов полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в желчи леща *Abramis brama* Рыбинского водохранилища с помощью метода флуоресцентной спектрометрии с заданными парами длин волн. Установлено, что рыбы накапливают как низко-, так и высокомолекулярные ПАУ; размерные и половые различия особей не определяют степень накопления ПАУ; рыбы подвергаются наибольшему воздействию загрязнителей в северной и южной частях водохранилища.

Введение

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) встречаются во всех средах жизни. Присутствуя в нефти и нефтепродуктах, угле, саже и эмульсионных маслах, будучи побочными продуктами сжигания топлива, они попадают в водную среду со сбросами, стоками и смывами, осадками и пылевыми частицами. ПАУ, являясь липофильными соединениями, при проникновении в организм способны накапливаться в жировой ткани. Эти соединения обладают иммунотоксическим, канцерогенным, мутагенным и тератогенным действием [1, 2]. Живые системы до определённой степени способны выводить ПАУ, вовлекая их в процесс биотрансформации. Сначала исходное соединение подвергается деятельности ферментов оксигеназ, роль которых заключается в повышении гидрофильности молекул, путём присоединения гидроксильной группы. Затем полученные соединения вступают в реакции с ферментами трансферазами, выво-

В.В. Юрченко, младший научный сотрудник лаборатории физиологии и токсикологии водных животных, ФГБУН Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук

дящими их из организма [3, 4]. В организме рыб наиболее интенсивно процесс биотрансформации проходит в печени, а метаболиты ПАУ, в основном, удаляются с желчью [2].

ПАУ и их метаболиты являются сильными флюорофорами, на этом их свойстве основаны аналитические методы определения данных соединений. Метод флуоресцентной спектрометрии с заданными парами длин волн активно применяется для оценки воздействия ПАУ на организм рыб как в экспериментальных, так и скрининговых натуральных исследованиях, а содержание метаболитов ПАУ в желчи рыб используется в качестве специфического биомаркера загрязнения водной среды [5-9 и др.].

Настоящее исследование проводили на Рыбинском вдхр. (58°30' с.ш., 38°20' в.д.). Водохранилище (рис. 1), образованное в месте слияния рек Волги, Мологи и Шексны, имеет энергетическое, транспортное, рыбохозяйственное и питьевое значение. На берегу р. Шексны расположен промышленный центр Северо-Запада России — г. Череповец. Водохранилище испытывает хроническое загрязнение промышленными сбросами, судоходством, поверхностным стоком с близлежащих территорий, атмосферным переносом. Экосистема водоёма неоднократно подвергалась сильному антропогенному воздействию. Так, в результате неисправностей в работе очистных сооружений Череповецкого металлургического комбината зимой 1986-1987 гг. сточные воды коксохимического производства беспрепятственно поступали в Рыбинское вдхр. Суммарное содержание ПАУ в воде в марте 1987 г. составляло 42 мкг/л [10]. В 1993 г. столкновение судов вблизи г. Череповца вызвало разлив дизельного топлива. Через месяц после этого события содержание нефтепродуктов в воде не

*Адрес для корреспонденции: viksapiksa@gmail.com



Рис. 1. Карта-схема района исследования. Станции отбора проб: 1 — бывшее русло р. Волги, напротив д. Коприно; 2 — бывшее русло р. Мологи, напротив с. Брейтово; 3 — бывшее русло р. Мологи, напротив пристани Первомайка; 4 — бывшее русло р. Шексны, напротив д. Ягорбы, около 60 км от г. Череповца; 5 — бывшее русло р. Шексны, напротив с. Мяксы, около 35 км от г. Череповца; 6 — бывшее русло р. Шексны, рядом с затопленным с. Любец, около 20 км от г. Череповца; 7 — бывшее русло р. Шексны, напротив д. Волково; 8 — устье р. Сутки. Стрелками обозначены направления преобладающих течений.

превышало обычных значений, однако суммарное содержание ПАУ в донных отложениях возросло на порядок [11].

Современные данные по содержанию ПАУ в компонентах экосистемы Рыбинского вдхр. отсутствуют. Измерение содержания метаболитов ПАУ в желчи рыб, отловленных в разных участках водохранилища, позволяет судить о накоплении ПАУ рыбами и, следовательно, о пространственных особенностях загрязнения водохранилища ПАУ.

Материалы и методы исследования

Исследование проводили в конце сентября — начале октября 2012 г. Рыб отлавливали донным тралом (время траления 30 мин, скорость 5 км/ч) на

Рыбинском вдхр., а также неводом в устьевой части р. Сутки, притоке водохранилища (рис. 1). В качестве модельного объекта был выбран лещ *Abramis brama*, относящийся к числу массовых видов рыб Рыбинского вдхр. [12] и регулярно учитываемый методом траловой съёмки. После отлова рыб измеряли промысловую длину и массу особей, отбирали пробы желчи и замораживали их при -18°C . Материалом для исследования послужили пробы желчи 79 рыб.

Определение метаболитов ПАУ проводили полуколичественным методом флуоресцентной спектрометрии с заданными парами длин волн [5]. Данный метод разработан для измерения флуоресценции метаболитов ароматических углеводородов, имеющих от 2 до 6 конденсированных бензольных колец. Пробы желчи размораживали при комнатной температуре и разводили 46 % этиловым спиртом в соотношении 1:1600. Интенсивность флуоресценции измеряли с помощью спектрофлуориметра Perkin Elmer LS55 в 96-луночных планшетах. В лунки вносили по 150 мкл рабочего раствора. Каждую пробу измеряли в трёх повторностях. Использовали три пары длин волн возбуждения и испускания для получения значений интенсивности флуоресценции метаболитов ПАУ, имеющих разное количество бензольных колец: 290/335 нм (2-3 кольца), 341/383 нм (4 кольца) и 380/430 нм (5-6 колец). В каждом режиме измерения ширина щелей возбуждения и испускания была установлена на 2,5 нм, эмиссионный фильтр открыт, и выбран параметр интегрирования результатов многократных измерений одной лунки. Результаты представлены в единицах интенсивности флуоресценции. Значения исследованных параметров приводятся в виде среднего арифметического и его стандартной ошибки.

Статистический анализ результатов проводили с использованием непараметрических методов статистики, т.к. распределение признаков отличалось от нормального. Статистическую значимость различий анализируемых выборок определяли при помощи одностороннего дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса и критерия согласия Колмогорова–Смирнова. Для выявления возможных корреляционных зависимостей содержания метаболитов ПАУ в желчи от длины и массы тела рыб применяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и их обсуждение

В желчи леща, отловленного в 2012 г. на Рыбинском вдхр., присутствовали метаболиты ПАУ, содержащие от 2 до 6 конденсированных бензольных колец. Интенсивность флюоресценции метаболитов ПАУ в желчи *Abramis brama* приведена на рис. 2.

Содержание метаболитов ПАУ, имеющих два и три конденсированных бензольных кольца, отражает диаграмма А. Минимальные (индивидуальное – 2,5 ед. и среднее – $4,1 \pm 0,2$ ед.) значения флюоресценции отмечены в пробах желчи леща из устья р. Сутки. Максимальное индивидуальное значение (14 ед.) зарегистрировано в пробе со станции Первомайка, а наибольшее среднее содержание метаболитов ПАУ ($9,2 \pm 0,8$ ед.) – у рыб со станции Любец.

Интенсивность флюоресценции метаболитов ПАУ, состоящих из четырёх бензольных колец, представлена на диаграмме Б рис. 2. Минимальная интенсивность флюоресценции (4,4 ед.) обнаружена в пробе со станции Коприно. Наименьшее среднее значение зафиксировано в желчи рыб из устья р. Сутки ($5,9 \pm 0,3$ ед.). Индивидуальный максимум (16,9 ед.) выявлен в пробе со станции Первомайка, тогда как наибольшее среднее значение показателя ($12,9 \pm 0,6$ ед.) имела выборка со станции Любец.

Таблица 1

Средние значения длины и массы леща *Abramis brama* Рыбинского вдхр.

Станция	<i>n</i>	Промысловая длина, мм	Масса, г
(1) Коприно	10	312 ± 10 а	641 ± 66 а
(2) Брейтово	11	377 ± 14 б	1233 ± 140 б
(3) Первомайка	10	370 ± 15 б	1212 ± 182 б
(4) Ягорба	9	317 ± 31 аб	856 ± 236 аб
(5) Мякса	12	332 ± 10 аб	773 ± 73 аб
(6) Любец	5	300 ± 7 а	529 ± 44 а
(7) Волково	11	361 ± 14 б	1138 ± 145 б
(8) устье р. Сутки	11	374 ± 9 б	1120 ± 101 б
<i>p</i> -величина		0,001	<0,001

Примечание: номера в скобках соответствуют точкам отбора проб (рис. 1); *n* – количество особей в выборке. Значения длины и массы представлены в виде: среднее арифметическое \pm стандартная ошибка среднего; *p*-величины получены при проведении одностороннего дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса. Значения, сопровождающиеся одинаковыми буквенными индексами, не имеют статистически значимых отличий (критерий Колмогорова–Смирнова, $p < 0,05$).

Ключевые слова: метаболиты полициклических ароматических углеводородов, метаболиты ПАУ, лещ, Рыбинское водохранилище

Содержание метаболитов ПАУ, имеющих пять и шесть бензольных колец, отображено на диаграмме В рис. 2. Наименьшее индивидуальное ($15,3$ ед.) и среднее ($19,4 \pm 0,6$ ед.) значения флюоресценции обнаружены в пробах из устья р. Сутки. Максимальное значение ($35,7$ ед.) зарегистрировано в желчи леща, отловленного на станции Волково. Наибольшее среднее значение флюоресценции ($29,3 \pm 1,4$ ед.) соответствует выборке со станции Любец.

Статистический анализ позволил обнаружить отличия длины и массы рыб, отловленных на разных станциях (табл. 1). При этом анализ корреляционной зависимости интенсивности флюоресценции метаболитов ПАУ в желчи от длины или массы тела особей не выявил статистически значимой связи переменных (коэффициент Спирмена, $|r| \leq 0,17$; $p > 0,05$). Половая принадлежность особей также не влияла на содержание метаболитов (тест Краскела–Уоллиса, $p > 0,05$).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что размерные показатели и половые различия особей не являются характеристиками, определяющими концентрацию метаболитов ПАУ в желчи рыб. Отсутствие подобной зависимости также было отмечено в исследовании влияния нефтяного загрязнения на кефаль в заливе Гуанабара [8].

Ранее в экспериментальных исследованиях показано, что концентрации метаболитов ПАУ в желчи хорошо коррелируют с уровнями воздействия ПАУ на организм рыб [5, 14]. Этот факт также подтверждён натурными исследованиями [7], в которых отмечено, что интенсивность флюоресценции метаболитов ПАУ в желчи рыб зависела от содержания ПАУ в донных отложениях ($r = 0,95$, $p < 0,01$). Таким образом, содержание метаболитов ПАУ в желчи рыб служит надёжным показателем уровня загрязнения водной среды.

В Рыбинском вдхр. лещ образует локальные группировки с ограниченным ареалом [13]. Так как миграция рыб на большие расстояния в отсутствие экстремальных воздействий почти исключена, то уровень содержания метаболитов ПАУ в желчи леща позволяет судить о пространственных особенностях загрязнения водохранилища. Результаты данного исследования свидетельствуют о том, что наименьшему загрязнению водной среды ПАУ подвергается устьевая часть р. Сутки, притока водохранилища. Другие исследованные участки водохранилища испытывают более сильную нагрузку загрязнителей.

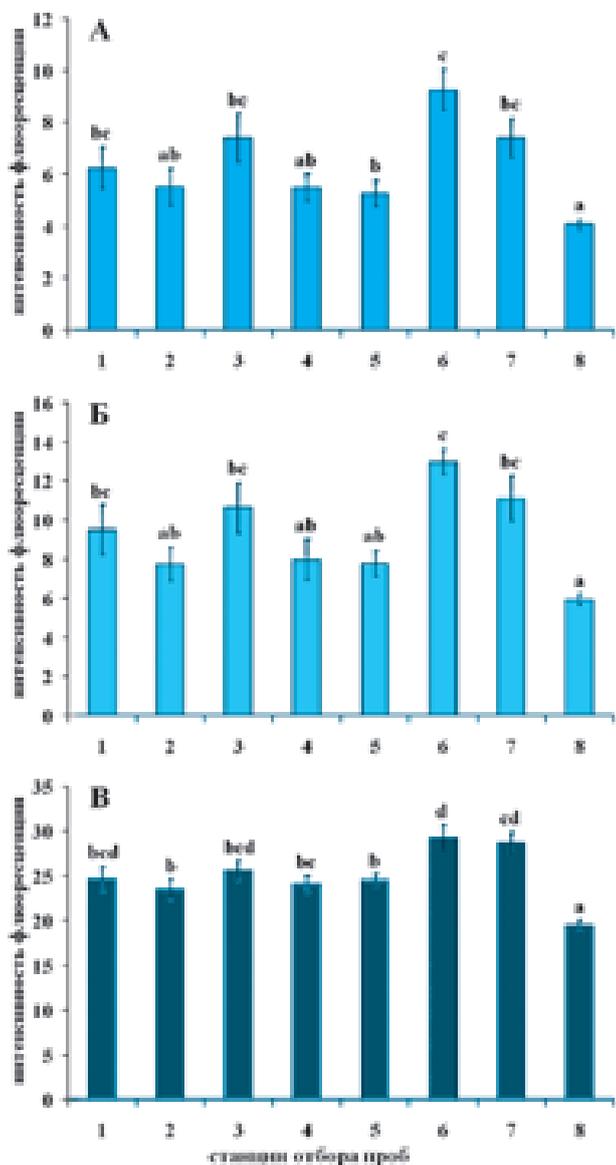


Рис. 2. Интенсивность флюоресценции метаболитов ПАУ в желчи леща *Abramis brama* Рыбинского вдхр.: А – имеющих 2-3 бензольных кольца, Б – имеющих 4 бензольных кольца, В – имеющих 5-6 бензольных колец. Номера столбцов соответствуют точкам отбора проб (рис. 1). На графиках представлены средние значения параметров с доверительными интервалами, построенными на основании значений стандартной ошибки среднего. Буквенные обозначения присвоены столбцам по результатам попарного сравнения выборок с применением критерия Колмогорова–Смирнова.

Пространственное распределение ПАУ в Рыбинском вдхр. изучалось в 1990-1993 г. [11]. В пробах воды присутствовало до 25 соединений ПАУ, 14 из которых было идентифицировано. Это были соединения, содержащие от 2 до 6 конденсированных бензольных колец: нафталин, флуорен, фенантрен, ан-

трацен, флуорантен, пирен, хризен, бензо(b) флуорантен, бензо(k)флуорантен, трифенилен, бензо(a)пирен, дибенз(a,h)антрацен, инденопирен, бенз(g,h,i)перилен. Авторы обнаружили присутствие ПАУ в донных отложениях, воде, моллюсках и рыбе и указали на увеличение содержания этих соединений в северной части Рыбинского вдхр. по мере приближения к г. Череповцу. Согласно полученным нами результатам в настоящее время также наблюдается комплексное загрязнение водохранилища, и неизменно максимальное загрязнение отмечается в северной части водоёма.

Большие количества низкомолекулярных ПАУ присутствуют в выбросах предприятий и могут рассеиваться на значительные расстояния перед тем, как происходит их оседание на поверхность земли или воды, тогда как высокомолекулярные ПАУ, в основном, поступают в водоём со сбросами или стоками и характеризуются градиентным распределением [15]. В соответствии с этим наблюдением следовало ожидать уменьшение содержания метаболитов высокомолекулярных ПАУ в желчи рыб по мере удаления от источника загрязнения, Череповецкого промышленного комплекса. Наблюдаемые на станциях Волково, Первомайка и Коприно высокие показатели содержания в желчи рыб метаболитов с пятью-шестью бензольными кольцами указывают на существенные дополнительные (вероятно, локальные) источники загрязнения водохранилища.

Заключение

Настоящее исследование позволило получить современные данные о содержании метаболитов ПАУ в желчи Рыбинского вдхр. Установлено, что: 1) рыбы накапливают как низко-, так и высокомолекулярные ПАУ; 2) размерные и половые различия особей не определяют степень накопления ПАУ; 3) рыбы подвергаются наибольшему воздействию загрязнителей в северной и южной (приплотинной) частях водохранилища.

Автор выражает благодарность Ю.В. Герасимову за организацию полевых исследований, Д.Д. Павлову и А.А. Морозову за помощь в сборе материала, а также Г.М. Чуйко за обсуждение настоящей работы.

Литература

1. Reynaud S. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: a review / S. Reynaud, P. Deschaux // *Aquat. Toxicol.* 2006. V. 77. P. 229-238.
2. Beyer J. Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: a review / J. Beyer, G. Jonsson, C. Porte, M.M. Krahn, F. Ariese // *Environ. Toxicol. Phar.* 2010. V. 30. P. 224-244.
3. Арчаков А.И. Оксигеназы биологических мембран. М.: Наука, 1983. 56 с.
4. Whyte J.J. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure / J.J. Whyte, R.E. Jung, C.J. Schmitt, D.E. Tillitt // *Crit. Rev. Toxicol.* 2000. V. 30, Iss. 4. P. 347-570.
5. Aas E. Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: an evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation / E. Aas, J. Beyer, A. Goksøyr // *Biomarkers.* 2000. V. 5. No 1. P. 9-23.
6. Gagnon M.M. EROD activity, serum SDH and PAH biliary metabolites in sand flathead (*Platycephalus bassensis*) collected in Port Phillip Bay, Australia / M.M. Gagnon, D.A. Holdway // *Mar. Pollut. Bull.* 2002. V. 44. P. 230-237.
7. Cheevaporn V. Cytochrome P450 1A activity in liver and fixed wavelength fluorescence detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in the bile of tongue-fish (*Cynoglossus acrolepidotus*, Bleeker) in relation to petroleum hydrocarbons in the eastern Gulf of Thailand / V. Cheevaporn, F.W.H. Beamish // *J. Environ. Biol.* 2007. V. 28. No 4. P. 701-705.
8. Neves R.L.S. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in fish bile (*Mugil liza*) as biomarkers for environmental monitoring in oil contaminated areas / R.L.S. Neves, T.F. Oliveira, R.L. Zioli // *Mar. Pollut. Bull.* 2007. V. 57. P. 1813-1838.
9. Wang X.H. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) metabolites in marine fishes as a specific biomarker to indicate PAH pollution in the marine coastal environment / X.H. Wang, H.S. Hong, J.L. Mu, J.Q. Lin, S.H. Wang // *J. Environ. Sci. Heal. A.* 2008. V. 43. P. 219-226.
10. Флеров Б.А. Экологическая обстановка на Рыбинском водохранилище в результате аварии на очистных сооружениях г. Череповца в 1987 г. // Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища / Под ред. Б.А. Флерова. Рыбинск: Изд. ИБВВ АН СССР, 1990. С. 3-11.
11. Козловская В.И. Полихлорированные бифенилы и полиароматические углеводороды в экосистеме Рыбинского водохранилища / В.И. Козловская, А.В. Герман // *Водные ресурсы.* 1997. Т. 24. №5. С. 563-569.
12. Герасимов Ю.В. Ихтиомасса и распределение рыб в Рыбинском водохранилище / Ю.В. Герасимов, Д.А. Новиков // *Экологические проблемы Верхней Волги* / Под ред. А.И. Копылова. Ярославль: ЯГТУ, 2001. С. 194-202.
13. Поддубный А.Г. Экологическая топография популяций рыб в водохранилищах. Л.: Наука, 1971. 312 с.
14. Beyer J. Time- and dose-dependent biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) exposed to benzo[a]pyrene, 2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl (PCB-156) and cadmium / J. Beyer, M. Sandvik, J.U. Skåre, E. Egaas, K. Hylland, R. Waagbø, A. Goksøyr // *Biomarkers.* 1997. No 2. P. 35-44.
15. Siddall R. Relationship between polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) concentrations in bottom sediments and liver tissue of bream (*Abramis brama*) in Rybinsk Reservoir, Russia / S. Siddall, P.W.J. Robotham, R.A. Gill, D.F. Pavlov, G.M. Chuiko // *Chemosphere.* 1994. V. 29. No 7. P. 1467-1476.

V.V. Yurchenko

POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON METABOLITES IN BILE OF *Abramis brama* BREAM AS INDICATOR OF POLLUTION OF THE RYBINSK RESERVOIR

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) were identified in bile of *Abramis brama* bream of the Rybinsk Reservoir using fluorescent spectroscopy method with specified pairs of wave-lengths. It was found that the fish collects low- and high-molecular PAH and collection rate does not depend on fish size and gender differences. And there is the most fish pollution in north and south parties of the reservoir.

Key words: polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites, PAH metabolites, bream, the Rybinsk Reservoir