

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ НИТРАТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ РАЗНЫХ ТКАНЕЙ РЫБ КАК БИОМАРКЕРА

© М. Р. Верголяс

Проведен биологический анализ водных образцов содержащие разные концентрации нитратов. Описывается влияние нитратов на организм и клетки рыб. Получены данные о негативном влиянии ПДК нитратов в воде. Показано, что при токсическом влиянии нитратов на организм рыб происходят изменения количественного состава лейкоцитов периферической крови, также отмечены структурные изменения ядер клеток в различных тканях. Обнаружено, что нитраты, содержащиеся в пробах воды, имеют цитогенотоксический эффект

Ключевые слова: питьевая вода, нитраты, генотоксичность, цитотоксичность, лейкоцитарная формула крови рыб

A biological analysis of aqueous samples containing different concentrations of nitrates is conducted. An influence of nitrates on the organism and the cells of fish is described. Data were obtained about the negative influence of maximum permissible concentration of nitrates in the water. It has been shown that the toxic effect of nitrates on an organism of fish is changing the quantitative composition of peripheral blood leukocytes, and observed the structural changes of cell nuclei in various tissues. It was found that the nitrates contained in the water samples have cyto-and genotoxic effect

Keywords: drinking water, nitrates, genotoxicity, cytotoxicity, WBC fish blood

1. Введение

Проблема загрязнения водной среды нитратами приобретает все большую остроту в большинстве стран мира, включая Украину. В настоящее время происходит постоянный рост их концентрации из-за широкого использования нитратных удобрений, избыток которых с грунтовыми водами поступает в источники водоснабжения.

Смена экологических факторов, вызванных возрастающим антропогенным влиянием, приводят к угрожающей ситуации касающейся выживания живых организмов и здоровья человека. Поэтому в комплексе мероприятий, направленных на предотвращение негативным влиянием на здоровье, связанных с факторами водной среды, важное место должна занимать оценка качества воды, в частности её безопасность для человека [1].

В последние годы появляется все больше информации о глобальном распространении нитратов как в воде, почве, так и в продуктах питания и о пагубном воздействии нитратов на здоровье человека.

2. Анализ литературных данных и постановка проблемы

На организм живых существ влияют нитраты, которые являются одними опасных загрязнителей окружающей среды, поскольку основными источниками поступления этих ксенобиотиков в организм человека есть питьевая вода и продукты питания [2, 3].

Нитраты характеризуются достаточно широким спектром токсического действия на живые организмы. Токсическое действие нитратов состоит в том, что в пищеварительном тракте они превращаются в нитриты, которые при поступлении в кровь вызывают метгемоглобинемию. Это присутствие в крови метгемоглобина – продукта окисления гемоглобина ядами нитратов и/или нитритов. Также под влия-

нием некоторых видов желудочных микроорганизмов нитраты восстанавливаются до нитритов, которые блокируют образование гемоглобина тем, что, восстанавливаясь, переводят железо из двухвалентного в трехвалентное [4], а также угнетение активности ферментных систем, участвующих в процессах тканевого дыхания.

Кроме того, установлено, что из нитритов в присутствии аминов могут образовываться N-нитрозамины, которые проявляют канцерогенную активность. При употреблении высоких доз нитратов с питьевой водой, или продуктами питания через 2–4 часов проявляются характерные симптомы нитратного отравления. Постоянное употребление воды с повышенным содержанием нитратов приводит к заболеваниям крови, сердечнососудистой системы. Негативно влияют на работу центральной нервной системы, так же и на развитие эмбрионов. Нитраты в концентрации более 20 мг/дм³ оказывают токсическое действие на организм человека [3].

Согласно санитарным правилам и нормам, в воде централизованного водоснабжения содержание нитратов не должно превышать 45 мг/дм³.

Источниками нитратов в окружающей среде являются:

- природным путем, при окислении органических соединений;
- азотные удобрения и перегной;
- большие сельскохозяйственные комплексы;
- городские свалки,
- транспорт и промышленность.

Источниками попадания нитратов в организм человека являются: овощи, фрукты и вода (особенно в системах обеспечения населения водой из открытых водоёмов, рек). Что касается кипячения загрязненной нитратами воды, то оно не уменьшает опасность воды, а наоборот, увеличивает её токсичность.

Загрязненная нитратами вода даже в смертельных дозах – чистая, прозрачная, без запаха и видимых примесей, обычная на вкус [5].

3. Цель и задача исследования

Активное использование в сельском хозяйстве минеральных удобрений приводит к повышению содержания нитратов, которые с грунтовыми водами поступает в источники водоснабжения. Содержание нитратов, часто в десятки раз превышает допустимую норму в питьевой воде. Проблема качества воды из децентрализованных источников поставок заостряется тем, что не подлежат постоянному контролю, в частности со стороны СЭС. В их поле зрения они попадают только в рамках осуществления общего санитарного надзора или в случаях инфекционных вспышек.

В связи с этим разработку эффективных методов оценки как прямого, так и опосредованного влияния техногенных и других загрязнителей на живые организмы становится всё более актуальной. Антропогенные изменения водных экосистем не могут не отражаться на физиологическом состоянии гидробионтов, в частности рыб.

Использование цито- и генотоксических способов диагностики качества водной среды при помощи рыб, является кратковременным, одновременно технически простым, универсальным и важным биотестом для выявления токсических факторов и веществ, загрязняющих окружающую среду, в частности для оценки качества природных и питьевых вод [6]. Распространенность тестов с рыбами связана с одной стороны с удобством их содержания в лабораторных условиях и тем, что тест-организмы пребывает непосредственно в исследуемых водных образцах, а также рыбы реагируют на токсическое влияние подобно млекопитающим [7, 8].

Анализ микроядер, как метод исследования генотоксичности и биомаркер генотоксического развития для человека, последнее время приобретает все большей популярности. В сравнении с тестом на хромосомные aberrации, подсчет микроядер является более простым, но не менее важным методом, занимает меньшее количество времени, т.е. микроядерный тест в силу своей простоты и возможности быстрого анализа становится методом скрининга химических соединений на генотоксичность. Ещё одним преимуществом этого метода является то, что он позволяет проводить оценку уровня хромосомных нарушений по анализу интерфазного ядра [6, 9, 10].

Для оценки цитотоксичности водных образцов исследовали влияние токсических веществ на кровь тест-организма (рыбу), а именно на лейкоциты крови. В определении цитотоксичности водной среды, как биомаркер использовали форменные элементы крови рыб. Определяли количество форменных элементов (лейкоцитов), и по их соотношению в контрольном и опытном образцах осуществляли оценку цитотоксичности водной среды [7, 11, 12].

4. Методика эксперимента

Для определения токсичности водных образцов использовали рыбы *Danio rerio* (L.) 50 экземпляров, также брали у них различные ткани, которые находились в контрольной и в загрязненной нитратами воде с концентрациями 5 мг/дм³, 10 мг/дм³, 20 мг/дм³ и 45 мг/дм³. Контрольная вода была приготовлена в лабораторных условиях согласно рекомендациям ДСТУ 4174:2003.

После экспозиции 96 часов у выживших рыб отбирали кровь из хвостовой вены, брали кусочек ткани жаберной дуги, хвостового плавника и из них готовили цитологические препараты. Из полученной крови делали мазки, фиксировали 96 % этиловым спиртом на протяжении 30 минут, высушивали и красили 15 мин. Раствором азур-эозина по Романовскому-Гимза. Кусочки ткани жаберной дуги и хвостового плавника фиксировали смесью глицерина, уксусной кислоты и дистиллированной воды при объёмном соотношении (1:1:10), соответственно. Полученные отпечатки тканей также красили по Романовскому-Гимза на протяжении 45 минут.

Анализ препаратов проводили под световым микроскопом, при общем увеличении $\times 1000$, и определяли количество клеток с микроядрами и двойными ядрами в контрольной и исследуемой группах. Затем проводили сравнительный анализ количества образованных микроядер и двойных ядер. Частота образования микроядер (МЯ) и двойных ядер (2Я), а именно величина отклонения от контроля была использована для оценки генотоксичности воды. Количество клеток, проанализированных для каждой особи (рыбы) составила 3000. Статистическая обработка проводилась стандартными методами, токсический эффект считается действительным при статистически достоверной разнице с контролем [13]. Для определения формулы крови в разных участках мазка подсчитывали 250 клеток, идентифицировали их по классификации, предложенной Н. Т. Ивановой [14], затем высчитывали процент каждого типа клеток. Также определяли цитотоксичность и специфичность формулы крови у рыб как биомаркер [7, 15].

5. Результаты исследование токсического влияния нитратов разной концентрации

Результаты исследования влияния образцов вод, содержащиеся нитратов на эритроциты крови, а также ткани рыб (жабры и хвостовой плавник), отображено в табл. 1.

В образцах вод загрязненными нитратами в концентрации 45 мг/дм³ погибли 30 % тест-организмов, в концентрации 20 мг/дм³ смертность достигла 50 % и в концентрации 10 мг/дм³ 20 %, соответственно. Во всех тканях общий уровень клеток с нарушениями митоза достоверно возрастал ($p < 0,05$) при действии трех концентраций нитратов 10 мг/дм³, 20 мг/дм³ и 45 мг/дм³ от 0,33 % до 4 % в сравнении с контролем, данный рост носил дозозависимый характер (табл. 2).

Таблица 1

Генотоксическое влияние исследуемых вод на различные ткани рыб *Danio rerio* (L.) после экспозиции (96 часов)

Тип клеток	Вид ядерных аномалий	Образцы исследуемых вод				
		Контроль г-‰	NO ₃ ⁻ 5мг/дм ³ , г-‰	NO ₃ ⁻ 10мг/дм ³ , г-‰	NO ₃ ⁻ 20мг/дм ³ , г-‰	NO ₃ ⁻ 45мг/дм ³ , г-‰
Эритроциты	мЯ	0	0	0,33	0,66	2,33
	2N	0	0	1	0,99	4
Клетки жабр	мЯ	0	0	0	0,66	2,33
	2N	0	0,33	0,33	0,66	3,66
Клетки хвостового плавника	мЯ	0	0	0	0,66	1,99
	2N	0	0	0,33	0,33	3,66
Количество выживших тест-организмов, %		100	100	80	50	30

Примечание: г – количество клеток с нарушением митоза на 3000 клеток; мЯ – клетки с микроядрами; 2Я – клетки с двойными ядрами

Таблица 2

Изменение состава форменных элементов крови *Danio rerio* (L.), после экспозиции (96 часов) в исследуемых образцах воды

Тип клеток	Лимфоциты		Моноциты		С/я нейтрофилы		П/я Нейтрофилы		Базофилы		Эозинофилы		Σ клетки
	п	%	п	%	п	%	п	%	п	%	п	%	
Контроль	221	88,4	9	3,6	12	4,8	4	1,6	3	1,2	1	0,4	250
NO ₃ -5 мг/дм ³	219	86,7	10	4	13	5,2	4	1,6	2	0,8	2	0,8	250
NO ₃ -10 мг/дм ³	213	85,2	10	4	13	5,2	4	1,6	6	2,4	4	1,6	250
NO ₃ -20 мг/дм ³	202	80,8	18	7,2	12	4,8	6	2,4	7	2,8	5	2	250
NO ₃ -45 мг/дм ³	171	68,4	23	9,2	14	5,6	6	2,4	19	7,6	17	6,8	250

Примечание: С/я – сегментоядерные; П/я – палочкоядерные

В результате проведенного эксперимента, при исследовании образцов вод содержащиеся нитраты на клеточном уровне у рыб *Danio rerio* (L.) по показателям форменных элементов периферической крови, цитотоксический эффект проявляли пробы воды с концентрациями 10 мг/дм³, 20 мг/дм³ и 45 мг/дм³ в сравнении с результатами контрольной воды. Увеличение количества эозинофилов, базофилов, моноцитов и уменьшение количества лимфоцитов в образцах воды указывает на проявление цитотоксического эффекта. Уменьшение количественной доли лимфоцитов от 88,4 % в контроле до 68,4 % в воде содержащиеся нитраты, происходило за счет увеличения моноцитов, базофилов и эозинофилов. Такое соотношение лейкоцитов в крови говорит о том, что в организме происходит воспалительный процесс (отравление). Полученные данные в пробе воды с нитратами 5 мг/дм³ приближались к показателям контрольной воды.

7. Выводы

Показано, что при токсическом влиянии нитратов на организм рыб *Danio rerio* (L.) происходят изменения клеточного состава периферической крови. А именно, наблюдалось увеличение процента сегментоядерных нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, моноцитов и уменьшение процента лимфоцитов. Отмечено, что степень выраженности данных изменений зависит от величины токсического влияния нитратов.

Исследовано влияние пробы воды, содержащей нитраты на показатели структурной целостности ядра различных тканей рыб. Структурные и количественные изменения ядер наблюдались уже при концентрации нитратов 10 мг/дм³. Изменение компонентов клеточного ядра, которые являются носителями генетической информации, приводит к мутациям клеток. Это может привести к ошибочной диагностике того или иного заболевания. Использование этих методов, дает возможность определения цитотоксичности и генотоксичности водных образцов.

ПДК нитратов в воде согласно СанПиН 2.1.4.1175-02 «Гигиенические требования к качеству воды нецентрализованного водоснабжения. Санитарная охрана источников» составляет 45 мг/дм³ [16]. Наши исследования показали, что содержание нитратов в воде выше 5 мг/дм³ негативно влияет на организм рыбы и её клетки [17].

Литература

1. Левич, А. П. Теоретические и методические основы технологии регионального контроля природной среды по данным экологического мониторинга [Текст] / А. П. Левич, Н. Г. Булгаков, В. Н. Максимов. – Москва: НИА-Природа, 2004. – 271 с.
2. Паничев, К. В. Отравление метгемоглобинообразователями у детей [Текст] / К. В. Паничев, В. Г. Середняк, М. В. Каржан // Анестезиол. и реаниматол. – 2000. – С. 56–58.
3. Gupta, S. K. Recurrent acute respiratory tract infection in areas with high nitrate concentrations in drinking water [Text] / S. K. Gupta, R. C. Gupta, A. V. Gupta, A. K. Seth, J. K. Bassin,

A. Gupta // Environmental Health Perspectives. – 2000 – Vol. 108, Issue 4. – P. 363–366. doi: 10.1289/ehp.00108363

4. Патики, В. П. Агроекологічна оцінка мінеральних добрив та пестицидів [Текст]: монографія / В. П. Патики, Н. А. Макаренко, Л. І. Моклячук; за ред. В. П. Патики. – Київ: Основа, 2005. – 300 с.

5. Жукова, Г. Ф. Поступление нитратов в составе рациона детей младшего возраста [Текст] / Г. Ф. Жукова, С. А. Филина, А. Н. Зайцев, Л. Г. Мамонова // Вопросы питания. – 1991. – № 6. – С. 49–53.

6. Верголяс, М. Р. Сравнительный анализ частоты проявления клеток с микроядрами и двойными ядрами у карася *Carassius auratus* в природных и лабораторных условиях [Текст]: зб. наук. пр. / М. Р. Верголяс, Т. В. Кучеренко, В. В. Архипчук. – Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. – Київ: ЛОГОС, 2007. – Т. 1. – С. 203–206.

7. Спосіб визначення цитотоксичності водного середовища [Текст]: пат. 85493 Україна: МПК (2006) G 01N 33/18 / В. В. Гончарук, М. Р. Верголяс. – заявитель и патентообладатель Киев, ин-т коллоидной химии и химии воды НАН Украины. – №а200801532; заявл.06.02.08; опубл. 26.01.09, Бюл. № 2. – 4 с.

8. Norppa, H. What do human micronuclei contain? [Text] / H. Norppa // Journal Mutagenesis. – 2003. – Vol. 18, Issue 3. – P. 221–233. doi: 10.1093/mutage/18.3.221

9. Верголяс, М. Р. Використання цитологічних біомаркерів на рибах для оцінки антропогенного забруднення морських і прісних вод [Текст]: наук. зб. / М. Р. Верголяс, В. В. Гончарук // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2008. – Т. 4. – С. 60–63.

10. Спосіб визначення генотоксичності водного середовища. Пат. 95717 Україна: МПК (2009) G 01 N 33/18. В.В. [Текст] / М. Р. Гончарук, М. Р. Верголяс, Болтіна, І. В. – Заявитель и патентообладатель Киев, ин-т коллоидной химии и химии воды НАН Украины. – № 201004569; заявл.19.04.10; опубл. 25.08.11, Бюл. № 16. – 3 с.

11. Arkhipchuk, V. V. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells [Text] / V. V. Arkhipchuk, N. N. Garanko // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2005. – Vol. 62, Issue 1. – P. 42–51. doi: 10.1016/j.ecoenv.2005.01.001

12. Hayashi, M. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms [Text] / M. Hayashi, T. Ueda, K. Uyeno, K. Wada, N. Kinnae, K. Saotome et. al // Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 1998. – Vol. 399, Issue 2. – P. 125–133. doi: 10.1016/s0027-5107(97)00251-0

13. Лакин, Г. Ф. Биометрия [Текст] / Г. Ф. Лакин. – М.: Высш. шк., 1980. – 293 с.

14. Иванова, Н. Т. Атлас клеток крови рыб [Текст] / Н. Т. Иванова. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. – 184 с.

15. Верголяс, М. Р. Цитологічна характеристика периферичної крові дев'яти видів риб [Текст] / М. Р. Верголяс, В. Ф. Безруков, Л. Г. Манило // Сучасні проблеми біології, екології та хімії. Запоріжжя. – 2007. – №. 2 – С. 217–220.

16. СанПиН 2.1.4.1175-02 «Гигиенические требования к качеству воды нецентрализованного водоснабжения. Санитарная охрана источников» [Текст]. – Санитарно-эпидемиологическоеправила и нормативы. – Москва, 2003.

17. ДСТУ 7527:2014 Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості [Текст]. – Введ. 2014-02-01. – Київ: ДП УкрНДНЦ, 2014. – 10 с.

References

1. Levich, A. P., Bulgakov, N. G., Maksimov, V. N. (2004). Theoretical and methodological foundations of regional technology control environment according to ecological monitoring. Moscow, 271.

2. Panichev, K. V., Serebnyak, V. G., Karzhan, M. V. (2000). Intoxication metgemoglobinoobrazovatelyami poisoning in children. Anesthesiology. and reanimatol, 56–58.

3. Gupta, S. K., Gupta, R. C., Gupta, A. B., Seth, A. K., Bassin, J. K., Gupta, A. (2000). Recurrent Acute Respiratory Tract Infections in Areas With High Nitrate Concentrations in Drinking Water. Environmental Health Perspectives, 108 (4), 363–366. doi: 10.1289/ehp.00108363

4. Patika, V. P., Makarenko, N. A., Moklyachuk, L. I.; Patiki, V. P. (Ed.) (2005). Agroekologichna otsinka Welcome mineralnih that pestsitidiv. Kyiv, 300.

5. Zhukov, G. F., Filin, S. A., Zaitsev, A. N., Mamonov, L. G. (1991). Of nitrate in the composition of the diet of young children. Nutrition, 6, 49–53.

6. Vergolyas, M. R., Kucherenko, T. V., Arhipchuk, V. V. (2007). Comparative Analysis of Incidence of cells with micronuclei and dual cores had carp *Carassius auratus* in natural and laboratory conditions. Dosyagnennya problems of genetics, selektsii that biotehnologii. Kyiv, 1, 203–206.

7. Goncharuk, V. V., Vergolyas, M. P. (2009). Spisib viznachennya tsitotoksichnosti Water seredovischa. Pat. 85,493 Ukraine: the IPC G 01N 33/18., the applicant and the patentee, Kiev, Institute of Colloid and Water Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, 200801532; zayavl.06.02.08; publ. 26.01.09, Bul. 2, 4.

8. Norppa, H. (2003). What do human micronuclei contain? Mutagenesis, 18 (3), 221–233. doi: 10.1093/mutage/18.3.221

9. Vergoljas, M. R., Goncharuk, V. V. (2008). Vykorystannja cytologichnyh biomarkeriv na rybah dlja ocinky antropogennoho zabrudnennja mors'kyh i prisnyh vod. Faktory eksperymental'noi' evoljucii' organizmiv. Kyiv: LOGOS, 4, 60–63.

10. Goncharuk, V. V., Vergolyas, M. R., Boltina, I. V. (2011). Spisib viznachennya genotoksichnosti Water seredovischa. Pat. 95,717 Ukraine: the IPC G 01,33/18. VV.; the applicant and the patentee, Kiev, Institute of Colloid and Water Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine. 201004569; zayavl.19.04.10; publ. 25.08.11, Bul. 16, 3.

11. Arkhipchuk, V. V., Garanko, N. N. (2005). Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. Ecotoxicology and Environmental Safety, 62 (1), 42–52. doi: 10.1016/j.ecoenv.2005.01.001

12. Hayashi, M., Ueda, T., Uyeno, K., Wada, K., Kinnae, N., Saotome et. al (1998). Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 399 (2), 125–133. doi: 10.1016/s0027-5107(97)00251-0

13. Lakin, G. F. (1980). Biometrics. Moscow: Higher, 293.

14. Ivanova, N. T. (1983). Atlas blood cells of fish. Moscow: Light and food industries, 184.

15. Vergolyas, M. R., Bezrukov, V. F., Manilo L. G. (2007). Tsitologichna charakteristic periferichnoi' krovi dev'yati vidiv RIB. Suchasni problemi biologii, ekologii that himii. Zaporizhya, 2, 217–220.

16. SanPyN 2.1.4.1175-02 «Gygyenysheskye trebovaniya k kachestvu vody nentralizovannogo vodosnabzheniya. Sanytarnaja ohrana ystochnykov» (2003). Canytarnopedydemyologicheskyyeppravyla y normatyvy. Moscow.

17. DSTU 7527 (2014). Water Pitney. Vimogi that methodological kontrolyuvannya of Quality. Enter 2014-02-01. Kyiv: DP UkrNDNC, 10.

*Рекомендовано до публікації д-р біол. наук, провідний науковий співробітник Дмитруха Н. М.
Дата надходження рукопису 20.08.2015*

Верголяс Майя Розметовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией, Институт коллоидной химии и химии воды им. А. В. Думанского НАН Украины, бул. Акад. Вернадского, 42, г. Киев, Украина, 03680
E-mail: vergolyas@meta.ua