

Vergolyas M. R., Goncharuk V. V. Токсическое влияние тяжелых металлов на организм гидробионтов = Toxic effects of heavy metals on the hydrobionts' organism. Journal of Education, Health and Sport. 2016;6(6):436-444. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.56065>
<http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/3616>

The journal has had 7 points in Ministry of Science and Higher Education parametric evaluation. Part B item 755 (23.12.2015).
755 Journal of Education, Health and Sport eISSN 2391-8306 7

© The Author (s) 2016;

This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, Poland

Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial

use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Received: 05.05.2016. Revised 25.05.2016. Accepted: 16.06.2016.

УДК 574.64:576.08:57.084.1

ТОКСИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ОРГАНИЗМ ГИДРОБИОНТОВ

М. Р. Верголяс, В. В. Гончарук

**Институт коллоидной химии и химии воды
им. А. В. Думанского НАН Украины, г. Киев**

Реферат

Проведено биотестирование для оценки качества питьевых вод содержащих тяжелые металлы согласно по требованиям ГСанПиН 2.2.4-171-10, где значения ПДК (предельная допустимая концентрация) в питьевой воде свинца (Pb) 0,03 мг/дм³, железа (Fe) 0,3 мг/дм³ и марганца (Mn) 0,1 мг/дм³. Контрольную воду приготовили в лабораторных условиях согласно рекомендациям ДСТУ 4174:2003, которая соответствует показателям ГСанПиН 2.2.4-171-10. Для оценки влияния токсичности водных образцов использовали тест-организмы – гидры, *Hydra attenuate*, дафнии *Ceriodaphnia affinis*, рыбы *Danio rerio* и шпорцевые лягушки *Xenopus* культивированных в лабораторных условиях.

Метод заключается в определении действия токсикантов на выбранные организмы в стандартных условиях с регистрацией изменений на поведенческих, физиологических и клеточном уровнях. Физико-химические методы определяют лишь наличие и количество химических элементов в тестируемых водных образцах, но не могут определить специфику формирования качества тестируемых водных образцах. Причиной этому является увеличение количества комбинаций химических соединений в водной среде (более 75 млн.).

В качестве оптимального набора для определения некоторых структурных и функциональных изменений генома клетки вследствие токсического воздействия предложен микроядерный тест. Реакция тест-организмов рыб и лягушек на раздражение токсического характера проявляется в образовании микроядер в эритроцитах периферической крови. Показана перспективность использования тест-организмов для оценки качества водной среды. Особое внимание уделено оценке риска для здоровья человека токсических веществ в питьевой воде, генотоксичность и цитотоксичность, которых выявляются с помощью гематологических показателей животных клеток. Универсальность клеточной организации открывает широкие возможности для токсикологических исследований с применением периферической крови различных групп животных (рыбы, лягушки) и последующей экстраполяцией полученных результатов на клетки крови и организм человека.

Ключевые слова: токсичность, генотоксичность, биотестирование, токсиканты, питьевая вода.

TOXIC EFFECTS OF HEAVY METALS ON THE HYDROBIONTS' ORGANISM

M. R. Vergolyas, V. V. Goncharuk

Institute of colloid chemistry and water chemistry named A. V. Dumansky NAS

Ukraine, Kyiv, Ukraine

Abstract

A bioassay for evaluating the quality of drinking water containing heavy metals, according to the requirements by GSanPiN 2.2.4-171-10 where the MAC value (maximum permissible concentration) in the drinking water of lead (Pb) 0,03 mg / dm³, iron (Fe) 0,3 mg / dm³ and manganese (Mn) 0,1 mg / dm³. The control water is prepared in the laboratory according to the recommendations of the State Standard 4174: 2003, which corresponds to parameters GSanPiN 2.2.4-171-10. To evaluate the effect of water samples toxicity using the test organism - hydra, Hydra attenuate, fleas Ceriodaphnia affinis, fish Danio rerio and Xenopus Xenopus cultured in the laboratory. The method consists in determining the actions of toxicants on selected organisms under standard conditions with registration changes in the behavioral, physiological, and cellular levels.

Physicochemical methods only determine the presence and amount of chemical elements in the test water samples, but can not determine the specificity of formation water

quality test samples. The reason for this is to increase the number of combinations of chemical compounds in an aqueous medium (more than 75 Mill.).

As an optimal set for the determination of some of the structural and functional changes in the genome of the cells due to the toxic effects of proposed micronucleus test. The reaction of the test organisms, fish and frogs to the irritation of the toxic nature manifests itself in the formation of micronuclei in red blood cells of peripheral blood. The prospects of the use of the test organisms for evaluating the quality of the aquatic environment. Particular attention is given to the evaluation of toxic substances to human health risk of drinking water, genotoxicity and cytotoxicity, which are detected by hematological parameters of animal cells. The versatility of cellular organization opens up opportunities for toxicological studies using peripheral blood of different groups of animals (fish, frogs) and subsequent extrapolation of the results to the blood cells and the human body.

Keywords: toxicity, genotoxicity, bioassay, toxicants, drinking water.

Введение. Загрязненная тяжелыми металлами водная среда оказывает негативное воздействие на гидробионты, приводит к нарастанию экологических последствий и представляет угрозу не только живым организмам живущих в воде, но и для здоровья человека.

На современном этапе для определения степени воздействия антропогенного загрязнения необходимо и актуально использование тест-организмов и их клеточных биомаркеров для оценки качества природных, в том числе и питьевых, вод [1]. Актуальность такого подхода подтверждают работы, проводимые научными коллективами во многих странах мира [2].

Методом химического анализа невозможно выявить всего набора элементов, присутствующих в водном растворе, оценить их взаимодействие и трансформацию в среде и организме. Общее количество химических соединений в окружающей среде превышает 75 млн. Из них наличие и концентрации только 30–40 химических веществ регулярно проверяются в наиболее важных экосистемах европейских стран. Значительная часть веществ не может быть определена в природных и сточных водах вследствие отсутствия соответствующих аналитических методов или высокой стоимости такого анализа. Биотестирование с использованием оптимальных наборов

тест-организмов и их клеточных параметров объективно характеризует биологическую составляющую качества воды [1, 3].

В последнее время токсикологические тесты с использованием гидробионтов достигли значительного развития. Они используются для выявления токсичности, цитотоксичности и генотоксичности вод разного назначения [4].

В данной работе для анализа влияния токсических веществ в водных образцах на тест-организмы нами были отобраны следующие объекты: Гидра, *Hydra attenuate* [5], дафния *Ceriodaphnia affinis* [6], рыбы *Danio rerio* [7], Шпорцевые лягушки *Xenopus* [8, 9].

Распространенность тестов на водных объектах связана, с одной стороны, с удобством содержания в лабораторных условиях и тем, что тест-организмы находятся непосредственно в исследуемом водном образце. С другой стороны, они, а именно рыбы и лягушки реагируют на токсическое влияние тяжелых металлов на живой организм в большинстве случаев подобно млекопитающим [9, 10].

Рыбы и амфибии характеризуются вполне развитой кроветворной и иммунной системами, отражающими любые функциональные изменения, происходящие в процессе жизнедеятельности животного [11].

Наши многочисленные работы показали, что при оценке токсических веществ в водной среде очень важно использование разных экотоксикологических биотестов, где токсичность изучается и на организменном и клеточном уровнях. Использование различных биотестов и их клеточные биомаркеры дает возможность объективного и комплексного контроля за все увеличивающимся числом ксенобиотиков, загрязняющих водную среду, большинство из которых не нормируются стандартами, но обладают способностью вызывать токсические, цитотоксические и генотоксические эффекты [12].

В исследованиях с помощью микроядерного анализа на лягушках чаще всего используют клетки крови, печени, а на рыбах еще и клетки плавников, жабр. Микроядерный тест на эритроцитах рыб и лягушки дает возможность определения кластогенных веществ в водной среде, поскольку эритроциты у них имеют ядро [9, 13].

Кровь – важнейшая система живого организма, она приходит в соприкосновение с клетками всех тканей и органов, обеспечивая тем самым возможность их дыхания и питания, и играет большую роль в его жизнедеятельности. [10, 14, 15].

Кровь у рыб и лягушек, также достаточно информативная ткань, которая быстро реагирует на действие различных факторов, ее показатели изменяются в зависимости

от загрязнения, химического состава воды. Поэтому всякого рода воздействия на ткани организма отражаются на составе и свойствах крови [13-15].

Цель работы. Выявить влияние тяжелых металлов свинца (0,03 мг/л), железа (0,3 мг/л) и марганца (0,1 мг/л) на водные тест-организмы: беспозвоночные – гидра, *Hydra attenuate*, дафния *Ceriodaphnia affinis*; позвоночные животные – рыбы *Danio rerio*, шпорцевые лягушки *Xenopus*. Также описать генотоксичность тяжелых металлов на клетках крови рыб и лягушек.

Материалы и методы исследований. В работе использовали водные образцы, содержащие тяжелые металлы согласно по требованиям ГСанПиН 2.2.4-171-10 [16], где значения ПДК в питьевой воде свинца (Pb) 0,03 мг/дм³, железа (Fe) 0,3 мг/дм³ и марганца (Mn) 0,1 мг/дм³. Контрольную воду приготовили в лабораторных условиях согласно рекомендациям ДСТУ 4174:2003, которая соответствует показателям ГСанПиН 2.2.4-171-10 [16]. Для оценки влияние токсичности водных образцов на водные тест-организмы использовали по 40 экземпляров каждой особи – гидр, *Hydra attenuate*, дафнии *Ceriodaphnia affinis*, рыб *Danio rerio* и шпорцевых лягушек *Xenopus* культивированных в лабораторных условиях. Тест-организмы были разделены на 4 группы по 10 особей. Каждую группу помещали в определенный аквариум: №1 контрольная вода, №2 свинец 0,03 мг/л, №3 железо 0,3 мг/л и №4 марганец 0,1 мг/л. Для оценки генотоксичности тяжелых металлов, после экспозиции через 96 часов у каждой рыбы из хвостовой вены брали кровь. От каждой лягушки брали кровь из задней лапки через 192 часа. Приготовление и анализ цитологических препаратов из периферической крови рыб и лягушек проводили по стандартной методике [9, 13]. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программ статистического анализа Microsoft Excel. Рассчитывали среднее арифметическое, среднее отклонение, погрешность среднего арифметического, токсический эффект считается действительным при статистически достоверной разнице с контролем [17].

Результаты и их обсуждение. Проведено биотестирование и цитологический анализ исследуемых проб вод содержащие тяжелые металлы: свинец (Pb) 0,03 мг/дм³, железа (Fe) 0,3 мг/дм³ и марганец (Mn) 0,1 мг/дм³. Результаты исследования влияния тяжелых металлов на организмы гидробионтов, отображено в табл. 1. Указаны данные общей токсичности (выживаемости) гидробионтов.

Таблица 1.

Токсическое влияние исследуемых водных образцов на тест-организмы (экспозиция 96 часов для рыб и 192 часов для лягушек).

Тест организмы	№1 контроль, %	№2 свинец 0,03мг/л, %	№3 железо 0,3мг/л, %	№4 марганца 0,1мг/л, %
гидра	100	40*	40*	50*
дафния	100	40*	50*	50*
рыба	100	60	90	80
лягушка	100	100	100	100

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Во всех образцах вод, содержащие тяжелые металлы, наблюдалась гибель тест-организмов. Выживаемость гидр – в образцах вод №2 и №3 составляло 40%, а в №4 50%. Организмы дафнии в образце №2 выжили 40%, а в образцах №3 и №4 выжили 50%, соответственно. Рыбы – в №2 выжили 60%, №3 90% и №4 80%. Только тест-организмы лягушки выжили 100% во всех образцах вод, но общее физиологическое состояние у них ухудшилось.

Эритроциты крови рыб и лягушек в момент воздействия токсикантов, которые претерпевали морфологические изменения, были выявлены с помощью микроскопии при общем увеличении $\times 1000$. На каждом препарате просматривали 3000 клеток. Генотоксическое влияния образцов вод, содержащиеся тяжелые металлы на эритроциты периферической крови рыб *Danio rerio* и шпорцевых лягушек *Xenopus*, отображено в табл. 2. Подсчет количества образованных микроядер и двойных ядер в эритроцитах выражены в промиллях – ‰.

Во время эксперимента изменялись физиологические поведения гидробионтов, они были неактивными и малоподвижными. У тест-организмов лягушек и выживших рыб брали кровь для оценки генотоксичности исследуемых образцов вод [13].

Таблица 2.

Генотоксическое влияние исследуемых водных образцов на эритроциты тест-организмов

Тип клеток	Показатель и, ‰	№1 КН	№2 Pb 0,03 мг/дм ³	№3 Fe 0,3 мг/дм ³	№4 Mn 0,1 мг/дм ³
Эритроциты рыб	мЯ	0	4,99±1,43*	3,67±0,82*	3,63±0,86*
	2Н	0	5,33±1,48*	4,33±1,16*	4,99±1,43*
Эритроциты лягушек	мЯ	0	3,99±1,24*	3,33±0,74*	3,67±0,82*
	2Н	0	4,66±1,26*	3,99±1,24*	4,0±1,24*

Примечание: мЯ – эритроциты с микроядрами; 2Я – эритроциты с двойными ядрами;

КН – контроль; * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

В результате проведенного исследования все образцы вод, содержащиеся тяжелые металлы проявили генотоксический эффект. В эритроцитах крови у рыб количество микроядер и двойных ядер достоверно ($p < 0,05$) увеличились в образцах №2 от 4,99 до 5,33 ‰, №3 3,67 – 4,33 ‰ и №4 3,63 – 4,99 ‰ по сравнению с контрольной водой.

Аналогичным образом реагировали эритроциты крови лягушек. Количества микроядер и двойных ядер в образцах вод №2 обнаружено от 3,99 до 4,66 ‰, №3 3,33 – 3,99 ‰ и №4 3,67 – 4 ‰ по сравнению с контрольной водой.

Присутствие тяжелых металлов в водной среде приводит к тому, что вода становится активным фактором вредного воздействия на здоровье живых организмов [14].

Выводы

При биотестировании исследуемые образцы вод, содержащие тяжелые металлы: свинец (Pb) 0,03 мг/дм³, железа (Fe) 0,3 мг/дм³ и марганец (Mn) 0,1 мг/дм³, вызвали гибель тест-организмов до 60%. Количества микроядер и двойных ядер достоверно ($p < 0,05$) увеличились от 3,3 до 5,33 ‰ по сравнению с контрольной водой.

Система мониторинга качества вод в Украине, как и в других стран мира, дает оценку превышения содержащих химических элементов (в основном токсикантов) к их лимитирующим показателям ПДК для водных объектов.

Значения ПДК по требованиям СанПиН практически не учитывают специфику поведение антропогенных соединений и природную уязвимость водных экосистем к действию загрязнения и их комбинированные эффекты.

Данная методика лишь констатирует количественные факторы наличия или отсутствия химических веществ и соединений, при этом, не оценивая общее качественное влияние водного раствора на живые организмы.

Биотестирование с использованием оптимальных наборов тест-организмов и их клеточных параметров объективно характеризует биологическую составляющую качества воды.

References

1. M. R. Vergolyas M. V. V. Goncharuk. An assessment of quality control of water by means of test organisms and their cages//Chemistry and technology of water t.38, No. 1 2016
2. Albertini R.J., Anderson D., Douglas G.R. et al. (2000) Mutat. Res., 111-172.
3. Postel S. // State of the world 1987. – New York: W.W. Norton, 1987. – P. 169–173.
4. Tsangaris, C., Vergolyas, M., Fountoulaki, E., Goncharuk, V.V. Genotoxicity and oxidative stress biomarkers in *Carassius gibelio* as endpoints for toxicity testing of Ukrainian polluted river waters // Ecotoxicology and Environmental Safety - 2011. – 74. №16. – P. 2240-2244.
5. V. V. Arkhipchuk, V. V. Goncharuk. A complex assessment of toxicity, cyto - and genotoksichnost of a poligeksametilenguanidin with use of vegetable and animal test organisms and their cages//Chemistry and technology of water, 2007, t. 29, No. 4.
6. DSTU 4174:2003 of Yak_st of the Vod. Vznachennya hron_chno i toksichn6ost_ the h_m_chnikh речовин that Vod on *Daphnia magna* Straus i *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (Cladocera, Crustacea). – Київ, Derzhstandart, 2004.
7. DSTU 4074-2001. Yakist Vod. Vznachannya gostroi letalnoi toksichnosti himichnikh речовин that Vod on prisnovodniy ribi [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. Statchny method (ISO 7346-1:1996, MOD).

8. Manning M.J. RES structure and function of the Amphibian the reticuloendothelial system: A comprehensive treatise/ Manning M.J., Horton J.D. // Eds. Cohen N.I. – Plenum Press. New York, London, 1982.– Vol. 3. – 393 p.
9. M. Vergolyas. CYTOGENETIC EVALUATION OF THE DRINKING WATER TOXICITY // «EUREKA: Life Sciences», 2016. – №1. – 47-54p.
10. Al-Sabti K., Metcalfe C.D. // Mutat. Res. - 1995. – 343. – P. 121-135.
11. Vergolyas M. R. Blood as integrated system of organism //ScienceRise. - 2016. - No. 2(1). - Page 7-11.
12. Patent Ukraïni № 201004569 vid 25.08.2011. Bjul.№16. Sposib viznachennja genotoksichnosti vodnogo seredovishha Goncharuk V.V., Vergoljas M.R., Boltina I.V.
13. NACIONAL"NIJ STANDART UKRAÏNI DSTU 7387:2013 DSTU 7387:2013 Jakist' vodi. Metod viznachennja cito- ta genotoksichnosti vodi i vodnih rozchiniv na klitinah krovi prisnovodnoï ribi Danio rerio (Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan). Goncharuk V.V., Vergolyas M.R.
14. Trahtenberg I.M. Metody izuchenija hronicheskogo dejstvija himicheskikh i biologicheskikh zagrijaznitelej / Trahtenberg I.M. Timofievskaja L.A., Kvjatkovskaja I.Ja.// Riga, Zinatis, 1987. 172 s.
15. Tica N.U. Klinicheskoe rukovodstvo po laboratornym testam / Pod red. N.U.Tica. // M.:JuNIMED-PRESS, 2003. – 942 s.
16. DERZHAVNI SANITARNI NORMI TA PRAVILA "Gigienichni vimogi do vodi pitnoï, priznachenoi dlja spozhivannja ljudinoju" (DSanPiN 2.2.4-171-10)
17. Antomonov M.Ju. Matematicheskaja obrabotka i analiz mediko-biologicheskikh dannyh. - K. : FMD, 2006.- 558 s.