

## ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ВЛИЯНИЯ ВОДЫ ИЗ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ НА ТЕСТ-ОРГАНИЗМЫ

Оценка качества питьевых вод методами биотестирования в последние десятилетия приобрела особую актуальность в связи со стремительным ростом количества потенциально опасных химических соединений, загрязняющих природные источники питьевого водоснабжения. При этом биотестирование дает интегральную оценку степени токсичности загрязненных вод для живых организмов с учетом синергизма и антогонизма взаимодействия разных растворенных веществ.

Биотестирование – это биологический контроль, который предполагает целенаправленное использование стандартных тест-организмов и методов для определения степени токсичности водной среды, основанный на измерении тест-реакции организма, его отдельной функции или системы [1, 2].

Использование экотоксикологических биотестов (растительных и животных тест-организмов) и их клеточных биомаркеров крайне важно для объективного и комплексного контроля за все увеличивающимся числом ксенобиотиков, загрязняющих водную среду, большинство из которых не нормируются существующими стандартами, однако обладают способностью вызывать разнообразные токсические, цитотоксические, генотоксические или мутагенные эффекты. Универсальность клеточной организации открывает широкие возможности для токсикологических исследований с применением различных групп животных и растений и последующей экстраполяцией полученных результатов на клетки и организм человека [3].

Исследования подобного рода необходимы, так как в окружающей среде общее количество химических соединений достигло > 75 млн. Они имеют ряд преимуществ перед физико-химическим анализом, при помощи которого зачастую не удается обнаружить неустойчивые соединения или количественно определить ультранизкие

концентрации экотоксикантов. Биотестирование же дает возможность быстрого получения интегральной оценки токсичности.

Целью наших исследований была сравнительная оценка токсичности питьевой воды из нескольких источников водоснабжения на представителей разных систематических групп и трофических уровней – водный организм (рыбы *Danio rerio*) и теплокровных животных (крысы *Wistar*). В частности, предполагалось изучить влияние воды на гематологические показатели живых организмов, которые являются индикатором не только физиологического состояния организма, но и одним из основных критериев выявления загрязнения питьевых вод [4, 9].

Рыба является высокоорганизованным гидробионтом, и непосредственно из-за обитания в воде цикл жизни и химические реакции в ее организме протекают быстрее, чем у других позвоночных (лягушки, крысы, кролики, птицы) [2, 4]. Рыб рекомендуют использовать для скрининга потенциально опасных для человека веществ, вызывающих уродства и раковые заболевания, а также генотоксических веществ, попадающих в питьевую воду. Это подтверждают коэффициенты корреляции между показателями мутагенности, установленные при исследовании клеток крови у рыб и лимфоцитах периферической крови человека. Полученные значения коэффициентов линейной корреляции свидетельствуют о взаимосвязи почти всех показателей, определяемых на рыбах, и количестве поврежденных абберрантных метафаз с метаболической активацией на лимфоцитах [5].

Крысы же являются одними из основных видов экспериментальных животных, используемых в биологических и медицинских исследованиях для определения механизмов различных заболеваний, эффективности и токсичности лекарственных препаратов и химических веществ.

## Материалы и методы

В работе оценивали водопроводную, артезианскую и фасованную («Знаменивська») воды. Контрольную воду готовили в лабораторных условиях согласно рекомендациям ДСТУ 4174:2003. В образцах воды определяли химический состав (содержание микро- и макроэлементов) методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (Optima 2100 DV фирмы Perkin Elmer, США). Содержание микро- и макроэлементов в контрольной воде не превышал нормативных показателей ПДК по ГСанПиН 2.2.4-171-10 [8].

Биотестирование проводили на 40 особях рыб *Danio rerio*, культивированных в лабораторных условиях. Тест-организмы были разделены на 4 группы по 10 особей. Каждую группу помещали в определенную, а именно контрольную, водопроводную, артезианскую и фасованную воды. После экспозиции через 96 часов у каждой особи из хвостовой вены брали образцы крови. Анализ периферической крови проводили по стандартной методике [2, 6].

Параллельно был проведен эксперимент на 40 половозрелых белых крысах (самцах) линии Вистар с массой тела 150–180 г. Крысы были разделены на 4 группы (по 10 животных в каждой). Все животные находились в стационарных условиях вивария на стандартном пищевом и специальном водном режиме. В частности, крысы группы № 1 пили контрольную воду; группы № 2 – воду из водопровода. Крысы группы № 3 пили воду из бювета, а животные группы № 4 – фасованную воду марки «Знаменивська».

Для определения гематологических показателей кровь отбирали из хвостовой вены. Общий анализ крови с подсчетом лейкоцитарной формулы проводили по стандартному методу [6].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием методов вариационной статистики с помощью программ статистического анализа Microsoft Excel. Рассчитывали среднее арифметическое, среднее отклонение, погрешность среднего арифметического. Различия между показателями определяли по *t*-критерию Стьюдента [7].

## Результаты и их обсуждение

Согласно выполненному химическому анализу, в водопроводной воде содержание отдельных элементов было выше, чем в контрольной воде. В частности, содержание As (в 1,6 раза), Ba (в 700 раз), Ca (в 2,8 раза), Mn (в 4000 раз),

Pb (в 4 раза), Sr (в 14,6 раза), Si (в 98 раз), Zn (в 300 раз) существенно превышало значение по сравнению с контрольной водой и ПДК для питьевой воды содержание Fe (в 6,3 раза). В воде № 2 из бювета установлено превышение ПДК для As (в 3,6 раза), Mn (в 1,2 раза) и Si (в 1,2 раза), по сравнению с контрольной водой содержание этих элементов было в 100, 6000 и 650 раз больше. По результатам измерения в воде «Знаменивська» по сравнению с контрольной также было установлено превышение содержания отдельных макро- и микроэлементов, а именно: Na (в 2,5 раза), P (в 35,7 раза), Sr (в 4 раза), Si (в 788 раз), Zn (в 47,8 раза). При этом значение ПДК превышало только содержание Si (в 1,5 раза).

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод, что по содержанию макро- и микроэлементов вода контрольная полностью соответствует требованиям к питьевой воде ГСанПиН 2.2.4-171-10. Вода из водопровода имеет превышение содержания Fe (в 6,3 раза), а вода из бювета – повышение As, Mn и Si (в 3,6; 1,2 и 1,2 раза соответственно). Вода «Знаменивська» подобная по большинству элементов к контрольной, однако имеет повышенное содержание Si в 1,4 раза.

Система крови является весьма чувствительной к действию потенциально опасных экзогенных факторов. Клетки крови одними из первых сталкиваются с веществами и соединениями, которые поступают в организм. Это вызывает необходимость обязательной оценки состояния периферической крови при условии определения их токсических свойств [9, 10].

По данным научной литературы [11], влияние токсикантов на систему крови характеризуется как общими, так и специфическими проявлениями. Основными механизмами гематотоксического действия являются нарушение эритропоэза, угнетение процесса синтеза гема и глобина, а также мембранно- и цитотоксическое действие, что приводит к снижению продолжительности жизни клеток и их морфофункциональным изменениям.

Для оценки цитотоксичности водных образцов изучали их влияние на тест-организм (рыбу). При определении цитотоксичности водной среды в качестве биомаркера использовали форменные элементы крови рыб (лейкоциты). Определяли их количество, по их соотношению в контрольном и опытном образцах оценивали цитотоксичность водной среды [4].

Из полученных данных видно, что у рыб, которые были в водопроводной воде, также установлено увеличение количества нейтрофилов и уменьшение лимфоцитов (до 68,4 %), эозинофилы (6,8 %). В образцах вод из бювета и в фасованной воде отмечалось увеличение моноцитов и нейтрофилов, также незначительное повышение эозинофилов по сравнению с контрольной водой (табл.).

Лейкоциты играют важную роль в защите организма от токсических воздействий, бактериальных и грибковых инфекций. Возникновение лимфопении (уменьшение количества лимфоцитов) характерно для начальной стадии инфекционно-токсического процесса и связано с их миграцией из сосудов в ткани к очагам воспаления. Согласно данным [12], воздействие токсиантов на организм сопровождается изменениями количественного состава клеток крови.

Выполненные на крысах исследования свидетельствуют, что показатели лейкоцитарного ряда клеток периферической крови крыс после употребления воды в течение 2 месяцев также характеризовались изменениями (табл.). У опытной группы крыс, которые пили воду из водопровода, установлено увеличение количества нейтрофилов сегментоядерных (на 63,5 %) и палочкоядерных (на 23,0 %) наряду с уменьшением численности лимфоцитов (на 22,7 %) и моноцитов (на 17,7 %). Эти данные могут указывать на развитие воспалительной реакции в организме подопытных животных. У крыс, употреблявших воду из бювета, по сравнению с контролем также было выявлено повышение количества нейтрофилов сегментоядерных (на 95,7 %) и эозинофилов (в 3,3 раза), снижение лимфоцитов (на 44,0 %) и моноцитов (на 12,0 %). Обнаруженные измене-

ния в клеточном составе периферической крови подопытных крыс могут указывать на активацию неспецифической естественной резистентности, развитие воспалительной и аллергической реакций. Нарушение соотношения клеточных популяций крови у животных, которым давали воду «Знаменивська» были менее значимыми, однако установленный нейтрофилез (увеличение относительного количества нейтрофилов с/я на 23,5 % и п/я – на 53,8 %) может быть признаком развития инфекционного процесса (табл.).

При определении качества питьевых вод методами биотестирования возникает ряд важных вопросов относительно экстраполяции полученных результатов на организм человека, как, например, являются ли данные о токсичности водных проб, полученные с помощью животных и растительных тест-организмов, сигналом опасности и для человека.

Согласно данным научной литературы, наиболее приемлемыми для экстраполяции на организм человека являются методы, оценивающие мутагенность, гено- и цитотоксичность, т.е. (суб)клеточные эффекты. Этот вывод обосновывается результатами нескольких международных программ (Gene-Tox, International Program on Chemical Safety–IPCS), выполненных в 90-х годах. Даже изменения клеточных структур растений, в частности лука, *Allium cepa*, предполагают генотоксические и мутагенные последствия для высших животных, в том числе и человека [13, 14].

В Европейском реестре зарегистрировано свыше 100 000 химических веществ (EINECS). Из них наличие и концентрации только 30–40 химических веществ регулярно проверяются в наиболее важных экосистемах европейских стран

Таблица

Оценка цитотоксичности исследуемых питьевых вод на клетках крови рыб *Danio rerio* и крыс Wistar

Образцы исследуемых вод		Лимфоциты, %	Моноциты, %	Нейтрофилы с/я, %	Нейтрофилы п/я, %	Эозинофилы, %
Группа животных						
1. Вода контрольная	рыбы	86,7±2,62	5,7±0,93	5,2±1,24	1,6±0,63	0,8±0,46
	крысы	45,4±1,89	28,4±1,50	23,0±1,34	2,6±0,51	0,6±0,24
2. Вода из водопровода	рыбы	68,4±1,96*	12,6±1,24*	9,8±2,25*	2,4±0,42*	6,8±0,63*
	крысы	35,4±1,63*	23,4±1,54*	37,6±1,91*	3,2±0,86*	0,4±0,24
3. Вода из бювета	рыбы	82,2±2,46	8,4±1,12	6,2±0,67	1,6±0,74	1,6±0,69
	крысы	25,5±3,03*	25,0±1,67	35,0±3,74	2,6±0,51	2,0±0,45
4. Вода «Знаменивська»	рыбы	80,8±2,66	7,2±2,25	7,6±2,14	2,4±0,91	2,0±0,72
	крысы	41,8±2,82	26,4±4,39	28,4±2,25	4,0±0,63*	1,4±0,68

Примечание. \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой.

[15]. Значительная часть веществ не может быть определена в природных и сточных водах вследствие отсутствия соответствующих аналитических методов или высокой стоимости такого анализа. Структурные и количественные изменения клеток и ядер наблюдаются даже при низких концентрациях токсикантов согласно СанПиН 2.1.4.1175-02 [16].

Полученные нами результаты тестирования цитотоксичности питьевых вод на тест-объектах, к которым относятся организмы с разным уровнем организации (рыбы и крысы), позволяют сделать следующие выводы.

### Выводы

1. Биомониторинг природных и питьевых вод – это актуальная задача на современном этапе развития общества, которая проводится научными коллективами во многих странах мира. Химические анализы при определении качества питьевой воды не совсем оправданы, так как химические методы не могут выявить всего набора элементов, присутствующих в водном растворе, оценить их взаимодействие и трансформацию в среде и организме. Биотестирование с использованием оптимальных наборов тест-организмов и их клеточных параметров объективно характеризует биологическую составляющую качества воды.

2. Кровь является одной из важнейших систем организма, играет важную роль в его жизнедеятельности. Благодаря широко развитой сети кровеносных капилляров она приходит в соприкосновение с клетками всех тканей и органов, обеспечивая тем самым возможность их дыхания и питания. Находясь в тесном соприкосновении с тканями, кровь обладает всеми реактивными свойствами тканей, ее чувствительность к патологическим раздражениям выше и тоньше, а реактивность – выразительнее и рельефнее. Поэтому всякого рода воздействия на ткани организма отражаются на составе и свойствах крови, которые являются признаками появления первых, неявно выраженных клинических симптомов патологического процесса.

3. В периферической крови животных при нормальных физиологических условиях орга-

низма образование форменных элементов находится в состоянии равновесия. Нарушение взаимоотношений между этими процессами, обусловленное реакцией организма на раздражение токсического вещества, и проявляется в изменении количественного состава клеток периферической крови.

4. Оценка токсичности с использованием гематологических показателей рыб и крыс соответствует современным требованиям, предъявляемым к исследованиям качества водных образцов, позволяет определять их биологическую активность на клеточном уровне. Регистрируемые изменения показателей крови в организме объективно характеризуют отдаленные последствия негативного воздействия. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования гематологических показателей организмов рыб и крыс в биотестировании питьевой воды.

5. Несмотря на превышения химических элементов в исследуемых образцах вод, все тест-организмы были живыми, но по нашим многочисленным работам мы знаем, что это временно, т.к. эксперименты с рыбами длились 4 сутки, с крысами 2 месяца, но даже за такое короткое время мы получили результаты по гематологическим показателям. Исходя из полученных результатов количества химических элементов в исследуемых образцах воды (из бьювета, фасованная и водопроводная), при цитологическом анализе лимфоциты периферической крови тест-организмов реагировали одинаково. Во всех образцах вод отмечено уменьшение количества лимфоцитов за счет увеличения других форменных элементов. В водопроводной воде было достоверное ( $p < 0,05$ ) уменьшение количества лимфоцитов в крови у рыб на 18,3 %, у крыс на 10 % по сравнению с контрольной водой, а в образце вод из бьювета на 19,2 % достоверное ( $p < 0,05$ ) уменьшение количества лимфоцитов в крови были у крыс. В результате проведенного эксперимента можно дать положительную оценку качества только артезианской воде. Фасованная и водопроводная воды не пригодны для употребления, рекомендуется пересмотреть технологию водоподготовки.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Arkhipchuk V.V., Goncharuk V.V. The problem of quality of drinking bottled water // J. Water Chem. and Technol. – 2004. – № 4. – P. 403–414.
2. Пат. 97199 Україна, МПК G 01 № 33/18. / В.В. Гончарук, М.Р. Верголяс. Опубл. 10.01.2012, Бюл. № 1.
3. Болтіна І.В., Верголяс М.Р., Повякель Л.І., Злацький І.А., Завальна В.В., Коваленко О.В., Макаров О.О., Заєць С.Р., Семінова А.Ю. Комплексне дослідження якості води різного призначення // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. Наук. праць / Під ред. В.А. Кунаха [та ін]. – К.: Логос, 2012. – 4. – С. 249–255.
4. 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). – Введ. 2013.
5. Goncharuk V.V., Vergolyas M.R., Boltina I.V. Investigation of mutagenicity and genotoxicity of drinking water // J. Water Chem. and Technol. – 2013. – № 5. – P. 426–435.
6. Балаховский И.С. Руководство по клинической лабораторной диагностике / Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1982. – 235 с.
7. Антомонов М.Ю. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных. – К.: ФМД, 2006. – 558 с.
8. Державні санітарні норми та правила “Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною” (ДСан-ПіН 2.2.4-171-10).
9. Трахтенберг И.М., Тимофиевская Л.А., Квятковская И.Я. Методы изучения хронического действия химических и биологических загрязнителей. – Рига, Зинатис, 1987. – 172 с.
10. Тица Н.У. Клиническое руководство по лабораторным тестам / Под ред. Н.У. Тица. – М.: ЮНИМЕД-ПРЕСС, 2003. – 942 с.
11. Апихтіна О.Л., Дмитруха Н.М., Коцюруба А.В., Коркач Ю.П., Лубянова І.П. Механізми гематотоксичної дії сполук свинцю // Журнал НАМН України. – 2012. – 18, № 1. – С. 100–109.
12. Goncharuk V.V., Vergolyas M.R. Toxic impact of *Escherichia coli* bacteria depending on their content in water on test organisms // J. Water Chem. and Technol. – 2014. – 36, № 1. – P. 83–91.
13. Fiskesjö G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. // Hereditas. – 1985. – 102. – P. 99–112.
14. Arkhipchuk V.V., Goncharuk V.V. Water quality bioassay at the cellular level // Journal of Water Chemistry and Technology. – 2001. – 23, № 5. – С. 531–544.
15. Postel S. State of the world 1987. – New York: W.W. Norton, 1987. – P. 169–173.
16. ДСТУ 7525:2014 Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості. – Введ. 2014.

VERGOLYAS M.R.<sup>1</sup>, TRAKHTENBERG I.M.<sup>2</sup>, DMYTRUKHA N.N.<sup>2</sup>, GONCHARUK V.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of colloid chemistry and water chemistry named A.V. Dumansky NAS Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Vernadsky boul., 42, e-mail: vergolyas@meta.ua

<sup>2</sup> State Institution Institute of Occupational Medicine of Medical Sciences of Ukraine, Ukraine, 01032, Kyiv, Saksaganskogo str., 75, e-mail: dmytrukha@ukr.net

## EVALUATION OF TOXIC EFFECT OF DIFFERENT WATER SAMPLES USING TEST ORGANIZMS

**Aim.** The aim of the study was to analyze impact of water sources toxicity on the hematological parameters in representatives of different systematic groups and trophic levels – aquatic organisms (fish, *Danio rerio*) and warm-blooded animals (rats, *Wistar*). **Methods.** Tap water, artesian, packaged (“Znamenivska”) waters and control water, prepared in the laboratory according to the recommendations of the State Standard 4174: 2003 were used in the experiment. Chemical analysis of water samples and cytotoxic evaluation in blood cells of the test organisms were conducted. **Results.** Indicator leukocyte line of peripheral blood cells of rats after consuming of water from different sources was characterized by violation of ratio of the cell populations. These data may indicate the development of inflammatory, allergic response and may be a sign of infection in organism. Violations in the ratio of white blood cells were also found in fish. Quantitative characterization of hematological parameters showed that fish leukocytes reacted in the same manner as the rat leucocytes. **Conclusions.** Prospects of use of hematological parameters of rat organism as well as fish one for bioassay of water quality were proved. Evaluation of water toxicity via determination of these parameters in test organisms meets modern requirements for studies of water samples quality. Biological properties found at the cellular level may resulted in changes at the whole organism level and may objectively characterize long-term consequences of drinking water toxic impact.

**Keywords:** drinking water, biological testing, fish, *Danio rerio*, *Wistar rats*, cytotoxicity, blood leukocyte formula, WBC.