

## ОЦІНКА ТОКСИЧНОСТІ НІТРАТІВ У ВОДІ З ВИКОРИСТАННЯМ ЦИТОМОРФОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ТЕСТ-ОРГАНІЗМІВ

Верголяс М.Р.

ПВНЗ «Міжнародна академія екології та медицини»  
Харківське шосе, 121, 02091, м. Київ  
[vergolyas@meta.ua](mailto:vergolyas@meta.ua)

Охорона навколишнього середовища, в тому числі й води? є важливим завданням для збереження здоров'я людини. У світовій практиці під час оцінки якості води крім хімічного аналізу проводять сумарну токсикологічну оцінку води, засновану на застосуванні різних методів біотестування. Оцінка якості водного середовища методами біотестування набула особливої актуальності у зв'язку зі стрімким зростанням кількості потенційно небезпечних хімічних сполук, що забруднюють природні джерела питного водопостачання. Особливо в останні роки з'являється все більше інформації як про глобальне поширення нітратів у воді, ґрунті, в харчових продуктах, так і про згубний вплив нітратів на здоров'я людини.

Вода в ряді випадків може відігравати провідну роль у надходженні нітратів і нітритів в організм людини. Надмірне застосування азотовмісних добрив призводить не тільки до накопичення нітратів, а й до зниження харчової цінності продуктів рослинництва, яке виражається в зменшенні вмісту вуглеводів, вітамінів і незамінних амінокислот, зміну складу мінеральних речовин, погіршенні органолептичних властивостей і хлібопекарських якостей. Крім токсичних властивостей нітратів, також треба враховувати можливість участі їх у створенні нітроз'єднань – сильних канцерогенів, тобто речовин, що сприяють розвитку злویкісних пухлин. Метою дослідження була оцінка токсичності води, яка містила нітрати 50 мг /  $\text{dm}^3$ , відповідно до вимог Державної санітарно-гігієнічної норми ДСанПіН 2.2.4-171-10 з використанням гематологічних показників тест-організмів риби *Danio rerio* і шпорцевих жаб *Xenopus*. Зразок води, який містить нітрати 50 мг /  $\text{dm}^3$ , негативно впливає на тест-організми і їх клітини. В їхній лейкоцитарній формулі крові спостерігалось зменшення лімфоцитів внаслідок підвищення кількості лейкоцитів. Виявили аномалії ядер – мікроядра й подвійні ядра в еритроцитах крові досліджуваних гідробіонтів. Спостерігали порушення процесів життєдіяльності у водних тварин у зразку води до очищення від нітратів, відбувалася загибель тест-організмів. Показано вплив проби води до й після очищення від нітратів на показники лейкоцитарної формули крові й структурної цілісності ядра клітин гідробіонтів, перспективність використання такого методу щодо оцінки цито- й генотоксичності водного середовища. *Ключові слова:* нітрати, вода, біотестування, цитотоксичність, генотоксичність, лейкоцитарна формула крові, тест-організми.

### Assessment of nitrate toxicity in water using cytomorphological indicators of test organisms. Vergolyas M.

Protecting the environment, including water, is an important task for maintaining human health. In world practice, when assessing water quality, in addition to chemical analysis, a total toxicological assessment of water is performed, based on the use of various biotesting methods. Assessment of the quality of the aquatic environment by biotesting methods has become especially relevant due to the rapid increase in the number of potentially dangerous chemical compounds that pollute natural sources of drinking water. Especially in recent years, there is growing information about the global spread of nitrates in water, soil, food and the harmful effects of nitrates on human health.

Water in some cases can play a leading role in the entry of nitrates and nitrites into the human body. Excessive use of nitrogen fertilizers leads not only to the accumulation of nitrates, but also to reduce the nutritional value of plant products, which is reflected in the reduction of carbohydrates, vitamins and essential amino acids, changing the composition of minerals, deterioration of organoleptic properties and baking quality. In addition, the toxic properties of nitrates should also be involved in the created nitroso compounds – strong carcinogens, but perhaps this made criminal forces. The aim of study was to evaluate the toxicity of water containing nitrates 50 mg /  $\text{dm}^3$  accordance with STATE STANDARDS 2.2.4-171-10 (State sanitary standards) using hematological parameters of test organisms and fish *Danio rerio* clawed frog *Xenopus*. A sample of water containing nitrates 50 mg /  $\text{dm}^3$  adversely affect the test organisms and their cells. There was a decrease in blood leukocyte formula lymphocytes due to increased number of leukocytes. Detected anomalies of nuclei – micronuclei and double nuclei in red blood cells of the studied aquatic organisms. Observed violations of vital processes in aquatic animals in a sample of water for purification from nitrates, there was the death of test organisms. The influence of water sample before and after purification from nitrates on the indicators of leukocyte blood formula and structural integrity of the nucleus of aquatic cells, the prospects of using this method to assess the cytogenotoxicity of the aquatic environment. *Key words:* nitrates, water, bioassay, cytotoxicity, genotoxicity, wbc blood, test organisms.

**Постановка проблеми.** Проблема забруднення водного середовища нітратами набуває все більшої гостроти в Україні та багатьох країн світу. В цей час відбувається постійне зростання їх концентрації через широке використання нітратних добрив, надлишок яких з ґрунтовими водами надходить в джерела водопостачання.

Зміни екологічних чинників, викликані чимраз більшим антропогенним впливом, призводять до загрозливої ситуації щодо виживання живих організмів і здоров'я людини. Тому в комплексі заходів, спрямованих на запобігання негативним впливам на здоров'я, пов'язаних із чинниками водного середовища, важливе місце повинна займати

оцінка якості води, зокрема її безпечність для людини [1].

В останні роки з'являється все більше інформації про глобальне поширення нітратів як у воді, ґрунті, так і в харчових продуктах, і про згубний вплив нітратів на здоров'я людини.

**Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень.** На організм живих істот впливають нітрати, які є одними небезпечних забруднювачів навколишнього середовища, оскільки основними джерелами надходження цих ксенобіотиків в організм людини є питна вода і харчові продукти [2].

Нітрати характеризуються досить широким спектром токсичної дії. Токсична дія нітратів полягає у тому, що в травному тракті вони частково відновлюються до нітритів (більш токсичних), і останні під час надходження в кров можуть викликати метгемоглобінемію, захворювання на метгемоглобінемію (MtHb). Під впливом деяких видів шлункових мікроорганізмів нітрати відновлюються до нітритів, які блокують утворення гемоглобіну тим, що, відновлюючись, переводять залізо з двовалентного в тривалентне [3], а також пригнічують активність ферментних систем, що беруть участь у процесах тканинного дихання.

Крім того, встановлено, що з нітритів у присутності амінів можуть утворюватись N-нітрозаміни, які виявляють канцерогенну активність. Під час вживання високих доз нітратів з питною водою чи харчовими продуктами через 4–6 годин проявляються характерні симптоми нітратного отруєння. Вода, забруднена нітратами, небезпечна для людей, а особливо для дітей у перші місяці життя. Одним із факторів, що роблять воду небезпечною, є нітрати, які під час перевищення вмісту в складі води призводять до тяжких захворювань, зокрема, до водно-нітратної метгемоглобінемії, яка може стати причиною смерті, а також впливають на роботу нервової та серцево-судинної систем і на розвиток ембріонів, а при довготривалому потраплянні можуть спричинити виникнення злоякісних пухлин, [2, 3].

Джерелами появи нітратів у довкіллі є природний шлях, під час окислення органічних сполук; азотні добрива і перегній; великі сільськогосподарські комплекси; міські звалища, транспорт і промисловість. Джерелами попадання нітратів в організм людини є овочі, фрукти та вода (особливо у системах забезпечення населення водою із відкритих водойм, річок). Що ж до кип'ятіння забрудненої нітратами води, то воно не зменшує, а, навпаки, збільшує її токсичність на 39–86%. Забруднена нітратами вода навіть в смертельних дозах – чиста, прозора, без запаху і видимих домішок, звичайна за смаком. Найбільший вміст нітратів, що часто в десятки разів перевищує допустиму норму, в питній воді у сільській місцевості. Це спричинено тим, що вода в селах фактично не контролюється. Згідно з санітарними правилами та нормами, у воді централізо-

ваного водопостачання вміст нітратів не повинен перевищувати 50 мг/дм<sup>3</sup>.

**Актуальність і мета дослідження.** Активне використання в сільському господарстві мінеральних добрив призводить до підвищення вмісту нітратів у ґрунтах, водах і рослинах. Проблема якості води в децентралізованих джерелах постачання загострюється тим, що приватні криниці, на відміну від джерел громадського користування, не підлягають постійному контролю, зокрема з боку СЕС. У їхнє поле зору вони потрапляють лише в межах здійснення загального санітарного нагляду або у випадках інфекційних спалахів.

У зв'язку із цим розробка ефективних методів оцінки як прямого, так і опосередкованого впливу техногенних та інших забруднювачів на живі організми стає все більш актуальною. Антропогенні зміни водних екосистем не можуть не відбиватися на фізіологічному стані гідробіонтів. Розробка оптимального для конкретних умов і одночасно технічно простого, універсального комплексу біотестів для виявлення токсичних факторів і речовин актуальна для визначення забруднення довкілля нітратами, зокрема оцінки якості природних і питних вод як на рівні організму, так і на рівні клітини, її геному.

Використання цито- і генотоксичних способів оцінки якості водного середовища за допомогою тест-організмів риб та жаб є універсальним, короткостроковим, простим і важливим біомаркером для виявлення токсичних речовин, що забруднюють довкілля [4]. Поширеність тестів із гідробіонтами пов'язана, з одного боку, зі зручністю їх утримання в лабораторних умовах, а з іншого – тим, що тест-організм перебуває безпосередньо в досліджувальному розчині, а також вони реагують на токсичний вплив подібно до ссавців [4; 5].

Для визначення токсичності води використовували організми риби й жаби та їх периферичну кров, які були в контрольній та у забрудненій нітратами воді.

Аналіз мікроядер, як метод дослідження генотоксичності та біомаркер генотоксичного ризику для людини останнім часом набуває все більшої популярності. В порівнянні з тестом на хромосомні аберації, підрахунок мікроядер є простішим, але не менш важливим методом, займає менше часу, тобто мікроядерний тест в силу своєї простоти та можливостей швидкого аналізу стає методом скринінгу хімічних з'єднань на генотоксичність. Ще однією перевагою цього методу є те, що він дозволяє проводити оцінку рівня хромосомних порушень по аналізу інтерфазного ядра, тобто не вимагає наявності клітин в мітозі на відміну від тесту на індукцію хромосомних аберацій [5; 6].

Для оцінки цитотоксичності водних зразків досліджують вплив токсичних речовин на тест-організм (рибу, жабу), а саме на їх клітини крові лейкоцити. У визначенні цитотоксичності водного середовища як біомаркер використовують формені

елементи крові, визначають кількість формених елементів (лейкоцитів), та за їх співвідношенням в контрольному і дослідному зразках здійснюють оцінку цитотоксичності водного середовища [4].

Таким чином, дослідження цитоморфологічних параметрів клітин крові дозволить одержати інформацію про стан імунітету особини, рівня впливу стресових чинників і стабільності геному (по частоті мікроядер та ядерних аномалій в еритроцитах), що в сукупності з іншими параметрами, одержуваними при популяційних дослідженнях (генотип, особливості морфології), може дати відомості, надзвичайно корисні у практичному й у теоретичному відношенні.

**Матеріали та методи досліджень.** В роботі аналізували зразки вод з вмістом нітратів (50 мг/дм<sup>3</sup>) та воду після очищення від нітратів. Контрольну воду готували в лабораторних умовах згідно з рекомендаціями ДСТУ 4174: 2003 (Державний стандарт України).

Біотестування проводили на 30 дорослих особинах риб *Danio rerio* масою тіла 2–4 грамів і шпорцевих жабах *Xenopus* масою тіла 50–80 грамів, культивованих в лабораторних умовах на базі Міжнародної Академії Екології та Медицини. Тест-організми були розділені на 3 групи по 10 особин. Кожну групу поміщали в акваріуми з контрольною, до і після очищення від нітратів, водою. Після експозиції через 96 годин у кожній особини з вени брали зразки крові. У риб кров брали з хвостової вени, у жаб – з вени задньої лапи. З відібраної крові робили мазки, фіксували 96% етиловим спиртом впродовж 30 хв., висушували та фарбували 15 хв. розчином азур-еозину за Романовським. Аналіз периферичної крові проводили за стандартною методикою [6]. Також визначали кількість клітин з мікроядрами та подвійними ядрами в контрольній та досліджуваній групах. Потім проводили порівняльний аналіз кількості утворених мікроядер та подвійних ядер. Частота утворення мікроядер (далі – МЯ) та подвійних ядер (далі – 2Я), а саме величина відхилення від контролю, була використана для оцінки генотоксичності води. Кількість клітин, проаналізованих для кожної риби, складала 3000.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням методів варіаційної статистики за допомогою програм статистичного аналізу Microsoft Excel. Розраховували середнє арифметичне, середнє відхилення, похибку середнього арифметичного. Відмінність показників визначали по t-критерію Стьюдента [7].

**Результати експерименту.** Досліджені зразки вод, отримані після очищення від нітратів із використанням нових цитогенетичних підходів, з'ясовано принцип їх впливу на тест-організм (риби, жаби) та на їхні клітини – структурні та функціональні зміни геному (гено- та цитотоксичність). Проведені дослідження на клітинному рівні, а саме було показано зміни у лейкоцитарної формули крові риб *Danio rerio* та жаб *Xenopus*, а також генетичні зміни за мікроядерним тестом на клітинах крові – еритроцитах. Використання цих методів дає можливість визначення цитотоксичності та генотоксичності водного зразка на клітинному рівні.

Зразок води до очищення від нітратів негативно впливає на тест-організми та їх клітини. Спостерігалось у лейкоцитарної формули крові зменшення лімфоцитів внаслідок підвищення кількості лейкоцитів. Виявили аномалії ядер (мікроядра та подвійні ядра) в еритроцитах крові досліджуваних гідробіонтів. Спостерігали порушення процесів життєдіяльності у водних тварин у зразку води до очищення від нітратів, відбувалася загибель тест-організмів риби 70%, жаби 40%. Отримані дані в зразках води після очищення від нітратів були на рівні контролю. Результати дослідження впливу зразків вод до і після очищення від нітратів зображено в таблицях 1, 2.

У результаті проведеного експерименту, при дослідженні проб води до і після очищення від нітратів на клітинному рівні у риб *Danio rerio* та жаб *Xenopus* за показниками формених елементів периферичної крові, цитотоксичний ефект виявляла вода до очищення від нітратів в порівнянні з даними контрольної води. Збільшення кількості еозинофілів, базофілів і моноцитів в пробі вказує на прояву цитотоксичного ефекту, а дані води після очищення від нітратів наблизилися до показників контрольної води.

Таблиця 1

**Зміна складу формених елементів крові *Danio rerio* та *Xenopus* в досліджуваних зразках води до і після очищення від нітратів**

Клітини крові, %	Лімфоцити		Моноцити		Сегментоядерні нейтрофіли		Паличкоядерні нейтрофіли		Базофіли		Еозинофіли	
	риби	жаби	риби	жаби	риби	жаби	риби	жаби	риби	жаби	риби	жаби
Зразки води												
Контроль	86,7	84,9	4	5	5,2	6,2	1,6	1,8	1,7	1,6	0,8	0,5
До очищення 50 мг/дм <sup>3</sup>	68,4	70,2	9,2	8,4	5,6	5,9	2,4	2,2	6,8	6,2	7,6	7,1
Після очищення	85,2	84,4	4	6	5,2	5,6	1,6	1,4	2,4	1,8	1,6	0,8

**Генотоксичний вплив досліджуваних вод до і після очищення від нітратів на клітини крові *Danio rerio* та *Xenopus***

Тест-організми, Зразки води	риби, n=10		жаби, n=10	
	МЯ, г-‰	2N, г-‰	МЯ, г-‰	2N, г-‰
Контроль	0	0	0	0
До очищення, 50мг/дм <sup>3</sup> (риби 30%, жаби 60%*)	2,67	4	1,99	3,33
Після очищення	0	0	0	0

Примітка: г – кількість клітин з порушенням мітозу на 3000 клітин; МЯ – клітини з мікроядра; 2N – клітини з подвійними ядрами; \* – кількість організмів, що вижили

За частотою еритроцитів з подвійними ядрами та мікроядрами в периферичній крові риб *Danio rerio* та *Xenopus* генотоксичний ефект проявила вода до очищення від нітратів від 1,99‰ до 4‰. У пробі після очищення від нітратів генотоксичний ефект не спостерігався у порівнянні з даними контрольної води. Досліджено вплив проби води до і після очищення від нітратів на показники структурної цілісності ядра клітин гідробіонтів, показано перспективність використання такого методу вивчення генотоксичних властивостей проб води.

Для визначення токсичності водного зразка до і після очищення води від нітратів запропоновано використання лейкоцитарної формули крові гідробіонтів як біомаркера. Визначення набору формених елементів крові – паличкоядерні нейтрофіли, сегментоядерні нейтрофіли, еозинофіли, базофіли, моноцити, лімфоцити – у досліджуваних риб та жаб, які перебували у контрольних та токсичних (до очищення від нітратів) водних зразках, дозволяє одержати повнішу картину впливу нітратів на тест-організм на клітинному рівні. Це своєю чергою підвищує чутливість і інформативність методу щодо оцінки цитотоксичності водного середовища.

**Висновки.** Отже, у результаті проведених досліджень було встановлено, що клітинні біомаркери та визначення формули крові додатково до стандартизованих тестів можуть бути використані для об'єктивної та всебічної оцінки токсичності органічних і неорганічних речовин і забруднення природних водойм різного ступеню.

Людина ризикує, регулярно вживаючи питну воду з нітратами (50 мг / дм<sup>3</sup>) і різними хімічними речовинами навіть в межах гранично допустимої концентрації. Система моніторингу якості вод в Україні, як і в більшості інших країн світу, дає оцінку перевищення хімічних елементів, в основному токсикантів, до їх показників, що лімітуються гранично допустимою концентрацією для водних об'єктів. Значення гранично допустимої концентрації на вимоги ДСанПіН практично не враховують специфіку формування якості вод, в тому числі поведінку антропогенних сполук і природну вразливість водних екосистем до дії забруднення і їх комбіновані ефекти. Також невідомо, наскільки ці ефекти небезпечні для живих організмів і життєдіяльності людини.

### Література

1. Левич А. П., Булгаков Н.Г., Максимов В.Н. Теоретические и методические основы технологии регионального контроля природной среды по данным экологического мониторинга. Москва : НИИ-Природа, 2004. 71 с.
2. Gupta S.K., Gupta R.C., Gupta A.B., Seth A.K., Bassin J.K., Gupta A. Recurrent acute respiratory tract infection in areas with high nitrate concentrations in drinking water. *Environmental Health Perspectives*. 2000. Vol. 108. № 4. P. 363–366.
3. Патица В.П., Макаренко Н.А., Моклячук Л.І. Агроекологічна оцінка мінеральних добрив та пестицидів : монографія. Київ : Основа, 2005. 300 с.
4. Vergolyas M. Safety analysis of drinking water on the test-organisms. *Біоресурси і природокористування*. 2019. № 3–4. URL: <https://doi.org/10.31548/bio2019.03.004> (дата звернення: 05.08.2019).
5. Tsangaris C., Vergolyas M., Fountoulaki E., Nizheradze K. Oxidative stress and genotoxicity biomarker responses in grey mullet (*Mugil cephalus*) from a polluted environment in Saronikos Gulf, Greece. *Achieves of Environmental Contamination and Toxicology*. 2011. № 61. P. 482–490.
6. ДСТУ 7387: 2013 Якість води. Метод визначення цито- та генотоксичності води і водних розчинів на клітинах крові прісноводної риби Даніо реріо (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). [Чинний від 2013-07-01]. Київ, 2013. 26 с. (Інформація та документація).
7. Антомонов М.Ю. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных. Киев, 2006. 558 с.