

Міжнародна академія екології та медицини ПВНЗ  
Дніпровський національний університет ім. Олеся Гончара  
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

ВЕРГОЛЯС МАЙЯ РОЗМЕТІВНА

УДК УДК 574.522:576.8:591.8

## ДИСЕРТАЦІЯ

ЕКОЛОГО–ТОКСИКОЛОГІЧНИЙ МОНІТОРИНГ СТАНУ ВОДИ РІЗНИХ  
ДЖЕРЕЛ УКРАЇНИ

03.00.16 - екологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

М.Р. Верголяс  
(підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий консультант:

Дмитруха Наталія Миколаївна  
доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник

Дніпро – 2019

## АНОТАЦІЯ

***Верголяс М.Р.* Еколого–токсикологічний моніторинг стану води різних джерел України.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.16 - екологія». Міжнародна академія екології та медицини. Київ, 2019.

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та практичне вирішення комплексної проблеми щодо застосування сучасних методів та використання показників оцінки якості питної води і на цій основі обґрунтовано систему заходів комплексної оцінки якості води з використанням різних біологічних тест-об'єктів. Нами була запропонована процедура комплексного біотестування природних і питних вод. При цьому є обов'язковим проведення досліджень (методами аналітичної хімії, мікробіології, радіології та біотестування), що встановлюють мінімальний ризик водного зразка для здоров'я людини, тобто з використанням різних методів обґрунтовується безпека води.

Був проведений порівняльний аналіз вод різного походження, за результатами біотестування отриманих за допомогою комплексу тваринних і рослинних тест-організмів. Така порівняльна характеристика дозволила виявити найбільш безпечні води для споживання населенням. Проведена нами оцінка якості поверхневих вод - джерел централізованого водопостачання м.Києва показала, що вихідна дніпровська і деснянська вода в місцях водозаборів відповідала категорії «безпечні води» за величиною індексу загальної токсичності. Комплексне біотестування поверхневих вод в акваторії м.Києва встановило негативний антропогенний вплив мегаполісів на водні екосистеми. Зростання середнього значення індексу загальної токсичності дніпровських вод у міру проходження території мегаполісу змінювався від 10 до 120 умовних одиниць, підтверджують цей факт зростання токсичності природної водного середовища.

Порівнюючи якість вихідної природної води (Дніпровський і Деснянський водозабори) та водопровідної хлорованої води ми прийшли до висновку, що процес хлорування значно підвищує токсичність вихідної води за рахунок утворення стійких хлорорганічних сполук, небезпечних для здоров'я людини.

Аналізуючи причини високої токсичності водопровідної води, ми прийшли до висновку, що це явище можна пояснити хлоруванням вихідної води, наявністю в ній залишкового хлору і продуктів сполуки хлору з органічними речовинами, в першу чергу хлорованими фенолами. Якість водопровідної води можна поліпшити доочищенням і знезараженням, наприклад, за допомогою універсальних установок, які розроблені та апробовані фахівцями України.

Наші дослідження якості фасованих негазованих питних вод різних марок методами біотестування показали їх різну якість, причому більше половини (54%) становили категорії "небезпечна" і "дуже небезпечна" вода. Причин, що пояснюють таку низьку якість фасованих вод, досить. Перш за все - це додавання у воду різних знезаражувальних речовин і речовин-консервантів, аж до антибіотиків. Ці речовини при вживанні фасованої води активно взаємодіють з епітеліальною тканиною шлунково-кишкового тракту, викликаючи її роздратування і запалення (гастрити). До того ж консерванти пригнічують мікрофлору шлунка і кишечника, що призводить до порушення травного процесу.

Проблема якості питних фасованих вод тісно пов'язана з її хімічним складом і мікробіологічною контамінацією. Оскільки вода фасується в ємності і зберігається протягом тривалого часу, то технології її обробки та терміни зберігання не повинні погіршувати первісної якості.

Одним з негативних факторів, що впливають на якість фасованих вод, тривалий контакт питної води з матеріалом тари. Підвищена температура зберігання фасованих вод значно підсилює процес міграції ацетальдегіду, який погіршує їх якість аж до появи токсичності.

Комплексне біотестування артезіанських вод (юрського і сеноманського горизонтів) з бюветів розташованих в різних районах м.Києва показало високу

якість води - 90% досліджуваних вод відповідали індексом загальної токсичності категорії "безпечна" вода. Артезіанські води з глибинних водоносних горизонтів (90-340 м) досить захищені товщею порід від техногенного та мікробного забруднення, і можуть використовуватися в якості питних без додаткового очищення і знезараження.

Проведення порівняльної характеристики якості питних вод різного походження за результатами комплексного біотестування за допомогою спектру тваринних і рослинних тест-організмів. За результатами досліджень водопровідна вода демонструвала токсичну дію на всі біотести, і, отже, не може використовуватися в якості питної води через високий ступінь ризику для здоров'я людини. Серед тестованих фасованих питних вод тільки "Моршинська" відповідала категорії "безпечна" вода, інші марки фасованих вод проявляли різного ступеня негативний вплив на життєдіяльність тест-організмів. За нашими даними артезіанські води не мають токсичного впливу на біотести, і тому їх якість відповідає вимогам, що пред'являються до питних вод, що задовольняє фізіологічні потреби організму людини.

В результаті виконання даної роботи оцінена роль і корисність кожного з біотестів для оцінки якості природних і питних вод.

Біотест за допомогою ракоподібних (дафнії і церіодафнії) за нашими даними є найчутливішим серед використовуваних біотестів. Завдяки своїй простоті і високій чутливості цей тест-організм є одним з найбільш поширених у світовій практиці. Він включений в міжнародні стандарти, використовується як національний норматив, в багатьох країнах входить в стандартні набори тест-організмів для визначення токсичності водних зразків. Рекомендується використання цього тест-об'єкта в гострих і хронічних експериментах з оцінки якості питних вод.

Інший представник безхребетних тварин - прісноводна гідра, яка використовується нами в дослідному наборі, хорошо зарекомендувала себе при тестуванні вод з низьким рівнем забруднення хлорованими органічними токсичними речовинами, зокрема хлорфеноли. Цей тест-організм проявляє

високу чутливість в хронічних експериментах при реєстрації морфологічних змін. Незважаючи на те, що біотест на прісноводних гідрах менш поширений, ніж біотестування за допомогою ракоподібних, він все таки володіє декількома перевагами. Наприклад, демонструє диференціальну реакцію а токсичний вплив за допомогою морфологічних і поведінкових реакцій. При комплексному біотестування за допомогою гідри можна визначати гостру і хронічну токсичність, а їх клітини використовувати для цитологічного аналізу. Слід зазначити підвищену чутливість цього тест-організму до токсичного впливу важких металів і органічних забруднювачів (феноли, хлорфеноли і ін.).

У наборі тест-організмів нами використовувалися також представники хребетних водних тварин - риб (даніо реріо, гуппі, срібний карась). Риби, хоч і менш чутливі до токсичного впливу, але за рахунок володіння високо розвиненими органами почуттів і центральною нервовою системою, що робить їх ідеальними тест-об'єктами для реєстрації зміни дуже чутливих тест-функцій (фізіологічних, біохімічних, цитологічних, поведінкових та ін.) У процесі біотестування у риб можна використовувати кров і тканини органів для цитологічного аналізу токсичних впливів. Біотест на рибах включений міжнародний і національний стандарти для оцінки якості вод, в багатьох країнах включається в набори тест-організмів для біотестування водних зразків. За допомогою риб можна ефективно здійснювати контроль за присутністю гострої токсичності в досліджуваній природних водах. Для визначення хронічної токсичності у водних зразках застосовується біотест заснований на протіканні ембріогенезу запліднених яйцеклітин (ікринок) риб, зокрема яйцеклітин даніо реріо. Він детально нами розроблений і апробований при біотестування природних і питних вод.

Досліджені зразки вод, отриманих після очистки від нітратів з використанням цитогенетичних підходів, з'ясовано принцип їх впливу на тест-організм (риби) та на їх клітини крові – структурні і функціональні зміни генома (гено- та цитотоксичність). А саме, було показано зміни у лейкоцитарної формули крові риб *Danio rerio* та генетичні зміни за мікроядерним тестом на

клітинах крові – еритроцитів. Використання цих методів дає можливість визначення цитотоксичності та генотоксичності водного зразка на клітинному рівні. Спостерігали у лейкоцитарній формулі крові зменшення лімфоцитів за рахунок підвищення кількості лейкоцитів. Виявили аномалії ядер в еритроцитах, зустрічались мікроядра та подвійні ядра в крові досліджуваних риб. Спостерігали порушення процесів життєдіяльності у хребетних тварин (риби), відбувалася 30 % загибель тест-організмів. На клітинному рівні спостерігались морфофункціональні зміни клітин крові та відхилення у лейкоцитарній формулі крові риб. Для визначення токсичності водного зразка до і після очистки води від нітратів запропоновано використання лейкоцитарної формули крові риб як біомаркера. Визначення набору формених елементів крові: паличкоядерні нейтрофіли, сегментоядерні нейтрофіли, еозинофіли, базофіли, моноцити, лімфоцити у досліджуваних риб, які перебували у контрольних та токсичних (до очистки від нітратів) водних зразках, дозволяє одержати більш повну картину впливу нітратів на тест-організм, на клітинному рівні. Це, в свою чергу, підвищує чутливість та інформативність методу, щодо оцінки цитотоксичності водного середовища

У набір біотестів включені також представники: ріпчаста цибуля і озимий сорт пшениці «Миронівська 808», рослинні тест-організми мають високу чутливість до азотвмісних речовин, зокрема до нітратів, які стимулюють ростові показники у рослин. Ми віддаємо перевагу зернам пшениці, які містять лише 5-10 відсотків власної вологи, на відміну від цибулин, де цей показник досягає 70%. Біотести на рослинах детально розроблені, і тому широко використовуються в міжнародних дослідженнях як на організмовому, так і клітинному рівнях для оцінки токсичності водних зразків.

Результати наших досліджень показали, що питні води різного походження, токсикологічно безпечні за даними хімічного аналізу відповідно до затверджених нормативів, можуть чинити негативний вплив на життєдіяльність тварин і рослинних тест-організмів. Отже, застосування методів аналітичної хімії, мікробіології та радіології, включених до національних

стандартів та нормативи, недостатньо для визначення біологічно властивостей водних зразків. Об'єктивна оцінка якості питної води вимагає використання, поряд зі стандартними підходами, ще й методів біотестування для визначення можливої загальної токсичності.

Поряд із забрудненням водного середовища хімічними речовинами і сполуками, істотно впливає на її якість біологічне забруднення, яке залежить від концентрації мікроорганізмів, зокрема бактерій, найпростіших, водоростей і мікроміцетів. Мікроорганізми в результаті своєї життєдіяльності, відмирання і розкладання насичують водне середовище токсичними екзометаболіти і продуктами розпаду. Вибравши бактерію кишкову паличку як модельний забруднює воду об'єкт, ми досліджували за допомогою методів біотестування водні зразки з різною щільністю *Escherichia coli*.

З результатів комплексного біотестування за допомогою тварин і рослинних тест-організмів показано, що щільності бактерій *Escherichia coli*  $10^2$  і  $10^3$  кл./см<sup>3</sup> не впливають на нормальну життєдіяльність гідробіонтів і на розмірно-вагові показники корінців пророщеного ріпчастої цибулі. Починаючи з щільності  $10^4$  кл./см<sup>3</sup> реєструється хронічна токсичність для *Ceriodaphnia affinis* і *Allium cepa*, проте індекс загальної токсичності дозволяє ще віднести дану воду до категорії «безпечні води».

Питна вода з бактеріальним обсемененням, де число *Escherichia coli* становить  $10^5$  кл./см<sup>3</sup> продемонструвала гостру токсичну дію на ракоподібних і рослинні тест-організми. У цьому випадку індекс загальної токсичності відповідав категорії «небезпечні води».

Щільність мікроорганізмів у воді  $10^6$  кл./см<sup>3</sup> викликала 100% загибель церіодафній, достовірно інгібував на 40% розвиток і зростання ріпчастої цибулі, викликав хронічну дію на прісноводну гідру *Hydra attenuate*. Це призвело до значного збільшення значення індексу загальної токсичності (170 у.о.), що відповідає категорії «небезпечні води». Споживання води з таким вмістом мікроорганізмів підвищує ступінь ризику для здоров'я людини.

Слід зазначити, що найчутливішим тест-організмом виявилася церіодафнія. Будучи твариною, що фільтрує воду в пошуках кормових одноклітинних організмів (тих же бактерій), *Ceriodaphnia affinis* проявила високу чутливість до мікробіологічного обсіменіння води. Це протиріччя можна пояснити високою концентрацією метаболітів бактерій *Escherichia coli* які вони виділяють у водне середовище, значно погіршуючи її якість.

При визначенні якості питних вод методами біотестування виникає ряд важливих питань щодо екстраполяції отриманих результатів на організм людини. Перш за все, необхідно відзначити, що використовуються нами в практичних дослідженнях тест-організми не завжди вловлюють гранично допустимі концентрації хімічних речовин, затверджених для питних вод міжнародними організаціями: Всесвітньою організацією охорони здоров'я (WHO), Агентством з охорони навколишнього середовища (US EPA), Європейським співтовариством (ЕС). У більшості випадків результати, отримані нами за допомогою окремих тест-організмів, були в 5-10 разів вище, ніж гранично допустимі концентрації, що наводяться в нормативних документах. Для підвищення порога чутливості біотестування ми провели об'єднання ряду тварин і рослинних тест-організмів різних трофічних рівнів з диференційованою чутливістю до забруднюючих речовин.

Проведені дослідження впливу води з різних джерел водопостачання на організм щурів виявили зміни маси тіла контрольних і дослідних щурів в динаміці експерименту. Так, у щурів контрольної групи, які пили контрольну воду, приготовлену за рецептурою, маса тіла в динаміці експерименту поступово зростала (через 1 тиждень – на 7,8%, через 1 місяць – на 12,1% і через 2 місяці – на 22,4 %). У дослідній групі № 2 тварин, які споживали воду з водогону динаміка зміни маси тіла мала різнонаправлений характер, тобто, через 1 тиждень вона знизилась на 12,4%, а через 1 і 2 місяці зросла на 16,9% і 8,4% порівняно з їх початковою масою. Маса тіла щурів в дослідній групі № 3 після вживання води з бювету через 1 тиждень зменшилась на 10,4%, а після 1 і 2 х місяців зросла на 26,6% і 7,8% відповідно з вихідним станом. У щурів групи №



4, які пили воду «Знаменська» також було визначено зменшення маси через 1 тиждень на 10,5%, тоді як через 1 і 2 місяці вона збільшилась на 20,9% і 8,2% порівняно з початком експерименту. Отже, отримані дані дозволяють припустити, найбільший несприятливий вплив на організм щурів справляла вода з водогону.

Визначені зміни у клітинному складі периферичної крові дослідних щурів можуть вказувати на активацію клітин неспецифічної природної резистентності. Порушення співвідношення клітинних популяцій крові тварин, яким давали фасовану воду були найменшим, при цьому відзначали збільшення кількості лейкоцитів (на 21,0 %,  $p < 0,05$ ).

Під час експерименту у дослідних щурів були встановлені зміни окремих біохімічних показників, що характеризують обмінні процеси в організмі. У результаті проведених досліджень виявлено деякі особливості специфіки впливу питної води у залежності від джерела її відбору та елементного складу на регулюючі системи, внутрішні органи та біохімічні процеси в організмі дослідних щурів, насамперед, на периферичну кров та паренхіматозні органи (печінка, нирки, підшлункова залоза).

Встановлені порушення вмісту гемоглобіну, ліпідного та вуглеводного обмінів, активність внутрішньоклітинних ферментів вказують на зміни у функціонуванні печінки, нирок і підшлункової залози у дослідних щурів за умови вживання питної води з водопроводу та бювету.

Важливим показником токсичного ураження будь-якого органу є його відносна маса та структурні зміни, які в подальшому відображаються на його функції. У результаті досліджень отримані дані показали особливості специфіки впливу питної води у залежності від джерела її відбору та елементного складу на регулюючі системи, внутрішні органи. Відносна маса тимуса у щурів всіх дослідних груп не відрізнялась від контрольних значень, тоді як маса селезінки достовірно знизилась в групі тварин, що пили воду з водогону (на 24,0%) і фасовану воду (на 26,0%). Це може вказувати на дистрофічні зміни в селезінці, які формуються за несприятливого впливу цих типів води.

Води з водопроводу і бювету у щурів викликало негативний вплив на клітинні механізми неспецифічної природної резистентності, також пригнічувало фагоцитарну активність нейтрофілів крові і резервні можливості фагоцитів. Такий прояв в свою чергу може позначитися на зниженні резистентності організму до інфекцій.

Зменшення рівня циркулюючі імунні комплекси в сироватці крові дослідних щурів з низькою молекулярною масою на фоні зниження фагоцитозу в нейтрофілах може вказувати на відкладення їх в судинах з наступним розвитком імунного запалення.

Проведеними дослідженнями впливу води з різних джерел водопостачання на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу в організмі щурів, встановлено наступні зміни. У групах щурів, що впродовж 2-х місяців отримували воду з водогону та бювету виявлено збільшення кінцевого продукту ПОЛ вмісту МДА в сироватці крові на 24,9% і 19,3% порівняно з цим показником у щурів, яким давали контрольну воду. З боку ферментів антиоксидантів у цих двох дослідних групах щурів встановлено зниження активності СОД (на 11,2% і 33,0%) і КТ (на 45,9% і 47,3%) відповідно.

У групі щурів, які вживали воду фасовану «Знаменівська» суттєвих порушень у стані про-і антиоксидантій системах порівняно з тваринами, яким давали воду контрольну, встановлено не було. Таким чином, проведеними дослідженнями встановлено зростання впливу на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу в організмі щурів води з водогону та з бювету. Зокрема, це проявлялося накопиченням у крові низькомолекулярного маркера наявності оксидативного стресу – МДА та пригнічення активності ферментів антиоксидантів – СОД і КТ.

Були досліджені гістологічними методами зміни в органах і тканинах різних органів щурів в залежності від якості питної води. При цьому відмічали, що найчастіше на зміну якості води реагувала печінка та нирки щурів.

Нашими дослідженнями доведено, що біотестування з використанням оптимального набору тест-організмів об'єктивно характеризує біологічну

складову якості води. Контроль якості питної води, включаючи різні етапи її приготування, очищення і знезараження, повинен проводитися за токсикологічними параметрами. Методи біотестування доцільно використовувати на всіх етапах оцінки якості питної води, включаючи заключний (характеристика ризику), на якому основним критерієм може стати еколого-епідеміологічна оцінка ризику для здоров'я населення ..

Розглядаючи сучасні підходи в санітарно-гігієнічному нормуванні якості питної води, ми запропонували для цих цілей використання результатів комплексного біотестування водних проб з розрахунком індексу загальної токсичності. Застосувавши модифіковану нами методологію оцінки ризику, створену Американським агентством з охорони навколишнього середовища (U.S. EPA) можна визначити ступінь ризику для здоров'я людей, тривалий час споживають неякісну питну воду. Коефіцієнт кореляції між результатами біотестування і ступенем захворюваності населення, що вживають протягом 10 років водопровідну воду, становив 0,70-0,94. Це говорить про те, що практично кожен третій показник захворюваності значимо пов'язаний з токсичністю водопровідної води.

**Наукова новизна результатів дослідження** полягає в тому, що вперше:

- застосовано комплексний підхід при дослідженні якості води та отримано нові дані, які дозволяють оцінити її безпечність;
- доведено вплив токсичних речовин, що містяться у воді на цитогенетичні показники клітин крові гідробіонтів та земноводних;
- в експерименті на щурах встановлено порушення імунологічної реактивності їх організму та морфофункціональні зміни внутрішніх органів в залежності від складу води;
- у дослідях *in vitro* встановлено цитотоксичну дію речовин, що містяться в питній воді по відношенню до клітин печінки та нирок.

**Практичне значення одержаних результатів.**

Модифіковано метод визначення якості питної води з використанням різних біооб'єктів. Доведено доцільність його використання у моніторингових

цілях, що підтверджено експериментальними результатами. Запропоновано цитогенетичні критерії оцінки якості та безпечності питної води.

За результатами досліджень отримано 4 патенти України на корисну модель: «Спосіб визначення генотоксичності водного середовища» (№ 201004569, 2011), «Спосіб визначення мутагенної активності питної води і культуральне середовище для його реалізації» (№ 201000606, 2011), «Спосіб підготовки біологічного об'єкта для визначення токсичності води», (№ 201012982, 2012), «Спосіб визначення цито- та генотоксичності питної води», (№ 201113123, 2014) та 2 Національні стандарти України: «Якість води. Метод визначення цито- та генотоксичності води і водних розчинів на клітинах крові прісноводної риби Даніо реріо (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan)» (ДСТУ 7387:2013), «Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості» (ДСТУ 7527:2014).

**Результати дисертаційної роботи впроваджені** в навчальний процес на кафедрі біології тварин факультету тваринництва та водних біоресурсів Національного університету біоресурсів і природокористування України; в навчальний процес на кафедрі природничо-технічного забезпечення діяльності водного транспорту та роботі державних установ: ДП "Український науково-дослідний інститут медицини транспорту Міністерства охорони здоров'я України"; ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки ім. Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України»; ДУ «Інститут медицини праці імені Ю.І. Кундієва Національної академії медичних наук України лабораторія аналітичної хімії і моніторингу токсичних речовин»; НУБіП «Українська лабораторія якості та безпеки продукції АПК».

*Ключові слова:* водна середовища, вода артезіанська, токсичні речовини, біотестування, якість води, тест-об'єкти, мутагенна активність, екологічна безпечність.

## SUMMARY

***Vergolyas M.R. Ecological and toxicological monitoring of water condition of various sources Ukraine*** - Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

Thesis for a scientific degree of Doctor of Biological Sciences in specialty 03.00.16 - ecology. International Academy of Ecology and Medicine. Kyiv, 2019.

In the dissertation the theoretical synthesis and practical solution of the complex problem concerning application of modern methods and indicators of estimation of quality of drinking water are carried out. On this basis, the system of measures of complex water quality assessment using various biological test objects was substantiated. We were offered a procedure for complex biotesting of natural and drinking water. At the same time, it is mandatory to carry out research (analytical chemistry, microbiology, radiology and biotesting) that establish the minimum risk of a water sample for human health, that is, using different methods, water safety is justified.

A comparative analysis of the results of biotesting of waters of various origins obtained through a complex of animals and plant test organisms was conducted. Such a comparative characteristic has revealed the most safe water for consumption by the population. The assessment of the quality of surface water - the sources of centralized water supply in Kiev showed that the outgoing Dnieper and Desnian water in the water intakes corresponded to the category of "safe water" by the value of the index of general toxicity. The complex biotesting of surface waters in the water area of Kiev has established a negative anthropogenic impact of megacities on aquatic ecosystems. The growth of the average value of the index of total toxicity of the Dnieper waters as it crossed the metropolis changed from 10 to 120 USD, confirming this fact of the growth of the toxicity of the natural aquatic environment.

Comparing the quality of the source natural water (Dniprotsky and Desnian water intakes) and plumbing chlorinated water, we came to the conclusion that the process of chlorination significantly increases the toxicity of the source water due to the formation of persistent organochlorine compounds, dangerous to human health.

Analyzing the causes of the high toxicity of tap water, we came to the conclusion that this phenomenon can be explained by chlorination of the source water, the presence of residual chlorine in it and products of chlorine compounds with organic substances, primarily chlorinated phenols. The quality of tap water can be improved by purification and decontamination, for example, with the help of universal installations developed and tested by specialists of Ukraine.

Our studies of the quality of packaged non-carbonated drinking water of various brands by biotesting methods showed their varying quality, with more than half (54%) being "dangerous" and "very dangerous" water. Reasons that explain such a poor quality of packaged water are enough. First of all, it is the addition of various disinfectants and preserving agents to antibiotics in the water. These substances when used in packaged water actively interact with the epithelial tissue of the gastrointestinal tract, causing its irritation and inflammation (gastritis). In addition, preservatives suppress the microflora of the stomach and intestines, which leads to disturbing the digestive process.

The problem of drinking water quality is closely related to its chemical composition and microbiological contamination. Since water is packed in a container and stored for a long time, its processing technology and storage times should not degrade the original quality.

One of the negative factors influencing the quality of packed water, prolonged contact with drinking water with the material of the container. The increased storage temperature of packaged water greatly enhances the process of migration of acetaldehyde, which worsens their quality until toxicity develops.

Comprehensive biotesting of artesian waters (Jurassic and Cenomanian horizons) from pump rooms located in different parts of Kiev showed high water quality - 90% of the studied waters corresponded to the index of total toxicity of the category "safe" water. Artesian water from deep aquifers (90-340 m) is sufficiently protected by thicker rocks from man-made and microbial contamination, and can be used as drinking water without further purification and decontamination.

Carrying out a comparative characteristic of the quality of drinking waters of various origins on the results of complex biotesting with the help of a spectrum of animals and plant test organisms. According to research results, tap water has shown a toxic effect on all biotests, and therefore can not be used as drinking water because of the high risk to human health. Among tested potable drinking water only "Morshinskaya" corresponded to the category of "safe" water, other brands of packaged water to varying degrees had a negative impact on the livelihoods of test organisms. According to our data, artesian water does not have a toxic effect on bioplants, and therefore their quality meets the requirements for drinking water that satisfies the physiological needs of the human body.

As a result of this work, the estimated role and usefulness of each of the bioassays for assessing the quality of natural and drinking water.

Biotest with crustacea (daphnia and ceriodata), according to our data, is the most sensitive among used biotestes. Due to its simplicity and high sensitivity, this test organism is one of the most common in the world of practice. It is included in international standards, used as a national standard, in many countries, is included in standard sets of test organisms to determine the toxicity of water samples. It is recommended to use this test object in acute and chronic experiments to assess the quality of drinking water.

Another representative of the invertebrate animals, the freshwater hydra used by us in the experimental set, has proven to be good in testing low-grade water with chlorinated organic toxic substances, in particular chlorophenols. This test organism exhibits high sensitivity in chronic experiments when recording morphological alterations. Despite the fact that biotest on freshwater hydrides is less common than biosensors using crustaceans, it still has several advantages. For example, demonstrates the differential response and toxic effects through morphological and behavioral reactions. With complex biotesting with hydra, acute and chronic toxicity can be determined, and their cells used for cytological analysis. It should be noted the increased sensitivity of this test organism to the toxic effects of heavy metals and organic pollutants (phenols, chlorophenols, etc.).

In the set of test organisms, we also used representatives of vertebrate aquatic animals - fish (data rerio, guppy, silver crucian). Fish, albeit less susceptible to toxic effects, but due to possession of highly developed sensory organs and central nervous system, making them ideal test objects for recording changes in very sensitive test functions (physiological, biochemical, cytological, behavioral and t . In the process of biotesting in fish you can use the blood and tissue organs for cytological analysis of toxic effects. Biotech on fish includes international and national standards for assessing the quality of water, in many countries, it is included in sets of test organisms for bioassay of water samples. With the help of fish, it is possible to effectively control the presence of acute toxicity in the investigated natural waters. To determine chronic toxicity in aqueous specimens, a biotest is used based on the embryogenesis of the fertilized eggs (eggs) of fish, in particular, the oocytes are given by roerio. He has been elaborated and tested by us in biotesting of natural and drinking water.

The samples of water obtained after purification from nitrates using cytogenetic approaches have been studied, the principle of their influence on the test organism (fish) and their blood cells - structural and functional changes of the genome (genome and cytotoxicity) have been determined. Namely, changes in the leukocyte formula of blood of fish *Danio rerio* and genetic changes in the micronucleus test on blood cells - erythrocytes have been shown. The use of these methods makes it possible to determine the cytotoxicity and genotoxicity of the aqueous sample at the cellular level. Observed in the leukocyte formula of blood reduction of lymphocytes by increasing the number of leukocytes. Detected abnormalities of nuclei in erythrocytes, micronuclei and double nuclei were found in the blood of investigated fish. Observed violations of vital functions in vertebrates (fish), there was a 30% death of test organisms. At the cellular level, morphofunctional changes in blood cells and deviations in the leukocyte blood fish formula were observed. To determine the toxicity of the water sample before and after purification of water from nitrates, the use of leukocyte blood formulas of fish as a bio-marker is proposed. Determination of a set of formed blood elements: rod-nucleus neutrophils, segmental neutrophils, eosinophils,



basophils, monocytes, lymphocytes in investigated fish, which were in control and toxic (to purify from nitrates) aqueous specimens, allows us to obtain a more complete picture of the effect of nitrates on the test organism, at the cellular level. This, in turn, increases the sensitivity and informativeness of the method for assessing the cytotoxicity of the aqueous medium

The set of biotest includes representatives of: onion and winter wheat variety Mironovskaya 808, plant test organisms have a high sensitivity to nitrogen-containing substances, in particular to nitrates that stimulate growth in plants. We prefer wheat grains that contain only 5-10 percent of their moisture, unlike bulbs, where this indicator reaches 70%. Plant biotests are elaborated in detail and are therefore widely used in international research both on the body and at the cellular levels for the assessment of the toxicity of aqueous specimens.

The results of our studies have shown that drinking water of various origins, toxicologically safe according to the chemical analysis in accordance with the approved standards, may have a negative impact on the livelihoods of animals and plant test organisms. Consequently, the use of methods of analytical chemistry, microbiology and radiology included in the national standards and norms, is not enough to determine the biological properties of water samples. An objective assessment of the quality of drinking water requires the use, along with standard approaches, of biotesting methods to determine the possible total toxicity.

Along with the pollution of the water environment with chemicals and compounds, significantly affects its quality biological pollution, which depends on the concentration of microorganisms, in particular bacteria, protozoa, algae and micromycetes. Microorganisms, as a result of their livelihoods, extinction and decomposition, saturate the aquatic environment with toxic exometabolites and decay products. By selecting the bacteria of the intestinal rod as a model contaminating the water, we investigated using water biotesting methods with different densities of *Escherichia coli*.

From the results of integrated biotesting with animals and plant test organisms, it has been shown that the density of bacteria *Escherichia coli* 10<sup>2</sup> and 10<sup>3</sup> cells / cm<sup>3</sup> do not

affect the normal viability of hydrobionts and the size and weight indices of the roots of germinated onion. From 104cc / cm<sup>3</sup> density, chronic toxicity for *Ceriodaphnia affinis* and *Allium cepa* is recorded, but the general toxicity index still allows the water to be classified as "safe water".

Drinking water with bacterial digestion, where the number of *Escherichia coli* is 105 cells / cm<sup>3</sup>, showed acute toxic effects on crustaceans and plant test organisms. In this case, the index of general toxicity corresponded to the category of "dangerous water".

The density of microorganisms in water of 106 cells / cm<sup>3</sup> caused 100% death of ceriodophyne, significantly inhibited the development and growth of onions by 40%, causing a chronic effect on *Hydra attenuate*, a freshwater hydra. This led to a significant increase in the index of total toxicity (170 USD), which corresponds to the category of "dangerous water". Consumption of water with this content of microorganisms increases the risk to human health.

It should be noted that the most sensitive test organism was *tseriodafenia*. As an animal that filters water in search of fodder unicellular organisms (the same bacteria), *Ceriodaphnia affinis* has shown high sensitivity to microbiological contamination of water. This contradiction can be explained by the high concentration of metabolites of bacteria *Escherichia coli* which they emit in the aquatic environment, significantly degrading its quality.

When determining the quality of drinking water by biotesting, a number of important issues arise regarding the extrapolation of the results obtained to the human body. First of all, it should be noted that the test organisms used by us in practical studies do not always capture the maximum permissible concentrations of chemicals approved for drinking water by the following organizations; The World Health Organization (WHO), the Environmental Protection Agency (US EPA), the European Community (EC). In most cases, the results we received from individual test organisms were 5-10 times higher than the maximum permissible concentrations given in the normative documents. To increase the threshold of sensitivity of biotesting, we

have united a number of animals and plant test organisms of different trophic levels with differentiated sensitivity to the pollutants.

The conducted researches of influence of water from various sources of water supply on an organism of rats have revealed changes of weight of a body of control and experimental rats in dynamics of experiment. Thus, in the control group rats who drank control water prepared according to the formulation, the body weight gradually increased in the dynamics of the experiment (after 7 weeks, by 7.8%, after 1 month - by 12.1%, and after 2 months - by 22 , 4%). In experimental group 2 animals that consumed water from the water supply, the dynamics of body mass changes was multi-directional, that is, after 1 week it decreased by 12.4%, and after 1 and 2 months it increased by 16.9% and 8.4% compared to their initial weight. The body weight of rats in experimental group number 3 after the use of water from the pump room after 1 week decreased by 10.4%, and after 1 and 2 months, increased by 26.6% and 7.8%, according to the initial state. In the group number 4 who were drinking water "Znamenskaya" also determined decrease in mass after 1 week by 10.5%, whereas in 1 and 2 months it increased by 20.9% and 8.2% compared with the beginning of the experiment. Consequently, the data obtained suggest that the greatest adverse effect on the body of rats was caused by water from the water supply.

The determined changes in the peripheral blood composition of the experimental rats may indicate the activation of cells of nonspecific natural resistance. Violation of the ratio of blood cell counts of animals to which the packed water was given was the smallest, with an increase in the number of leukocytes (21.0%,  $r < 0.05$ ).

During the experiment, experimental rats were able to detect changes in certain biochemical parameters characterizing metabolic processes in the body. As a result of the research, some features of the specificity of the influence of drinking water on the basis of the source of its selection and the elemental composition on the regulatory systems, internal organs and biochemical processes in the organism of the experimental rats, first of all, peripheral blood and parenchymal organs (liver, kidneys, pancreas) .

Established violations of hemoglobin, lipid and carbohydrate metabolism, activity of intracellular enzymes indicate changes in functioning of the liver, kidneys and pancreas in experimental rats provided drinking water is used from the water supply and pump room.

An important indicator of the toxic lesion of any organ is its relative weight and structural changes, which are subsequently reflected in its functions. As a result of the research the obtained data showed the peculiarities of the specifics of the influence of drinking water, depending on the source of its selection and the elemental composition on the regulatory systems, internal organs. Relative mass of thymus in rats of all experimental groups did not differ from the control values, while the mass of the spleen was significantly lower in the group of animals drinking water from the water supply (by 24.0%) and packaged water (by 26.0%). This may indicate dystrophic changes in the spleen, which are formed due to the adverse effects of these types of water.

Water from the water supply and pump room in rats caused a negative effect on the cellular mechanisms of non-specific natural resistance, and also suppressed the phagocytic activity of blood neutrophils and reserve capacities of phagocytes. Such a manifestation, in turn, may affect the reduction of the organism's resistance to infections.

Reducing the level of circulating immune complexes in serum from experimental low-molecular weight rats against the background of reduced phagocytosis in neutrophils may indicate their deposition in vessels with the subsequent development of immune inflammation.

Conducted studies of the influence of water from different sources of water supply on the prooxidant-antioxidant balance in the rat body, the following changes are established. In groups of rats, which received water from the water supply and pump room during the 2 months, an increase in the final product of the LDL content of MDA in serum was found to be 24.9% and 19.3%, respectively, in the rats given control water. Antioxidant enzymes in these two experimental groups of rats showed a

decrease in SOD activity (by 11.2% and 33.0%) and CT (45.9% and 47.3%) respectively.

In the group of rats, who consumed water packed "Znamenovskaya" significant violations of the state of pro-and antioxidant systems compared with animals, which gave water control, it was not installed. Thus, the studies carried out have shown an increase in the effect on the prooxidant-antioxidant balance in the body of water rats from the water supply and distribution system. In particular, this was manifested by the accumulation in the blood of a low molecular weight marker of the presence of oxidative stress - MDA and inhibition of the activity of antioxidant enzymes - SOD and CT. Histological changes in organs and tissues of different organs of rats were investigated depending on the quality of drinking water. At the same time, it was noted that the liver and kidneys of the rats reacted most often to change the quality of the water.

Our research has proved that biotesting using an optimal set of test organisms objectively characterizes the biological component of water quality. Monitoring of the quality of drinking water, including the various stages of its preparation, purification and decontamination, should be carried out according to toxicological parameters. Biotesting methods should be used at all stages of the assessment of drinking water quality, including the final (risk profile), on which the eco-epidemiological risk assessment for the health of the population may become the main criterion.

Considering modern approaches to sanitary-hygienic standardization of drinking water quality, we proposed for these purposes the use of the results of integrated biotesting of water samples with the calculation of the index of total toxicity. Applying our modified risk assessment methodology, created by the American Environmental Protection Agency (U.S. EPA), can determine the degree of risk to human health, for a long time, consume poor-quality drinking water. The correlation coefficient between the results of biotesting and the incidence rate of the population consuming tap water for 10 years was 0.70-0.94. This suggests that almost every third indicator of morbidity is significantly associated with the toxicity of tap water.

**Scientific novelty of the research results is that for the first time:**

- an integrated approach has been applied in the study of water quality and new data have been obtained that make it possible to assess its safety;
- the influence of toxic substances contained in water on the cytogenetic parameters of blood cells of hydrobionts and amphibians is proved;
- in an experiment in rats, there was a violation of immunological reactivity of their organism and morphofunctional changes of internal organs, depending on the composition of water;
- in vitro studies have established the cytotoxic effects of substances contained in drinking water in relation to liver and kidney cells.

**The practical value of the results.**

Modified method for determining the quality of drinking water using various bio-objects. The expediency of its use for monitoring purposes has been proved, which is confirmed by experimental results. The cytogenetic criteria for assessing the quality and safety of drinking water are proposed.

According to the results of researches, 4 patents of Ukraine were received on the utility model: "A method for determining the genotoxicity of the aquatic environment" (No. 201004569, 2011), "A method for determining the mutagenic activity of drinking water and the culture medium for its implementation" (No. 201000606, 2011), "Method of preparation of biological (No. 201012982, 2012), "Method for determining the cytotoxicity of drinking water", (No. 201113123, 2014) and 2 National Standards of Ukraine: "Quality of water. Method for determining the cytotoxicity of water and water solutions on freshwater fish of the blood of the Danian roach (Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan) »(DSTU 7387: 2013),« Drinking water. Requirements and methods of quality control "(DSTU 7527: 2014).

**The results of the dissertation work** were introduced into the educational process at the Department of Animal Biology, Faculty of Animal Husbandry and Aquatic Bioresources of the National University of Bioresources and Environmental Management of Ukraine; in the educational process at the department of natural-technical support of the activity of water transport and the work of state institutions:

State Enterprise "Ukrainian Research Institute of Transport Medicine of the Ministry of Health of Ukraine"; State Enterprise «Scientific Center for Preventive Toxicology, Food and Chemical Safety named after L.I. Medved of the Ministry of Health of Ukraine "; State Institution «Institute of Occupational Medicine named after Yu.I. Kundiyeu National Academy of Medical Sciences of Ukraine, laboratory of analytical chemistry and monitoring of toxic substances "; National University of Bioresources and Environmental Management of Ukraine “Ukrainian Laboratory for Quality and Product Safety Agroindustrial Complex”.

*Key words:* water environment, artesian water, toxic substances, biotesting, water quality, test objects, mutagenic activity, ecological carelessness.

## Список публікації здобувача в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

### Монографія:

1. Таран О. П., Пармон В. Н., **Верголяс М. Р.** Каталитические, сорбционные, микробиологические и интегрированные методы для защиты и ремедиации окружающей среды: монография. Новосибирск : Изд-во СО РАН, 2013. 298 с. *(Особистий внесок: аналіз літератури, частковий збір та обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

### Статті в наукових фахових виданнях України

2. **Vergolyas M. R.**, Veyalkina N. N., Goncharuk V. V. Effect of copper ions on hematological and cytogenetic parameters of freshwater fishes of *Carassius auratus gibelio* // Cytology and genetics. 2010. 44 (2). P. 124–128. **Scopus**. *(Особистий внесок: виконано аналіз літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, підготовлено матеріал до опублікування).*

3. Goncharuk V. V., **Vergolyas M. R.**, Boltina I. V. Investigation of drinking water mutagenicity and genotoxicity // Journal of Water Chemistry and Technology. 2013. 35 (5). P. 426–435. **Scopus**. *(Особистий внесок: здійснено експериментальні дослідження та проаналізовано представлений матеріал, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

4. **Vergolyas M. R.**, Lutsenko T. V., Goncharuk V. V. Cytotoxic effect of chlorophenols on cells of the root meristem of welsh onion (*Allium fistulosum* L.) seeds // Cytology and genetics. 2013. 47 (1). P. 34–38. **Scopus**. *(Особистий внесок: здійснено аналіз літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, підготовлено матеріал до опублікування, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

5. Goncharuk V. V., **Vergolyas M. R.** Toxic impact of *Escherichia coli* bacteria depending on their content in water on test organisms // Journal of Water Chemistry and Technology. 2014. 36 (1). P. 46–50. **Scopus**. *(Особистий внесок: здійснено аналіз літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено*



аналіз результатів, підготовлено матеріал до опублікування, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)

6. **Vergolyas M. R.**, Lutsenko T. V., Zlatskii I. A., Goncharuk V. V. Determination of the quality of artesian waters // Journal of Water Chemistry and Technology. 2014. 36 (5). P. 252–256. **Scopus**. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

7. **Vergolyas M. R.**, Goncharuk V. V. The effect of isotopic composition of water on biological organisms analyzed by a cytological method // Journal of Water Chemistry and Technology. 2015. 37 (1). P. 44–47. **Scopus**. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

8. **Vergolyas M. R.**, Goncharuk V. V. Evaluation of water quality control by using test organisms and their cells // Journal of Water Chemistry and Technology. 2016. 38 (1). P. 62–66. **Scopus**. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

9. Болтіна І. В., **Верголяс М. Р.**, Повякель Л. І., Злацький І. А., Завальна В. В., Коваленко О. В., Васецька О. П., Заєць Є. Р., Семенова А. Ю. Комплексне дослідження якості води різного призначення // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. УТГіС. Київ: ЛОГОС, 2012. Т. 4. С. 219–224. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

10. Кравченко О. О., **Верголяс М. Р.**, Максін В. І. Оцінка генотоксичності наноаквацитратів срібла та міді за допомогою мікроядерного тесту на клітинах риб *Danio rerio* // Біоресурси і природокористування. 2013. № 1–2. Т. 5. С. 31–35. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури,*

*виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

11. Болтина И. В., Костик Е. Л., **Верголяс М. Р.** Применение краткосрочных тестов для исследования мутагенной активности бутылированной питьевой воды // Проблемы харчування : наук.-практ. журнал. 2011. № 1/2. С. 70–74. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

12. **Верголяс М. Р.** Визначення токсичності водних зразків з використанням гематологічних параметрів риб // Фактори експериментальної еволюції організмів. Київ, 2015. Т. 17. С. 299–302. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

13. Осмалений М. С., Головков А. М., Нанієва А. В., **Верголяс М. Р.** Комплексна оцінка токсичності водних зразків за допомогою рослинних і тваринних тест-організмів // Фактори експериментальної еволюції організмів. Київ, 2015. Т. 16. С. 74–77. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

14. **Верголяс М. Р.**, Головков А. Н., Наниева А. В., Пелищенко А. В., Гончарук В. В. Генотоксическое влияние фтора питьевой воды // Фактори експериментальної еволюції організмів. Київ, 2016. Т. 18. С. 33–35. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

15. **Верголяс М. Р.**, Трахтенберг И. М., Дмитруха Н. Н., Гончарук В. В. Оценка токсического влияния воды из разных источников на тест-организмы //

Фактори експериментальної еволюції організмів. Київ, 2016. Т. 19. С. 97–102. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

16. **Верголяс М. Р.** Визначення токсичної вплив гербіцидів на тест-організми у воді // Екологічні науки : наук.-практ. журнал. Київ : ДЕА, 2019. № 26. С. 84–87. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

17. **Vergolyas M.** Safety analysis of drinking water on the test-organisms // Біоресурси і природокористування. Київ, 2019. Т. 11. № 3–4. URL: <https://docs.google.com/viewerng/viewer?url=http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Bio/article/viewFile/bio2019.03.004/11350> *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

**Статті в міжнародних фахових виданнях або виданнях, які входять до наукометричної бази даних**

18. 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 (3). P. 482–490. **Web of Science**. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

19. Tsangaris C., **Vergolyas M.**, Fountoulaki E., Goncharuk 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. **Web of Science**. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та*

*проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

20. **Vergolyas M. R.**, Goncharuk V. V. Toxic effects of heavy metals on the hydrobionts' organism // Journal of Education, Health and Sport. 2016. № 6 (6). P. 436–444. eISSN 2391-8306.DOI. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

21. **Vergolyas M. R.**, Trakhtenberg I. M., Dmytrukha N. M. Assessment of toxic effects of drinking water from various sources on indicators rats Wistar immune system. Journal of Education, Health and Sport. 2016. № 6 (9). P. 855–866. eISSN 2391-8306.DOI. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

22. **Vergolyas M.** Assessment of drinking water quality at the cellular level // Adv Tissue Eng Regen Med Open Access. 2019. № 5 (1). P. 53–55. **DOI: 10.15406/atroa.2019.05.00099. BASE, Google Scholar.** *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

23. **Vergolyas M.** Research of cytotoxic activity of water from different water supply sources // Adv Tissue Eng Regen Med Open Access. 2019. № 5 (3). P. 92–96. **DOI: 10.15406/atroa.2019.05.00105. BASE, Google Scholar.** *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

#### **Патент України на винахід**

24. Спосіб визначення генотоксичності водного середовища: патент 95717 Україна. № 201004569; заявл. 19.04.2010 ; опубл. 25.08.2011, Бюл. № 16. 8 с. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури,*

*виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

25. Спосіб визначення мутагенної активності питної води і культуральне середовище для його реалізації: патент 93964 Україна. № 201000606 ; заявл. 22.01.2010 ; опубл. 25.03.2011, Бюл. № 6. 10 с. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

26. Спосіб підготовки біологічного об'єкта для визначення токсичності води: патент 97199 Україна. № 201012982; заявл. 01.11.2010 ; опубл. 10.01.2012, Бюл. № 1. 10 с. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

27. Спосіб визначення цито- та генотоксичності питної води: патент 104175 Україна. № 201113123; заявл. 07.11.2011; опубл. 10.01.2014, Бюл. № 1. 6 с. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

### **Національний стандарт України**

28. ДСТУ 7387:2013 Якість води. Метод визначення цито- та генотоксичності води і водних розчинів на клітинах крові прісноводної риби Даніо rerіо (Brachydanіо rerіо Hamilton-Buchanan). *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

29. ДСТУ 7525:2014 Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

### **Публікації, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

30. **Верголяс М. Р., Гончарук В. В.** Використання морфофункціональних змін клітин риб як біоіндикаторів хімічного забруднення водою // III-й всеукраїнський з'їзд екологів з міжнародною участю (Екологія/Ecology – 2011). Вінниця, 2011. Т. 2. С. 298–301. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*
31. **Верголяс М. Р.** Определение токсичности нитратов с использованием цитоморфологических параметров разных тканей рыб как биомаркера // Scientific Journal "ScienceRise". 2015. № 9/4 (14). Р. 10–13. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*
32. **Vergolyas M. R.** Blood as integrated system of organism // ScienceRise. 2016. № 2 (1). Р. 7–11. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*
33. **Верголяс М. Р., Трахтенберг І. М., Дмитруха Н. М., Гончарук В. В.** Оцінка токсичного впливу питних вод на організм щурів wistar // Актуальные проблемы транспортной медицины. 2016. № 2 (44). С. 52–59. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*
34. **Верголяс М. Р., Пелишенко А. В., Наниева А. В., Осмаленый Н. С.** Оценка цитотоксического влияния глутамата натрия методом биотестирования // Первый независимый научный вестник. 2016. № 7. С. 5–9. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано*

*експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

35. **Верголяс М. Р., Трахтенберг І. М., Дмитруха І. М.** Оцінка цитотоксичної активності води з різних джерел водопостачання // Довкілля та здоров'я. Київ, 2016. № 4 (80). С. 19–22. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

36. **Верголяс М. Р., Дмитруха Н. М., Андрусишина І. М.** Особливості впливу питної води з різних джерел водопостачання на організм щурів вістар // Современные проблемы токсикологии. Киев, 2016. № 4. С. 80–86. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

37. **Верголяс М. Р.** Альтернативный метод оценки качества питьевых вод при помощи биотестирования // Актуальные проблемы транспортной медицины. 2016. № 4 (46). С. 159–167. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

38. **Vergolyas M.** Cytogenetic evaluation of the drinking water toxicity // EUREKA: Life Sciences. 2016. № 1. P. 47–54. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

39. **Верголяс М. Р.** Екотоксикологічна оцінка якості питних вод на тест-організмах // Sciences of Europe. 2016. № 8 (8). С. 4–8. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

40. **Vergolyas M.** Use of hematological indicators of hydrobionts as bioindicators of anthropogenic pollution of the water environment // Magyar Tudományos Journal. 2019. Vol. 31. № 1 (1). P. 3–6. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*
41. **Верголяс М. Р.** Оцінка антропогенного забруднення водного середовища за допомогою гістоморфологічної характеристики паранхіматозних органів тест-об'єкта // Magyar Tudományos Journal. 2019. Vol. 34. № 3 (1). P. 4–8. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*
42. Болтіна І. В., **Верголяс М. Р.**, Богданович Л. В., Завальна В. В., Селіван А. Ю., Панченко І. В. Дослідження якості води за допомогою біотестів // Збірник наукових праць Всеукраїнської науково-практичної конференції «Екологія міст та рекреаційних зон» (3–4 червня 2010 р., м. Одеса). 2010. С. 40–43. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*
43. **Верголяс М. Р.** Оценка антропогенного загрязнения природных вод с помощью гематологических показателей тест-объекта (рыб) // Сборник научных работ Международной научной конференции «Достижения науки и передовые технологии по восстановлению засоленных земель и улучшению эксплуатации ирригационных сооружений» (2–3 апреля 2011 г., г. Ашхабат). 2011. С. 321–323. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*
44. **Vergolias M.** Quality assessment aquatic environment using test-objects and its cells // Cooperation in GreenTec with Eastern Europe Focussing Water Treatment : Workshop (25–26 April 2012, Hannover Fair). 2012. P. 34. *(Особистий*



*внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

45. **Vergolias M.** Fundamental and applied research in the field of biology of water // Water Management Network – Membrane Technologies : Workshop (14–16 April 2013, Berlin). 2013. P. 61. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

46. **Верголяс М. Р.,** Осмалений М. С. Визначення цитотоксичності та генотоксичності водного середовища при використанні комплексних методів біотестування // Матеріали Міжнародної наукової конференції «Механізми функціонування фізіологічних систем», приуроченої до 70-ліття біологічного факультету та 230-ліття фізіології у Львівському університеті (15–17 жовтня 2014 р., м. Львів). 2014. С. 22–23. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

47. **Верголяс М. Р.** Цитогенетический способ оценки качества питьевых фасованных вод / «Наука, техника и инновационные технологии в эпоху могущества и счастья» : материалы Международной научной конференции (11–13 июня 2015 г., г. Ашхабад). 2015. Ч. 1. С. 353–354. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

48. **Верголяс М. Р.** Визначення токсичності нітратів у питної води з використанням цитогенетичних параметрів крові у гідробіонтів // Матеріали Науково-практичної конференції «Актуальні питання гігієни та екологічної безпеки України»: XI марзеєвські читання (8–9 жовтня 2015 р., м. Івано-Франківськ). 2015. С. 11–12. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та*

*опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

49. **Верголяс М. Р.**, Осмаленый Н. С., Головков А. Н. Оценка токсического влияния тяжелых металлов на организм гидробионтов // Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції «Чиста вода. Фундаментальні, прикладні та промислові аспекти» (28–30 жовтня 2015 р., м. Київ). 2015. С. 67–69. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

50. **Верголяс М. Р.** Генотоксическое влияние тяжелых металлов на клетки крови тест-организмов / Актуальные проблемы медицины. Сборник научных статей. Республиканской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 25-летию основания учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет» (5–6 ноября 2015 г., г. Гомель, Беларусь). 2015. С. 142–143. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, підбір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формування висновків.)*

51. **Верголяс М. Р.**, Злацький І. А., Осмаленый Н. С., Головков А. Н., Пелишенко А. В., Наниева А. В. Дії іонів важких металів на динаміку росту молоді риб та личинок амфібій // Перспективи майбутнього та реалії сьогодення в технологіях водо підготовки: матеріали міжнародної науково-практичної конференції (18–19 листопада 2015 р., м. Київ). 2015. С. 168–169. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

52. **Верголяс М. Р.** Цитогенетические критерии оценки безопасности питьевых вод / Бюллетень XV чтений им. В. В. Подвысоцкого (26–27 мая 2016 г., г.Одесса). 2016. С. 41. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та*

*опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

53. **Верголяс М. Р.**, Головков А. Н., Пелишенко А. В., Наниева А. В. Оценка токсичности и безопасности питьевых вод // Матеріали II Міжнародної конференції «Інноваційні підходи і сучасна наука» (31 травня 2016 р., м. Київ). 2016. С. 46–50. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

54. **Верголяс М. Р.**, Трахтенберг І. М., Дмитруха Н. М. Оценка безопасности водной среды // Матеріали VI Національного конгресу з біоетики (27–30 вересня 2016 р., м. Київ). 2016. С. 77. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

55. **Верголяс М. Р.** Наниева А. В., Пелишенко А. В. Інтегральна оцінка токсичності гербіцидів // Матеріали Науково-практичної конференції з міжнародною участю «Ефекти радіації та інших ксенобіотиків на репродуктивну систему і організм» (4–7 жовтня 2016 р., м. Долина, Івано-франківська обл.). 2106. С. 29. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

56. Трахтенберг І. М, **Верголяс М. Р.**, Дмитруха Н. М. Оцінка якості питної води в дослідях на культурі клітин // Матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції «Чиста вода. Фундаментальні, прикладні та промислові аспекти» (26–28 жовтня 2016 р., м. Київ). 2016. С. 105–107. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

57. **Верголяс М. Р.,** Головков А. Н., Пелишенко А. В., Наниева А. В. Токсическое и генотоксическое влияние бактерий *E.coli* на тест-организмы в питьевой воде // «Актуальные проблемы медицины»: матеріалі Республіканської науково-практичної конференції с міжнародним участієм (3–4 ноября 2016 г., м. Гомель). 2016. С. 75–81. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*
58. **Верголяс М. Р.,** Дмитруха Н. М. Вплив питної води з різних джерел водопостачання на гематологічні показники крові щурів вістар // Матеріали науково-практичної конференції «Актуальні питання громадського здоров'я та екологічної безпеки України»: XIV марзєєвські читання (11–12 жовтня 2018 р., м. Київ). 2018. С. 218–221. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*
59. **Vergolyas M.,** Konturova S., Rathore D. Ecotoxicological assessment of natural water safety // «Public health: problems and development priorities» (November 29, 2018, Ostroh). 2018. P. 101–106. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*
60. **Верголяс М. Р.** Визначення якості питної води на тестових організмах // Матеріали XVIII Міжнародної науково-практичної конференції «Ресурси природних вод карпатського регіону» (23–24 травня 2019 р., м. Львів). 2019. С. 98–102. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*
61. **Верголяс М. Р.,** Ратхоре Д. С. Вплив важких металів у воді на клітини крові гідро біонтів // Матеріали XVIII Міжнародної науково-практичної

конференції «Ресурси природних вод карпатського регіону» (23–24 травня 2019 р., м. Львів). 2019. С. 102–104. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

62. **Верголяс М. Р.** Перспективність досліджень водних зразків з використанням альтернативних методів *in vitro* // Матеріали VII Національного конгресу з біоетики (30 вересня – 2 жовтня 2019 р., м. Київ). 2019. С 109–110. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

63. **Верголяс М. Р.** Кореляційно-регресійний аналіз для моделювання впливу компонентного складу вод на тест-об'єкти / III International Scientific and Practical Conference. Scientific achievements of modern society (6–8 November, 2019, Liverpool, United Kingdom). 2019. С. 534–543. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

64. **Верголяс М. Р., Дмитруха Н. М.** Оцінка безпечності та якості питної води за допомогою біотестування / Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції «Перспективи майбутнього та реалії сьогодення в технологіях водо підготовки» (до 135-річчя НУХТ). Київ, 2019. *(Особистий внесок: аналітичний огляд, добір та опрацювання літератури, виконано експериментальні дослідження та проведено аналіз результатів, обробка експериментальних даних, формулювання висновків.)*

## ЗМІСТ

|                                                                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....                                                                                                   | 40  |
| ВСТУП.....                                                                                                                       | 41  |
| РОЗДІЛ 1. ....                                                                                                                   | 49  |
| СУЧАСНІ ДАНІ СТОСОВНО ОЦІНКИ ЕКОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕЧНОСТІ ВОДИ<br>(аналітичний огляд наукової літератури) .....                       | 49  |
| 1.1. Екологічні проблеми якості води .....                                                                                       | 49  |
| 1.2. Екотоксикологічна оцінка води .....                                                                                         | 57  |
| 1.3. Цитогенетичні критерії для оцінки екологічної безпечності води.....                                                         | 65  |
| 1.4. Методичні аспекти використання біотестування в водоохоронних заходах.....                                                   | 71  |
| РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....                                                                                    | 76  |
| 2. 1. Біотестування на рослинах .....                                                                                            | 76  |
| 2. 2. Біотестування (визначення гострої та хронічної токсичності) на гідробіонтах<br>(ракоподібні, гідра, риби, земноводні)..... | 77  |
| 2.2.1. Методика біотестування з використанням ракоподібних <i>Daphnia magna</i><br>Straus .....                                  | 77  |
| 2.2.2. Методика біотестування з використанням ракоподібних <i>Ceriodaphnia affinis</i><br>Lilleborg .....                        | 80  |
| 2.2.3. Методика біотестування з використанням кишковопорожнинних <i>Hydra</i><br><i>attenuate</i> Pallas.....                    | 83  |
| 2.2.4. Методика біотестування з використанням риб <i>Brachidanio rerio</i> Hamilton –<br>Buchanan .....                          | 86  |
| 2.3. Цитологічні дослідження на рибах і жабах .....                                                                              | 92  |
| 2.4. Токсикологічна дослідження на щурах.....                                                                                    | 94  |
| 2.5. Дослідження на культурі клітин в умовах <i>in vitro</i> .....                                                               | 95  |
| РОЗДІЛ 3. КОМПЛЕКСНА ОЦІНКА ТОКСИЧНОСТІ ВОДИ ЗА<br>ВИКОРИСТАННЯМ РОСЛИННИХ І ТВАРИННИХ ТЕСТ-ОРГАНІЗМІВ....                       | 106 |
| 3.1. Аналіз на токсичність води з використанням рослин .....                                                                     | 107 |
| 3.2. Оцінка якості природної води - джерел централізованого водопостачання на<br>прикладі м.Києва .....                          | 110 |

|                                                                                                                                       |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.3. Біотестування артезіанських вод з бюветів м.Києва .....                                                                          | 118 |
| 3.4. Дослідження якості фасованих негазованих питних вод з торгової мережі м.Києва.....                                               | 126 |
| РОЗДІЛ 4. ТОКСИКОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАБРУДНЕННЯ ВОДИ НА ГІДРОБІОНТАХ .....                                                        | 137 |
| 4. 1 Визначення токсичності питної води за цитогенетичними параметрами крові у гідробіонтів.....                                      | 137 |
| 4. 2. Дослідження дії іонів важких металів на динаміку росту молоді риб та личинок амфібій та впливна клітини крові риби і жаби ..... | 141 |
| 4.3.Визначення токсичності наноаквацитратів срібла та міді у водному середовищі .....                                                 | 146 |
| 4.4. Дослідження впливу мікроорганізмів на якість води                                                                                |     |
| 4.5. Інтергальна оцінка токсичності гербіцидів .....                                                                                  | 167 |
| РОЗДІЛ 5. ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИЧНОГО ВПЛИВУ ВОДИ НА ОРГАНІЗМ ЩУРІВ .....                                                                  | 217 |
| 5.1. Оцінка зміни маси тіла та внутрішніх органів.....                                                                                | 217 |
| 5.2. Зміни показників периферичної крові .....                                                                                        | 221 |
| 5.3. Порушення показників неспецифічної резистентності та імунологічної реактивності .....                                            | 228 |
| 5.4. Зміни ліпідного та вуглеводного обміну.....                                                                                      | 232 |
| РОЗДІЛ 6. ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИЧНОЇ ДІЇ ЗРАЗКІВ ВОДИ В ЕКСПЕРИМЕНТАХ IN VITRO.....                                                        | 245 |
| 6.1. Оцінка впливу зразків води на життєздатність та функції клітин                                                                   | 245 |
| 6.2. Оцінка цито- та генотоксичності різних типів вод (артезіанська, фасована, дехлоровна водопровідна) на клітинах крові             | 258 |
| РОЗДІЛ 7. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ ...                                                                           | 270 |
| ВИСНОВКИ                                                                                                                              | 282 |
| ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ                                                                                                                | 286 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....                                                                                                      | 287 |
| ДОДАТКИ                                                                                                                               | 325 |

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГДК – гранично допустима концентрація

МЯ – мікроядра

НД –нормативні документи

2Я – подвійні ядра

БТ – біологічний тест

ЛК<sub>50</sub> – летальна концентрація для 50% тест-організмів

ЛК<sub>100</sub> – летальна концентрація для 100% тест- організмів

ВОЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я

ЕРА – Агенство з охорони оточуючого середовища

ДСТУ – Національний стандарт України

ДСанПіН – Державні санітарні норми та правила

ІЗТ – індекс загальної токсичності

О.Ф. – Поодинокі фрагменти

Об. – Обміни

ФАН – фагоцитарна активність нейтрофілів

ФГА – фітогемаглютинін

ФІ – фагоцитарний індекс (% клітин, що фагоцитують)

ФЧ – фагоцитарне число (середнє число часточок латексу)

ЦІК в.м. – циркулюючі імунні комплекси високомолекулярні

ЦІК н.м. – циркулюючі імунні комплекси низькомолекулярні

Ум. од. – умовні одиниці

п.ф. – парні фрагменти

М.А. – Мультееаберативні клітини - кількість аберацій 3 і більше.

К абер / аб.мет. – Кількість аберацій на одну аберантну метафазу.



## ВСТУП

**Актуальність теми.** В сучасних умовах проблема забезпечення населення якісною питною водою стає все більш актуальною. Якість питної води обумовлена багатьма чинниками: природою джерела, регіональними особливостями ґрунтотворних порід і мінералів, ефективністю методів знезараження, ступенем антропогенного навантаження (хімічне або мікробне забруднення) та ін. [1, 2].

Вживання питної води значно забезпечує добову потребу організму в макро- і мікроелементах. З питною водою людина отримує від 8 до 25% добової потреби мінеральних речовин (Ca – до 20%, Mg – 25%, F – 50-80%, I – до 50%). Проте сьогодні водопровідна вода виступає чинником шкідливого впливу на здоров'я людини і першопричиною виникнення багатьох небезпечних захворювань. За даними ВООЗ вода містить 13 тисяч токсичних елементів, понад 80% всіх захворювань передається через воду [3-6]. Відмічається тісний зв'язок між мінеральним складом питної води та рівнем захворюваності населення. Встановлено, що тривале вживання питної води із жорсткістю понад 10 мг-екв/л (високий вміст Ca) призводить до патологічних змін з боку серцево-судинної та сечостатевої систем. Підвищений вміст у воді Fe негативно впливає на печінку та шкіру людини. Споживання води з високими концентраціями Ca, Sr, Si, Fe, Cl корелює із захворюваністю сечокам'яної хвороби [3-6].

Як відомо несприятливі чинники довкілля викликають в організмі фізіологічні, генетичні, біохімічні, морфологічні та інші зміни [7]. Серед інтегральних показників, що дозволяють оцінити порушення на різних рівнях функціонування організму, є показники периферичної крові. Відзначено використання гематологічних та біохімічних показників крові для моніторингу стану здоров'я людини [7, 8].

На жаль використання класичних технологій не достатньо для очищення питної води. Тому при вирішенні цієї проблеми, поряд зі зміною інфраструктури водопостачання, яка передбачає створення нових форм водозабезпечення, у тому числі використання популярної на сьогодні фасованої води, необхідним є

постійний контроль якості питної води на всіх етапах водопідготовки та водопостачання. На сьогодні для контролю якості питної води використовують мікробіологічний аналіз та фізико-хімічні методи визначення органолептичних, токсикологічних, фізіологічних показників. При цьому основними критеріями є повноцінність складу питної води за макро- та мікроелементами, що обумовлено державними стандартами [8-11].

Вплив питної води на людину може відрізнятись залежно, як від комбінації різних елементів, так і від їх концентрацій, навіть за умов відповідності встановленим нормам. У питній воді можуть бути присутні біологічно активні речовини, які не нормуються, та речовин, які беруть участь у формуванні структури води. Сучасні фізико-хімічні методи аналізу складу води не дають можливості вичерпно оцінювати якість питної води і прогнозувати комплексний вплив присутніх речовин і структури води на біологічні об'єкти. Отже, оцінка якості води, основана на гідрохімічних показниках, не може бути достатньою [11, 12].

Таким чином, виникає потреба у розробці і використанні нових методів комплексної оцінки якості питної води та її можливого впливу на біологічні об'єкти. Таким методом є біотестування, яке повинно стати першим етапом визначення якості питної води, і головним – у визначенні можливих наслідків її впливу на живі організми [12, 13]. Все вище викладене і визначає актуальність даного напрямку досліджень.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дана робота виконувалася в рамках науково-дослідних робіт Міжнародної академії екології та медицини: «Впровадження сучасних технологій, організації висококваліфікованої та спеціалізованої медичної допомоги населенню з використанням міжнародного досвіду як формування екологічної безпеки країни в період економічної кризи» (Державний реєстраційний номер 0118U006640). В рамках науково-дослідної теми Інституту колоїдної хімії та хімії води НАН України: «Розробка нових підходів до оцінки та кондиціонування якості води», III-

1-12, (Державний реєстраційний номер 0112U000040); «Створення концепції управління біологічною активністю та фізико-хімічними властивостями води, у тому числі її ізотопним складом, при очищенні природних вод з урахуванням сучасних вимог до якості питної води», III-2-12, (Державний реєстраційний номер 0112U000038). В дисертації узагальнені результати галузевих пріоритетних НДР НАМН України, які виконувались в ДУ «Інститут медицини праці імені Ю.І. Кундієва НАМН» «Удосконалення методичних підходів контролю безпеки застосування нових пестицидів та інших хімічних речовин сільськогосподарського призначення», (Державний реєстраційний номер 0113U001442); «Удосконалення методології мультикомпонентного аналізу щодо пріоритетних забруднювачів виробничого середовища та довкілля», (Державний реєстраційний номер 0116U000503).

**Мета дослідження** - наукове обґрунтування тест-моделей і показників біотестування для підвищення ефективності моніторингу якості і безпеки водного середовища.

**Завдання дослідження**, обумовлені поставленою метою, передбачали:

1. Узагальнити вітчизняний та міжнародний досвід з питання застосування методів та показників для оцінки якості водного середовища.
2. Оцінити можливість застосування різних біологічних тест-об'єктів для встановлення безпечності води.
3. Визначити стан цитогенетичних параметрів крові у гідробіонтів, дослідити залежність цих порушень від вмісту токсичних речовин у водного середовища.
4. Встановити особливості токсичної дії води з різних джерел водопостачання за умови моделювання субхронічної інтоксикації у щурів.
5. Оцінити цитотоксичний ефект води з різних джерел водопостачання в дослідях *in vitro* на моделі культури клітин різного походження.
6. Провести аналіз показників комплексної оцінки якості води з використанням різних біологічних тест-об'єктів.

7. Обґрунтувати комплекс методів та показників біотестування для підвищення ефективності моніторингу якості водного середовища.

**Об'єкт дослідження** – біологічні тест-об'єкти різного рівня організації за умови експозиції водних розчинів різного походження в умовах *in vivo* та *in vitro*.

**Предмет дослідження** – цитологічні та цитогенетичні показники рослин, гідробіонтів, земноводних; гематологічні, біохімічні, імунологічні та гістологічні показники лабораторних тварин; життєздатність клітин у культурі за впливу води з різних джерел.

**Методи дослідження:** хіміко-аналітичні, цитологічні, токсикологічні, гематологічні, біохімічні, імунологічні, гістологічні, статистичні.

**Наукова новизна результатів дослідження** полягає в тому, що вперше:

- застосовано комплекс біологічних тест-моделей (рослини, гідробіонти, земноводні, теплокровні тварини, культура клітин) при дослідженні якості природних і питних вод та отримано нові дані, які дозволяють оцінити їх безпечність;

- встановлено негативний вплив води на морфометричні параметри, ріст і розвиток та цитогенетичні показники рослин (цибуля, пшениця, салат).

- доведено вплив токсичних речовин, що містяться у воді на цитогенетичні показники клітин крові гідробіонтів та земноводних, запропоновано цитогенетичні та мутагенні критерії оцінки якості та безпечності водного середовища.

- в експерименті на щурах встановлено порушення, біохімічних показників, імунологічної реактивності організму, гістологічні та морфофункціональні зміни внутрішніх органів в залежності від хімічного складу води;

- у дослідах на культурі клітини *in vitro* встановлено цитотоксичну дію речовин, що містяться у питній воді централізованого і нецентралізованого водопостачання;

- обґрунтовано комплекс методів та показників біотестування для підвищення ефективності екологічного моніторингу якості водного середовища.

### **Практичне значення одержаних результатів.**

Доведено доцільність використання комплексного біотестування (на тест-організмах різного рівня організації) у моніторингових цілях, що підтверджено експериментальними результатами. Запропоновано біологічні критерії оцінки якості та безпечності води. Як інтегральний показник безпечності води запропоновано – індекс загальної токсичності (ІЗТ), який дозволяє характеризувати її за категорією від «безпечної» до «дуже небезпечної».

За результатами досліджень отримано 4 патенти України на корисну модель: «Спосіб визначення генотоксичності водного середовища» (№ 201004569, 2011), «Спосіб визначення мутагенної активності питної води і культуральне середовище для його реалізації» (№ 201000606, 2011), «Спосіб підготовки біологічного об'єкта для визначення токсичності води», (№ 201012982, 2012), «Спосіб визначення цито- та генотоксичності питної води», (№ 201113123, 2014) та 2 Національний стандарти України: «Якість води. Метод визначення цито- та генотоксичності води і водних роз-чинів на клітинах крові прісноводної риби Даніо реріо (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan)» (ДСТУ 7387:2013), «Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості» (ДСТУ 7527:2014).

**Результати дисертаційної роботи впроваджені** в навчальний процес на кафедрі біології тварин факультету тваринництва та водних біоресурсів Національного університету біоресурсів і природокористування України; в навчальний процес на кафедрі природничо-технічного забезпечення діяльності водного транспорту та роботі державних установ: ДП "Український науково-дослідний інститут медицини транспорту Міністерства охорони здоров'я України"; ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки ім. Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України»; ДУ «Інститут медицини праці імені Ю.І. Кундієва Національної академії медичних наук

України лабораторія аналітичної хімії і моніторингу токсичних речовин»; НУБіП «Українська лабораторія якості та безпеки продукції АПК».

**Особистий внесок здобувача.** Автором особисто проаналізована вітчизняна і зарубіжна література за проблемою, визначена мета і поставлені задачі, обрані методичні підходи щодо проведення досліджень в умовах експериментів на лабораторних тваринах та альтернативних тест-системах в умовах *in vitro*. Ідею, щодо використання біологічних об'єктів при визначенні якості води сформовано разом з науковим консультантом. Автором самостійно виконано цитологічні, цитогенетичні, біохімічні і імунологічні дослідження, які включали: визначення показників крові у гідробіонтів, земноводних та теплокровних; дослідження цитотоксичних ефектів в умовах *in vitro*. Дисертантом самостійно здійснено аналіз первинного матеріалу, статистичну обробку результатів, проведено узагальнення результатів, сформульовані основні положення дисертаційної роботи та висновки. Окремі дослідження були виконані на базі ДУ «Інститут медицини праці імені Ю.І. Кундієва Національної академії медичних наук України»: токсикологічні дослідження на базі лабораторії промислової токсикології і гігієни праці при використанні хімічних речовин під керівництвом академіка НАМНУ, члена-кореспондента НАНУ Трахтенберга І.М.; хіміко-аналітичні дослідження складу питної води виконано у співпраці з старшим науковим співробітником к.б.н. Андрусишиною І.М.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційної роботи доповідались та були обговорені на:

**1. Міжнародних наукових форумах:** Міжнародній науковій конференції «Достижения науки и передовые технологии по восстановлению засоленных земель и улучшению эксплуатации ирригационных сооружений». (Ашгабат, Туркменістан, 2011); III-й всеукраїнський з'їзд екологів з міжнародною участю (Вінниця, Україна, 2011); Міжнародній науково-практичній конференції «Достижения і проблеми генетики, селекції та біотехнології» (Одеса, Україна, 2012); Workshop: Cooperation in GreenTec with Eastern Europe Focussing Water Treatment. (Hannover Fair, Germany, 2012); Workshop: Water Management Network

- Membrane Technologies. (Berlin, Germany, 2013); Міжнародній науковій конференції «Механізми функціонування фізіологічних систем» (Львів, Україна, 2014); Міжнародній науковій конференції “Наука, техника и инновационные технологии в эпоху могущества и счастья” (Ашгабат, Туркменістан, 2015); Міжнародній науково-практичній конференції «Чиста вода. Фундаментальні, прикладні та промислові аспекти» (Київ, Україна, 2015); X Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Київ, Україна, 2015); Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальные проблемы медицины» (Гомель, Беларусь, 2015); Міжнародній науково-практичній конференції «Перспективи майбутнього та реалії сьогодення в технологіях водопідготовки» (Київ, Україна, 2015); Міжнародній науковій конференції «Інноваційні підходи і сучасна наука» (Київ, Україна, 2016); Міжнародній науково-практичній конференції «Ефекти радіації та інших ксенобіотиків на репродуктивну систему і організм (м. Долина, Івано-Франківська обл., Україна, 2016); Міжнародній науково-практичній конференції, «Чиста вода. Фундаментальні, прикладні та промислові аспекти» (Київ, Україна, 2016); Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальные проблемы медицины» (Гомель, Беларусь, 2016); Міжнародній науково-практичній конференції «XV Чтения им. В.В. Подвысоцкого» (Одеса, Україна, 2016); XI Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Київ, Україна, 2016); Міжнародній науково-практичній конференції «Public health: problems and development priorities» (Острог, Україна, 2018); XVIII Міжнародній науково-практичній конференції «Ресурси природних вод карпатського регіону». Проблеми охорони та раціонального використання (Львів, Україна, 2019); III Міжнародній науково-практичній конференції "Перспективи майбутнього та реалії сьогодення в технологіях водопідготовки" (до 135-річчя НУХТ) (Київ, Україна, 2019).

**2. Національних та регіональних наукових форумах:** Всеукраїнський науково-практичній конференції «Екологія міст та рекреаційних зон» (Одеса, Україна, 2010); Науково-практичній конференції “Актуальні питання гігієни та

екологічної безпеки України” XI марзєєвські читання (Івано-Франківськ, Україна, 2015); VI-ому Національному конгресі з біоетики (Київ, Україна, 2016); Науково–практичній конференції «Актуальні питання громадського здоров’я та екологічної безпеки України» XIV марзєєвські читання (Київ, Україна, 2018); VII-ому Національному конгресі з біоетики (Київ, Україна, 2019).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 64 наукових праці, у тому числі 22 статті – у наукових фахових виданнях, перелік яких затверджений МОН України (з них 5 – без співавторства), 4 патенти на корисну модель, розроблено та затверджено 2 стандарти загальнодержавного значення (ДСТУ)., розділи у монографії, 14 статей – у журналах та збірниках наукових праць, 21 – тези доповідей у збірниках матеріалів наукових форумів.

**Структура дисертації.** Дисертація викладена на 342 сторінках друкованого тексту. Основний текст, який містить 47 таблиці та 49 рисунків, викладено на 287 сторінках. Робота складається зі змісту, переліку умовних позначень, анотації, вступу, 7 розділів (аналітичний огляд літератури; матеріали та методи дослідження; 6 розділів результатів власних досліджень), аналізу та узагальнення результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, який включає 407 джерела (з них 242 – кирилицею, 145 – латиницею) та 15 додатків.



**РОЗДІЛ 1.**  
**СУЧАСНІ ДАНІ СТОСОВНО ОЦІНКИ ТОКСИЧНОСТІ І**  
**БЕЗПЕЧНОСТІ ПИТНОЇ ВОДИ**  
**(аналітичний огляд наукової літератури)**

У довкіллі, у тому числі гідросфері, одночасно присутні близько 60000 речовин і сполук, які постійно біологічно й хімічно трансформуються, а також взаємодіють між собою, проявляючи синергізм або антагонізм при токсичній дії на водні екосистеми. Масштаби забруднення настільки значні, що природні процеси самоочищення та здатність гідросфери до самовідновлення в деяких районах світу не можуть нейтралізувати токсичний вплив господарської діяльності людини.

**1.1. Екологічні проблеми якості води**

Однією з головних екологічних проблем людства є якість води, що прямо пов'язано зі станом здоров'я населення, екологічною чистотою продуктів харчування, з виникненням проблем медичного й соціального характеру [1, 2].

По даним Всесвітньої Організації Охорони здоров'я (ВОЗ) – 80% всіх захворювань у світі передається водою. Щорічно 25 мільйонів чоловік помирає від цих захворювань. Проблемою є те, що на планеті постійно скорочуються запаси чистої питної води. І це відбувається при зростаючому обсязі водоспоживання [1, 2, 14].

Основні джерела прісної (питної) води – ріки та прісні озера – поширені на континентах украй нерівномірно. У Європі та Азії, де проживає 70% населення, зосереджено 39% світових запасів річкових вод. У Європі, де проживає майже 20% населення планети, запаси прісної води становлять лише 7% всіх світових запасів води. Протягом тривалого історичного періоду в регіонах з достатніми природними запасами чистої прісної води люди повною мірою задовольняли свої потреби в питній воді, не відчуваючи в ній нестачі.

В Україні середньодобове споживання води на одну людину становить 320 л, а це в 1,5–2 рази перевищує середній рівень споживання прісної води країнами

Європи [15, 16]. В Україні 445 міст та 829 селищ міського типу мають централізовані системи водопостачання. Каналізаційними системами забезпечено 417 (94 %) міст та 519 (57 %) селищ міського типу. 2/3 українців споживають воду з рік, озер і водоймищ, а 1/3 одержують воду з підземних джерел. Основне джерело питної води в Україні – р. Дніпро [14].

В Україні спостерігається нерівномірний розподіл питної води по регіонах. У Донецькій, Запорізькій, Дніпропетровській, Миколаївській, Херсонській та Одеській областях на 1 кв. км поверхні доводиться всього від 5-10 до 40 тис. куб. м води, включаючи підземні, тобто 120–400 куб. на одну людину. Це в 15-20 разів менше, ніж у західних областях України (Львівська, Ровенська, Івано-Франківська, Закарпатська, Тернопільська). У великих містах (Одеса, Харків) на одну людину доводиться в середньому 400 л води на добу, у Дніпрі витрати становлять – 250 л, сільській місцевості – 35–40 л [17 -19].

Поряд з цим, за даними Українського державного науково-дослідного інституту "УКРВОДГЕО", 69 % всієї питної води, що поставляється у дома українців, не відповідає встановленим санітарним нормам.

У зв'язку з інтенсивним ростом чисельності населення планети та його господарської діяльності, що вимагає величезних витрат водних ресурсів, потреба у воді неухильно зростає. Крім того, втрати прісної води відбуваються внаслідок скорочення водоносності рік, забруднення водойм стічними водами тощо [20]. З огляду на це, проблема водопостачання якісною питною водою стала однією з найважливіших у житті та розвитку людського суспільства.

Основними токсичними речовинами, що надходять до водних об'єктів (поверхневі та підземні джерела води) зі стічними водами, є нафта та нафтопродукти, фенол, аміак, пестициди, важкі метали, складні хімічні сполуки та ін. Деякі сполуки можуть зберігатися десятиліттями в поверхневих і підземних водах і глибоко проникати в поземні горизонти. Особливу тривогу викликає низька якість поверхневих і підземних вод, які постійно піддаються забрудненню викидами підприємств. Крім того, майже 100 куб. кілометрів дощової води може наситити залізом, що викидають у смітник. Частка штучного

озалізнення води позначається на якості води [21, 22]. З господарсько-побутовими стічними водами до джерел питної води можуть потрапити збудники інфекційних захворювань [23].

Концентрація різних хімічних елементів у питній воді залежить від природних і техногенних (антропогенних) факторів. Природні причини обумовлені рівнем природного вмісту елементів у відкритих водоймах, підземних водах, ґрунті та гірських породах, а техногенні – надходженням у навколишнє середовище хімічних елементів у результаті господарської діяльності людини [3, 9].

Згідно даних [3, 24], до хімічних елементів, вміст яких у питній воді значною мірою визначається специфічними біогеохімічними особливостями того чи іншого регіону, відносяться фтор, залізо, барій, титан, цирконій, ванадій, молібден, літій, стронцій і кобальт.

Вміст у питній воді важких металів (свинець, мідь, нікель, цинк), а також марганцю та хрому залежить як від геохімічних особливостей території, так і від специфіки техногенного впливу на довкілля. Фахівцями встановлено, що якщо концентрація різних хімічних елементів у питній водопровідній воді перевищують фоновий рівень, це є підтвердженням їх техногенного, а не природного, походження [3, 24].

До шкідливих речовин, що забруднюють джерела водопостачання та питну воду, відносять пестициди. Це хімічні речовини, які використовують для захисту рослин, сільськогосподарських продуктів, деревини, виробів з вовни, бавовни, шкіри, для знищення ектопаразитів тварин і боротьби з переносниками небезпечних захворювань [25, 26].

За даним вчених [9, 20], використання пестицидів у сільському господарстві може привести до місцевого та регіонального забруднення джерел питної води. Вміст пестицидів у воді відкритих водойм і підземних вод в значній мірі змінюється залежно від сезону року та місцевих геологічних особливостей. Найвища концентрація пестицидів виявляється у водах навесні та на початку

літа після злив. Пестициди виявлені майже в 50% досліджених проб ґрунтових вод, відібраних на території США.

Усього за даними Американського Агентства по Охороні Навколишнього Середовища (EPA) та інших організацій США, більше 160 діючих речовин пестицидів відомі як канцерогени або з підозрілою канцерогенною дією.

Значну небезпеку для населення становлять випадки екстремально високого забруднення питної води шкідливими речовинами техногенного походження. Зазвичай це відбувається при різних техногенних аваріях та екологічних катастрофах [15], які характеризуються потужними викидами токсичних речовин у довкілля. Зокрема, вагомий внесок в забруднення води вносять ядерні технології та підприємства паливної промисловості. Вода та ґрунт насичуються радіоактивними речовинами й важкими металами.

У результаті аварії на Чорнобильській АЕС в Україні уражена радіацією територія площею 2712 км<sup>2</sup> повністю виключена з народногосподарського використання. Причому період розпаду деяких радіонуклідів, які потрапили у довкілля досягає 130 років. Побічним результатом чорнобильської катастрофи стало забруднення водних джерел і, як наслідок, питної води радіонуклідами. Це привело до дефіциту чистої природної води в зоні катастрофи [27- 29]. Крім того, частина радіонуклідів з течією річок потрапила у Чорне та Азовське моря [30 - 32].

Проблема забруднення поверхневих джерел водопостачання і якості питної води актуальна для всього світу. Тому вчені багатьох країн зайняті проблемами очищення забруднених вод, опрісненням морської солоної води та пошуком нових джерел вологи, зокрема відомі проекти з буксирування антарктичних айсбергів до берегів Каліфорнії, Саудівської Аравії та інших країн.

У світовій практиці стандарти якості питної води постійно переглядаються. Стандарти ВООЗ 1970 р. містили 9, 1984 р. – 27, а 1993 р. – уже 95 показників. Зазначені стандарти покладені в основу Директиви 90/778/ЄС і для багатьох країн світу є основними.

Одним зі шляхів вирішення проблеми забезпечення населення високоякісною та корисною для організму людини питною водою є використання прісних підземних вод і, насамперед, артезіанських [33]. Циркулюючи в гірських породах протягом сотень і тисяч років, ці води збагачуються широким спектром мікроелементів і мінеральних речовин. Крім того, вони відрізняються від поверхневих вод винятковою стерильністю та піддаються меншому забрудненню внаслідок техногенного впливу та змін клімату.

Для поліпшення якості питної води варто реалізувати ряд заходів. У першу чергу це стосується розробки й впровадження державних стандартів на питну воду. На початку 2002 р. вступив у дію Закон України "Про питну воду та питне водопостачання", що визначає правові, економічні та організаційні положення функціонування системи питного водопостачання, спрямовані на гарантоване забезпечення населення якісною та безпечною для здоров'я людини водою. У той же час, дотепер основним нормативним документом, що визначає якість питної води, залишається ДСТУ 2874-82 "Вода питна. Гігієнічні вимоги й контроль за якістю". По цьому нормативному документі якість питної води оцінюється за 28 санітарно-хімічними і бактеріологічними показниками.

З 01.01.2000 р. в Україні уведений у дію новий нормативний документ Державні санітарні правила і норми (ДСанПіН) №383 (186/1940) "Вода питна. Гігієнічні вимоги до якості води централізованого господарсько-питного водопостачання". Він включає 54 показника якості і контролю за якістю питної води. У цьому документі значно розширений спектр показників, нормативні рівні деяких з них стали більш вимогливі.

Гігієнічні нормативи якості питної води, представлені в новому нормативному документі ДСанПіН "Вода питна", є більше жорсткими, чим у ДСТУ 2874-82 "Вода питна", і більше наближеними до стандартів якості ВООЗ та ЄС, у деяких випадках жорсткіші вимоги до таких показників (органолептичні, мутність, вміст барію, фтору, хлорфенолів, хлороформу, чотирьоххлористого вуглецю).

ДСанПіН № 383 є відомчим документом, що став в основі нового національного стандарту (ДСТУ) по питній воді. Практика введення ДСанПіН №383 "Вода питна" у дію на водопровідних станціях і контролю якості води Санепідемслужбою дозволить при необхідності переглянути деякі з них. Наближення вітчизняних гігієнічних нормативів якості питної води до рівня стандартів ВООЗ та ЄС є одним з елементів входження України до Європейського Співтовариства.

Якість питної води залежить від багатьох чинників: природою джерела, регіональними особливостями ґрунтових порід і мінералів, ефективністю методів знезараження, ступенем антропогенного навантаження (хімічне або мікробне забруднення) та ін. [16]. Причому, саме вживання питної води забезпечує добову потребу організму в макро- і мікроелементах. З питною водою людина отримує від 8 до 25% добової потреби мінеральних речовин (Са – до 20%, Mg – 25%, F – 50-80% до 50% I) [17- 18]. З іншого боку, водопровідна вода стає активним чинником шкідливого впливу на здоров'я людини і першопричиною виникнення багатьох небезпечних захворювань [14]. Встановлено тісний зв'язок між мінеральним складом питної води та рівнем захворюваності населення [14- 17].

При вирішенні проблеми забезпечення населення якісною питною водою, поряд зі зміною інфраструктури водопостачання, яка передбачає виникнення нових форм водозабезпечення, в тому числі використання популярної на сьогодні фасованої води, необхідним є постійний контроль якості питної води на всіх етапах водопідготовки та водопостачання [19, 21].

Особливу роль в оцінці стану навколишнього середовища відіграють біологічні тести. Це пов'язано з тим, що результати хімічного аналізу, проведеного за допомогою складного обладнання, у багатьох випадках не дозволяють оцінити справжню небезпеку впливу тих чи інших забруднювачів на середовище, прогнозувати наслідки їхнього впливу на живі організми [21]. Різноманітні забруднюючі речовини, потрапляючи в навколишнє середовище, можуть зазнавати різних перетворень, підсилюючи при цьому свою токсичну

дію. Із цієї причини необхідними є методи інтегральної оцінки якості середовища (води, ґрунту, повітря). Величезну роль при цьому грають методи біотестування [22, 27].

Біотестування – це методичний прийом, який базується на оцінці впливу факторів середовища на організм, його окрему функцію чи систему організмів[28].

Біотестування застосовується для експресного контролю за відходами промислових підприємств, контролем технологічних процесів у режимі реального часу; для визначення рівня токсичності нової продукції, для контролю за токсичним ефектом матеріалів, лікарських речовин, харчових продуктів, визначення якості питної води тощо [29 - 31].

Методичні можливості вивчення токсичності різних речовин на тест-організмах за останні двадцять років істотно розширилися. Ведеться інтенсивний пошук найбільш чутливих тест-об'єктів і показників, відпрацьовуються інструментальні методи аналізу, застосовуються різні способи оцінки якості водного середовища, зміни параметрів фізіологічних систем і біохімічного статусу тест-організмів.

Якщо токсичний ефект вивчають на рівні клітини, то оцінюють насамперед цитотоксичність речовини. Токсичний процес на клітинному рівні проявляється: структурно-функціональними змінами клітин (зміна форми, спорідненості до барвників, рухливості тощо); передчасною загибеллю клітин (некроз, апоптоз); мутаціями (генотоксичність). Різноманітність ефектів, що формуються при цьому, з боку цілісного організму обумовлено складністю організації клітин, різноманіттям клітинних форм, що становлять організм. Особливості, що сформувалися в процесі еволюції, структури та функції окремих клітинних типів, які формують різні органи і тканини, настільки істотні, що чутливість різних клітин до токсикантів може відрізнятися в тисячі разів. Проте, живі організми об'єднані спільністю фундаментальних властивостей, а це дозволяє виділити й деякі загальні механізми, що лежать в основі цитотоксичної дії ксенобіотиків. До числа найважливіших відносять наступні: порушення

енергетичного обміну, порушення гомеостазу внутрішньоклітинного кальцію, активація вільно-радикальних процесів у клітині, порушення процесів синтезу білка та клітинного розподілу, ушкодження клітинних мембран [7, 32, 33].

Необхідно відзначити, що всі ці механізми тісно зв'язані один з одним. Часом один із них є пусковим, але надалі особливу значимість в ушкодженні клітини здобувають інші. Дуже часто два або декілька зі згаданих механізмів пов'язані між собою типу "порочного кола". Тому поділ на заявлені механізми носить штучний характер.

Отримані нами дані після проведених численних досліджень показали, що біотестування на організмовому і клітинному рівнях доцільно застосовувати для комплексної оцінки якості водного середовища, критеріями якої служать стандартні показники смертності, розвитку й розмноження тваринних і рослинних тест-організмів, а також структурні (за мікроядерним тестом) і функціональні (по лейкоцитарній формулі крові) параметри клітин.

Використання екотоксикологічних біотестів - рослинних і тваринних тест-організмів та клітинних біомаркерів вкрай важливо для об'єктивного і комплексного контролю за все зростаючою кількістю ксенобіотиків, що забруднюють водне середовище, більшість з яких не нормуються існуючими стандартами, проте мають здатність викликати різноманітні токсичні, цитотоксичні, генотоксичні або мутагенні ефекти. Універсальність клітинної організації відкриває широкі можливості для токсикологічних досліджень із застосуванням різних груп тварин і рослин і подальшою екстраполяцією отриманих результатів на організм людини [34].

Проблеми біотестування водних зразків на клітинному рівні досить докладно висвітлені в роботах [11, 13]. У них описуються дослідження, що проводяться на субклітинному і молекулярному рівнях, однак експерименти трудомісткі та дорого коштують, внаслідок чого їхнє широке застосування практично обмежене.



## 1.2. Екотоксикологічна оцінка води

Однією з головних проблем сьогодення залишається проблема забезпечення якісною питною водою. Вода є незамінним компонентом живого організму і необхідною умовою для життя. Вона виконує фізико-хімічні функції, які забезпечують нормальний перебіг біохімічних процесів у будь-якому живому організмі. Проте вживання неповноцінної по вмісту макро- і мікроелементів води призводить до безлічі захворювань, погіршення імунної системи [35], а водопровідна (хлорована) вода сприяє накопиченню у питній воді канцерогенних речовин [36]. Методи біотестування при оцінці якості питних вод набула особливої актуальності у зв'язку зі стрімким зростанням кількості потенційно небезпечних хімічних сполук, що забруднюють природні джерела питного водопостачання. Фізико-хімічні методи визначають лише наявність і кількість хімічних елементів в тестованих водних зразках, але не можуть визначити поведінку антропогенних сполук і природну вразливість водних екосистем до комбінованих ефектів їх забруднення [37].

Біотестування – один з методів біологічного контролю, який передбачає цілеспрямоване використання стандартних тест-організмів і методів для визначення ступеня токсичності водного середовища, заснований на вимірюванні тест-реакції організму, його окремої функції або системи. Тест-організми перебуваючи в досліджуваному водному зразку, реагують на небезпеку незалежно від того, які речовини і в яких поєднаннях приводять до змін їх життєво важливих функцій [38,39].

Вибір тест-організмів визначається їх поширеністю, простотою культивування в лабораторних умовах, доступними методиками проведення експериментів і експресивністю отримання результатів.

У наших роботах для аналізу впливу токсичних речовин у водних зразках на організм і його клітини був відібраний наступний набір біотестів: рослини – цибуля *Allium cepa*, пшениця *Tríticum*, салат *Lactuca sativa*, огірок *Cucumis sativus*; безхребетні – гідра *Hydra attenuate*; ембріони (ікринки) риб, *Danio rerio*; ракоподібні – дафнія *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg і *Daphnia magna* Straus,

хребетні тварини – риби даніо *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan, гупії *Poecillia reticulata* Peters, золота рибка *Carassius auratus auratus*, короп *Cyprinus carpio*; карась *Carassius auratus gibelio*; шпорцеві жаби *Xenopus*; щурі Vistar.

Жива система характеризується множинністю реагування і містить такі компоненти, як гомеостатичне врівноваження, буферизація, системи депонування та зв'язування токсикантів тощо. Кінцева картина, що формується в результаті взаємодії гідробіонтів (та інших живих організмів) з токсикантами, не рівнозначна і зумовлена двома основними факторами: силою впливу токсиканта, яка залежить від його хімічної природи, біологічної активності, концентрації, тривалості та повторності впливу – з одного боку, та особливостями реагування живих організмів на цей вплив – з другого. Без сумніву, будь-яка речовина за достатньо високих концентрацій може впливати на гідробіонтів, виявляючи ушкоджувальний та пригнічувальний вплив.

Результати проведених багаторазових досліджень дало можливість стверджувати, що біотестування на організовому та клітинному рівнях доцільно застосовувати для комплексної оцінки якості водного середовища, критеріями якої служать стандартні показники виживаності, розвитку і розмноження тварин і рослинних тест-організмів, також структурні та функціональні параметри їх клітин [40].

Екотоксикологічна оцінка води з різних джерел водопостачання на тест-організмах різних систематичних груп і їх клітинах дозволяє врахувати шкідливий вплив токсичних речовин на тест-об'єкти з подальшою екстраполяцією отриманих результатів на організм людини.

Метод біотестування на рослинних тест-об'єктах звичайній простий і чутливий спосіб визначення інтегральної токсичності води, викликаной різними чинниками. Показником токсичності виступає пригнічення росту корінців цибулі. Встановлено, що ріст корінців пригнічується при більш низьких концентраціях токсиканту. Цей метод дозволяє визначити не тільки токсичність водного середовища, а і його мутагенні властивості [41, 42].

Методика на гідрах *Hydra attenuata* ґрунтується на встановленні різниці між кількістю загиблх у випробній воді та у воді, в якій тест-організми утримуються (контроль). Дорослі тест-організми *Hydra attenuata* експонують в статичній системі упродовж 96 годин. Під впливом токсичних агентів гідра проявляє широкий спектр морфологічних змін, що вказують на сублетальні (хронічні) і летальні ефекти. Спостереження ведуться щоденно з фіксуванням морфологічних змін. Наприкінці випробувань на основі аналізу кількості та ступеню помітних морфологічних змін у гідр реєструють виживаність контрольної і піддослідної груп тварин [43].

Основним видом організмів гідробіонтів, який легко культивується в лабораторних умовах в будь-яку пору року є *Ceriodaphnia affinis* та *Daphnia magna*, використовується в ролі тест-об'єкта для оцінки токсичності водного середовища. Дафнії належать до найбільш поширених представників зоопланктону. Популярність цих рачків як тест-об'єктів пов'язана, головним чином, з їхніми фізіологічними властивостями. За характером живлення вони є фільтраторами, чутливими до дії токсичних речовин, легко вводяться в культуру, доволі стійкі в лабораторних умовах (при культивуванні *in vitro*), дають цілий комплекс тест-реакцій і мають короткий життєвий цикл. Останнє дозволяє простежити наслідки токсичного впливу (навіть у малих концентраціях) протягом ряду поколінь. Біотестування із залученням таких гідробіонтів, як дафнії є загальноприйнятим і широко використовується для дослідження як токсичності різних хімічних речовин, так і якості водного середовища загалом [44].

Антропогенні зміни водних екосистем відображаються на фізіологічному стані гідробіонтів, зокрема риб та жаб. Костисті риби та жаби – досить численний і розповсюджений клас, що займає важливе місце в екосистемі, визнані зручними тест об'єктом для вивчення якісного стану водного середовища. Найбільш чутливою до забруднення є молодь гідробіонтів[45]. Також важливо досліджувати вплив на земноводні, оскільки на ранніх стадіях розвитку їх організм є найбільш уразливим до токсикантів [46]. Вивченню

підлягає проблема дослідження коливальних процесів біопродукційних показників молоді риб та личинок безхвостих амфібій, які є одними з об'єктів, що забезпечують функціонування водних систем [47] .

Тест-об'єкти риб та жаб рекомендовано як модельні об'єкти при визначенні біологічної дії потенційно небезпечних речовин в воді, для скринінгу токсикантів таких як мутагени, тератогени та канцерогени. Їх можна рекомендувати використовувати для скринінгу потенційно небезпечних для людини токсичних речовин, що потрапляють в питну воду. Це підтверджують коефіцієнти кореляції між показниками на рибах і в культурі лімфоцитів периферичної крові людини. Отримані значення коефіцієнтів лінійної кореляції свідчать про взаємозв'язок багатьох показників, що визначаються на рибах, і кількості пошкоджених аберрантних метафаз з метаболічної активацією [48]

Однією з інтегральних систем, що дозволяють простежити порушення на різних рівнях функціонування, є система крові. Гематологічні показники добре відображають реакцію декількох систем організму на вплив різноманітних фізіологічних та патологічних факторів на організм. Умови перебування накладають відбиток на морфологічні особливості і кількісні показники червоної й білої крові. До того ж, гематологічні показники є високоспецифічними для виду і змінюються в достатньо вузьких межах, що дозволяє використовувати їх в якості маркерів різних фізіологічних та патологічних процесів. Вивчення внутрішньовидових особливостей клітинного складу крові риб та жаб є необхідним для інтерпретації фізіологічних змін, що виникли в наслідок генетичних чи філогенетичних змін та в наслідок впливу факторів зовнішнього середовища [13, 49] .

Серед перспективних методологічних підходів до використання показників крові у якості біомаркерів слід відзначити мікроядерний тест, який успішно використовується як метод дослідження генотоксичності водних розчинів різних класів сполук *in vivo*, так і для моніторингу хімічного забруднення води *in situ*. Для дослідження за допомогою мікроядерного аналізу на рибах і жабах найчастіше використовували еритроцити периферичної крові, також інші

клітини тканин плавців та зябер у риб. Мікроядерний тест на еритроцитах дає можливість визначення кластогенних речовин у водному середовищі, оскільки еритроцити риб та жаб мають ядра. Численні дослідження показали, що в еритроцитах периферичної крові у польових умовах часто зустрічаються мікроядра внаслідок впливу різноманітних поллютантів [49]

Гематологічні показники живих організмів є індикатором не тільки фізіологічного стану організму, але і одним з основних критеріїв виявлення забруднення питних вод [50, 51]

Антропогенні зміни водних екосистем не можуть не відображатись на фізіологічному стані гідробіонтів, зокрема риб та жаб. У сукупності з іншими параметрами, одержуваними при популяційних дослідженнях (генотип, особливості морфології) це може дати корисні у практичному й у теоретичному відношенні відомості про рівень антропогенного навантаження водою.

Одними з основних експериментальних тварин в біологічних і медичних дослідженнях є щури. Для оцінки впливу різних токсичних речовин у воді на організми лабораторного щура лінії Вістар, вивчають їх поведінку, окремі органи і клітини крові [52]

Загальна теорія систем в біології виділяє надорганізмовий (популяційний) рівень та рівень цілісного організму, за яким слідують системний, органний, тканинний, клітинний та субклітинний. У токсикології вказаному підходу зокрема відповідає розподілення показників на інтегральні (неспецифічні) та специфічні. Перші дозволяють переважно судити про стан всього організму, або його найважливіших систем, другі – про стан окремих органів або функцій. При цьому інтегральні показники, такі як маса тіла, морфологічний склад крові, морфологічні зміни в органах, коефіцієнт маси внутрішніх органів – виглядають біологічно більш значущими [53] Однак, визначення специфічних показників, які відображають дію досліджуваної речовини на окремі системи та органи, метаболічні процеси, активність ферментів дозволяє встановити механізм дії і найбільш ранні прояви токсичного ефекту [54]

До інтегральних показників, які відображають стан організму відноситься маса тіла тварин та відносна маса або індекс маси внутрішніх органів. Динаміка зміни маси тіла експериментальних тварин під час експозиції відображає загальний стан організму та загальної (неспецифічної) реакції на інтоксикацію. Це дозволяє у процесі експерименту швидко оцінити стан організму тварин, рівень розвитку інтоксикації, а також скорегувати за необхідності хід експерименту [1, 8, 11 ]

Органами-мішенями токсичного впливу хімічних речовин на організм в першу чергу є печінка, селезінка, нирки. При цьому маса тіла тварин може не змінюватись, тому, поруч з визначенням маси тіла оцінюють абсолютну і відносну масу (маса органу/маса тіла  $\times 100$ ) внутрішніх органів. Ці показники відносно прості і досить чутливі і показові. Абсолютний і відносний показник маси приблизно однаково інформативний лише у випадку, коли відсутні значні відмінності у масі тіла тварин. У зв'язку з цим, абсолютні показники використовують лише при відсутності розбіжностей у масі дослідних і контрольних тварин. У випадку, коли маса тіла тварин відрізняється співставляють відносні показники маси органів [8, 12] .

Чутливою до дії потенційно небезпечних екзогенних чинників є система крові. Клітини крові одними із перших стикаються з речовинами та сполуками, які надходять до організму. Це зумовлює необхідність обов'язкової оцінки стану периферичної крові за умови визначення токсичності речовин [8, 32, 55] .

Вплив токсикантів на систему крові характеризується як загальними, так і специфічними проявами [56]. Основними механізмами гематотоксичної дії є порушення еритропоезу, пригнічення процесу синтезу гему і глобіну, а також мембрано- та цитотоксична дія, що призводить до зниження тривалості життя клітин та їх морфофункціональних змін. Класичним проявом негативного впливу ксенобіотиків на організм є розвиток анемії. Зазвичай анемія визначається зниженням вмісту гемоглобіну в крові, проте щоб з'ясувати, залізодефіцитна вона чи ні, визначають зміст цинкпротопорфірину (ЦПП) – метаболіту обміну речовин, в процесі перетворення якого утворюється гем. Підвищуватися вміст

ЦПП може за впливу цілої низки забруднювачів, зокрема свинцю та інших важких металів.

Біохімічний аналіз крові дозволяє оцінити роботу внутрішніх органів: печінки, підшлункової залози, нирок та ін. Крім того, проведення біохімічного аналізу крові дає можливість оцінити вміст мікроелементів в організмі [57].

Через різноманітні функції печінки в життєдіяльності організму оцінка її функціональної здатності потребує широкого набору методів. Проте у більшості токсикологічних досліджень обмежуються визначенням ранніх та найбільш чутливих ознак порушення функції печінки. У зв'язку з цим, для оцінки функціонального стану печінки обираються такі біохімічні показники сироватки крові: активність ферментів аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ), лужної фосфатази (ЛФ), гамма-глутамілтрансферази (ГГТ), вміст білірубину, сечової кислоти [58].

При визначенні якості питних вод методами біотестування виникає ряд важливих питань щодо екстраполяції отриманих результатів на організм людини, як, наприклад, чи є дані про токсичність зразків води, отримані за допомогою тваринних та рослинних тест-організмів, сигналом небезпеки і для людини. Використання перерахованих вище методів дає можливість адекватного перенесення результатів, отриманих на рівні клітини, на більш високий рівень організації – організм.

Таким чином, аналіз індивідуальних особливостей перерахованих тестових тварин і рослин, а також порівняння їх чутливості по відношенню до ряду токсичних речовин дозволяє сформулювати загальні вимоги, яким повинні відповідати використовувані тест-організми, а саме простота культивування; легка відтворюваність в лабораторних умовах; забезпечення сталості генетичних і фізіологічних характеристик; висока чутливість до основних поллютантів природних вод; легка спостережуваність тест реакцій та їх відтворюваність. При підборі тих чи інших видів тварин або рослин для проведення специфічних біологічних тестів можуть бути рекомендовані і інші, але зазначеним вище віддається перевага.

При оцінці якості питної води вирішення проблеми комбінованої дії хімічних речовин полягає у застосуванні біоіндикаторів для кількісної оцінки токсичності. Цей метод біотестування дає можливість по відповідній реакції тест-організму отримати інтегральну інформацію стосовно сукупності токсичних агентів, що впливають на тест-об'єкт. Завдяки простоті, оперативності та доступності біотестування отримало широке визнання у всьому світі і його все частіше використовують поряд з методами аналітичної хімії. Значною перевагою цього методу є можливість виявлення токсичного впливу комплексу речовин, які аналітично не визначаються.

Можливі шляхи погіршення якості питних вод пов'язані зі змінами їхнього хімічного складу, радіаційним і мікробіологічним забрудненням, тривалістю та умовами зберігання, а також особливостями технологій водоподготовки [59].

Стосовно мікробіологічного забруднення води, тобто негативного впливу мікробних складових продуктів життєдіяльності людини або тварин, що надходять у водні об'єкти [60], то забруднення води визначається по загальному мікробіологічному обсемененню та присутності санітарно-показових мікроорганізмів – індикаторів наявності виділень людини або тварин. У води прісних водойм разом зі стічними водами попадають представники мікрофлори людини та тварин (кишкова паличка, цитробактер, ентеробактерій, ентерококи, клостридії) і збудники кишкових інфекцій (черевного тифу, паратифу, дизентерії, холери, лептоспірозу, ентеровірусних інфекцій). Забруднення води органічними речовинами супроводжується збільшенням бактерій і мікоз. Таким чином, вода є чинником передачі збудників багатьох інфекційних захворювань. Деякі збудники можуть навіть розмножуватися у воді (холерний вібріон, легіонели) [61].

Дослідження впливу *E.coli* на біологічні об'єкти дуже важливо. Оскільки цей мікроорганізм розповсюджений у природі, а його підвищена концентрація в продуктах харчування та воді може згубно впливати на людину, зокрема викликати дисбактеріоз, а деякі штами – навіть холероподібні захворювання [62].



У нормі непатогенні бактерії *E.coli* населяють кишечник людини, проте можуть викликати розвиток патологій при потраплянні до інших органів або порожнини людського тіла. Наприклад, якщо бактерія попадає в черевну порожнину, може виникнути перитоніт. Доза, що призводить до захворювання, залежить від типу та кількості патогенної кишкової палички (для ентеротоксигенної *E.coli* ця величина може становити від 100 мільйонів до 10 мільярдів бактерій, для ентероінвазивної та ентерогеморагічної *E.coli* - усього 10 організмів). Найбільш чутливі до захворювання діти раннього віку, літні та ослаблені люди [63].

### **1.3. Цитогенетичні критерії для оцінки екологічної безпечності води**

Мікроядра як особливі структури ядра були виявлені давно. Особливо численні такі повідомлення в гематологічній літературі. Вперше мікроядра були виявлені в еритроцитах у кінці XIX століття, і найчастіше позначались як тільця Жолі. В кінці минулого століття та на початку нинішнього багато гематологів констатували, що деякі речовини, які вводили до організму, можуть викликати різке підвищення числа еритроцитів з тільцями Жолі [64, 65].

Кількість досліджень, виконаних з використанням мікроядерного тесту, продовжує збільшуватись досить швидкими темпами [66]. В США в рамках токсикологічної програми Агентства по охороні навколишнього середовища (EPA) створена робоча група з спеціалістів по мікроядерному аналізу. Мікроядерний тест включений як обов'язковий при токсикологічних дослідженнях у країнах Європейського економічного співтовариства та Японії. Широко використовується мікроядерний тест і в інших країнах [20, 67]. Незважаючи на значні успіхи в розвитку мікроядерного тесту, усе ще виникає багато питань відносно методології даного аналізу, тому продовжуються роботи стосовно розробці якомога простіших та зручніших для практичного використання методик.

Збільшення числа клітин із мікроядрами, та з патологіями поділу, як правило, супроводжується пригніченням мітотичної активності. Це може бути

зумовлено пониженою життєздатністю клітин з мікроядрами [68, 69]. Так було показано, що при високих концентраціях мутагену порушується лінійний характер числа мікроядер в залежності від дози мутагену. Токсичні дози можуть призвести до пригнічення ділення клітин та їх загибелі поряд з зменшенням числа клітин із мікроядрами [70]. У той же час деякими вченими показано, що кореляція між частотою мікроядер та мітотичним індексом є дуже низькою, але є чітка залежність числа клітин із мікроядрами від дози мутагену [71].

Результати аналізу суттєво залежать від природи мутагену та об'єкту дослідження. Так речовини, що швидко руйнуються, не здатні індукувати мікроядра, так як для цього необхідний довготривалий вплив мутагену на ядерні та мітотичні структури клітин. Утворення клітин із мікроядрами, особливо в хребетних, залежить від загального стану організму, стану його захисних систем.

Тож при виборі тест-об'єкту для скринінгу та моніторингу мутагенів зовнішнього середовища, необхідно мати достатні основи для використання саме цього виду, лінії, тест-організму, необхідно з певною обережністю порівнювати одержані результати з більш ранніми при впливі того ж мутагену, але на інших організми [13].

Переважає більшість досліджень по мікроядерному тесту проводяться на лабораторних мишах та щурах [72, 73]. серед водних організмів більшість робіт виконана на рибах [74-77]. Також часто для мікроядерного аналізу використовують культуру клітин [78, 79].

Як вже зазначалось, серед водних організмів найпопулярнішим тест-об'єктом для мікроядерного аналізу є риби. Мікроядерний тест на рибах є чутливим методом оцінки генотоксичності речовин і перспективним для виявлення токсичних речовин у воді. Серед різноманітних організмів риби найбільш зручний для таких дослідів об'єкт, так як досить легко утримується в лабораторних умовах і піддається впливові токсичних речовин. Оскільки риби зазвичай реагують на токсиканти подібно до вищих хребетних, наприклад, ссавців [80], вони можуть бути використані для виявлення речовин, що потенційно викликають канцерогенний ефект у людини. Риби можуть стати

„контролем” потенційного генотоксичного впливу на людину шкідливих речовин у питній воді [81].

Для дослідження за допомогою мікроядерного аналізу на рибах найчастіше використовують клітини крові, печінки та зябер. Мікроядерний тест на еритроцитах риб дає можливість визначення кластогенних речовин у водному середовищі, оскільки еритроцити кісткових риб мають ядра. Численні досліді показали, що в еритроцитах периферичної крові риб як у польових так і лабораторних умовах часто зустрічаються мікроядра внаслідок впливу різноманітних полютантів [82].

Перевага методу підрахунку мікроядер у клітинах зябер полягає в тому, що не має необхідності стимулювати поділ клітин у цьому швидко проліферуючому органі – мішені. При одночасному аналізі мікроядер у клітинах зябер та печінки, виявлено більшу чутливість клітин зябер до генотоксичного впливу [83, 84].

За допомогою мікроядерного аналізу визначені рівні хромосомних мутацій у кровотворних клітинах різних видів риб із водойм розташованих поблизу гірничо-металургійного комбінату. У ряді випадків спостерігалася дуже висока частота еритроцитів із мікроядрами в особин, які знаходилися в сильно забруднених водоймах. По відсотку еритроцитів із мікроядрами виявлено видові, сезонні і локальні відмінності [85].

Відомо, що при аналізі забрудненої води мутагенними речовинами важливу роль відіграють рослини. При цьому мікроядерне тестування застосовується досить широко. Багато досліджень проведено на клітинах кореневої меристеми кінських бобів (*Vicia faba* L.) [86], цибулі (*Allium cepa* L.) та салату (*Lactuca sativa* L.) [87, 88] та традесканції (*Tradescantia* sp. L.) [89, 90].

Так, вплив на корінці *V. faba* хлористим кадмієм окремо і разом із нітролооцтовою кислотою викликав значне число клітин із мікроядрами. При заміні  $\text{CdCl}_2$  на  $\text{CoCO}_3$  збільшення утворення рівня клітин із мікроядрами відмічено у випадках використання цієї речовини разом із нітролооцтовою кислотою [91]. Також було показано, що сполуки хрому індукують мікроядра в кінчиках корінців *V. faba*, при цьому відмічено пряму залежність від дози. У

роботі Довгалюк А.І. [88] Allium-тест (тест з *Allium cepa*) був використаний для оцінки впливу сполук важких металів на клітини кореневої меристеми цибулі, на основі даних досліджень було запропоновано два ряди токсичності солей металів: за ефективними концентраціями, та сублетальними і летальними ефектами, в обох випадках найтоксичнішим виявився сульфат міді.

Мікроядерний тест широко використовується для оцінки токсичності речовин, які мають генотоксичні властивості. Цей тест, як відомо, не поступається, а інколи і перевищує за своєю інформативністю тести на хромосомні аберації [92]. Крім того, тест має ряд переваг: менша кількість артефактів, велика точність підрахунку результатів, менш трудомісткий та більш продуктивний [93].

У сучасній токсикологічній практиці поряд із традиційними на лабораторних тваринах експериментами оцінки токсичності речовин значного поширення набуло використання альтернативних об'єктів та методів дослідження з дотриманням принципів "трьох R" (*Replacement, Reduction i Refinement*), яку вперше сформулювали W.Russel та R.Birch в 1959 році. При використанні альтернативних методів *in vitro* було показано, що вони є досить точними, простими, швидкими у постановці, перспективними, універсальними, практично цінними, селективними та економічно рентабельними. Перспективність досліджень з використанням альтернативних методів *in vitro* підсилюється із зростаючою увагою до ролі етичних аспектів при виборі об'єкту досліджень, збільшення зацікавленості науковців та широкої громадськості у гуманному ставленні до тварин і скороченні їх чисельності в наукових експериментах [13]

На сьогодні в якості моделей *in vitro* використовуються системи різної біологічної організації – безхребетні тварини, гідробіонти, мікроорганізми, рослини, культури клітин людини та тварин, а також молекулярні системи (білки, ферменти). *In vitro* моделі можуть бути застосовані не тільки для отримання даних «доза-відповідь», а і для встановлення механізмів токсичної дії речовини [94].

За рекомендаціями ISO та інших міжнародних організацій дослідження цитотоксичної дії речовин можуть проводитись на первинних культурах клітин і тканин, виділених з організму тварин, людини, а також перещеплювальних або постійних, отриманих з окремих видів пухлин. Вибір клітин-мішеней залежить від очікуваних біологічних ефектів досліджуваної речовини. Дослідження безпосередньо на культурі клітин людини спрощує екстраполяцію даних і прогнозування токсичності речовини відносно організму людини [95].

Цитогенетичні тести *in vitro* спрямовані на те, щоб продемонструвати індукцію хромосомних порушень в культивованих клітинах, в даному випадку лімфоцитів периферичної крові, які рівномірно розподілені і знаходяться в одній фазі клітинного циклу (Go).

Найбільш інформативним є метод вивчення хромосом на стадії метафази, оскільки він дозволяє досліджувати весь спектр структурних і кількісних порушень хромосом. Це один з найбільш відпрацьованих, стандартизованих і широко поширених методів, що дає можливість досить об'єктивно порівнювати отримані результати з даними інших авторів.

З огляду на рівень пошкоджень генетичного матеріалу клітин, розрізняють 3 типи мутацій:

- генні – зміни структури гена;
- хромосомні – зміни структури хромосом (аберації хромосом);
- геномні – зміни числа хромосом (анеу- і полиплоїдія).

В процесі індукованого мутагенезу між ними є позитивна кореляція. Оскільки мутації є результатом складних взаємодій між реплікацією, рекомбінацією і випадковими помилками в роботі репараційних систем, нестабільність хромосом в певній мірі відображає мутагенні процеси під впливом факторів різної природи – фізичної або хімічної.

Експериментальне вивчення генотоксичності ефектів дії хімічних сполук на організм людини є обов'язковим елементом токсикологічної оцінки нових речовин. Воно необхідне також для вже відомих сполук, якщо існує підозра про можливий розвиток специфічних ефектів у віддалені терміни або, якщо з ними

контактують великі контингенти, а надійні дані про безпеку в зазначеному відношенні рівнів їх вмісту у зовнішньому середовищі відсутні [96] На сьогоднішній день накопичений великий досвід по виявленню і оцінці генотоксичних властивостей ксенобіотиків, у тому числі щодо питань гігієнічного нормування [97 - 100].

Токсичний ефект (*toxic* – отруйний, потенційно летальний) свідчить про можливий потенційно летальний вплив хімічної речовини (в даному випадку на тест-об'єкт).

Геномні мутації – анеуплоїдія і поліплоїдія, привертають дедалі більшу увагу дослідників, зважаючи на великий вплив цих порушень на розвиток різних патологічних станів. Значимість числових хромосомних порушень в етіології вроджених вад розвитку та ембріональної загибелі у людини не викликає сумнівів. Крім того, кореляція числових порушень певних хромосом з пухлинними фенотипами свідчить про величезне значення даних аномалій і в канцерогенезі [101 - 104].

Анеуплоїдія (від грец. *An* - негативна частка, *eu* - добре, повністю, *-ploos*, тут - кратний, і *éidos* - вид) – явище, при якому клітини організму містять число хромосом некратне гаплоїдному (одинарному). Серед анеуплоїдії розрізняють гіперформи – організми з набором хромосом, збільшеним на одну або більше, і гіпоформи – зі зменшеним на одну або більше набором хромосом.

Слід відзначити той факт, що перелік анеугенів або агентів, здатних індукувати анеуплоїдію, продовжує рости та поповнюється в більшій мірі за рахунок хімічних сполук, відомих своїми канцерогенними властивостями [102].

Виявлено позитивний кореляційний зв'язок між загальною кількістю аберантних, поліплоїдних, гіперполіплоїдних клітин, кількістю і характером клонів аномальних клітин у лімфоцитах периферичної крові та типом і стадією пухлинного процесу у хворих на рак молочної залози та шлунково-кишкового тракту [105, 106] .

М.М. Виленчик пов'язує поліплоїдію зі зменшенням мітотичного потенціалу при розподілі. Крім того, І. А. Знаєвською при дослідженні дітей з Народицького

р-ну, Житомирської обл. було виявлено, що частота поліплоїдних клітин є показником радіаційного впливу, який достовірно перевищував контрольні значення і позитивно корелював зі сформованим радіаційним фоном (зі збільшенням радіаційного навантаження росла частота поліплоїдних клітин) [107, 108] .

Ще один цитогенетичний показник, на який слід звернути увагу – мультиаберантні клітини. Виникнення мультиаберантних клітин може призвести до активації протоонкогенів, в результаті чого може виникнути пухлинний процес. Крім того, наявність мультиаберантних клітин свідчить про зміни в системі репарації [109,110].

Згідно зі стандартизованої методикою (СОП № МА-127 від 30.04.2001 р.) та ПА № 8332 [111] вивчаються хромосомні і геномні мутації.

Концепція, згідно з якою канцерогенні хімічні речовини викликають рак внаслідок мутагенної дії, є основою теорії індукції злоякісних новоутворень в результаті соматичних мутацій. Результати досліджень [ 95, 112] свідчать, що більшість хімічних канцерогенів залишаються біологічно неактивними доки не будуть перетворені в реакційно здатні молекули. Такі хімічні речовини і є проканцерогенами (і / або промутагенами).

#### **1.4. Методичні аспекти використання біотестування в водоохоронних заходах**

Розробка оптимального для конкретних умов і разом з тим технічно простого, матеріально недорого і універсального комплексу біотестів для виявлення токсичних факторів і речовин – актуальна проблема для визначення ступеня забруднення навколишнього середовища, зокрема, зокрема оцінка якості природних і питних вод, що характеризуються низькими рівнями забруднення.

Суть комплексного підходу полягає в наступному. Різні типи токсичності вод вивчаються як на рівні організму, так і на клітинному рівні, причому в кожному з цих досліджень використовуються підходи, що дозволяють отримати комплексну оцінку токсичного впливу на біоту. Зокрема, на рівні організму

аналізуються реакції представників різних систематичних груп і трофічних рівнів.

Комплексна оцінка токсичності водних зразків з використанням набору біотестів дозволяє об'єктивно дослідити вплив несприятливого фактора середовища на тваринні і рослинні організми. Для її кількісної інтерпретації пропонується застосування індексу загальної токсичності (ІЗТ), який являє собою суму ефектів, розрахованих для досліджуваної води або розчинених речовин для всіх біотестів, включно – бактерій. Щоб виключити надмірний вплив будь-якого з біотестів на загальний результат, максимальне значення для одного організму обмежується 100 умовними одиницями (загибель усіх тест-організмів). Так, наприклад, при використанні у батареї 4 тест-об'єктів максимальне значення індексу загальної токсичності не може перевищувати 400 умовних одиниць.

Крім поєднання різних біотестів для об'єктивної оцінки якості тестованих вод, вкрай важливим є комплексний розвиток досліджень, що проводяться на клітинному рівні. Іншими словами використовується ряд методів, які фіксують зміни в структурі і функціональній активності спадкового апарату на рівні клітини. Вибір цих критеріїв обумовлений їх інформативністю, хорошою відтворюваністю і технічної простотою на клітинному рівні. У організмів з батареї біотестів визначають кількісні характеристики ядерець, частоту мікроядер і подвійних ядер, здійснюють контроль проліферактивної активності клітин по мітотичного індексу. Мікроядерний тест – один з методів виявлення розчинених у воді речовин, які проявляють генотоксичні властивості.

Літературні дані вказують на те, що мікроядерний тест не поступається, а іноді і перевершує за інформативністю та оперативністю тести на хромосомні аберації. Підкреслюється також ряд інших переваг цього тесту – менше число артефактів, можливість більш якісного обліку, до того ж метод є менш трудомістким [103, 104]. Мікроядра представляють собою округлі позаядерні тільця, які формуються при конденсації ацентричних хромосомних фрагментів або цілих хромосом, які не включені в основне ядро по завершенню клітинного ділення. Створення мікроядер може бути обумовлено порушеннями різних



клітинних механізмів. Отже, підвищена частота клітин з мікроядра є біомаркером генотоксичних ефектів, які можуть виникнути внаслідок впливу кластогенних або анеугенних агентів [101, 103]. У будь-якому випадку мікроядра вказують на геномну нестабільність.

Для вивчення особливостей функціонування генома клітини доцільно використовувати кількісні характеристики ядерець (число і розмір) [102]. Зміна їх морфології безпосередньо пов'язана з важливими молекулярно-генетичними процесами і об'єктивно відображає особливості метаболізму клітини [103, 104]. Подібну залежність легко встановити, оскільки ядрце є місцем синтезу РНК і формування предрибосомних частинок. Доведено, що для клітин з малою кількістю ядерець найбільш інформативними характеристиками є розмір одиночного ядереця і частка клітин з гетероморфними парними ядереця, тоді як для клітин з декількома ядереця – їх кількість [105 - 112]

Додатковою об'єктивною інформацією про вплив водного середовища на організм тест-об'єкта служить цитологічна характеристика клітин різних тканин, в тому числі і формула крові риб [113, 115]. Показано, що зафіксоване на ранньому етапі зміна кількісного співвідношення формених елементів крові, передувало відтермінуванням загибелі тест-організмів. Найбільш суттєві відхилення в гематологічному статусі і функціонального стану клітинного та гуморального ланки імунітету свідчать про розвиток дестабілізуючих процесів в гомеостазі організму риб. У периферичній крові риб при дії несприятливих чинників водного середовища спостерігалось підвищення загального числа еритроцитів, лейкоцитів і лімфоцитів, поява незрілих форм нейтрофілів до промієлоцитів, реєструвався низький рівень Т-, В-розеткоутворюючих лімфоцитів і мінімальні концентрації загального білка сироватки крові та імуноглобулінів. При цьому зміни формули крові у риб відповідала характеристикам інших показників біотестування і, таким чином, доповнювала їх [113-115].

Органели в клітинах риб, наприклад субмітохондріальний тест, застосовують, оцінюючи можливу токсичність водних проб для людини [110, 114, 116].

Риби часто реагують на токсичні впливи подібно ссавцями. Тому риб доцільно використовувати в якості модельних об'єктів при визначенні потенційно небезпечних для здоров'я людини токсичних речовин у питній воді, для скринінгу токсикантів, здатних викликати каліцтва і ракові захворювання [115, 116]. Результати необхідні при розробці відповідних нормативів поряд з вже апробованими і затвердженими показниками, наприклад, гідрохімічними, хіміко-аналітичними, фізичними, санітарно-гігієнічними та ін.

Вода, призначена для питних цілей, в ході біотестування не повинна мати статистично достовірних відхилень від контрольних параметрів, які наводяться в методичних посібниках до використовуваних тест-організмів. В цьому випадку якість води визнається відповідним біологічним нормативам. У разі достовірних відхилень від контрольних показників, досліджувані проби води визначаються, як токсичні відповідно до її біологічних характеристик. За ступенем відхилення від контрольних величин, з одного боку, і за кількістю тест-організмів, які зафіксували негативний ефект, з іншого, воду, що піддається аналізу, класифікують, як слабо, середньо і сильно токсичну за результатами біологічних впливів на тваринні і рослинні організми. Також під час аналізу добре розроблених і апробованих, найбільш простих і інформативних клітинних та субклітинних параметрів визначають ступінь мутагенності, генотоксичності і цитотоксичності водних зразків [110, 111, 115].

Залежно від цілей дослідження і технічних можливостей спеціалізовані лабораторії застосовують мінімально необхідний, оптимальний або такий що має додаткові набори організмів для біотестування. У мінімально необхідному наборі біотестов можна об'єднати дафнію і церіодафнію (як представників тварин) і цибулю або салат (як представників рослин). Ці тест-організми використовуються для визначення токсичності водних проб за хімічними забруднювачами. З метою поглибленого аналізу тестованої води додатково до

батареї біотестов можна включити гідру (як має специфічну реакцію на токсичні речовини) і рибу (як представника хребетних тварин з високою організацією центральної нервової системи).

Для практичного застосування дослідні установи формують власні набори біотестів, найбільш доцільні відповідно до їх технічних можливостей, наявним досвідом роботи, а також виходячи з поставлених завдань.

## **Висновки до розділу 1**

Проведено аналіз літературних джерел за темою дисертаційного дослідження. Слід підкреслити, що останнім часом водне середовище відчуває значне антропогенне забруднення, яке порушує процеси самоочищення і відновлення якості води на Землі, зокрема Україні. Нестача якісної питної води несе загрозу здоров'ю людства. З огляду на це, проблема водопостачання якісною питною водою стала однією з найважливіших у житті та розвитку людського суспільства. Значну небезпеку для населення становлять випадки екстремально високого забруднення водного середовища шкідливими речовинами техногенного походження. Також відмічена, водопровідна вода стає активним чинником шкідливого впливу на здоров'я людини і першопричиною виникнення багатьох небезпечних захворювань. В тому числі використання популярної на сьогодні фасованої води, необхідним є постійний контроль якості питної води на всіх етапах водопідготовки та водопостачання

Результати хімічного аналізу, у багатьох випадках не дозволяють оцінити справжню небезпеку впливу тих чи інших забруднювачів на середовище, прогнозувати наслідки їхнього впливу на живі організми. Різноманітні забруднюючі речовини, потрапляючи в навколишнє середовище, можуть зазнавати різних перетворень, підсилюючи при цьому свою токсичну дію. Із цієї причини необхідними є методи інтегральної оцінки якості середовища (води, ґрунту, повітря). Величезну роль при цьому грають методи біотестування. Охарактеризовані доцільність застосування біотестування для оцінки якості екологічного стану водних екосистем.

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Біотестування на рослинах

Використання рослин як чутливих тест-організмів до забруднення навколишнього середовища бере початок зі стародавніх віків [117]. Перші спостереження зробили ще античні вчені, саме вони звернули увагу на зв'язок зовнішнього вигляду рослин з умовами їх зростання [118]. Наприкінці 1970-х років, в рамках програми *Gene-Tox*, яка виконувалася Управлінням по Захисту Навколишнього Середовища (EPA) Генетичної токсикології США було показано, що рослинні системи можуть широко застосовуватись для виявлення мутагенів, кластогенів і канцерогенів. Рослини – унікальні по своїй здатності бути індикаторами генотоксикантів *in situ*, як у вигляді поодиноких тестів, так і в комплексі з іншими тест-організмами [41, 119]. Основними рослинними тест-системами, що використовували в програмі *Gene-Tox* були: *Arabidopsis thaliana* L., *Allium cepa* L., *Vicia faba* L., *Hordeum vulgare* L., *Zea mays* L., *Tradescantia paludosa* і *Glycine max* L. [120].

В наших експериментах біотестування на рослинах проводили на наступних видах: цибуля *A. Cepa*, салат *L. Sativa* та м'яка пшениця (*Triticum vulgare* Host) сорту озима «Миронівська 808». Метод біотестування на рослинах - простий і чутливий спосіб визначення інтегральної токсичності води, викликаній різними чинниками. Показником токсичності виступає пригнічення або стимулювання росту корінців під впливом токсичних речовин у водному середовищі у порівнянні з контролем. Цей метод дозволяє визначити не тільки токсичність водного середовища, ще й його мутагенні властивості [121-124].

Ступінь токсичності досліджуваних зразків води оцінювали вимірюванням довжини кожного корінця із загальної кількості корінців. Особливу увагу приділяли цитологічним дослідженням на клітинах кореневої меристеми рослин. Для цитологічних досліджень з клітин кореневої меристеми цибулі, салату та м'якої пшениці готували цитологічні препарати з відростлого коріння рослин, забарвлювали ацеторсеїном при температурі 22–25°C протягом 15 хв.,

після чого їх промивали в 45 %-му розчині оцтової кислоти, що запобігає потраплянню часточок барвника на препарат. Відділяючи зону росту корінців, готували давлені препарати. При мікроядерному аналізі для кожного препарату підраховували по 3000 клітин, визначали мітотичний індекс, кількість клітин з мікроядрами, подвійними ядрами та з іншими патологіями мітозу, якщо такі зустрічались.

## **2. 2. Біотестування (визначення гострої та хронічної токсичності) на гідробіонтах (ракоподібні, гідра, риби, земноводні)**

### **2.2.1. Методика біотестування з використанням ракоподібних *Daphnia magna* Straus**

*Принцип методики.* Методика заснована на визначенні виживання дафній при впливі токсичних речовин, що містяться в тестованій воді в порівнянні з контролем [44, 125].

Короткочасне біотестування (до 96 год) дозволяє визначити гостру токсичну дію води на дафній за показником виживання. Показником виживання служить середня кількість тест-організмів, що вижили в досліджуваній воді по відношенню до контролю за певний час. Критерієм гострої токсичності є загибель 50 і більше, а також хронічної токсичності від 20 до 40 більше відсотків дафній за період часу до 96 годин в досліджуваній воді в порівнянні з контролем [44, 49, 125].

*Характеристика тест-організму.* Дафнії живуть в стоячих і слабопроточних водоймах. На території України *Daphnia magna* широко розповсюджена. Вона є типовим мезосапробним гідробіонтом. Джерелом харчування дафнії в природних водоймах є бактерії, одноклітинні водорості, детрит, розчинені органічні речовини. Інтенсивність споживання корму залежить від його характеру, концентрації в середовищі, температури, віку рачків тощо. Процес харчування дафній безпосередньо пов'язаний з рухом грудних ніжок, що

направляють струм води всередину панцира (своєрідна фільтрація кормових частинок з води) [125].

Інтенсивний водно-сольовий обмін (більше 80% води рачок замінює менш ніж за 2 хв) сприяє підтриманню постійного осмотичного тиску всередині панцира і збереженню форми тіла. Тому при погіршенні стану дафній тіло часто деформується, що можна вважати ознакою порушення водно-сольового обміну.

*Утримання культури і годування.* Вихідний матеріал для лабораторної культури дафній можна отримати в установах, що мають спеціалізовані лабораторії біотестування вод. Якщо цей вид зустрічається в місцевих водоймах, то відловив дафній планктонним (газ №№20-26) гідробіологічним сачком, можна самостійно виростити культуру рачка в лабораторних умовах.



Рисунок 2.2.1.1 Зовнішній вигляд дафнії *Daphnia magna* (збільшення в 20 раз).

Вирощують культуру дафній в клімотостаті, боксі або в приміщенні, що не містить токсичних парів або газів. Оптимальна температура для культивування і біотестування становить  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , освітленість 400-500 лк при тривалості світлового дня 12-14 год. Для культивування дафній використовують штучно приготовлену воду, згідно з ДСТУ 4174: 2003. Допускається також використання природної води з екологічно чистих водойм. Вода для культивування повинна відповідати таким вимогам: величина рН - 7,0-8,2; жорсткість загальна 3-4 мг екв/ дм<sup>3</sup>; концентрація розчиненого кисню не менше 6,0 мг / дм<sup>3</sup>. Кормом для дафній служать зелені водорості (хлорела або сценедесмус) та хлібопекарські дріжджі.

*Методика біотестування.* Перед початком біотестування в пробі води визначають концентрацію розчиненого кисню, яка не повинна бути менше 6,0

мг/дм<sup>3</sup>. Якщо цей показник нижче, то тестуєму воду аерують за допомогою мікрокомпресора. Біотестування проводять в кліматостаті або боксі при оптимальному температурному і світловому режимах. Результати біотестування вважаються достовірними, якщо за весь період спостережень загибель дафній в контролі не перевищувала 10%, а концентрація розчиненого кисню в кінці біотестування становила не менше 2 мг / дм<sup>3</sup>.

Для проведення біотестування в судини по 0,1 дм<sup>3</sup> наливають контрольної і води, що тестується, дотримуючись трикратну повторність. У кожній посудині за допомогою пластикової піпетки з діаметром 0,5-0,7 мм поміщають по 10 одностодових дафній і експонують при оптимальних умовах протягом часу до 96 годин. При короткочасному біотестування дафній не годують [44].

Облік дафній, що вижили проводять через 1, 6, 24, 48, 72 і 96 год. Особин вважають, таикми що вижили, якщо вони вільно пересуваються в товщі води або спливають із дна склянки не пізніше 15 секунд після легкого похитування. Якщо в будь-який період часу в тестованій воді гине 50 і більше відсотків дафній, біотестування припиняють.

*Характеристики похибки вимірювань.* Межі, в яких знаходиться відносна похибка визначення токсичності за даною методикою з заданою довірчою ймовірністю  $P = 0,95$ , складають  $\pm 66\%$ . Найбільше можливе значення середнього квадратичного відхилення випадкової складової відносної похибки визначення токсичності за даною методикою  $\sigma$  ( $\delta$ ) становить 34%. Характеристики похибки встановлені за результатами внутрішньолaboratorного експерименту з використанням еталонної речовини - калію біхромату ( $K_2Cr_2O_7$ ).

Для визначення придатності культури дафній для біотестування встановлюють середню летальну концентрацію розчину еталонної речовини - калію двухромовокислого ( $K_2Cr_2O_7$ ) за 48 год біотестування ( $LK_{50}$  за 48 год). Для цього готують вихідний розчин  $K_2Cr_2O_7$  з концентрацією 1 г / дм<sup>3</sup>, використовуючи дистильовану воду. Далі з вихідного розчину готують серію розчинів з концентраціями  $K_2Cr_2O_7$  від 0,5 до 4,0 мг / дм<sup>3</sup> з інтервалом 0,5 мг / дм<sup>3</sup>, використовуючи воду для культивування (дослідження). Контролем

служить вода для культивування. Біотестування цих розчинів проводять тривалістю 48 год. Якщо отримана величина ЛК<sub>50</sub> за 24 год знаходиться в експериментально встановленому діапазоні реагування тест-об'єкта, який дорівнює 0,9-2,5 мг / дм<sup>3</sup> K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, культура дафній придатна для біотестування [44, 49, 125].

Якщо ЛК<sub>50</sub> за 48 год не знаходиться в зазначеному діапазоні реагування, перевіряють умови культивування тест-об'єкта, при необхідності культуру замінюють.

### **2.2.2. Методика біотестування з використанням ракоподібних *Ceriodaphnia affinis* Lilleborg**

*Принцип методики.* Принцип методики біотестування з використанням церіодафній той же, що і з використанням дафній. Основною відмінністю є час біотестування - до 48 год. Короткочасне біотестування дозволяє визначити гостру токсичну дію води на церіодафній по їх виживанню. Показником виживання служить середня кількість тест-організмів, що вижили в тестованій воді по відношенню до контролю за певний час. Критерієм гострої токсичності є загибель 50 і більше, а також хронічної токсичності від 20 до 40 більше відсотків церіодафній за період часу до 48 годин в тестованій воді в порівнянні з контролем [125].

*Характеристика тест-організму.* Церіодафнії розповсюджені по всій земній кулі та на території України, крім Криму. *Ceriodaphnia affinis* населяє переважно невеликі, неглибокі озера, ставки і ріки з уповільненим плином. Зустрічається рідше, ніж інші види церіодафній, в основному в літоральному планктоні на відкритих місцях або між заростями очерету і занурених водних рослин. Тіло церіодафній укладено в прозорий хітиновий панцир, стулки якого на черевній стороні не з'єднані і утворюють щілину (рис. 2.2.2.1). У грудному відділі є 5 пар грудних ніжок, функції яких пов'язані з фільтрацією води, харчуванням та диханням [44].



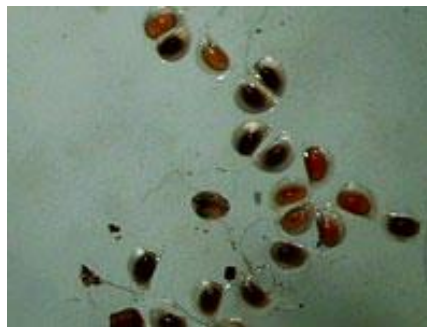
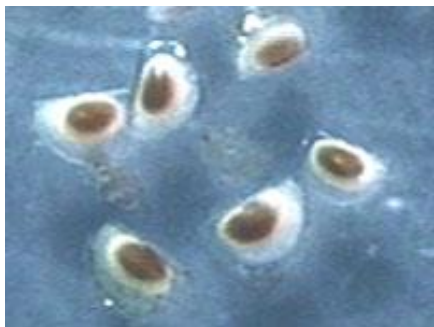


Рисунок 2.2.2.1 -. Зовнішній вигляд церіодафній *Ceriodaphnia affinis*. (Збільшення в 20; 10 разів).

*Утримання культури і годування.* Вихідний матеріал для лабораторної культури церіодафній можна отримати в установах, що мають спеціалізовані лабораторії біотестування вод.

Культуру *Ceriodaphnia affinis* вирощують в клімотостаті, боксі або в приміщенні, що не містить токсичних парів або газів. Оптимальні умови для утримання: температура  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , освітленість 400-600 лк при тривалості світлового дня 12-14 ч. Для культивування дафній використовують штучно приготовлену воду, згідно з ДСТУ 4174:2003 [125]. Допускається також використання природної води з екологічно чистих водойм. Вода для культивування повинна відповідати таким вимогам: величина рН - 7,0-8,2; жорсткість загальна 1,3-2,0 мг екв /  $\text{дм}^3$ ; концентрація розчиненого кисню не менше 5,0 мг /  $\text{дм}^3$ . Рекомендується розмістити культуру церіодафній в кристалізаторах обсягом 2-3  $\text{дм}^3$ , які заповнюються водою наполовину. Можна використовувати і інші скляні посудини зазначеного обсягу.

Кожні 7-20 діб культуру оновлюють. Для цього відбирають 20 статевозрілих самок і поміщають в судини для культивування, заповнені водою з розрахунку 50-100  $\text{см}^3$  на одну особину. За оптимальних умов утримання церіодафнія вимічує молодь щодоби або раз в дві доби. Послід молодих самок складаються з 2-6 особин [44].

Раз на добу церіодафній годують суспензією хлібопекарських дріжджів (з розрахунку 5  $\text{см}^3$  суспензії на 1  $\text{дм}^3$  води) і раз в тиждень - суспензією зелених

водоростей (з розрахунку  $0,5 \text{ см}^3$  суспензії на  $1 \text{ дм}^3$  води). З водоростей рекомендується використовувати хлорелу або сценедесмус.

*Методика біотестування.* Обсяг проби води для біотестування  $0,5 \text{ дм}^3$ . На початку визначають концентрацію розчиненого кисню у воді, яка не повинна бути менше  $5,0 \text{ мг} / \text{дм}^3$ . Якщо цей показник нижче, то воду, що тестують аерують за допомогою мікрокомпресора. В процесі біотестування вода не аерується. Біотестування проводять в кліматостаті або боксі, в яких забезпечується оптимальний, температурний і світловий режими. Результати біотестування вважаються достовірними, якщо за весь період спостережень загибель дафній в контролі не перевищувала 10%, а концентрація розчиненого кисню в кінці біотестування становила не менше  $2 \text{ мг} / \text{дм}^3$  [49, 243].

Для проведення біотестування використовують 10 ємностей, у кожену наливають по  $15 \text{ см}^3$  досліджувану воду, в одну посудину - контрольну воду. У кожній посудині за допомогою пластикової піпетки з діаметром  $2,0 \text{ мм}$  поміщають по 1 молодій церіодафнії. Спочатку садять в контрольну, а потім в тестуючу воду.

Облік церіодафній, що вижили проводять через 1, 6, 24 і 48 год. Особин вважаються такими, що вижили, якщо вони вільно пересуваються в товщі води або спливають із дна склянки не пізніше 15 секунд після легкого похитування. Якщо в будь-який період часу, що враховується в тестованій воді гине 50 і більше відсотків особин, біотестування припиняють. Протягом 48 годин церіодафній не годують [125, 243].

*Характеристики похибки вимірювань.* Межі, в яких знаходиться відносна похибка визначення токсичності за даною методикою з заданою довірчою ймовірністю  $P = 0,95$ , складають  $\pm 61\%$ .

Найбільше можливе значення середнього квадратичного відхилення випадкової складової відносної похибки визначення токсичності за даною методикою  $\sigma$  ( $\delta$ ) становить 39%.

Характеристики похибки встановлені за результатами внутрішньолaboratorного експерименту з використанням еталонної речовини - калію біхромату ( $K_2Cr_2O_7$ ) [243].

Для визначення придатності культури церіодафній для біотестування встановлюють середню летальну концентрацію розчину еталонної речовини - двухромовоокислого калію ( $K_2Cr_2O_7$ ) за 24 год біотестування ( $LK_{50}$  за 24 год). Для цього готують вихідний розчин  $K_2Cr_2O_7$  концентрацією 1 г /  $дм^3$ , використовуючи дистильовану воду. Далі з вихідного розчину готують серію розчинів з концентраціями  $K_2Cr_2O_7$  від 0,5 до 4,0 мг /  $дм^3$  з інтервалом 0,5 мг /  $дм^3$ , використовуючи воду для культивування (дослід). Контролем служить вода для культивування. Біотестування цих розчинів проводять тривалістю 24 год. Якщо отримана величина  $LK_{50}$  за 24 год знаходиться в експериментально встановленому діапазоні реагування тест-об'єкта, який дорівнює 0,9-3,3 мг /  $дм^3$   $K_2Cr_2O_7$ , культура церіодафній придатна для біотестування.

Якщо  $LK_{50}$  за 24 год не знаходиться в зазначеному діапазоні реагування, перевіряють умови культивування тест-об'єкта, при необхідності культуру [125].

### **2.2.3. Методика біотестування з використанням кишковопорожнинних *Hydra attenuate Pallas***

*Принцип методики.* Методика заснована на порівнянні виживання гідр і їх морфологічних змін в тестованій воді та контролі. Короткочасне біотестування (до 96 год) дозволяє визначити гостру токсичну дію води на гідр по їх виживанню. Показником виживання служить середня кількість тест-організмів, що вижили в тестованій воді по відношенню до контролю за певний час. Критерієм гострої токсичності є загибель 50 і більше, а також хронічної токсичності від 20 до 40 більше відсотків риб за період часу до 96 годин в тестованій воді в порівнянні з контролем. Показником хронічного токсичної дії, що тестується води на *Hydra attenuate Pallas* можуть служити її морфологічні реакції (згортання щупалець «булава» або стискання тіла - «кулька») [126, 242].

Нами розроблено проект ДСТУ, в якому якість води визначається біотестуванням на лабораторній культурі гідр.

*Характеристика тест-організму.* Гідра відноситься до роду прісноводних сидячих кишковопорожнинних. Вона мешкає в стоячих водоймах і річках з повільною течією. Вона прикріплюється до водних рослин або ґрунту. Довжина тіла гідри становить 1-20 мм. Це одиночний малорухливий поліп. Тіло гідри циліндричної форми, на передньому кінці тіла на околоротових конусі розташований рот, оточений віночком з 5-12 щупалець. У деяких видів тіло розділене на тулуб і стеблинка. На задньому кінці тіла (стеблинки) розташована підшва, з її допомогою гідра пересувається і прикріплюється. Гідра має радіальної (одноосно-гетеропольний) симетрією. Вісь симетрії з'єднує два полюси - оральний, на якому знаходиться рот, і аборальний, на якому знаходиться підшва [242].

Гідра харчується дрібними безхребетними - дафніями, моїном і іншими ракоподібними, циклопами, а також олігохет-наїдідами. Здобич захоплюється щупальцями, а отрута, що міститься в клітинах, швидко паралізує дрібних жертв. Координованими рухами щупалець здобич підноситься до рота, а потім за допомогою скорочень тіла гідра «надівається» на жертву. Неперетравлені залишки їжі викидаються через рот.



Рисунок 2.2.3.1 - Зовнішній вигляд прісноводної гідри *Hydra attenuate* (збільшення в 20 раз).

*Утримання культури і годування.* У лабораторних умовах гідр *Hydra attenuate* (рис. 2.2.3.1) розміщують в кристалізаторах діаметром 20 см, заповнених на 2/3 приготовленої води. Тест-організми містяться при температурі

20--24 ° С і при стандартному фотоперіоді - 16/8 год. Гідру щодня годують свежевипущеними дезінфікованими наупліями Артемій (солонowodний рачок *Artemia salina*). Через 1-2 години після годування гідру відкрєпляють від стінок і промивають, пересаджуючи в свіже водне середовище [242].

Перед проведенням тестів важливо перевірити, що умови культивування тест-організмів дозволяють гідрам розмножуватися брунькуванням. Для біотестування використовують тільки зовні здорові організми.

*Процедура біотестування.* Гідр не годують протягом 24 год перед біотестуванням. Тестування водних проб проводиться в пластикових планшетах на 12 осередків. Після заповнення осередків водою, в кожного. Поміщають по 2-3 гідри за допомогою піпетки Пастера. Всього використовують по 10-15 організмів в тестованій воді і контролі. Загибель риб в контролі не повинна перевищувати 10%. Обсяг проби води для біотестування на гідрах - 20 мл.

По закінченню 24, 48, 72 і 96 год експозиції за гідрами спостерігають за допомогою мікроскопа або біокуляру. При цьому реєструють морфологічні зміни, а також кількість загинув тварин. Під час біотестування гідр не годують.

Для визначення наявності гострого токсичного впливу води біотестування проводять протягом 96 год. Якщо в будь-який враховується період часу гине 50 і більше відсотків тест-організмів, то біотестування припиняють. Якщо відсоток загинув гідр знаходиться в інтервалі від 20 до 40%, то тестована вода проявляє хронічну токсичну дію на тест-організми [242].

*Характеристики похибки вимірювань.* Межі, в яких знаходиться відносна похибка визначення токсичності за даною методикою з заданою довірчою ймовірністю  $P = 0,95$ , складають  $\pm 30\%$ .

Найбільше можливе значення середнього квадратичного відхилення випадкової складової відносної похибки визначення токсичності за даною методикою  $\sigma$  ( $\delta$ ) становить 15%. Характеристики похибки встановлені за результатами внутрішньолaboratorного експерименту з використанням еталонної речовини - калію біхромату ( $K_2Cr_2O_7$ ).

Для визначення придатності культури для біотестування встановлюють середню летальну концентрацію розчину еталонної речовини - двухромовоокислого калію ( $K_2Cr_2O_7$ ) за 48 год біотестування ( $LK_{50}$  за 48 год). Для цього готують вихідний розчин  $K_2Cr_2O_7$  концентрацією 1 г /  $дм^3$ , використовуючи дистильовану воду. Далі з вихідного розчину готують серію розчинів з концентраціями  $K_2Cr_2O_7$  від 1,5 до 5,0 мг /  $дм^3$  з інтервалом 0,5 мг /  $дм^3$ , використовуючи воду для культивування (дослід). Контролем служить водне середовище для гідр. Біотестування цих розчинів проводять тривалістю 48 год. Якщо отримана величина  $LK_{50}$  за 48 год знаходиться в експериментально встановленому діапазоні реагування тест-об'єкта, який дорівнює 2,5-4,0 мг /  $дм^3$   $K_2Cr_2O_7$ , культура прісноводних гідр придатна для біотестування [242].

Якщо  $LK_{50}$  за 48 год не знаходиться в зазначеному діапазоні реагування, перевіряють умови культивування тест-об'єкта, при необхідності культуру замінюють.

#### **2.2.4. Методика біотестування з використанням риб *Brachidanio rerio* Hamilton – Buchanan**

*Принцип методики.* Методика заснована на порівнянні виживання риб у воді для тестування і контролі. Короткочасне біотестування (до 96 год) дозволяє визначити гострий токсичний вплив води на риб по їх виживанню. Показником виживання служить середня кількість тест-організмів, що вижили в тестованій воді по відношенню до контролю за певний час. Критерієм гострої токсичності є загибель 50 і більше, а також хронічної токсичності від 20 до 40 більше відсотків риб за період часу до 96 год в тестованій воді в порівнянні з контролем [127-128].

Як тест-організмів використовують риб широко застосовуваних у міжнародних і національних стандартах по біотестуванню води данію (*Brachidanio rerio* Hamilton - Buchanan) або гуппі (*Poecilia reticulate* Peters). Ми віддавали перевагу данію, як більш генетично однорідним організмам [245].

*Характеристика тест-організму.* Даніо (рис. 2.2.4.1) - широко розповсюджена акваріумна риба. У природі вона мешкає в повільно поточних водоймах Південно-Східної Азії. Довжина тіла дорослих риб не перевищує 4,5 см. Тіло має циліндричну форму, сріблясте, з 7-9 темно-синіми горизонтальними смугами. Даніо виключно рухливі, ведуть стадний спосіб життя. Статева зрілість настає через 3-4 місяці. Статеве відмінності виражені слабо, самка має більш округле черевце [128].

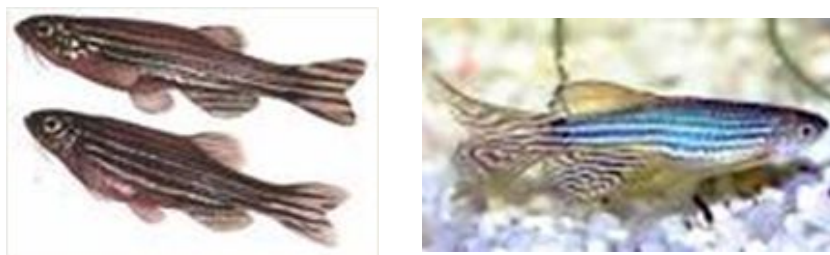


Рисунок 2.2.4.1 - Зовнішній вигляд риби даніо *Brachidanio rerio*.

*Утримання культури і годування.* У лабораторних умовах даніо містять в просторах, подовжених акваріумах. Акваріуми заповнюються відстояною протягом 3 діб водопровідною водою (дехлорування) з температурою  $23 \pm 1$  ° і величиною рН 7,7-8,2. Воду аерують за допомогою мікрокомпресору. Освітлення звичайне, зі зміною дня і ночі. Щільність посадки риб не більше 30 особин на 70 дм<sup>3</sup> води. Годують дорослих даніо 1-2 рази на добу живим (мотиль, дафнії, артемії), а також сухими штучними кормами. Кількість до повинно відповідати його поїдання. Один раз в тиждень здійснюється підміна води (1/4 частина обсягу) з чищенням дна сифоном [129, 245].

*Методика біотестування.* Для біотестування використовують статевозрілих даніо. Биотестирование проводять при освітленні розсіяним світлом з природною зміною дня і ночі, концентрація кисню в воді не менше 4 мг / дм<sup>3</sup> і температурі  $23 \pm 1$  °. Загибель риб в контролі не повинна перевищувати 10%. Обсяг проби води для біотестування на рибах - 20 дм<sup>3</sup>.

У акваріуми або інші скляні ємності наливають по 10 дм<sup>3</sup> контрольної і тестується води, куди поміщають по 10 риб. Повторність дворазова. Воду під час біотестування не аерують, рибу не годують. Щодоби в кожному акваріумі

визначають кількість тих, що вижили риб. Загиблих, які не подають ознак руху або дихання протягом 5 хв після дотику до них скляною паличкою, видаляють з води.

Для визначення наявності гострого токсичного дії води біотестування проводять протягом 96 год. Якщо в будь-який враховується період часу гине 50 і більше відсотків риб, то біотестування припиняють. Якщо відсоток загиблих риб знаходиться в інтервалі від 20 до 40%, то тестована вода хронічно токсично діє на тест-організми [245].

*Характеристики похибки вимірювань.* Межі, в яких знаходиться відносна похибка визначення токсичності за даною методикою з заданою довірчою ймовірністю  $P = 0,95$ , складають  $\pm 30\%$ .

Найбільше можливе значення середнього квадратичного відхилення випадкової складової відносної похибки визначення токсичності за даною методикою  $\sigma$  ( $\delta$ ) становить 15%. Характеристики похибки встановлені за результатами внутрішньолaboratorного експерименту з використанням еталонної речовини - калію біхромату ( $K_2Cr_2O_7$ ) [128, 245].

Для визначення придатності культури данію реріо для біотестування встановлюють середню летальну концентрацію розчину еталонної речовини - двухромовоокислого калію ( $K_2Cr_2O_7$ ) за 48 год біотестування ( $LK_{50}$  за 48 год). Для цього готують вихідний розчин  $K_2Cr_2O_7$  концентрацією 1 г /  $дм^3$ , використовуючи дистильовану воду. Далі з вихідного розчину готують серію розчинів з концентраціями  $K_2Cr_2O_7$  від 25 до 200 мг /  $дм^3$  з інтервалом 25 мг /  $дм^3$ , використовуючи воду для культивування (дослід). Контролем служить вода для культивування. Біотестування цих розчинів проводять тривалістю 48 год. Якщо отримана величина  $LK_{50}$  за 48 год знаходиться в експериментально встановленому діапазоні реагування тест-об'єкта, який дорівнює 45-60 мг /  $дм^3$   $K_2Cr_2O_7$ , культура церіодафній придатна для біотестування.

Якщо  $LK_{50}$  за 48 год не знаходиться в зазначеному діапазоні реагування, перевіряють умови культивування тест-об'єкта, при необхідності культуру замінюють.



## ***Методика біотестування з використанням ембріогенезу яйцеклітин риб *Brachidanio rerio* Hamilton - Buchanan***

*Принцип методики.* Ікру риби останнім часом стали все більше використовувати, як тестові об'єкти в токсикології при оцінці якості води. А саме в Європі і Америці модельними об'єктами досліджень є запліднена ікра риби виду *Brachidanio rerio* Hamilton - Buchanan [129]. У сучасних дослідженнях на токсичність, спостерігають ембріональний розвиток організму. Зміни в розвитку ембріона на ранніх стадіях при дії токсикантів можуть призводити до їх деградації, недорозвиненості дорослої особини або в результаті до загибелі ембріона риб.

У багатьох країнах заборонені експерименти на дорослих особинах, тому замінюють дослідженнями розвитку яйцеклітин і ембріонів риб, які вважаються більш перспективними в етичному відношенні. Ще однією перевагою таких експериментів є те, що вони проводяться за досить короткий час - 48-72 год. Розвиток ембріона *Brachidanio rerio* добре описано в літературі, оскільки зародки риб служать одними з важливих моделей в дослідках ембріонального розвитку хребетних тварин і використовуються як чутлива тест-функція при біотестування вод. Ембріогенез у риб використовується також в дослідках молекулярної генетики, біології розвитку, нейробіології і трансгенних дослідженнях [245].

Утримання дорослих особин не вимагає великих витрат. Риба може виробляти протягом усього року багато прозорої неклеюкої щодо субстрату ікри вже на 4 місяці життя. Нерест стимулюється різкою зміною температурного режиму, пом'якшенням води і наявністю рослинного субстрату, на який риби, що нерестяться відкладають ікру. Яйця досить великі  $d = 1\text{мм}$  і видно неозброєним оком. Одна самка дає в середньому 50-200 яєць за один нерест. Ікра (рис. 2.2.4.2) на світло під бінокулярним мікроскопом має перевітеліновий простір з жовтком, оточеним мембраною, зародковий диск знаходиться на анімальному полюсі. Яйця телолецитальні, розподіл меробластическіе і дискоїдальне (рис 2.2.4.2). *Brachidanio rerio*, можуть поїдати свою ікру, тому це слід враховувати при

постановці досвіду. Відомі порушення на різних стадіях розвитку ембріона, які призводять до подальшої загибелі організму. Методика по постановці нескладна. Ми використовували групу статевозрілих особин *Brachidanio rerio*, які містилися окремо самці від самок, в скляних акваріумах при температурі 23-24 ° С, при постійній аерації та фільтрації води. Годували рибу стандартними сухими кормами з додаванням живих кормів (мотиль, трубочник). Світловий режим становив 12:12, відповідно дня і ночі. На нерест брали зрілих рибу в співвідношенні 2: 1 самців до самок і поміщали в невеликий скляний акваріум з приготовленою синтетичною водою, з насиченням киснем не менше 80%, температурою 26 ° С. Збирали ікру за допомогою чашок, які ставили на дно акваріума і накривали сепараторної сіткою, для запобігання поїдання виробниками своєї ікри. На сепараторну сітку прикріплювалися штучні рослини для стимуляції нересту. Акваріум накривали темним ковпаком, через який не проникає світло. Через 12 год ковпак знімався і світло починає стимулювати нерестову поведінку у риби [129, 245].

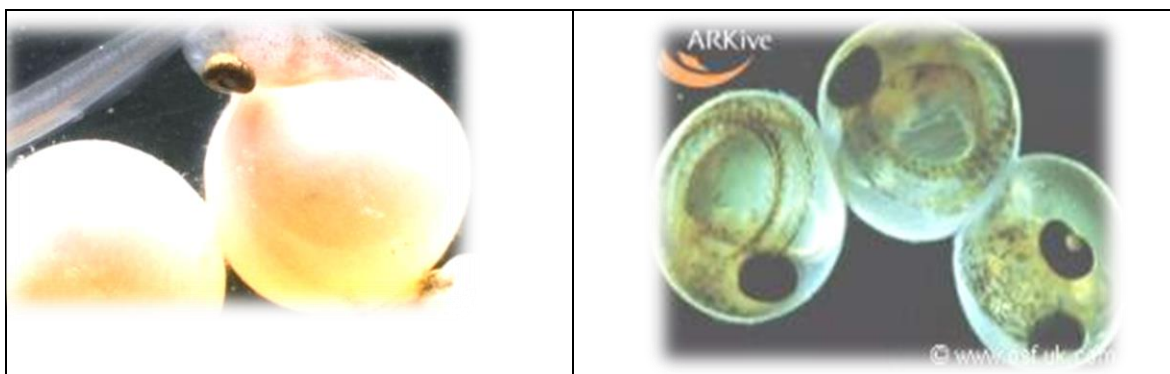


Рисунок 2.2.4.2 - Будова яйцеклітин (ікринок) риби (збільшення в 20 разів).

Нерест і запліднення відбувалося протягом 30-60 хвилин після стимуляції світлом, після чого рибу виловлювали і виймали чашки з ікрою. Розвиток яйця починається через 15 хвилин після запліднення. Дроблення починається після акумулювання на анімальному полюсі цитоплазми, де вона огортає ядро зиготи. Тільки частина цитоплазми яйця (бластодиск) піддається дробленню, в той час як ділянка цитоплазми, багата жовтком не ділиться. Дроблення починається з створення 2-х бластомерів, а потім синхронним розподілом формуються 4, 8, 16,

32 клітинні бластомери. На цих стадіях (4-32), легко відрізнити запліднену ікру від не заплідненої. Візуально незапліднена ікра буде більш темною, а згодом стане білою з помутнінням. Тільки запліднена ікра може бути використана для проведення експерименту. Заплідненої має бути не менше 50% від загальної кількості [129, 245].

*Методика біотестування.* Запліднену ікру розміщували в 7мм чашки Петрі заповнені розчином токсиканту на синтетичній воді або досліджуваній воді. Кожне розведення або проба води повинні тестуватися не менше ніж на 10 ембріонах. Окремо ставилося контрольна чашка Петрі. Експеримент вважається достовірним, якщо в контролі загинуло не більше 10% ембріонів. Позитивною відповіддю на дію токсиканту вважається більш 10% ефект або загибель ембріонів [129].

Параметри за якими визначається ефект або загибель ембріонів описані в стандартній методикою. Ембріони які досліджуються постійно спостерігають протягом 48 год інкубації при температурі 26°C. На різних стадіях розвитку виділяють кілька ознак, які свідчать про загибель ембріона. Перше, це коагуляція яйця - свідчить про повну загибель. По-друге, відділення хвоста ембріона на стадії 24 год, що в подальшому призводить також до загибелі ембріона. На стадії 48 год має бути помітне серцебиття, якщо воно відсутнє, то ембріон вважається мертвим. Деякі дослідники звертають увагу також на відсутність пігментації на 48 год розвитку, що теж свідчить про недорозвиненість ембріона в результаті дії на нього токсичного агента [129].

Досліди спостерігають на бінокулярний мікроскоп і записують або фотографують на цифрову вебкамеру. З перенесенням даних на комп'ютер, де можна чітко розгледіти розвиток на різних стадіях.

Методика тестування на ембріонах *Brachidanio rerio* досить чутлива, оперативна, легко відтворена і може бути використана для досліджень великого спектра токсичних речовин, а також для оцінки якості природних вод [129].

### 2.3. Цитологічні дослідження на рибах і жабах

Для мікроядерного тесту на клітинах риб, використовували клітини крові, зябер та хвостового плавця. У жаб кров відбирали з вени задніх кінцівок.

*Приготування цитологічних препаратів.* Кров відбирали з хвостової вени, у жаб кров відбирали з вени задніх кінцівок, робили мазки, фіксували 96% етиловим спиртом 30 хв., висушували.

Тканину зябер (зяберні пелюстки), фіксували в оцтово-гліцериновій суміші (10% оцтова кислота на 10% розчині гліцерину). Ця суміш є одночасно і фіксуючою, і мацеруючою рідиною. Вона м'яко фіксує тканину плавця, і розділяє її на окремі клітини, внаслідок чого отримуємо суспензію цілих клітин. Фіксація і мацерація матеріалу повинні відбуватись не менш як добу, потім тканина в даній суміші може зберігатися протягом місяця при 4°C. Цитологічні препарати готували наступним чином: шматочки тканини, зафіксовані в оцтово-гліцериновій суміші, переносили на предметне скло і препарувальною голкою гомогенізували тканину, отримуючи суспензію клітин, з якої потім робили мазок [115].

Мікроядерний тест на тканині хвостового плавця: для приготування препаратів з хвостового плавця використовували регенеровану тканину плавця, тобто ту, що утворилась під час перебування риб в досліджуваному розчині (вона відрізнялась більш світлим кольором). Фіксацію проводили так само, як і в попередньому випадку. Шматочки тканини, зафіксовані в оцтово-гліцериновій суміші, переносили на предметне скло і препарувальною голкою гомогенізували тканину, отримуючи суспензію клітин, з якої потім робили мазок. Далі препарати сушили.

*Фарбування цитологічних препаратів.* Фарбування поводити за методом Романовського-Гімза стандартним розчином Азур-еозину, що полягає у вибіркового поглинанні трьох барвників: азура, метиленової сині й еозину. Азур має амфотерно-основну реакцію, еозин - кислу, а метиленова синій – лужну [114, 115]. Для фарбування препаратів азур-еозином до мазків додавали 2-2,5 см<sup>3</sup> азур-еозинового барвника (0,67% азуру II та 0,56% еозину в гліцерині), розведеного в

25 рази у 10 мМ фосфатному буфері, рН 6,8 (при відхиленні від цього значення рН може мати місце переважання синього або червоного відтінку). Через 15-30 хв. (у залежності від клітинної лінії) зразки виймали з кювети з барвником, ополіскували дистильованою водою та сушили у вертикальному положенні.

*Аналіз цитологічних препаратів.* Аналіз препаратів крові, зябер та клітин хвостового плавця проводили наступним чином: під світловим мікроскопом із загальним збільшенням 1000 (об'єктив 100, окуляр 10) підраховували кількість клітин з мікроядрами та іншими патологічними змінами мітозу. Загальна кількість проаналізованих клітин на цитологічному препараті складала більш як три тисячі клітин у кожному випадку.

*Дослідження формули крові риб і жаб.* Кров відбирали з хвостової вени, у жаб кров відбирали з вени задніх кінцівок. Краплю крові наносили на попередньо знежирене предметне скло. Препарати висушували на повітрі, попереджуючи попадання пилу, фіксували в 96 %- му етанолі 30 хв. і знову висушували. Фіксовані препарати зберігались в сухому місці до проведення цитологічного аналізу.

*Фарбування цитологічних препаратів.* Препарати фарбували по методиці Паппенгейма–Крюкова, яка полягає у комбінованій обробці мазків розчином Мая-Грюнвальда та 2% розчином Романовського-Гімза, що дає можливість краще диференціювати складові частини клітин [113, 115, 116].

*Аналіз цитологічних препаратів.* Цитологічні препарати аналізували під світловим мікроскопом із загальним збільшенням  $\times 1000$ . Кількість клітин, проаналізованих для кожної риби, складала 5000.

Для визначення формули крові в чотирьох ділянках мазка підраховували близько 1250 клітин, ідентифікуючи їх за класифікацією, запропонованою Н.Т. Івановою, а потім вираховували відсоток кожного типу клітин.

## **2.4. Токсикологічні дослідження на щурах**

*Методика тестування з використання щурів.* Дослідження на лабораторних тваринах проводитимуться при дотриманні принципів біоетики у відповідності з положенням Європейської конвенції щодо захисту хребетних

тварин, яких використовують в експериментальних й інших наукових цілях (Стасбург, 1086 р), Директиви Ради Європи 2010/63EU, Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження». Витяг з протоколу №3 від 12.04.2016 р., засідання Комісії з біоетики ДУ «Інститут медицини праці НАМН».

Досліди проведені на 40 статевозрілих щурах самцях лінії Вістар з початковою масою тіла 150–180 г, які впродовж двох місяців знаходились в умовах віварію на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до питної води. Тварини були розділені на чотири дослідні групи (по 10 особин в кожній групі). Перша група щурів (контрольна) впродовж експерименту пила воду, отриману згідно з рекомендаціям ДСТУ 4174:2003 [125] у кількості  $128,7 \pm 0,64$  г за добу; друга група тварин вживала воду з водопроводу цього інституту, добова кількість склала  $96,4 \pm 0,98$  г. Щурі третьої дослідної групи пили воду з бювету у кількості  $110,6 \pm 0,86$  г за добу, що знаходиться біля інституту, а тваринам четвертої групи давали фасовану воду, добова кількість вживаної води склала  $124,6 \pm 0,58$  г.

Відбір проб води для дослідження здійснювали у відповідності з методичними рекомендаціям ДСТУ ISO 5667-2:2003 [130]. Щоб виключити негативний вплив хлору, водопровідну воду дехлорували впродовж 12 год. При дослідженні усіх проб води враховували концентрації домішок та повноцінність складу за макро- та мікроелементами, як визначено стандартами. Вміст макро- і мікроелементів визначали за допомогою методу атомно-емісійної спектроскопії з індуктивно зв'язаною плазмою (Optima 2100 DV фірми Perkin Elmer, США) [131]. Після закінчення експерименту тварин піддавали легкому ефірному наркозу та забирали кров для гематологічних і біохімічних досліджень. Загальний аналіз крові з підрахунком лейкоцитарної формули проводили за стандартними методами [132]. Визначення біохімічних показників, що характеризують білковий, ліпідний та вуглеводний обміни, стан печінки та нирок виконано за допомогою біохімічного аналізатора HumaLyzer 2000 (Німеччина) з використанням стандартних тест-наборів EliTeck (Франція) [133]. Всі

дослідження на щурах проводились відповідно до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях [134].

У роботі використали штам *E.coli* ДО-12, отриманий з колекції Державного науково-дослідного Інституту стандартизації та контролю медичних біологічних препаратів ім. Л.А. Тарасевича (м. Москва). Культуру бактерій вирощували в мясо-пептонном бульйоні до логарифмічної стадії росту (3 - 4 год), центрифугували, тричі відмивали й ресуспендировали у фосфатному буфері до щільності 108 КОЕ/дм<sup>3</sup>. Отриманий осад відмивали тричі у фізіологічному розчині (0,9 % NaCl) і ресуспендировали в цьому ж розчині до щільності 108 КОЕ/дм<sup>3</sup>. Необхідний обсяг вихідної суспензії вносили в заздалегідь приготовлену фасовану питну воду.

Для дослідження якості питних вод з мікробіологічним забрудненням використалася фасована негазована питна вода, що за результатами комплексного біотестування відносилась до I класу категорія - "безпечні води". За технологією ця вода добувається з підземного джерела та фасується без розриву струменя, не контактуючи з атмосферним повітрям. Проводилося дослідження води за вмісту *E. coli* з концентраціями 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> на дм<sup>3</sup>, контролем служила фасована питна вода без обсемененості мікроорганізмами.

Біотестування проводили на тест-організмах: риби *Brachidanio rerio*, церіодафнія *Ceriodaphnia affinis*, гідра *Hydra attenuate* на рослині цибулі *Allium sera*. Використали по 10 особин кожного виду організму, поміщали на 96 годин у кожен досліджувану воду. Для визначення впливу бактерії *E. coli* на лейкоцитарну формули крові та частоту виникнення ядерних порушень у клітках різних органів риб, після експозиції 96 год від кожної особини брали зразки тканин хвостового плавця, зябер і крові.

## **2.5. Дослідження на культурі клітин в умовах *in vitro***

Під час дослідження визначали цитотоксичну дію питної контрольної води, що підготовлена в лабораторії МАЕМ за спеціальним методом, води з водогону,

води з бювету і фасованої води «Знаменівська». Обрані зразки відрізнялись між собою за хімічним складом.

Дослідження були проведені на клітинах лінії НЕК-293 (ембріональні клітини нирки людини), лінії L929 (фібробласти миші) і РТР (перещеплювальні клітини тестикул поросят), які були отримані з Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Клітин лінії НЕК 293 – це постійна клітинна лінія, отримана шляхом трансформації первинних клітин ембріональної нирки людини; це іморталізовані та злоякісно трансформовані високопроліферуючі клітини нирки людини. За морфологією клітини епітеліоїдні. Клітинна лінія НЕК 293 використовується у вірусології, у дослідженнях з вивчення механізмів злоякісної трансформації, а також як стандартна модель для тестування біологічно-активних речовин та особливостей нефротоксичної дії.

Клітинна лінія L929 – це перещеплювальна лінія фібробластів мишей СЗН, трансформованих метилхолантеном. Клітини утворюють щільний моношар з типових фібробластоподібних клітин веретеноподібної, округлої або овальної форми. Більшість клітин має два відростки. Клітини L929 використовується у дослідженнях з вивчення механізмів злоякісної трансформації, а також як для тестування загальної цитотоксичної дії різних речовин.

Клітини РТР – перещеплювальна лінія, отримана з тестикул поросят. Це моношарова культура, яка використовується у вірусології, біотехнології та як модель для тестування токсичності речовин.

Всі взяті в експеримент клітини культивували в поживному середовищі RPMI 1640 (“SIGMA”, США), яке містило 4 ммоль/л L-глутаміну, 10% ембріональної сироватки теляти (“SIGMA”, США), 40 мкг/мгЛ гентаміцину, у термостаті при 37°C з 5% CO<sub>2</sub> на пластиковому посуді (SenteLab, Україна). Зміну середовища проводили кожні 2 доби. Пересів клітин здійснювали за допомогою розчину Версену при утворенні клітинами суцільного моношару (4-5 доба росту).



Дослідження цитотоксичної дії проводили за умови наявності у клітинній суспензії не менше 90% живих клітин. Цитотоксичну активність досліджуваних зразків води по відношенню до культур клітин визначали за нормативними документами INVITTOX в тестах з метилтетразолієм (MTT), сульфородаміном В (SR В) та нейтральним червоним (NR) [135].

**Тест відновлення метилтетразолію (MTT-тест).** Принцип методу MTT заснований на здатності сукцинатдегідрогенази – ферменту мітохондріальної мембрани клітини відновлювати жовту сіль метилтетразолію (3-[4,5-диметилтіазол-2-іл] – 2,5-дифенілтетразолію бромід) до кристалів формагану фіолетового кольору, що накопичуються в результаті цієї реакції в цитоплазмі живих клітин. Таким чином, за інтенсивністю накопичення кристалів формагану в цитоплазмі можна судити про рівень мітохондріального дихання клітини, що є показником її життєздатності. Кількість утвореного формагану у клітинному моношарі пропорційно наявній кількості живих клітин.

Під час дослідження клітини висаджували на 96-лункові планшети в концентрації  $1 \times 10^5$ /мл (по 100 мкл на лунку) у повному ростовому середовищі. Через 24 год до клітин вносили розчин досліджуваних зразків води. Через 24 год культивування в середовище вносили розчин MTT (SIGMA, США) по 10 мкл/лунку в концентрації 5 мг/мл, інкубували 3 год. Після цього планшети центрифугували при 1500 об/хв протягом 5 хв., Супернатант видаляли і додавали в кожен лунку по 50 мкл диметилсульфоксиду (DMSO, SERVA) для розчинення кристалів формагану. Через 30 хв. інкубації при кімнатній температурі визначали оптичну густину (ОГ) контрольних і дослідних лунок при довжині хвилі 540 нм за допомогою мультилункового спектрофотометру Sunrise Tecan (Австрія). За контроль були взяті лунки з клітинами, в які не додавали воду.

**Тест з сульфородаміном В (SR В).** Тест фарбування сульфородаміном В дозволяє визначити вміст загального білку, що може бути показником приросту клітин та їх проліферації. Для дослідження клітини висаджували на 96 лункові планшети в концентрації  $1 \times 10^5$ /мл по 100 мкл на лунку у повному ростовому середовищі. Через 24 год до клітин вносили зразки води та інкубували їх при

37°C та 5% CO<sub>2</sub> протягом 24 год. Потім клітини фіксували 50% розчином трихлороцтової кислоти (ТХО) (кінцева концентрація 10% ) протягом 1 год. при 4°C, після чого промивали проточною водою. Фіксовані у лунках клітини фарбували 0,4% розчином сульфородаміну В (Sulforodamine B, SIGMA, США) протягом 30 хв. Після видалення барвника лунки промивали 1% розчином оцтової кислоти, барвник розчиняли додаванням 10 мМ розчину Tris-base при струшуванні 10 хв. на шейкері. Оптичну густину розчину реєстрували за допомогою мультилункового спектрофотометру Sunrise Tecan (Австрія) при довжині хвилі 540 нм.

**Тест з нейтральним червоним (NR).** Метод з нейтральним червоним ґрунтується на здатності живих клітин поглинати та накопичувати у лізосомах вітальний барвник нейтральний червоний. Пошкодження лізосом призводить до зниження накопичення барвника. За інтенсивністю адсорбції барвника нейтрального червоного здійснюється оцінка інтенсивності процесів активного мембранного перенесення та активності лізосомальних ферментів. Це є ще одним показником життєздатності клітин.

Під час дослідження клітини висаджували на 96-лункові планшети в концентрації  $1 \times 10^5$ /мл (по 100 мкл на лунку) у повному ростовому середовищі. Через 24 год до клітин вносили розчин досліджуваних зразків води. Після культивування клітин із кожної лунки обережно відбирали середовище. Далі клітини у лунках промивали внесенням 150 мкл теплового буферного розчину, який потім обережно видаляли з кожної лунки. До клітин в лунки додавали по 100 мкл робочого розчину нейтрального червоного та інкубували протягом 3-х годин в термостаті з 5% CO<sub>2</sub>. Робочий розчин нейтрального червоного готували безпосередньо перед застосуванням. Після інкубації видаляли робочий розчин нейтрального червоного та промивали лунки додаванням 150 мкл фосфатного буферного розчину (ФБР). Після видалення ФБР до лунок додавали по 150 мкл екстрагуючого розчину (1мл льодяної оцтової кислоти, 50 мл етанолу та 49 мл дистильованої води). Планшет обережно струшували протягом 10 хв. на шейкері. При цьому нейтральний червоний екстрагується з клітин, забарвлюючи

розчин. Визначали оптичну густину вмісту лунок при довжині хвилі 540 нм за допомогою мультилункового спектрофотометру Sunrise Tecan (Австрія) при довжині хвилі 540 нм.

*Оцінка результатів.* В усіх описаних вище методах кількість життєздатних клітин розраховували за формулою:  $\text{ОГ}_{\text{дл}} / \text{ОГ}_{\text{кл}} \times 100\%$ , де :

ОГ<sub>кл</sub> – оптична густина в контрольних лунках;

ОГ<sub>дл</sub> – оптична густина в дослідних лунках.

Для роботи на культурах клітин застосовано спеціальне обладнання та реактиви.

*Обладнання:* ламінарний бокс, мікроскоп бінокулярний, термостат з 5% CO<sub>2</sub>, центрифуга з ротором для 96 лункових планшетів, мультилунковий спектрофотометр (ІФА-рідер) Sunrise Tecan (Австрія), ваги електричні лабораторні, холодильник побутовий електричний з морозильною камерою, аналізатор потенціометричний з похибкою вимірювань рН  $\pm 0,01$ , дозатори піпеткові автоматичні одно- та багатоканальні перемінного об'єму від 1 до 1000 мкл, камера Горяєва.

*Витратні матеріали:* культуральні флакони, 96-лункові планшети, стерильні наконечники для дозатора піпеткового (50,100,200, 300 мкл), стерильні пластикові піпетки градуйовані об'ємом 1, 2, 3, 5, та 10 мл; фільтрувальний папір ватман №1.

*Середовища культивування, хімічні реагенти:* Середовище RPMI 1640 (SIGMA, США), L-глутамін (SIGMA, США), сульфат гентаміцину (Біофарма, Україна), ембріональна теляча сироватка (ETC) (SIGMA, США), дистильована вода та реактиви з чистотою не нижче кваліфікації «ЧДА».

*Дослідження мутагенної активності води з бюветів у культурі лімфоцитів периферичної крові людини in vitro без і з метаболічною активацією.*

З метою вивчення можливих метаболітів досліджувану речовину піддають процесу біотрансформації за допомогою ферментів мікросомального окиснення, що містяться в постмітохондріальній супернатанті гомогената печінки щурів – фракції S-9. Для цього культуру лімфоцитів периферичної крові інкубують разом

з досліджуваною речовиною, а також активують мікросомальною сумішшю – S-9 міх (фракція S-9 + Ко-фактори - НАДФ і Глюкозо-6-фосфат) – СВП № МА-127 від 30.04.2001 г і ПА № 4301 [136].

Експеримент ставили в двох варіантах: без і з метаболічною активацією.

У варіантах без метаболічної активації реєструють дію прямих мутагенів – сполук, які індукують мутації за рахунок активності первинної структури досліджуваної речовини. Дія ж промутагенів – сполук, ефект яких обумовлений утворенням мутагенних метаболітів, реєструють в варіантах експерименту з метаболічною активацією.

Культитивування лімфоцитів і приготування препаратів хромосом виконували за стандартними методиками [137] з модифікаціями, які прийняті в лабораторії мутагенезу. В експерименті використовували культуру лімфоцитів, отриману від практично здорового донора – жінки 40 років, яка не приймала медичні препарати і не досліджувалася протягом року рентгенологічно.

Кров відбирали одноразовим шприцом з ліктьової вени, розливали по 1 см<sup>3</sup> в стерильні гепаринізовані (5 од. в 0,1 см<sup>3</sup> фізіологічного розчину (0,9% NaCl) центрифужні пробірки та поміщали в холодильник при температурі +4 °С. Далі в пробірки з кров'ю в стерильних умовах послідовно додавали 20 од. пеніциліну натрієвої солі (в 0,1 см<sup>3</sup> фізіологічного розчину) і до 8 см<sup>3</sup>. середовища RPMI. Як митоген використовували Фітогеммаглютинін-Р (Sigma) в кількості 20 мкг/см<sup>3</sup> культурального середовища. Вміст кожної пробірки розливали в два скляні флакони, які герметично закривали гумовими пробками і інкубували в термостаті при + 37°С.

При постановці експерименту з метаболічною активацією разом з препаратом додавали мікросомальну активуючу суміш (S-9 міх), яку готували відповідно до методичних рекомендацій D.M. Maron і B.N. Ames [138].

Тварини (щури - самці в кількості 2 голів) були отримані з розплідника клініки лабораторних тварин ПП "Біомодельсервіс" (г. Київ, ул. Е. Потьє, 14) при Інституті фармакології і токсикології АМН України. Під час проведення експерименту тварини містилися у віварії в стандартних пластикових клітках,

при температурі навколишнього середовища 20-22°C, вологості повітря 50-60%, стандартному світловому режимі "день-ніч". Відбір піддослідних тварин проводили методом "випадкових чисел" [139].

Індукцію ферментів мікосомального окиснення здійснювали за допомогою одноразового, внутрішньочеревного введення щурам суміші поліхлорованих біфенілів "соволом" за 5 діб до забою в кількості 500 мг/кг маси тварини. За добу до забою у тварин відбирали корм і заміняли питну воду на 5%-ний розчин сахарози. Щурів забивали шляхом цервікальної дислокації.

У стерильних умовах видаляли печінку. Печінку промивали до повного видалення крові стерильним 0,15М розчином KCl охолодженим до +4°C. Відмиту печінку подрібнювали і гомогенізували в скляному гомогенізаторі в трикратному об'ємі 0,15М KCl при +4°C. Отриману таким чином суспензію (гомогенат) розливали по центрифужних пробірках і центрифугували протягом 15хв. при 9000 об/хв. і температурі від +2 до +4°C. Мікосомальний супернатант розливали в поліетиленові епіндорфи, заморожували в рідкому азоті і зберігали до використання. Вміст білку (визначали за методом Лоурі [140] в мікосомальному супернатанті фракції склав 17,0 мг/см<sup>3</sup>.

У пробірки за 24 год до закінчення інкубації разом з препаратом додавали мікосомальну активуючу суміш в кількості 0,05 см<sup>3</sup>, яку готували безпосередньо перед внесенням наступним чином:

|                                                |                       |
|------------------------------------------------|-----------------------|
| розчин MgCl <sub>2</sub> /KCl                  | 1,0 см <sup>3</sup>   |
| 1М глюкозо-6-фосфат (Sigma)                    | 0,25 см <sup>3</sup>  |
| 0,1М NADF (Sigma)                              | 2,0 см <sup>3</sup>   |
| 0,2М фосфатний буфер (pH = 7,4)                | 25,0 см <sup>3</sup>  |
| стерильна дистильована вода                    | 19,75 см <sup>3</sup> |
| 0,05 см <sup>3</sup> гомогенату печінки щурів. |                       |

Експеримент супроводжували негативним і позитивним контролем. У позитивному контрольному варіанті в експерименті без метаболічної активації в

культуру лімфоцитів на 28 год інкубації додавали мітоміцин-С в концентрації 10,0 мкг/см<sup>3</sup> культурального середовища. У варіанті з метаболічною активацією як позитивний контроль використовували циклофосфан в концентрації 20 мкг/см<sup>3</sup>. Всі робочі розчини готували безпосередньо перед внесенням в культуру.

Через 52 год від початку інкубації вміст флаконів розливали по центрифужних пробірках. Центрифугування проводили протягом 5 хв. при 1000 об/хв. Надосадок видаляли, залишивши шар в 5-7мм. над поверхнею осаду. Гіпотонічну обробку проводили 0,56% розчином KCl протягом 5 хв. при +37°C. Пробірки центрифугували, надосадок видаляли, як і в попередній маніпуляції. Фіксацію проводили свіжоприготовленим фіксатором, який містить суміш охолодженого до +4 °C етанолу і крижаної оцтової кислоти в співвідношенні 3:1. Процедуру фіксації повторювали тричі. Тривалість фіксацій: перша – 40 хв друга та третя – по 24 год (при +4°C) [141, 142] .

Отриману після фіксації суспензію розкопували на заморожені предметні скельця. Залишки фіксатора випалювали в полум'ї спиртівки. Препарати фарбували 2,5% розчином барвника Гімза. Відбір метафазних пластинок для цитогенетичного аналізу, класифікація та облік аберацій хромосом були загальновизнаними [143] .

У кожному варіанті експерименту аналізували по 200 метафазних пластинок, які містили не менше 44 хромосом та мали не більше 3 накладених хромосом в одній метафазі. Враховували аберації хроматидного і хромосомного типів. Прогалини реєстрували, але в число аберацій не включали. При підрахунку кількості анеуплоїдних клітин враховували гіпоплоїдні метафази – від 26 до 42 хромосом і гіперплоїдні – більше 48 хромосом [136].

### ***Розчини та реактиви, які використовували при дослідженні***

У таблиці 2.51 представлено назви реактивів, які були використані в роботі при приготуванні цитологічних препаратів.

Таблиця 2.5.1

Розчини та реактиви, які використовували в дослідженнях

| №  | Назва розчинів та речовин                              | Виробник                                               | Ступінь чистоти            | Рік випуску | Стандарт          |
|----|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------|-------------|-------------------|
| 1. | Азур-еозин за Романовським (в розчині)                 | ВАТ Шостківський завод хімічних реактивів              | Чистий ч                   | 2011        | ТУ 6-09-349-75    |
| 2. | Азур-еозин за Романовським (в розчині)                 | Шостківській завод хімреактивів Реахім                 | Чистий ч                   | 2011        | ТУ 6-09-349-75    |
| 3. | Еозин-метиленовий синій за Май-Грюнвальдом (в розчині) | ВАТ Шостківський завод хімічних реактивів              | Чистий ч                   | 2010        | ТУ 6-09-184-75    |
| 4. | Кислота оцтова (реактив) $\text{CH}_3\text{COOH}$      | Україна м. Суми                                        | Хімічно чиста льодяна «ХЧ» | 2011-7      | ДОСТ 61-75        |
| 5. | Масло імерсійне для мікроскопії                        | МініМед Росія м. Брянськ                               | Чистий                     | 2011        | ДОСТ 13739-78     |
| 6. | Спирт етиловий 96%                                     | Держкоммедбіопром України Межиріцький вітамінний завод |                            |             | Рег. Р/97/226/19  |
| 7. | Hoechst 33258                                          | Fluka, Німеччина                                       | 98%                        | 2010        | CAS N. 23491-45-4 |
| 8. | Глицерин                                               | Реахім, Росія                                          | Ч                          | 2011        | ДОСТ 6259-75      |

**Досліджувані зразки води.** Для дослідження впливу антропогенного забруднення, зразки води були відібрані з прісноводних водойм України: рік Десна та Дніпро у районі міста Києва, загалом три станції.

Результати хімічного аналізу, проведеного відділом аналітичної очистки води Інституту колоїдної хімії та хімії води НАН України, наведені у таблиці 2.5.2. Співставлення одержаних показників з нормативами, розробленими для оцінки якості питної води, вказує на те, що відібрані проби річкової води

характеризувались відсутністю значних відхилень від нормативних показників, за виключенням перманганатної окиснюваності та загального органічного вуглецю, вміст якого є підвищеним. Це виключає можливість впливу на функціональний стан риб під час експерименту зміни загальних гідрохімічних показників досліджуваних зразків води.

Таблиця 2.5.2

Хімічний аналіз досліджуваних зразків річкової води

| Найменування показників              | Результати вимірювань |          |          | Вимоги НД* | Позначення НД на метод Випробувань |
|--------------------------------------|-----------------------|----------|----------|------------|------------------------------------|
|                                      | Зразок 1              | Зразок 2 | Зразок 3 |            |                                    |
| Органолептичні показники             |                       |          |          |            |                                    |
| Кольоровість, град                   | 48,0                  | 50,0     | 28,0     | 20         | ДОСТ 3351                          |
| Мутність (за кольором мг/ дм³        | 1,7                   | 2,6      | 2,6      | 1,5        | ДОСТ 3351                          |
| Узагальнені показники                |                       |          |          |            |                                    |
| рН                                   | 8,15                  | 7,95     | 8,15     | 6,0-9,0    | [1]                                |
| Мінералізація, мг/дм³                | 292,0                 | 280,0    | 192,0    | 100-1000   | ДОСТ 18164                         |
| Жорсткість, мг-екв/дм³               | 3,7                   | 3,8      | 4Д       | 1,5-7,0    | ДОСТ4151                           |
| Окиснюваність перманганатна, мг/дм³  | 10,0                  | 12,0     | 9,0      | 4,0        | [1]                                |
| Загальний органічний вуглець, мг/дм³ | 10,8                  | 11,3     | 9,0      | 3,0        | ДОСТ 18164                         |
| Лужність, мг-екв/дм³                 | 3,7                   | 3,3      | 3,8      | 0,5-6,5    | [1]                                |
| Неорганічні показники                |                       |          |          |            |                                    |
| Амоній, мг/ дм³*                     | <0,05                 | 0,07     | <0,05    | 1,5        | ДОСТ 4192                          |
| Бікарбонати, мг/ дм³                 | 225,7                 | 201,3    | 231,8    | -          | [1]                                |
| Залізо загальне, мг/ дм³             | 0,05                  | 0,125    | 0,08     | 0,3        | ДОСТ 4011                          |



| Найменування показників       | Результати вимірювань |          |          |           | Вимоги НД* | Позначення НД на метод Випробувань |
|-------------------------------|-----------------------|----------|----------|-----------|------------|------------------------------------|
|                               | Зразок 1              | Зразок 2 | Зразок 3 |           |            |                                    |
| Калій, мг/дм <sup>3</sup>     | 2,8                   | 4,0      | 2,5      | -         |            | ДОСТ 23268.7                       |
| Кальцій, мг/дм <sup>3</sup>   | 60,1                  | 58,1     | 64,1     | -         |            | [1]                                |
| Магній, мг/дм                 | 8,51                  | 10,9     | 11,0     | 10-80     |            | [1]                                |
| Марганець, мг/дм <sup>3</sup> | 0,023                 | 0,022    | 0,024    | 0,1       |            | ДОСТ 4974, [3]                     |
| Мідь, мг/дм <sup>3</sup>      | <0,001                | <0,001   | <0,001   | 1,0       |            | [3]                                |
| Натрій, мг/дм <sup>3</sup>    | 8,95                  | 20,0     | 8,5      | 200       |            | ДОСТ 23268.6                       |
| Нітрати, мг/дм <sup>3</sup>   | 1                     | 12,0     | 1,3      | 45        |            | ДОСТ 18826                         |
| Нітрити, мг/дм <sup>3</sup>   | <0,02                 | 1,15     | 0,4      | (3,0)     |            | ДОСТ 18826                         |
| Свинець, мг/дм <sup>3</sup>   | <0,01                 | <0,001   | <0,001   | 0,03      |            | ДОСТ 18164                         |
| Стронцій, мг/дм <sup>3</sup>  | 0,2                   | 0,17     | 0,19     | 7,0       |            | ДОСТ 23950                         |
| Сульфати, мг/ дм <sup>3</sup> | 10,0                  | 30,0     | 32,6     | 500 (250) |            | ДОСТ 4389                          |
| Фосфати, мг/дм <sup>3</sup>   | 0,23                  | 1,15     | 0,4      | (0,4)     |            | [1]                                |
| Хлориди, мг/дм                | 13,5                  | 24,8     | 14,2     | 250 (350) |            | ДОСТ 4245                          |
| Цинк, мг/дм <sup>3</sup>      | 10,8                  | 11,3     | 9,0      | 5,0       |            | [2]                                |

Нормативні документи 1. ДОСТ 2874-82 «Вода питна»; 2. ДСанПиН-% «Вода питна. Гігієнічні вимоги до якості води централізованого господарсько-питного водопостачання».

*Примітка.* Об'єкт випробувань - зразки води: зразок № 1 — зразок води з ріки Дніпро (р-н Гідропарк, м. Київ); зразок № 2 - зразок води з ріки Дніпро (р-н Бортничі, м. Київ); зразок №3 - зразок води з ріки Десна (с. Хотянівка).

**Статистична обробка даних.** На заключному етапі досліджень проводили аналіз та статистичну обробку результатів. Результати виконаних

досліджень обраховані з використанням загальноновизнаних методів статистичної обробки результатів медико-біологічних досліджень [144, 145] з визначенням середньоарифметичних величин показників ( $M$ ), стандартної похибки ( $m$ ), квадратичного відхилення ( $\sigma$ ), параметричних методів перевірки статистичних гіпотез ( $t$ -критерій Ст'юдента), непараметричним  $\varphi$  – критерієм Фішера та кореляційного аналізу за допомогою пакету статистичних програм.

Фотографії цитологічних препаратів робили за допомогою системи аналізу відео зображень, яка складається з мікроскопу Jenaval (Carl Zeiss, Jena), камери відео спостереження (Color CCD Camera, Vision), та PC – сумісного комп'ютеру.

## **Висновки до розділу 2**

Для досягнення мети та вирішення поставлених завдань розроблено структура експериментальних досліджень. Визначені та описані методи, які використані в експериментальних дослідженнях. А саме, формовано наукові основи біотестування, як методу аналізу об'єктів водного середовища, описано застосування комплекс біологічних тест-моделей (рослини, гідробіонти, земноводні, теплокровні тварини, культура клітин) для дослідження якості природних і питних вод, які дозволяють оцінити їх безпеку.

(Патент України на винахід № 201004569, 2011 р.; патент України на винахід № 201000606, 2011 р.; патент України на винахід № 201012982, 2012 р.; патент України на винахід № 201113123, 2014 р.; Національний стандарт України ДСТУ 7525:2014; ДСТУ 7387:2013).

## **РОЗДІЛ 3. КОМПЛЕКСНА ОЦІНКА ТОКСИЧНОСТІ ВОДИ ЗА ВИКОРИСТАННЯМ РОСЛИННИХ І ТВАРИННИХ ТЕСТ-ОРГАНІЗМІВ**

### **3.1. Аналіз на токсичність питної води з використанням рослин**

Причиною вкрай незадовільної якості води, що поставляється населенню України є наступні фактори [146 - 148]:

1. Україна належить до країн, слабо забезпеченим водою.
2. Всі джерела водозаборів в Україні відповідає лише 3 і 4, частище 5 категорії якості, тобто характеризується як «вода забруднена» і «вода брудна».
3. Незадовільний стан обладнання централізованої водоочистки і використання застарілих технологій водопідготовки.
4. Хлорування води призводить до утворення цілого ряду хлорорганічних сполук, які надають токсичний, канцерогенний і мутагенний ефект на організм людини.
5. Термін експлуатації 60-70% водопроводів країни вже закінчився, і вони знаходяться в аварійному стані.

За невеликим винятком, вода всіх регіонів України містить підвищені концентрації хлору, заліза і марганцю, солей, органічних сполук і відрізняється високою мінералізацією. Причиною низької якості води, що поставляється населенню є використання в основному поверхневих вод як джерела водозбору, практично неконтрольоване антропогенне забруднення джерел водопостачання, надлишкове хлорування і вторинне забруднення води в процесі транспортування [36, 149]. Найбільш забрудненими, з точки зору питної води, є басейн річки Дніпро, Сіверського Дінця, річки Приазов'я, окремі притоки Дністра, Західного Бугу [150].

У зону найбільш критичних регіонів входять Одеська, Донецька, Харківська, Дніпропетровська, Запорізька, Херсонська та Миколаївська області. У цих областях якість води класифікується як дуже брудна (VI клас). У цих регіонах через антропогенного забруднення (промисловість, побутові стічні води), а також через зношеність очисних споруд люди часто п'ють технічну воду, відхилення від норми якої часом становить до 80 відсотків [151].

Найбільш чистими регіонами, з точки зору питної води, є західні області України (крім Львова): Рівненська, Тернопільська, Івано-Франківська і

Волинська. Досить сприятливої може вважатися ситуація в Сумській, Полтавській і Чернігівській областях [152].

Одне з найнебезпечніших екологічних явищ - незадовільний стан труб централізованого водопостачання населення і внутрішні водопровідні розводки житлового фонду, які десятиліттями не змінювалися. Хімічні та мікробіологічні забруднювачі накопичувалися в трубах тривалий час, поки не досягли «критичної маси», після чого при подачі по ним води вони змиваються в поточну воду і надходять з кранів в квартири. На внутрішніх поверхнях труб поселяється і розмножується безліч різних мікроорганізмів: віруси, бактерій, водоростей, мікроміцетів, які виділяють токсини шкідливі для здоров'я людини. Молекули цих токсинів проявляють стійкість до кип'ятіння і до дії хлору [153-155].

Чавунні і сталеві труби водопровідної мережі, мідні і цинкові деталі кранів розширюють і поповнюють перелік металів, що містяться у воді.

У лабораторії біотестування вод ІКХХВ НАН України та ПВНЗ МАЕМ протягом кількох років нами проводилася оцінка якості води централізованого водопостачання населення за допомогою комплексного біотестування. Використовувалася комплекс рослинних і тваринних тест-організмів різних трофічних рівнів. Результати біотестування на організмах підсумовувалися, визначався індекс загальної токсичності, величина якого вказується на категорію вод по відношенню до тест-організмів (табл. 3.1.1).

Водопровідна хлорована вода за результатами комплексного біотестування впливала токсично на тест-організми та відповідала на підставі величини індексу загальної токсичності категорії «небезпечні води». При цьому ракоподібні *Cereodaphnia affinis* відчували гострий токсичний вплив, а прісноводна гідра *Hydra attenuate* і риба данію реріо *Brachidanio rerio* - хронічну токсичну дію.

Таблиця 3.1.1

Результати комплексного біотестування водопровідної води у м. Києві (2014-2017 рр.)

| Характерис- | Церіо | Гідра | Риба | Цибуля | Індекс | Категорія |
|-------------|-------|-------|------|--------|--------|-----------|
|-------------|-------|-------|------|--------|--------|-----------|

| тика водної проби                  | дафнія<br><i>Cereo daphnia affinis</i> | <i>Hydra attenuate</i> | <i>Brachi danio rerio</i> | ріпчаста<br><i>Allium cepa</i> | загальної токсинності | якості води          |
|------------------------------------|----------------------------------------|------------------------|---------------------------|--------------------------------|-----------------------|----------------------|
| контрольна вода                    |                                        |                        |                           |                                |                       |                      |
| 2014                               | 10                                     | 0                      | 0                         | 0                              | 10                    | безпечна (0-40)      |
| 2015                               | 0                                      | 10                     | 0                         | 0                              | 10                    |                      |
| 2016                               | 10                                     | 0                      | 0                         | 0                              | 10                    |                      |
| 2017                               | 10                                     | 10                     | 0                         | 0                              | 20                    |                      |
| Водопровідна вода 2014             |                                        |                        |                           |                                |                       |                      |
| 2015                               | 60                                     | 40                     | 30                        | 20                             | 150                   | небезпечна (121-200) |
| 2016                               | 50                                     | 50                     | 30                        | 25                             | 155                   |                      |
| 2017                               | 80                                     | 40                     | 30                        | 20                             | 170                   |                      |
|                                    | 70                                     | 50                     | 40                        | 20                             | 180                   |                      |
| Водопровідна вода після Веги» 2014 |                                        |                        |                           |                                |                       |                      |
| 2015                               | 0                                      | 10                     | 10                        | 0                              | 20                    | безпечна (0-40)      |
| 2016                               | 10                                     | 10                     | 0                         | 10                             | 30                    |                      |
| 2017                               | 0                                      | 10                     | 0                         | 0                              | 10                    |                      |
|                                    | 0                                      | 10                     | 10                        | 0                              | 20                    |                      |

Результати представлені в Таблиці 3.1.1 свідчать, що доочищення водопровідної води установкою «Вега», яка розроблена та виготовлена співробітниками ІКХХВ НАН України, повністю прибирила її токсичність, і покращувала якість води до категорії «безпечна».

Таким чином, водопровідна хлорована вода за даними біологічного тестування не відповідає якості питної води, і її тривале споживання населенням підвищує ступінь ризику для його здоров'я. Застосовуючи установки для доочищення водопровідної води, можна значно поліпшити її якість до відповідності з вимогами що висуваються до якості питної води.

У пошуках причин високої токсичності водопровідної води ми за допомогою біотестування оцінили якість природних поверхневих вод - джерел централізованого водопостачання м.Києва.

### **3.2. Оцінка якості природної води - джерел централізованого водопостачання на прикладі м. Києва**

Питне водопостачання України на 80% забезпечується поверхневими водами, які нерівномірно розподілені по території країни. Основні джерела прісної води - води річок Дніпра, Десни, Дністра, Південного Бугу, Північного Дінця, Дунаю з притоками, а також малих річок північного узбережжя Чорного та Азовського морів [156, 157].

Погіршення якості поверхневих вод обумовлено як природними так і антропогенними факторами. Перші на відміну від других збалансовані процесами самоочищення вод за рахунок їх кругообігу в природі. Домінуюче антропогенне забруднення вод (хімічне, фізичне і біологічне) пов'язане з господарською діяльністю людини [152, 158].

Стан водних джерел систем централізованого водопостачання не може гарантувати необхідної якості питної води, а в ряді міст України воно досягає небезпечного рівня для здоров'я людини [159]. Служби санітарно-гігієнічного нагляду постійно відзначають високе забруднення поверхневих вод. Більшість забруднюючих речовин потрапляють до вододжерел зі стоками і зливовими стоками з територій промислових підприємств, сільськогосподарських об'єктів і угідь, а також з інших санітарно неблагополучних місць. У зв'язку з цим проводиться гіперхлорування води, що, в свою чергу, небезпечно для здоров'я населення в зв'язку з утворенням хлорорганічних сполук [36].

Найбільшим водним об'єктом, який забезпечує водопостачання 2/3 населених пунктів України, є річка Дніпро. Головний споживач дніпровської води - місто Київ, який географічно розташований в середній течії річки. У Києві знаходиться велика кількість промислових підприємств, шість з яких є екологічно небезпечні, а три - основні водокористувачі і забруднювачі поверхневих вод [160, 161].

За останні роки в Дніпрі, у тому числі в районі джерел централізованого водопостачання спостерігається тенденція поступового погіршення якості води, зокрема: присутність у вихідній воді органічних сполук, періодичне підвищення

кольоровості, підвищений вміст заліза і марганцю, різке зниження розчиненого кисню [162, 163] . Так, в районі водозабору Дніпровської водопровідної станції відзначається забруднення води р. Дніпро, що виражається в перевищенні порогових концентрацій по бактеріальним і фізико-хімічними показниками.

Звертаючи увагу на вищезазначене, еколого-санітарний стан і якість води в районі Дніпровського водозабору багато в чому залежить від стану його територій водоохоронних зон та прибережної смуги. Є підстави вважати, що відновлення на цій ділянці природно-екологічної рівноваги шляхом освіти і впорядкування водоохоронних зон, які служили б буфером для надходження забруднюючих речовин у поверхневі води, є неможливим.

Наші дослідження були спрямовані на оцінку якості поверхневих вод річок Дніпро і Десна в районі м. Києва, в тому числі і в безпосередній близькості водозаборів Дніпровської і Деснянської водопровідних станцій, і з'ясування ступеня антропогенного впливу мегаполісу на якість вод р. Дніпро за допомогою методів комплексного біотестування.

Складність пошуку надійного підходу комплексної, узагальнюючої оцінки екологічного стану водних об'єктів полягає в тому, що необхідно визначити якісну характеристику цілісних водних екосистем з багатокomпонентної структурно-функціональної організацією, яка важко піддається формалізації. На наш погляд, комплексне біотестування з використанням набору тварин і організмів (розділ 2) максимально наближено має вирішити цю проблему.

Дослідження проводилися протягом 4 років (2014-2017 роки), проби води відбиралися на постійних місцях: 15 км вище м.Києва р. Десна (с. Хотянівка), 5 км вище за течією Дніпра м.Києва (м Вишгород), в межах м.Києва (Гідропарк) і 5 км нижче в районі сел. Бортничі (рис. 3.2.1).

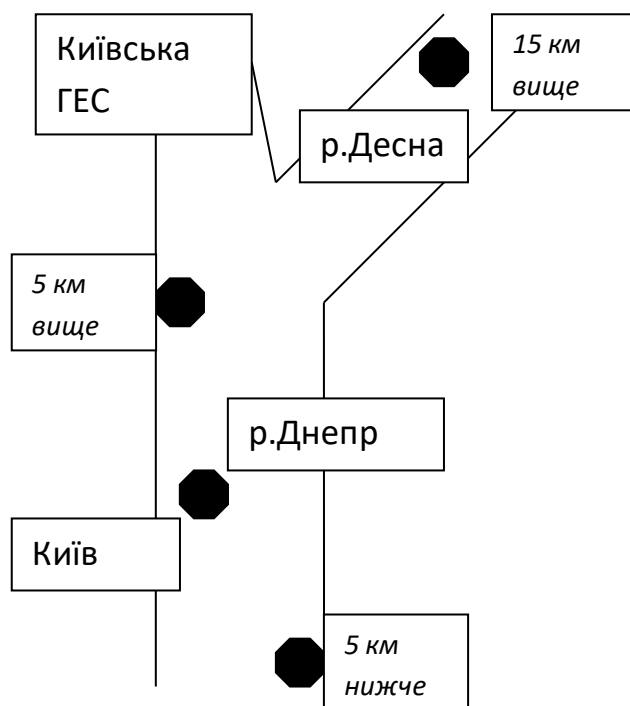


Рисунок 3.2.1 -. Карта-схема місць відбору проб поверхневих вод.

Результати комплексного біотестування показали, що водні проби, відібрані вище м.Києва не чинили токсичної дії тварини і рослинні тест-організми (табл. 3. 2.1). Таким чином, дніпровську і деснянську воду в районі Вишгорода і Хотянівка можна віднести відповідно до величини індексу загальної токсичності до категорії «безпечні води».

Водні проби, відібрані в м. Києва та в 5 км нижче надавали в тій чи іншій мірі токсичний вплив на тест-організми - категорії води «небезпечна» і «небезпечна» відповідно. Так, у зразках води біля Гідропарку хронічна токсичність спостерігалася для безхребетних церіодафній, прісноводної гідри та риби, а в районі сел. Бортничі дніпровська вода викликала гостру токсичну дію на ракоподібних, гідру та хронічний токсичний вплив на риб і ріпчасту цибулю.



Результати комплексного біотестування поверхневих вод річок Дніпро і  
Десна (2014-2017 рр).

| Місця<br>відбору<br>проб<br>води                      | Церіо<br>дафнія<br><i>Cereo<br/>daphnia</i> | Гідра<br><i>Hydra<br/>attenu<br/>ate</i> | Риба<br><i>Brachi<br/>danio<br/>rerio</i> | Цибуля<br>ріпчаста<br><i>Allium<br/>sepa</i> | Індекс<br>загальної<br>токсич-<br>ності | Категорія<br>якості води |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|
| 15км<br>вище<br>Києва<br>2014<br>2015<br>2016<br>2017 | 10<br>0<br>10<br>10                         | 10<br>10<br>10<br>0                      | 0<br>0<br>0<br>0                          | 0<br>0<br>10<br>10                           | 20<br>10<br>20<br>20                    | безпечна<br>(0-40)       |
| 5км вище<br>Києва<br>2014<br>2015<br>2016<br>2017     | 10<br>10<br>10<br>0                         | 20<br>10<br>10<br>20                     | 0<br>10<br>0<br>10                        | 0<br>0<br>0<br>0                             | 30<br>30<br>20<br>30                    |                          |
| У Києві<br>2014<br>2015<br>2016<br>2017               | 30<br>40<br>40<br>30                        | 40<br>40<br>30<br>40                     | 10<br>10<br>20<br>20                      | 10<br>10<br>20<br>10                         | 90<br>100<br>110<br>100                 | небезпечна<br>(41-120)   |
| 5км<br>нижче<br>Києва<br>2014<br>2015<br>2016<br>2017 | 50<br>50<br>60<br>50                        | 50<br>40<br>30<br>50                     | 20<br>30<br>30<br>30                      | 20<br>20<br>10<br>20                         | 140<br>140<br>130<br>150                |                          |

Результати комплексного біотестування ще раз показали негативний антропогенний вплив мегаполісів на водні екосистеми. Зростання середнього значення індексу загальної токсичності дніпровських вод підтверджує факт антропогенного забруднення поверхневих вод р. Дніпро (рис. 3.2.2).

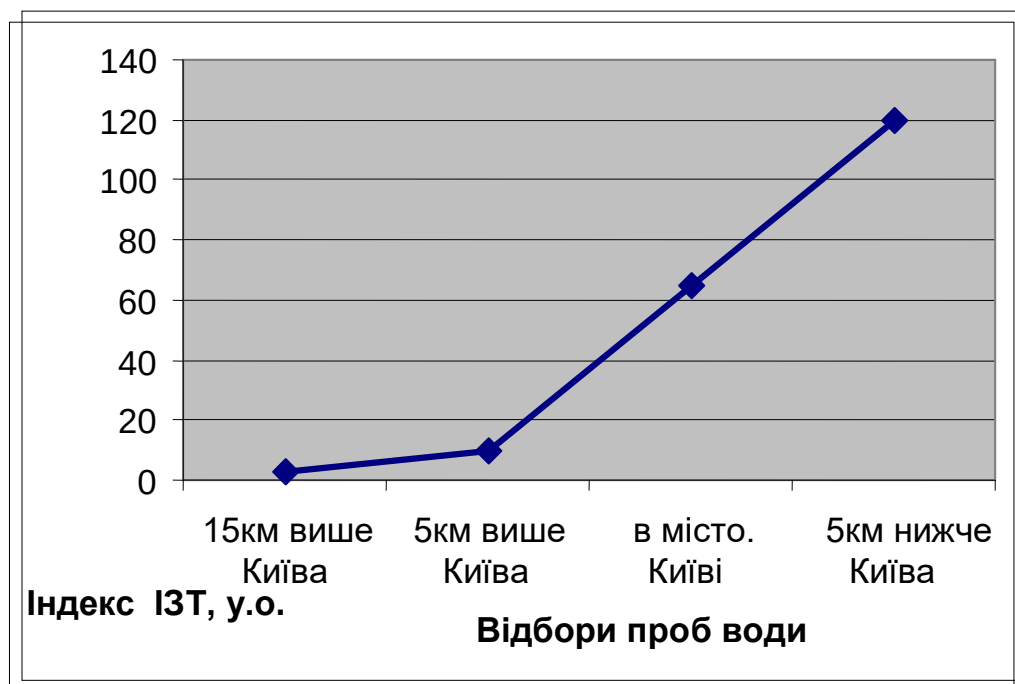


Рисунок 3.2.2 - Динаміка зміни показника індексу загальної токсичності в залежності від місця відбору проб води.

Порівнюючи якість вихідної природної води (Дніпровський і Деснянський водозабори) та водопровідної хлорованої води ми прийшли до висновку, що процес хлорування значно підвищує токсичність вихідної води за рахунок утворення стійких хлорорганічних сполук, небезпечних для здоров'я людини.

**Біотестування підземних вод.** З огляду на зростаюче погіршення якості водопровідної води, гостро стоїть проблема пошуку альтернативних джерел питного водопостачання населення. Такими є підземні джерела, так як вони надійно захищені від природних і антропогенних забруднень багат шарової товщею ґрунтів і порід. За своїм хімічним складом і органолептичними характеристиками найкращими показниками володіє вода з підземних напірних джерел - артезіанських свердловин юрського і сеноманського горизонтів глибиною 90-330 м, крім цього артезіанська вода вільна від радіонуклідів, нітритів, нітратів та інших небезпечних для здоров'я людини речовин.

Ще на початку 90-х років [164] запропоновані місця відбору артезіанської питної води у вигляді бюветних комплексів, які включають в себе артезіанську свердловину, надземне архітектурна споруда, фільтрувальні установки,

інженерні комунікації, контрольно-вимірювальні пристрої та ін. За даними санітарно-епідеміологічних служб, артезіанська вода не вимагає очищення хімічними реагентами і знезараження хлором. Якість артезіанської води (згідно з рекомендаціями ВООЗ): хімічний склад, органолептичні показники, загальна мінералізація, каламутність, мікробіологічні, радіологічні показники і т.д. перевіряють на сучасному обладнанні. Хімічний склад води в різних бюветах, природно, різниться за змістом деяких компонентів, але всі вони по концентрації знаходяться в межах норми. Артезіанську воду з бюветів рекомендують [164] для пиття і приготування їжі населенням. За весь час існування системи бюветного водопостачання в м Києві не було жодного випадку спалаху у населення інфекційних захворювань, викликаних вживанням артезіанської питної води. Вода з деяких свердловин може мати специфічний нестійкий запах, викликаний наявністю природного сірководню в низьких концентраціях (до 0,05 мг / дм<sup>3</sup>), який не шкодить здоров'ю людини.

Якість артезіанської води підтвердило комплексне біотестування, проведене в лабораторії біомаркерів та біотестування вод. Біологічно протестовано 9 зразків артезіанських вод, взятих з різних бюветів і районів Києва [165], на комплекс біотестів (ріпчаста цибуля, гідра, церіодафнія і риба) з вивченням можливої цитотоксичності (клітини цибулі і гідри) і генотоксичності (клітини цибулі і тканин риб). За результатами біотестування не виявлено токсичного впливу артезіанських вод на тест-організми, а на клітинному рівні зареєстровано повна відсутність цито- і генотоксичності: всі вимірювані показники знаходилися на рівні контрольних величин.

У Білгородській області (Росія) проводили біотестування за допомогою дафній (*Daphnia magna*) природних джерел питної води (джерел) [166]. Основними оціночними показниками були виживаність, плодючість, ріст в ряду поколінь. Дослідження хронічної токсичності за допомогою дафній показало, що з 9 вивчених джерел 6 мають воду хорошої якості, інші три слід оцінювати як непридатні для пиття.

**Загальна характеристика підземних вод.** Підземні води розташовуються в товщі земної кори до глибини приблизно 13-14 км, вони найчастіше бувають доброякісними, так як розташовуючись на глибині, вони менше схильні до забруднень різного походження. Підземні води діляться на ґрунтові і міжпластові. Ґрунтові води залягають в першому водотривкому шарі. Утворюються вони в результаті фільтрації через ґрунт і ґрунт атмосферних і поверхневих вод. Ця вода використовується більшістю населення в сільській місцевості та в невеликих містах. В цьому випадку треба враховувати, що в результаті фільтрації через ґрунт вода звільняється від органічних домішок і мікроорганізмів на глибині 6 і більше метрів. Найбільш якісними з гігієнічної точки зору є глибокі міжпластові води. Залягають вони в водопроникних породах нижче першого водотривкому шару, утворюючи кілька водоносних горизонтів, перекритих зверху і підстилаються знизу. Якість підземної води залежить від складу і характеру водоносних порід [167]. Похиле розташування водоносних шарів, обумовлює наявність гідростатичного тиску води, укладеної між водотривкими пластами, тому при виході на поверхню вода може підніматися вище поверхні землі, утворюючи фонтан (артезіанська вода).

Артезіанські свердловини (від назви французької провінції Артуа, де в 1726 році вперше було задокументовано фонтануючі свердловини) належать до джерел децентралізованого водопостачання. Артезіанські води - напірні підземні води, укладені в водоносних пластах гірських порід між водотривкими шарами. Вони залягають переважно в земних відкладеннях, що виникли задовго до появи людини, на глибині понад 50 м і утворюють артезіанські басейни [168].

Кожен артезіанський басейн містить води різного хімічного складу в залежності від умов їх формування:

- високомінералізовані, часто хлоридного типу, залягають в глибоких частинах басейну та - слабо, гідрокарбонатного типу, у верхніх шарах.

На території України виділяють три великі басейни артезіанських вод: Волинсько-Подільський, Дніпровсько-Донецький і Причорноморський. Прийнято вважати, що артезіанська вода чистіша будь-який інший води, проте

ця думка не завжди вірно. Артезіанська вода дійсно добре захищена від навколишнього забруднення, так як знаходиться глибоко під землею, але і її склад, на жаль, не завжди відповідає нормі [169].

За хімічним складом забруднень і домішок артезіанська вода - майже повна протилежність водопровідної. Для неї характерно:

- велика кількість механічних домішок - суспензій, що вимиваються з ґрунту
- висока мінералізація (високий вміст солей)
- високі концентрації заліза і марганцю, який часто супроводжує залозу
- солі жорсткості (карбонати кальцію і магнію), що перевищують гранично допустимі концентрації
- відсутність активного хлору
- нітрати, наслідок ненормованого застосування в сільському господарстві мінеральних добрив - один з найстрашніших забруднювачів, який може потрапляти в артезіанську свердловину при порушенні технічних умов її розробки і експлуатації
- мікроорганізми - як правило, слабо представлені, проте можуть зустрічатися більш оласние мікроорганізми, ніж у воді централізованого водопостачання.

У всьому світі вода артезіанських свердловин вважається багатством і стратегічним запасом країни і проходять строгий контроль з боку держави [170]. Відсутність суворого регулярного нагляду за бурінням свердловин в Україні призвело за останні роки до різкого погіршення її якості. Близько 32% проб питної води, відібраних з джерел децентралізованого водопостачання, не відповідають нормативам за санітарно-хімічними показниками та близько 23% - за бактеріологічними.

В Україні є регіони, де забруднення підземних вод має тотальний характер. Це, перш за все, Донецька, Луганська, Дніпропетровська області. Досить частими стали і випадки локального забруднення артезіанських водоносних горизонтів. Порушення технічних умов при бурінні свердловин призводить до можливості забруднення глибоких шарів свердловини менш чистими водами верхніх водоносних горизонтів [171]. У районах активного землеробства, де пестицидна

навантаження досить висока, артезіанську воду потрібно попередньо (а потім і періодично) перевіряти на вміст важких металів, пестицидів, радіонуклідів. Для поліпшення ситуації з артезіанською водою в Україні потрібно побороти злочинно недбале до неї ставлення. Розміщення водозабірних споруд, їх влаштування та утримання повинно бути регламентовано і контролюватися державою.

Ще один спосіб видобутку підземної води за допомогою колодязів був винайдений кілька століть назад. Фактично, колодязь - це вертикальна свердловина для добування ґрунтових вод, з укріпленими стінками і механізмом підйому води на поверхню - будь то відро на мотузці або механічний насос.

Головне призначення колодязя - забезпечувати людину чистою питною водою, необхідною в щоденному побуті. Щоб зберегти колодязну воду, колодязь повинен мати міцну кришку - захищає його від попадання всередину комах і дрібних тварин, атмосферних опадів, пилу та бруду [172].

Але навіть при правильному його використанні, вода з колодязя недосконала, причому її якість постійно погіршується з часом. В Україні понад 40 тисяч колодязів. Виходячи з аналізів, на сьогоднішній день в більш ніж 40% українських криниць вода не придатна для пиття і не відповідає елементарним санітарно-гігієнічним нормам [173].

Воді з колодязя властиві проблеми, характерні для води в більшості джерел водопостачання України, а саме - наявність солей, сполук заліза, марганцю, алюмінію, нітратів, амонію, органічних речовин природного походження і багатьох інших несумісних зі здоровим способом життя елементів [174].

Щоб отримувати з колодязя чисту і якісну воду, необхідно робити регулярний контроль її якості і необхідну в кожному конкретному випадку водоочистку.

### **3.3. Біотестування артезіанських вод з бюветів м.Києва**

Низька якість водопровідної води, внаслідок, наприклад, її хлорування, призводить до того, що все більше людей вважають за кращі альтернативні джерела питної води - води з артезіанських свердловин або бутильовані води,

яка в Україні на 90% являє собою оброблену з використанням різних технологій ту ж артезіанську воду. Однак після обробки артезіанська вода не завжди зберігає свої природні властивості.

В межах рівнинної території України виділяють три значних артезіанських басейнів; Волино-Подільський, Дніпровсько-Донецький і Причорноморський. Прісні артезіанські води в цих басейнах розповсюджені на глибині 200-500 м, головним чином у відкладеннях, які формувалися мільйони років тому юрському і крейдяному періодах мезазойської ери.

Гідрохімічні умови формування запасів артезіанської прісної води в київському регіоні почали вивчати в 90-х роках ХІХ століття, коли вирішувалося питання пошуку джерел централізованого водопостачання для м.Києва [174]. З цього часу починається використання артезіанської питної води, яка видобувається з сеноманського (глибина 90-195 м) і юрського (глибина 256-340 м) водоносних горизонтів. Тому ми провели комплексне біотестування підземних вод юрського і сеноманського горизонтів на прикладі проб, які відібрали в десяти бюветах м.Києва, розташованих в різних районах. Результати досліджень представлені в таблиці 3.3.1.

З десяти артезіанських бюветних вод тільки одна вода проявила гостру токсичність для прісноводної гідри і хронічну токсичність для ракоподібних і риб. За показником індексу загальної токсичності вона віднесена до категорії «небезпечна вода». Решта проби артезіанських вод не мали токсичності для використовуваних при біотестуванні тварин і ратіельності тест-організмів. Виняток становили артезіанські води з бивет по пр. Тимошенко (хронічна токсичність для *Cereodaphnia affinis* і на вул. Закревського (хронічна токсичність для *Hydra attenuate*). Але ця обставина не завадила по значенню індексу загальної токсичності віднести 90% проб артезіанських вод до категорії «безпечні води». За цим показником якість артезіанських вод з бюветів м.Києва вигідно відрізняється від водопровідної хлорованої води, яка в наших дослідженнях в тій чи іншій мірі надавала токсичну дію на тваринні і рослинні тест-організми в 100% водних зразків.

Результати біотестування артезіанських вод з бюветів м. Києва (2013 -  
2014 роки)

| Місцезнаходження бювету | Церіодафнія<br><i>Ceriodaphnia affinis</i> | Гідра<br><i>Hydra attenuate</i> | Риба<br><i>Poecilia reticulata</i> | Цибуля ріпчаста<br><i>Allium cepa</i> | Індекс загальної токсичності | Категорія якості води |
|-------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|-----------------------|
| Вул. Артема             | 0                                          | 10                              | 0                                  | 0                                     | 10                           | безпечна (0-40)       |
| Парк ім. Шевченко       | 0                                          | 10                              | 0                                  | 0                                     | 10                           | безпечна (0-40)       |
| Вул. Сабурова           | 10                                         | 0                               | 0                                  | 10                                    | 20                           | безпечна (0-40)       |
| Вул. Туполева           | 10                                         | 0                               | 0                                  | 10                                    | 20                           | безпечна (0-40)       |
| Вул. Бальзака           | 10                                         | 10                              | 0                                  | 0                                     | 20                           | безпечна (0-40)       |
| Вул. Приречная          | 20                                         | 0                               | 0                                  | 0                                     | 20                           | безпечна (0-40)       |
| Вул.Вербицького         | 10                                         | 10                              | 0                                  | 0                                     | 20                           | безпечна (0-40)       |
| Вул.Закревського        | 20                                         | 0                               | 10                                 | 0                                     | 30                           | безпечна (0-40)       |
| Пр.Тимошенко            | 0                                          | 10                              | 10                                 | 0                                     | 20                           | безпечна (0-40)       |
| Вул.Почайнинська        | 30                                         | 50                              | 20                                 | 0                                     | 100                          | небезпечна (41-120)   |
| Контрольна вода         | 0                                          | 0                               | 0                                  | 0                                     | 0                            | безпечна (0-40)       |



Що стосується особливостей хімічного складу артезіанських вод з бюветів м.Києва, то їх можна розділити на чотири групи:

- бювети, в яких вода добувається з Сеноманського горизонту і яка має мінералізацію менш 450 мг / дм<sup>3</sup>, вміст основних макроелементів в ній становить в мг / дм<sup>3</sup>: Ca <70, Mg 8-22, Na <25, K <12;

- бювети, в яких вода добувається з Юрського горизонту з мінералізацією 400-550 мг / дм<sup>3</sup>, вміст основних макроелементів в ній становить в мг / дм<sup>3</sup>: Ca 40-50, Mg 20-30, Na 38-45, K 12-15;

- бювети, в яких вода надходить з Юрського горизонту на масиві Вигурівщина-Троєщина з мінералізацією 700-800 мг/дм<sup>3</sup>, вміст основних макроелементів в ній становить в мг/дм<sup>3</sup>: Ca 30-80, Mg 13-25, Na 180-270, K 30-40;

- бювети, в яких вода надходить з двох горизонтів і змішується перед подачею споживачеві, ця вода має проміжний хімічний склад, який може змінюватися в залежності від співвідношення сеноманської і юрської вод.

Таким чином, в різних бюветах м.Києва вода має різний хімічний склад. Важливою характеристикою підземного джерела питної води є стабільність її хімічного складу. Цей показник вказує на ступінь захищеності від забруднень і вплив зони підживлення на якість води, а також дає можливість робити прогнози щодо стану джерела в майбутньому. У випадках, коли стабільність хімічного складу доведена, спрощується контроль за її якістю [164].

**Екогігієнічна оцінка фасованих негазованих вод.** Міжнародна асоціація бутильованої води (IBWA) дає наступне визначення бутильованої води: «Вода вважається бутильованою, якщо вона відповідає державним стандартам, гігієнічним вимогам до питної води, поміщена в гігієнічний контейнер і продається для вживання людиною. При цьому вона не повинна містити підсолоджувачів або складових штучного походження; ароматизатори, екстракти та есенції природного походження можуть бути додані до бутильованої води в кількості, яка не перевищує одного вагового відсотка; якщо ж вода містить

більший відсоток становлять, то вона відноситься до безалкогольних напоїв» [175].

**Проблеми якості питних фасованих вод.** Споживання природних питних вод, розфасованих в ємності, в останні роки стрімко збільшується. Хоча сумніви про реальну вигоду заміни традиційних джерел питної води на воду, розфасовану в ємності, висловлюються досі [176, 177]. Так, при порівнянні якості артезіанських і бутильованих питних вод методами біотестування, перші виявилися більш безпечними за типом токсичності, який характеризує життєдіяльність клітин організму (цитотоксичність) [178 -179]. Тому переконливим аргументом на користь бутильованої питної води, а саме води з оптимальним мінеральним складом, міг би послужити її комплексний аналіз за різними параметрами, в тому числі і біологічним, який доводить наявність у такої води властивостей, сприятливих для здоров'я людини. Проблема якості питних фасованих вод зв'язана безпосередньо з її хімічним складом, радіаційною безпекою, мікробіологічної обсемененністю.

Один з головних критеріїв оцінки якості вод, розфасованих в ємності, заснований на аналізі її хімічного складу. На відміну, наприклад, від Росії, де введені в дію санітарно-епідеміологічні правила і нормативи «Питна вода. Гігієнічні вимоги до якості води, розфасованої в ємності. Контроль якості. СанПіН 2.1.4.1116-02», в Україні відсутні нормативи і вимоги до бутильованим питних вод. Численні дослідження хімічного складу бутильованих вод в різних країнах світу показали перевищення концентрацій деяких речовин: неорганічних (кадмій, залізо, ртуть, нікель, цинк (Саудівська Аравія); мідь (Чилі); алюміній (Іспанія); алюміній, марганець, хром, нікель, миш'як, селен і свинець (Канада)) і органічних (бензол, хлороформ, діхлорметан (Канада); етанол, лімонен, пентан і тетрахлоретилен (США)) [178].

Дослідження якості 12 марок негазованих фасованих питних вод з торгової мережі України [179] виявили в трьох водах хімічні параметри, які не відповідають вимогам, що пред'являються до якості питної води згідно з міжнародними нормативами (ВООЗ, ЕРА США, ЄС). При цьому більшість фірм

виробників не призводять детальну інформацію про методи обробки вихідної води.

Отже, хімічний аналіз питних фасованих вод, які споживаються в різних країнах, доводить актуальність і важливість контролю вмісту у воді цілого ряду неорганічних і органічних речовин з метою попередження їх негативного впливу на здоров'я людини. Відхилення від міжнародних норм і стандартів за хімічним складом виявлені в бутильованих водах, які вироблені в високорозвинених країнах (США, Канада, Японія, Англія та ін.), де рівень контролю якості продукції вищий, ніж на Україні.

Дані про досліджувані води за даними виробника, які вказані на етикетках дуже різні. За даними знаходяться на етикетці практично неможливо зробити висновки якої вона якості. Слід констатувати, що немає єдиного, науково - обґрунтованого опису стандарту фасованих питних вод, який задовольняв задовільну якість фасованої води для споживача. Це дає можливість робити зловживання фальсифікацією при випуску фасованих питних вод. Практично немає ніяких гарантій виробника на якість фасованої питної води.

***Вплив пакувального матеріалу на якість фасованих питних вод.***  
Поліетилентерефталат (ПЕТ), завдяки своїм фізико-хімічним властивостям, зокрема міцності і прозорості, широко використовується в якості пакувального матеріалу для харчових продуктів, в тому числі і питної води. Наявні нормативи вимагають, щоб з пакувального матеріалу не мігрували речовини в кількостях, здатних викликати небажані зміни властивостей харчового продукту. З цією метою встановлені як загальні ліміти такої міграції, так і спеціальні ліміти для окремих речовин - похідних ПЕТ матеріалів. Відомо, наприклад, що поліетилентерефталат може зазнавати теплову деградацію, продуктом якої є ацетальдегід і фталати [178].

Концентрація ацетальдегіду в ПЕТ-пляшках становить 6,3 мг на 1 кг матеріалу, а величина вимивання в воду сягає 200 мкг / дм<sup>3</sup>. Підвищена температура води (40°C і вище) значно збільшує процес міграції ацетальдегіду.

Крім температури води на інтенсивність міграції карбонільних сполук з ПЕТ-тари впливають сонячне світло, тривалість і умови зберігання, концентрація і підвищений тиск вуглекислого газу і знижене значення рН. Для перевірки впливу температури на погіршення якості питної води пов'язаної з міграцією токсичних сполук з ПЕТ-тари нами проведені наступні дослідження. П'ять фасованих питних вод з категорії «безпечні води» (ІОТ = 0-40 у.о.) - «Моршинська», «Бонаква», «Каліпсо», «Ордана» та «Знаменівська» в заводській тарі помістили в шафу-термостат, де ці марки фасування вод разом з контрольною водою в скляній тарі зберігалися протягом трьох місяців при підвищеній температурі 40°C. Після 3-х місяців якість фасованих вод оцінювали комплексним біотестуванням за допомогою набору тваринних і рослинних тест-організмів (табл. 3.3.2).

Результати біотестування показали, що 3-х місячне зберігання фасованих питних вод при підвищеній температурі приводило до значного погіршення їх якості на 40-80% відповідно до величини індексу загальної токсичності, що відповідало категорії «небезпечні води». Контрольна вода в скляній тарі не змінила своїх біологічних властивостей. З огляду на той факт, що ПЕТ-тара була герметично закупорена, то підвищення токсичності питної води ми пов'язуємо з тепловою деградацією матеріалів тари і надходженням органічних токсичних речовин в воду.

Міграцію летких органічних речовин при деградації поліетилентерефталатових та поліетиленових бутілок, поліпропіленових кришок та етилвінілацетатних вкладок вимірювали в озонованих водах [172]. За цих умов у воду були виявлені бутанал, пентанал, гексанал, гептанал, октанал, нонанал, 2,2-диметил пропанал, 3-гексанон, 2-гексанон та гептанон. Концентрація цих речовин зростала із збільшенням тривалості експозиції з озоном.

Міграція хлориду вініла із полівінілхлоридних бутілок зростало прямо пропорційно тривалості зберігання розфасовки зі швидкістю 1 нг/дм<sup>3</sup> за добу [178].

Вплив підвищеної температури (40°C) при зберіганні на якість фасованих в  
ПЕТ-тару питних вод (2016-17рр.)

| Марка<br>фасованої<br>води             | <i>Cereo<br/>daphnia<br/>affinis</i> | <i>Hydra<br/>attenuate</i> | <i>Brachi<br/>danio<br/>rerio</i> | <i>Allium<br/>sepa</i> | Індекс<br>загальної<br>токсичності | Категорія<br>води      |
|----------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|------------------------|------------------------------------|------------------------|
| Контрольна<br>вода до<br>зберігання    | 0                                    | 0                          | 0                                 | 0                      | 0                                  | безпечна<br>(0-40)     |
| Контрольна<br>вода після<br>зберігання | 10                                   | 10                         | 0                                 | 0                      | 20                                 | безпечна<br>(0-40)     |
| Моршинська<br>до<br>зберігання         | 0                                    | 0                          | 0                                 | 0                      | 0                                  | безпечна<br>(0-40)     |
| Моршинська<br>після<br>зберігання      | 20                                   | 20                         | 0                                 | 10                     | 50                                 | небезпечна<br>(41-120) |
| Бонаква до<br>зберігання               | 10                                   | 0                          | 10                                | 15                     | 35                                 | безпечна<br>(0-40)     |
| Бонаква<br>після<br>зберігання         | 30                                   | 40                         | 20                                | 10                     | 100                                | небезпечна<br>(41-120) |
| Каліпсо до<br>зберігання               | 10                                   | 10                         | 0                                 | 15                     | 35                                 | безпечна<br>(0-40)     |
| Каліпсо<br>після<br>зберігання         | 30                                   | 30                         | 20                                | 20                     | 100                                | небезпечна<br>(41-120) |
| Ордана<br>до<br>зберігання             | 20                                   | 20                         | 0                                 | 0                      | 40                                 | безпечна<br>(0-40)     |
| Ордана після<br>зберігання             | 30                                   | 40                         | 30                                | 10                     | 110                                | небезпечна<br>(41-120) |
| Знаменівська<br>до<br>зберігання       | 10                                   | 20                         | 10                                | 0                      | 40                                 | безпечна<br>(0-40)     |
| Знаменівська<br>після<br>зберігання    | 40                                   | 50                         | 20                                | 20                     | 130                                | небезпечна<br>(41-120) |

Сумарна доза вживання цього мономера із питною водою може досягати навіть 100 нг на одну людину за добу, тоді як згідно нормативів максимальна добова доза хлориду вініла на людину не повинна перевищувати 25 нг.

Погіршення якості фасованих питних вод обумовлено змінами їх хімічного складу, мікробіологічним забрудненням, а також порушенням тривалості та умов зберігання, особливостями технологій водопідготовки, фальсифікацією продукції (невідповідність якості фасованої води даним на етикетці).

### **3.4. Дослідження якості фасованих негазованих питних вод з торгової мережі м. Києва**

На підставі багаторічних досліджень запропонована процедура комплексного біотестування питних вод розглядається нами як оптимальна і ефективна. Вона проводиться спільно з визначенням хімічного складу води фізико-хімічними методами і мікробіологічними аналізом, які дозволяють встановити ступінь ризику для здоров'я людини, яке споживає неякісну питну воду. Комплексна оцінка якості фасованих вод дозволяє об'єктивно оцінити їх можливу біологічну небезпеку і визначити води, які не є небезпечними для вживання у якості питної. Такі води повинні задовольняти вимоги, що пред'являються до питної води високої якості.

Мета даної роботи - проведення комплексного дослідження біологічними методами найбільш поширених в торговій мережі України фасованих негазованих питних вод із загальною мінералізацією  $<1 \text{ г / дм}^3$ . Нами представлені показники 17 марок фасованих негазованих вод з торгової мережі м Києва. Досліди з використанням тваринних і рослинних тест-організмів проведені протягом п'яти місяців з лютого по червень 2016 року, коли термін зберігання для всіх досліджуваних вод не перевищував рекомендованого фірмами-виробниками.

За узагальненими результатами біотестування на рослинних, безхребетних і хребетних тест-організмах досліджувані фасовані води можна умовно

розділити на 4 групи в залежності від значення ІЗТ – індекс загальної токсичності (табл. 3.4.1).

До першої групи - категорія "безпечні" питні води - відносяться марки вод, які мали величину індексу загальної токсичності в інтервалі від 0 до 40 умовних одиниць при застосуванні чотирьох біотестов У наших дослідженнях цих умов відповідали марки питних вод "Моршинська", "Ордана", "Бон аква", "Нірр", "Вода питна", "Знаменівська", "Каліпсо" та інші.

До другої групи - категорія "небезпечні" - відносяться питні води з значеннями індексу загальної токсичності в діапазоні від 41 до 120, наприклад, "Старий Миргород", "Сімейна",

До третьої групи - категорія "небезпечні" - відносяться питні води з індексом загальної токсичності від 121 до 200, в нашому випадку - "Прозора", "Софія Київська", а бутильована вода "Доктор" з значенням індексу загальної токсичності 210 у.о. представляє категорію вод «Дуже небезпечна». Дані води, згідно з результатами біотестування, при тривалому вживанні можуть становити високий ступінь ризику для здоров'я людини.

Що стосується характеристик біотестів, які включені в дослідну комплекс, то вони різняться по чутливості і видоспецифічності до токсичного впливу. За отриманими даними нижчі ракоподібні (церіодафнія і дафнія) є найбільш чутливими тест-організмами з батареї біотестів. Так за допомогою церіодафній гостра токсичність виявлена в чотирьох марках питних вод.

У той же час показниками хронічної токсичності відповідали чотири марки питних вод ("Вода питна", "Прозора", "Contrex" і "Vittel"). Особливістю біотеста з ракоподібними є чітка реакція на рівень мінералізації вод і, зокрема, на наявність кальцію. Така реакція біотестів пояснюється тим, що для життєдіяльності цих гідробіонтів необхідний кальцій для побудови зовнішнього скелета.

Завдяки своїй простоті і високій чутливості цей біотест відносять до одного з найбільш поширених методів біотестування в світовій практиці.

Таблиця 3.4.1

## Результати біотестування питних фасованих вод (2016 р.).

| Марка фасованої води | <i>Cereo daphnia affinis</i> | <i>Hydra attenuate</i> | <i>Brachi danio rerio</i> | <i>Allium cepa</i> | Індекс загальної токсичності | Категорія води            |
|----------------------|------------------------------|------------------------|---------------------------|--------------------|------------------------------|---------------------------|
| Моршинська           | 0                            | 0                      | 0                         | 0                  | 0                            | безпечна (0-40)           |
| SPA                  | 10                           | 10                     | 0                         | 0                  | 20                           | безпечна (0-40)           |
| Бон аква             | 10                           | 0                      | 0                         | 10                 | 20                           | безпечна (0-40)           |
| Ордана               | 10                           | 10                     | 0                         | 0                  | 20                           | безпечна (0-40)           |
| Hipp                 | 0                            | 10                     | 10                        | 10                 | 30                           | безпечна (0-40)           |
| Bebivita             | 10                           | 0                      | 0                         | 20                 | 30                           | безпечна (0-40)           |
| Humana               | 10                           | 20                     | 0                         | 0                  | 30                           | безпечна (0-40)           |
| Contrex              | 20                           | 0                      | 10                        | 0                  | 30                           | безпечна (0-40)           |
| Вода питна           | 20                           | 10                     | 0                         | 0                  | 30                           | безпечна (0-40)           |
| Знаменівська         | 10                           | 20                     | 0                         | 0                  | 30                           | безпечна (0-40)           |
| Каліпсо              | 10                           | 10                     | 0                         | 15                 | 35                           | безпечна (0-40)           |
| Vittel               | 20                           | 10                     | 0                         | 5                  | 35                           | безпечна (0-40)           |
| Старий Миргород      | 40                           | 20                     | 10                        | 0                  | 70                           | небезпечна (41-120)       |
| Семейная             | 50                           | 40                     | 10                        | 0                  | 100                          | небезпечна (41-120)       |
| Прозора              | 50                           | 70                     | 20                        | 20                 | 160                          | небезпечна (121-200)      |
| Софія Київська       | 80                           | 80                     | 20                        | 20                 | 200                          | небезпечна (121-200)      |
| Доктор               | 100                          | 100                    | 30                        | 10                 | 240                          | дуже небезпечна (201-400) |

Він включений в міжнародні стандарти, використовується як національний норматив, а також часто включається в набори тест-організмів для оцінки токсичності проб вод. Розшифровка ролі багатьох генів цього прісноводного рачка дасть ключ до розуміння унікальної екологічної функції дафній [179, 180].



Інший представник безхребетних тварин – гідра, також має високу чутливість до токсичного впливу, наприклад до органічних забруднювачів вод. Незважаючи на те, що біотест з гідрами є менш поширеним, ніж дафнієвий тест, все ж він має деякі переваги. Він об'єктивно демонструє диференційовану реакцію тест-організму на несприятливі фактори водного середовища за допомогою ряду різних морфологічних змін. У комплексному біотестуванні за допомогою гідр можна визначати як гостру ( "Прозора", "Софія Київська" і "Доктор"), так і хронічну токсичність ("Старий Миргород", "Сімейна") питних фасованих вод.

Представники хребетних водних тварин в наборі біотестів представлені рибами (*Даніо реріо*). Риби як тест-організми необхідні для контролю випадків з гострою токсичністю (в наших дослідженнях фасованої питної води такі випадки не спостерігалися). Не дивлячись на те, що риба менш чутливий тест-організм, вона також як дафнія і цереодафнія включена в міжнародний і національний стандарти, і в багатьох країнах широко використовується в комплексі біотестов для оцінки якості вод. Риба може використовуватися при біотестуванні вод в якості джерела клітинного матеріалу для цитотоксичних і генотоксичних досліджень [181].

Представником рослин в наборі біотестов є ріпчаста цибуля. Оскільки інші тест-організми ставляться до тварин, він допомагає оцінити різноманітність ефектів і специфічність речовин, що забруднюють водне середовище. Наприклад, при проростанні ріпчастої цибулі в воді, що містить підвищені концентрації азотистих речовин, спостерігається підвищення макроскопічних показників (довжина і маса корінців) в порівнянні з контрольними показниками. Біотест детально розроблений, тому широко використовується в міжнародних дослідженнях токсичності забруднених вод як на організмовому, так і на клітинному рівнях. В експериментах з фасованої питної водою у чотирьох марок ("Каліпсо", "Знаменівська", "Hipp" і "Bebivita") зареєстровано достовірне максимальне відхилення від контрольних значень (20%).

Контролювали також показники мікробної безпеки питної води, в тому числі кількість гетеротрофних бактерій, відповідно до вимог для фасованої питної води (табл. 3.4.2). Дані аналізу мікробіологічної безпеки фасованих питних вод підтвердили результати комплексного біотестування. Так, все води, що відносяться до категорій "небезпечна" і "дуже небезпечна", в тій чи іншій мірі містили підвищену кількість мікроорганізмів в одиниці об'єму.

Таблиця 3.4.2

Показники мікробного обсіменіння фасованих питних вод різних виробників

| Марка фасованої води | Число кишков. бактерій в 1 дм <sup>3</sup> | Число гетеротрофних бактерій в 1 см <sup>3</sup> при 37° С, 1 добу | Число гетеротрофних бактерій в 1 см <sup>3</sup> при 37° С, 2 доби | Число гетеротрофних бактерій в 1 см <sup>3</sup> при 22°С, 3 доби | Кількість дріжджів і мікроміцетів в 100 см <sup>3</sup> води |
|----------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Моршинська           | <3                                         | 0                                                                  | 0                                                                  | 40                                                                | 0                                                            |
| SPA                  | <3                                         | 0                                                                  | 0                                                                  | 0                                                                 | 2                                                            |
| Humana               | <3                                         | 0                                                                  | 0                                                                  | 10                                                                | 0                                                            |
| Ордана               | <3                                         | 0                                                                  | 0                                                                  | 2                                                                 | 0                                                            |
| Бон аква             | <3                                         | 0                                                                  | 0                                                                  | 0                                                                 | 0                                                            |
| Bebivita             | <3                                         | 0                                                                  | 0                                                                  | 0                                                                 | 2                                                            |
| Hipp                 | <3                                         | 0                                                                  | 0                                                                  | 0                                                                 | 0                                                            |
| Contrex              | <3                                         | 2                                                                  | 320                                                                | 30                                                                | 5                                                            |
| Вода питна           | <3                                         | 0                                                                  | 0                                                                  | 100                                                               | 0                                                            |
| Знаменівська         | <3                                         | 0                                                                  | 0                                                                  | 100                                                               | 0                                                            |
| Каліпсо              | <3                                         | 0                                                                  | 0                                                                  | 400                                                               | 1                                                            |
| Vittel               | <3                                         | 1                                                                  | 1                                                                  | 0                                                                 | 1                                                            |
| Старый Миргород      | <3                                         | 0                                                                  | 0                                                                  | 1000                                                              | 2                                                            |
| Семейная             | <3                                         | 2                                                                  | 2                                                                  | 200                                                               | 0                                                            |
| Прозора              | <3                                         | 0                                                                  | 0                                                                  | 36                                                                | 3                                                            |
| Софія Київська       | <3                                         | 0                                                                  | 4                                                                  | 35                                                                | 1                                                            |
| Доктор               | <3                                         | 0                                                                  | 2000                                                               | 0                                                                 | 0                                                            |

При вивченні хімічного складу і властивостей фасованих вод були визначені 45 показників, які необхідні для оцінки якості питної води відповідно до вітчизняними нормативними документами [182-184] і вимогами ЄС [185], - органолептичні, узагальнені (рН, мінералізація, загальний органічний вуглець,

перманганатная окислюваність, аніонні поверхнево-активні сполуки та ін.), макро- і мікрокомпоненти неорганічної природи, летючі органічні сполуки. З отриманих даних видно, що органолептичні властивості всіх досліджених марок води (запах, кольоровість, каламутність) практично однакові і відповідають гігієнічним нормативам [184]. У той же час концентрація основних катіонів та аніонів у водах значно різниться. При цьому величина рН змінюється в інтервалі 5,8 - 8,4, мінералізація - 33 - 2143 мг / дм<sup>3</sup>, жорсткість - (0,1 - 31,8) мг-екв / дм<sup>3</sup>, лужність - (0,5 - 6,7) мг-екв / дм<sup>3</sup>. Концентрація амонію становила (<0,05 - 1,3) мг / дм<sup>3</sup>, калію - (<0,1 - 12), кальцію - (1,6 - 536) мг / дм<sup>3</sup>, магнію - (<1 - 60), натрію - (0,9 - 240) мг / дм<sup>3</sup>, стронцію - (<0,1 - 7,3) мг / дм<sup>3</sup>, кремнієвої кислоти - (5,6 - 55,8) мг / дм<sup>3</sup>, нітратів - (<0,5 - 8,5) мг / дм<sup>3</sup>, хлоридів - (<0,7 - 248) мг / дм<sup>3</sup>, сульфатів - (<4 - 1102) мг / дм<sup>3</sup> і фторидів - (<0,02 - 1,47) мг / дм<sup>3</sup>.

Для досліджених зразків фасованих питних вод характерний низький вміст загального органічного вуглецю в інтервалі 0,08-1,0 мг / дм<sup>3</sup>, важких металів - <0,1 ГДК, а також мікробіологічна безпека; виняток становлять води "Сімейна", "Старий Миргород" і "Доктор", в яких кількість гетеротрофних бактерій в одиниці об'єму перевищує гігієнічний норматив в 2, 10 і 20 раз, відповідно. У зразку води "Знаменівська" виявлені слідові кількості срібла (консервант) на рівні 0,004 мг / дм<sup>3</sup>, що в 10 разів нижче ГДК. Найбільший вміст натрію виявлено у водах "Старий Миргород", "Знаменівська", "Сімейна", в останній ГДК перевищено в 1,2 раз; у порівнянні з іншими фасованими водами концентрація натрію вища в 10 - 100 раз.

Слід зазначити, що в ряді зразків фасованої води загальна мінералізація, жорсткість, вміст магнію і фтору були нижчими від встановлених гігієнічних нормативів фізіологічно повноцінною питної води. Так, в марках вод "Вода питна" і "SPA" мінералізація становить <100 мг / дм<sup>3</sup>; в воді "Старий Миргород", "Вода питна", "Знаменівська", "Моршинська", "SPA" жорсткість - <1,5 мг-екв / дм<sup>3</sup>; в водах "Старий Миргород", "Вода питна", "Знаменівська", "Моршинська", "SPA", "Bebivita", "Humana" концентрація магнію - <10 мг / дм<sup>3</sup>; в водах "Ордана", "Старий Миргород", "Знаменівська", "Доктор", "Каліпсо", "Софія

Київська" вміст фторидів відповідає або близько до гігієнічним нормативам (0,7-1,5 мг / дм<sup>3</sup>), інші фасовані води містять фториди на рівні <0,2 мг / дм<sup>3</sup>.

Опрацьована група фасованих вод включає також воду для дитячого харчування ("Humana", "Hipp", "SPA", "Bebivita"), лікувально-столову мінеральну воду з підвищеним вмістом кремнію "Знаменівська", природну мінеральну воду "Contrex", в якій мінералізація 2000мг / дм<sup>3</sup> і вміст кальцію 536 мг / дм<sup>3</sup>, перевищують гігієнічні нормативи для питної води, а вміст стронцію знаходиться на рівні ГДК, що в 10-30 разів більше, ніж в інших зразках фасованих вод.

Досліджені в 2016 р. хімічні склади вод "Ордана", "Софія Київська", "Старий Міргород", "Моршинська", "Vittel" практично такі ж як і в 2015 р., але для вод "Бон аква" і "Hipp" виявлено значне розходження в показниках мінералізації, жорсткості, лужності, концентрації натрію, кремнію, фторидів і ін.

Зіставлення даних біотестов і хімічних аналізів досліджуваних бутильованих вод показало, що результати біотестування не можуть бути однозначно інтерпретовані на підставі наявних даних мікробіологічного і хімічного аналізів (45 показників). Наприклад, в категорію "безпечні" потрапляють питні води, в яких ряд показників не відповідають гігієнічним нормативам для питної води, в той же час категорія "небезпечні" і "дуже небезпечні" присвоєна водам, що відповідають гігієнічним нормативам і не містить токсичних елементів. Ми припустили, що питні води категорії "дуже небезпечна" містять консерванти, не зазначені на етикетці, що і підтвердили додаткові дослідження. Це ще раз показує важливість біотестування - як необхідного етапу при оцінці якості питної води.

Таким чином, схема комплексної оцінки якості питних вод з використанням набору рослинних і тваринних тест-організмів забезпечує об'єктивну і всебічну характеристику токсичності (гострої і хронічної), яка може бути викликана забрудненням джерела водокористування, недоліками застосовуваних технологій водопідготовки, наявністю у воді ксенобіотиків, впливом тари, умовами зберігання та ін.

Порівняння фасованих вод, що виробляються українськими і зарубіжними фірмами, а також вод, призначених для приготування дитячого харчування, не виявило між ними, згідно з результатами біотестування, істотних відмінностей. Отже, токсичні властивості досліджуваних вод не залежить від умов їх виробництва, що застосовуються всередині країни або за кордоном, а також від підвищених вимог, пропонованих до продуктів дитячого харчування.

Питна вода марки «Моршинська» за результатами комплексного біотестування отримала найкращі показники якості - відсутність смертності у тест-організмів. Дані про фасованої питної води «Моршинська»: згідно з етикеткою на пляшках - негазована мінеральна природна столова вода, розлита з джерела «Моршинський», місто Моршин, Львівської обл., Україна. Гідрокарбонатна, сульфато-гідрокарбонатна різного катіонного складу. Для щоденного вживання. Термін зберігання - 1 рік в темному місці при температурі від 5 до 20°C. Проведений хімічний аналіз складу даної питної води показав повну відповідність даним наведеним етикетці виробника (табл. 3.4.3).

Аналіз хімічного складу досліджуваної води доводить, що Моршинське джерело - один з небагатьох в світі джерел чистої природної води, яка має ідеально збалансований для людського організму мінеральний склад.

Результати оцінки якості питних фасованих вод методами біотестування показали, що води, вироблені за затвердженими нормативами і токсикологічних безпечні за даними хімічного аналізу, можуть мати шкідливий, негативний вплив на тваринні і рослинні тест-організми.

Отже, застосування методів аналітичної хімії, мікробіології та радіології, включених до національних стандартів та нормативи, недостатньо для визначення біологічних властивостей досліджуваної води. Об'єктивна оцінка якості води вимагає використання, поряд зі стандартними підходами, і методів біотестування.

## Хімічний склад фасованої питної води марки «Моршинська»

| хімічний показник      | Дані з етикетки на пляшці | Дані, отримані аналітичними методами |
|------------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| Загальна мінералізація | 0,1-0,3 г/дм <sup>3</sup> | 0,15 г/дм <sup>3</sup>               |
| гідрокарбонати         | 50-150 мг/дм <sup>3</sup> | 85 мг/дм <sup>3</sup>                |
| Сульфати               | <100 мг/дм <sup>3</sup>   | 10 мг/дм <sup>3</sup>                |
| Хлориди                | < 25 мг/дм <sup>3</sup>   | 5 мг/дм <sup>3</sup>                 |
| Натрій + калій         | < 50 мг/дм <sup>3</sup>   | 10,5 мг/дм <sup>3</sup>              |
| Кальцій                | 5-50 мг/дм <sup>3</sup>   | 19,6 мг/дм <sup>3</sup>              |
| Магній                 | < 25 мг/дм <sup>3</sup>   | 4,8 мг/дм <sup>3</sup>               |

Проведені дослідження показали, що біотестування із застосуванням набору тест-організмів є ефективним підходом для інтегральної оцінки якості питних вод. Біотести виявляють токсичні властивості водного середовища, диференціюють різні марки фасованих вод відповідно до можливим ризиком для здоров'я людини.

Комплексний підхід до оцінки якості питних негазованих вод дає об'єктивну, достовірну характеристику хімічного складу та мікробіологічної обсіменіння досліджуваних марок вод, але найбільш важливим компонентом інтегральної оцінки якості вод є результати біотестування, що характеризують біологічні властивості питної води і можливу ступінь ризику для здоров'я її споживачів. Виходячи з цього, можна зробити висновок, що методи біотестування повинні обов'язково застосовуватися для нормування якості питних вод, в тому числі і фасованих.

Отримані дані про біологічні властивості 17 марок фасованих негазованих питних вод з торгової мережі м.Києва вказують на їх різну якість. Так, тільки в одній марці питних вод з категорії "безпечна" - "Моршинської" не з'являлися загибелі тест-організмів; до категорії "небезпечні" ми віднесли 2

марки з досліджуваних бутильованих питних вод, до IV-го класу категорією 6, характеризується погана (брудні) і V клас категорією 7 — дуже погана (дуже брудна) - 3 марки різних фірм виробників, тобто фактично 1/4 усіх досліджуваних фасованих питних вод в тій чи іншій мірі можуть бути небезпечними для здоров'я людини при тривалому вживанні.

### **Висновки до роділу 3**

Результати комплексного біотестування поверхневих та питних вод різного походження дозволили зробити наступні висновки:

*Поверхневі води* - джерела водопровідної води м.Києва річки Дніпро і Десна, не виявляли токсичного впливу на тваринні і рослинні тест-організми (райони м Вишгорода і с. Хояновка - відповідно до величини індексу загальної токсичності «безпечні води»), в межах м.Києва та с. Бортничі спостерігалось погіршення якості водного середовища (до «небезпечні води»), що пояснюється негативним впливом мегаполісу на водний об'єкт.

*Хлорування природної води* призводить до різкого погіршення її якості за рахунок появи хлорорганічних сполук, зокрема хлорфенолів. Вода з системи централізованого водопостачання населення м. Києва не відповідає якості питної та вимагає подальшої доочистки.

*Якість різних марок бутильованої питних негазованих вод* варіює згідно ІЗТ (індекс загальної токсичності) від категорії «безпечні води» до «дуже небезпечні води». За результатами біотестування кращі показники мала питна вода марки «Моршинська».

Результати біотестування показали, що трьох місячне зберігання фасованих питних вод при підвищеній температурі (40°C) приводило до значного погіршення їх якості - на 40-80% зростала величина індексу загальної токсичності, що відповідало категорії «небезпечні води». Контрольна вода в скляній тарі не змінила своїх біологічних властивостей. З огляду на той факт, що ПЕТ-тара була герметично закупорена, то підвищення токсичності питної води

ми пов'язуємо з теплової деградацією матеріалів тари і надходженням органічних токсичних речовин в воду.

*З десяти артезіанських бюветних вод* тільки одна вода проявила гостру токсичність для прісноводної гідри і хронічну токсичність для ракоподібних і риб. За показником індексу загальної токсичності вона віднесена до категорії «небезпечна вода» Решта проби артезіанських вод не мали токсичність для використовуваних при біотестування тваринних і рослинних тест-організмів, що дозволило віднести їх до категорії «безпечні води».

Основні результати досліджень опубліковано у наукових працях Верголяс М.Р. [3, 4, 6, 9, 11, 15, 17, 19].



## РОЗДІЛ 4. ТОКСИКОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАБРУДНЕННЯ ВОДИ НА ГІДРОБІОНТАХ

### 4. 1 Визначення токсичності водного середовища з використанням цитогенетичних параметрів крові у гідробіонтів

Результати дослідження впливу зразків вод, що містяться нітратів на еритроцити крові, а також тканини риб (зябра і хвостовий плавець), наведено в Таблиці 4.1.1

Таблиця 4.1.1

Генотоксичний вплив досліджуваних вод на різні тканини риб *Danio rerio* (L.)  
після експозиції (96 год).

| Тип клітин                                                                                                                     | Вид ядерних аномалій | Зразки досліджуваних вод |                                                            |                                                             |                                                             |                                                             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                |                      | Контроль<br>‰            | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup><br>5мг/дм <sup>3</sup> ,<br>‰ | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup><br>10мг/дм <sup>3</sup> ,<br>‰ | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup><br>20мг/дм <sup>3</sup> ,<br>‰ | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup><br>45мг/дм <sup>3</sup> ,<br>‰ |
| Еритроцити                                                                                                                     | мЯ                   | 0                        | 0                                                          | 0,33                                                        | 0,66                                                        | 2,33                                                        |
|                                                                                                                                | 2N                   | 0                        | 0                                                          | 1                                                           | 0,99                                                        | 4                                                           |
| клітини зябер                                                                                                                  | мЯ                   | 0                        | 0                                                          | 0                                                           | 0,66                                                        | 2,33                                                        |
|                                                                                                                                | 2N                   | 0                        | 0,33                                                       | 0,33                                                        | 0,66                                                        | 3,66                                                        |
| Клітини хвостового плавця                                                                                                      | мЯ                   | 0                        | 0                                                          | 0                                                           | 0,66                                                        | 1,99                                                        |
|                                                                                                                                | 2N                   | 0                        | 0                                                          | 0,33                                                        | 0,33                                                        | 3,66                                                        |
| Кількість тест-організмів, що вижили в, %                                                                                      |                      | 100                      | 100                                                        | 80                                                          | 50                                                          | 30                                                          |
| Примітка: г - кількість клітин з порушенням мітозу на 3000 клітин; МЯ - клітини з мікроядра; 2Я - клітини з подвійними ядрами. |                      |                          |                                                            |                                                             |                                                             |                                                             |

У зразках вод забрудненими нітратами в концентрації 20 мг/дм<sup>3</sup> смертність тест-організмів досягала 50 % і в концентрації 10 мг/дм<sup>3</sup> - 20 %, відповідно. У всіх тканинах загальний рівень клітин з порушеннями мітозу достовірно зростав (р < 0,05) при дії трьох концентрацій нітратів 10 мг/дм<sup>3</sup>, 20 мг/дм<sup>3</sup> та 45 мг/дм<sup>3</sup> від

0,33 ‰ до 4 ‰ у порівнянні з контролем, даний ріст носив дозозалежний характер (табл. 4.1.2).

Таблиця 4.1.2

Зміна складу формених елементів крові *Danio rerio* (L.), після експозиції (96 год)

в досліджуваних зразках води

| Тип клітин                                            | Лімфо-<br>цити |      | Моно-<br>цити |     | С/я<br>нейтро-<br>філи |     | П/я<br>нейтро-<br>філи |     | Базофіли |     | Еозино-<br>філи |     | Σ<br>клетки |
|-------------------------------------------------------|----------------|------|---------------|-----|------------------------|-----|------------------------|-----|----------|-----|-----------------|-----|-------------|
|                                                       |                |      |               |     |                        |     |                        |     |          |     |                 |     |             |
| Зразки<br>досліджува-<br>них вод                      | N              | %    | n             | %   | n                      | %   | n                      | %   | n        | %   | N               | %   |             |
| Контроль                                              | 221            | 88,4 | 9             | 3,6 | 12                     | 4,8 | 4                      | 1,6 | 3        | 1,2 | 1               | 0,4 | 250         |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup><br>5 мг/дм <sup>3</sup>  | 219            | 86,7 | 10            | 4   | 13                     | 5,2 | 4                      | 1,6 | 2        | 0,8 | 2               | 0,8 | 250         |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup><br>10 мг/дм <sup>3</sup> | 213            | 85,2 | 10            | 4   | 13                     | 5,2 | 4                      | 1,6 | 6        | 2,4 | 4               | 1,6 | 250         |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup><br>20 мг/дм <sup>3</sup> | 202            | 80,8 | 18            | 7,2 | 12                     | 4,8 | 6                      | 2,4 | 7        | 2,8 | 5               | 2   | 250         |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup><br>45 мг/дм <sup>3</sup> | 171            | 68,4 | 23            | 9,2 | 14                     | 5,6 | 6                      | 2,4 | 19       | 7,6 | 17              | 6,8 | 250         |
| Примітка: С/я – сегментоядерні; П/я – паличкоядерні.  |                |      |               |     |                        |     |                        |     |          |     |                 |     |             |

В результаті проведеного експеримента, при дослідженні зразків води, що містили нітрати, на клітини риб *Danio rerio* (L.) за показниками формених елементів периферичної крові, цитотоксичний ефект проявляли зразки води з концентраціями 10 мг/дм<sup>3</sup>, 20 мг/дм<sup>3</sup> та 45 мг/дм<sup>3</sup> в порівнянні з результатами контрольної води. Збільшення кількості еозинофілів, базофілів, моноцитів і зменшення кількості лімфоцитів в зразках води вказує на прояв цитотоксичного ефекту. Зменшення кількісної частки лімфоцитів від 88,4% в контролі до 68,4% у воді містяться нітрати, відбувалося за рахунок збільшення моноцитів, базофілів і еозинофілів. Таке співвідношення лейкоцитів в крові говорить про те, що в

організмі відбувається запальний процес (отруєння). Отримані дані в пробі води з нітратами 5 мг/дм<sup>3</sup> наближалися до показників контрольної води.

Зроблено висновки: Показано, що при токсичному впливі нітратів на організм риб *Danio rerio* (L.) відбуваються зміни у складі крові. А саме, спостерігалось збільшення відсотка сегментоядерних нейтрофілів, еозинофілів, базофілів, моноцитів і зменшення відсотка лімфоцитів. Відзначено, що ступінь вираженості даних змін залежить від величини токсичного впливу нітратів.

Досліджено вплив проби води, що містить нітрати на показники структурної цілісності ядра різних тканин риб. Структурні і кількісні зміни ядер спостерігалися вже при концентрації нітратів 10 мг/дм<sup>3</sup>. Зміна компонентів клітинного ядра, які є носіями генетичної інформації, призводить до мутацій клітин. Це може привести до помилкової діагностики того або іншого захворювання. Використання цих методів, дає можливість визначення цитотоксичності і генотоксичності водних зразків.

Нітрати характеризуються досить широким спектром токсичної дії. Токсична дія нітратів полягає в тому, що, в травному тракті вони частково відновлюються до нітритів (більш токсичних), останні, при надходженні в кров можуть викликати метгемоглобінемію. Метгемоглобінемія - присутність в крові метгемоглобіну - продукту окислення гемоглобіну отрутами нітратів, нітритів. Під впливом деяких видів шлункових мікроорганізмів нітрати відновлюються до нітритів, які блокують утворення гемоглобіну тим, що, відновлюючись, переводять залізо з двовалентного в тривалентне [186].

ГДК нітратів у воді згідно з СанПіН 2.1.4.1175-02 «Гігієнічні вимоги до якості води нецентралізованого водопостачання. Санітарна охорона джерел» становить 45 мг/дм<sup>3</sup> [187]. Наші дослідження показали, що вміст нітратів у воді вище 5 мг/дм<sup>3</sup> негативно впливає на організм риби і її клітини [188].

Досліджені зразки вод, які отримані після очистки від нітратів з використанням цитогенетичних підходів, та з'ясовано принцип їх впливу на тест-організм (риби). а також на їх клітини крові – структурні і функціональні зміни генома (гено- та цитотоксичність). А саме, було показано зміни у

лейкоцитарної формули крові риб *Даніо реріо* та генетичні зміни за мікроядерним тестом на клітинах крові – еритроцитів. Використання цих методів дає можливість визначення цитотоксичності та генотоксичності водного зразка на клітинному рівні.

Результати дослідження впливу зразків вод до і після очистки від нітратів на еритроцити крові та результати дослідження лейкоцитарної крові риб відображено в Таблицях 4.1.1 та 4.1.2.

Зразок води до очищення від нітратів негативно впливає на організм риби та її клітини. Спостерігалася у лейкоцитарної формули крові зменшення лімфоцитів за рахунок підвищення кількості лейкоцитів. Виявили аномалії ядер в еритроцитах, зустрічались мікроядра та подвійні ядра в крові досліджуваних риб. Спостерігали порушення процесів життєдіяльності у хребетних тварин (риби), відбувалася 30 % загибель тест-організмів. На клітинному рівні спостерігались морфофункціональні зміни клітин крові та відхилення у лейкоцитарній формулі крові риб.

Для визначення токсичності водного зразка до і після очистки води від нітратів запропоновано використання лейкоцитарної формули крові риб як біомаркера. Визначення набору формених елементів крові: паличкоядерні нейтрофіли, сегментоядерні нейтрофіли, еозинофіли, базофіли, моноцити, лімфоцити у досліджуваних риб, які перебували у контрольних та токсичних (до очистки від нітратів) водних зразках, дозволяє одержати більш повну картину впливу нітратів на тест-організм, на клітинному рівні. Це, в свою чергу, підвищує чутливість та інформативність методу, щодо оцінки цитотоксичності водного середовища. При токсичних впливах нітратів на організм риб відбуваються порушення структурної цілісності ядра еритроцитів. Відмічено, що ступінь вираженості даних змін залежить від токсичного впливу нітратів. Показано перспективність використання даного методу для вивчення генотоксичних властивостей проб води [191]. Отже, у результаті проведених досліджень було встановлено, що клітинні біомаркери визначення формули крові та мікроядерний тест, додатково до стандартизованих методів, можуть

бути використані для об'єктивної та всебічної оцінки токсичності забруднюючих речовин. Також часто спостерігались поліморфноядерні клітини. Отримані дані в зразках води після очистки від нітратів були на рівні контролю.

Через частоту еритроцитів з подвійними ядрами і мікроядрами в периферичній крові риб *Danio rerio* (L.), генотоксичний ефект проявила вода до очистки від нітратів. У пробі після очистки від нітратів генотоксичний ефект не спостерігався у порівнянні з даними контрольної води.

#### **4. 2. Дослідження дії іонів важких металів на динаміку росту молоді риб, личинок амфібій та вплив на клітини крові риби і жаби**

Під час експерименту було отримано дані залежно від концентрацій досліджуваних токсикантів. В експериментах з  $\text{Cu}^{2+}$ , ріст маси тіла молоді гуппі майже не супроводжувався різкими коливаннями. Проте при порівнянні цих даних з динамікою зміни значення питомої швидкості росту молоді риб в акваріумах з різною концентрацією іонів виявилось, що коливання, не помітні з даних щодо зміни маси тіла, чітко виражені в динаміці питомої швидкості росту. А саме, значення питомої швидкості росту в акваріумах з найбільшою концентрацією  $\text{Cu}^{2+}$  з часом поступово знижувалися, що свідчить про наявність токсичного ефекту. У акваріумах з найменшою концентрацією токсиканта та в контролі спостерігали коливання значень показника питомої швидкості росту. При наявності в акваріумах  $\text{Cu}^{2+}$  в різних концентраціях, істотних змін маси тіла риб не спостерігали. В акваріумах з найбільшою концентрацією значення цього показника постійно знижується, а за найменшої концентрації  $\text{Cu}^{2+}$  та в контролі значення питомої швидкості росту різко зростає. Питома швидкість росту пуголовок в акваріумах з найбільшою концентрацією  $\text{Cu}^{2+}$  схожа з попередніми результатами в експериментах з рибами. Значення цього показника постійно знижується, а в акваріумах з найменшою концентрацією та в контролі питома швидкість росту швидко зростає.

Висновки. В обох експериментах з молоддю гуппі та пуголовками жаб за дії  $\text{Cu}^{2+}$  значення показника ефективності використання раціону було

найбільшим у контролі і знижувалося зі зростанням концентрації іонів важких металів в акваріумах. Крім того, пуголовки жаб виявились чутливішими до забруднення води, ніж молодь риб. Оскільки в однакових умовах за дії найбільших концентрацій іонів  $\text{Cu}^{2+}$  спостерігалися зниження значень досліджуваних показників у пуголовок жаб відразу після внесення токсиканту до модельної системи, на відміну від повільнішої реакції в молоді гупі.

Різниця в чутливості досліджуваних об'єктів до іонів важких металів зумовлена фізіолого-біохімічними особливостями досліджуваних об'єктів. Встановлено істотний вплив важких металів, що можна визначити, за зміною питомої швидкості росту та ефективністю використання раціону. При екстраполяції результатів експерименту на природні екосистеми можна передбачати результати токсичного забруднення водного середовища іонами важких металів [189, 190].

Проведено біотестування і цитологічний аналіз досліджуваних проб вод які містять важкі метали: свинець (Pb) 0,03 мг / дм<sup>3</sup>, заліза (Fe) 0,3 мг / дм<sup>3</sup> і марганець (Mn) 0,1 мг / дм<sup>3</sup>. Результати дослідження впливу важких металів на організми гідробіонтів, відображено в табл. 4.2.1. Вказані дані загальної токсичності (виживання) гідробіонтів.

Таблиця 4.2.1

Токсичний вплив досліджуваних водних зразків на тест-організми (експозиція 96 год для риб і 192 год для жаб).

| Тест-організми | №1 контроль, % | №2 свинець 0,03мг/л, % | №3 залізо 0,3мг/л, % | №4 марганець 0,1мг/л, % |
|----------------|----------------|------------------------|----------------------|-------------------------|
| гідра          | 100            | 40*                    | 40*                  | 50*                     |
| дафнія         | 100            | 40*                    | 50*                  | 50*                     |
| риби           | 100            | 60                     | 90                   | 80                      |
| жаби           | 100            | 100                    | 100                  | 100                     |

Примітка: \*  $p < 0,05$  у порівнянні з контрольною групою

У всіх зразках вод, що містять важкі метали, спостерігалася загибель тест-організмів. Виживання гідр - в зразки вод №2 и №3 становило 40%, а в №4 50%.

Організмі дафнії в зразки №2 вижили 40%, а у зразках №3 и №4 вижили 50%, відповідно. Риби - в №2 вижили 60%, №3 90% и №4 80%. Тільки тест-організми жабі вижили 100% у всіх зразки вод, но загальне фізіологічний стан у них погіршилося.

Еритроцити крові риб та жаб в момент впливу токсикантів, Морфологічні зміни, що були виявлені за допомогою мікроскопії при загальному збільшенні  $\times 1000$ . На кожному препараті переглядалось 3000 клітин. Генотоксичність впливу зразків вод, що містять важкі метали на еритроцити периферичної крові риб *Danio rerio* та шпорцевих жаб *Xenopus*, відображено в табл.4.2.2. Підрахунок кількості Утворення мікроядер и подвійних ядер в еритроцитах виражені в проміллях - ‰.

Під час експерименту змінювалися фізіологічні поведінки гідробіонтів, вони були неактивними и малорухомими. У тест-організмів жаб і риб, що вижили брали кров для оцінки генотоксичности досліджуваних зразків води.

Таблиця 4.2.2

Генотоксичний вплив досліджуваних водних зразків на еритроцити тест-організмів

| Тип клітин     | Показники, ‰ | №1<br>КН | №2<br>Рb 0,03<br>мг/дм3 | №3<br>Fe 0,3<br>мг/дм3 | №4<br>Mn 0,1<br>мг/дм3 |
|----------------|--------------|----------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| Еритроцити риб | мЯ           | 0        | 4,99±1,43*              | 3,67±0,82*             | 3,63±0,86*             |
|                | 2N           | 0        | 5,33±1,48*              | 4,33±1,16*             | 4,99±1,43*             |
| Еритроцити жаб | мЯ           | 0        | 3,99±1,24*              | 3,33±0,74*             | 3,67±0,82*             |
|                | 2N           | 0        | 4,66±1,26*              | 3,99±1,24*             | 4,0±1,24*              |

Примітка: мЯ - еритроцити з мікроядра; 2Я - еритроцити з подвійними ядрами; КН - контроль; \*  $P < 0,05$  у порівнянні з контрольною групою.

В результаті проведеного дослідження всі зразки води, що містять важкі метали проявили генотоксичний ефект. В еритроцитах крові у риб кількість мікроядер і подвійних ядер достовірно ( $p < 0,05$ ) збільшилися в зразках №2 від 4,99 до 5,33 ‰, №3 3,67 - 4,33 ‰ і №4 3,63 - 4,99 ‰ в порівнянні з контрольною водою. Аналогічним чином реагували еритроцити крові жаб. Кількість мікроядер і подвійних ядер в зразках вод №2 виявлено від 3,99 до 4,66 ‰, №3 3,33 - 3,99 ‰ і №4 3,67 - 4 ‰ в порівнянні з контрольною водою. Присутність важких металів у водному середовищі призводить до того, що вода стає активним чинником шкідливого впливу на здоров'я живих організмів [1, 192].

Таким чином, при біотестуванні досліджувані зразки вод, що містять важкі метали: свинець (Pb) 0,03 мг/дм<sup>3</sup>, залізо (Fe) 0,3 мг/дм<sup>3</sup> і марганець (Mn) 0,1 мг/дм<sup>3</sup>, викликали загибель тест-організмів до 60%. Кількості мікроядер і подвійних ядер достовірно ( $p < 0,05$ ) збільшилися від 3,3 до 5,33 ‰ в порівнянні з контрольною водою.

Система моніторингу якості вод в Україні, як і в інших країн світу, дає оцінку перевищення хімічних елементів (в основному токсикантів) до їх лімітуючих показниками ГДК для водних об'єктів. Значення ГДК по вимогам СанПіН практично не враховують специфіку поведінку антропогенних сполук і природну вразливість водних екосистем до дії забруднення і їх комбіновані ефекти.

Дана методика лише констатує кількісні фактори наявності або відсутності хімічних речовин і сполук, при цьому, не оцінюючи загальне якісне вплив водного розчину на живі організми.

Біотестування з використанням оптимальних наборів тест-організмів і їх клітинних параметрів об'єктивно характеризує біологічну складову якості води.

Під час проведення біотестування з допомогою риби *Danio rerio* гостра токсичність не спостерігалась, рівень виживання тест-організмів склав 100%. Результати по генотоксичності зразків води з різними концентраціями фторид-іонів представлені в таблиці 4.2.3



## Генотоксичність досліджених зразків вод з фторид-іонами

| Зразки досліджуваних вод | Генотоксичні показники,‰ |               |
|--------------------------|--------------------------|---------------|
|                          | Мікроядра                | Подвійні ядра |
| Контрольна вода          | 0                        | 0             |
| 1,0 мг/дм <sup>3</sup>   | 0                        | 0,33          |
| 1,5 мг/дм <sup>3</sup>   | 0,33                     | 0,66*         |
| 3,0 мг/дм <sup>3</sup>   | 0,66*                    | 0,99*         |

Примітка: \* -  $p < 0,05$  у порівнянні з контрольною групою

З отриманих даних видно, що зразок води з концентрацією фторид-іонів 1,0 мг/дм<sup>3</sup> не виявляв генотоксичний ефект. Згідно ДСТУ 7387: 2013 [44], критерій генотоксичності (КГТ) не перевищує 0,33 ‰. У досліджуваних зразках вод з концентраціями 1,5 мг/дм<sup>3</sup> и 3,0 мг/дм<sup>3</sup> було достовірне ( $p < 0,05$ ) збільшення кількості мікроядер і подвійних ядер в периферичній крові у риб у порівнянні з контрольною водою, їх значення досягли від 0,99 ‰ і 1,65 ‰ відповідно, що свідчить про прояв генотоксичної ефекту.

Біотестування природних і питних вод є актуальним завданням у багатьох країнах світу. Біологічні системи є дуже чутливими до токсичних речовин водного середовища. Появ шкідливих хімічних сполук у воді відбуваються зміни параметрів біохімічних реакцій у гідро біонтів [191, 192].

У роботі всі зразки вод з вмістом фтору 1,0 мг/дм<sup>3</sup>, 1,5 мг/дм<sup>3</sup> та 3,0 мг/дм<sup>3</sup> не викликали гостру токсичність у тест-об'єктів. Підвищений вміст фтору у воді понад 1,0 мг / дм<sup>3</sup> проявив генотоксичний ефект. Згідно з вимогами ВООЗ вміст фтору в питній воді 1,0 мг/дм<sup>3</sup>.

Таким чином, фтор є необхідним компонентом для нормальної життєдіяльності організму і тварин і людини, його надлишок або недолік можуть призвести до серйозних негативних наслідків.

#### **4.3. Визначення токсичності наноаквацитратів срібла та міді у водному середовищі**

При застосуванні нових речовин в навколишньому середовищі гостро стоїть питання щодо їх токсичності. Наноаквацитрати металів знайшли своє застосування в багатьох галузях сільського господарства, ветеринарії та біології [193]. Одним з перспективних напрямків є використання цих препаратів для лікування антибактеріальних хвороб риб, в той же актуальним залишається питання щодо оцінки впливу цих речовин на клітинному рівні. Фізико-хімічні методи аналізу не здатні в багатьох випадках виявляти нестійкі сполуки або визначати вплив на живі організми малих концентрацій екотоксикантів [44]. Тому, останнім часом, завдяки простоті, універсальності та експресності великої популярності набули методи біотестування. В той же час, більшість методик полягає в реєстрації смертності особин, личинок чи ембріонів [194, 195]. Але велика кількість токсикантів при потраплянні в навколишнє середовище, і особливо у водну екосистему, може не призводити до летальних ефектів, поряд з цим викликаючи необоротні зміни на клітинному рівні.

Для оцінки токсичності водних розчинів, що містять наноаквахелати міді і срібла використовували методику комплексного біотестування - набору тваринних і рослинних тест-організмів.

При проведенні біотестування проводилася реєстрація показників досліджуваної води: концентрація розчиненого кисню за допомогою киснеміра Ажа-101м, величини рН за допомогою портативного рН-метра рН-150М. У наших дослідженнях ці показники водного середовища відповідали параметрам необхідним для нормальної життєдіяльності водних організмів - рівень кисню відповідав 5-8 мгО<sub>2</sub>/см<sup>3</sup>, а величина РН коливалася в межах 6,5-8,5. Температура води підтримувалася на рівні 21-23°C за допомогою кліматичних камер, світловий режим відповідав зміни дня і ночі.

В роботі використовувалися отримані нами наноаквахелати металів, а саме водні розчини нанокарбоксилатів харчових кислот із вмістом металів 0,1 г/л і слабокислою реакцією (рН 4–6). Для визначення токсичної дії наноаквахелатів

міді і срібла на тест-організми готували їх водні розчини за допомогою методу серійних розведень. Для приготування розчинів використовували штучну воду (ДСТУ 4173:2003). Метод серійних розведень дозволяє визначати мінімальні концентрації наноаквахелати металів, які викликають початкову дію на тест-організми та максимальні – летальні по відношенню до досліджуваних тварин і рослин.

Досліди проводили на штучній воді середньої жорсткості (до дистильованої води додавали солі натрію, калію, кальцію і магнію), а також на ставковій воді з водойм Немішаївського рибного господарства. Природна вода використовується при штучному нересті і культивуванні ікри і ембріонів риб, вона має в своєму складі органічні речовини, в тому числі гумінові кислоти. Гумінові кислоти, як відомо, можуть зменшувати токсичність важких металів по відношенню до водних організмів.

Таблиця 4.3.1

Вживаність риби данію реріо (*Danio rerio*) при внесенні різної концентрації наноаквахелатів срібла

| Зразки досліджуваних вод        | Загиблих риб, % |         |         |         |
|---------------------------------|-----------------|---------|---------|---------|
|                                 | 24 год.         | 48 год. | 72 год. | 96 год. |
| <i>Штучно підготовлена вода</i> |                 |         |         |         |
| Контроль                        | 0               | 0       | 0       | 0       |
| Ag 0,3 мг/л                     | 100             | -       | -       | -       |
| Ag 0,1 мг/л                     | 100             | 100     | 100     | 100     |
| Ag 0,05 мг/л                    | 60              | 60      | 80      | 80      |
| Ag 0,025 мг/л                   | 0               | 0       | 0       | 0       |
| Ag 0,01 мг/л                    | 0               | 0       | 0       | 0       |
| <i>Ставкова вода</i>            |                 |         |         |         |
| Контроль                        | 0               | 0       | 0       | 0       |
| Ag 0,1 мг/л                     | 100             | 100     | 100     | 100     |
| Ag 0,08 мг/л                    | 60              | 80      | 80      | 100     |
| Ag 0,05 мг/л                    | 0               | 0       | 0       | 0       |
| Ag 0,03 мг/л                    | 0               | 0       | 0       | 0       |

Всі тест-організми культивувалися в штучно підготовленій воді, яка за своїм складом відповідає ідеальній питній воді. Гідробіонти адаптувалися до даного водного середовища і при будь-якій зміні якості вод адекватно реагували на зміни умов. В наших дослідах – внесення у водне середовище різних концентрацій наноаквахелатів срібла (табл. 4.3.1).

Як видно з табличного матеріалу, в штучно підготовленій воді токсичність срібла відсутня при концентрації 0,025 мг/л, а природній ставковій воді – при 0,05 мг/л. Таким чином, 0,05 Ag мг/л для природних вод можна використовувати як бактерицидний і профілактичний засіб при розведенні риби. Схожі результати біотестування отримані для риби при внесенні в водне середовище різних концентрацій суміші наноаквахелатів срібла і міді (табл.4.3.2).

Таблиця 4.3.2

Вживаність риби даніо реріо (*Danio rerio*) при внесенні різної концентрації суміші наноаквахелатів срібла та міді

| Зразки досліджуваних вод        | Загиблих риб, % |         |         |         |
|---------------------------------|-----------------|---------|---------|---------|
|                                 | 24 год.         | 48 год. | 72 год. | 96 год. |
| <i>Штучно підготовлена вода</i> |                 |         |         |         |
| Контроль                        | 0               | 0       | 0       | 0       |
| Ag, Cu 0,3 мг/л                 | 100             | -       | -       | -       |
| Ag, Cu 0,1 мг/л                 | 100             | 100     | 100     | 100     |
| Ag, Cu 0,05 мг/л                | 60              | 60      | 80      | 80      |
| Ag, Cu 0,025 мг/л               | 0               | 0       | 0       | 0       |
| Ag, Cu 0,01 мг/л                | 0               | 0       | 0       | 0       |
| <i>Ставкова вода</i>            |                 |         |         |         |
| Контроль                        | 0               | 0       | 0       | 0       |
| Ag, Cu 0,1 мг/л                 | 100             | 100     | 100     | 100     |
| Ag, Cu 0,08 мг/л                | 20              | 40      | 40      | 60      |
| Ag, Cu 0,05 мг/л                | 0               | 0       | 0       | 0       |
| Ag, Cu 0,03 мг/л                | 0               | 0       | 0       | 0       |

Встановлено, що для риб, які культивуються в штучно приготовленій воді, гостра токсична дія суміші наноаквахелатів срібла і міді спостерігається на рівні 0,05 мг/л, а для ставкової природної води – для даніо реріо 0,08 мг/л.

При концентрації 0,01 – 0,02 мг/л, наноаквахелати не викликали жодних змін клітинному рівні.

Щоб проаналізувати вплив наноавацитратів на модельні і природні водні екосистеми, і оцінити можливість використання їх в прикладних цілях, було прийнято рішення проводити дослідження у двох напрямках. Перше - контролем слугувала штучна вода середньої твердості (до дистильованої води додавали солі натрію, калію, кальцію та магнію), друге - досліди проводилися на ставковій воді з водойм навчально-науково-виробничої лабораторії рибництва в смт Немішаєве.

В контрольному та експериментальних варіантах спостерігали клітини крові риб, з нормальним ядром та цитоплазмою. При додаванні 0,01 мг/дм<sup>3</sup> наноаквацитратів до контрольного розчину, виявляли поодинокі еритроцити крові риб з мікроядрами, цитоплазма була близькою до норми, тобто додавання такої концентрації препарату не викликає стресових змін у риб. В той же час при додаванні концентрації суміші препарату 0,025 мг/дм<sup>3</sup> спостерігалася велика кількість клітин з мікроядрами, крім того, відбувалося руйнування клітинної оболонки.

При другій серії експериментів контролем виступали зразки, відібрані зі ставків навчально-науково-виробничої лабораторії рибництва. Хоч ця вода і використовується для культивування риб, при утримуванні данію рерио були помічені значні зміни на клітинному рівні. Зустрічалися значна кількість еритроцитів з мікроядрами та подвійними ядрами, у цитоплазмі клітин збільшився розмір вакуолі. Спостерігалася збільшення кількості лейкоцитів, що може свідчити про запальні процеси в організмі риб. Тому додавання препаратів наноаквацитратів призводило тільки до посилення запальних процесів та необоротних змін у клітині, що проявлялося у підвищенні кількості еритроцитів з мікроядрами та утворенні конгломератів клітин. При дослідженні наноаквацитратів суміші срібла і міді з концентрацією 0,01-0,05 мг/дм<sup>3</sup> були відзначені суттєві зміни цитологічних показників периферичної крові: утворення аномалії ядер, збільшення кількості лейкоцитів у порівнянні з контрольною

групої. Зміна цих параметрів у риб, які витримувались у водних зразках з природних водоймищ (Немишаєво), може свідчити про присутність ксенобіотиків в воді. При дослідженні генотоксичної дії даних речовин за допомогою аналізу ядерцевих характеристик було відмічено різні зміни цих показників. Отже, результати мікроядерного тесту свідчать про його досить високу чутливість та інформативність поряд з дослідями на токсичність і про можливість його сумісного використання зі стандартними тестами. Було помічено, що відповідь на вплив препаратів, проявляється на клітинному рівні ще до того, як почнеться розвиток незворотних процесів деструкції та летальний ефект.

При концентраціях суміші наноаквахелатів срібла і міді 0,02 мг/л для штучно приготовленої води та 0,05 мг/л для ставкової виживаність прісноводної гідри (*Hydra attenuata*) склала 100%. Для ракоподібних церіодафній (*Ceriodaphnia affinis*) всі досліджувані концентрації наноаквахелатів срібла та суміші срібла і міді виявились летальними, що вказує на їх високу чутливість до дії цих речовин. Змін розмірно-масових показників корінців ріпчастої цибулі (*Allium cepa*) у досліджуваній воді при різному розведенні в порівнянні з контрольною групою після експозиції протягом 96 год не було помічено.

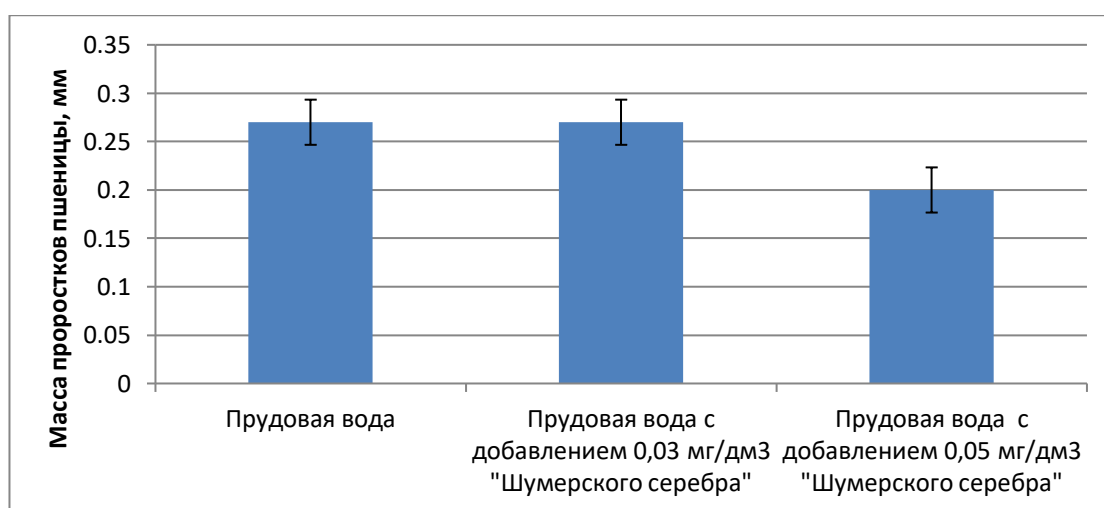


Рис. 4.3.1. Вплив наноаквацитратів суміші срібла та міді на масу корешків пшениці.

Дослідження (рис. 4.3.1.) впливу наноаквахелатов срібла і суміші срібла і міді на ростові показники корінців озимої пшениці «Миронівська - 808» (*Triticum aestivum* L.) показали, що достовірні зміни розмірно-вагових спостерігалися при концентрації 0,05 мг/дм<sup>3</sup> для ставкової води. У цих умовах відбувалося пригнічення проростання тестового рослини. Водночас, для контрольної води достовірні оновлено розмірно-масових показників не спостерігалися.

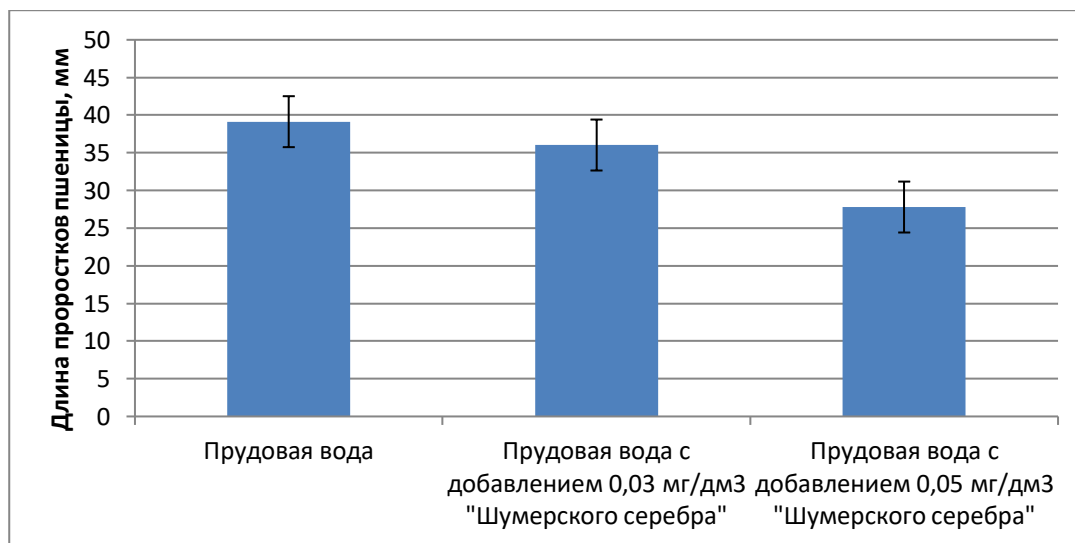


Рис. 4.3.2. Вплив наноаквацитратів суміші срібла та міді на довжину корешків пшениці.

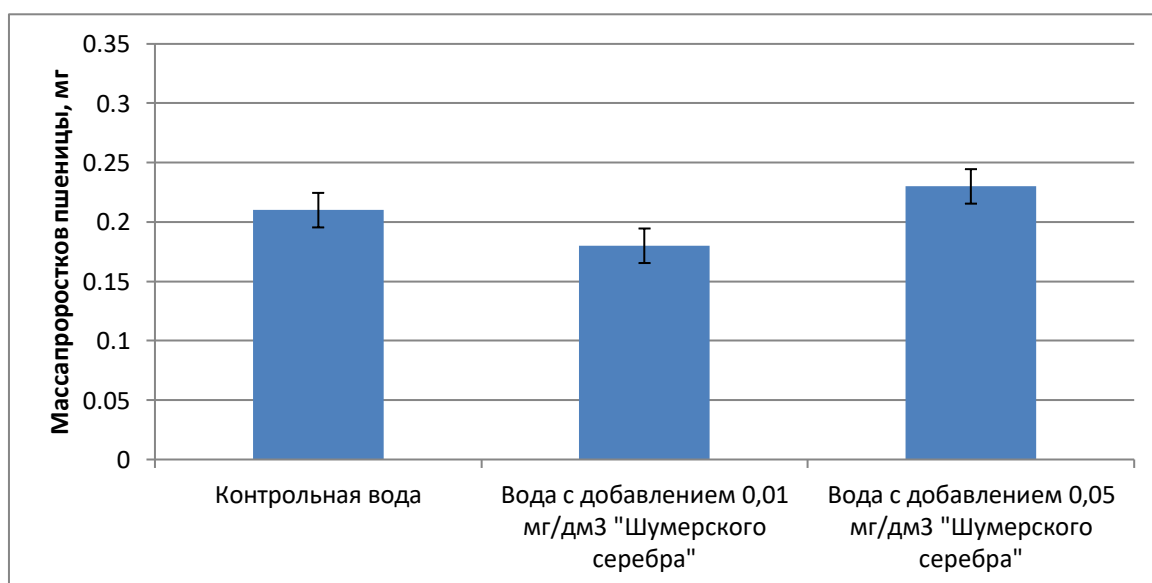


Рис. 4.3.3. Вплив наноаквацитратів суміші срібла та міді на довжину корешків пшениці.

Дослідження впливу наноаквахелатов срібла і суміші срібла і міді на ростові показники корінців цибулі (*Allium sera*) показали наступні результати: хоча при пророщування лука у водах з різним сольовим складом без наноаквацітратів змін масово- розмірних показників майже не відбувалося; при додаванні наноаквацітратів до контрольної води , змін розмірних показників не спостерігалось і спостерігалось невелике зменшення масових показників, у той час, як при пророщування лука в ставкової воді з додаванням наноаквацітратів спостерігалася стимуляція зростання корінців тестового рослини (рис. 4.3.4 – 4.3.5).

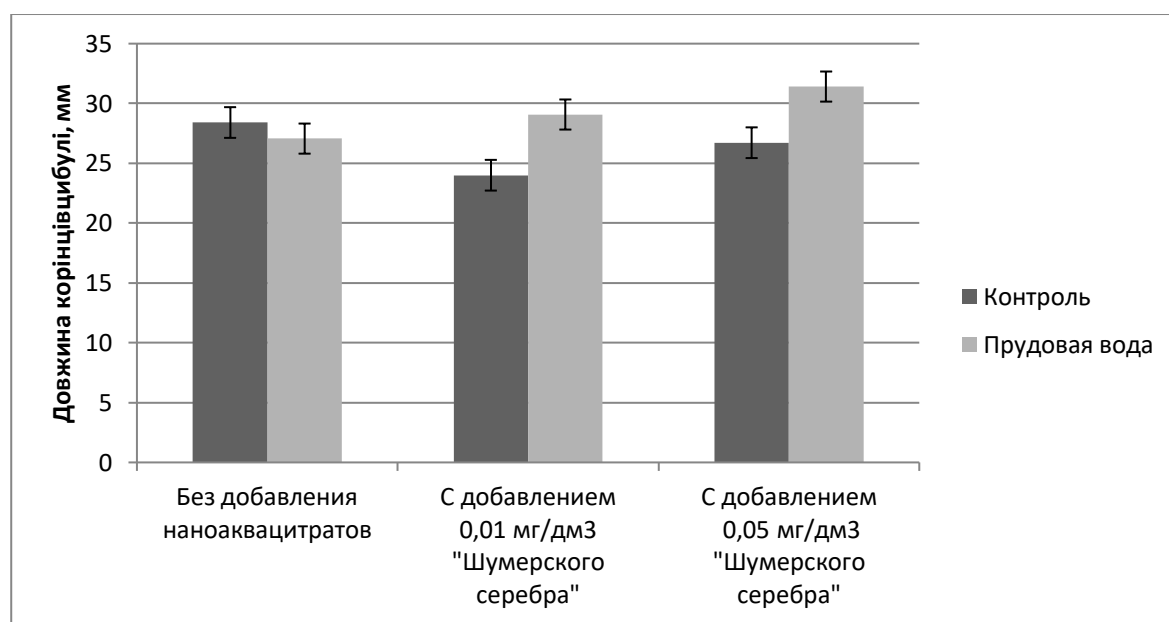


Рис 4.3.4. Порівняльна характеристика середньої довжини корешків цибулі при додаванні наноаквацитратів

Водні екотоксикологи довели, що токсична дія більшості важких металів, тому числі міді та срібла на гідробіонтів обумовлено їх іонами [6, 23, 24]. Концентровані розчини їх солей порушують функції органів дихання у тварин. У слабких розведеннях, проникаючи в організм ВМ блокують проникність біологічних мембран, знижують вміст розчинних протеїнів, викликають пригнічення активності ферментів.



Встановлено, що наноматеріали срібла і міді володіють як біогенної, так і бактерицидною активністю щодо збудників хвороб, і в той же час, на відміну від іонних форм відповідних металів, що не виявляють токсичної дії [196].

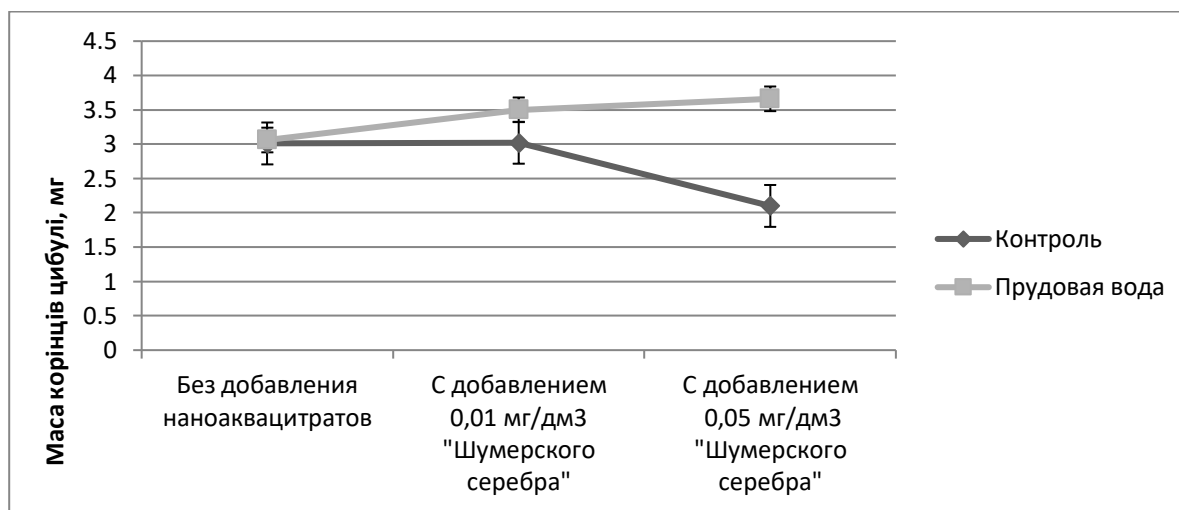


Рис.4.3.5. Порівняльна характеристика сумарної маси корешків цибулі при додаванні наноаквацитратів

Оскільки за даними [197 - 200] токсичність наночастинок металів у багато разів нижче від токсичності їх іонів, отриманих із застосуванням солей, використання наноаквацитратів металів є перспективним, екологічно безпечним і економічно доцільним застосуванням при знезараженні води і при лікуванні та попередженні хвороб риб бактеріологічної етіології.

Отримані результати біотестування свідчать про перспективи можливого практичного застосування наноаквацитратів срібла та міді як препаратів комплексної і антибактеріальної дії.

Були проведені дослідження щодо впливу концентрацій 0,01-0,02 мг/дм³ на ембріонів риби даніо. Досліджені концентрації володіли антибактеріальним ефектом і поряд з цим не викликали токсичних ефектів для дорослих особин на організмовому та клітинному рівні. На рис.4.3.6-4.3.9 наведено дані щодо виживаності та появи сублетальних ефектів на ембріонах *D. rerio* при впливі різних концентрацій наноаквацитратів металів в порівнянні з контролем.

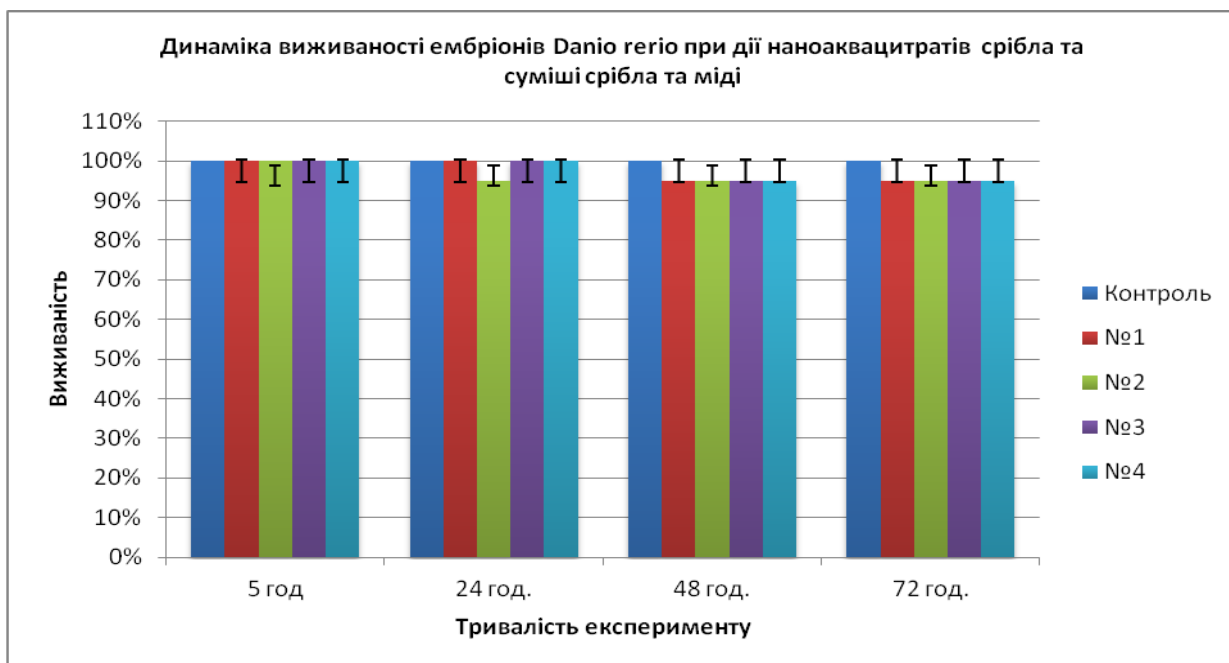


Рис.4.3.6. Дія різних концентрацій наноаквацитратів срібла та суміші сріблі і міді на ембріони *Danio rerio*: №1 - 0,01 мг/дм<sup>3</sup> Ag; №2- 0,02 мг/дм<sup>3</sup> Ag; №3 -0,01 мг/дм<sup>3</sup>Ag, Cu; №4 - 0,02 мг/дм<sup>3</sup> Ag, Cu

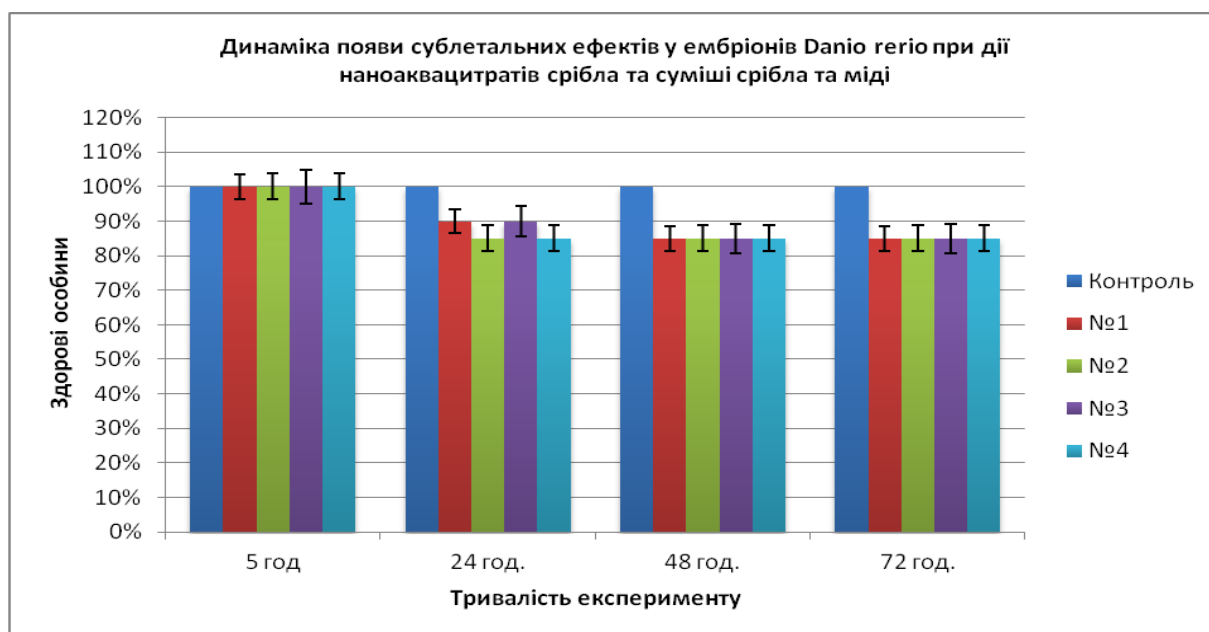


Рис.4.3.7. Утворення сублетальних ефектів при впливі різних концентрацій наноаквацитратів срібла та суміші сріблі і міді на ембріони *Danio rerio*: №1 - 0,01 мг/дм<sup>3</sup> Ag; №2- 0,02 мг/дм<sup>3</sup> Ag; №3 -0,01 мг/дм<sup>3</sup>Ag, Cu; №4 - 0,02 мг/дм<sup>3</sup> Ag, Cu

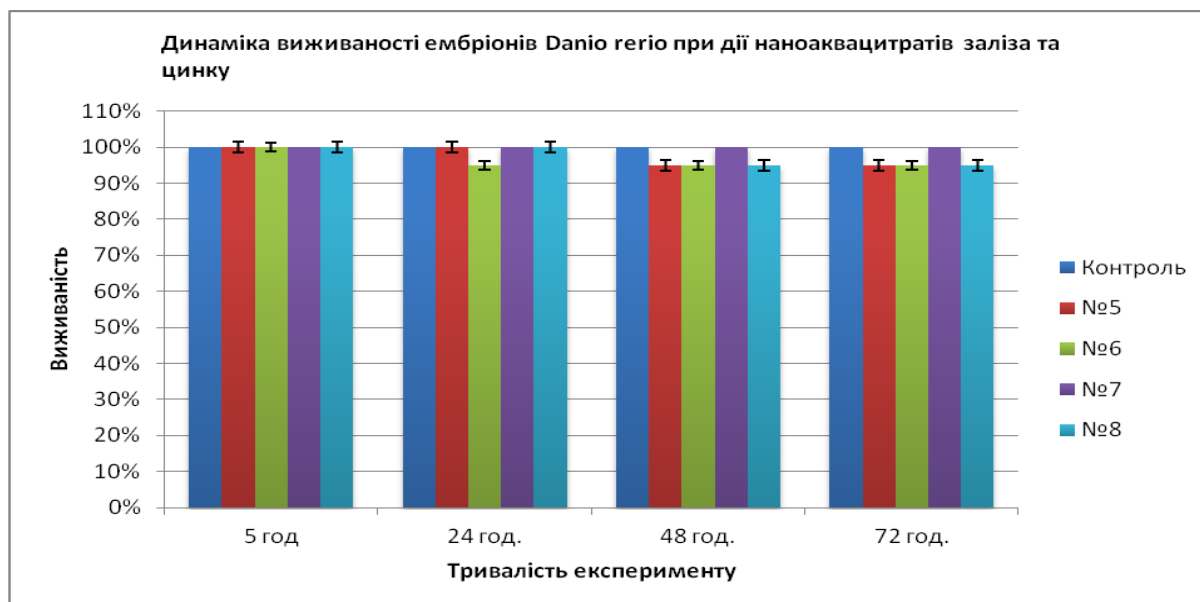


Рис.4.3.8. Дія різних концентрацій наноаквацитратів заліза та цинку на ембріони *Danio rerio*: №1 - 0,01 мг/дм<sup>3</sup> Fe; №2- 0,02 мг/дм<sup>3</sup> Fe; №3 -0,01 мг/дм<sup>3</sup> Zn; №4 - 0,02 мг/дм<sup>3</sup> Zn.

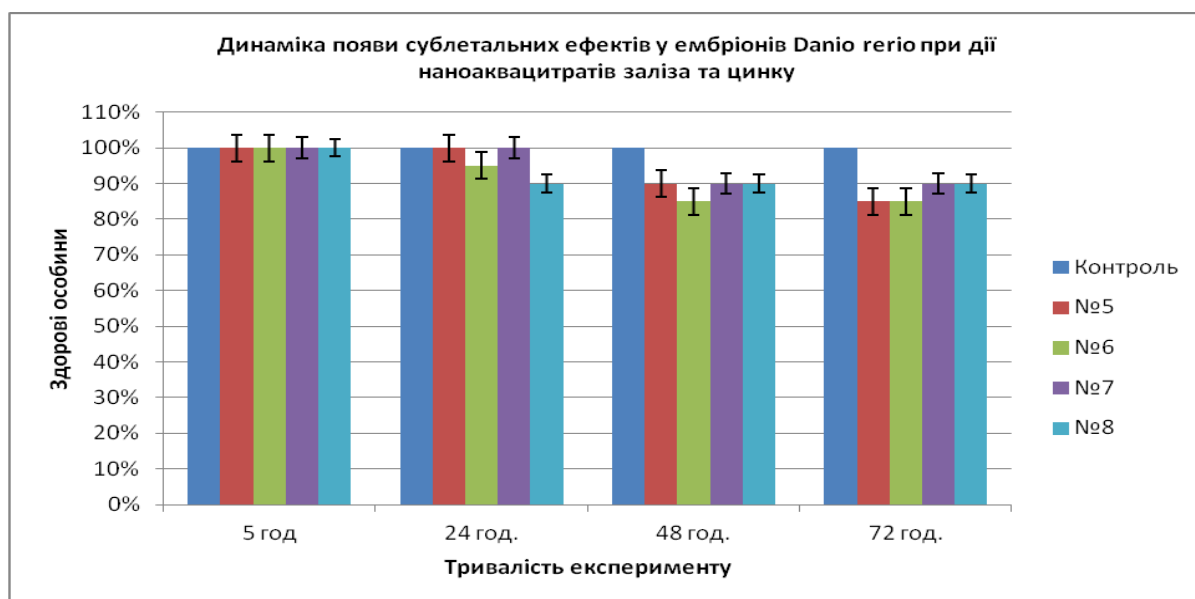


Рис.4.3.9. Утворення сублетальних ефектів при впливі різних концентрацій наноаквацитратів заліза та цинку на ембріони *Danio rerio*: №1 - 0,01 мг/дм<sup>3</sup> Fe; №2- 0,02 мг/дм<sup>3</sup> Fe; №3 -0,01 мг/дм<sup>3</sup> Zn; №4 - 0,02 мг/дм<sup>3</sup> Zn.

Як видно з рис.4.3.6-4.3.9, протягом проведення експерименту відсоток летальних ефектів особин в усіх варіативних групах майже не відрізнявся від контролю. Виключенням є варіант №7, де летальний ефект не був зафіксований.

В усіх групах ембріонів через 72 години експозиції залишалися живими близько 90-95% особин. Протягом перших 5 годин не було відмічено також сублетальних ефектів. Хоча слід відмітити, що в усіх варіативних групах при концентраціях 0,02 мг/дм<sup>3</sup> через 24 експозиції та 0,01 мг/дм<sup>3</sup> при 48 годинах у 10-15% особин почала спостерігатися сублетальна дія токсиканту. Прояви її відрізнялися в залежності від варіативних груп. Найбільш вираженими при дії цинку, срібла, міді були порушення пігментації тіла, в той же час вплив заліза проявлявся в порушенні розвитку очного яблука. Важливо зазначити, що вплив сублетальних концентрацій на ранніх стадіях розвитку риби може призвести до суттєвих змін у виживших особин[201]. В подальшому це може проявитися у зниженні імунітету, порушенні роботи різних життєво важливих систем та збільшенні смертності серед дорослих особин в популяціях та угрупованнях риби [202].

Дослідження цитотоксичності проводилось паралельно з тестами на токсичність, тобто тест-організми після аналізу токсичності досліджуваних проб фіксували для приготування цитологічних препаратів та досліджували кров риби, які були в контрольній воді та у концентрації наноаквацитратів. Було проаналізовано вплив суміші наноаквацитратів міді та срібла на клітинному рівні за допомогою мікроядерного тесту та оцінити перспективи використання препаратів для лікування бактеріальних хвороб риби. При дослідженні впливу суміші наноаквацитратів міді та срібла використовували тест-організми *Danio rerio* та їх клітини крові для оцінки генотоксичності. Піддослідні групи *Danio rerio* масою 1-2 г та довжиною 35-45 мм утримувалися в розчинах, отриманих шляхом додавання до ставкової та штучної води середньої твердості (до дистильованої води додавали солі натрію, калію, кальцію та магнію) наноаквацитратів суміші срібла і міді з концентрацією 0,01-0,05 мг/дм<sup>3</sup>. Дане розведення не викликало летальних змін у тест-об'єктів. Умови утримання під час процедури біотестування контрольних і піддослідних груп тест-організмів не відрізнялися за фізико-хімічними параметрами за винятком відсутності або наявності наноаквацитратів. Досліди проводили в трикратній повторюваності.

Для кожного концентрації відбиралось по 5 особин. Температура води 20-22 °C, рН = 6,5-8. Дослідження генотоксичності проводилося паралельно з тестами на токсичність, тобто, досліджували кров риб, які були в контрольній воді та у концентраціях наноаквацитратів. Препарати клітин периферичної крові готували за методикою вказаною у патенті [115]. Аналіз зразків відбувався за допомогою мікроскопу Axio Imager A1 виробник Carl Zeiss, обладнаним дифференційно-інтерференційним контрастом (ДІК); в роботі було використане 1000-кратне збільшення та фотовідбитки зроблені камерою AxioCam MRm1.

Щоб проаналізувати вплив наноаквацитратів на модельні і природні водні екосистеми, і оцінити можливість використання їх в прикладних цілях, було прийнято рішення проводити дослідження у двох напрямках. Перше - контролем слугувала штучна вода середньої твердості (до дистильованої води додавали солі натрію, калію, кальцію та магнію), друге - досліди проводилися на ставковій воді з водою навчально-науково-виробничої лабораторії рибництва в смт Немішаєве.

На цитологічних препаратах спостерігати клітини крові риб *Danio rerio*, які утримувалися в контрольному розчині без додавання наноаквацитратів. Всі еритроцити з нормальним ядром та цитоплазмою. При додаванні 0,01 мг/дм<sup>3</sup> наноаквацитратів до контрольного розчину, помічено поодинокі еритроцити крові риб з мікроядрами в місцях позначених стрілкою, цитоплазма є близькою до норми, тобто додавання такої концентрації препарату не викликає стресових змін у риб. В той же час при додаванні концентрації суміші препарату 0,025 мг/дм<sup>3</sup> спостерігалася велика кількість клітин з мікроядрами, крім того, в місцях, позначених стрілкою, відбувалося руйнування клітинної оболонки. При другій серії експериментів контролем виступали зразки, відібрані зі ставків навчально-науково-виробничої лабораторії рибництва. Хоч ця вода і використовується для культивування риб, при утримуванні даніо реріо були помічені значні зміни на клітинному рівні. Зустрічалися значна кількість еритроцитів з мікроядрами та подвійними ядрами, у цитоплазмі клітин збільшився розмір вакуолі. Спостерігалася збільшення кількості лейкоцитів, що може свідчити про запальні процеси в організмі риб. Тому додавання препаратів наноаквацитратів

призводило тільки до посилення запальних процесів та необоротних змін у клітині, що проявлялося у підвищенні кількості еритроцитів з мікроядрами та утворенні конгломератів клітин.

Таким чином, при дослідженні наноаквацитратів суміші срібла і міді з концентрацією 0,01-0,05 мг/дм<sup>3</sup> були відзначені суттєві зміни цитологічних показників периферичної крові: утворення аномалії ядер, зростання кількості лейкоцитів у порівнянні з контрольною групою. Зміна цих параметрів у риб, які витримувались у зразках з природних водоймищ (Немишаєво), може свідчити про присутність ксенобіотиків в воді. При дослідженні генотоксичної дії даних речовин за допомогою аналізу ядерцевих характеристик було відмічено різні зміни цих показників. Отже, результати мікроядерного тесту свідчать про його досить високу чутливість та інформативність поряд з дослідом на токсичність і про можливість його сумісного використання зі стандартними тестами. Було помічено, що відповідь на вплив препаратів, проявляється на клітинному рівні ще до того, як почнеться розвиток незворотних процесів деструкції та летальний ефект. Висновки. Встановлено, що токсичний ефект наноаквацитратів срібла і міді проявляється у зростанні кількості еритроцитів крові з мікроядрами та порушенні клітинної оболонки. В той же час, невеликі концентрації наноаквацитратів не викликали значних змін у порівнянні з контрольними дослідом на клітинному рівні, що свідчить про можливість використання концентрацій близько 0,01 мг/дм<sup>3</sup> наноаквацитратів у рибництві та акваріумістиці.

#### **4.4. Дослідження впливу мікроорганізмів на якість води**

Будь-які води на Землі містять живу субстанцію: бактерії, віруси, міцети, одноклітинні організми, водорості, а це значить, що у воді завжди присутні продукти їх метаболізму і органічні речовини, якими ці мікроорганізми харчуються. Важко знайти таку воду, в якій відсутнє життя. Досвід показує як негативну, так і позитивну роль біоти у воді. Патогенні організми (конкретні види бактерій і віруси) становлять небезпеку для здоров'я - їх необхідно усувати

з питної та господарської води, а інші види мікроорганізмів сприяють очищенню води - їх культивують в системах очищення і кондиціонування води. Дуже важливим показником є біологічна стабільність води, що означає незмінність її біотичних властивостей - рівновага в видовий склад і кількість хвороботворних бактерій, що сприяє підтримці сольового і газового складу водного середовища, збереженню органолептичних характеристик (запах, присмак, колір, каламутність, завислі речовини) води. Відсутність такого «біологічного стабілізатора» призводить до тимчасового погіршення якості води: зацвітання, появи запаху, каламутності і суспензії. Приклад такого погіршення якості водиможно спостерігати після відстою піднятою з глибин артезіанської води. У підземних анаеробних умовах бактеріальний склад води представлений анаеробними бактеріями, які в умовах наземної атмосфери відмирають і поступово замінюються аеробними бактеріями. Протягом певного періоду (від кількох годин до кількох десятків діб) відбувається зміни складу розчинених газів і елементів - дегазується розчинений сірководень, аміак, вуглекислий газ, випадає в осад розчинений заліза та інші хімічні речовини, змінюються органолептичні властивості води. У ній зникає специфічний болотний або сірководневий запах, і характерний болотний присмак. Каламутність збільшується, а потім зменшується. В цілому вода в певний період знаходиться в нестабільному стані, але нарешті приходить до рівноважного стану при регулюючій та стабілізуючій ролі мікроорганізмів.

З огляду на важливу роль біоти у формуванні органолептичних, бактеріологічних та хімічних властивостей води, ми пропонуємо відображати її склад і кількісні характеристики в нормативах якості питної води, у вигляді більш детального, ніж це відображено в діючих нормативних документах. При цьому, виходячи з вищезгаданого для джерела води, в якому відсутня жива субстанція, в силу нерівноважних властивостей такої води повинні вводитися обмеження для використання як питною.

З іншого боку, надмірне обсіменіння питної води мікроорганізмами, особливо патогенними, загрожує здоров'ю споживача. При цьому може

спостерігатися значительне погіршення якості води через накопичення в ній метаболітів життєдіяльності мікроорганізмів, а також речовин, що утворюються при відмирання і розкладання біоти. Тому нами були проведені дослідження для встановлення впливу щільності мікроорганізмів у питній воді на її якість з використанням комплексного біотестування.

Для дослідження якості питних вод з мікробіологічними обсіменінням використовувалася фасована питна негазована вода марки «Моршинська», яка за результатами комплексного біотестування відносилась до категорії «безпечні води» і займала за якістю перше місце в ранжуванні фасованих вод. За технологією ця вода видобувається з підземного джерела і фасується без розриву струменя, що не контактуючи з атмосферним повітрям. Без обсіменіння мікроорганізмами фасована питна вода «Моршинська» служила контролем.

Обсіменіння бутильованої питної негазованої води «Моршинська» проводилося штамом кишкової палички (*Escherichia coli*). Вона являє собою паличкоподібну бактерію, що належить до групи факультативних анаеробів (живе і розмножується тільки в умовах відсутності прямого кисню). Кишкова паличка має безліч штамів, більшість з яких належить до природної мікрофлори кишечника людей і допомагає запобігати розвитку шкідливих мікроорганізмів і синтезувати вітамін К. Однак деякі її різновиди (наприклад, серотип O157: H7) здатні викликати серйозні отруєння, кишковий і колібактериоз.

Нормальна мікрофлора кишечника включає в себе безліч мікроорганізмів, серед яких - лактобактерії, ентерококи, стрептококи та ін. Штами цих бактерій знаходяться в рівновазі, але якщо останнє якимось чином порушиться, патогенні мікроорганізми починають посилено розмножуватися. При цьому активізуються процеси бродіння і гниття, викликаючи розвиток серйозних захворювань. Деякі штами кишкової палички викликають не тільки захворювання шлунково-кишкового тракту, але вражають також сечостатеву систему, провокують кольпіт, цистит, простатит, менінгіт у немовлят, іноді стають причиною розвитку гемолітичний-уремічного синдрому, перитоніту, маститу, пневмонії та сепсису.



Методика обсіменіння питної води «Моршинська», яка служила контролем при біотестування, бактеріями *Escherichia coli* проводилася в лабораторії мікробіології ІКХХВ НАН України. Суспензію бактерій розводили контрольної водою до встановлення щільності  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  та  $10^6$  клітин в  $\text{см}^3$ . Результати комплексного біотестування з використанням гідробіонтів і рослинних тест-організмів наведені в таблиці 4.4.1.

Таблиця 4.4.1

Результати біотестування питної води з різним ступенем бактеріального обсіменіння (2013 р.)

| Щільність бактерій у воді кл./ $\text{см}^3$ | Церіодафінія <i>Ceriodaphnia affinis</i> | Гідра <i>Hydra attenuate</i> | Риба <i>Brachydanio rerio</i> | Цибуля <i>Allium cepa</i> | Індекс загальної токсичності | Категорія води            |
|----------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|
| Контроль                                     | 0                                        | 0                            | 0                             | 0                         | 0                            | безпечна (0-40)           |
| $10^2$                                       | 0                                        | 0                            | 0                             | 0                         | 0                            | безпечна (0-40)           |
| $10^3$                                       | 0                                        | 0                            | 0                             | 0                         | 0                            | безпечна (0-40)           |
| $10^4$                                       | 20                                       | 0                            | 0                             | 10                        | 30                           | безпечна (0-40)           |
| $10^5$                                       | 70                                       | 0                            | 0                             | 20                        | 90                           | небезпечна (41-120)       |
| $10^6$                                       | 100                                      | 30                           | 0                             | 40                        | 170                          | Дуже небезпечна (121-200) |

Аналіз результатів комплексного біотестування всіяних бактеріями зразків питної води дозволяє зробити висновок, що щільності бактерій  $10^2$  і  $10^3$  кл. /  $\text{см}^3$  не впливають на нормальну життєдіяльність гідробіонтів і на розмірно-вагові показники корінців пророщеної ріпчастої цибулі. Починаючи з щільності  $10^4$  кл./ $\text{см}^3$  реєструється хронічна токсичність для *Ceriodaphnia affinis* і *Allium cepa*,

проте індекс загальної токсичності дозволяє ще віднести дану воду до категорії «безпечні води».

Питна вода з бактеріальним обсіменінням, де число мікроорганізмів *Escherichia coli* становить 105 кл. / см<sup>3</sup> мала гострий токсичний вплив на ракоподібних і рослинні тест-організми. У цьому випадку індекс загальної токсичності відповідав категорії «небезпечні води».

Щільність мікроорганізмів *Escherichia coli* у воді 10<sup>6</sup> кл. / см<sup>3</sup> викликала 100% загибель церіодафній, достовірно інгібувала на 40% розвиток і зростання ріпчастої цибулі, викликала хронічну токсичну дію на прісноводну гідру *Hydra attenuate*. Це призвело до значного збільшення значення індексу загальної токсичності (170 у.о.), що відповідає категорії «небезпечні води». Споживання води з таким вмістом мікроорганізмів підвищує ступінь ризику для здоров'я людини.

Слід зазначити, що більш чутливим тест-організмом виявилася церіодафнія. Будучи тваринам, що фільтрує воду в пошуках кормових одноклітинних організмів (тих же бактерій), *Ceriodaphnia affinis* проявила високу чутливість до мікробіологічного обсіменіння води. Це протиріччя можна пояснити високою концентрацією метаболітів бактерій *Escherichia coli*, які вони виділяють у водне середовище, значно погіршуючи її якість.

У результаті проведення експериментів по біотестуванню фасованої води з різною концентрацією бактерій *E. coli* 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> на см<sup>3</sup> отримані дані на організаменному рівні представлені в Таблиці 4.4.2

З результатів комплексного біотестування за допомогою тваринних і рослинних тест-організмів видно, що досліджувані зразки фасованої питної води з концентраціями бактерій 10<sup>2</sup> та 10<sup>3</sup> не викликали гостру та хронічну токсичність. Також не впливали на нормальну життєдіяльність гідробіонтів і розмірно-вагові показники корінців пророслого ріпчастого лука протягом 96 год. Починаючи із щільності 10<sup>4</sup> мікроорганізмів реєструється хронічна токсичність для *Ceriodaphnia affinis*, *Hydra attenuate* та *Allium cepa*.

Тест-організми після експозиції (96 год) в досліджуваних зразках  
фасованої питної води з різними концентраціями бактерій

| Досліджувані зразки | Загиблі особини, %          |                        |                          | Відхилення від контролю, % |
|---------------------|-----------------------------|------------------------|--------------------------|----------------------------|
|                     | <i>Ceriodaphnia affinis</i> | <i>Hydra attenuate</i> | <i>Brachidanio rerio</i> | <i>Alliumcepa</i>          |
| Контроль            | 0                           | 0                      | 0                        | 0                          |
| 10 <sup>2</sup>     | 0                           | 0                      | 0                        | 0                          |
| 10 <sup>3</sup>     | 0                           | 0                      | 0                        | 0                          |
| 10 <sup>4</sup>     | 20                          | 20                     | 0                        | -10                        |
| 10 <sup>5</sup>     | 70                          | 30                     | 0                        | -20                        |
| 10 <sup>6</sup>     | 100                         | 40                     | 0                        | -40                        |

Питна вода з бактеріальним обсемененням, що становить 10<sup>5</sup> мікроорганізмів на см<sup>3</sup> викликала гостру токсичність у ракоподібних, хронічну токсичність у гідр і рослинних тест-організмів.

Щільність мікроорганізмів у воді 10<sup>6</sup> мікроорганізмів викликала 100% загибель церіодафній, достовірне пригнічення на 40% розвиток і ріст корінців ріпчастого лука, також хронічну токсичність у прісноводних гідр *Hydraattenuate*. Не виключено, що споживання води з таким вмістом мікроорганізмів підвищує ступінь ризику для здоров'я людини.

Особливо чутливим тест-організмом виявилася церіодафнія. Будучи твариною, що фільтрує воду в пошуках кормових одноклітинних організмів (тих же бактерій), *Ceriodaphnia affinis* виявила високу чутливість до мікробіологічного обсеменення води. Це протиріччя можна пояснити високою концентрацією метаболітів бактерій, що надійшло у водне середовище, значно погіршуючи її якість.

Під час проведення експерименту по біотестуванню питної води з різною концентрацією бактерій *E. coli*  $10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6$  на  $\text{см}^3$  смертність тест-організмів (*Brachidanio rerio*) протягом 96 годин не було зафіксовано в жодній з досліджуваних проб, але змінювалися їх фізіологічна поведінка, до кінця експерименту вони були неактивними та малорухомими.

У порівнянні вище перерахованими гідробіонтами риба є високоорганізованим організмом і знаходиться вище по екологічній ніші. Безпосередньо живучи у воді цикл життя та хімічних реакцій в організмі відбуваються швидше, ніж в інших хребетних, до яких риба близька за своїми органами та системами (жаби, щури, кролики, птахи) [203].

М'ясо риби за хімічним складом близьке до м'яса ссавців. Воно містить багато білків, жиру та води. У нормі м'язова тканина риб, як і м'ясо тварин, не містить мікроорганізмів. Мікробна обсемененність органів риби перебуває в прямій залежності від кількості мікрофлори [203].

Для більше детального дослідження впливу бактерії *E. coli* на організм риб, проводився досліди на клітинному рівні (табл. 2, 3).

Універсальність клітинної організації риб відкриває широкі можливості для токсикологічних досліджень із наступною екстраполяцією отриманих результатів на організм людини [49, 113].

Наші численні дослідження показали перспективність використання гематологічних показників організмів риб у біотестуванні. У даній роботі для характеристики структурних і кількісних змін найважливіших компонентів клітинного ядра (хромосом і генів), що є носіями генетичної інформації, використали цитогенетический метод - мікроядерний тест [49, 113, 115].

При дослідженні впливу води на показники формених елементів крові риб цитотоксичний ефект проявляли всі досліджувані зразки води в порівнянні з контрольними. У фасованій питній воді з різними концентраціями бактерій *E. coli*  $10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6$  на  $\text{см}^3$  спостерігалася дозозалежна зміна гематологічних показників білої крові риб (табл. 4.4.3).

Таблиця 4.4.3

Зміна складу формених елементів крові *Brachidanio rerio* (L.), після експозиції (96 год) в досліджуваних зразках фасованої питної води з різними концентраціями бактерій

| Досліджувані зразки | Формені елементи білої крові, % |          |                |                |          |            |
|---------------------|---------------------------------|----------|----------------|----------------|----------|------------|
|                     | Лімфоциты                       | Моноциты | С/я нейтрофіли | П/я нейтрофили | Базофили | Эозинофили |
| Контроль            | 91,6                            | 3,2      | 3,6            | 1,2            | 0,4      | 0          |
| 10 <sup>2</sup>     | 87,2                            | 3,6      | 4,8            | 1,6            | 1,6      | 1,2        |
| 10 <sup>3</sup>     | 83,2                            | 4,4      | 4,8            | 2,0            | 3,2      | 2,4        |
| 10 <sup>4</sup>     | 76,4                            | 8,8      | 4,4            | 2,4            | 4,8      | 3,2        |
| 10 <sup>5</sup>     | 74                              | 10       | 4,5            | 2,5            | 5,4      | 3,6        |
| 10 <sup>6</sup>     | 73,6                            | 10       | 4,6            | 2,6            | 5,6      | 3,6        |

Зменшення кількісної частки лімфоцитів від 91,6% у контролі до 73,6 % у воді із вмістом *E. coli* 10<sup>6</sup> на см<sup>3</sup>, відбувалося за рахунок збільшення моноцитів, базофілів, еозинофілів і нейтрофілів. Таке співвідношення лейкоцитів у крові говорить про те, що висока концентрація метаболітів бактерій, які виділялись у водне середовище, значно погіршила її якість і викликала запальний процес в організмі.

Таблиця 4.4.4

Генотоксичний вплив фасованої питної води з різними концентраціями бактерій на клітини *Danio rerio* (L.)

| Тип клітин                 | Показники, % | Досліджувані зразки |                 |                 |                 |                 |                 |
|----------------------------|--------------|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                            |              | Контроль            | 10 <sup>2</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>5</sup> | 10 <sup>6</sup> |
| Еритроцити                 | мЯ           | 0                   | 0,33            | 0,33            | 0,67            | 1               | 1               |
|                            | 2N           | 0                   | 0,33            | 0,67            | 1               | 1               | 1               |
| Клітин жабр                | мЯ           | 0                   | 0               | 0               | 0,67            | 0,67            | 0,67            |
|                            | 2N           | 0                   | 0,67            | 1               | 0,67            | 1               | 1               |
| Клітин хвостового плавника | мЯ           | 0                   | 0,33            | 0,33            | 0,33            | 1               | 0,67            |
|                            | 2N           | 0                   | 0               | 0,67            | 1               | 0,67            | 1               |

Отримані дані показують, що у всіх тканинах *Brachidanio rerio* (L.) (в еритроцитах крові, на клітках зябер, в епітеліальних клітках хвостового плавця) зустрічалися подвійні ядра й мікроядра, що означало про генотоксический ефект досліджуваних вод з бактеріями *E.coli*. Спостерігалось, що зі збільшенням концентрації бактерій збільшувалася кількість клітин з аномальними ядрами.

Таким чином, концентрація метаболітів бактерій *E. coli*, виділена у водне середовище, значно погіршила її якість і на рослинних організмах інгібувала ріст корінців, виявила в безхребетних організмах хронічну токсичність на гідрі, і викликала гостру токсичність на цериодафнії [204-209].

Отримані результати на клітинному рівні показали, що відхилення від контролю спостерігалися вже з концентрації мікроорганізмів  $10^2$ . Навіть при виявленні бактерій у незначній кількості спостерігаються запальні процеси, які відбиваються на гематологічних показниках - лейкоцитах крові риб.

Лейкоцити грають дуже важливу роль у захисті організму від бактеріальних і грибкових інфекцій. Ріст кількості нейтрофілов у крові - це відповідь організму на бактеріальні й багато інших інфекцій. Виникнення лімфопенії (зменшення кількості лімфоцитів) характерно для початкової стадії інфекційно-токсичного процесу та пов'язане з їхньою міграцією до вогнищ запалення [51, 210].

Досліджувані зразки фасованої питної води з різними концентраціями бактерій вірогідно збільшували частоту ядерних порушень у тканинах організму риб, тобто викликали генотоксичні ефекти.

При потраплянні до організму людини кишкової палички *E. coli* незалежно від її кількості або концентрації викликає в тканинах запальний процес того або іншого органа (кальпит, простатит, перитоніт і т.д.), що приводить до збою імунної системи [204-209].

Висновки: Необхідність у проведення таких досліджень обумовлена тим, що в питній воді, включаючи фасовану, повсюдно визначається кишкова паличка. Однак вплив *E. coli* та продуктів її метаболізму на токсичність питної води не вивчалось. Загальноприйняті дослідження з використання *E. coli* як

показника санітарно-гігієнічного стану води не включає токсичну оцінку води, що містить кишкову паличку.

Результати дослідження показали, що використання як тест-організмів так і їх клітин доцільно застосовувати для комплексної оцінки якості питних вод, поряд зі стандартними методами.

Структурні та кількісні зміни ядер і клітин спостерігалися вже при концентрації бактерій *E. coli*  $10^2$ . Зміна компонентів клітинного ядра, які є носіями генетичної інформації, приводить до мутацій клітин. Це може привести до помилкової діагностики того або іншого захворювання, а також до проліферації онкологічних клітин.

Відповідно до діючих гігієнічних вимог до якості води централізованих систем питного водопостачання (ВОЗ): загальна кількість кишкових паличок *E. coli* в 1 см<sup>3</sup> води не повинне перевищувати 3 КОЕ. Наші дослідження доводить, що наявність бактерії *E. coli* в питній воді категорично не припустимо.

#### **4.5. Інтергальна оцінка токсичності гербіцидів**

На сьогодні людство використовує велику кількість різноманітних гербіцидів для боротьби з бур'янами. Основним критерієм стійкості біогідроценозів є біорізноманіття. Більшість гербіцидів вимиваються у водойми з поверхневим стоком талих, дощових та ґрунтових вод, змивом з сільськогосподарських угідь та колекторно-дренажні води. Так, внаслідок потрапляння у водойми, гербіциди порушують гомеостаз екосистеми (пригнічується фотосинтез та синтез білку, порушуються процес обміну через мембрани тощо), спричиняючи загибель живих організмів. Це виявляється у зменшенні чисельності видів [211].

Посилення впливу господарської діяльності людини призводить до збільшенні об'ємів потрапляння гербіцидів у відкриті водойми, становлячи серйозну загрозу екосистемі. Головна їх небезпека полягає в тому, що більшість з них мають досить широкий спектр активності, тому їх дія поширюється не

тільки на цільових шкідників, а й на весь агроценоз в цілому. Одним з найважливіших побічних наслідків дії пестицидів є розвиток шкідливих резистентних організмів, що потребує внесення ще сильніших препаратів [211 - 213].

Також, слід відмітити, що гербіциди можуть мати прямий негативний вплив на продуцентів, але не прямий вплив на травоядних тварин або хижаків, представляючи небезпеку як для людей, так і для тварин. Окрім того, вони являють собою кумулятивні отрути, тобто, токсичність їх дії залежить не тільки від концентрації, а й від тривалості дії. Чим вище трофічний рівень, тим в більшій мірі на ньому концентруються гербіциди. Тому, нераціональне використання пестицидів стає причиною гострих отруєнь від 3,5 до 5 млн. осіб щорічно (США, 2010-2012 роки) [212, 213].

Надійний контроль якості довкілля тільки хімічними методами практично неможливий, тому що ці методи не завжди чутливі і не дозволяють оцінювати токсичність водойми в цілому, до того ж присутність одних речовин заважає визначенню інших, а токсичні сполуки у воді можуть змінюватися, стаючи більш чи менш токсичними [214].

Виходячи з цього, виникає необхідність у розробці експрес-тестування для їх швидкого виявлення у водоймах, що полягає у інтегральній оцінці ступеня токсичності середовища. Таку інформацію можуть забезпечити методи біотестування, які засновані на використанні біотестів - живих організмів, виділених в лабораторну культуру. Оскільки біотестування може бути використано як для оцінки токсичності забруднених вод, так і для контролю токсичності стічних вод, цей метод знаходить широке застосування в токсикологічному контролі [115, 214].

Головною метою роботи є виявлення специфічних проявів чутливості тест-організмів до дії гербіцидів. Це дозволить прискорити аналіз впливу їх на гідробіонтів та розробити заходи боротьби з даним видом забруднення. Актуальність роботи обумовлена появою безлічі небезпечних гербіцидів в Україні і необхідність визначення їх наявності у водоймах стоїть дуже гостро.



Новизна роботи полягає в тому, що за рахунок дослідження ферментативної активності білка рослинних організмів буде виявлено тест-організми, що проявлятимуть специфічну чутливість до дії гербіцидів. За даними цих досліджень можна буде швидко та дешево проводити біотестування води будь-яких водойм на вміст гербіцидів у ній [215, 216].

Гербіциди представляють небезпеку як для людей, так і для тварин, тому необхідно вкрай обережно ставитися до їх застосування. Більшість гербіцидів мають досить широкий спектр активності, тому їх дія поширюється не тільки на цільових шкідників, а й на весь агроценоз в цілому (грунти, рослини та біота). Здатність їх до біоаккумуляції спричиняє накопичення цих ксенобіотиків в педосфері [216]. Небезпека застосування ґрунтів залишками гербіцидів також підсилюється їх фітотоксичністю, внаслідок чого вони здатні знижувати врожайність наступних культур [217].

Забруднення гербіцидами має глобальний характер, оскільки вони передаються трофічними ланцюгами від рослин до тварин, в тому числі і до людини. При цьому, чим вище трофічний рівень, тим в більшій мірі на ньому концентруються гербіциди [211, 217]. Окрім того, вони являють собою кумулятивні отрути, тобто, токсичність їх дії залежить не тільки від концентрації, а й від тривалості дії. Тому, нераціональне використання пестицидів стає причиною гострих отруєнь від 3,5 до 5 млн. осіб щорічно [217, 218].

Як відомо, гербіциди не тільки забруднюють ґрунти, прямо діючи на педобіотнів, а й самі ґрунти стають причиною забруднення водоймів у результаті змивання з поверхні ґрунту або при міграції по профілю ґрунту з наступним потраплянням до підземних вод, що несе потенційну загрозу для джерел питного водопостачання. Вимивання їх у водойми залежить від їх здатності до деградації та рухливості в ґрунті, що визначається їх молекулярними властивостями. Надходження препаратів збільшується в умовах ерозії ґрунту, що супроводжується виносом адсорбованих на часточка ґрунту гербіцидів [219].

Підсумовуючи вище сказане, можна виділити такі особливості впливу гербіцидів на навколишнє середовище порівняно з іншими токсикантами:

1) неможливість попередити їх безконтрольну циркуляцію в біосфері, яка відбувається наступними шляхами:

а) повітря – ґрунт – рослини – рослиноїдні тварини – (хижі тварини) – людина;

б) повітря – ґрунт – вода – фітопланктон – зоопланктон – риби – людина;

2) біологічна активність препаратів, що зумовлює потенційну небезпеку для природи та людини;

3) неможливість зменшення норм витрат, оскільки це лише призведе до зниження ефективності захисних заходів та появи стійких до дії препарату організмів;

4) контакт зі значною кількістю людей, починаючи від робітників підприємства, що його випускає і до залишкових кількостей в харчових продуктах;

5) здатність до біоаккумуляції в педо- та гідробіонтах.

Таким чином, відразу після застосування гербіцидів, вони включаються в трофічні ланцюги і мігрують до повного розпаду. Стійкість їх в природних умовах спричиняє тривалість перебування у навколишньому середовищі. Одним з найважливіших побічних наслідків дії пестицидів є розвиток шкідливих резистентних організмів [211, 212, 220].

*Шляхи міграції гербіцидів у водойми, їх поведінка у навколишньому середовищі*

Існують чотири основних шляхи потрапляння пестицидів у ґрунти. Це післясходова та передсходова обробка посівних площ, змішування з ґрунтами та внесення зі стічними водами. Перші три шляхи найбільш поширені при використанні гербіцидів. Оскільки гербіциди складають близько 60% загального світового ринку пестицидів, то забруднення ґрунтів відбувається здебільшого усвідомлено, а подальше забруднення ґрунтових вод може відбутися чи не

відбуватися [219]. Пестициди та їх метаболіти потрапляють до рослини шляхом поглинання їх корінням, а також при фоліарному проникненні з повітря.

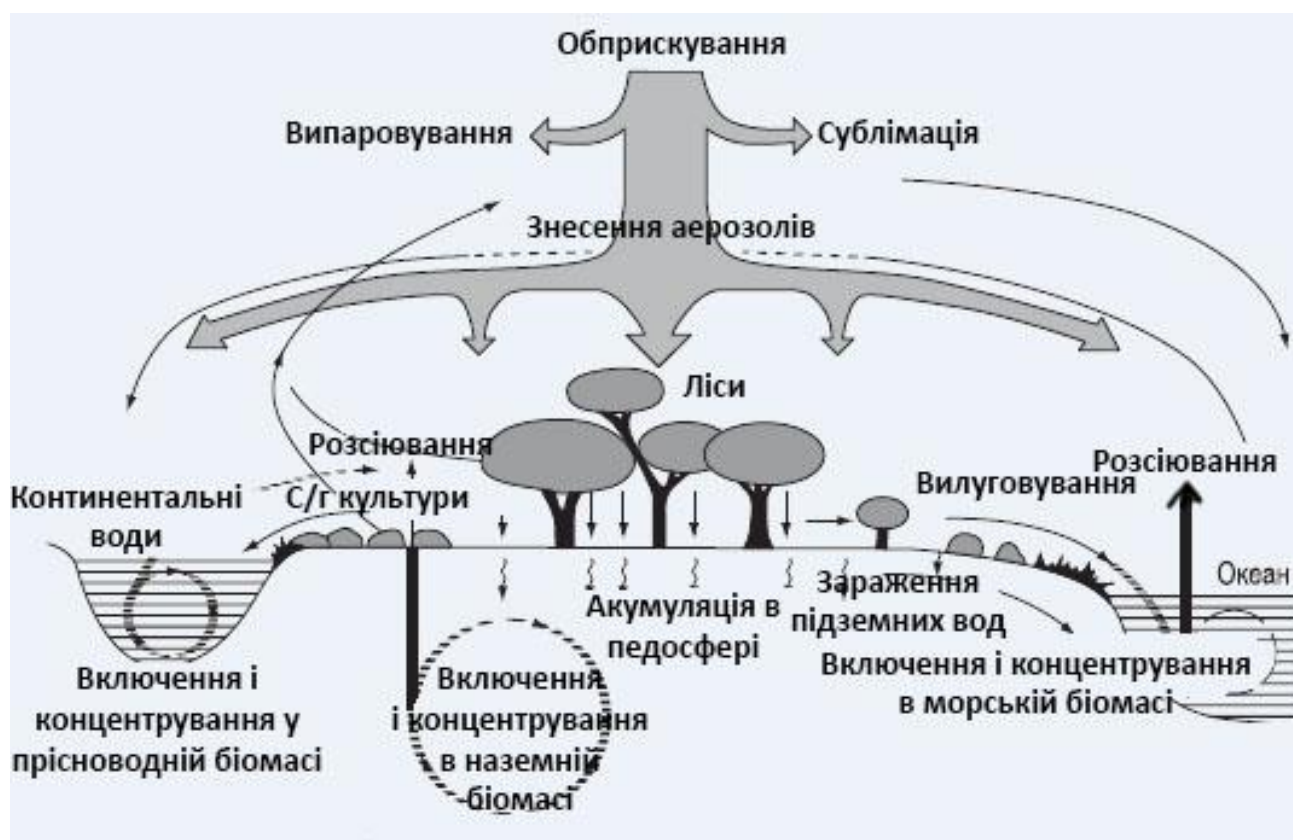


Рисунок 4.5.1 – Міграція пестицидів у біосфері

В більшості випадку, першою ланкою міграції пестицидів стає атмосферне повітря (рисунок 4.5.1), де з атмосферними потоками пестициди переносяться на великі відстані. Проте, провідну роль в міграції пестицидів займають водні потоки. До складу твердого стоку пестициди потрапляють двома шляхами: потрапляють при поверхневому змиві з ґрунтовими часточками або сорбуються муловими частками вже у водоймі. Придонні відкладення є основним резервуаром накопичення стійких органічних забруднюючих речовин, що забезпечує їх тривалу циркуляцію у водних екосистемах. В трофічних ланцюгах їх концентрація різко підвищується: порівняно з вмістом у мулі, в водоростях концентрація зростає в 10 разів, у ракоподібних – в 100 разів, в рибах – в 1000 разів, а в хижих рибах – в 10 000 разів [211]. Акумулюючись у тканинах

промислових видів риб, птахів та тварин, пестициди потрапляють і до організму людини [214, 215, 217].

При будь-якому способу внесення пестицидів використовується вода від 0,5 до 500 л/га (при іригації – до 250 000 л/га) [217, 221, 222]. Вода слугує основним транспортом для міграції пестицидів у навколишньому середовищі. До відкритий водойм вони потрапляють:

- зі стічним водами підприємств, що їх випускають;
- при авіаційній або наземній обробці сільськогосподарських угідь, лісів;
- з дощовими та талими водами внаслідок змиву з сільськогосподарських угідь;
- з водами зрошувальних систем тощо [223].

Окрім описаних шляхів, які фактично не можна відрегулювати, пестициди вносять ціленаправлено у водойми для знищення шкідливих водоростей та комах. Також, у зв'язку зі зростаючою кількістю населення і збільшенням дефіциту питної води, відбувається неконтрольоване вторинне використання води. На сільськогосподарських угіддях для цих цілей забирають воду з найближчих водойм без попереднього очищення. Таким чином, відбувається повторне забруднення води вже внесеними пестицидами [223].

У реальних умовах інтенсивного застосування отрутохімікатів у глобальних масштабах і їх циркуляції в навколишньому середовищі надходження пестицидів має, як правило, регіональний, а стійких препаратів – глобальний характер [217].

Пестициди здатні мігрувати поверхневим стоком якщо вони розчинні у воді або якщо входять до складу колоїдних часток, які виносяться з ґрунту з вологою. Пестициди, які потрапляють до поверхневого стоку з оброблених полів, не завжди означають забруднення. Проте, якщо поверхневий стік формується поблизу сезонних чи постійних водяних потоків, річок, ставків, озер, пестициди створюють проблему забруднення.

Винесення пестицидів з поверхневим стоком найбільш вірогідно під час важких дощів, надлишкової іригації. Круті схили, надмірно зволожені ґрунти та

бідний рослинний покрив також сприяють посиленню винесення їх з поверхневим стоком.

Для мінімізації втрат пестицидів через змивання, слід зменшити їх здатність потрапляти в поверхневий стік або зменшити об'єм поверхневого стоку. Досягнення цих цілей можливе шляхом раціонального планування обробки земель пестицидами (попереджувати внесення, якщо очікується дощ), акуратним застосуванням іригації, використання добавок, які посилюють утримування пестицидів на поверхні рослин тощо [1, 222, 223].

Перебуваючи у водоймі, пестициди змінюють органолептичні властивості води, її хімічний склад. Для біоти важливими наслідками впливу ксенобіотиків є зниження вмісту розчиненого кисню, знищення водних комах, пригнічення життєдіяльності гідробіонтів [211-223].

Поведінку пестицидів у навколишньому середовищі регулюють: властивості пестицидів, кількісний та якісний склад ґрунтової фракції, гідрогеологічні особливості території та кліматичні фактори. Ключовими властивостями пестицидів є: здатність до іонізації у воді, розчинність у воді, летучість, утримування ґрунтами, тривалість життя.

Процеси, що визначають долю пестицидів у навколишньому середовищі (рисунок 4.5.2):

- адсорція (зв'язування з мінеральною чи органічною складовою ґрунту;
- перенесення далі у навколишнє середовище;
- розклад [220].

***Роль пестицидів у сучасному господарстві.*** Сільськогосподарські рослини в процесі росту і розвитку піддаються впливу ряду несприятливих абіотичних і біотичних факторів. До біотичних факторів належать пошкодження шкідливими гризунами, комахами, кліщами, голими слимаками, нематодами і грибами, бактеріями, вірусами, фітоплазменними організмами, засміченість посівів. Шкідливі організми, харчуючись за рахунок культурних рослин, ускладнюють їх виростання, плодоношення і часто призводять до загибелі. В результаті їх шкідливої діяльності знижуються кількість і якість врожаю [224].

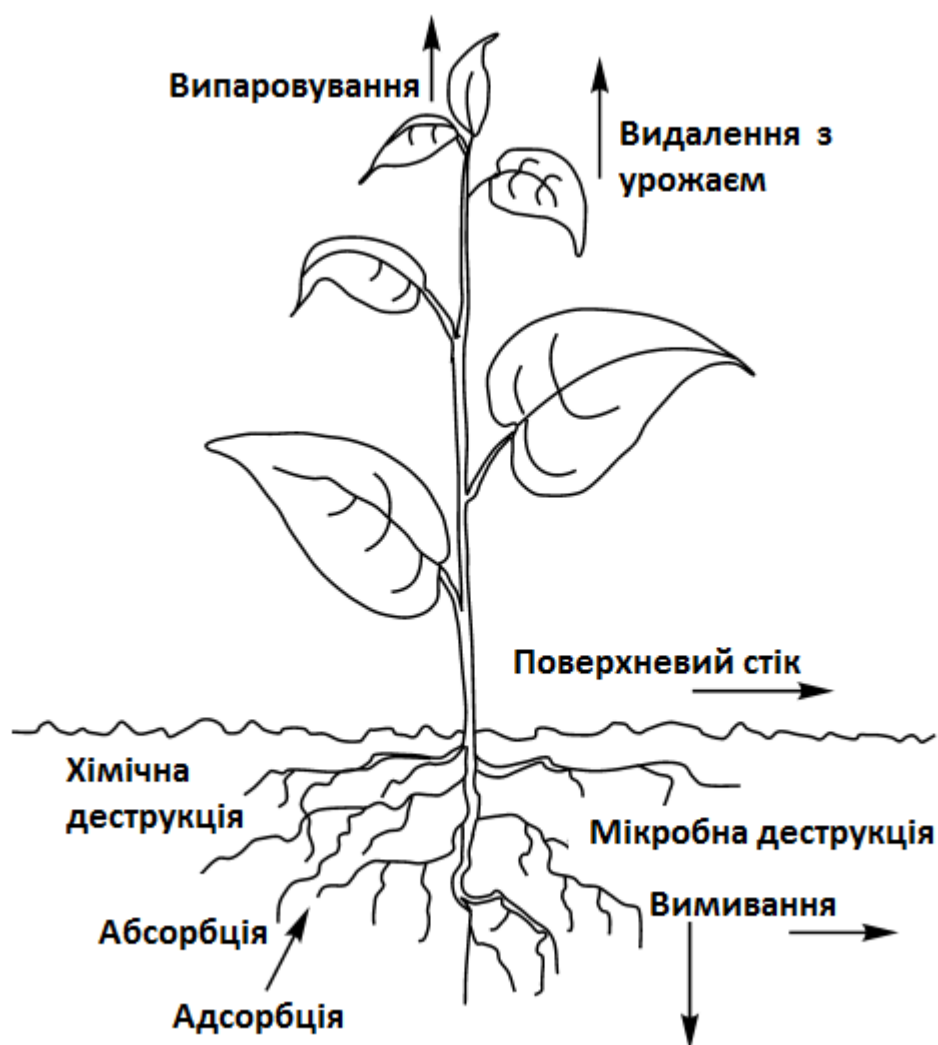


Рисунок 4.5.2 – Міграція пестицидів у навколишньому середовищі

Ще з ранніх часів людство було вимушене використовувати різні засоби захисту свого урожаю від шкідників-комах. За 1500 років до нашої ери використовувалися рослини з різким специфічним запахом для відлякування бліх, вапно та золу почали використовувати проти тлі 3000 років тому, ртуть та миш'як – на початку нашої ери. Арсеніт міді почали масово застосовувати для боротьби з жуками-шкідниками картоплі ще у Франції в 1867 році. Окрім природньої боротьби за джерело харчування, існувала також необхідність знищення комах-переносчиків різних захворювань (тиф, чума, малярія тощо).

Використання інсектицидів дало змогу збільшити об'єми вирощування культур в 2 рази, а також вдалося майже повністю позбутися таких хвороб, як малярія [220, 221].

Збільшення середньорічного об'єму валової продукції можливо за рахунок інтенсивних факторів розвитку, впровадження новітніх досягнень науки, техніки тощо. Вирішення проблеми забезпечення населення харчовими продуктами в значній мірі залежить від добре організованої системи захисту рослин [225, 226].

Сучасні сільськогосподарські технології вимагають широкого застосування пестицидів й агрохімікатів. На сьогодні масштаби застосування пестицидів в Україні становлять понад 300 діючих речовин, близько 400 препаративних форм на площах понад 40 млн. га у кількостях понад 36 тис. тонн [218, 219].

Позитивні наслідки використання пестицидів:

- зростання джерел здорової їжі, не забрудненої мікотоксикантами. Сільськогосподарське виробництво без застосування пестицидів відіграє незначну роль у забезпеченні населення продуктами харчування, оскільки навіть при їх використанні втрачається до 1/3 за рахунок шкідників;

- пестициди дозволяють контролювати більше 10 000 видів комах, 8000 видів грибів та більше 2000 видів бур'янів [218].

При обмежених земельних ресурсах і можливостях зростання врожайності за рахунок традиційних факторів інтенсифікації (хімізації, механізації, меліорації земель) захист рослин реально допомагає вирішити проблему продовольчої безпеки. В даний час у світовому землеробстві попереджуються втрати від шкідників, хвороб і бур'янів на суму понад 100 млрд доларів (27,6% продукції землеробства) [219].

#### ***Наслідки впливу пестицидів для природних екосистем та людини.***

У момент застосування пестицидів 70-90% їх потрапляє у ґрунт. Залишкові кількості пестицидів пригнічують ґрунтову біоту, спричиняючи негативу післядію на культурні рослини, потрапляють в поверхневі і підземні води [223, 225]. Пестициди при їх виробництві та застосуванні можуть

забруднювати повітря виробничих приміщень, атмосферне повітря, ґрунт, стічні та питні води. При різних способах обробки сільськогосподарських культур вони можуть потрапляти в їстівні частини рослин, в організм риб, при обробці худоби і птиці, а також при поїданні худобою корму, що містить пестициди, останні виявляють в молоці, м'ясі, жирі тварин. Багато пестициди здатні довго зберігатися в середовищі проживання людини, потрапляючи з одного об'єкта в інший, перетворюватися у більш токсичні сполуки, потрапляти в організм людини і накопичуватися в ньому [217]. В силу своєї токсичності небезпечні для людини і навколишнього середовища [217, 222, 223].

Пестициди виявляються навіть у тих областях, де їх не використовували, наприклад, в льодах Арктики і Антарктики, жирової тканини пінгвінів. Це пояснюється тим, що вони можуть досягати верхніх шарів атмосфери, переноситися вітром на далекі відстані і з опадами випадати на значній відстані від місця застосування [219].

Біологічна різноманітність є головним критерієм стійкості екосистеми. Під впливом антропогенних факторів відбувається зниження біорізноманіття, збіднення генофонду. Це виявляється у зменшенні чисельності інших видів, на їх зміні, викликаній мутаціями, або їх повним зникненням. Наявність в ґрунтах залишкових кількостей пестицидів у підвищених дозах викликає, в першу чергу, зниження видового біорізноманіття мікроорганізмів та зникнення окремих, вразливих до їх дії, видів. Забруднення ґрунтів також небезпечне з точки зору зниження продуктивності рослин, оскільки спричиняє додаткове внесення хімічних речовин для їх підтримання [211].

Постійне застосування отруйних хімічних речовин може викликати загибель не тільки шкідливих комах, але і корисних паразитичних, хижих комах, акарифагів та інших корисних організмів, що регулюють чисельність популяції шкідників, що призводить до порушення природних зв'язків організмів у біоценозі. Слід відмітити, що гербіциди можуть мати прямий негативний вплив на продуктивність, але не прямий вплив на трав'яних тварин або хижаків. Тим не



менш, гербіциди можуть викликати «трофічні каскади», в тому числі непрямих негативних наслідків біомаси трав'янистих та хижаків [227, 228].

При інтенсивній обробці сільськогосподарських угідь пестицидами та порушенні інструкцій щодо їх застосування спостерігається отруєння птахів, особливо пташенят. У полях і лісах при застосуванні пестицидів гинуть зайці, лисиці та інші теплокровні тварини. Відзначається масова загибель риб: сигів, колюшек, лососів при обробці полів і лісів пестицидами; крім того, препарати накопичуються в тканинах риб і в водної рослинності [215, 229, 230].

У Великобританії за останні роки відбулося зменшення біорізноманіття рослинного світу на 50%, комах – на 33% та птахів – на 25%. Наразі задокументовано більше 100 тис. випадків загибелі птахів, викликані хімічними речовинами. Якщо сучасний рівень біодеградації буде продовжуватися в такому ж масштабі, то до 2050 року прогнозується втрата більше 11% природних екосистем. [229].

Близько 80% всіх пестицидів, які щорічно виробляються у світі, використовуються в розвинених країнах, але в них відбувається менше половини всіх смертельних випадків, пов'язаних з дією пестицидів. Більша частина отруєнь і смертей спостерігається в країнах, які розвиваються, де існують неадекватні стандарти безпеки, низькоякісний захисний одяг, погані установки для миття, не достатній контроль за дотриманням законів, погане маркування пестицидів, неграмотність та недостатність знань про небезпеку пестицидів. Окрім того, середні залишкові концентрації пестицидів у їжі вище у країн, що розвиваються, ніж у розвинених країнах. В цілому, найбільше піддаються дії пестицидів робітники ферми, спеціалісти, використовують їх та населення прилеглих територій [231].

Головні негативні екологічні наслідки використання пестицидів є такими:

- токсичність для тварин та людини;
- вражаються не тільки цільові шкідливі організми, багато корисних видів також, що призводить до порушення взаємозв'язків у біоценозі;

- залишкові кількості пестицидів акумулюються та концентруються в трофічних ланцюгах, де з кожним новим рівнем їх концентрація зростає;
- виносяться за межі оброблюваної території і включаються в регіональні, континентальні та глобальні процеси масообміну;
- з'являються резистентні види організмів, які вимагають більш високих концентрацій пестициду для їх пригнічення;
- зростає вірогідність появи віддалених наслідків [232].

Зниження побічних ефектів може бути досягнуто такими заходами:

- контроль за шкідниками біологічними методами;
- використання стійких до шкідників культур;
- заборона використання стійких та дуже рухомих видів пестицидів;
- заборона використання пестицидів широкого спектру дії;
- покращення техніки використання пестицидів;
- розвиток біотехнологій [233].

#### *Класифікація та механізм токсичної дії гербіцидів різних груп.*

Гербіциди бувають вибіркової і суцільної дії. Перші знищують рослини, що відносяться до окремого класу (однодольні, дводольні), життєвої формі (однорічні, багаторічні кореневищні), сімейству (злаки), виду (вівсюг, пирій, види осоту); другі - будь-яку рослинність. Цей розподіл умовний, адже багато гербіциди із збільшенням дози втрачають свою вибірковість. За способом проникнення гербіциди поділяють на контактні, що вражають рослини в місцях контакту з ними, і системні, здатні пересуватися по провідній системі. За умовами застосування гербіциди поділяють на ґрунтові, або досходові (їх вносять у ґрунт або на її поверхню до посіву або після посіву культури до появи сходів), і листові, або післясходові. Завдяки їх високій ефективності і швидкості дії, можливо виконати прополку в стислі терміни, провести культивуацію, прискорити дозрівання окремих культур, поліпшити можливість механізованого прибирання [231, 234].

При передсходовому внесенні гербіцид часто залишається на поверхні ґрунту. Його доступність для бур'янів знижується через те, що він переходить із

рідкої фази в тверду або за рахунок фотолізу, коли він розкладається під дією сонячного світла. Окрім того, виносу гербіцида з поверхні ґрунту сприяє змивання у вигляді розчиненого компонента дощового стоку або в адсорбованому вигляді на колоїдних часточках.

При проведенні передсходового перемішування гербіцида з землею, можна покращити ефективність контролю за бур'янами. Це обумовлено покращенням парофазової дифузії гербіциду в приповерхневому шарі, його сорбції на складових частинах ґрунту і гідродинамічному перенесенні. Завдяки цьому знижується ризик його вимивання. Перемішування з землею також сприяє також біологічному розкладу гербіцида ґрунтовими мікроорганізмами [235].

За механізмом дії на бур'яни гербіциди поділяють на чотири основні групи:

- інгібітори фотосинтезу. Проникають в хлоропласти рослин, перешкоджають захопленню електронів в фотосистемі I і їх перенесенню до фотосистемі II (триазинов, похідні сечовини);
- впливають на дихання рослин, пригнічуючи синтез АТФ (динітрофенол, галогенфеноли);
- інгібітори мітозу (карбамати, динітроаніліни);
- регулятори росту рослин. Діють аналогічно фітогормонам ауксином. Прискорюючи ріст рослин, призводять до їх виснаження і загибелі (арілоксиалкілкарбонові і арілкарбонові кислоти).

Гербіциди можуть пригнічувати також синтез нуклеїнових кислот, каротиноїдів, білків, ліпідів, блокувати біосинтез і транспорт природних регуляторів росту [236].

При контактній взаємодії токсиканта залежність доза-ефект не має лінійного характеру, тому рекомендовані дози гербіцидів повинні формуватися з урахуванням реакції біоценологічно значимих груп [234, 237]. Досвід показує, що передбачувана залежність доза – ефект, ймовірно, будуть виявлені в експериментах на тваринах. В той же час, наприклад, при доклінічній оцінці

препаратів, непередбачувані своєрідні побічні ефекти, не пов'язані з часом або дозою, значно важче визначити, що ускладнює процедуру тестування [234].

В таблиці 4.5.1 наведено дані про токсичні концентрації пестицидів, засновані на величині LD<sub>50</sub> для щурів в мг/кг маси тіла.

Таблиця 4.5.1

Класифікація пестицидів за ступенем небезпеки отруєння

| Клас небезпеки        | Перорально  |              | Трансдермально |              |
|-----------------------|-------------|--------------|----------------|--------------|
|                       | тверді      | рідкі        | тверді         | Рідкі        |
| ІА сильнодіючі отрути | 5 і менше   | 20 і менше   | 10 і менше     | 40 і менше   |
| ІВ високотоксичні     | 5-50        | 20-200       | 10-100         | 40-400       |
| ІІ середньотоксичні   | 50-500      | 200-2000     | 100-1000       | 400-4000     |
| ІІІ малотоксичні      | близько 500 | близько 2000 | близько 1000   | близько 4000 |

*Біологічні методи як альтернатива застосування гербіцидів.* Людство всієї планети постає перед питанням чи можливо прожити без пестицидів взагалі. Сучасна наука створила деяку альтернативу у вигляді біологічних методів контролю (наприклад, поширенням корисних хижих комах), що і є органічним землеробством. Але масштаби такого господарства невеликі і прогодувати населення в більш ніж 7 млрд. людей не здатні.

Однією з альтернатив є створення генетично модифікованих рослин. Наразі досягнуто наступних успіхів у виведенні таких рослин:

- 1) покращення харчових властивостей культур;
- 2) природна стійкість проти комах; до хвороб; до гербіцидів.

Тим не менше, при виведенні стійких культурних рослин, необхідно бути вкрай обачливим, адже можливе введення в харчову частину рослин ще більш токсичних речовин, ніж пестициди.

Інший вид біологічного контролю – за допомогою природних ворогів шкідливих комах (Сонечкові, богомоли). Проте, він не набув широкого поширення через повільної дії та відсутності «ударного» впливу на угіддя великої площі.

У деяких випадках ефективним виявляється стерилізація чоловічих особин, внаслідок чого не утворюється потомство. Цей метод також не виявився успішним через обмеженість свого впливу та особливості життєдіяльності окремих видів.

Виведення вірусів для знищення специфічних видів комах знаходиться на стадії розробки. Цей підхід є небезпечним зважаючи на те, що вірус може представляти безпосередню небезпеку для життя людей [238].

Біотестування як експрес-метод моніторингу довкілля

Дані про вміст токсикантів у воді не несуть інформації про їх токсичність для гідробіонтів, саме тому в середині 70-х років у науково-практичних дослідженнях пошуки експрес методів аналізу токсичності різних вод і вміст у них хімічних сполук, що потрапляють у навколишнє середовище, стали найбільш актуальні [238, 239].

Для інтегральної оцінки ступеня токсичності навколишнього природного середовища використовуються методи біоіндикації та біотестування. Останній заснований на використанні біотестів - живих організмів, виділених в лабораторну культуру [240]. При оцінці якості середовища в лабораторному експерименті враховуються такі показники: виживаність тест-організмів, темпи їх розмноження, інтенсивність життєвих процесів (дихання, травлення, фотосинтез), поведінкові реакції [241].

Основною перевагою застосування методів біотестування є те, що вони, як правило, не вимагають великих площ і дороговартісного устаткування [242]. В даний час біотестування знаходить широке застосування в токсикологічному контролі, так як воно може бути використано як для оцінки токсичності забруднених вод, так і для контролю токсичності стічних вод [240-243].

Біотестування регулярно використовується:

- при проведенні токсикологічної оцінки промислових, стічних побутових, сільськогосподарських, дренажних, забруднених природних та інших вод з метою виявлення потенційних джерел забруднення;
- у контролі аварійних скидів високотоксичних стічних вод;

- для оцінки ступеня токсичності стічних вод на різних стадіях формування при проектуванні локальних очисних споруд;
- у контролі токсичності стічних вод, що подаються на очисні споруди біологічного типу з метою попередження проникнення небезпечних речовин для біоценозів активного мулу;
- при визначенні рівня безпечного розбавлення стічних вод для обліку результатів біотестування при коригуванні та встановленні гранично допустимих скидів речовин, що надходять у водойми зі стічними водами;
- при проведенні екологічної експертизи нових матеріалів, технологій очищення, проектів очисних споруд та ін .;
- при розробці санітарно-гігієнічних та еколого-рибогосподарських ГДК [244].

Тест-організми повинні відповідати таким вимогам:

- особини повинні бути генетично однорідними, щоб забезпечити схожість їх чутливості і резистентності, а також однаковість відповідних реакцій, що гарантуватиме високу відтворюваність результатів тестування;
- функціональна активність тест-організму не повинна мати сезонної періодичності, що дозволить отримувати результати незалежно від пори року;
- повинні мати високий рівень метаболізму, що забезпечить швидкість виникнення у них відповідних реакцій і, отже, експресність методу;
- повинні бути стресостійкі до пов'язаних з процедурою тестування діям: експериментальні камери, проведення необхідних спостережень і вимірів не повинно само по собі викликати у них чітко виражених стресових реакцій.

Відгук біологічної тест-системи повинен бути стабільний, і його рівень повинен бути контрольованим. Найпростішим відгуком біологічної тест-системи є виживання її об'єктів у ході впливу випробуваного фактора. Вважається, що чутливі біологічні тест-системи дають позитивний відгук на вплив. Так, наприклад, дуже чутливі тест-системи, засновані на тому, що біологічний об'єкт уникає впливу екологічного чинника [242]. Один з таких відгуків вибирають як тест-реакцію - закономірно виникаючас у відповідь реакція тест-системи на

вплив комплексу зовнішніх факторів, вибраних для аналізу стану цієї системи. Ступінь прояву тест-реакції оцінюється за тест-критерієм. Це показник, на підставі якого здійснюється оцінка зміни тест-системи. За ступенем прояву тест-реакції судять про токсичність досліджуваного об'єкта. По зміні характерного, точно змінюваного показника, що відображає порушення життєво важливих функцій організму, визначають ступінь шкідливості токсиканта [243].

При дослідженні дії токсичної речовини на організм оцінюють його реакцію за одним або декількома показниками. Якщо досліджується сукупність показників, то, зазвичай, загальна чутливість організму встановлюється по найчутливішому з показників [245].

Надійний контроль якості довкілля тільки хімічними методами практично неможливий, тому що ці методи не завжди чутливі і не дозволяють оцінювати токсичність водойми в цілому, до того ж присутність одних речовин заважає визначенню інших, а токсичні сполуки у воді можуть змінюватися, стаючи більш-менш токсичними. Проте, біотестування не скасовує систему аналітичних і апаратурних методів контролю природного середовища, а лише доповнює її якісно новими біологічними показниками, так як з екологічної точки зору самі по собі результати визначення концентрації токсикантів мають відносну цінність [225, 246, 247]. Отже, токсичність, встановлювана методами біотестування, є інтегральним показником забруднення природних середовищ. Як і всі інтегральні показники, він має недолік - не розкриває забруднюючі речовини, присутні в пробі, тому результати біотестування не завжди збігаються з даними гідрохімічного аналізу [49, 115, 225].

#### ***Оцінка гострої та хронічної токсичності методами біотестування.***

Токсичність - це ступінь прояву отруйної дії різних сполук та їх сумішей, які ушкоджують, інгібують, викликають генетичні зміни або вбивають організми у воді, ґрунті, повітрі. При біотестування визначають гостру і хронічну токсичність контрольованих об'єктів для живих організмів. За критерій токсичності приймається достовірна кількісна зміна тест-параметра, на підставі якого робиться висновок про токсичність речовини, води або ґрунту [248].

Токсичні ефекти молекулярно-генетичного та організменого рівнів розглядаються в якості первинних токсичних ефектів, що виникли внаслідок порушень популяційних та екосистемних механізмів [248-250]. У сукупності чутливість і резистентність тест-організму визначають діапазон токсичності, у межах якого буде можлива її оцінка [251-253].

Гострий дослід - короткострокова процедура біотестування (з встановленими в кожній методиці часом експозиції), що визначає гостру токсичність по 50% виживаності (смертності) тест-об'єктів. Гостра токсичність проявляється в тому випадку, якщо інтенсивність чинників (агентів) настільки велика, що компенсаторна і адаптаційна здатність організму не встигають проявлятися і він гине [245, 249].

Гострі дослідження на токсичність, як правило, являють собою перші випробування, з метою отримання даних про відносну токсичність, що може виникнути з одного або короткочасною впливу. Стандартизовано тести для експозицій оральний, шкірних і інгаляційних. Це первісна оцінка токсичних проявів і є одним з перших дослідів, що проводяться для дослідження всіх нових сполук. Інформація, отримана в ході проведення гострого дослідження може:

- слугувати базою для класифікації та маркування сполуки;
- забезпечити початкову інформацію про режим токсичної дії речовини;
- допомогти визначити дозу нової сполуки;
- визначити LD<sub>50</sub> [252 - 257].

Необхідно пам'ятати, що лише дані про LD<sub>50</sub> не відображають гострі токсичні властивості з'єднання і не надають достатньо інформації для класифікації з'єднання. Це значення також не має достовірної кореляції з різними механізмами дії різних токсичних агентів. Порівняння істотні лише тоді, коли агенти є гомологічними і мають однакові або подібні механізми дії. Аналіз LD<sub>50</sub> переводить значення в порівняльну ознаку гострої токсичності для певного агента у певного організму в конкретному віці, статі, певного виду.

Таким чином, основне значення проведення тестування з визначення LD<sub>50</sub> є порівняльним. Окрім того, визначення обмежене. За сучасними науковими



методиками, LD<sub>50</sub> застаріла, потребує великої кількості тварин, не забезпечує істотну інформацію про механістичної ефектів або селективних органів-мішеней. Він також обмежений шляхом і тривалістю впливу.

Субгостра токсичність використовується для визначення ймовірної токсичності в ході повторних впливів від декількох тижнів до декількох місяців [258, 259].

Хронічний дослід - довготривала процедура біотестування шляхом впливу на організм протягом значної частини життя (не менше 1/10 тривалості життя). Хронічна токсичність визначається при менш інтенсивному, але більш тривалому впливі токсикантів. При цьому відбуваються порушення рівноваги між розпадом і синтезом речовин в організмі тест-об'єктів, руйнування генома і припинення розмноження [249, 259].

Так, дослідження токсичності проводяться для визначення, які побічні ефекти будуть пов'язані з повторним введенням препарату в більш низьких дозах, ніж ті, які використовуються в рамках досліджень гострої токсичності для визначення безпечних доз. Ці дослідження тривають від 1 до 2 тижнів до 1 до 2 років. Найбільше поширення набули такі дослідження:

1) тест для визначення впливу репродуктивного потенціалу та на майбутні покоління: мета випробовування полягає у визначенні збитку репродуктивного потенціалу та появи майбутніх поколінь, що викликаний введенням випробовуваної речовини протягом багатьох поколінь;

2) тест для визначення тератогенності: мета - введення досліджуваної речовини в вагітних тварин протягом періоду формування внутрішніх органів плоду, і визначення, чи пошкодження народженого плоду було обумовлено випробовуваною речовиною;

3) тест на анцерогенність: метою цього тесту є з'ясування, чи є речовина канцерогенною, коли її вводять тварині безперервно протягом усього терміну спостереження [251].

Доктор Дж. Фіскеджу (Швеція) наголошує на тому, що генотоксичність і мутагенність – більш важливі характеристики, ніж просто визначення токсичності води [260 - 262].

Особливості біотестування при оцінці якості гідросфери.

Велика частина біотестів рекомендується для застосування тільки в практиці контролю за рівнем токсичного забруднення стічних вод, що значною мірою зумовлено невисокою і обмеженою чутливістю відомих біологічних методів оцінки сумарної токсичності води [243].

Для оцінки токсичного забруднення водного об'єкту промисловими чи іншими стічними водами, необхідно дати відповіді на такі питання:

- чи токсичка вихідна вода, що надходить у водойму зі стічними водами?
- який ступінь її токсичності?
- на якій відстані від джерела забруднення токсичність набуває свого мінімального значення? [250].

Біотестування природних вод має ряд відмінностей від біотестування стічних вод або окремих хімічних сполук. При оцінці токсичності природних вод методом біотестування можуть вирішуватися два завдання: отримання систематичної інформації про можливу токсичність води (водної товщі і придонних шарів) і донних відкладень водойми і його ділянок; отримання експрес-інформації про токсичність конкретних проб або токсичному забрудненню водойми або його ділянки у зв'язку з аварійною ситуацією [243].

Результати гідробіологічного аналізу прямо або побічно корелюють з динамікою гідрохімічного складу режиму досліджуваних біогідроценозов. У свою чергу, методи біотестування, які є нововведенням в сучасній прикладній екології, органічно поєднують у собі принципи і підходи, які використовуються в традиційній гідрохімії і гідробіології [263].

При проведенні екотоксикологічних контролю водних середовищ передбачається застосовування не менше двох методів з тест-організмами з різних систематичних груп і за остаточний результат ступеня токсичності досліджуваної проби приймати той, який отриманий при використанні тестів, що

виявили найбільшу чутливість відповідно до принципу врахування пошкодження найбільш слабкої ланки екосистеми [264].

Найбільш широке поширення при біотестування стічних та природних вод отримали методи з використанням таких тест-об'єктів: найпростіших (інфузорії, джгутикові), кишковопорожнинних (гідри), черв'яків (планарії, п'явки), молюсків (червоногі), ракоподібних (дафнії, гаммаріуси), риб, а також представників різних груп рослин і водоростей [265].

Вищі рослини є невід'ємним компонентом водних екосистем, оскільки належать до автотрофним організмів, що створюють первинну продукцію в результаті фотосинтезу. Здатність вищих рослин накопичувати речовини в концентраціях, що перевищують фонові значення, зумовило їх використання в системі моніторингу та контролю стану навколишнього середовища. Гідрофіти чутливо реагують на зміну гідрофізичних і гідрохімічних показників: температури, прозорості, кислотності, сольового та іншого хімічного складу води, донних відкладень, забезпеченості водойми біогенними речовинами та ін. [266 - 269].

Здатність водоростей мешкати в різноманітних умовах унікальна. Вони живуть у морях і океанах, річках і озерах, дощовій воді з мінімальною кількістю солей, в гіперсолоних озерах, на високогірних льодах і поверхні розжарених скель. Незважаючи на, здавалося б, широку пластичність, вони легко реагують на забруднення середовища [268].

Завдяки широкому поширенню водорості мають велике значення в житті багатьох організмів, відіграють важливу роль в біотичному кругообігу. Водорості морських і прісних водойм (а також прибережна рослинність) є їжею для планктонних і бентосних тварин, у тому числі деяких риб.

Вивчення водоростей вкрай важливо для розуміння процесів, що протікають у водоймах. На частку водоростей припадає половина фотосинтетичної продукції Землі. У водних екосистемах фітопланктон є одним з основних джерел органічної речовини, тому для характеристики стану водного середовища необхідно знати його різноманітність і фізіологічне

состоянієізученіє водоростей вкрай важливо для розуміння процесів, що протікають у водоймах [268, 269]..

При постановці експериментів велике значення має фізіологічний стан культури водоростей і її вік. Тому для експерименту відбирають розвинену, життєздатну культуру з клітинами приблизно одного віку [268].

Найбільш часто використостовуваними організмами для оцінки якості водойм є ряска мала і елодея канадська. Увагу до них викликана переважно тим, що вони можуть чинити істотний вплив на фізико-хімічні показники води і процеси самоочищення. Крім того, повсюдна поширеність у водоймах, здатність рости на штучних середовищах, невибагливість до спеціальних умов для культивування і висока чутливістьробить їх унікальними тест-об'єктами в біологічному моніторингу водного середовища. Більше того, при встановленні ГДК шкідливих речовин, що скидаються у водойми вони є обов'язковими тест-організмами [266 - 269].

Необхність застосування біотестування для оцінки гербіцидного забруднення водойм. 20 березня 2015 року у Ліоні, Франція, Міжнародне агентство з дослідження раку (IARC), проводило оцінку п'яти фосфорорганічних пестицидів, серед яких був гліфосат– найбільш поширений за об'ємами гербіцид у світі, що було визнано ще у 2006 році. Він зареєстрований у США з 1974 року і застосовується для боротьби з бур'янами в широкому спектрі сільськогосподарських, міських, садово-паркових, водних і лісових ситуацій. Більшість гербіцидів містить ізопропіламінову сіль гліфосату [270, 271].

Продукти з гліфосату виробляються в різних країнах світу компанією Monsanto Company. Вони продаються під різними торговими марками: у США найбільш поширені назви Roundup, Rodeo і Accord. Його інтенсивно застосовують у сільському господарстві у більшості країн і залишкові кількості виявлено в харчових продуктах [271].

Гліфосат часто описується як токсикологічно нешкідливий: «інтенсивні дослідження приводять до твердого висновку, що гліфосат має дуже низький рівень токсичності». Огляд токсикології гліфосату, здійснений LD<sub>50</sub>, змушує

зробити інші висновки. Шкідливі ефекти були виявлені в кожній стандартній категорії тестування (субхронічна і хронічна токсичність, канцерогенність, мутагенність і вплив на репродуктивність).

В результаті дослідження IARC гербіцид було віднесено до категорії 2A – ймовірно канцерогенний для людини, що було підтверджено даними Всесвітньої організації охорони здоров'я [215, 272, 273]. Так, повна класифікація включає такі категорії:

- 1 – канцерогенний для людей;
- 2A – ймовірно канцерогенний та 2B – можливо канцерогенний
- 3 – не класифікований стосовно канцерогенності для людей;
- 4 – імовірно не канцерогенний для людей.

Можливо, що з проведенням більшої кількості досліджень та збору даних про випадки захворювань, цей гербіцид буде віднесено до категорії 1. Поверхнево-активна речовина, що використовується в поширених продуктах на базі гліфосату, більш токсична, ніж сам гліфосат, а комбінація цих двох речовин ще більш токсична [215, 272, 273].

Контакт з гліфосатом зв'язується з появою репродуктивних проблем у людини. Дослідження в Онтаріо (Канада) показали, що використання батьком гліфосату асоціюється зі збільшенням викиднів і передчасних пологів у фермерських сім'ях.

Дослідження Monsanto Co. залишків пестициду в культурних рослинах виявили гліфосат в салаті-латуку через п'ять місяців після обробки (латук був посаджений через чотири місяці після обробки) і в ячмені - через чотири місяці після обробки (ячмінь був посаджений через місяць після обробки).

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я «значні залишки» гліфосату були знайдені при обробці пшениці перед жнивими (для підсушування зерна). Висівки містили в 2 - 4 рази більше пестициду, ніж ціле зерно. Залишки не зникають при випічці.

Обробка гліфосатом знижує популяції корисних комах, птахів і дрібних ссавців внаслідок знищення рослинності, яка використовується ними в якості їжі

або укриття. Обширний дрейф гліфосату спостерігався в 1970-і роки, коли дослідження в Каліфорнії виявили гліфосат в 800 метрах від місця його повітряного і наземного застосування [271].

Численні дослідження вивчили токсичність гербіциду Roundup для нецільових організмів. Дослідження, проведене в 2004 році, показало, що в «екологічно значущих» концентраціях, виявлено істотний вплив на північноамериканського пугловка, *Rana pipiens*. В ході проведення хронічного експерименту, вони продемонстрували зменшення розмірів, збільшення часу метаморфоза, і пошкодження хвоста. Агентство захисту довкілля США назвало гліфосат «виключно долгоживущим», а польові дослідження в штатах Айова і Нью-Йорк виявили, що період напіврозпаду гербіциду перевищує 100 днів. Гліфосат був знайдений у водних джерелах після його застосування у сільському, міському та лісовому господарстві [215, 272, 273].

При оцінці дії гербіциду на біологічну активність чорнозему звичайного через 28-35 днів компостування у ґрунті відбулося значиме зменшення інтенсивності дихання. Це вказує на зниження активності ґрунтових мікроорганізмів в результаті дії препарату. Як правило, чим вище застосовувалася доза препарату, тим сильніше інгібувалося дихання ґрунту [74].

При дослідженні впливу мікроконцентрацій гліфосату на озиме тритикалі сорту «Михась» було встановлено інгібування (до 10% від контролю) всхожості насіння, хоча це не є цільовим бур'яном [75].

При проведенні фітотестування з використанням тест-об'єкту редис червоний з білим кінчиком було виявлено, що при концентрації 1 мг/л не спостерігається вплив на проростання насіння, але знижується довжина корінців проростків. При концентраціях від 10 до 100 мг/л препарат виявив сильну інгібуючу дію як на проростання, так і на довжину корінців. Також, величина питомої швидкості росту мікроорганізмів суттєво знизилася і через три доби складала, відповідно, 84, 65 і 54% від контролю [74, 75].

Гліфосат може потрапити в поверхневі води разом з частинками ґрунту, коли вони змиваються в струмки і ріки. Як часто це трапляється невідомо, так як

систематичний контроль вмісту гліфосату у воді проводиться рідко. Гліфосат був виявлений як в поверхневих, так і в ґрунтових водах.

У двох дослідженнях стійкість гліфосату в ставкової воді оцінювалася від 12 до 60 днів. Гліфосат довше зберігається в ставковому мулі. Наприклад, період напіврозпаду в ставковому мулі в Міссурі склав 120 днів, стійкість в мулі вище року спостерігалася в Мічигані і Орегоні [271, 276].

Виходячи з таких результатів, виявлення наявності гліфосату у водоймах є вкрай важливим завданням сучасності, оскільки, будучи найпоширенішим гербіцидом, він неодмінно потрапляє у водойми, отруюючи їх.

Гербіциди, що використовуються у роботі. Гліфосат – фосфорорганічний гербіцид. В роботі використовувалися розчини калієвої солі гліфосату – найпоширенішого гербіциду у світі за об'ємами використання. Його хімічна формула -  $C_3H_8NO_5P$ . Застосовую в сільському і лісовому господарствах проти дводольних і злакових бур'янів; а також для десикації зернових культур.

Має яскраво виражену системну дію. Проникаючи в усі вегетативні органи, накопичується в меристематичних тканинах, в зонах активного росту, де порушує фізіологічні процеси, що призводить до загибелі рослин. З ґрунтовим розчином може всмоктуватися кореневими волосками. Добре пригнічує багаторічні кореневищні бур'яни.

Гліфосат застосовується як гербіцид системної та вибіркової (при спрямованій обробці, без попадання на культуру) дії для боротьби з однолітніми, багаторічними та злаковими бур'янами в період вегетації. На однорічних рослинах дія гербіциду проявляється через 2-4 дні, на багаторічних – через 7-10 днів і пізніше в залежності від стадії їх розвитку. Хмарна або прохолодна погода уповільнює прояв дії речовини. Однорічні бур'яни пригнічуються протягом 20-60 днів до повторного відростання.

Передбачається, що гліфосат пригнічує біосинтез фенілаланіну, інгібує хлорізматмутазу або префенат дегідратази. Симптоми пошкодження: поява у рослин світло-зеленого забарвлення, жовтизни. Знебарвлення верхівок, втрата тургору. Потім рослину засихає.

У воді препарат стійкий. Зменшення рівня гліфосату в водній системі відбувається за рахунок впливу мікрофлори і в результаті впливу ультрафіолетового випромінювання. Гербіцид може переноситися водним потоком вниз за течією від місця обробки на кілька кілометрів. Зменшення кількостей у природній воді препарату і його основного метаболіту, головним чином, відбувається за рахунок адсорбції діючої речовини опадами і розкладання мікроорганізмами.

Препарати на основі гліфосату відносяться до 3 класу небезпеки для людини і 3 класу небезпеки для бджіл. ГДК у воді водойм – 0,02 мг/дм<sup>3</sup>.

*Клетодим – хлорорганічний гербіцид.* Хімічна формула:  $C_{17}H_{26}ClNO_3S$ . Клетодим - інгібітор синтезу жирів. Після потрапляння на поверхню листа речовина абсорбується листової поверхнею і переміщається по флоємі до меристемних регіонів. Препарат накопичується в тканинах, порушує біосинтез ліпідів, викликаючи загибель бур'янів. Селективний післясходовий гербіцид. Знищує бур'яни протягом 1-3 тижнів. після обприскування. Знижена температура і посушливі умови знижують його гербіцидну активність.

Розчиняється в більшості органічних розчинників (розчинність більше 900 г/л). Нестабільно піддається розкладанню при підвищеній температурі, під дією УФ світла, при екстремальних значеннях рН. Піддається окисленню і розкладанню в аеробних умовах, період напіврозпаду 1-3 дні. Клетодим стійкий при відсутності сонячного світла у водних розчинах з рН=7-10. Основними продуктами метаболізму є клетодим сульфон та клетодим сульфоксид. ГДК у воді водойм – 0,002 мг/дм<sup>3</sup>.

*Мікроядерний тест на клітинах корінців цибулі та пшениці.* Хімічну мацерацію коренів проводили протягом 120 хвилин у 45% розчині  $CH_3COOH$ . Після мацерації корені цибулі з метою аналізу подвійних ядер та мікроядер клітин переносили у сухі порцелянові чашки і додавали по краплям розчин ацетоорсеїну. Корінці фарбували при температурі 24°C протягом 1 – 1,5 години. Коли корені набували темно-червоного забарвлення, їх відмивали мацеруючим розчином.



На знежирених предметних скельцях лезом відрізали кінчики коренів (меристемні частини). На частинки корінців, для одного препарату 3-4 кінчика, крапали гліцерин і накривали покривним склом. Для того щоб клітини розташувалися моношаром, по склу строго перпендикулярно били олівцем до утворення «хмаринок» клітин.

Аналіз цитологічних препаратів проводили за допомогою світлового мікроскопа. Підрахунок мікроядер та подвійних ядер зручніше вести при збільшенні об'єктива 40. Визначали окремо по корінцям кількість клітин з мікроядрами та подвійними ядрами на кожні 500 клітин.

Визначення каталазної активності екстракту елодеї

Група методів, що дозволяє оцінити стресову реакцію тест-організму на токсикант, - біохімічні, які виявляють ефективність біохімічних реакцій, рівень ферментативної активності тощо. Ферменти, які виділяють тест-об'єкти, здатні виявляти специфічні біокаталітичні реакції. Каталаза відноситься до оксидоредуктаз і розкладає на воду та молекулярний кисень перекис водню (має токсичність для клітин), що утворюється в процесі окиснення органічних речовин. Кількість білка в пробах визначалася за методом Лоурі. Використання тестів на каталазу пов'язане з тим, що більшість хімічних забруднювачів пригнічують в першу чергу окисно-відновні процеси [277].

Каталазну активність визначали по зниженні екстинкції розчину, який містить  $H_2O_2$  у якості субстрату, при додаванні до нього безклітинного екстракту за 1 хв. при  $25^{\circ}C$  та довжині хвилі 240 нм [24]. Виміри проводили на двопробеному спектрофотометр СФ-26. Каталазну активність виражали у перетворених за 1 хв. мкмольх  $H_2O_2$ , віднесеного до вмісту білку у реакційній суміші.

Для дослідження бралися безклітинні препарати *Elodea canad.*, час експозиції яких у водному розчині гербіциду складав від 1 (для визначення гострої токсичності) до 4 (хронічної) діб. Досліди проводились у 3-5 кратній повторюваності.

*Морфологічний аналіз корінців цибулі та проростків пшениці.* При дослідженні токсичності цибулинок очищують від лушпиння і розміщують у верхньому зрізі пробірок для тестування, заповнених водними зразками. Використовується генетично однорідний, сортовий рослинний матеріал візуально однакового розміру. Для досліджень відбирали цибулинки розміром приблизно 1,5 см, для кожного зразка води по 10 цибулинок. Концентрації для гліфосату складали 0,01; 0,02 та 0,03 мг/дм<sup>3</sup>, а для клетодиму - 0,001; 0,002 та 0,003 мг/дм<sup>3</sup>.

Після експозиції впродовж 24, 48, 72 і 96 год змінювали досліджувані зразки води і контроль відповідно. Через 96 год за допомогою лінійки вимірювали довжину всіх корінців із 10 цибулин кожного ряду водних зразків і контролю потім їх зважували на електронних вагах. Ступінь токсичності досліджуваних зразків води для корінців цибулі ріпчастої оцінювали після проведення статистичної обробки результатів біотестування (середньої маси та довжини корінців).

Для проведення дослідження на токсичність гербіцидів для пшениці брали чашку Петрі, клали на її дно три шари фільтрувального паперу, потім - по 10 насінин пшениці і заливали досліджуваним розчином так, щоб пшениця наполовину свого розміру була вкрита розчином. Дослід триває 4 доби.

Через 96 год за допомогою лінійки вимірювали довжину всіх корінців із 10 насінин пшениці водних зразків і контролю потім їх зважували на електронних вагах. Ступінь токсичності досліджуваних зразків води для корінців пшениці оцінювали після проведення статистичної обробки результатів біотестування (середньої маси та довжини корінців).

*Біотестування з використанням риб.* Для біотестування використовували дорослі (статевозрілі) особини Даніо реріо та гуппі. Біотестування проводили при освітленні розсіяним світлом з природною зміною дня і ночі (16 год – світло і 8 год темрява), при температурі водного середовища 19-22°C. Об'єм води у стакані не повинен був перевищувати 2 л. Під час експерименту слідкували, щоб загибель риб у контролі не перевищувала 10%. Перед початком тестування

вимірювали рН досліджуваних вод (значення рН повинно бути в межах 6,5-8,5). В хімічні стакани наливали по 2 л контрольної і досліджуваної води. В кожну підписану ємкість висаджували по 10 риб. Щодобово у кожній ємкості підраховували кількість загиблих риб, яких відразу видаляли. Загиблою вважали рибу, яка не проявляє ознак дихання і рухливості впродовж 5 хвилин після доторкання до неї скляною паличкою. Для визначення присутності гострої токсичної дії випробуваної води біотестування проводили протягом 96 годин. Біотестування було короткочасовим, тому риб не годували.

Воду вважали гостро токсичною, якщо за 96 год гинуло 50 або більше відсотків піддослідних риб, для цього зразка біотестування на рибах закінчувалось. Якщо кількість загиблих риб в цей час складало від 20 до 40 відсотків, то досліджувана вода мала хронічний токсичний вплив на тест-організми.

Для випробування на *Hydra attenuata* використовують пластикові планшети з осередками об'ємом 5 см<sup>3</sup> (чотири осередки на контроль та чотири осередки на кожну із досліджуваних проб).

За 24 год до випробування в осередки у планшеті заливають по 4,5 см<sup>3</sup> середовища для культивування *Hydra attenuata*. Пластиковою піпеткою відбирають із посудини для культивування дорослі особини *Hydra attenuata* без бруньок та вміщують їх у осередки (по 3 особини на осередок). Планшет накривають кришкою та вміщують у термокамеру. Експозицію здійснюють при температурі 21-24 °С без годування.

Через 24 год весь розчин із осередків обережно відбирають піпеткою, не пошкоджуючи при цьому організми. Після цього в осередки знову заливають по 4,5 см<sup>3</sup> розчину: у перші чотири – середовище для культивування гідр (контроль), у послідувачі чотири – випробну воду, розчин речовини у необхідній концентрації, водну витяжку з ґрунтів, донних відкладів, відходів (дослід). Планшет знову вміщують у термокамеру та витримують при тих же умовах протягом 96 годин. Спостереження роблять через 24, 48, 72 та 96 год.

Впродовж випробування тест-організми не годують. Через 96 год підраховують кількість живих організмів в контрольних та дослідних осередках. Біотестування гербіцидів на організменному рівні:

При проведенні біотестування на організменному рівні, було використано наступні тест-об'єкти:

- цибуля ріпчаста (*Allium cepa*);
- церіодафнія (*Ceriodaphnia affinis*);
- гідра (*Hydra attenuata*);
- риби (гупі (*Poecilia reticulata*) та даніо (*Danio rerio*).

Використання цибулі ріпчастої та пшениці м'якої як тест-об'єктів для визначення токсичності води

Для визначення хронічної токсичності за досліджувану ознаку було обрано такий морфологічний показник, як довжина коріння. В приготовлені розчини з різними концентраціями гербіцидів поміщалися цибулини на 7 діб. В таблиці 4.5.2 наведено отримані результати.

Таблиця 4.5.2

Результати вимірювання довжини корінців (в міліметрах) цибулі ріпчастої при дії гліфосату та клетодиму у розчині з різною концентрацією

| Контроль     | Концентрація гліфосату, мг/дм <sup>3</sup> |            |            |
|--------------|--------------------------------------------|------------|------------|
|              | 0,01                                       | 0,02       | 0,03       |
| 28,01 ± 0,66 | 33,68±0,73                                 | 31,53±0,84 | 26,57±0,92 |
| Контроль     | Концентрація клетодиму, мг/дм <sup>3</sup> |            |            |
|              | 0,01                                       | 0,02       | 0,03       |
| 28,01 ± 0,66 | 33,42±0,87                                 | 32,55±0,68 | 33,37±0,67 |

Спостерігаємо, що при хронічному впливові гліфосату на цибулю ріпчасту в концентраціях 0,01 та 0,02 мг/дм<sup>3</sup> спостерігається посилення ростових процесів, довжина корінців більше від контролю на 3,52-5,67 сантиметрів, що складає близько 18%. Нагадаємо, що концентрація 0,02 мг/дм<sup>3</sup> – це гранично

допустима концентрація гліфосату у водоймі. При впливові концентрації, що більше ГДК ( $0,03 \text{ мг/дм}^3$ ), спостерігається пригнічення ростових процесів приблизно на 5%.

Отримані результати дають змогу прослідкувати лінійну залежність між дозою гербіциду та вимірюваним тест-параметром. Стимулююча дія гліфосату у низьких концентраціях на рослині відмічена й іншими вченими [215, 271]. Проте, відмічене інгібування ростових процесів при концентрації вище рівня ГДК, викликає необхідність у подальших дослідженнях, адже цибуля не є цільовим бур'яном для гліфосату і не повинна була зазнати суттєвих змін.

Клетодим широко використовується для пригнічення бур'янів на посівах цибулі ріпчастої. При дослідженні його впливу на рослину не виявлено лінійної залежності між дозою токсиканту та пригніченням росту корінців рослини. Проте, спостерігається значне збільшення довжини корінців у всіх зразках порівняно з контролем (до 15%).

Подібна ситуація спостерігалась і у випадку з гліфосатом, але клетодим не показав пригнічення ростових процесів при концентраціях вище ГДК ( $0,02 \text{ мг/дм}^3$ ). При проведенні повторного дослідження було взято до уваги такі ознаки як довжина корінців, їх маса, мітотичний індекс (відсоток клітин, що знаходяться в фазі поділу до загальної кількості проаналізованих клітин), кількість мікроядерних та двоядерних клітин. Час експозиції – 96 год (гостра токсичність). Результати представлено в таблиці 4.5.3.

При повторному дослідженні у всіх пробах виявлено незначне інгібування ростових процесів обома гербіцидами, проте, не спостерігається лінійної залежності. Так, найсильніше пригнічення гліфосатом в концентрації  $0,03 \text{ мг/дм}^3$ , а клетодимом – у найнижчій концентрації  $0,001 \text{ мг/дм}^3$ . Мітотичний індекс зростає з підвищенням концентрації, між ними є лінійна залежність. Мікроядерні та двоядерні клітини виявлено лише при впливові клетодиму. Слабкий відгук тест-реакцій (менше 20%) робить дані систем мало придатними для визначення наявності гербіцидів у воді.

Таблиця 4.5.3

Вплив гліфосату та клетодиму в різних концентраціях на тест-реакції  
цибулі ріпчастої

| Концентрація гербіциду          | Довжина корінців (мм) | Маса корінців (г) | МІ        | мЯ | 2Я |
|---------------------------------|-----------------------|-------------------|-----------|----|----|
| Контроль                        | 37,91                 | 0,52              | 192       | 0  | 0  |
| Гліфосат                        |                       |                   |           |    |    |
| №1 – 0,01 мг/дм <sup>3</sup>    | 37,20 (-2%)           | 0,48 (-8%)        | 182 (-5%) | 0  | 0  |
| №2 – 0,02 мг/дм <sup>3</sup>    | 36,71 (-3%)           | 0,54 (+4%)        | 190 (-1%) | 0  | 0  |
| №3 – 0,03 мг/дм <sup>3</sup>    | 35,13 (-7%)           | 0,55 (+6%)        | 194 (+1%) | 0  | 0  |
| Клетодим                        |                       |                   |           |    |    |
| №1 – 0,001 мг/дм <sup>3</sup> ; | 32,13(-15%)           | 0,53 (+2%)        | 175 (-9%) | 0  | 1  |
| №2 – 0,002 мг/дм <sup>3</sup> ; | 36,45 (-4%)           | 0,49 (-6%)        | 184 (-4%) | 0  | 1  |
| №3 – 0,003 мг/дм <sup>3</sup>   | 39,48 (+6%)           | 0,67 (+29%)       | 215(+15%) | 2  | 2  |

Примітка: мЯ – мікроядро, 2Я – подвійне ядро, МІ – мітотичний індекс.

Вплив гліфосату показав незначне пригнічення ростових процесів порівняно з контролем, в межах 10%. Результати мають лінійну залежність: при збільшенні дози гербіциду зменшується довжина корінця. Проте, спостерігається збільшення біомаси при високих концентраціях токсиканту. Цей результат вимагає подальшого вивчення. За впливу клетодиму виявлено лінійну залежність між стимуляцією росту корінців та накопиченням біомаси при збільшенні концентрації токсиканту.

Для дослідження гострої токсичності на пшениці м'якій було приготовлено таку ж саму серію розчинів. Результати наведено в таблиці 4.5.4.

Таблиця 4.5.4

Довжина та маса корінців пшениці м'якої, пророщеної на забрудненій токсикантами воді

| Концентрація гербіциду          | Довжина корінців (мм) | Маса корінців (г) |
|---------------------------------|-----------------------|-------------------|
| Контроль                        | 51,65                 | 0,28              |
| Гліфосат                        |                       |                   |
| №1 – 0,01 мг/дм <sup>3</sup>    | 49,9 (-3%)            | 0,25 (-10%)       |
| №2 – 0,02 мг/дм <sup>3</sup>    | 48,5 (-6%)            | 0,29 (+4%)        |
| №3 – 0,03 мг/дм <sup>3</sup>    | 47,7 (-8%)            | 0,31 (+11%)       |
| Клетодим                        |                       |                   |
| №1 – 0,001 мг/дм <sup>3</sup> ; | 49,00 (-5,5%)         | 0,26 (0%)         |
| №2 – 0,002 мг/дм <sup>3</sup> ; | 51,02 (-2%)           | 0,30 (+0,6%)      |
| №3 – 0,003 мг/дм <sup>3</sup>   | 53,08 (+3%)           | 0,34 (+18%)       |

На жаль, відсутність чіткої лінійної залежності «доза-реакція» та слабкий або відсутній відгук у більшості проб не дає змоги використовувати цибулю ріпчасту та пшеницю м'яку при виявленні гербіцидів у воді.

Використання церіодафній, гідр та риб як тест-об'єктів для визначення хронічної токсичності. Для визначення хронічної токсичності було обрані такі ж дози токсикантів, як і в досліді з цибулею. Використання ширшого діапазону концентрацій не дало б змогу прослідкувати чітку тест-реакцію, оскільки вже при значення ГДК деякі тест-організми показали 100% смертність. Результати представлено на рисунках 4.5.3, 4.5.4.

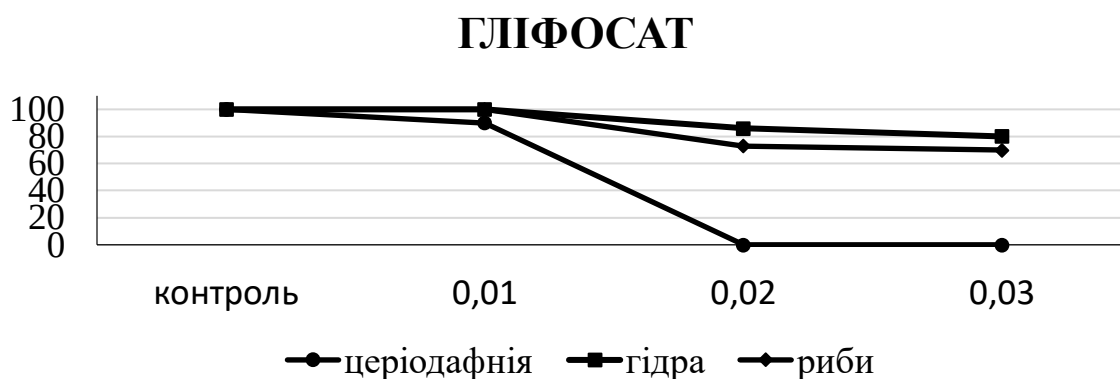


Рисунок 4.5.3 – Залежність між концентрацією гліфосату та виживанням тест-організмів (у %)

В ході проведення дослідження найвищу чутливість показали представники виду церіодафній, смертність яких складала 100% вже при досягненні 0,02 мг/дм<sup>3</sup>. Таким чином, це робить їх непридатними для виявлення чутливості до гліфосату. Інші тест організми – гідри та риби – показали схожі лінійні залежності. Гідри виявилися найбільш стійкими до дії гліфосату понад рівень ГДК.

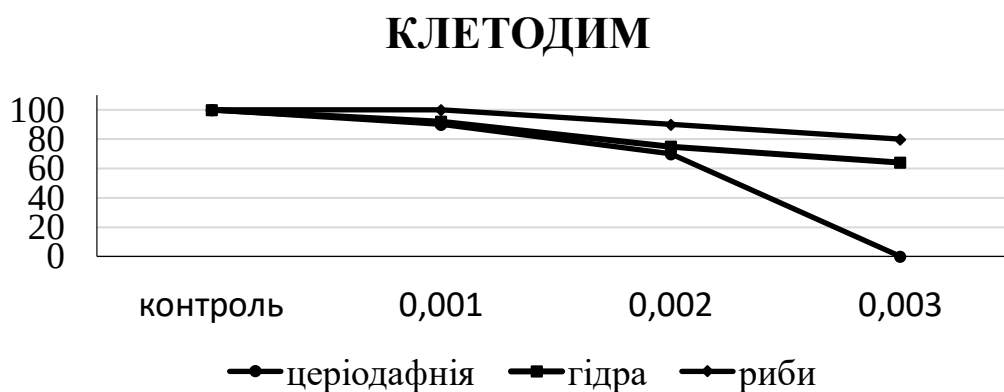


Рисунок 4.5.4 – Залежність між концентрацією клетодиму та виживанням тест-організмів (у %)

При використанні водного розчину клетодиму у випадку тест-об'єктів гідр та риб отримано схожу лінійну залежність, як і при використанні гліфосату. Для риб клетодим також виявився більш токсичним, ніж для гідр, які показали найвищу стійкість. В даному експерименті смертність церіодафній наступила при концентраціях вище ГДК, а при 0,02 мг/дм<sup>3</sup> складала 70%. Проте, дані



результати не дають змоги впевнено сказати, що їх можна застосовувати для виявлення гербіцидів у воді, адже діапазон концентрацій може бути іншим.

Таким чином, вид, що показав найвищу стійкість є гідри і їх найкраще застосовувати для біотестування гербіцидів у водоймах. Класичний тетс-об'єкт періодафінія показав високу смертність при малих концентраціях пестицидів, що унеможливило проведення експериментів з ними.

*Біотестування гербіцидів на молекулярному рівні:* Каталаза відноситься до найбільш активних ферментів-оксидоредуктаз. Більшість токсикантів пригнічують саме окисно-відновні реакції, тому це стало основою дослідження дії гербіциду на молекулярному рівні.

Для визначення гострої токсичності гліфосату було проведено дослідження на водній рослині елодея канадська, тіло якої повністю занурене у водне середовище. Також, вона є видом-космополітом, що дозволяє відтворювати результати в будь-якій точці світу. Тривалість експерименту складала 1, 2, 3, 4 доби, але 1 та 4 є найбільш показовими (таблиця 4.5.5).

Таблиця 4.5.5

Визначення каталазної активності *Ecolea canad.*, в ум.од.акт. після експозиції у водному розчині гліфосату

| Тривалість експозиції | Контроль                       | Концентрація гліфосату у розчині, мг/дм <sup>3</sup> |       |       |
|-----------------------|--------------------------------|------------------------------------------------------|-------|-------|
|                       |                                | 0,02                                                 | 0,2   | 2,0   |
|                       | Значення каталазної активності |                                                      |       |       |
| 1 доба                | 0,154                          | 0,249                                                | 1,360 | 0,802 |
| 4 доби                | 0,154                          | 0,122                                                | 0,197 | 0,582 |

Найвищий рівень активності – на 1-шу добу при концентрації 0,2 мг/дм<sup>3</sup> – вище майже у 8 разів порівняно з контрольним зразком, після чого відбувся спад активності майже в половину, що може бути пов'язано з інактивацією ферменту. Оскільки у всіх пробах спостерігається активація ферменту порівняно з контролем, дане питання потребує подальшого вивчення.

При тривалості експерименту 4 доби спостерігалось лінійне підвищення активності по мірі зростання дози токсиканту, але в меншій мірі, ніж при однодобовому впливові. На нашу думку це пов'язано з тим, що в організмі весь час проходили дві реакції: накопичення токсиканту та пошкодження клітин і адаптація до дії гербіциди. Оскільки адаптаційний потенціал виявився вищим, ми спостерігаємо такі результати саме на 4-ту добу.

Таким чином, елодея показала кращу залежність між тест-реакцією та відповіддю в широкому діапазоні концентрацій гліфосату, ніж інші організми.

В ході експерименту виявлено:

- періодафнії є найбільш чутливими організмами, проте, не можуть бути використанні при біотестуванні води на наявність гербіцидів, оскільки лінійність реакції спостерігається у надто вузькому діапазоні;

- цибуля показала лінійну залежність між дозою гліфосату та довжиною корінців, але також спостерігається стимулююча дія при низьких концентраціях. При впливові клетодиму не виявлено лінійної залежності та у всіх пробах є такою стимулюючий ефект. Такі результати потребують більш детального вивчення;

- гідри виявилися найбільш стійкими до дії обох гербіцидів і показали лінійну залежність між збільшенням концентрації та зменшенням виживання;

- при дослідженні каталазної активності протягом 1 доби відбулось значне підвищення активності (майже у 8 разів порівняно з контролем) при концентрації, що відповідала рівню ГДК – 0,02 мг/дм<sup>3</sup>. При вищій концентрації активність знову знизилась. При дослідженні в 4 доби спостерігається лінійне підвищення активності зі зростанням концентрації. На рівні 2,0 мг/дм<sup>3</sup> спостерігається підвищення каталазної активності майже в 4 рази порівняно з контролем. В подальшому передбачається проведення експерименту з визначення хронічної токсичності обох гербіцидів для елодеї.

Таким чином, використання класичних тест-об'єктів при дослідженні токсичності води з гербіцидами, не є зручним, оскільки не дозволяє визначити їх наявність у широкому діапазоні концентрацій. Проте, застосування гідр цілком

можливе, адже їх лінійна залежність між дозою токсиканта та виживання є рівномірною.

Застосування елодеї є більш перспективним, оскільки вона є водною рослиною, тіло якої повністю занурене у воду, на відміну від цибулі ріпчастої. Більше того, дослідження каталазної активності є кращим показником токсичності середовища, ніж відсоток виживання, оскільки відрізняється більшим ступенем специфічності. Лінійна залежність виявлена у широкому діапазоні, що дозволить визначати токсичність навіть сильно забрудненої токсикантами води.

*Визначення кореляційних зв'язків між вмістом токсичних речовин у воді та її безпечністю.* Проблема вивчення взаємозв'язків між екологічними показниками та діючими факторами середовища є однією з найважливіших проблем аналізу негативного техногенного впливу на стан довкілля і здоров'я населення. Будь-яка екологічна політика передбачає регулювання екологічними змінними і повинна ґрунтуватись на знанні того, як ці змінні впливають на ті чи інші результативні показники, поліпшення яких є кінцевою метою фахівця, що приймає рішення. На практиці далеко не всі екологічні явища і процеси можна вивчити за допомогою методики детермінованого факторного аналізу, оскільки в більшості випадків їх не можна звести до математичних залежностей, де величинам факторного показника відповідає єдина величина результативного показника.

Частіше в екологічних дослідженнях зустрічаються стохастичні залежності, які відрізняються приблизністю та невизначеністю. Вони проявляються тільки в середньому по значній кількості об'єктів і спостережень. У стохастичних залежностях кожній величині факторного показника може відповідати декілька значень результативного показника. Ця обставина пояснюється тим, що всі фактори, від яких залежить результативний показник, діють в комплексі і взаємо зв'язано. В залежності від того, наскільки оптимально сполучаються різні фактори, настільки буде рівновеликим ступінь впливу кожного з них на величину результативного показника.

Взаємозв'язок між факторами і результативним показником проявиться, якщо взяти для дослідження велику кількість спостережень по досліджуваних об'єктах і порівняти їх значення. Тоді відповідно до закону великих чисел вплив інших факторів на результативний показник згладжується, нейтралізується. Це дає можливість встановити силу зв'язку і співвідношення між явищами, що вивчаються.

Кореляційний (стохастичний) зв'язок – це неповна, імовірнісна залежність між показниками, що проявляється тільки в масі спостережень. Розрізняють парну і множинну кореляцію.

Парна кореляція – це зв'язок між двома показниками, один з яких являється факторним, а другий – результативним.

Екологічні явища і процеси залежать від великої кількості факторів. Як правило, кожен фактор окремо не визначає явища повністю. Тільки комплекс факторів у їх взаємозв'язку може дати більш чи менш повне уявлення про характер явища, що вивчається. Множинна кореляція виникає із взаємодії декількох факторів з результативним показником.

Застосування кореляційного аналізу дозволяє розв'язати такі задачі:

- 1) визначити зміну результативного показника під впливом одного або кількох факторів (в абсолютному виразі), тобто визначити, на скільки одиниць зміниться величина результативного показника при зміні факторного на одиницю;
- 2) встановити відносний ступінь залежності результативного показника від кожного фактора.

Дослідження кореляційних співвідношень має велике значення в аналізі екологічних процесів. Це проявляється в тому, що значно поглиблюється факторний аналіз, встановлюється місце і роль кожного фактору у формуванні рівня дослідження показників, поглиблюються знання про явища, що вивчаються, визначаються закономірностей їх розвитку. І як підсумок – точніше обґрунтовуються глобальні проекти захисту довкілля та поточні екологічні заходи. На тлі проведених досліджень більш об'єктивно оцінюється підсумок

природоохоронної діяльності підприємств і організацій та більш повно визначаються внутрішні резерви щодо покращення екологічної ситуації у досліджуваних районах.

Багатофакторний кореляційний аналіз складається з декількох етапів:

- на першому етапі визначаються фактори, які впливають на показник, що вивчається і відбираються найбільш суттєві для кореляційного аналізу;
- на другому етапі збирається і оцінюється вихідна інформація, необхідна для кореляційного аналізу;
- на третьому етапі вивчається характер і моделюється зв'язок між факторами і результативним показником, тобто підбирається і обґрунтовується математичне рівняння, яке найбільш точно виражає сутність залежності, що вивчається;
- на четвертому етапі проводиться розрахунок основних показників зв'язку кореляційного аналізу;
- на п'ятому етапі дається статистична оцінка результатів кореляційного аналізу і практичне їх застосування.

Щоб обрати фактори, які в подальшому будуть включені до множинної кореляції, проводиться аналіз парних регресій, при якому встановлюється наявність зв'язку між результативним показником і кожним із факторів. Обґрунтування рівняння зв'язку проводиться за допомогою співставлення паралельних рядів, групування даних і лінійних графіків. Розміщення точок на графіку покаже, яка залежність утворилася між показниками, що вивчаються: прямолінійна чи криволінійна.

Найбільш простим рівнянням, яке характеризує прямолінійну залежність між двома показниками, являється рівняння прямої:

$$Y_x = a + bx$$

де  $x$  – факторний показник;  $Y$  – результативний показник;  $a$  і  $b$  – параметри регресії, які потрібно знайти.

Це рівняння описує такий зв'язок між двома ознаками, при якому із зміною факторного показника на певну величину спостерігається рівномірне зростання чи зниження значення результативного показника.

Коефіцієнт  $a$  – постійна величина результативного показника, яка не зв'язана із зміною даного фактора і визначає основний рівень дії інших факторів. Параметр  $b$  показує зміну результативного показника із підвищенням чи зниженням величини фактора на одиницю його вимірювання. Підставивши в рівняння регресії відповідне значення  $x$  можна визначити вирівняне (теоретичне) значення результативного показника  $Y$ .

Таким чином можна визначити ступінь залежності між явищами, що вивчаються, однак регресійний аналіз не дає відповіді на питання: чи тісний цей зв'язок, та чи суттєво або другорядне діє даний фактор на величину результативного показника.

Для вимірювання тісноти зв'язку між факторними і результативними показниками визначають коефіцієнт кореляції. У випадку прямолінійної форми зв'язку між показниками, що вивчаються, коефіцієнт кореляції розраховують за формулою:

$$r = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}\right)\left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}\right)}} =$$

$$= \frac{\bar{x}\bar{y} - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left(\sum x^2 n - (\sum x)^2\right)\left(\sum y^2 n - (\sum y)^2\right)}}$$

Коефіцієнт кореляції може приймати значення від 0 до  $\pm 1$ . Чим ближче його величина до 1, тим тісніший зв'язок між явищами, що вивчаються і навпаки. В багатофакторну модель включаються ті з факторів, коефіцієнти кореляції яких досить високі, а залежність між факторним і результативним показником носить прямолінійний характер.

Одна з умов кореляційного аналізу – це однорідність досліджуваної інформації відносно розподілу її біля середнього рівня. Критеріями однорідності

інформації служать середньоквадратичне відхилення і коефіцієнт варіації, які розраховуються по кожному факторному і результативному показнику.

Середньоквадратичне відхилення показує абсолютне відхилення індивідуальних значень від середнього арифметичного. Воно визначається за формулою:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$$

Коефіцієнт варіації характеризує відносну міру відхилення окремих значень від середнього арифметичного. Для його розрахунку використовується формула:

$$V = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

Чим вищий коефіцієнт варіації, тим відносно більше розкидані дані навколо середнього значення даного показника і тим менша вирівненість (однорідність) об'єктів, що вивчаються. Мінливість варіаційного ряду прийнято вважати незначною, якщо коефіцієнт варіації не перевищує 10 %, середньою – при 10-20 %, значною – більше 20 %, але менше 33 %. Значення коефіцієнта варіації, що перевищує 33 % свідчить про неоднорідність інформації і про неможливість її використання в такому вигляді у подальших розрахунках.

Після відбору факторів і оцінки вихідної інформації важливою задачею в багатфакторному кореляційному аналізі є моделювання зв'язку між факторними і результативними показниками, тобто підбір відповідного рівняння, яке найкраще описує залежності, що вивчаються.

Для його обґрунтування використовуються ті ж прийоми, що й для встановлення наявності зв'язку. Якщо зв'язок всіх факторних показників з результативними носить прямолінійний характер, то для запису цих залежностей можна використати лінійну функцію:

$$Y_x = a + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + \dots + b_nx_n$$

В цій моделі коефіцієнти  $b_i$  показують, на скільки одиниць зміниться результативний показник із зміною факторного на одиницю в абсолютному виразі. Розв'язок задачі багатфакторного кореляційного аналізу проводять на ПЕОМ за типовими програмами із застосуванням широких можливостей пакету Microsoft Excel.

Розрахунок рівняння зв'язку (регресії) проводиться зазвичай кроковим способом. Спочатку в розрахунок приймається один фактор, що найбільше впливає на результативний показник, потім другий, третій і т. д. На кожному кроці розраховують рівняння зв'язку, множинний коефіцієнт кореляції і детермінації, критерій Фішера тощо [278].

Величина їх на кожному кроці порівнюється з попередньою. Чим більша величина коефіцієнтів множинної кореляції і детермінації і чим більше розрахунковий критерій Фішера відповідного табличного значення, тим точніше рівняння зв'язку описує залежності, що склались між досліджуваними показниками. Якщо додавання наступних факторів не покращує оціночних показників зв'язку, то їх треба відкинути, тобто зупинитись на тому рівні, де ці показники найбільш вагомі.

Коефіцієнти рівняння показують кількісний вплив кожного фактора на результативний показник при незмінності інших [278, 279].

Для того, щоб переконатись в надійності рівняння зв'язку і правомірності його використання з практичною метою, необхідно дати статистичну оцінку надійності показників зв'язку. Для цього використовується критерій Фішера (F-відношення). Критерій Фішера розраховується таким чином:

$$F = \frac{\sigma_{воспр}^2}{\sigma_{ост}^2}$$

$$\sigma_{воспр}^2 = \frac{\sum (Y_{x_i} - \bar{Y}_x)^2}{m - 1}$$

$$\sigma_{ост}^2 = \frac{\sum (Y_i - Y_{x_i})^2}{n - m}$$



де  $Y_{x_i}$  – індивідуальне значення результативного показника, розраховане за рівнянням;  $\bar{Y}_x$  – середнє значення результативного показника, розраховане по вихідних даних;  $Y_i$  – фактичне індивідуальне значення результативного показника;  $m$  – кількість параметрів у рівнянні зв'язку, враховуючи вільний член рівняння;  $n$  – кількість спостережень.

Фактична величина  $F$ -відношення, співставляється з табличним і робиться висновок про надійність зв'язку. Якщо  $F_{\text{факт}} < F_{\text{табл}}$ , то гіпотеза про відсутність зв'язку між результативним та факторними показниками відхиляється і побудована модель вважається адекватною.

Якщо кореляційний аналіз проведено правильно, то отримане рівняння можна використовувати для практичних цілей:

- 1) оцінки результатів впливу шкідливих факторів на довкілля;
- 2) розрахунку впливу факторів на приріст результативного показника;
- 3) підрахунку резервів покращення рівня досліджуваного показника;
- 4) планування і прогнозування його величини.

Таким чином, багатофакторний кореляційний аналіз має важливе наукове і практичне значення. Він дозволяє вивчити закономірності зміни результативного показника в залежності від поведінки різних факторів, визначити їх вплив на величину результативного показника, встановити, які з них є основними, а які – другорядними. Цим досягається більш об'єктивна і комплексна оцінка ступеня негативних впливів на довкілля [278 - 280].

*Кореляційно-регресійний аналіз впливу компонентного складу питних вод на показники життєдіяльності риб.*

Розглянемо багатофакторну кореляційну модель, де результативними показниками є бікарбонати, мг/дм<sup>3</sup>, кальцій, мг/дм<sup>3</sup>, сульфати, мг/дм<sup>3</sup>, хлориди, мг/дм<sup>3</sup>, сухий залишок органічних речовин, мг/дм<sup>3</sup>.

Факторними показниками є лімфоцити, моноцити, сегментоядерні нейтрофіли, паличкоядерні нейтрофіли, базофіли, еозинофіли. Аналіз

кореляційних зв'язків виявив високу щільність зв'язку між факторам впливу і показниками. Результати аналізу представлені в табл. 4.5.6 – 4.5.8.

Таблиця 4.5.6

Аналіз кореляційних зв'язків

| Оцінка щільності кореляційних зв'язків | Лімфоцити                 | Моноцити               | Сегментоядерні нейтрофіли | Паличкоядерні нейтрофіли | Базофіли               | Еозинофіли             |
|----------------------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
| Хлориди, мг/дм <sup>3</sup>            | -0,791                    | 0,674                  | -0,219                    | 0,518                    | 0,810                  | 0,881                  |
| Нітрати, мг/дм <sup>3</sup>            | -0,583                    | 0,389                  | -0,085                    | 0,109                    | 0,650                  | 0,737                  |
| Бікарбонати, мг/дм <sup>3</sup>        | -0,882                    | 0,715                  | 0,050                     | 0,476                    | 0,837                  | 0,947                  |
| Кальцій, мг/дм <sup>3</sup>            | -0,672                    | 0,554                  | -0,327                    | 0,320                    | 0,769                  | 0,791                  |
| Сухий залишок, мг/дм <sup>3</sup>      | -0,767                    | 0,609                  | -0,123                    | 0,352                    | 0,797                  | 0,880                  |
| Характ-ка кореляційного зв'язку        | Сильний зворотній зв'язок | Сильний прямий зв'язок | Слабкий зворотній зв'язок | Слабкий прямий зв'язок   | Сильний прямий зв'язок | Сильний прямий зв'язок |

Отже, основна маса діючих факторів має сильний вплив на кількість формених елементів крові риб, а саме на: лімфоцити, моноцити, базофіли, еозинофіли (де коефіцієнт кореляції суттєво перевищує значення 0,55). Більш слабкий вплив має склад питних вод на сегментоядерні нейтрофіли (тут максимальне значення коефіцієнта кореляції 0,327) та паличкоядерні нейтрофіли

(тут максимальне значення коефіцієнта кореляції 0,518) незначним є вплив нітратів на моноцити (тут значення коефіцієнта кореляції складає 0,389).

Вищесказане свідчить про правильний вибір діючих факторів для побудови моделі. Парні лінійні моделі показують високу щільність прилягання дослідних даних до лінійно вирівняних кривих. Про це свідчать наведені приклади графічних образів розроблених лінійних моделей, що представлені на рис. 4.5.5. – 4.5.7.

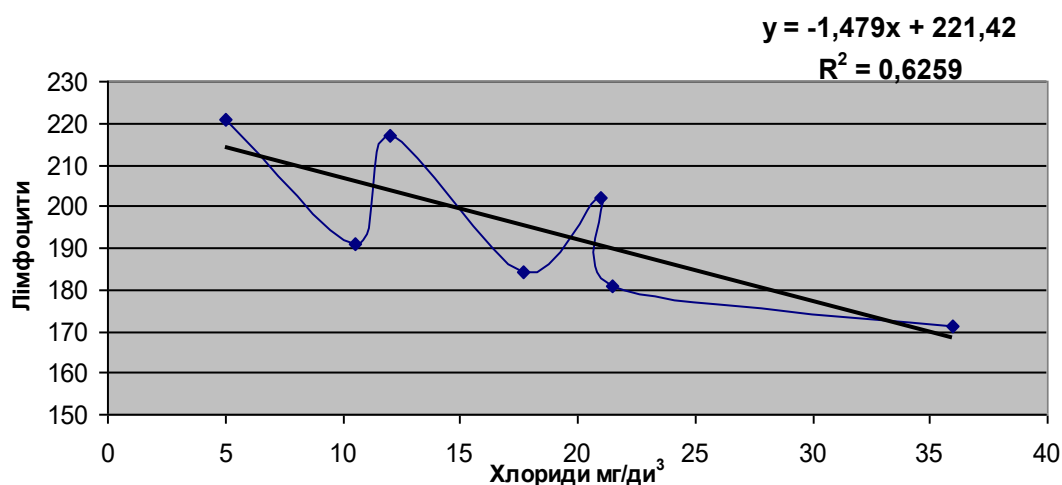


Рисунок 4.5.5. Лінійна модель «Лімфоцити-хлориди»

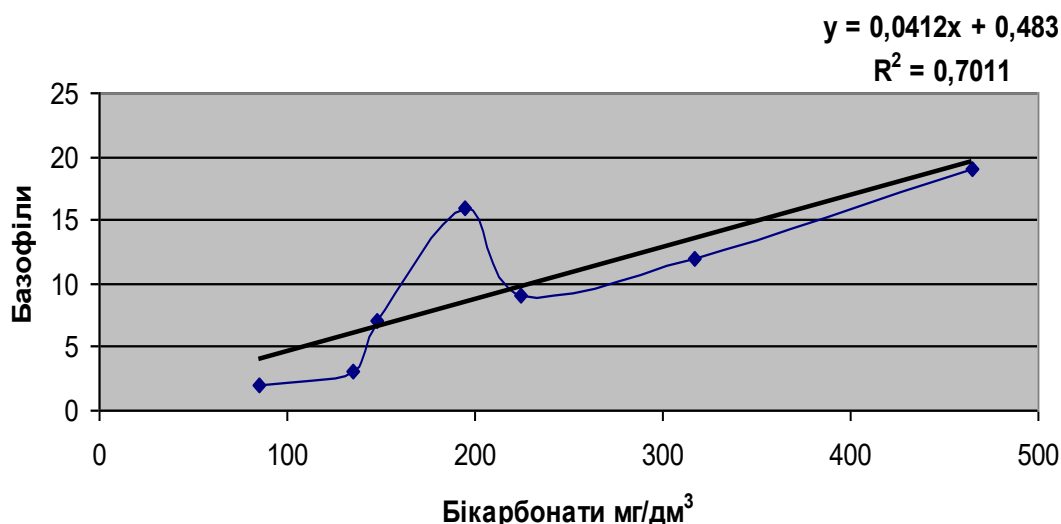


Рисунок 4.5.6. Лінійна модель «Базофіли-бікарбонати»

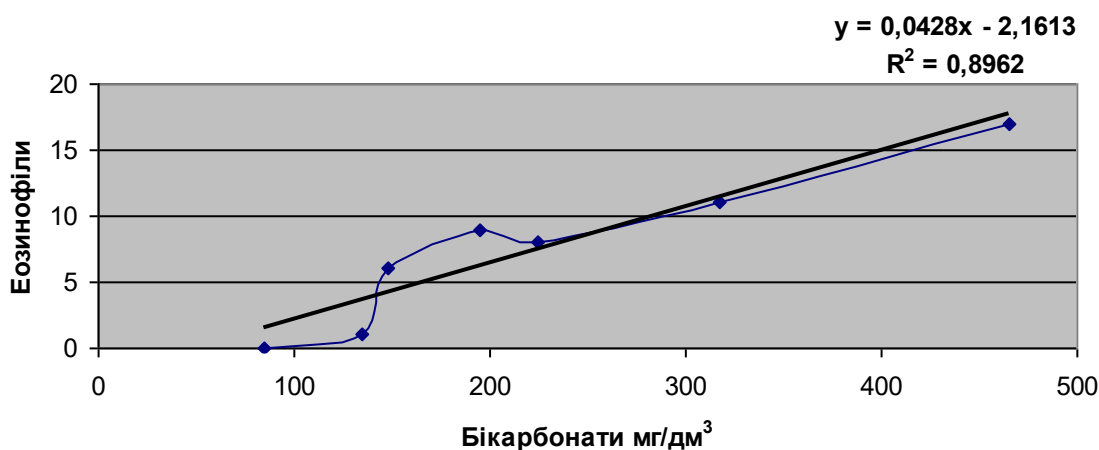


Рисунок . 4.5.7. Лінійна модель «Еозинофіли-бікарбонати»

Таблиця 4.5.7

#### Позначення параметрів моделей

| Позначення | Фактори             | Позначення | Результативні показники   |
|------------|---------------------|------------|---------------------------|
| X1         | Хлориди, мг/дм³     | Y1         | Лімфоцити                 |
| X2         | Нітрати, мг/дм³     | Y2         | Моноцити                  |
| X3         | Бікарбонати, мг/дм³ | Y3         | Сегментоядерні нейтрофіли |
| X4         | Кальцій, мг/дм³     | Y4         | Паличкоядерні нейтрофіли  |
| X5         | Сух.залишок, мг/дм³ | Y5         | Базофіли                  |
|            |                     | Y6         | Еозинофіли                |

Отже, побудовано адекватні лінійні багатofакторні моделі, які мають високі значення щільності групування між фактичними і розрахунковими даними (всі коефіцієнти детермінації та кореляції близько і більше 0,9). Ці моделі дозволяють з високою точністю прогнозувати вплив параметрів питної води на показники життєдіяльності риб і, таким чином, передбачати якісні показники питної води в широкому спектрі досліджуваних параметрів.

П'ятифакторні моделі залежності формених елементів периферичної крові риб від вмісту неорганічних складових та сухого залишку органічних речовин у питних водах.

|                                                                                                                |           |          |          |              |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|----------|----------|--------------|-----------|
| Повна модель для лімфоцитів: $Y_1 = 221,5 - 0,55X_1 + 0,42X_2 - 0,38X_3 - 0,91X_4 + 0,35X_5$                   |           |          |          |              |           |
| 0,34755                                                                                                        | -0,91102  | -0,37899 | 0,42411  | -0,55027     | 221,52717 |
| 0,45399                                                                                                        | 0,92958   | 0,28930  | 2,45655  | 1,92588      | 31,07868  |
| 0,93772                                                                                                        | 11,48401  |          |          |              |           |
| 3,01109                                                                                                        | 1         | $R^2 =$  | 0,93772  | $F =$        | 3,01109   |
| 1985,54619                                                                                                     | 131,88238 | Корел. = | 0,96836  | $F_{таб.} =$ | 6,60789   |
| Повна модель для моноцитів: $Y_2 = 2,15 - 0,13X_1 - 0,94X_2 + 0,11X_3 - 0,46X_4 - 0,08X_5$                     |           |          |          |              |           |
| -0,08498                                                                                                       | 0,45908   | 0,11521  | -0,93534 | -0,13168     | 2,15136   |
| 0,22567                                                                                                        | 0,46208   | 0,14381  | 1,22111  | 0,95732      | 15,44867  |
| 0,88397                                                                                                        | 5,70850   |          |          |              |           |
| 1,52374                                                                                                        | 1,00000   | $R^2 =$  | 0,88397  | $F =$        | 1,52374   |
| 248,27017                                                                                                      | 32,58698  | Корел. = | 0,94020  | $F_{таб.} =$ | 6,60789   |
| Повна модель для сегментоядерних нейтрофілів: $Y_3 = 18,45 + 0,39X_1 + 0,69X_2 - 0,016X_3 - 0,4X_4 - 0,034X_5$ |           |          |          |              |           |
| 0,03371                                                                                                        | -0,40085  | -0,01658 | 0,69264  | 0,38723      | 18,49649  |
| 0,07712                                                                                                        | 0,15791   | 0,04915  | 0,41730  | 0,32716      | 5,27946   |
| 0,94380                                                                                                        | 1,95083   |          |          |              |           |
| 3,35852                                                                                                        | 1,00000   | $R^2 =$  | 0,94380  | $F =$        | 3,35852   |
| 63,90853                                                                                                       | 3,80575   | Корел. = | 0,97149  | $F_{таб.} =$ | 6,60789   |
|                                                                                                                |           |          |          |              |           |

|                                                                                                            |          |          |          |              |                               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|--------------|-------------------------------|
|                                                                                                            |          |          |          |              | продовження<br>Таблиця. 4.5.8 |
| Повна модель для паличкоядерних нейтрофілів: $Y_4 = 2,87 + 0,11X_1 - 0,2X_2 + 0,03X_3 - 0,12X_4 - 0,36X_5$ |          |          |          |              |                               |
| -0,03565                                                                                                   | 0,12035  | 0,03299  | -0,20092 | 0,10888      | 2,87495                       |
| 0,05922                                                                                                    | 0,12126  | 0,03774  | 0,32045  | 0,25122      | 4,05407                       |
| 0,87124                                                                                                    | 1,49804  |          |          |              |                               |
| 1,35327                                                                                                    | 1,00000  | $R^2 =$  | 0,87124  | $F =$        | 1,35327                       |
| 15,18446                                                                                                   | 2,24411  | Корел. = | 0,93340  | $F_{таб.} =$ | 6,60789                       |
| Повна модель для базофілів: $Y_5 = 2,84 - 0,089X_1 - 0,21X_2 + 0,15X_3 + 0,54X_4 - 0,16X_5$                |          |          |          |              |                               |
| -0,15860                                                                                                   | 0,53835  | 0,14621  | -0,20649 | -0,08860     | 2,83978                       |
| 0,13865                                                                                                    | 0,28391  | 0,08836  | 0,75027  | 0,58819      | 9,49190                       |
| 0,94946                                                                                                    | 3,50739  |          |          |              |                               |
| 3,75761                                                                                                    | 1,00000  | $R^2 =$  | 0,94946  | $F =$        | 3,75761                       |
| 231,12678                                                                                                  | 12,30179 | Корел. = | 0,97440  | $F_{таб.} =$ | 6,60789                       |
| Повна модель для еозинофілів:<br>$Y_6 = 0,05 + 0,279X_1 + 0,094X_2 + 0,091X_3 + 0,17X_4 - 0,083X_5$        |          |          |          |              |                               |
| -0,08295                                                                                                   | 0,17319  | 0,09098  | 0,09386  | 0,26664      | -0,04998                      |
| 0,11880                                                                                                    | 0,24326  | 0,07571  | 0,64284  | 0,50397      | 8,13277                       |
| 0,95607                                                                                                    | 3,00517  |          |          |              |                               |
| 4,35242                                                                                                    | 1,00000  | $R^2 =$  | 0,95607  | $F =$        | 4,35242                       |
| 196,53474                                                                                                  | 9,03106  | Корел. = | 0,97779  | $F_{таб.} =$ | 6,60789                       |

Отримані закономірності дозволяють провести більш глибокий факторний аналіз зв'язків між комплексною дією складових питної води і рівнем життєдіяльності живих організмів. З проведеного кореляційно-регресійного аналізу та моделювання впливу діючих факторів на тест об'єкти можна зробити такі прогностичні зауваження:

- збільшення вмісту хлоридів у воді призведе до суттєвого збільшення їх токсичної дії в першу чергу на лімфоцити крові, базофіли, еозинофіли та моноцити;
- підвищення вмісту в воді нітратів негативно відіб'ється на вмісті в крові базофілів, еозинофілів та лімфоцитів;
- збільшення вмісту бікарбонатів позначиться шкідливим впливом на еозинофіли, лімфоцити, базофіли та моноцити.
- збільшення вмісту кальцію відіб'ється на концентрації еозинофілів, базофілів та лімфоцитів крові;
- збільшення сухого залишку у воді свідчить про відхилення від нормальних концентрацій лімфоцитів, еозинофілів, базофілів та моноцитів.
- слід зазначити, що відхилення від нормальних значень більшості складових питної води не суттєво позначиться на сегментоядерних та паличкоядерних нейтрофілах.

Дана залежність свідчить про наявність і організмі досліджуваних риб запальних та інфекційних процесів, а також вказує на адаптацію імунітету риб.

Отже, для покращення якості питної води Києва можна рекомендувати впроваджувати такі організаційні та природоохоронні заходи, які спрямовані на оптимізацію компонентного складу питної води міста, що сприятиме підвищенню рівня захисних сил організму киян.

#### **Висновки до розділу 4**

Отримані результати стосовно визначення токсичності гідроекології з використанням комплексного біотестування показали, що водні проби в районі

Вишгорода і Хотянівка можна віднести до II-го класу 3 категорії і характеризується як добру (добра вода). Водні проби, відібрані в м. Києва та в 5 км нижче міста відносяться до V-го класу 7 категорії і характеризується як дуже погана (дуже брудна). Забруднення води нітратами має антропогенне і природне походження. Встановлено, що вода, забруднена нітратами (ГДК 45 мг/л) негативно впливає на живі організми та їх клітини крові.

При оцінці токсичності на клітинному рівні дозволить отримати інформацію про стан імунітету біоти і рівень впливу стресових факторів. Результати досліджень свідчать про можливість використання наноаквацитратів міді і срібла у концентрації 0,01 мг/дм<sup>3</sup> в рибному господарстві і акваріумістиці.

Відповідно до діючих гігієнічних вимог до якості води централізованих систем питного водопостачання (ВОЗ): загальна кількість кишкових паличок *E. coli* в 1 см<sup>3</sup> води не повинне перевищувати 3 КОЕ. Наші дослідження доводить, що наявність бактерії *E. coli* в питній воді категорично не припустимо.

Використання класичних тест-об'єктів при дослідженні токсичності води з гербіцидами, не є зручним, оскільки не дозволяє визначити їх наявність у широкому діапазоні концентрацій. Проте, застосування гідробіонтів цілком можливе, адже їх лінійна залежність між дозою токсиканта та виживання є рівномірною.

Результати дослідження показали, що використання як тест-організмів так і їх клітин доцільно застосовувати для комплексної оцінки якості поверхневих і питних вод, поряд зі стандартними методами.

Основні результати досліджень опубліковано у наукових працях Верголяс М.Р. [1, 2, 5, 8, 10, 12, 19, 22]



## **РОЗДІЛ 5. ОЦІНКА ТОКСИЧНОГО ВПЛИВУ ВОДИ НА ОРГАНІЗМ ЩУРІВ**

### **5.1. Оцінка зміни маси тіла та внутрішніх органів.**

Загальна теорія систем в біології виділяє надорганізмовий (популяційний) рівень та рівень цілісного організму, за яким слідують системний, органний, тканинний, клітинний та субклітинний. У токсикології вказаному підходу зокрема відповідає розподілення показників на інтегральні (неспецифічні) та специфічні. Перші дозволяють переважно судити про стан всього організму, або його найважливіших систем, другі – про стан окремих органів або функцій. При цьому інтегральні показники, такі як маса тіла, морфологічний склад крові, морфологічні зміни в органах, коефіцієнт маси внутрішніх органів – виглядають біологічно більш значущими [281]. Однак, визначення специфічних показників, які відображають дію досліджуваної речовини на окремі системи та органи, метаболічні процеси, активність ферментів дозволяє встановити механізм дії і найбільш ранні прояви токсичного ефекту [282].

До інтегральних показників, які відображають стан організму відноситься маса тіла тварин та відносна маса або індекс маси внутрішніх органів. Динаміка зміни маси тіла експериментальних тварин під час експозиції відображає загальний стан організму та загальної (неспецифічної) реакції на інтоксикацію. Це дозволяє у процесі експерименту швидко оцінити стан організму тварин, рівень розвитку інтоксикації, а також скорегувати за необхідності хід експерименту [281].

Органами-мішенями токсичного впливу хімічних речовин на організм в першу чергу є печінка, селезінка, нирки. При цьому маса тіла тварин може не змінюватись, тому, поруч з визначенням маси тіла оцінюють абсолютну і відносну масу (маса органу/маса тіла  $\times 100$ ) внутрішніх органів. Ці показники відносно прості і досить чутливі і показові. Абсолютний і відносний показник маси приблизно однаково інформативний лише у випадку, коли відсутні значні відмінності у масі тіла тварин. У зв'язку з цим, абсолютні показники

використовують лише при відсутності розбіжностей у масі дослідних і контрольних тварин. У випадку, коли маса тіла тварин відрізняється співставляють відносні показники маси органів [282].

На початку експерименту маса тіла щурів була в межах 150-180 г. Тварини були розподілені в дослідні групи методом випадкової вибірки, середня маса у кожній групі статистично достовірно не відрізнялася одна від одної.

Проведені дослідження впливу води з різних джерел водопостачання на організм щурів виявили зміни маси тіла контрольних і дослідних щурів в динаміці експерименту. Так, у щурів контрольної групи, які пили контрольну воду, приготовлену за рецептурою, маса тіла в динаміці експерименту поступово зростала (через 1 тиждень – на 7,8%, через 1 місяць – на 12,1% і через 2 місяці – на 22,4 %). У дослідній групі № 2 тварин, які споживали воду з водогону динаміка зміни маси тіла мала різнонаправлений характер, тобто, через 1 тиждень вона знизилась на 12,4% , а через 1 і 2 місяці зросла на 16,9% і 8,4% порівняно з їх початковою масою. Маса тіла щурів в дослідній групі № 3 після вживання води з бювету через 1 тиждень зменшилась на 10,4%, а після 1 і 2 х місяців зросла на 26,6% і 7,8% відповідно з вихідним станом. У щурів групи № 4, які пили воду «Знаменська» також було визначено зменшення маси через 1 тиждень на 10,5%, тоді як через 1 і 2 місяці вона збільшилась на 20,9% і 8,2% порівняно з початком експерименту (табл. 5.1.1). Отже, отримані дані дозволяють припустити, найбільший несприятливий вплив на організм щурів справляла вода з водогону.

Таблиця 5.1.1

Зміни маси тіла контрольних і дослідних щурів, які пили воду з різних джерел водопостачання

| Група тварин    | На початок експерименту | Через 1 тиждень | Через 1 місяць | Через 2 місяці |
|-----------------|-------------------------|-----------------|----------------|----------------|
| Вода контрольна | 165,00±5,00             | 177,80±5,82     | 185,00±7,07*   | 202,00±9,03*   |
| Вода з водогону | 178,00±2,00             | 156,00±4,85*    | 208,00±1,22*   | 193,00±4,36*   |
| Вода з бювету   | 154,00±9,27             | 138,00±9,30     | 195,00±12,65*  | 166,00±9,27    |
| «Знаменівська»  | 182,00±7,35             | 163,00±9,82     | 220,00±12,45*  | 197,00±10,56   |

Примітка: \* –  $p \leq 0,05$  у порівнянні з масою тіла на початок експерименту

Дані щодо динаміки приросту маси тіла контрольних і дослідних щурів представлені на рисунку 5.1.1. Видно, що вживання контрольної води мало позитивний вплив на організм щурів і сприяло збільшенню їхньої маси тіла через тиждень в середньому на 12,8 г, через місяць на 20,0 г і через 2 місяці - 37,0 г. Тварини, що пили воду з водогону, бювету і бутильовану мали односпрямовану зміну маси тіла. Зокрема, через 1 тиждень маса тілах щурів з усіх 3-х дослідних груп знизилась на 22 г, 16 г і 19 г порівняно з початковою масою, що може вказувати на розвиток стресогенної реакції. Через 1 місяць експерименту маса тіла усіх піддослідних тварин збільшилась (на 30 г, 41 г і 38 г) порівняно з попередніми даними.

Це може свідчити про включення адаптаційно-компенсаторних реакцій. Зменшення ж маси тіла щурів 2, 3 і 4 груп через 2 місяці порівняно з попереднім терміном експерименту в середньому на 15 г, 29 г і 23 г може вказувати на несприятливий вплив вживаної ними води на організм (рис. 5.1.1.).

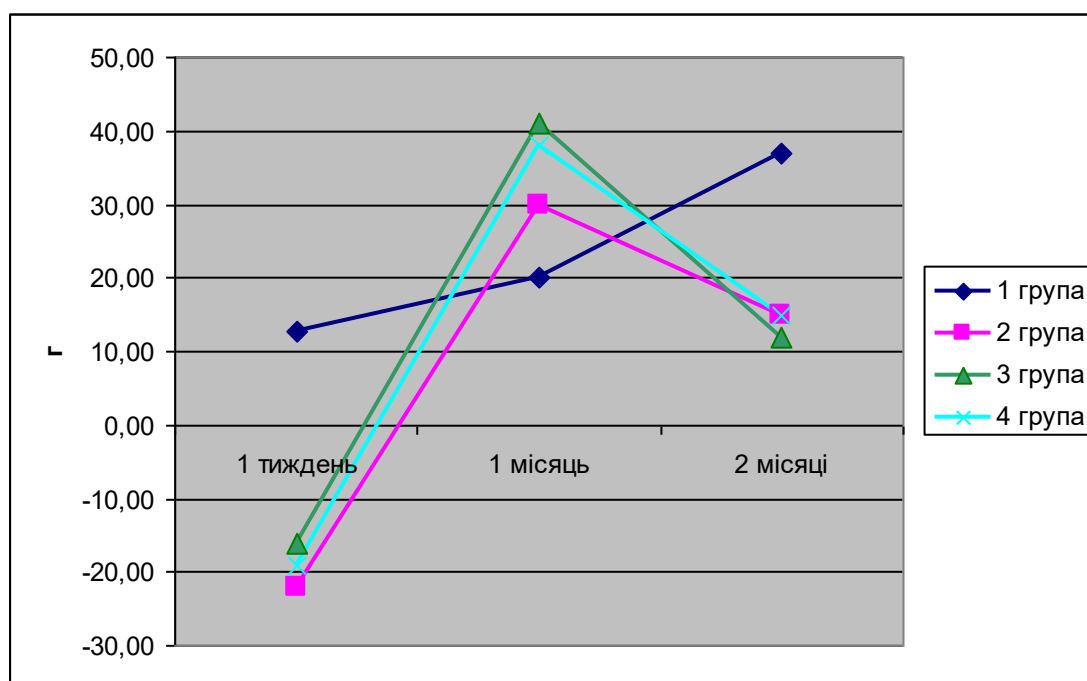


Рисунок 5.1.1 Динаміка зміни маси тіла контрольних і дослідних щурів, які пили воду з різних джерел водопостачання.

*Примітка:* 1 група - вода контрольна; 2 група – вода з водогону; 3 група - вода з бювету; 4 група – вода «Знаменівська».

Узагальнюючи отримані результати дослідження, слід зазначити, що враховуючи показники зміни маси тіла піддослідних тварин, як інтегрального показника токсичної дії, можна зробити висновок, що позитивний вплив на організм мала вода контрольна, тоді як інші води мали негативний вплив на стан щурів, при цьому найбільш несприятливим було вживання води з водогону.

Після закінчення експерименту усіх дослідних тварин знеживлювали, забирали і зважували внутрішні органи - печінку, серце, нирки, селезінку та тимус. Кожен орган ретельно оглядали з поверхні та на розріз. При візуальній оцінці не спостерігали патологічних змін і яких-небудь групових особливостей у структурі органів, тоді як зважування виявило групові відмінності відносної маси окремих внутрішніх органів (табл. 5.1.2). Як видно з представлених даних, відносна маса серця, норок і тимуса у тварин дослідних груп була такою, як і в групі, що пили контрольну воду. Останнє може свідчити про відсутність вираженого впливу досліджуваних вод на розвиток цих органів. Проте, відносна маса печінки і селезінки у щурів, які пили воду з водогону та «Знаменівська» була значно меншою (печінки - на 11% і 14%, а селезінки – на 24% і 26%) за показники у тварин, що вживали контрольну воду.

Таблиця 5.1.2

Відношення маси органів контрольних і дослідних щурів, які пили воду з різних джерел водопостачання

| Найменування джерела води | Відносна маса органа (маса органа/маса тіла x100 г), $M \pm m$ |           |             |           |             |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
|                           | серце                                                          | нирка     | печінка     | тимус     | селезінка   |
| Контрольна                | 0,38±0,01                                                      | 0,33±0,02 | 2,91±0,11   | 0,14±0,02 | 0,50±0,02   |
| З водогону                | 0,37±0,02                                                      | 0,32±0,01 | 2,59±0,06 * | 0,16±0,01 | 0,38±0,03 * |
| З бювету                  | 0,38±0,02                                                      | 0,36±0,02 | 2,89±0,13   | 0,18±0,02 | 0,44±0,03   |
| Знаменівська"             | 0,36±0,01                                                      | 0,33±0,01 | 2,50±0,10 * | 0,16±0,01 | 0,37±0,02*  |

\* –  $p \leq 0,05$  у порівнянні з постекспозиційним періодом.

Отримані результати, дозволяють припустити про негативний вплив води з водогону і бутильованої води «Знаменівська» на розвиток печінки та селезінки, а отже, на їхню структуру та функцію.

## **5.2. Зміни показників периферичної крові**

Як відомо в організмі, за дії несприятливих чинників навколишнього середовища виникають фізіологічні, генетичні, біохімічні, морфологічні та інші зміни [282]. Серед інтегральних показників, що дозволяють простежити порушення на різних рівнях функціонування організму, є показники периферичної крові. Використання гематологічних та біохімічних показників крові для моніторингу стану здоров'я людини відзначено в роботах багатьох авторів [51, 282 - 284].

Результати хімічного аналізу досліджуваних зразків питної води показали, що контрольна вода містила мікро- і макроелементи, вміст яких не перевищував нормативні показники, а саме, гранично допустиму концентрацію (ГДК) згідно ДСанПін 2.2.4-171-10 [285] (табл.5.2.1).

У воді з водопроводу порівняно з контрольною вміст окремих елементів був вищим, так значення Fe перевищувало більше ніж в 10 разів. У воді з бювету встановлено перевищення ГДК для As (у 3,6 рази), Mn (у 1,2 рази) і Si (у 1,2 рази). У фасованій воді значення ГДК перевищував тільки вміст Si (у 1,4 рази) (див.табл. 5.2.1).

Відомо, що система крові є однією з надчутливих до дії потенційно небезпечних екзогенних чинників, вплив яких характеризується як загальними, так і специфічними проявами. Основними механізмами гематотоксичної дії є порушення еритропоезу, пригнічення процесу синтезу гему і глобіну, а також мембрано- та цитотоксична дія, що призводить до зниження тривалості життя клітин крові та зміна кількісного складу [51, 283].

Отримані нами результати свідчать, що вміст еритроцитів в крові дослідних груп щурів не відрізнявся від контрольної. Концентрація гемоглобіну в крові щурів, які пили контрольну воду на кінець експерименту склала  $111,40 \pm 3,94$  г/л.

Вміст макро- та мікроелементів у досліджуваних зразках питної води з різних джерел водопостачання

| Елементи  | Зразки води     |                  |                |               |                          |
|-----------|-----------------|------------------|----------------|---------------|--------------------------|
|           | Вода контрольна | Вода водопроводу | Вода з б'ювету | Вода фасована | ГДК ДсанПін 2.2.4-171-10 |
| Al, мкг/л | 1,30±0,26       | 21,00±4,20       | 19,00±3,80     | <0,0009       | 100                      |
| As, мкг/л | 3,30±0,66       | 5,20±1,04        | 36,00±7,20     | 4,70±0,94     | 10                       |
| Ag, мкг/л | <0,6            | <0,6             | <0,6           | <0,6          | 25                       |
| Ba, мкг/л | 0,36±0,07       | 28,00±5,60       | 5,40±1,08      | 1,50±0,30     | 100                      |
| Ca, мг/л  | 21,66±4,33      | 60,23±12,05      | 132,7±26,54    | 6,12±1,22     | <130                     |
| Cd, мкг/л | <0,08           | <0,08            | <0,08          | <0,08         | 1.0                      |
| Co, мкг/л | 0,46±0,09       | 0,65±0,13        | 3,40±0,68      | 4,50±0,90     | 100                      |
| Cr, мкг/л | <0,2            | <0,2             | <0,2           | <0,2          | 50                       |
| Cu, мкг/л | <0,4            | <0,4             | <0,4           | <0,4          | 1000                     |
| Fe, мг/л  | <0,1            | 126,0±25,20      | 30,00±6,00     | <0,1          | 200                      |
| K, мг/л   | 0,99±0,19       | 1,58±0,32        | 3,94±0,79      | 0,95±0,19     | до 20                    |
| Mg, мг/л  | 10,11±2,02      | 12,36±2,47       | 16,55±3,31     | 1,68±0,34     | <80                      |
| Mn, мкг/л | 0,01±0,002      | 41,00±8,20       | 60,00±12,00    | <0,1          | 50                       |
| Mo, мкг/л | 0,06±0,012      | <0,5             | <0,5           | <0,5          | 70                       |
| Na, мг/л  | 27,46±5,49      | 8,85±1,77        | 12,03±2,41     | 69,57±13,91   | <200                     |
| Ni, мкг/л | <0,4            | <0,4             | <0,4           | 0,8           | 100                      |
| P, мг/л   | 0,006±0,001     | <0,004           | 0,031±0,006    | 0,20±0,04     | 3.5                      |
| Pb, мкг/л | <1,0            | 4,00±0,10        | <1,0           | <1,0          | 10                       |
| Se, мкг/л | <3,0            | <3,0             | 7,00±1,40      | <3,0          | 10                       |
| Sr, мг/л  | 0,013±0,003     | 0,19±0,04        | 0,58±0,12      | 0,053±0,01    | 7.0                      |
| Si, мг/л  | 0,018±0,04      | 1,76±0.35        | 11,84±2,37     | 14,19±2,84    | 10                       |
| V, мкг/л  | 14,00±2,80      | 14,00±0,30       | 11,00±2,20     | 9,00±1,80     | 100                      |
| Zn, мкг/л | 2,30±0,46       | 71,00±14,20      | 16,00±3,20     | 11,00±0,22    | 100                      |

У щурів 2-ої дослідної групи порівняно з 1-ою контрольною групою вміст гемоглобіну підвищився на 33,2%, в 3-ій – на 22,6%, а в 4-ій – на 17,6% відповідно ( $p<0,05$ ). У дослідних тварин, порівняно зі щурами 1-ої групи виявлено незначне збільшення гематокриту, що може бути обумовлено збільшенням загальної маси еритроцитів.

Що стосується розподілу клітин лейкоцитарного ряду, то вони також характеризувались певними змінами (табл. 5.2.2). Так, у щурів 2-ої дослідної групи, що пили воду з водопроводу встановлено збільшення кількості лейкоцитів (на 57,9%,  $p<0,05$ ), нейтрофілів сегментоядерних (на 63,5%,  $p<0,05$ ), зменшення чисельності лімфоцитів (на 22,1%,  $p<0,05$ ) і моноцитів (на 17, 7%,  $p<0,05$ ). У щурів 3-ої групи, які вживали воду з бювету у порівнянні з контрольними було виявлено підвищення кількості лейкоцитів (на 32,5%,  $p<0,05$ ), нейтрофілів сегментоядерних (на 95,7%,  $p<0,05$ ), а також зниження лімфоцитів (на 44,0%,  $p<0,05$ ).

Таблиця 5.2.2

Показники периферичної крові дослідних щурів, які пили воду з різних джерел водопостачання,  $M\pm m$

| Показники                      | Групи дослідних щурів |                       |                     |                    |
|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|
|                                | Вода<br>Контрольна    | Вода з<br>водопроводу | Вода з<br>Кювету    | Вода<br>Фасована   |
| Еритроцити, $\times 10^{12}/л$ | 9,72 $\pm$ 0,44       | 11,30 $\pm$ 1,27      | 10,02 $\pm$ 0,43    | 10,08 $\pm$ 0,12   |
| Гемоглобін, г/л                | 111,40 $\pm$ 9,94     | 148,40 $\pm$ 8,75*    | 136,60 $\pm$ 11,08* | 131,00 $\pm$ 3,11* |
| Гематокрит, %                  | 40,80 $\pm$ 1,93      | 46,40 $\pm$ 2,38      | 44,40 $\pm$ 1,50    | 43,80 $\pm$ 1,56   |
| лейкоцити $\times 10^9/л$      | 7,58 $\pm$ 0,35       | 11,52 $\pm$ 0,95*     | 10,04 $\pm$ 1,28*   | 9,18 $\pm$ 0,25*   |
| лімфоцити, %                   | 45,40 $\pm$ 1,89      | 35,40 $\pm$ 1,63*     | 25,45 $\pm$ 3,03*   | 41,80 $\pm$ 2,82   |
| моноцити, %                    | 28,40 $\pm$ 1,50      | 23,40 $\pm$ 1,54*     | 25,00 $\pm$ 1,67    | 26,40 $\pm$ 4,39   |
| нейтрофіли с/я, %              | 23,00 $\pm$ 1,34      | 37,60 $\pm$ 1,91*     | 45,00 $\pm$ 3,74*   | 28,40 $\pm$ 2,25   |
| нейтрофіли п/я, %              | 2,60 $\pm$ 0,51       | 3,20 $\pm$ 0,86       | 2,60 $\pm$ 0,51     | 4,00 $\pm$ 0,63    |
| еозинофіли, %                  | 0,60 $\pm$ 0,24       | 0,40 $\pm$ 0,24       | 2,00 $\pm$ 0,45*    | 1,40 $\pm$ 0,68    |

Примітка: в цій та наступних таблицях \* –  $p<0,05$  у порівнянні з показниками в 1-ій контрольній групі щурів, які вживали контрольну воду.

Визначені зміни у клітинному складі периферичної крові дослідних щурів можуть вказувати на активацію клітин неспецифічної природної резистентності. Порушення співвідношення клітинних популяцій крові тварин, яким давали фасовану воду були найменшим, при цьому відзначали збільшення кількості лейкоцитів (на 21,0 %,  $p < 0,05$ ).

Під час експерименту у дослідних щурів були встановлені зміни окремих біохімічних показників, що характеризують обмінні процеси в організмі (табл. 5.2.3). Так, після вживання щурами води з водопроводу, бювету та фасованої в сироватці крові було визначено незначне збільшення вмісту загального білка порівняно з 1-ою контрольною групою (на 4,8%, 4,7% і 12,8% відповідно). Слід відзначити, що вміст альбуміну в крові щурів усіх дослідних груп був на рівні контрольних значень. Під час експерименту встановлено, що у щурів 2-ої і 3-ьої дослідних груп вміст холестерину в крові був вищим в 1,4 і 1,3 рази, а тригліцеридів (на 14,3% і 36,7%,  $p < 0,05$  порівняно з показниками в 1-ій контрольній групі тварин. Встановлене підвищення рівня холестерину та тригліцеридів можуть бути ознакою несприятливого впливу води з водопроводу та бювету на ліпідний обмін.

В усіх дослідних щурів концентрація глюкози в крові була підвищеною (в 1,5; 1,3 і 1,5 рази) порівняно зі значенням в 1-ій групі тварин, що може вказувати на порушення її утворення та обміну (табл. 5.2.3).

За даними літератури, гіперглікемія є частим симптомом при різних захворюваннях, насамперед, пов'язаних зі змінами в ендокринній системі [286, 287]

Порушення у функціонуванні внутрішніх органів за дії несприятливих чинників дозволяє оцінити біохімічний аналіз крові. Так, про функціональний стан печінки можуть свідчити такі показники, як активність ферментів: аланінамінотрансферази (АлАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ), лужної фосфатази (ЛФ), гамма-глутамілтрансферази (ГГТ), а також вміст білірубину і сечової кислоти.



Таблиця 5.2.3

Біохімічні показники сироватки крові дослідних щурів, які пили воду з різних джерел водопостачання,  $M \pm m$

| Показники                | Вода контрольна | Вода з водопроводу | Вода з бювету | Вода фасована |
|--------------------------|-----------------|--------------------|---------------|---------------|
| Загальний білок, г/л     | 70,64±1,06      | 74,05±0,26*        | 73,98±0,94*   | 79,64±0,56*   |
| Альбумін, %              | 33,98±0,42      | 35,38±0,54         | 35,08±0,65    | 33,80±0,77    |
| Холестерин, ммоль/л      | 1,35±0,04       | 1,89±0,06*         | 1,72±0,24*    | 1,28±0,04     |
| Тригліцериди, ммоль/л    | 0,49±0,05       | 0,56±0,03*         | 0,67±0,03*    | 0,45±0,02     |
| Глюкоза, ммоль/л         | 2,34±0,11       | 3,55±0,18*         | 3,08±0,09*    | 3,40±0,13*    |
| АсАТ, ОД/л               | 187,50±3,40     | 235,60±13,20*      | 239,00±7,58   | 172,0±10,06*  |
| АлАТ, ОД/л               | 78,80±3,60      | 78,25±2,39         | 69,00±3,34*   | 65,18±0,99*   |
| ГГТ, ОД/л                | 45,00±3,45      | 56,60±1,94*        | 70,80±2,15*   | 45,00±2,74    |
| ЛФ, ОД/л                 | 90,80±0,89      | 85,50±5,48         | 87,35±4,87    | 87,20±7,83    |
| Лактатдегідрогеназа МЕ/л | 0,99±0,03       | 1,08±0,05          | 1,09±0,07     | 1,05±0,04     |
| Альфа амілаза, ОД/л      | 463,00±34,26    | 626,00±73,04*      | 650,75±16,52* | 378,40±17,60* |
| Сечова кислота, ммоль/л  | 65,50±0,94      | 72,45±7,26*        | 74,08±0,82*   | 60,28±1,36    |
| Сечовина, ммоль/л        | 5,00±0,22       | 6,38±0,18*         | 6,30±0,30*    | 4,76±0,49     |
| Креатинін, мкмоль/л      | 48,00±1,34      | 56,80±2,85*        | 46,25±1,49    | 50,75±2,56    |

Примітка: \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з показниками в контрольній групі щурів, які вживали контрольну воду.

Активність трансаміназ у сироватці крові є одним з найбільш цінних і найпоширених в клінічній практиці показників. Вибіркова тканинна локалізація дозволяє вважати трансамінази маркерними ферментами ушкодження органів, зокрема: АлАТ - печінки, а АсАТ - міокарду [287 -289].

Результати виконаних досліджень показали, що у щурів 2-ої і 3-ьої дослідних груп, що вживали воду з водопроводу та бювету виявлено підвищення активності ферменту АсАТ (на 25,7% і 27,4%, порівняно зі щурами 1-ої групи, які пили контрольну воду,  $p < 0,05$ ). Активність ферменту АлАТ була зниженою в 3-ій та 4-ій дослідних групах порівняно з показниками в 1-й групі (на 14,0% і 18,0% відповідно,  $p < 0,05$ ). Що стосується лужної фосфатази, то в усіх дослідних групах активність цього ферменту не змінювалась. Активність ферменту ГГТ була збільшеною в сироватці крові щурів, які пили воду з водопроводу і бювету (на 25,8% і 57,3% порівняно з 1-ою групою тварин,  $p < 0,05$ ). У крові щурів, що пили фасовану воду, активність цього ферменту була на рівні контрольних значень (табл. 5.2.3).

Для оцінки тяжкості ураження печінки використовують коефіцієнт де Рітіса, який визначається як співвідношення активності АсАТ до АлАТ. Встановлено, що при запальних процесах у печінці спостерігається підвищення активності АлАТ і зменшення коефіцієнта де Рітіса, а при некрозі гепатоцитів зростає активність АсАТ, що призводить до підвищення коефіцієнту [290, 291].

Проведені розрахунки показали, що у групі щурів, які пили контрольну воду і фасовану воду коефіцієнт де Рітіса становив 2,4 і 2,6 відповідно, а у щурів, яким давали воду з водогону і бювету цей показник був збільшеним (до 3,0 і 3,5). Отже, отримані результати дозволяють припустити, що вживання щурами води з водопроводу і бювету впродовж 2-х місяців спричинило підвищення активності трансаміназ, збільшення коефіцієнта де Рітіса, активності фермента ГГТ, що може вказувати на несприятливу дію води з водопроводу і бювету на печінку.

Як видно з даних, представлених в таблиці 3, вживання питної води в усіх дослідних групах не впливало на активність лужної фосфатази та лактатдегідрогенази. У дослідних щурів, які пили воду з водопроводу і бювету

була підвищеною активність  $\alpha$ -амілази (на 35% і 40,6%,  $p < 0,05$  порівняно зі значенням в 1-ій групі). У щурів, яким давали пити фасовану воду активність цього ферменту порівняно з тваринами 1-ої групи була зниженою (на 18,3%) (табл. 5.2.3). Фермент  $\alpha$ -амілаза – є показником, що характеризує стан підшлункової залози, збільшення активності цього ферменту в сироватці крові спостерігається при різних захворюваннях підшлункової залози [291].

У тварин 2-ої і 3-ьої дослідних груп встановлено незначне збільшення вмісту сечової кислоти (на 10,6% і 13,1%) і достовірне підвищення сечовини (на 27,6% і 26,0%,  $p < 0,05$ ) порівняно з тваринами, що пили контрольну воду. У тварин 2-ої та 3-ьої дослідних груп визначено також збільшення вмісту креатиніну (на 18,3% і 5,7% ). Збільшення вмісту сечовини та креатиніну в клінічній практиці розглядають як ранні ознаки погіршення функції нирок.

Таким чином отримані результати дослідження стану організму щурів, які пили воду з різних джерел водопостачання дозволяють зробити наступні висновки.

У результаті проведених досліджень виявлено деякі особливості специфіки впливу питної води у залежності від джерела її відбору та елементного складу на регулюючі системи, внутрішні органи та біохімічні процеси в організмі дослідних щурів, насамперед, на периферичну кров та паренхіматозні органи (печінка, нирки, підшлункова залоза).

Встановлені порушення вмісту гемоглобіну, ліпідного та вуглеводного обмінів, активність внутрішньоклітинних ферментів вказують на зміни у функціонуванні печінки, нирок і підшлункової залози у дослідних щурів за умови вживання питної води з водопроводу та бювету.

Виявлені порушення гематологічних і біохімічних показників у щурів за впливу питної води з різних джерел водопостачання, що відрізнялись за мінеральним складом потребують продовження досліджень, зокрема застосування морфологічних методів для детального вивчення структури внутрішніх органів.

### 5.3. Порушення показників неспецифічної резистентності та імунологічної реактивності

Важливим показником токсичного ураження будь-якого органу є його відносна маса та структурні зміни, які в подальшому відображаються на його функції. Як відомо, імунна система організму є багатокомпонентною, до складу її входять імунні органи — центральні (тимус, кістковий мозок) та периферичні (селезінка, лімфатичні вузли, дифузна лімфоїдна тканина), клітинні та гуморальні компоненти. Органи імунної системи відіграють провідну роль у формуванні імунітету. У ссавців проліферація та диференціювання імунокомпетентних клітин відбувається в центральних органах імунної системи. Т-лімфоцити дозрівають у тимусі, а В-лімфоцити — у кістковому мозку. Далі ці клітини мігрують до периферичних імунних органів (селезінка, лімфатичні вузли), де відбувається розвиток клітинної та гуморальної імунної відповіді [294 - 297]

Під час проведених досліджень основні імунні органи (тимус, селезінка) відібрали після декапітації щурів під легким ефірним наркозом. У всіх тварин визначали відносну масу тимуса та селезінки на 100 г маси тіла (табл.5.3.1). Аналіз отриманих даних показав, що після двох місяців експерименту відносна маса тимуса у щурів всіх дослідних груп не відрізнялась від контрольних значень, тоді як маса селезінки достовірно знизилась в другій групі тварин, що пили воду з водогону (на 24,0%) і в 4-й групі, яким давали фасовану воду (на 26,0%) (табл. 5.6). Останнє може вказувати на дистрофічні зміни в селезінці, які формуються за несприятливого впливу цих типів води.

Оцінка фагоцитарної активності нейтрофілів крові. Процес фагоцитозу є одним з основних механізмів неспецифічної резистентності організму, що забезпечує захист від надходження чужорідних речовин. Завдяки антигенпризентуючій та ефекторній функціям фагоцити (макрофаги, нейтрофіли) можуть бути одночасно учасниками і регуляторами імунної відповіді. Порушення їх функціональної активності може стати причиною формування імунопатологічних процесів, зокрема хронічних інфекцій [295].

Значення відносної маси імунних органів щурів після вживання води з  
різних джерел водопостачання

| Групи тварин    | Відносна маса<br>тимусу | Відносна маса<br>селезінки |
|-----------------|-------------------------|----------------------------|
| Контрольна вода | 0,14±0,02               | 0,50±0,02                  |
| Вода з водогону | 0,16±0,01               | 0,38±0,03*                 |
| Вода з бювету   | 0,18±0,02               | 0,44±0,03                  |
| Вода фасована   | 0,16±0,01               | 0,37±0,02*                 |

Примітка: \*—  $p < 0,05$  у порівнянні з показниками в контрольній групі щурів, які вживали контрольну воду.

При споживанні щурами контрольної води фагоцитарна активність нейтрофілів була на рівні ФІ -  $60,00 \pm 1,67$  % і ФЧ -  $2,26 \pm 0,12$  умов.од. (ФЧ). Вода з водогону і бювету порівняно з контрольними величинами викликали зниження поглинальної активності нейтрофілів, а саме, ФІ до  $33,80 \pm 2,37$ % і  $31,80 \pm 4,22$ % (на 43,7% і 47,0% відповідно), а ФЧ до  $1,98 \pm 0,17$  умов. од. і  $1,84 \pm 0,09$  умов. од (на 12,4% і 18,6% ). У щурів, які пили фасовану воду, показники фагоцитарної активності нейтрофілів крові були на рівні значень в контрольній групі (табл. 5.3.2).

Метаболічна активність фагоцитів та їхня здатність до утворення активних форм кисню в процесі «респіраторного вибуху» у контрольній групі щурів була на рівні  $26,80 \pm 2,92$  % (НСТ- спонтанний ) і  $59,60 \pm 3,87$  % (НСТ-стимульований). При споживанні води з водогону кисень утворююча здатність нейтрофілів крові підвищилась на 30,6% і води фасованої – на 29,1% ( $p < 0,05$ ).

При цьому резервні можливості фагоцитів у щурів усіх дослідних груп суттєво знизились, зокрема, в 2-й групі - на 55,4%, 3-й – на 38,9% і в 4-й – на 20,8% (табл. 5.3.2).

Показники фагоцитарної активності нейтрофілів крові щурів після  
вживання води з різних джерел водопостачання

| Групи тварин    | Показники, $M \pm m$ |                  |                        |                           |
|-----------------|----------------------|------------------|------------------------|---------------------------|
|                 | ФІ, %                | ФЧ, умов.од      | НСТ-тест спонтанний, % | НСТ-тест стимульований, % |
| Контрольна вода | 60,00 $\pm$ 1,67     | 2,26 $\pm$ 0,12  | 26,80 $\pm$ 2,92       | 59,60 $\pm$ 3,87          |
| Вода з водогону | 33,80 $\pm$ 2,37*    | 1,98 $\pm$ 0,17  | 35,00 $\pm$ 2,00*      | 26,60 $\pm$ 2,09*         |
| Вода з бювету   | 31,80 $\pm$ 4,22*    | 1,84 $\pm$ 0,09* | 25,40 $\pm$ 0,93       | 36,40 $\pm$ 1,91*         |
| Вода фасована   | 56,60 $\pm$ 1,91     | 2,18 $\pm$ 0,13  | 34,60 $\pm$ 1,72*      | 47,20 $\pm$ 1,07*         |

Примітка: \*–  $p < 0,05$  у порівнянні з показниками в контрольній групі щурів, які вживали контрольну воду.

Отримані результати дозволяють припустити, що вживання води з водогону і бювету викликало несприятливий вплив на клітинні механізми неспецифічної природної резистентності, а саме, пригнічувало фагоцитарну активність нейтрофілів крові та резервні можливості фагоцитів, що в свою чергу може відобразитись на зниженні резистентності організму до інфекцій.

Визначення вмісту ЦК та титру комплементу в сироватці крові дослідних щурів. Утворення імунних комплексів (антиген-антитіло) є результатом гуморальної імунної відповіді організму на надходження чужорідних антигенів та важливим механізмом, який забезпечує їх видалення. За фізіологічних умов утворені імунні комплекси деякий час циркулюють в крові, після чого відбувається їх елімінація. Одночасно з цим, циркулюючі імунні комплекси (ЦК) середньої та низької молекулярної маси можуть запускати ланцюги патологічних реакцій, зокрема, аутоімунних та нагромадження у тканинах і органах. Це, в свою чергу, зумовлює посилену агрегацію та адгезію тромбоцитів, що призводить до порушення мікроциркуляції крові та облітерації судин мікроциркуляторного русла, пошкодження і некрозу тканин [295 - 297]

Визначення ЦІК в сироватці крові дослідних щурів показало, що у щурів 2-ої і 4-ої дослідних груп рівень ЦІК високомолекулярних був на рівні контрольної групи, тоді як у тварин 3-ої групи, що пили воду з бювету вміст ЦІК в.м. збільшився у 1,5 рази. Концентрація ЦІК з низькою молекулярною масою у щурів групи № 2 і 4 була нижче ніж за умови споживання контрольної води (на 34,5% і 25,7%) (табл. 5.3.3).

Таблиця 5.3.3

Вміст ЦІК у сироватці крові щурів після вживання води з різних джерел водопостачання

| Групи тварин    | Показники, М±m              |                           |                              |
|-----------------|-----------------------------|---------------------------|------------------------------|
|                 | ЦІК, од.опт.густ.           |                           | Титр<br>комплементу,<br>СН50 |
|                 | Високомолекулярні, ПЕГ 3,5% | Низькомолекулярні, ПЕГ 7% |                              |
| Вода контрольна | 14,74±1,01                  | 50,32±5,43                | 11,12±1,08                   |
| Вода з водогону | 11,00±2,77                  | 32,96±4,03*               | 13,42±0,54                   |
| Вода з бювету   | 22,04±2,31*                 | 42,88±2,16                | 13,97±0,67                   |
| Вода фасована   | 12,18±2,09                  | 37,40±1,77*               | 13,42±0,54                   |

Примітка: \*–  $p < 0,05$  у порівнянні з показниками в контрольній групі щурів, які вживали контрольну воду.

Зниження вмісту ЦІК в сироватці крові відбувається в наслідок їх активної елімінації шляхом фагоцитозу або перерозподілу з подальшим відкладенням в судинах і тканинах органів, зокрема нирок. Зменшення рівня ЦІК н.м. на фоні зниження фагоцитозу в нейтрофілах може вказувати на відкладення їх в судинах з наступним розвитком імунного запалення.

Зроблено висновки: У результаті досліджень отримані дані показали особливості специфіки впливу питної води у залежності від джерела її відбору та елементного складу на регулюючі системи, внутрішні органи. Відносна маса тимуса у щурів всіх дослідних груп не відрізнялась від контрольних значень, тоді як маса селезінки достовірно знизилась в групі тварин, що пили воду з

водогону (на 24,0%) і фасовану воду (на 26,0%). Це може вказувати на дистрофічні зміни в селезінці, які формуються за несприятливого впливу цих типів води.

Води з водопроводу і бювету у щурів викликало негативний вплив на клітинні механізми неспецифічної природної резистентності, також пригнічувало фагоцитарну активність нейтрофілів крові і резервні можливості фагоцитів. Такий прояв в свою чергу може позначитися на зниженні резистентності організму до інфекцій.

Зменшення рівня циркулюючі імунні комплекси в сироватці крові дослідних щурів з низькою молекулярною масою на фоні зниження фагоцитозу в нейтрофілах може вказувати на відкладення їх в судинах з наступним розвитком імунного запалення.

#### **5.4. Зміни ліпідного та вуглеводного обміну.**

Ліпіди (жири) – є обов'язковим компонентом клітин і тканин організму. Вони приймають участь у теплоізоляції, забезпечують значну частину добової потреби в енергії. У крові присутні 4 основні групи ліпідів: холестерин (холестерол), тригліцериди, фосфоліпіди, жирні кислоти. Холестерин є найважливішим показником ліпідного обміну, служить структурним компонентом клітинних мембран, бере участь у синтезі статевих гормонів, жовчних кислот, вітаміну D. Виділяють фракції холестерину – ліпопротеїди низької щільності (ЛПНЩ) і високої щільності (ЛПВП) і деякі інші, що розрізняються по складу і функціям. У печінці холестерин під час взаємодії з жирними кислотами (у вигляді ацил-КоА) утворює естери холестерину, які надходять у кров, де міститься певна кількість вільного холестерину. Зміна концентрації холестерину в крові пов'язана з функціональним станом печінки. Під час більшості функціонально компенсованих захворювань печінки спостерігають підвищений уміст холестерину в крові, тоді як у разі печінкової недостатності його вміст знижується. Підвищення рівня холестерину в крові



вважається чинником, що призводить до розвитку атеросклерозу - утворення специфічних бляшок у судинах [295, 298, 299].

Відомо, що у переважній більшості випадків розвиток серцево-судинних захворювань безпосередньо пов'язаний з порушенням ліпідного обміну. Так, при вивченні ліпідних спектрів у хворих на ішемічну хворобу серця практично завжди вдається виявити відхилення в обміні ліпідів або апополіпротеїнів, чим пояснюють виникнення атеросклеротичних змін у судинному руслі [296, 301].

Сучасні дані свідчать про участь ліпідів у таких мембрано залежних процесах, як транспорт речовин і катіонів, окисне фосфорилування, зв'язування гормонів, проведення нервового імпульсу, регуляція матричної активності хроматину тощо. Зміни складу ліпідів тягнуть за собою зсуви в активності мембрано зв'язаних ферментів, а це, у свою чергу, може викликати глибокі зміни всього клітинного метаболізму [295, 296, 302 - 304].

Споживання води щурами 2-ої і 3-ьої дослідних груп призвело до збільшення вмісту в крові концентрації холестерину в 1,4 і 1,3 рази порівняно з тваринами, що пили контрольну воду. У цих тварин було також встановлено підвищений вміст тригліцеридів (на 14,3% і 36,7%) (табл. 5.4.1).

Таблиця 5.4.1

Біохімічні показники сироватки крові, що характеризують ліпідний та вуглеводний обміни організму контрольних і дослідних щурів, які пили воду з різних джерел водопостачання

| Дослідні групи тварин  | Показники, М±m       |                        |                    |                     |
|------------------------|----------------------|------------------------|--------------------|---------------------|
|                        | Холестерин<br>моль/л | Тригліцериди<br>моль/л | α-амілаза,<br>ОД/л | Глюкоза,<br>ммоль/л |
| 1. Вода контрольна     | 1,35±0,04            | 0,49±0,05              | 463,00±34,26       | 2,34±0,11           |
| 2. Вода з водогону     | 1,89±0,06*           | 0,56±0,03              | 626,00±73,04*      | 3,55±0,18*          |
| 3. Вода з бювету       | 1,72±0,24*           | 0,67±0,03*             | 650,75±16,52*      | 3,08±0,09*          |
| 4. Вода «Знаменівська» | 1,28±0,04            | 0,45±0,02              | 378,40±17,60*      | 3,40±0,13*          |

Примітка: \*–  $p < 0,05$  у порівнянні з показниками в контрольній групі щурів, які вживали контрольну воду.

Отже, встановлені зміни у ліпідному обміні, зокрема підвищення рівня холестерину та тригліцеридів можуть бути ознакою несприятливого впливу води з водогону та бювету на ліпідний обмін, що може обумовити в подальшому розвиток атеросклерозу і розвиток патології серцево-судинної патології.

Показником, що характеризує стан підшлункової залози є фермент  $\alpha$ -амілаза гідролізує розщеплення крохмалю і глікогену до декстранів і мальтози. Збільшення активності цього ферменту в сироватці крові спостерігається при різних захворюваннях підшлункової залози [295, 304].

У дослідних щурів, які пили воду з водогону і бювету активність ферменту  $\alpha$ -амілаза була збільшеною порівняно зі значенням в контрольній групі (на 35% і 40,6%,  $p < 0,01$ ). У щурів, яким давали пити воду «Знаменівська» активність ферменту  $\alpha$ -амілаза навпаки була зниженою. Оскільки амілаза фільтрується в клубочках нирок, її активність в сироватці підвищується при гострій нирковій недостатності. Зниження активності ферментів порівняно з нормальними значеннями може бути при зниженому синтезі, вроджених дефіцитах, за наявності інгібіторів активності ферменту.

Вуглеводи є основним джерелом енергії для організму. Основним показником вуглеводного обміну є глюкоза. Концентрація її в крові є результатом співвідношення швидкості утворення глюкози з глікогену чи інших джерел, всмоктування її з шлунково-кишкового тракту і утилізація тканинами. Окиснюючись вона дає організму енергію і необхідні для життя метаболіти. Гіперглікемія є частим симптомом при різних захворюваннях, насамперед, пов'язаних зі змінами в ендокринній системі [295, 296, 304].

Концентрація глюкози в крові в усіх дослідних групах біла підвищеною (в 1,5; 1,3 і 1,5 рази) порівняно з значенням в контрольній групі. Зростання глюкози може бути при таких захворюваннях як: цукровий діабет, ендокринні порушення, гострий і хронічний панкреатит, муковісцидоз, пухлини підшлункової залози, хронічні захворювання печінки та нирок, інфаркт міокарда.

Таким чином, у результаті проведених досліджень виявлено деякі особливості специфіки впливу води у залежності від джерела її відбору, на

біохімічні процеси, морфологічну структуру, субклітинні та клітинні, регулюючі системи, насамперед, на паренхіматозні органи (печінка, нирки, підшлункова залоза). Всі зазначені вище порушення білкового, ліпідного та вуглеводного обміну, активність внутрішньоклітинних ферментів вказують на зміни у функціонуванні печінки, нирок і підшлункової залози у дослідних щурів за умови вживання неякісної питної води, якою є вода з водогону і бювету.

*Оцінка прооксидантно-антиоксидантного статусу у щурів після введення сполук свинцю.* Загальновизнано, що аеробне дихання і супутнє удосконалення антиоксидантною системи (АОС) були потужними факторами еволюційного розвитку. Для розуміння ролі активних форм кисню (АФК) в еволюції і підтримці життєздатності існуючих видів важливо врахувати, що АФК постійно продукуються усіма клітинами. АФК виконують чимало корисних і незамінних функцій. Єдиною прийнятною стратегією надійного функціонування живих систем є підтримка оптимального рівня АФК, який може бути забезпечений шляхом суворого контролю і підтримки рівноваги між процесами їх утворення та згасання. У нормальних умовах цей процес перебуває в рівновазі з можливостями АОС, яка відіграє важливу роль, захищає його системи і клітини від ушкодження вільними радикалами, які безперервно утворюються в живому організмі, а також сприяє відновленню працездатності систем, що відповідають за обмінні процеси. Відомо, що інтенсифікація вільнорадикальних процесів, перекисного окислення поліненасичених жирних кислот спостерігається при розвитку загального неспецифічного адаптаційного синдрому (стресу). Це відбувається практично при більшості гострих захворювань і станів, коли загострюються хронічні захворювання, виникають інтоксикації, травми тощо. В основі біологічної доцільності цієї інтенсифікації лежить посилення в екстремальних умовах синтезу ейкозаноїдів, оновлення мембран, що сприяють здійсненню детоксикаційних процесів, стабілізують стан організму. Одним із показників стану організму може бути стан антиоксидантної системи (АОС), оксидантної системи (ООС) та зміна активності основних ферментів циклу Кребса [291, 292].

Первинні продукти перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) – гідроперекиси ліпідів – є речовинами нестійкими, досить швидко руйнуються з утворенням вторинних продуктів перекисного окислення ліпідів. Серед них найбільш відомий малоновий діальдегід (МДА), накопиченням якого в організмі пояснюється формування синдрому інтоксикації, що супроводжує багато захворювань внутрішніх органів. Накопичення продуктів ПОЛ відбувається при будь-яких видах патологій. Отже, одним із несприятливих наслідків перекисного окислення ліпідів вважають утворення малонового діальдегіду (МДА), в результаті обумовленого вільними радикалами розриву поліненасичених жирних кислот [291].

Антиоксидантні ферменти утворюють єдиний метаболічний ланцюг, в якому продукт первинної реакції є субстратом наступної. Одними з важливих компонентів антирадикального і антиперекисного захисту є ферменти супероксиддисмутаза і каталаза [292].

Супероксиддисмутаза (СОД) є каталізатором реакції дисмутації - зворотнього перетворення АФК в кисень і перекис водню. СОД – металофермент, який відіграє ключову роль в антиоксидантному захисті організму. Відомі 3 форми СОД: цитозольна Cu / Zn-залежна СОД (СОД1), мітохондріальна Mn-залежна СОД (СОД2) і позаклітинна також Cu / Zn-залежна СОД (СОД3). Каталаза (КТ) є одним з найбільш потужних і ефективних природних каталізаторів. При високих концентраціях субстрату каталаза руйнує перекис не тільки з дивовижною швидкістю, але і без втрат відновного потенціалу клітини, завдяки тому, що активний центр ферменту «змушує» перекис виконувати роль одночасно донора і акцептора водню.

Високий рівень шкідливих для організму продуктів екзо- і ендогенного походження роблять печінку і нирки уразливими органами при різних типах інтоксикації, особливо на ранніх етапах розвитку. Отже, вивчення впливу токсикантів на окислювальний стрес є важливим у розумінні патогенезу розвитку тієї чи іншої патології [293].

Проведеними дослідженнями впливу води з різних джерел водопостачання на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу в організмі щурів, встановлено наступні зміни (табл. 5.4.2). У групах щурів, що впродовж 2-х місяців отримували воду з водогону та бювету виявлено збільшення кінцевого продукту ПОЛ вмісту МДА в сироватці крові на 24,9% і 19,3% порівняно з цим показником у щурів, яким давали контрольну воду. З боку ферментів антиоксидантів у цих двох дослідних групах щурів встановлено зниження активності СОД (на 11,2% і 33,0%) і КТ (на 45,9% і 47,3%) відповідно. У групі щурів, які вживали воду бутильовану «Знаменівська» суттєвих порушень у стані про-і антиоксидантій системах порівняно з тваринами, яким давали воду контрольну, встановлено не було.

Таблиця табл. 5.4.2

Вміст малонового діальдегіду та активність ферментів СОД і КТ в сироватці крові контрольних і дослідних щурів, що пили воду з різних джерел водопостачання

| Дослідні групи тварин | Показники, $M \pm m$ |                   |                  |
|-----------------------|----------------------|-------------------|------------------|
|                       | МДА, ммоль/л         | СОД               | КТ               |
| Вода контрольна       | 5,34 $\pm$ 0,24      | 39,70 $\pm$ 0,52  | 8,67 $\pm$ 0,56  |
| Вода з водогону       | 6,37 $\pm$ 0,11*     | 35,24 $\pm$ 1,46* | 4,69 $\pm$ 0,05* |
| Вода з бювету         | 6,67 $\pm$ 0,27*     | 30,58 $\pm$ 0,35* | 4,57 $\pm$ 0,14* |
| Вода Знаменівська»    | 5,34 $\pm$ 0,23      | 36,55 $\pm$ 0,78  | 9,57 $\pm$ 0,39  |

Примітка: \*–  $p < 0,05$  у порівнянні з показниками в контрольній групі щурів, які вживали контрольну воду.

Таким чином, проведеними дослідженнями встановлено зростання впливу на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу в організмі щурів води з водогону та збювету. Зокрема, це проявлялося накопиченням у крові

низькомолекулярного маркера наявності оксидативного стресу – МДА та пригнічення активності ферментів антиоксидантів – СОД і КТ .

*Оцінка впливу питної води з різних джерел водопостачання на показники імунної системи.*

Імунна система – одна з гомеостатичних систем організму. Основна її функція полягає у забезпеченні захисту організму від різних чужорідних агентів та власних видозмінених структур. Порушення, що виникають у структурі та діяльності даної системи, мають важливе значення у формуванні патологій бронхо-легеневої, серцево-судинної, нервової та ендокринної систем, алергічних, онкологічних та аутоімунних захворювань [294].

Відповідь імунної системи на антигенний подразник поділяють на природний імунітет (неспецифічна резистентність), який успадковується і властивий даному організму з народження, та адаптивний (специфічний) імунітет, який формується протягом життя в результаті імунізації до різних інфекцій. До факторів неспецифічної резистентності організму (НРО) відносяться біологічні бар'єри (шкіра і слизові оболонки), бактерицидні субстанції клітин, гідролітичні ферменти та інші. НРО забезпечує первинний захист організму від широкого спектру різноманітних несприятливих чинників і тісно пов'язана зі специфічною імунною відповіддю. Механізми специфічного імунітету включаються після дії антигену. Вони обумовлені функціональною активністю антиген-специфічних лімфоцитів (клітинна відповідь) і специфічних антитіл (гуморальна відповідь). Клітинний імунітет представлений популяцією Т-лімфоцитів, серед яких виділяють кілери, супресори та хелпери. Гуморальний імунітет пов'язаний з синтезом плазматичними клітинами (В-лімфоцити) антитіл та їх взаємодією з антигеном. Сила і швидкість специфічного імунітету суттєво змінюється при повторному контакті з антигеном. Оскільки неспецифічна резистентність першою включається у захист організму від чужорідних антигенів, як інфекційного так і неінфекційного походження визначення її показників, першочерговим етапом було оцінити зміни саме цих показників [295, 296, 305, 306].

Під час досліджень визначали масу тіла контрольних та дослідних щурів та відносну масу імунних органів – тимуса і селезінки. У всіх групах тварин визначали фагоцитарну активність нейтрофілів периферичної крові (ФАН) до полістиролового латексу, яка включала: фагоцитарний індекс (ФІ)- кількість фагоцитуючих нейтрофілів, та фагоцитарне число (ФЧ) – середнє число часточок латексу, поглинутих одним нейтрофілом. У сироватці крові щурів визначали рівень циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) в реакції преципітації з поліетиленгліколем (ПЕГ) М=6000 (високомолекулярних – з 3,5% ПЕГ, а низькомолекулярних – з 7,0 % ПЕГ) [305 - 308].

*Оцінка стану водних екосистем річки Дніпра за показниками гістоморфології паранхіматозних органів тест-організмів*

Для дослідження впливу антропогенного забруднення, зразки води були відібрані з річки Дніпро (район Гідропарк і район Бортничі) в місті Києві. Досліди проводили на 30 статевозрілих щурах самцях лінії Вістар масою тіла 160–180 г, які впродовж двох місяців знаходились в умовах віварію на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до питної води. Тварини були розділені на три дослідні групи (по 10 особин в кожній групі). Перша група щурів (контрольна) впродовж експерименту пила воду, отриману згідно з рекомендаціям ДСТУ 4174:2003 (Державний стандарт України), друга група пила річкову воду з району Гідропарк, третя - з району Бортничі. Також для оцінки стану водних екосистем річки Дніпра, брали 20 риб - срібний карась (*Carassius gibelio*), вагою 10-12 г., виловлених з річки Дніпро. Експеримент повторювали двічі.

Після закінчення експерименту тварин знеживлювали під легким ефірним наркозом та забирали внутрішні органи для гістологічних досліджень. Шматочки внутрішніх органів експериментальних і контрольних тварин фіксували в 10 % нейтральному формаліні. Потім промивали в проточній воді протягом 24 годин, обезводнювали в спиртах висхідної концентрації (70, 80, 96, абсолютний спирт). Далі матеріал поводити через спирт - хлороформ, хлороформ, хлороформ - парафін та заливали в парафін. З парафінових блоків виготовляли зрізи

товщиною 4-5 мкм, які фарбували гематоксиліном і еозином за стандартними методиками [308 - 311]. Виготовлені препарати вивчали за допомогою мікроскопа Axion vision (Carl Zeiss) і виконували макрофотографування за допомогою вбудованої в нього камерою. Всі дослідження на щурах проводились відповідно до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях [312].

#### *Результати гістоморфологічного дослідження органів щурів.*

Печінка. Будова печінки у щурів (контрольна група) збережена, з добре помітними часточками. Печінкові часточки мають форму шестикутника і утворені печінковими балками і внутрічасточковими кровоносними капілярами. Центролобулярні вени широкі, заповнені вільно розміщеними або агрегованими еритроцитами. Синусоїди вузькі, вистелені суцільним шаром зірчастих ретикулоендотеліоцитів [314, 315].

Гепатоцити полігональної форми, містять центральне розташовані овальні ядра з ядерця і дифузно розподіленим хроматином. Гепатоцити портальної, проміжної і центральної зон з еозинофільною цитоплазмою. В окремих гепатоцитах - по два ядра. Портальні тракти трикутної або полігональної форми, містять в складі тріад дрібні артеріальні і венозні судини, а також жовчні протоки, кількість яких у складі індивідуальних портальних трактів варіює від одного до трьох. На окремих ділянках визначається повнокров'я синусоїдних капілярів, центральних і портальних вен. При ШИК-реакції практично у всіх гепатоцитах виявляється глікоген у вигляді дрібних дифузно розподілених в цитоплазмі гранул [315, 316].

Вода з р. Дніпра (район Гідропарк, м. Київ), капсула не потовщена. Здебільшого відмічається дисконкомплексція печінкових балок, поліморфізм часточок. Печінкові клітини неправильної багатокутної форми з округлими ексцентрично розташованими великими ядрами, що містять 2-4 компактних ядерця. Відзначаються окремі лімфогістіоцитарні гранульоми в області портальних трактів, з локалізацією великої кількості лімфоцитів по периферії гранульоми, в центрі - лімфоцити, плазматичні клітини, гістіоцити. з Вода з р.



Дніпра (район Бортничі). Печінкові клітини у досліджуваних щурів неправильної багатокутної форми з округлими ексцентрично розташованими великими ядрами, що містять 2-4 компактних ядерця. Осередкове повнокров'я (помірне і виражене) центральних, міжчасточкових вен та синусоїдних капілярів, розширення просторів Діссе [314 - 317 ].

Нирки. а) У корі рівномірно розташовані нефрони, що включають ниркові тільця, їх капсули, проксимальні і дистальні відділи, представлені звитими канальцями. Судинні клубочки, утворені капілярами, помірно повнокровні, просвіт капсул вільний. Проксимальні відділи звивистих канальців вистелені високим циліндричним епітелієм, звивистих канальців дистального відділу нефрона – циліндричним епітелієм без щіткової облямівки. Петлі нефронів, розташовані в мозковому шарі, нисхідні частини яких утворені прямими канальцями, стінка яких складається зі світлих плоских епітеліальних клітин. Висхідна частина петлі за будовою аналогічна дистальному відділу нефрона. Збірні трубки численні, розподілені рівномірно, вистелені одношаровим кубічним і циліндричним епітелієм, цитоплазма більшості клітин світла. Судини нирок помірно повнокровні, що найбільш виражено в юкстамедулярній зоні [314 - 317 ], рис. 5.4.1.

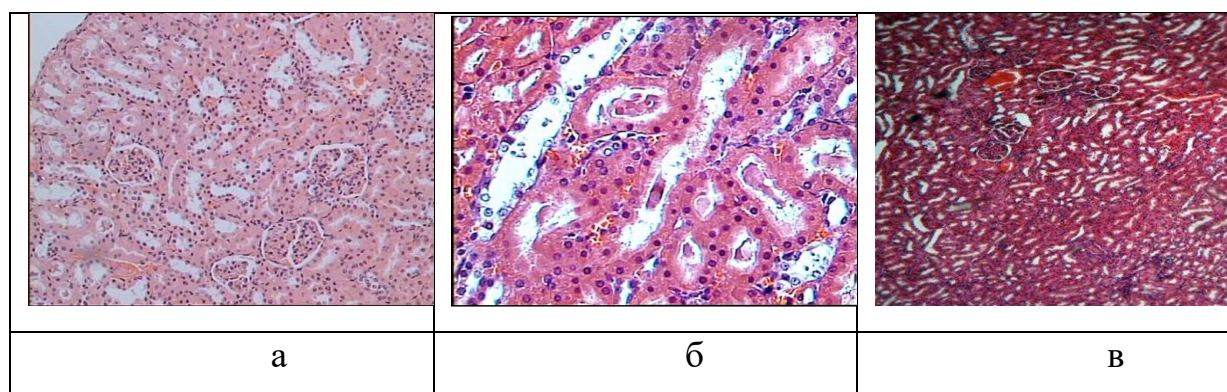


Рисунок 5.4.1. – Нирка щура. а) Контрольна група, б) вода з р. Дніпра (район Гідропарк, м. Київ), в) з р. Дніпра (район Бортничі). Забарвлення гематоксилін-еозином х400.

Капсула тонка (б). Клітинна будова клубочків відповідає нормі, відзначається осередкове повнокров'я капілярів клубочків, набухання і «гіперхромія»

ендотеліоцитів. Місцями відмічається зерниста дистрофія нефротелію проксимальних (звивистих) каналців нирок з наявністю в просвіті білкових мас (рис. 5). Дистальні (прямі) висхідні і низхідні каналці здебільшого не змінені. Ектазія і повнокров'я нечисленних венул кори. Збірні каналці мозкового шару мономорфного виду, епітеліальні клітини однорідної структури; зрідка відзначається везикуляція їх цитоплазми [316, 317].

Місцями відмічається повнокров'я капілярів клубочків (в). Відзначається дистрофія або фрагментація щіткової облямівки нефротелію проксимальних каналців з накопиченням в їх просвіті безформних слабооксіфільних грудочок або зернистих циліндрів. У деяких клітинах відзначені пікнотичної зміни ядер на тлі вираженого розширення просвіту каналців. Помірне і виражене повнокров'я венул кори [314 - 317].

Результати гістоморфологічного дослідження органів срібного карася.

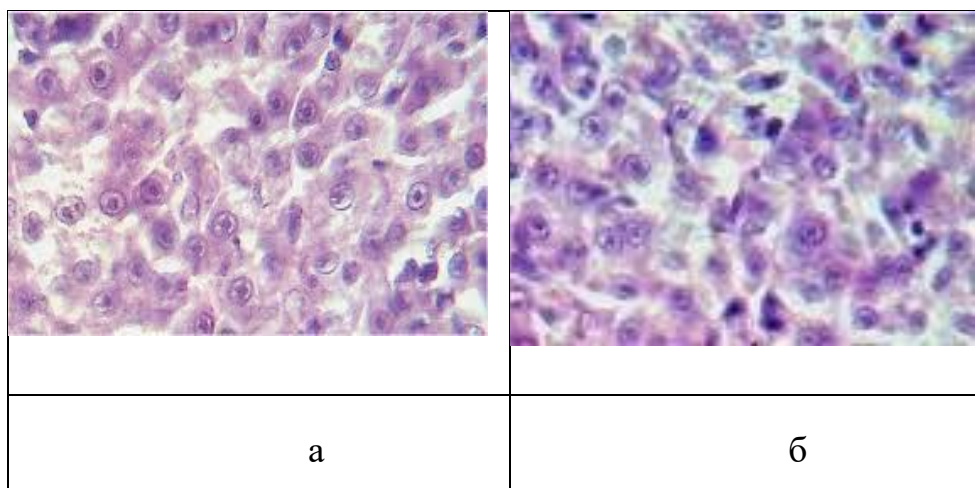


Рисунок 5.4.2. - Печінка срібного карася (*Carassius gibelio*). а) вода з р. Дніпра (район Гідропарк, м. Київ), б) з р. Дніпра (район Бортничі).Забарвлення гематоксилін-еозином х400.

На отриманих гістологічних даних печінки срібного карася (*Carassius gibelio*), виловлені з річки Дніпро, виявили патологічні відхилення (рис. 5.4.2).

У досліджуваних групах в печінці риб виявлені некрози, дистрофія гепатоцитів, місцями виявили скупчення двоядерних клітин і проліферація

купферовских клітин. Також спостерігалися зниження кількості клітин з глікогеном (ШИК-реакція). Виявлені численні осередки некрозів в печінці риб вказують на серйозну забруднення водного середовища. Некрози гепатоцитів в печінці риб є результатом забруднення вод важкими металами, також наслідком паразитарних інвазій. На гістологічних препаратах вогнища некротичні зміни клітин частіше виявлялися в печінці карася з району Бортничі [318, 319].

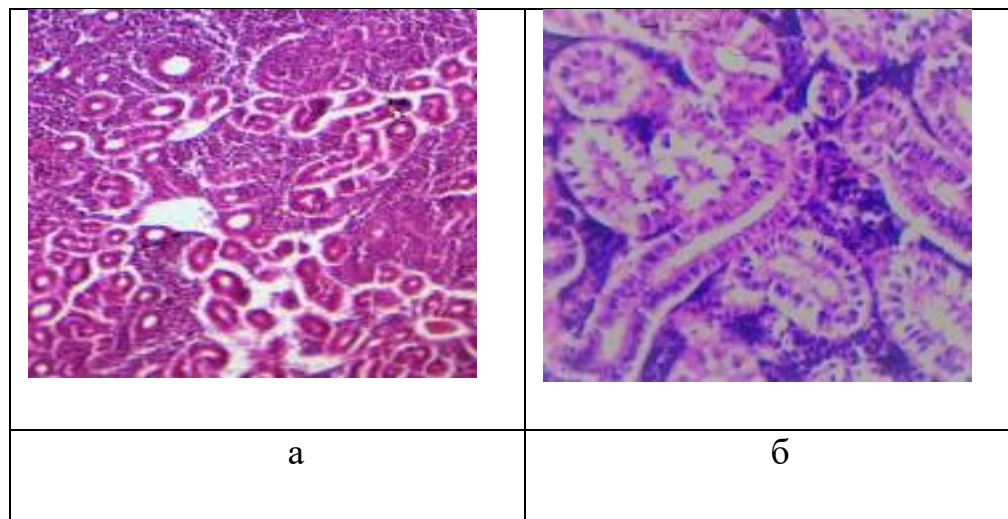


Рисунок 5.4.3 - Нирка срібного карася (*Carassius gibelio*). Забарвлення гематоксилін-еозином х400.

На гістологічних препаратах нирок срібного карася (*Carassius gibelio*), що мешкає в річці Дніпро (район Гідропарк і район Бортничі) в місті Києві, спостерігається фрагменти нирки з каналцями різних розмірів, щодо розширеними просвітами. Епітелій збережений. В окремих каналцях відзначаються дистрофічні зміни епітелію каналців. В стромі гістіоцитарна реакція, що відрізняється від норми і може свідчити про несприятливі умови для риб (рис. 5.4.3).

Беручи до уваги зростаючу кількість забруднювачів в річкових акваторіях, прилеглих до регіонів з високим рівнем індустріалізації, ці показники життєдіяльності гідробіонтів можуть бути використані для проведення постійного екологічного моніторингу природних вод, а також для оцінки потенційного

токсикологічного ризику присутніх в воді хімічних речовин для здоров'я людини [319 ].

Таким чином, проведені дослідження по визначенню впливу антропогенного забруднення річкових вод дозволили виявити зміни паренхіматозних органів (печінка, нирки) у досліджуваних тваринах щурів вістар та срібного карася, яких можна запропонувати для біоіндикації водного середовища. Отримані результати по виявленню зміни паренхіматозних органів щурів та риб під впливом забруднювачів прісної води, можуть бути екстрапольовані в певній мірі на здоров'я людини, враховуючи той факт, що річкова вода є одним з основних джерел питної води для населення України та інших країн світу.

### **Висновки до розділу 5**

Встановлено особливості токсичної дії води з різних джерел водопостачання за умови моделювання субхронічної інтоксикації тест-організм у щурів. Виявлено деякі особливості специфіки впливу питної води у залежності від джерела її відбору та елементного складу на регулюючі системи, внутрішні органи та біохімічні процеси в організмі дослідних щурів, насамперед, на периферичну кров та паренхіматозні органи (печінка, нирки, підшлункова залоза).

Наукової новизною роботи є, що за гістологічною структурою органів-індикаторів риб і щурів можна оцінити екологічний стан водних екосистем.

Результати дослідження дозволяють дійти висновку, що біотестування із використанням різних за рівнем організації тест-об'єктів дає можливість оцінити безпечність водного середовища, зокрема питних вод. Також їх доцільно використовувати у комплексній оцінці водних джерел разом з хімічними та мікробіологічними методами.

Основні результати досліджень опубліковано у наукових працях Верголяс М.Р. [15, 21, 32, 36, 37, 41]

## РОЗДІЛ 6. ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИЧНОЇ ДІЇ ЗРАЗКІВ ВОДИ В ЕКСПЕРИМЕНТАХ IN VITRO

### 6.1. Оцінка впливу зразків води на життєздатність та функції клітин.

Дослідження мутагенної активності води з бюветів у культурі лімфоцитів периферичної крові людини *in vitro* без і з метаболічною активацією. Розглянемо частоту аберацій хромосом у лімфоцитах периферичної крові (табл. 6.1.1).

Таблиця 6.1.1

Частота метафаз з абераціями хромосом в лімфоцитах периферичної крові  
людини

| Показники                                       | Кількість метафаз |              | Середня частота метафаз з абераціями, $M \pm m$ , в % |
|-------------------------------------------------|-------------------|--------------|-------------------------------------------------------|
|                                                 | Всього            | З абераціями |                                                       |
| Контроль                                        | 200               | 4            | $2,00 \pm 0,99$                                       |
| Контроль S-9                                    | 200               | 5            | $2,50 \pm 1,10$                                       |
| Мітоміцин-С (позитивний контроль без активації) | 100               | 15           | $15,00 \pm 3,57^1$                                    |
| Циклофосфан (позитивний контроль з активацією)  | 100               | 16           | $16,00 \pm 3,67^1$                                    |
| <i>Бювети без активації</i>                     |                   |              |                                                       |
| вул. Горького                                   | 200               |              | $3,00 \pm 1,21$                                       |
| вул. Раскової                                   | 60                |              | $3,33 \pm 2,32$                                       |
| бульв. Шевченка                                 | 200               |              | $4,00 \pm 1,39$                                       |
| Печерська Лавра (1)                             | 200               |              | $4,50 \pm 1,47$                                       |
| <i>Бювети з активацією</i>                      |                   |              |                                                       |
| вул. Горького                                   | 60                | 3            | $5,00 \pm 2,81$                                       |
| вул. Раскової                                   | -                 |              |                                                       |
| бульв. Шевченка                                 | -                 |              |                                                       |
| Печерська Лавра (1)                             | -                 |              |                                                       |

Примітка: -  $P \leq 0,01$

З даних таблиці видно, що статистично достовірного підвищення частоти метафаз з абераціями при дії буювотної води в експериментах без, і з метаболічною активацією не спостерігалось. Але слід зазначити токсичні ефекти: напівтоксичний – у варіанті без метаболічної активації в буювоті з вул. Раскової; напівтоксичний – у варіанті експерименту з метаболічною активацією в буювоті з вул. Горького; токсичний – в трьох інших буюветах.

Це свідчить про те, що в воді з буюветів присутні протоксиканти (речовини, які перетворюються в токсичні в присутності системи метаболічної активації).

При дії мітоміцину-С і циклофосфану (позитивні контролю) було встановлено достовірне ( $P < 0,001$ ) підвищення частоти аберантних метафаз, яке підтверджує адекватність використання даної тест-системи для дослідження цитогенетичної активності хімічних речовин.

Таблиця 6.1.2

Частота анеуплоїдних клітин у лімфоцитах периферичної крові людини.

| Показники                                          | Кількість метафаз |                     | Середня частота анеуплоїдних клітин, $M \pm m$ , % | Кількість поліплоїдів % |
|----------------------------------------------------|-------------------|---------------------|----------------------------------------------------|-------------------------|
|                                                    | Всього            | Анеуплоїдних клітин |                                                    |                         |
| Контроль                                           | 200               | 23                  | $11,50 \pm 2,30$                                   |                         |
| Контроль S-9                                       | 200               | 23                  | $11,50 \pm 2,30$                                   |                         |
| Мітоміцин-С<br>(позитивний контроль без активації) | 100               | 22                  | $22,00 \pm 4,10^1$                                 |                         |
| Циклофосфан<br>(позитивний контроль з активацією)  | 100               | 24                  | $24,00 \pm 4,30^1$                                 |                         |
| <i>Буювети без активації</i>                       |                   |                     |                                                    |                         |
| вул. Горького                                      | 200               | 23                  | $11,50 \pm 2,30$                                   |                         |
| вул. Раскової                                      | 60                | 7                   | $11,67 \pm 4,14$                                   |                         |
| бульв. Шевченка                                    | 200               | 25                  | $12,50 \pm 2,34$                                   |                         |
| Печерська Лавра (1)                                | 200               | 49                  | $24,50 \pm 3,04^1$                                 |                         |
| <i>Буювети з активацією</i>                        |                   |                     |                                                    |                         |
| вул. Горького                                      | 60                |                     | $8,33 \pm 3,57$                                    |                         |

Примітка: –  $P \leq 0,01$

З даних таблиці видно, що статистично достовірне підвищення частоти анеуплоїдних метафаз при дії бюветної води спостерігається тільки в пробі води з бювету Печерської Лаври (1), що свідчить про можливість виникнення канцерогенного ризику. Крім того, в двох водах (з вул. Раскової та Шевченка) виявлені поліплоїдні клітини, що також може свідчити (хоча і в меншій мірі) про можливість виникнення канцерогенного ризику.

Таблиця 6.1.3

Кількість і розподіл аберацій хромосом за типами в культурі лімфоцитів периферичної крові людини без і з метаболічною активацією

| Показники                                       | Тип аберацій      |                  |                   |                   |      |
|-------------------------------------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|------|
|                                                 | Хроматидні        |                  | Хромосомні        | М.а. <sup>4</sup> |      |
|                                                 | О.ф. <sup>1</sup> | Об. <sup>2</sup> | П.ф. <sup>3</sup> |                   |      |
| Контроль                                        | 4                 |                  |                   |                   | 1,00 |
| Контроль S-9                                    | 5                 |                  |                   |                   | 1,00 |
| Мітоміцин-С (позитивний контроль без активації) | 16                | 2                | 3                 | 5                 | 2,40 |
| Циклофосфан (позитивний контроль з активацією)  | 18                | 1                | 3                 | 4                 | 2,13 |
| <i>Бювет без активації</i>                      |                   |                  |                   |                   |      |
| вул. Горького                                   | 4                 |                  | 3                 |                   | 1,16 |
| вул. Раскової                                   | 2                 |                  |                   |                   | 1,00 |
| бульв. Шевченка                                 | 6                 |                  | 4                 | 2                 | 2,00 |
| Печерська Лавра (1)                             | 8                 |                  | 1                 | 3                 | 2,00 |
| <i>Бювети з активацією</i>                      |                   |                  |                   |                   |      |
| вул. Горького                                   | 3                 |                  | 1                 |                   | 1,33 |

Примітка: 1. О.ф. – поодинокі фрагменти; 2. Об. – обміни; 3. П.ф. – парні фрагменти; 4. М.а. – мультиаберативні клітини – кількість аберацій 3 і більше; 5. К-сть абер/аб. мет. – кількість аберацій на одну аберагентну метафазу.

Аберації хромосом, які спостерігалися при дії води бюветів, були представлені поодинокими і парними фрагментами – делеціями, що характерно для дії агентів хімічної природи [320]. Але слід зауважити, що в двох пробах

(вул. Горького та Шевченка) присутня дещо збільшена кількість парних фрагментів – можливий вплив реагентів радіаційної природи або важких металів

При дії на культуру лімфоцитів бюветної води виявлені мультіаберрантні клітини, що свідчить про її можливий вплив на систему репарації клітин. Кількісний показник аберацій по аберрантних метафазах на вул. Горького і Раскової відповідає характеристиці дії слабких мутагенів, а на вул. Шевченка та в Печерській Лаврі (1) – середніх мутагенів [321].

Висновки. Виходячи з того, що природні води можуть бути різного ступеню токсичності, причому токсичність їх може формуватися за рахунок різних чинників водного середовища, для визначення їх токсичності було сформовано тест-системи (кілька видів тваринних і рослинних тест-організмів), з підсумовуванням результатів біотестування (комплексний підхід). При цьому необхідно ретельно вибирати чутливі тест-реакції у відповідь і тест-критерії, які дозволяють адекватно оцінити якість досліджуваної води.

Згідно з експериментальними даними максимальне за тривалістю виживання спостерігалось у піддослідній групі ракоподібних у водному середовищі при співвідношенні кальцію до магнію 4 до 1. Враховуючи нетоксичність водного середовища, можна зробити висновок, що при такому співвідношенні цих елементів метаболічні процеси в організмі знаходяться в оптимальному режимі, що подовжує виживаність у *Daphnia magna*. Виходячи з того, що водні ракоподібні використовують для побудови зовнішніх стулок (скелета) кальцій, дослідження необхідно продовжити з іншими представниками набору тест-організмів – рибою, прісноводою гідрою, рослинами. Завдяки комплексному біотестуванню питних вод з різним сольовим складом можна отримати результати їх біологічних властивостей.

Проте, підвищення мінералізації і жорсткості водного розчину може привести до зниження токсичності розчинених в ньому токсичних речовин внаслідок зв'язування, утворення комплексів і підвищення резистентності тест-організмів. Тому при значних відхиленнях сольового складу від оптимального необхідно вносити певні корективи результатів біотестування [322-326].



Мутагенні властивості бюветної води досліджені в тесті, який дозволяє визначати здатність речовини індукувати хромосомні і геномні мутації *in vitro*. Вода з вулиці Горького. В експерименті з метаболічної активацією спостерігався полутоксическій ефект - можливу присутність протоксикантов. Мутагенних ефектів не виявлено в обох варіантах експериментів - без і з метаболічної активацією. Статистично достовірного підвищення частоти анеуплоїдних метафаз не спостерігалось, що свідчить про неможливість виникнення канцерогенного ризику. При дії на культуру лімфоцитів води мультіаберрантні клітини не виявлені, що свідчить про неможливість впливу на систему репарації клітин. Показник кількості аберацій на аберрантних метафазах в пробі води з бювету без метаболічної активації відповідає характеристиці дії слабких мутагенів. Але, присутні кілька збільшена кількість парних фрагментів - можливий вплив реагентів радіаційної природи або важких металів [324-329].

Таким чином, проба води з бювету володіє полутоксичним ефектом - протоксикант. Мутагенної, можливої канцерогенної активністю не володіє. На систему репарації клітин впливу не робить. Але, можливо з труб мігрують важкі метали

Вода з вулиці Раскової. В експерименті без метаболічної активації спостерігається напівтоксичний ефект, у варіанті експерименту з метаболічною активацією спостерігався токсичний ефект - можлива присутність прямих і непрямих токсикантів (протоксикантів).

У варіанті експерименту без метаболічної активації:

- мутагенних ефектів не виявлено;
- статистично достовірного підвищення частоти анеуплоїдних метафаз не спостерігалось, що свідчить про неможливість виникнення канцерогенного ризику. Однак, присутність поліплоїдні клітини нівелює це твердження, хоча не на 100%.
- при дії на культуру лімфоцитів води мультіаберрантні клітини не виявлені, що свідчить про неможливість впливу на систему репарації клітин.
- показник кількості аберацій на аберрантних метафазах в пробі води з бювету без метаболічної активації відповідає характеристиці дії не мутагенів.

Таким чином, проба води з бювету володіє напівтоксичним ефектом (без активації) і токсичним (з активацією), мутагенною активністю не володіє. На систему репарації клітин не впливає. Але, присутність поліплоїдних клітин показує якусь частку можливої канцерогенної активності.

Вода з бювету по вулиці Шевченка. В експерименті з метаболічної активації спостерігається токсичний ефект - протоксикант.

У варіанті експерименту без метаболічної активації:

- достовірного підвищення частоти аберацій не виявлено, але частота аберацій хромосом перевищує 3%, що говорить про потенційний ризик мутагенної активності.
- статистично достовірного підвищення частоти анеуплоїдних метафаз не спостерігалось, що свідчить про неможливість виникнення канцерогенного ризику. Однак, присутність поліплоїдних клітин нівелює це твердження, хоча не на 100%.
- при дії води на культуру лімфоцитів виявлені мультиаберрантні клітини, що свідчить про можливість впливу на систему репарації клітин.
- показник кількості аберацій з аберрантними метафазами в пробі води з бювету без метаболічної активації відповідає характеристиці дії середніх мутагенів.
- присутня дещо збільшена кількість парних фрагментів - можливий вплив реагентів радіаційної природи або важких металів [322-325].

Таким чином, у пробі води з бювету присутні протоксиканти, що мають потенційну мутагенну активність, впливають на систему репарації клітин. Присутність поліплоїдних клітин показує якусь частку можливої канцерогенної активності, крім того, можливо з труб у воду мігрують важкі метали. Вода з бювету Печерської Лаври(1). В експерименті з метаболічної активації спостерігається токсичний ефект - протоксикант.

У варіанті експерименту без метаболічної активації:

- достовірного підвищення частоти аберацій не виявлено, але частота аберацій хромосом перевищує 3%, що говорить про потенційний ризик мутагенної активності.

- спостерігається статистично достовірне підвищення частоти анеуплоїдних метафаз, що свідчить про можливість виникнення канцерогенного ризику.
- при дії води на культуру лімфоцитів виявлені мультіаберрантні клітини, що свідчить про можливість впливу на систему репарації клітин.
- показник кількості аберацій на аберрантним метафазу в пробі води з бювету без метаболічної активації відповідає характеристиці дії середніх мутагенів.

Таким чином, в пробі води з бювету присутні протоксиканти. Має потенційну мутагенною активністю. Досить високий відсоток можливого канцерогенного ризику. Впливає на систему репарації клітин [330 - 341].

#### *Вплив хімічного складу води на структуру та функції клітини*

Дослідження в МТТ-тесті цитотоксичної дії 4 разків питної води з різних джерел водопостачання, показали, що найбільшу токсичну активність по відношенню до ембріональних клітин нирки людини лінії НЕК-293 проявляла вода з водогону та бювету (кількість життєздатних клітин за їх впливу становила 64,41% і 77,00% відповідно). Контрольна вода і бутильована вода «Знаменівська» справляли значно менший вплив, кількість життєздатних клітин була 91,73% та 81,75%. В тесті з сульфородаміном В кількість живих клітин за впливу контрольної води становила 100,00%, води з водогону – 82,45%, води з бювету – 89,20%, а «Знаменівська» - 96,75%) (табл.6.1.4).

Таблиця 6.1.4

Життєздатність клітин лінії НЕК-293 за дії питної води з різних джерел водопостачання

| Методи дослідження       | % життєздатних клітин |                 |               |                     |
|--------------------------|-----------------------|-----------------|---------------|---------------------|
|                          | Вода контрольна       | Вода з водогону | Вода з бювету | Вода «Знаменівська» |
| МТТ-тест                 | 91,73±0,06            | 64,41±6,98      | 77,00±6,14    | 81,75±0,64          |
| Тест з сульфородаміном В | 100,00±0,00           | 82,45±0,50      | 89,20±3,40    | 96,75±1,05          |

Примітка: \* -  $p < 0,05$  у порівнянні з контролем

Отримані результати дозволяють припустити, що досліджувані зразки питної води проявляють приблизно однаковий вплив на синтез білка клітинами.

При дослідженні токсичності питної води з різних джерел по відношенню до фібробластів мишей (L929) було встановлено, що при додаванні до середовища культивування контрольної води кількість живих клітин склала 88,55%. Найбільшу цитотоксичну активність проявляла вода з бювету, кількість живих клітин при її додаванні до середовища інкубації була на рівні 58,56%, а також бутильована вода «Знаменівська» (кількість живих клітин склала 61,9%). В той же час, при додаванні до клітин води з водогону спостерігали збільшення показника оптичної густини в дослідних лунках до 134,3% порівняно з контрольними лунками. Це вказує на стимуляцію мітохондріальної активності та дихальної функції клітин [339-342].

Встановлене підвищення може бути обумовлено хімічним складом води з водогону, вірогідніше, за рахунок надлишкового вмісту в ній заліза, яке окислювачем і активує окисно-відновні процеси в клітинах. В тесті з сульфородаміном В для всіх зразків води було встановлено приблизно однакову виживаність клітин (на рівні 64-72 %). Тобто, досліджувана питна вода виявляла приблизно однаковий вплив на синтез білка клітинами. За результатами, що були отримані в тесті з нейтральним червоним всі досліджувані зразки води порівняно з контрольними показниками справляли незначний вплив на мембрани клітин і лізосоми (табл.6.1.5).

Таблиця 6.1.5

Життєздатність клітин лінії L 929 за дії води з різних джерел водопостачання

| Метод дослідження           | % життєздатних клітин |                 |               |                     |
|-----------------------------|-----------------------|-----------------|---------------|---------------------|
|                             | Вода контрольна       | Вода з водогону | Вода з бювету | Вода «Знаменівська» |
| МТТ-тест                    | 88,55±8,55            | 134,30±0,01     | 58,56±1,45    | 61,90±0,80          |
| Тест з сульфородаміном Б    | 70,40±1,50            | 66,85±3,05      | 65,50±1,60    | 68,90±4,50          |
| Тест з нейтральним червоним | 100,00±0,00           | 91,55±4,15      | 93,70±8,60    | 99,60±6,00          |

Примітка: \* -  $p < 0,05$  у порівнянні з контролем

При дослідженні токсичності питної води було встановлено її різний вплив не тільки на життєздатність клітин, а й на їх морфологічні зміни. Так, за внесення контрольної води у поживне середовище для культивування клітин лінії L 929 не спостерігали суттєвого порушення їхнього моношару. В окремих клітинах було виявлено збільшені вакуолі [342].

Слабке утворення кристалів формагану є ознаками низької життєздатності клітин. Це вказує цитотоксичну активність води з бювету. Дослідження, що були виконані на клітинах РТР дозволили встановити, що найбільшою цитотоксичною активністю в МТТ-тесті володіла вода з бювету (кількість живих клітин була 61, 5%), а найменшою вода контрольна (кількість живих клітин була 72,8%). Вода з водогону і бутильована «Знаменівська» мали однаковий вплив на виживаність клітин (65,5% і 66,75% живих клітин) (табл.6.1.6).

Таблиця 6.1.6

Життєздатність клітин лінії РТР за дії питної води з різних джерел  
водопостачання

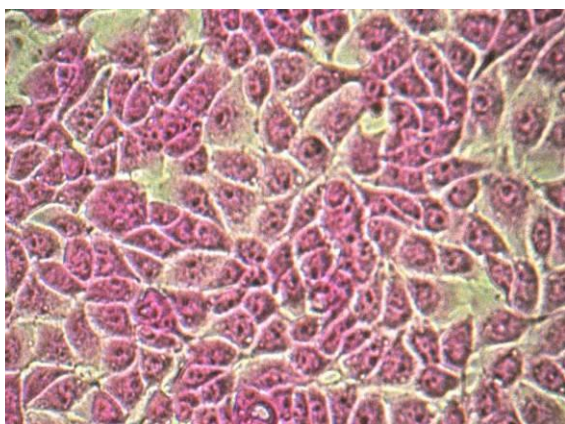
| Метод<br>Дослідження        | % життєздатних клітин |                    |                  |                        |
|-----------------------------|-----------------------|--------------------|------------------|------------------------|
|                             | Вода<br>контрольна    | Вода<br>з водогону | Вода<br>з бювету | Вода<br>«Знаменівська» |
| МТТ-тест                    | 72,80±0,60            | 65,50±4,40         | 61,50±8,00       | 66,75±5,45             |
| Тест з сульфородаміном В    | 81,45±6,90            | 68,20±1,80         | 66,95±1,95       | 69,45±4,65             |
| Тест з нейтральним червоним | 100,00±0,00           | 93,75±10,35        | 88,10±12,50      | 89,65±4,85             |

Примітка: \* -  $p < 0,05$  у порівнянні з контролем

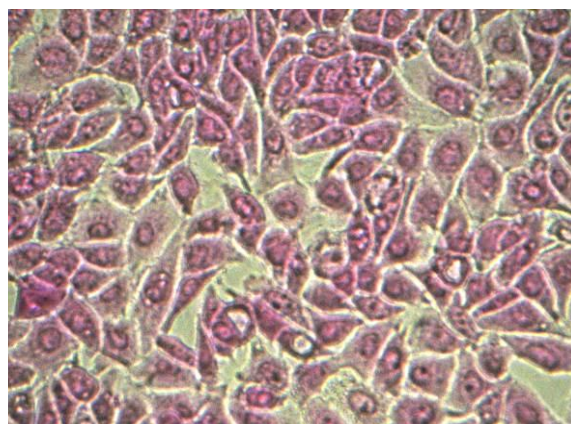
В тесті з сульфородаміном В кількість життєздатних клітин була найбільшою після додавання контрольної води (81,45%), води «Знаменівська» - 69,45%, води з водогону – 68,2%, а найменша за впливу води з бювету – 66,95%. Фарбування нейтральним червоним показало, що найбільшою цитотоксичною активністю володіла вода з бювету, про що свідчило зменшення кількості живих клітин до 88,1% порівняно з іншими зразками (табл.6.1.6).

При додаванні до клітин води з водогону спостерігали округлення та роз'єднання клітин, збільшення ядер клітин, зниження їх до адгезії, і як наслідок порушення моно шару (рис.6.1.1).

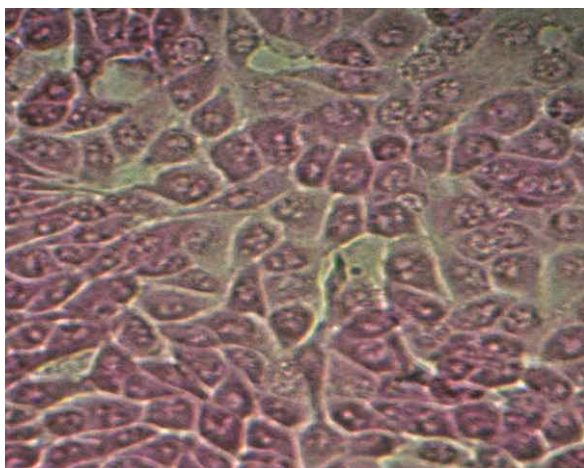
Інкубація клітин з водою із бювету сприяла підвищеній вакуолізації клітин, втраті клітинних контактів, їх округленню та лізису. Незначне порушення моношару фібробластів було встановлено за впливу бутильованої води «Знаменівська». За своєю морфологією клітини були подібні до тих, що зазнавали впливу води з водогону (рис.6.1.1).



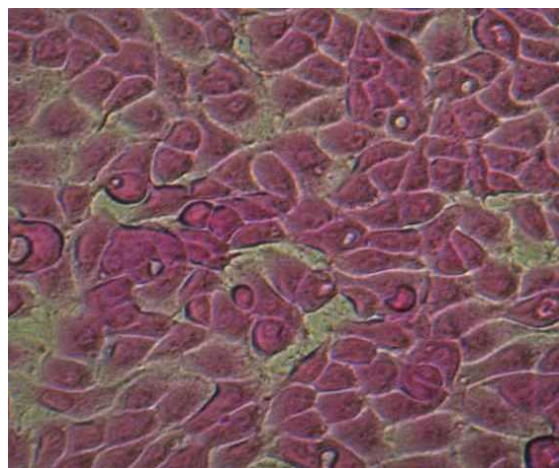
Контроль (клітини L929 + середовище)



Клітини L929 + вода контрольна

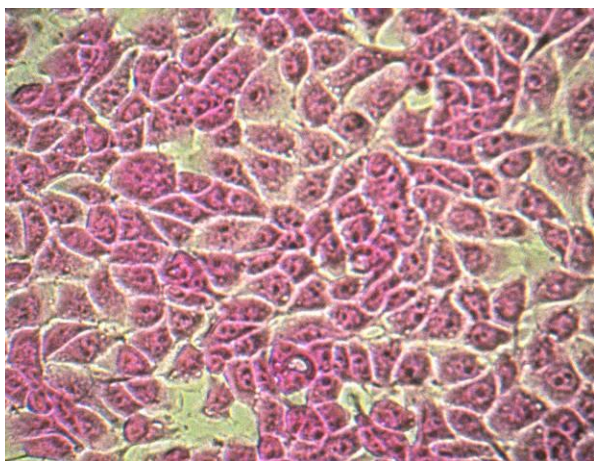


Клітини L929 + вода з водогону



Клітини L929 + вода з бювету





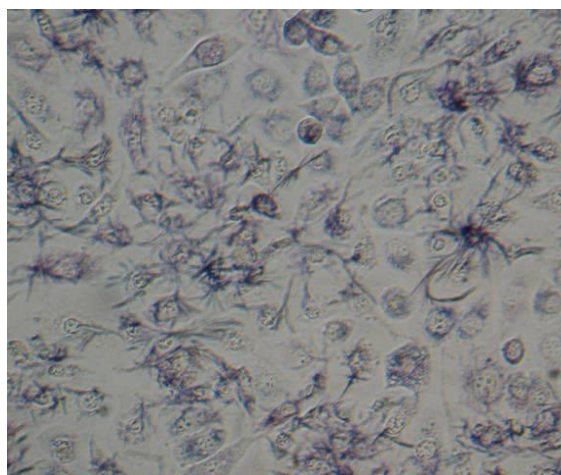
Клітини L929 + вода «Знаменівська»

Рисунок 6.1.1 – Морфологія клітин лінії L929 після 24 годин інкубації з різними зразками питної води (тест з сульфородаміном В).

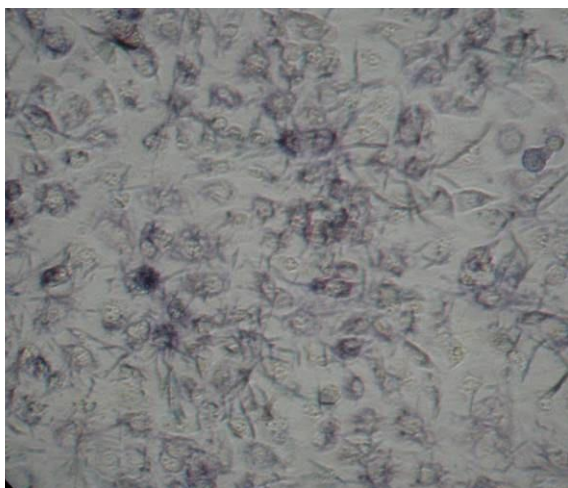
В МТТ-тесті найбільш інтенсивне утворення кристалів формазану було встановлено в клітинах L929, що зазнавали впливу води з водогону. Менше кристали формазану утворювалися в клітинах за дії води з бювету (рис. 6.1.2).



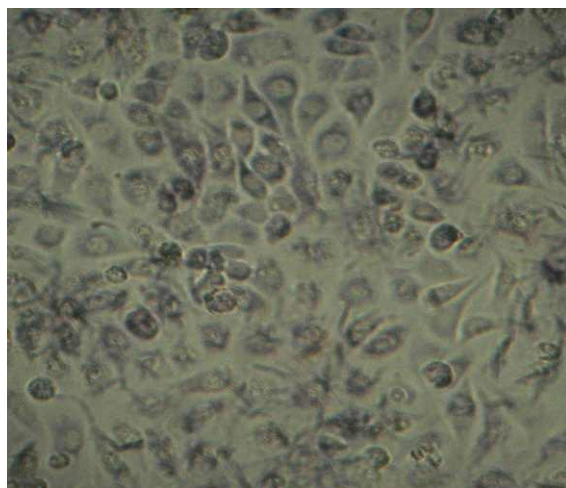
Контроль (клітини L929 + середовище)



Клітини L929 + вода контрольна



Клітини L929+ вода з водогону



Клітини L929+ вода з кювету



Клітини L929+ вода «Знаменівська»

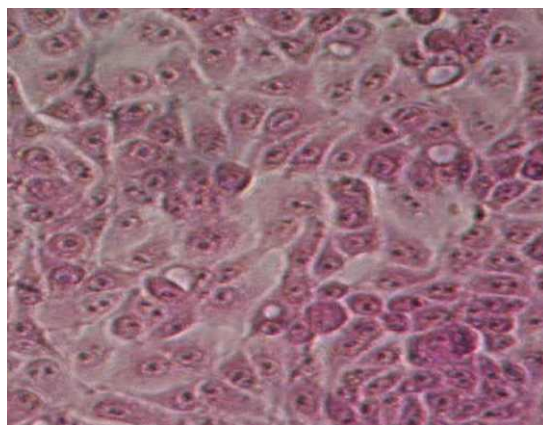
Рисунок 6.1.2 – Інтенсивність утворення кристалів формазану в клітинах лінії L929 після 24 годин інкубації з різними зразками питної води (МТТ-тест).

При дослідженні морфології клітин лінії РТР після інкубації їх з контрольною водою було встановлено округлення окремих клітин та поява крупних вакуолей, схожих на повітряні пухирці, при цьому порушення моношару не спостерігали. При додаванні до клітин РТР води з водогону було виявлено порушення моношару за рахунок округлення і роз'єднання клітин, збільшення числа мертвих клітин. В окремих клітинах були наявні збільшені за розміром вакуолі (рис.6.1.3).





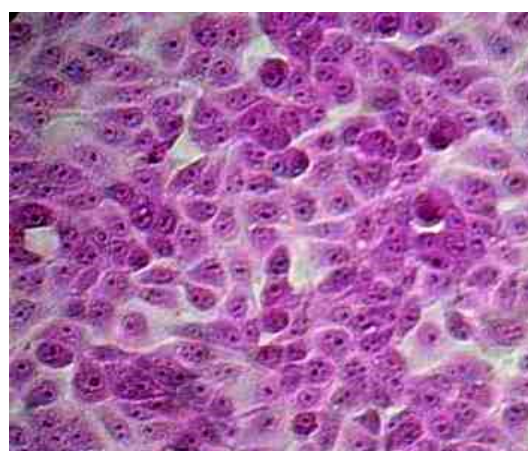
Контроль (клітини РТР + середовище)



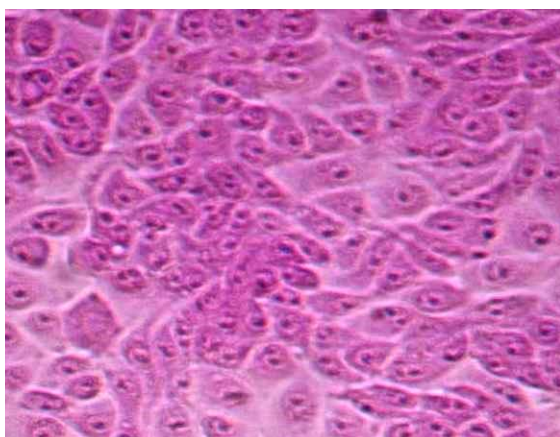
Клітини РТР + вода контрольна



Клітини РТР + вода з водогону



Клітини РТР + вода з кювету



Клітини РТР + вода «Знаменівська»

Рисунок 6.1.3 – Морфологія клітин лінії РТР після 24 годин інкубації з різними зразками питної води (тест з сульфородаміном В).

Вода з бювету при додаванні до клітин РТР викликала найбільший токсичний ефект. Спостерігали порушення моношару, появу округлених інтенсивно забарвлених апоптичних клітин. За впливу води «Знаменівська» суттєвих змін у структурі моно шару та самих клітин не виявлено (рис.6.1.3).

Експерименти, що виконані в роботі [343, 344] свідчать, що внесення до культури клітин хлорованої води з водогону вже через 2 год. спричиняло цитотоксичну дію. При цьому спостерігали деструкцію моно шару, склеювання, зміни морфологічної структури клітин. Найбільш чутливими до токсичного впливу досліджуваної води виявились клітин нирок людини лінії ХЕК -293, що може вказувати на негативний вплив води на сечовидільну систему.

Отримані нами результати досліджень з визначення цитотоксичності питної води з різних джерел водопостачання дозволяють дійти наступних висновків.

Найбільший цитотоксичний ефект за даними МТТ-тесту та тесту з сульфородаміном В до клітин нирки людини лінії ХЕК-293 виявляла вода з водогону, а до фібробластів миші лінії L 929 та тести кулів поросят РТР - вода з бювету. Найменший вплив на життєздатність клітин спричиняла вода контрольна [345 -347].

Негативний вплив води на життєздатність клітин проявлявся у порушенні функції мітохондрій та синтезу білка. Більш чутливими до токсичної дії води виявились клітини лінії РТР, що може вказувати на можливий негативний вплив води на статеву систему організму.

## **6.2. Оцінка цит- та генотоксичності різних типів вод (артезіанська, фасована, дехлорована, водоповідна) на клітинах крові**

Згідно виконаному хімічному аналізу, у водопровідній воді вміст окремих елементів був вищим, ніж у контрольній воді. Зокрема, зміст As (в 1,6 рази), Ba (в 700 разів), Ca (в 2,8 рази), Mn (4000 разів), Pb (в 4 рази), Sr (в 14,6 рази) , Si (в 98 разів), Zn (в 300 разів), істотно перевищувало значення в порівнянні з контрольною водою і ГДК для питної води вміст Fe (в 6,3 рази). У воді № 2 з

бювету встановлено перевищення ГДК для As (в 3,6 рази), Mn (в 1,2 рази) і Si (в 1,2 рази) в порівнянні з контрольною водою зміст цих елементів було в 100, 6000 і 650 разів більше. За результатами вимірювання в воді «Знаменівська» в порівнянні з контрольною також було встановлено перевищення вмісту окремих макро- і мікроелементів, а саме, Na (в 2,5 рази), P (в 35,7 рази), Sr (в 4 рази), Si (788 рази), Zn (в 47,8 рази). При цьому значення ГДК перевищувало тільки зміст Si (в 1,5 рази).

Таким чином, отримані результати дозволяють зробити висновок, що за змістом макро- і мікроелементів вода контрольна повністю відповідає вимогам до питної води ДСанПіН 2.2.4-171-10. Вода з-під крана має перевищення вмісту Fe (в 6,3 рази), а вода з бювету - підвищення As, Mn і Si (в 3,6; 1,2 і 1,2 рази відповідно). Вода «Знаменівська» є подібна за більшістю елементів до контрольної, однак має підвищений вміст Si в 1,4 рази.

Система крові є дуже чутливою до дії потенційно небезпечних екзогенних факторів. Клітини крові одними з перших стикаються з речовинами і сполуками, які надходять в організм. Це викликає необхідність обов'язкової оцінки стану периферичної крові за умови визначення їх токсичних властивостей [284].

За даними літератури [286, 343], вплив токсикантів на систему крові характеризується як загальними, так і специфічними проявами. Основними механізмами гематотоксичних дії є порушення еритропоезу, пригнічення процесу синтезу гема і глобіну, а також мембрано- і цитотоксичну дію, що призводить до зниження тривалості життя клітин і їх морфофункціональних змін.

Для оцінки цитотоксичності водних зразків вивчали їх вплив на тест-організм (рибу). При визначенні цитотоксичності водного середовища в якості біомаркери використовували формені елементи крові риб (лейкоцити). Визначали їх кількість, за їх співвідношенню в контрольному і дослідному зразках оцінювали цитотоксичність водного середовища [115].

З отриманих даних видно, що у риб, які були у водопровідній воді також встановлено збільшення кількості нейтрофілів і зменшення лімфоцитів (до 68,4%), еозинофіли (6,8%).

У зразках вод з бювету і фасовану воду відзначалося збільшення моноцитів і нейтрофілів, також незначне підвищення еозинофілів в порівнянні з контрольною водою (табл. 6.2.1).

Лейкоцити відіграють важливу роль у захисті організму від токсичних впливів, бактеріальних і грибкових інфекцій. Виникнення лимфопенії (зменшення кількості лімфоцитів) характерно для початкової стадії інфекційно-токсичного процесу і пов'язане з їх міграцією з судин в тканині до вогнищ запалення. Згідно з даними [284, 333-336] вплив токсикантів на організм супроводжується змінами кількісного складу клітин крові.

Виконані на щурах дослідження свідчать, що показники лейкоцитарного ряду клітин периферичної крові щурів після вживання води протягом 2 місяців також характеризувалися змінами (табл. 6.2.1).

У дослідної групи щурів, які пили воду з водопроводу [347], встановлено збільшення кількості нейтрофілів сегментоядерних (на 63,5%) і паличкоядерних (на 23,0%) поряд зі зменшенням чисельності лімфоцитів (на 22,7%) і моноцитів (на 17, 7%). Ці дані можуть вказувати на розвиток запальної реакції в організмі піддослідних тварин. У щурів, що вживали воду з бювету, в порівнянні з контролем також було виявлено підвищення кількості нейтрофілів сегментоядерних (на 95,7%) і еозинофілів (в 3,3 рази), зниження лімфоцитів (на 44,0%) і моноцитів (на 12, 0%).

Виявлені зміни в клітинному складі периферичної крові піддослідних щурів можуть вказувати на активацію неспецифічної природної резистентності, розвиток запальної і алергічної реакції. Порухення співвідношення клітинних популяцій крові у тварин, яким давали воду «Знаменівська» були менш значущими, проте встановлений нейтрофіліоз (збільшення відносної кількості нейтрофілів з / я на 23,5% і п / я - на 53,8%) може бути ознакою розвитку інфекційного процесу (табл. 6.2.1).

## Оцінка цитотоксичності досліджуваних питних вод на клітинах крові риб

*Danio rerio* і щурів Wistar

| Зразки досліджуваних вод<br>Група тварин |      | Лімфоцити,<br>% | Моноцити,<br>% | Нейтро-<br>філи с/я,<br>% | Нейтро-<br>філи п/я,<br>% | Еозино-<br>філи, % |
|------------------------------------------|------|-----------------|----------------|---------------------------|---------------------------|--------------------|
| 1. Вода контрольна                       | Риби | 86,7±2,62       | 5,7±0,93       | 5,2±1,24                  | 1,6±0,63                  | 0,8±0,46           |
|                                          | щури | 45,4±1,89       | 28,4±1,50      | 23,0±1,34                 | 2,6±0,51                  | 0,6±0,24           |
| 2. Вода из водопровода                   | Риби | 68,4±1,96*      | 12,6±1,24*     | 9,8±2,25*                 | 2,4±0,42*                 | 6,8±0,63*          |
|                                          | щури | 35,4±1,63*      | 23,4±1,54*     | 37,6±1,91*                | 3,2±0,86*                 | 0,4±0,24           |
| 3. Вода из бювета                        | Риби | 82,2±2,46       | 8,4±1,12       | 6,2±0,67                  | 1,6±0,74                  | 1,6±0,69           |
|                                          | щури | 25,5±3,03*      | 25,0±1,67      | 35,0±3,74                 | 2,6±0,51                  | 2,0±0,45           |
| 4. Вода «Знаменівська»                   | Риби | 80,8±2,66       | 7,2±2,25       | 7,6±2,14                  | 2,4±0,91                  | 2,0±0,72           |
|                                          | щури | 41,8±2,82       | 26,4±4,39      | 28,4±2,25                 | 4,0±0,63*                 | 1,4±0,68           |

Примітка: \* -  $p < 0,05$  у порівнянні з контрольною групою

При визначенні якості питних вод методами біотестування виникає ряд важливих питань щодо екстраполяції отриманих результатів на організм людини, як, наприклад, чи є дані про токсичність водних проб, отримані за допомогою тварин і рослинних тест-організмів, сигналом небезпеки і для людини.

Згідно з даними літератури найбільш прийнятними для екстраполяції на організм людини є методи, що оцінюють мутагенність, гено- і цитотоксичність, тобто клітинні ефекти. Цей висновок обґрунтовується результатами кількох міжнародних програм (Gene-Tox, International Program on Chemical Safety-IPCS), виконаних в 90-х роках. Навіть зміни клітинних структур рослин, зокрема цибулі, *Allium* сера, припускають генотоксичні і мутагенні наслідки для вищих тварин, у тому числі і людини [348, 349].

В Європейському реєстрі зареєстровано понад 100 000 хімічних речовин

(EINECS). З них наявність та концентрації тільки 30-40 хімічних речовин регулярно перевіряються в найбільш важливих екосистемах європейських країн [350]. Значна частина речовин не може бути визначена в природних і стічних водах внаслідок відсутності відповідних аналітичних методів або високу вартість такого аналізу. Структурні і кількісні зміни клітин і ядер спостерігаються навіть при низьких концентраціях токсикантів згідно СанПіН 2.1.4.1175-02 [351].

Отримані нами результати тестування цитотоксичності питних вод на тест-об'єктах, до яких відносяться організми з різним рівнем організації (риби і щури), дозволяють зробити наступні висновки.

Біомоніторинг природних і питних вод - це актуальне завдання на сучасному етапі розвитку суспільства, яка проводиться науковими колективами в багатьох країнах світу. Хімічні аналізи при визначенні якості питної води не зовсім виправдані, так як хімічні методи не можуть виявити всього набору елементів, присутніх у водному розчині, оцінити їх взаємодію і трансформацію в середовищі і організмі. Биотестирование з використанням оптимальних наборів тест-організмів і їх клітинних параметрів об'єктивно характеризує біологічну складову якості води [352-361].

Кров є однією з найважливіших систем організму, відіграє важливу роль в його життєдіяльності. Завдяки широко розвиненої мережі кровоносних капілярів вона приходить в зіткнення з клітинами всіх тканин і органів, забезпечуючи тим самим можливість їх дихання і харчування. Перебуваючи в тісному зіткненні з тканинами, кров має всі реактивними властивостями тканин, її чутливість до патологічним подразнень вище і тонше, а реактивність - виразніше і рельєфніше. Тому всякого роду впливу на тканини організму відбиваються на склад і властивості крові, які є ознаками появи перших, неявно виражених клінічних симптомів патологічного процесу [362-367].

В периферичної крові тварин при нормальних фізіологічних умовах організму освіту формених елементів знаходиться в стані рівноваги. Порушення взаємовідносин між цими процесами, обумовлене реакцією організму на

подразнення токсичної речовини, і проявляється в зміні кількісного складу клітин периферичної крові [34, 35, 51, 362, 364-367].

Оцінка токсичності з використанням гематологічних показників риб і щурів відповідає сучасним вимогам, що пред'являються до досліджень якості водних зразків, дозволяє визначати їх біологічну активність на клітинному рівні. Реєстровані зміни показників крові в організмі об'єктивно характеризують віддалені наслідки негативного впливу. Отримані дані свідчать про перспективність використання гематологічних показників організмів риб і щурів в біотестування питної води [52, 53, 366-371].

Незважаючи на перевищення хімічних елементів в досліджуваних зразках вод все тест-організми були живими, але по нашим численним роботам ми знаємо, що це тимчасово, тому що експерименти з рибами тривали 4 доби, з щурами 2 місяці, але за короткий час отримали результати по гематологічним показникам. Виходячи з отриманих результатів кількості хімічних елементів в досліджуваних зразках води (з бювету, фасована та водопровідна), при цитологічному аналізі лімфоцити периферичної крові тест-організмів реагували однаково. У всіх зразках вод відзначено зменшення кількості лімфоцитів за рахунок збільшення інших формених елементів.

У водопровідній воді було достовірне ( $p < 0,05$ ) зменшення кількості лімфоцитів в крові у риб на 18,3%, у щурів на 10% у порівнянні з контрольною водою, а в зразку вод з бювету на 19,2% достовірне ( $p < 0,05$ ) зменшення кількості лімфоцитів в крові були у щурів. В результаті проведеного експерименту можна дати позитивну оцінку якості тільки артезіанську воду. Фасована і водопровідна води не придатні для вживання, рекомендується переглянути технологію водопідготовки.

Проведено біотестування й цитологічний аналіз досліджуваних проб води. Оцінка цито- та генотоксичності різних типів вод (артезіанська, фасована, дехлорированная водопровідна) на клітках крові тест-організмів і культурі клітин лімфоцитів людини показані в таблиці 6.2.2.

## Порівняльна оцінка досліджуваних вод на клітинах крові

| Тип клітин |                        | Показники | Зразки досліджуваних вод |              |                      |                            |
|------------|------------------------|-----------|--------------------------|--------------|----------------------|----------------------------|
|            |                        |           | Контроль                 | Артезианська | Фасованна ("Humana") | Водопровідна (дехлорована) |
| Еритроцити | Клітини риб            | мЯ ‰      | 0                        | 0            | 1,67                 | 3,63                       |
|            |                        | 2N ‰      | 0                        | 0            | 3                    | 4                          |
|            | Клітини жаб            | мЯ ‰      | 0                        | 0            | 1,33                 | 3,33                       |
|            |                        | 2N ‰      | 0                        | 0            | 2,33                 | 3,66                       |
|            | Клітини щурів          | мЯ ‰      | 0                        | 0            | 0,66                 | 1,66                       |
|            |                        | 2N ‰      | 0                        | 0            | 0,99                 | 2,66                       |
| Лімфоцити  | Клітини риб            | %         | 9,50                     | 9,60         | 28,0                 | 35,20                      |
|            | Клітини жаб            | %         | 18,30                    | 18,60        | 30,0                 | 38,20                      |
|            | Клітини щурів          | %         | 50,70                    | 50,70        | 60,40                | 66,60                      |
|            | Культура клітин людини | %         | 40,50                    | 40,80        | 56,60                | 60,20                      |

Примітка: \* -  $p < 0,05$  у порівнянні з контролем

З отриманих даних видно, що по мікроядерному тесті й по кількісній характеристиці лімфоцитів риби реагують подібним образом зі ссавцями, у тому числі й людиною. Тому риб рекомендують використати для скрининга потенційно небезпечних для людини речовин, що викликають каліцтва й ракові захворювання, а також у якості "стражів" генотоксических речовин, що попадають у питну воду. Це підтверджують коефіцієнти кореляції між показниками на рибах й у культурі лімфоцитів периферичної крові людини. Отримані значення коефіцієнтів лінійної кореляції свідчать про взаємозв'язок майже всіх показників, обумовлених на рибах, і кількості ушкоджених аберрантних метафаз із метаболіческою активацією [42, 48, 180, 348].



Утворення мікроядер, фрагментація хромосом часто виникають у процесі розвитку онкозаболевания, при вірусній інфекції, бактеріальному зараженні, а також при впливі на клітки іонізуючого опромінення й різних мутагенів. Стійкий кореляційний зв'язок кількості ушкоджених аберрантних метафаз із метаболіческою активацією виявлених між показниками обумовленої культури лімфоцитів периферичної крові людини й на цибулі [48, 180].

Морфологічні зміни, які перетерплюють клітки в момент впливу токсикантів, можуть бути виявлені за допомогою мікроскопії. У мал.1 можна спостерігати такі явища, еритроцити крові - цілі ядра в клітці (а, в), клітки зі структурними порушеннями ядер, мікроядра, подвійні ядра, сегментовані ядра (б, г).

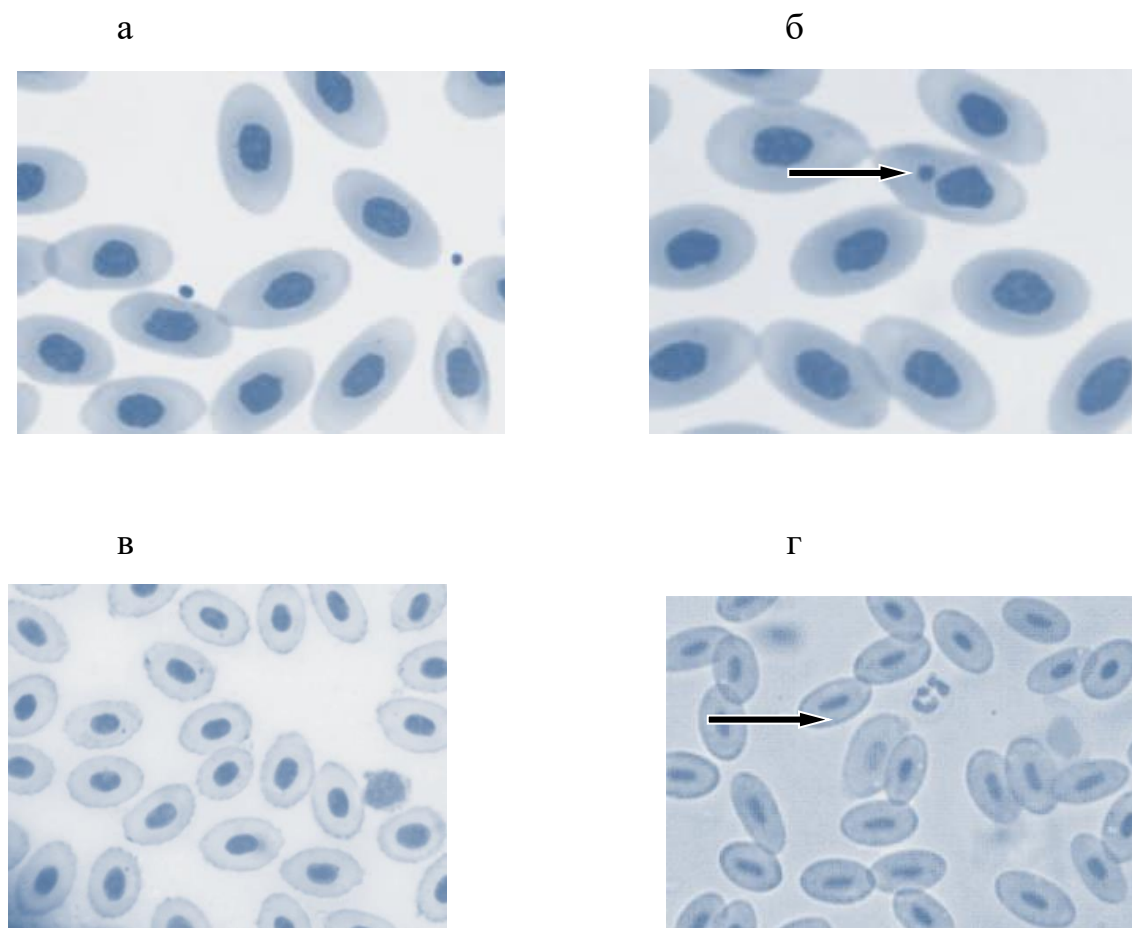


Рисунок 6.2.1. Зразки цитологічних препаратів периферичної крові гідробіонтів зі структурними порушеннями ядер еритроцитів: а - еритроцити крові риб контрольної групи; б - еритроцити крові риб досліджуваної групи з мікроядром; в - еритроцити крові жаб контрольної групи; г - еритроцити крові жаб досліджуваної групи з подвійним ядром і з сегментованим ядром.

Для оцінки цитотоксичності водних зразків вивчали вплив токсичних речовин на тест-організм (рибу), а саме на клітки крові лейкоцитів. При визначенні цитотоксичності водного середовища в якості біомаркера використали формені елементи крові риб (лейкоцити), визначали кількість останніх і по їхньому співвідношенню в контрольному й досвідченому зразках оцінювали цитотоксичність водного середовища [49, 115].

Лейкоцити грають дуже важливу роль у захисті організму від токсичних впливів, бактеріальних і грибкових інфекцій. Ріст кількості нейтрофілов у крові - це відповідь організму на впливи токсикантів, бактеріальні й багато інших інфекцій. Виникнення лимфопенії (зменшення кількості лімфоцитів) характерно для початкової стадії інфекційно-токсичного процесу й пов'язане з їхньою міграцією з посудин у тканині до вогнищ запалення [115, 372, 373].

Кількісна оцінка лейкоцитів описана як біомаркер клітинного складу організму. Для визначення цитотоксичності водних зразків досліджували вплив токсичних речовин на периферичну кров, а саме на лейкоцити крові.

У якості біомаркера використали формені елементи крові (лейкоцити) риб, при цьому розраховували їхня кількість, і по їхньому співвідношенню в контрольному й досвідченому зразках оцінювали цитотоксичність водного середовища. Цей метод технічно простий, швидко виконуємо, недорогий, легко піддається кількісній оцінці, інформативний [49, 115, 365, 367].

Універсальність клітинної організації риб відкриває широкі можливості для токсикологічних досліджень із наступною екстраполяцією отриманих результатів на клітки й організм людини [374, 375].

Вплив токсикантів на організм супроводжуються зі змінами кількісного складу нейтрофілов. За допомогою мікроскопії визначали цитотоксичність водного середовища. На рисунку 6.2.2 у зразках препаратів показані лімфоцити периферичної крові риб (а), жаби (б), пацюків (в), людини (г).

У нашій роботі для характеристики структурних і кількісних змін найважливіших компонентів клітинного ядра (хромосом і генів), що є носіями

генетичної інформації, використали цитогенетический метод - мікроядерний тест [375, 376].

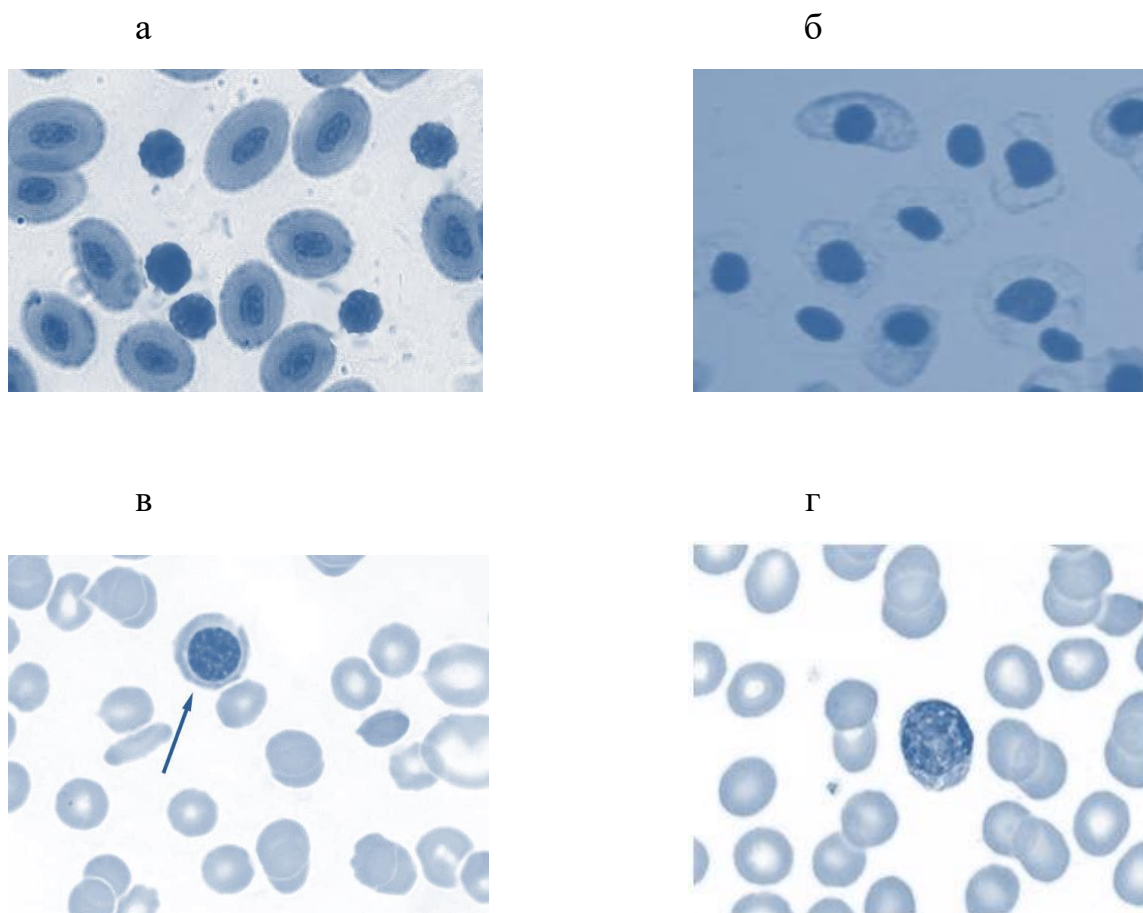


Рисунок 6.2.2. Зразки цитологічних препаратів периферичної крові гідробіонтів, щурів і людини для визначення цитотоксичності водного середовища: а - лімфоцити крові риб; б - лімфоцити крові жаби; в - лімфоцити крові щурів; г - лімфоцити крові людини.

Дотепер питання про те, чи відіграє формування мікроядер особливу роль у канцерогенезі, залишається відкритим. У кожному разі мікроядра вказують на геномну нестабільність [375, 376].

При визначенні якості питних вод методами біотестування виникає ряд важливих питань щодо екстраполяції отриманих результатів на організм людини, як, наприклад, чи є дані про токсичність водних проб, отримані за допомогою тваринних і рослинних тест-організмів, сигналом небезпеки й для

людини. Перераховані вище роботи дають можливість правильності переносу результатів, отриманих на рівні клітки, на більше високі рівні організації [377-380].

Найбільш прийнятними для екстраполяції на організм людини є методи, що оцінюють мутагенність, гено- і цитотоксичність, тобто (суб)клітинні ефекти. Цей висновок обґрунтовується результатами декількох міжнародних програм (Gene-Tox, International Program on Chemical Safety-iPCS), виконаних в 90-х роках. Навіть зміни клітинних структур рослин, зокрема лука, *Allium* сера, припускають генотоксические й мутагенні наслідки для вищих тварин, у тому числі й людини [375].

У Європейському реєстрі зареєстроване понад 100 000 хімічні речовини (EINECS). З них наявність і концентрації тільки 30 - 40 хімічних речовин регулярно перевіряються в найбільш важливих екосистемах європейських країн [374]. Значна частина речовин не може бути визначена в природних і стічних водах внаслідок відсутності відповідних аналітичних методів або високої вартості такого аналізу .

Показаний перспективність використання гематологічних показників організмів риб у біотестированні. Кров - як одна з найважливіших систем організму відіграє більшу роль у його життєдіяльності. Завдяки широко розвитий мережі кровоносних капілярів вона приходить у зіткнення із клітками всіх тканин й органів, забезпечуючи тим самим можливість їхнього подиху й харчування. Перебуваючи в тісному зіткненні із тканинами, кров має всі реактивні властивості тканин, її чутливість до патологічних роздратувань вище й тонше, а реактивність - виразніше й рельєфнее. Тому всякого роду впливу на тканині організму відбиваються на складі й властивостях крові. Гематологічні дослідження пророкують появу перших, неявно виражених клінічних симптомів патологічного процесу [381, 382].

У периферичній крові тварин і людини при нормальних фізіологічних умовах організму утворення формених елементів й їхнє руйнування перебувають у стані рівноваги. Порушення взаємин між цими процесами, обумовлене

реакцією організму на подразнення токсичного або інфекційного характеру, проявляється в зміні кількісного складу клітин периферичної крові [382, 383].

Перераховані в нашій роботі методи задовольняють сучасним вимогам, пропонованим до досліджень якості водних зразків. Вони визначають їхні біологічні властивості на (суб)клітинному рівні, реєструють зміни в спадкоємному апараті, об'єктивно характеризують віддалені наслідки їхнього впливу. Структурні й кількісні зміни клітин й ядер спостерігаються навіть при низьких концентраціях токсикантів згідно СанПин 2.1.4.1175-02 [384-389].

Биомониторинг природних і питних вод - це актуальне завдання на сучасному етапі розвитку суспільства, що проводиться науковими колективами в багатьох країнах миру. Хімічні аналізи при визначенні якості питної води не зовсім виправдані, тому що хімічні методи не можуть виявити всього набору елементів, що є присутнім у водяному розчині, оцінити їхню взаємодію й трансформацію в середовищі й організмі. Биотестирование з використанням оптимальних наборів тест-організмів й їхніх клітинних параметрів об'єктивно характеризує біологічну складову якості води [115, 390-392].

## **Висновки до розділу 6**

Визначено стан цитогенетичних параметрів крові в гідробіонтів та теплокровних тварин, досліджено залежність цих порушень від вмісту токсичних речовин у водному середовищі. Встановлено цитотоксичний ефект води з різних джерел водопостачання в дослідях *in vitro* на моделі культури клітин різного походження. Проведено аналіз показників комплексної оцінки якості води з використанням клітин різних біологічних тест-об'єктів

Основні результати досліджень опубліковано у наукових працях Верголяс М.Р. [8, 11, 22, 32, 38, 40, 42]

## **РОЗДІЛ 7. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ**

Біотестування природних поверхневих вод - джерел питного постачання широко використовуються в різних країнах, оскільки дозволяють отримати інтегральну оцінку якості води. Використання екотоксикологічних біотестов (тваринних і рослинних тест-організмів) вкрай важливо для об'єктивного і комплексного контролю за все зростаючою числом токсичних речовин, що забруднюють природне і питну воду, більшість з яких не нормується існуючими стандартами [384, 393, 394].

На підставі багаторічних досліджень процедура комплексного біотестування природних і питних вод пропонується нами як оптимальна. Обов'язково проводять дослідження (методами аналітичної хімії, мікробіології, радіології та біотестування), що встановлюють мінімальний ризик водного зразка для здоров'я людини, тобто з використанням різних методів обґрунтовується безпеку води. Вода, що не містить токсичних речовин, з одного боку, і що володіє оптимальним набором хімічних елементів, необхідних для нормальної життєдіяльності живих організмів і їх клітин, з іншого боку, задовольняє вимогам що ставляться до якісної питної води [40, 52, 395-397].

Метою цих досліджень було зіставлення результатів біотестування вод різного походження, отриманих за допомогою комплексу тварин і рослинних тест-організмів. Така порівняльна характеристика дозволяє виявити найбільш безпечні води для споживання населенням. Якість такої питної води - фізіологічно повноцінно, так як в ній мають бути відсутні антропогенні забруднювачі і бути присутнім життєво необхідні біогенні елементи, які легко засвоюються організмом з води [398, 399].

Проведена нами оцінка якості поверхневих вод - джерел централізованого водопостачання м.Києва показала, що вихідна дніпровська і деснянська вода в місцях водозаборів відповідала категорії «безпечні води» за величиною індексу загальної токсичності. Комплексне біотестування поверхневих вод в акваторії м.Києва встановило негативний антропогенний вплив мегаполісів на водні

екосистеми. Зростання середнього значення індексу загальної токсичності дніпровських вод у міру проходження території мегаполісу змінювався від 10 до 120 у.о., підтверджуючи цей факт зростання токсичності природної водного середовища [390, 400, 401, 402].

Порівнюючи якість вихідної природної води (Дніпровський і Деснянський водозабори) та водопровідної хлорованої води ми прийшли до висновку, що процес хлорування значно підвищує токсичність вихідної води за рахунок утворення стійких хлорорганічних сполук, небезпечних для здоров'я людини.

На підставі багаторічних досліджень методика комплексного біотестування природних і питних вод пропонується нами як оптимальна. Обов'язково проводять дослідження (методами аналітичної хімії, мікробіології, радіології та біотестування), що встановлюють мінімальний ризик водного зразка для здоров'я людини, тобто з використанням різних методів обґрунтовується безпеку води. Вода, що не містить токсичних речовин, з одного боку, і що володіє оптимальним набором хімічних елементів, необхідних для нормальної життєдіяльності живих організмів і їх клітин, з іншого боку, задовольняє вимогам що ставляться до якісної питної води.

Метою цих досліджень було зіставлення результатів біотестування води різного походження, отриманих за допомогою комплексу тварин і рослинних тест-організмів. Така порівняльна характеристика дозволяє виявити найбільш безпечні води для споживання населенням. Якість такої питної води - фізіологічно повноцінно, так як в ній повинні відсутувати антропогенні забруднювачі і бути присутнім життєво необхідні біогенні елементи, які легко засвоюються організмом з води [49, 401].

Оцінка якості водопровідної води в м.Києві за останні 10 років методами біотестування показала її непридатність в якості питної води. Всі тест-організми в тій чи іншій мірі відчували токсичну дію водопровідної води. Яка відповідно до індексу токсичності в будь-який час року вона ставилася до категорії «небезпечна» вода.

Аналізуючи причини високої токсичності водопровідної води, ми прийшли до висновку, що це явище можна пояснити хлоруванням вихідної води, наявністю в ній залишкового хлору і продуктів сполуки хлору з органічними речовинами, в першу чергу хлорованими фенолами. Хлорфеноли мають високий ступінь токсичності, вони стійкі до розпаду і трансформування, мають високу акумулюючої здатністю [403, 404]. Накопичуючись в тканинах живих організмів, хлоровані феноли порушують роботу багатьох систем організму, зокрема імунної та ендокринної. Кип'ятіння водопровідної води не усуває її токсичності для живих організмів.

Водопровідна вода вкрай важко включається в метаболізм живими організмами і їх клітинами. Поверхневий натяг водопровідної води близько 75 дин / см, а клітина може використовувати воду з поверхневим натягом близько 43-45 дин / см. 45 дин / см - це біологічно оптимальне поверхневий натяг міжклітинної рідини і крові [403, 404].

Ще один фактор токсичності водопровідної води - незадовільний стан труб централізованого питного водопостачання населення і внутрішні водопровідні розводки житлового фонду, які десятиліттями не змінювалися. Хімічні та мікробіологічні забруднення накопичуються на стінках труб тривалий час, і при подачі води вони змиваються в проток і надходять з кранів в квартири. На внутрішніх поверхнях труб поселяється і розмножується безліч різних мікроорганізмів: вірусів, бактерій, водоростей, мікроміцетів, що виділяють токсини шкідливі для здоров'я людини. Молекули цих токсинів проявляють стійкість до кип'ятіння і до дії хлору [403].

Чавунні і сталеві труби водопровідної мережі, мідні і цинкові деталі кранів доповнюють вміст металів, що містяться у воді. У водопровідній воді можуть бути присутніми розчинене залізо, марганець і важкі метали. Рідше - фтор, сірководень, фосфати.

Якість водопровідної води можна поліпшити доочищенням і знезараженням, наприклад, за допомогою універсальних установок сімейства «Вега», які розроблені та апробовані фахівцями ІКХХВ ім. А.В. Думанського



НАН України. Результати комплексного біотестування з визначенням категорії якості води за допомогою індексу загальної токсичності наведені в таблиці 7.1.

Таблиця 7.1

Порівняльний аналіз якості питних вод різного походження за категоріями на підставі значень індексу токсичності.

| Проба<br>Категорія води         | Водопроводная<br>вода | Фасованная<br>вода | Артезианская<br>вода |
|---------------------------------|-----------------------|--------------------|----------------------|
| Безпечна                        | 0%                    | 70%                | 90%                  |
| умовно безпечна                 | 0%                    | 12%                | 10%                  |
| «Опасная» небезпечна            | 100%                  | 12%                | 0%                   |
| «Очень опасная» дуже небезпечна | 0%                    | 6%                 | 0%                   |

Наші дослідження якості фасованих негазованих питних вод різних марок методами біотестування показали їх різноякісність, причому більше половини (54%) становили категорії "небезпечна" і "дуже небезпечна" вода (табл. 7.1). Причин, що пояснюють таке низька якість фасованих вод, досить. Перш за все - це додавання в воду різних знезаражувальних і речовин, що консервують, аж до антибіотиків. Ці речовини при вживанні фасованої води активно взаємодіють з епітеліальною тканиною шлунково-кишкового тракту, викликаючи її роздратування і запалення (гастрити). До того ж консерванти пригнічують мікрофлору шлунка і кишечника, що призводить до порушення травного процесу.

Проблема якості питних фасованих вод тісно пов'язана з її хімічним складом і мікробіологічної обсемененностью. Оскільки вода фасується в ємності і зберігається протягом тривалого часу, то технології її обробки та терміни зберігання не повинні погіршувати первісної якості.

Одним з негативних факторів, що впливають на якість фасованих вод, тривалий контакт питної води з матеріалом тари. Поліетилентерефталат (ПЕТ)

завдяки своїм фізико-хімічним властивостям широко використовується для розливу питних вод. Однак він виділяє в воду сполуки, які в підвищених концентраціях можуть завдати шкоди здоров'ю людини: терефталевая кислота, ізофталеву кислота, етиленгліколь та інші. Відомо також, що ПЕТ може зазнавати теплову деградацію, продуктом якої є ацетальдегід. Підвищена температура зберігання фасованих вод значно підсилює процес міграції ацетальдегіду, який погіршує їх якість аж до появи токсичності.

Комплексне біотестування артезіанських вод (юрського і сеноманського горизонтів) з бюветів розташованих в різних районах м.Києва показало високу якість води - 90% досліджуваних вод відповідали індексом загальної токсичності категорії "безпечна" вода (табл. 7.1). Артезіанські води з глибинних водоносних горизонтів (90-340 м) досить захищені товщею порід від техногенного та мікробного забруднення, і можуть використовуватися в якості питних без додаткового очищення і знезараження [165, 405]. Доброякісність артезіанських вод часто знижується при виготовленні фасованих вод за допомогою доочистки різними технологіями (фільтрація, коагуляція, флокуляція, озонування, обробка ультрофіолет, додавання консервантів і т.п.). Після технологічної обробки артезіанська вода не завжди зберігає природні властивості. Вона може навіть придбати токсичні властивості. Встановлено [405], що артезіанські води не проявляють цитотоксичність у порівнянні з фасованими водами, які характеризуються негативними змінами в життєдіяльності клітин тест-організмів. Таким чином, артезіанські води не вимагають додаткової обробки і задовольняють умови нової концепції якості питних вод [405, 406].

Проведення порівняльної характеристики якості питних вод різного походження за результатами комплексного біотестування за допомогою набору тварин і рослинних тест-організмів. За результатами досліджень водопровідна вода демонструвала токсичну дію на всі біотести, і, отже, не може використовуватися в якості питної води через високий ступінь ризику для здоров'я людини. Серед тестованих фасованих питних вод тільки "Моршинська" відповідала категорії "безпечна" вода, інші марки фасованих вод в різному

ступені надавали негативний вплив на життєдіяльність тест-організмів. За нашими даними артезіанські води не мають токсичного впливу на біотести, і тому їх якість відповідає вимогам, що пред'являються до питних вод, що задовольняє фізіологічні потреби організму людини.

В результаті виконання даної роботи оцінена роль і корисність кожного з біотестов для оцінки якості природних і питних вод. Біотест за допомогою ракоподібних (дафнії і церіодафнії) за нашими даними є найчутливішим серед використовуваних біотестів. Це можна пояснити тим, що дані гідробіонти є фільтраторами води за способом харчування. В процесі фільтрації вони взаємодіють з розчиненими токсичними речовинами і відчують їх вплив на організм. Так як свій зовнішній панцир ракоподібні будують з кальцію і магнію, то вони мають підвищену чутливістю до рівня мінералізації води. Зокрема, якщо концентрація кальцію менше 50 і більше 300 мг / дм<sup>3</sup>, то їх життєдіяльність порушується аж до летального результату. Завдяки своїй простоті і високій чутливості цей тест-організм є одним з найбільш поширених у світовій практиці. Він включений в міжнародні стандарти, використовується як національний норматив, в багатьох країнах входить в стандартні набори тест-організмів для визначення токсичності водних зразків. Рекомендується використання цього тест-об'єкта в гострих і хронічних експериментах з оцінки якості питних вод.

Інший представник безхребетних тварин - прісноводна гідра, яка використовується нами в дослідному наборі, хорошо зарекомендувала себе при тестуванні вод з низьким рівнем забруднення хлорованими органічними токсичними речовинами, зокрема хлорфеноли. Цей тест-організм проявляє високу чутливість в хронічних експериментах при реєстрації морфологічних змін. Незважаючи на те, що біотест на прісноводних гідрах менш поширений, ніж біотестування за допомогою ракоподібних, він все таки володіє декількома перевагами. Наприклад, демонструє диференціальну реакцію та токсичний вплив за морфологічними показниками і поведінковою реакцією. При комплексному біотестування за допомогою гідр можна визначати гостру і хронічну токсичність, а їх клітини використовувати для цитологічного аналізу.

Слід зазначити підвищену чутливість цього тест-організму до токсичного впливу важких металів і органічних забруднювачів (феноли, хлорфеноли і ін.).

У наборі тест-організмів нами використовувалися також представники хребетних водних тварин - риби (даніо реріо, гуппі, срібний карась). Риби, хоч і менш чутливі до токсичного впливу, але за рахунок високо розвинених органів відчуттів і центральною нервовою системою, це робить їх ідеальними тест-об'єктами для реєстрації зміни чутливих тест-функцій (фізіологічних, біохімічних, цитологічних, поведінкових та інш.) У процесі біотестування у риб можна використовувати кров і тканини органів для цитологічного аналізу токсичних впливів. Біотест на рибах включений міжнародний і національний стандарти для оцінки якості вод, в багатьох країнах включається в набори тест-організмів для біотестування водних зразків. За допомогою риб можна ефективно здійснювати контроль за присутністю гострої токсичності в досліджуваних природних водах. Для визначення хронічної токсичності у водних зразках застосовується біотест заснований на протіканні ембріогенезу запліднених яйцеклітин (ікринок) риб, зокрема яйцеклітин даніо реріо. Він детально нами розроблений і апробований при біотестування природних і питних вод.

У набір біотестів включений також представники: ріпчаста цибуля і озимий сорт пшениці «Миронівська 808», Рослинні тест-організми мають високу чутливість до азотсодержащим речовин, зокрема до нітратів, які стимулюють ростові показники у рослин. Ми віддаємо перевагу зернам пшениці, які містять лише 5-10 відсотків власної вологи, на відміну від цибулин, де цей показник досягає 70%. Біотести на рослинах детально розроблені, і тому широко використовуються в міжнародних дослідженнях як на організмовому, так і клітинному рівнях для оцінки токсичності водних зразків.

Результати наших досліджень показали, що питні води різного походження, токсикологически безпечні за даними хімічного аналізу відповідно до затверджених нормативів, можуть чинити негативний вплив на життєдіяльність тварин і рослинних тест-організмів. Отже, застосування методів

аналітичної хімії, мікробіології та радіології, включених до національних стандартів та нормативи, недостатньо для визначення біологічно властивостей водних зразків. Об'єктивна оцінка якості питної води вимагає використання, поряд зі стандартними підходами, ще й методів біотестування для визначення можливої, загальної токсичності.

Поряд із забрудненням водного середовища хімічними речовинами і сполуками, істотно впливає на її якість біологічне забруднення, яке залежить від концентрації мікроорганізмів, зокрема бактерій, найпростіших, водоростей і мікроміцетів. Мікроорганізми в результаті своєї життєдіяльності, відмирання і розкладання насичують водне середовище токсичними екзометаболіти і продуктами розпаду. Вибравши бактерію кишкову паличку як модельний забруднює воду об'єкт, ми досліджували за допомогою методів біотестування водні зразки з різною щільністю *Escherichia coli*.

З результатів комплексного біотестування за допомогою тварин і рослинних тест-організмів видно, що щільності бактерій *Escherichia coli*  $10^2$  та  $10^3$  кл./см<sup>3</sup> не впливають на нормальну життєдіяльність гідробіонтів і на розмірно-вагові показники корінців пророщеного ріпчастої цибулі. Починаючи з щільності  $10^4$  кл./см<sup>3</sup> реєструється хронічна токсичність для *Ceriodaphnia affinis* і *Allium cepa*, проте індекс загальної токсичності дозволяє ще віднести дану воду до категорії «безпечні води».

Питна вода з бактеріальним обсемененням, де число *Escherichia coli* становить  $10^5$  кл./см<sup>3</sup> продемонструвала гостру токсичну дію на ракоподібних і рослинні тест-організми. У цьому випадку індекс загальної токсичності відповідав категорії «небезпечні води».

Щільність мікроорганізмів у воді  $10^6$  кл./см<sup>3</sup> викликала 100% загибель церіодафній, достовірно інгібував на 40% розвиток і зростання ріпчастої цибулі, викликав хронічну дію на прісноводну гідру *Hydra attenuate*. Це призвело до значного збільшення значення індексу загальної токсичності (170 у.о.), що відповідає категорії «небезпечні води». Споживання води з таким вмістом мікроорганізмів підвищує ступінь ризику для здоров'я людини.

Слід зазначити, що найчутливішим тест-організмом виявилася церіодафінія. Будучи твариною, що фільтрує воду в пошуках кормових одноклітинних організмів (тих же бактерій), *Ceriodaphnia affinis* проявила високу чутливість до мікробіологічного обсіменіння води. Це протиріччя можна пояснити високою концентрацією метаболітів бактерій *Escherichia coli* які вони виділяють у водне середовище, значно погіршуючи її якість.

При визначенні якості питних вод методами біотестування виникає ряд важливих питань щодо екстраполяції отриманих результатів на організм людини. Перш за все, необхідно відзначити, що використовуються нами в практичних дослідженнях тест-організми не завжди вловлюють гранично допустимі концентрації хімічних речовин, затверджених для питних вод наступними організаціями; Всесвітньою організацією охорони здоров'я (WHO), Агентством з охорони навколишнього середовища (US EPA), Європейським співтовариством (ЕС). У більшості випадків результати, отримані нами за допомогою окремих тест-організмів, були в 5-10 разів вище, ніж гранично допустимі концентрації, що наводяться в нормативних документах. Для підвищення порога чутливості біотестування ми провели об'єднання ряду тварин і рослинних тест-організмів різних трофічних рівнів з диференційованою чутливістю до забруднюючих речовин.

Нашими дослідженнями і літературними даними доведено, що біотестування з використанням оптимального набору тест-організмів об'єктивно характеризує біологічну складову якості води. Контроль якості питної води, включаючи різні етапи її приготування, очищення і знезараження, повинен проводитись за токсикологічними параметрами. Методи біотестування доцільно використовувати на всіх етапах оцінки якості питної води, включаючи заключний (характеристика ризику), на якому основним критерієм може стати еколого-епідеміологічна оцінка ризику для здоров'я населення ..

Розглядаючи сучасні підходи в санітарно-гігієнічному нормуванні якості питної води, ми запропонували для цих цілей використання результатів комплексного біотестування водних проб з розрахунком індексу загальної

токсичності. Застосувавши модифіковану нами методологію оцінки ризику, створену Американським агентством з охорони навколишнього середовища (U.S. EPA) [405, 407], можна визначити ступінь ризику для здоров'я людей, тривалий час споживають неякісну питну воду. Коефіцієнт кореляції між результатами біотестування і ступенем захворюваності населення, що вживають протягом 10 років водопровідну воду, становив 0,70-0,94. Це говорить про те, що практично кожен третій показник захворюваності значимо пов'язаний з токсичністю водопровідної води.

При вивченні біологічних властивостей знесоленої води з результатів хронічного експерименту було видно, що обезсолена вода, позбавлена макроелементів, навіть при годуванні піддослідних ракоподібних негативно впливала на життєдіяльність їх організму. Це виражалося в пригніченні розвитку і розмноження *Ceriodaphnia affinis*. Кількість молодих особин у контрольній водному середовищі більш ніж в 4 рази перевищувала число народжених особин в знесоленої воді.

Схожий результат розмноження спостерігався у прісноводних гідр, які протягом 8 діб культивувалися в знесоленої воді. Народжуваність молодих особин в цьому середовищі в 3 рази була нижчою, ніж в контрольні показники. При цьому ми на увазі не хронічну токсичність, а фактор відсутності у водному середовищі необхідних для нормального розвитку і розмноження макро- і мікроелементів. З цього можна зробити висновок, що обезсолена вода (дистильована, бідистильована, пропущена через міліпоровскій фільтр) не забезпечує повноцінних фізіологічних і біохімічних процесів в тваринних і рослинних організмах. Для преодолення негативних последствий употребления дистиллированной и сходной с ней воды рекомендуется обогащение ее комплексом макро- и микроэлементов.

Однак штучна вода не може замінити природну. Тому оптимальне рішення цієї проблеми з позицій здоров'я людини - це вживання мінеральної води, що містить необхідний набір життєво важливих, біогенних елементів.

Для з'ясування, яке співвідношення кальцію до магнію є оптимальним для нормальної життєдіяльності організмів ми досліджували тривалість виживання тест-організмів - дафнії (*Daphnia magna*) в штучно приготованих водах з різним співвідношенням кальцію до магнію (1: 1; 2: 1, 4: 1; 6: 1). Представник водних ракоподібних обраний для проведення досліджень в першу чергу через високу чутливості до мінерального складу воді [125, 232], а по-друге він є стандартним і поширеним як за кордоном, так і на Україні для визначення якості питної води [182, 351]. Вода готувалася на основі дистильованої з додаванням чотирьох базових солей кальцію, магнію, натрію і кальцію з рекомендаціями [130] для середньої жорсткості. Змінної була концентрація кальцію: 30, 60, 120 і 180 мг / дм<sup>3</sup>. В експерименті тест-організми годувалися (функціональне навантаження). Досвід закінчувався, коли гинули всі тест-організми, які не одержують протягом експозиції поживних речовин.

Згідно з експериментальними даними максимальне за тривалістю виживання спостерігалось у піддослідній групі ракоподібних у водному середовищі при співвідношенні кальцію до магнію 4 до 1. З огляду на нетоксичність водного середовища, можна зробити висновок, що при такому співвідношенні цих елементів метаболічні процеси в організмі знаходяться в оптимальному режимі, що продовжує виживаність у *Daphnia magna*. Виходячи з того, що водні ракоподібні використовують для побудови зовнішніх стулок (скелета) кальцій, тому дослідження необхідно продовжити з іншими представниками набору тест-організмів - рибою, прісноводної гідрою, рослинами. Завдяки комплексному біотестуванню питних вод з різним сольовим складом можна отримати результати їх біологічних властивостей.

Однак, підвищення мінералізації і жорсткості водного розчину може привести до зниження токсичності розчинених в ньому токсичних речовин внаслідок зв'язування, освіти комплексів і підвищення резистентності тест-організмів [49, 182]. Тому при значних відхиленнях сольового складу від оптимального необхідно вносити певні корективи результатів біотестування.



За результатами комплексного біотестування біологічні властивості води визначаються співвідношення ізоотопів водню протію і дейтерію. Зміна цього співвідношення в ту чи іншу сторону в порівнянні з мінеральною водою призводить до порушень нормальної життєдіяльності тест-організмів. Результати біотестування необхідні для розробки відповідних нормативів поряд з вже апробованими і затвердженими показниками, наприклад гідрохімічними, хіміко-аналітичними, фізичними, санітарно-гігієнічними та ін.

Питна вода в процесі біотестування не повинна мати статистично достовірних відхилень від контрольних значень, які наводяться в методичних посібниках та нормативних документах для використовуваних тест-організмів. В цьому випадку можна вважати, що якість води відповідає біологічним нормативам. При достовірних відхиленнях результатів біотестування від контрольних значень досліджувані проби води визначаються як токсичні у відповідності з їх біологічними характеристиками. За ступенем відхилення від контрольних значень, з одного боку, і за кількістю тест-організмів, які зафіксували негативний ефект, з іншого боку, воду, що піддається аналізу, класифікують як нетоксичну, слаботоксичні і токсичну за біологічним впливом на тваринні і рослинні організми.

## ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення та практичне вирішення комплексної проблеми щодо моніторингу стану та екологічної безпеки водного середовища із застосуванням сучасних методів та тест-об'єктів біотестування експрес оцінки якості поверхневих і питних вод України, їх безпечності для здоров'я людини та інших живих істот.

1. Моніторингові дослідження на основі комплексного біотестування показали, що водні проби в районі Вишгорода і Хотянівка можна віднести до II-го класу 3 категорії і характеризується як добру (добра вода). Водні проби, відібрані в м. Києва та в 5 км нижче міста відноситься до V-го класу 7 категорії і характеризується як дуже погана (дуже брудна). Зростання середнього значення індексу загальної токсичності дніпровських вод у міру проходження території мегаполісу підтверджує факт екологічного забруднення поверхневих вод р. Дніпро.

2. У багатьох регіонах України реєструють перевищення ГДК (45 мг/л) нітратів у воді. Забруднення води нітратам має антропогенне і природне походження. Встановлено, що вода, забруднена нітратами негативно впливає на організм риб і їх клітини крові. За її впливу відбувалася 30% загибель риб. На клітинному рівні спостерігалися морфофункціональні зміни клітин крові і відхилення в лейкоцитарній формулі крові риб - зменшення лімфоцитів (на 18,3%). Виявлено аномалії ядер, в еритроцитах зустрічалися мікроядра (1‰) і подвійні ядра (1‰). Використання риб і їх як тест-об'єктів дає можливість визначення цитотоксичності і генотоксичності водного зразка на клітинному рівні.

3. Використання екотоксикологічних біотестів (рослинних і тваринних тест-організмів) і їх клітинних біомаркерів дозволило виявити токсичність розчинів наноаквацитратів міді і срібла з концентрацією 0,01-0,05 мг/дм<sup>3</sup>. При концентраціях суміші наноаквацитратів срібла і міді 0,01-0,02 мг/дм<sup>3</sup> виживання прісноводної гідри (*Hydra attenuata*) склало 100%, в той же час концентрації 0,03-

0,05 мг/дм<sup>3</sup> негативно вплинуло на їх життєдіяльність. Зміна розмірно-масових показників корінців цибулі (*Allium* сера) в досліджуваній воді при різних розведеннях розчинів наноаквацитратів міді і срібла, не було помічено. Концентрації суміші наноаквацитратів срібла і міді 0,01-0,05 мг/дм<sup>3</sup> на ембріонах і рибах *Danio rerio* токсичність не викликали. Оцінка токсичності на клітинному рівні дозволить отримати інформацію про стан імунітету біоти і рівень впливу стресових факторів. Результати досліджень свідчать про можливість використання наноаквацитратів міді і срібла у концентрації 0,01 мг/дм<sup>3</sup> в рибному господарстві і акваріумістиці.

4. При дослідженні впливу розчинів гербіцидів гліфосата та клетодима з використанням тест-організмів отримали дані гострої та хронічної токсичності від 10% до 100% на рівні ГДК. Для риб клетодим (ГДК у воді 0,002 мг/дм<sup>3</sup>) при концентраціях 0,002 мг/дм<sup>3</sup> загальна токсичність складала 10%, у гідр 25%, спостерігали 100% смертність періодафній при концентраціях вище ГДК, а при 0,002 мг/дм<sup>3</sup> складала 70%. При використанні цибулі *Allium* сера відмічене інгібування ростових процесів у обох розчинах гербіцидів та виявлена микроядра, подвійні ядра у всіх концентраціях клетодиму, навіть на рівні ГДК. Викликає необхідність у подальших дослідженнях, адже цибуля не є цільовим бур'яном для гліфосату і не повинна була зазнати суттєвих змін. Дані результати дають змоги впевнено сказати, що біотестів можна застосовувати для виявлення токсичності гербіцидів у воді. Отримані дані свідчать про високу токсичність гербіцидів у воді. Забруднення оточуючу середу гербіцидами має глобальний характер, оскільки вони передаються трофічними ланцюгами від рослин до тварин, у тому числі і до людини. Нераціональне використання пестицидів стає причиною гострих отруєнь від 3,5 млн. людей щороку.

5. Результати оцінки якості питних фасованих вод методами біотестування показали, що води, вироблені за затвердженими нормативами є безпечні за даними хімічного аналізу, проте можуть мати негативний вплив на тваринні і рослинні тест-організми. Отже, застосування методів аналітичної хімії, мікробіології та радіології, включених до національних стандартів та

встановлені їх нормативи, є недостатніми для визначення біологічних властивостей води. Об'єктивна оцінка якості води вимагає використання, поряд зі стандартними підходами, і методів біотестування. Запропоновані біотести виявляють токсичні властивості водного середовища, диференціюють різні марки фасованих вод відповідно до можливих ризиків для здоров'я людини.

6. Токсикологічні дослідження впливу води різного походження на організм щурів дозволили встановити їх негативний вплив на клітинний склад периферичної крові. Вода з водогону і бювету порівняно з контрольними величинами викликали зниження поглинальної активності нейтрофілів до  $33,80 \pm 2,37\%$  і  $31,80 \pm 4,22\%$  (на  $43,7\%$  і  $47,0\%$  відповідно). Механізми неспецифічної природної резистентності, зокрема пригнічення фагоцитарної та бактерицидної активності нейтрофілів крові, зниження їх резервних можливостей; зміни окремих біохімічних показників, що характеризують обмінні процеси в організмі та функціональний стан печінки, нирок, підшлункової залози.

7. Гістологічні дослідження структури органів-мішеней (печінка, нирки) риб і щурів показали зміни їх структури в залежності від якості води. У щурів, що пили воду з р. Дніпро в печінці виявлялися клітини неправильної багатокутної форми з округлими ексцентрично розташованими великими ядрами, дискомплексація печінкових балок, поліморфізм частинок, окремі лімфогістіоцитарні гранульоми в області порталних трактів. А на гістологічних препаратах печінки риб виявлено некрози, дистрофія гепатоцитів, скупчення двоядерних клітин і проліферація купферовських клітин, зниження кількості клітин з глікогеном (ШИК-реакція). Виявлені численні осередки некрозів в печінці риб які вказують на серйозне забруднення водного середовища. В нирках досліджуваних щурів відзначалася дистрофія, повнокров'я капілярів клубочків, пікнотичні зміни ядер на тлі вираженого розширення просвіту каналців. У риб відзначали дистрофічні зміни епітелію каналців нирок. В стромі гістіоцитарна реакція, що відрізняється від норми і може свідчити про несприятливі умови для риб. Отримані результати по виявленню зміни паренхіматозних органів щурів та риб під впливом забруднювачів прісної води, можуть бути екстрапольовані в

певній мірі на організм людини, враховуючи той факт, що річкова вода є одним з основних джерел питної води для населення України та інших країн світу.

8. Дослідження на культурі клітин показали, що найбільший цитотоксичний ефект за даними МТТ-тесту та тесту з сульфородаміном В на клітин нирки людини лінії ХЕК-293 виявляла вода з водопроводу (кількість життєздатних клітин за їх впливу становила 64,41% і 77,00% відповідно). Контрольна вода і бутильована вода «Знаменівська» справляли значно менший вплив, кількість життєздатних клітин була 91,73% та 81,75%. В тесті з сульфородаміном В кількість живих клітин за впливу контрольної води становила 100,00%, води з водопроводу – 82,45%, води з бювету – 89,20%, а «Знаменівська» - 96,75%). Дослідження на клітинах РТР дозволили встановити, що найбільшою цитотоксичною активністю в МТТ-тесті володіла вода з бювету (кількість живих клітин 61, 5%), а найменшою вода контрольна (кількість живих клітин 72,8%). Вода з водопроводу і «Знаменівська» мали однаковий вплив на виживаність клітин (65,5% і 66,75%). Найменший вплив на життєздатність усіх клітин спричиняла вода контрольна. Негативний вплив води на життєздатність клітин проявлявся у порушенні функції мітохондрій та синтезу білка. Морфологічні зміни клітин після інкубації з водою із бювету та з водопроводу характеризувались підвищеною вакуолізацією клітин, втратою клітинних контактів, їх округленням та лізисом. Більш чутливими до токсичної дії досліджуваних зразків води виявились клітини лінії РТР, що може вказувати на можливий негативний вплив води на статеву систему організму.

9. В експериментах *in vivo* і *in vitro* встановлено мутагенні властивості бюветної води. Визначено здатність речовини, що містяться у воді індукувати хромосомні і геномні мутації. Встановлено присутність у воді протоксикантів, що мають потенційну мутагенну активність, впливають на систему репарації клітин. Запропоновано оцінку цито- та генотоксичності різних типів вод (артезіанська, фасована, дехлорована водопровідна) на клітинах тест-організмів (крові риби) і лімфоцитів людини. Отримані значення коефіцієнтів лінійної кореляції свідчать про взаємозв'язок майже всіх показників, досліджених на

рибах, і кількості ушкоджених аберрантних метафаз із метаболічною активацією, виявлених на лімфоцитах людини.

10. На основі результатів проведених комплексних еколого-токсикологічних, цитологічних, цитогенетичних, гематологічних, біохімічних, імунологічних, гістологічних досліджень удосконалено методичні підходи щодо оцінки якості водного середовища, яке зазнає антропогенного впливу, науково обґрунтовано класи і категорії якості вод різного походження за їх екологічним станом, запропоновано методи біологічної оцінки, які сприяють зменшенню токсичного впливу забруднювачів на водну екосистему та підвищенню її захисту.

### **ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**

1. З метою підвищення ефективності, всебічної оцінки якості природного водного середовища рекомендовано використання простих і економічних методів біотестування на таких тест-об'єктах як рослини та гідробіонти, завдяки яким можна здійснити інтегральну оцінку якості води з помірними витратами та максимальною ефективністю. У складних випадках для визначення негативного впливу води на здоров'я людини слід проводити подальші, більш складні та вартісні дослідження на теплокровних тваринах та культурі клітин людини, які спрямувати на визначення системних, органотоксичних та віддалених (мутагенних і генотоксичних) ефектів.

2. У зв'язку з тим, що кількість фасованих вод постійно збільшується, а це призводить до збільшення кількості фальсифікату та загалом погіршення якості таких питних вод попри збереження вимог до наявності у певній кількості мінералів, солей та інших сполук пропонується крім використання хіміко-фізичного та мікробіологічного аналізу цих вод доповнити комплексним біотестуванням, що сприятиме більшій точності оцінки їх якості і зменшенню ризиків для здоров'я людини.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Трахтенберг И.М. Популярная токсикология / под общ.ред. И.М. Трахтенберга, Н.Г. Проданчука. — К.: ВД «Авіцена», 2016. — 448 с.
2. Гончарук В.В. Новая концепция обеспечения населения качественной питьевой водой // Химия и технология воды, 2008. - т.30, №3. – С.239-252.
3. Проданчук М.Г. Науково-методичні аспекти токсиколого-клінічних досліджень впливу мінерального складу питної води на стан здоров'я населення України (огляд літератури) / М.Г. Проданчук., І.В. Мудрий, В.І. Великий // Современные проблемы токсикологии. - 2006.- № 3. - С. 4–7.
4. Drinking water minerals and mineral balance / F. Koszisek, I. Rosborg, O. Selinus, M. Ferrante, D. Jovanonic // SIP, Switzerland, 2015. — 105 p.
5. Savant D. Pepyn. M.-P.Drinking water and cardio-vascular disease. // Food and chemical toxicology - 2002. - V. 40. - P.1311-1325.
6. І.М. Андрусишина, І.О. Голуб, О.Г. Лампека Еколого-гігієнічна оцінка навантаження важкими металами довкілля м. Києва в системі сніг-вода-ґрунт // Екологічна безпека та природокористування, № 2 (18), 2015
7. М.Д. Луцик, Лін Ках Вай , Ю.Л. Осип, Р.С. Стойка. Використання стимульованих мітогеном лімфоцитів як клітин-мішеней при тестуванні речовин на антипроліферативну активність // Експерим. та клініч. фізіологія і біохімія. - 2005. - № 1. - С. 19-24
8. М.Р. Верголяс, Н.М. Дмитруха, І.М. Андрусишина Особливості впливу питної води з різних джерел водопостачання на організм щурів вістар // Современные проблемы токсикологии, Киев, 2016г.
9. Руководство по обеспечению качества питьевой воды. – Женева: Всемирная организация здравоохранения, 2004. – т.1. – 121с.
10. Лугай Г.Ф. Химический состав питьевой воды и здоровье населения // Гигиена и санитария. – 1992, №1. – С.13-15.
11. Альтернативні методи і тест-системи / І.М. Трахтенберг, В.М. Коваленко, Н.В. Кокшарева, П.Г Жмінько та ін. К.: ВД «Авіцена», 2008. – 268 с.

12. M. Vergolyas. Cytogenetic evaluation of the drinking water toxicity // «EUREKA: Life Sciences», 2016. – №1. – 47-54p.
13. Биотестирование природных вод Харьковской области / В.В. Яковлев, Т.Ю. Бирюкова, С.А. Мацюк // Научно-технический сборник Коммунальное хозяйство городов. – 2008. – №84. – С. 102-110.
14. Прокопов В.О. Гігієнічна оцінка централізованого господарсько-питного водопостачання України / В.О. Прокопов, О.М. Кузьмінець, В.А. Соболев // Довкілля та здоров'я. - 2008. - № 10-12. - С. 14-18.
15. Яцик А.В. Наукові організаційні засади безпечного водокористування в Україні // Водозабезпечення та водне господарство. - 2004, №1. – С.4-8.
16. Трахтенберг И.М., Проданчук Н.Г. Популярная токсикология / Под общ. ред. И.М. Трахтенберга, Н.Г. Проданчука. – К.: ВД «Авіцена», 2016. – 448 с.
17. Фетисова Г.К. Роль минерального состава питьевой воды в формировании неинфекционной патологии населения // Гигиена и санитария. - 2004. - №1. - С.20-22.
18. Гончарук В.В. Комплексна оцінка якості фасованих вод / В. Гончарук, В. Архипчук, Г. Терлецька, Г. Корчак // Вісник НАН України. — 2005. — N 3. — С. 47-58.
19. Зміни та доповнення до ДСанПін 2.2.4-171-10 «Гігієнічні вимоги для споживання людиною» - шлях до вдосконалення нормативного документу / В.О. Прокопов, Зоріна О.В., Протас С.В., Ляшко В.К. // Гігієна населених місць. – К. – 2011. – №58. – С. 71-77.
20. Water in Changing World // The United Nations World Water Development Report 3 (WWDR3). – Paris: UNESCO, 2009, - 432 p.
21. Дятлов С.Е. Роль и место биотестирования в комплексном мониторинге загрязнения морской среды / С.Е. Дятлов // Экология моря. — 2000. — №. 51. — С. 83-87.
22. Зерщикова Т.А. Современная проблематика анализа качества питьевой воды путем биотестирования / Т.А. Зерщикова, Л.П. Флоринская // Фундаментальные исследования. – 2006. – № 11 – С. 54-55.



23.      Общая токсикология / Под ред. Курляндского Б.А., Филатова В.А.. – М.: Медицина, 2002. – 608 с.
24.      Drinking water minerals and mineral balance /F. Koszisek, I. Rosborg, O. Selinus, M. Ferrante, D. Jovanovic // SIP, Switzerland, 2015. -105 p.
25.      Рахманин Ю.А., Михайлова Р.И. Питьевая вода и здоровье человека: проблемы и методики исследований // Милиорация и водное хозяйство. – 1998, №3. – С.58-60.
26.      Насонкина Н.Г. Повышение экологической безопасности систем питьевого водоснабжения. – Макеевка: ДонНАСА, 2003. – 181 с.
27.      Воронова Г.Л. Экспериментальное биотестирование качества воды реки Днепр / Г.Л. Воронова, Г.Г. Адамчик, Л.А. Куцко // Вопросы рыбного хозяйства Беларуси: сб. науч. тр./ Вып. 19. Институт рыб. хоз-ва НАН Беларуси. – Мн.: Технопринт, 2003. – 298 с.
28.      Оливернусова Л. Оценка состояния окружающей среды методом комплексной биоиндикации // Биоиндикация и биомониторинг: сбор. Статей. — М.: Наука, 1991 – 138с.
29.      Жмур Н.С. Государственный и производственный контроль токсичности методами биотестирования в России. – М.: Международный Дом сотрудничества, 1997. – 114 с.
30.      Левич А. П. Теоретические и методические основы технологии регионального контроля природной среды по данным экологического мониторинга / Левич А. П., Булгаков Н. Г., Максимов В. Н. – М.: НИИ-Природа, 2004. – 271 с.
31.      Hanson N. Utility of biomarkers in fish for environmental monitoring// Integrated Environmental Assessment and Management – 2009. – V. 5, №1. – P. 182–186.
32.      Куценко П.Н. Основы токсикологии. – Санкт-Петербург, 2002. – С. 24.
33.      Верголяс М.Р., Білий Р.О., Стойка Р.С., Гончарук В.В. Проапоптичні зміни в еритроцитах риби *Danio Rerio* за впливу катіонів міді // Біологічні студії. – 2009. – Том 3/№2 – 15-22 с.

34. Vergolyas M. Research of cytotoxic activity of water from different water supply sources. *Adv Tissue Eng Regen Med Open Access*. 2019;5(3):92–96. DOI: 10.15406/atroa.2019.05.00105.
35. Vergolyas M. R., Trakhtenberg I. M., Dmytrukha N. M. Assessment of toxic effects of drinking water from various sources on indicators rats Vistar immune system // *Journal of Education, Health and Sport*. – 2016. –V. 6(9). – P.855-866.
36. Прокопов В.О. Хлорована питна вода та ризики для здоров'я населення / В.О. Прокопов, О.В. Зоріна, С.В. Гуленко [та ін.] // *Гігієна населених місць*. – 2012. – ип.60. – С. 76-86.
37. Верголяс М.Р., Гончарук В.В. Оценка контроля качества воды с помощью тест-организмов и их клеток // *Химия и технология воды*. – т.38, №1. – С. 2016.
38. Arkhipchuk V.V., Goncharuk V.V. // *J. Water Chem. and Technol*. – 2004. – № 4. – P. 403–414.
39. Пат. 97199 Україна, МПК G 01 № 33/18. / В.В. Гончарук, М. Р. Верголяс. Опубл. 10.01.2012, Бюл. № 1.
40. Болтіна І.В. Комплексне дослідження якості води різного призначення / І.В. Болтіна, М.Р. Верголяс, Л.І. Повякель, І.А. Злацький, В.В. Завальна, О.В. Коваленко, О.П. Васецька, Є.Р. Заєць, А.Ю. Семенова // *Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. Збірник наукових праць ІХ з'їзду. УТГіС. К.: ЛОГОС*, - 2012. – Т.4. – С.219-224.
41. Fiskesjö G. The Allium test as a standard in environmental monitoring// *Hereditas*. – 1985. – V.102. – P. 99-112.
42. Верголяс М.Р., Луценко Т.В., Гончарук В.В. Цитотоксичний вплив хлорфенолів на клітини кореневої меристеми насіння цибулі батун (Allium fistulosum L.) // *Цитология и генетика*. – 2013. – Т.6, № 1. – С. 44-49.
43. Гончарук В., Архипчук В., Терлецька Г., Корчак Г. Комплексна оцінка якості фасованих вод // *Вісник НАН України*. – 2005. – № 3. – С. 47-58.

44. ДСТУ4173-2003. Якість води. Визначення гострої токсичності хімічних речовин та води на *Daphnia magna* Straus і *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (*Cladocera*, *Crustacea*). – Київ, Держстандарт України, 2004.
45. Гандзюра В.П. Продуктивність біосистем за токсичного забруднення середовища важкими металами. – Київ: ВГЛ “Обрії”, 2002. – 248 с.
46. Биоэнергетика гидробионтов // Шульман Г.Е., Финенко Г.А., Аннинский Б.Е. и др./ Под ред. Шульмана Г.Е. - Киев: Наук. думка, 1990.–248 с.
47. Брагинский Л.П Принципы классификации и некоторые механизмы структурно-функциональных перестроек пресноводных экосистем в условиях антропогенного пресса // Гидробиол. журн.–1998.–Т. 34, № 6.– С. 72–94.
48. Гончарук В.В., Верголяс М.Р., Болтина И. В. Исследование мутагенности и генотоксичности питьевой воды // Химия и технология воды. - 2013. - 35, № 5. - С. 426-435.
49. ДСТУ 7525:2014 Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості.
50. Трахтенберг И.М. Методы изучения хронического действия химических и биологических загрязнителей / И.М. Трахтенберг, Л.А.Тимофиевская, И.Я. Квятковская // Рига: Зинатис, 1987. –172 с.
51. Vergolyas M. R. Blood as integrated system of organism // ScienceRise. - 2016. - № 2(1). – Р. 7-11.
52. Верголяс М.Р., Трахтенберг І.М., Дмитруха Н.М., Гончарук В.В. Оцінка токсикосичного впливу питних вод на організм щурів Vistar // Актуальные проблемы транспортной медицины 2016. - № 2 (44). –С. 52-59.
53. Тихонов В.Н. Анализ изменений массы внутренних органов в токсикологическом эксперименте / В.Н. Тихонов, В.К. Шитиков, Н.А. Мирошниченко, А.Ф. Ковалев // Фармакология и токсикология. 1984. – Т. 47. – № 5. - С. 113-116.
54. Ляшенко О. А. Биоиндикация и биотестирование в охране окружающей среды / О. А. Ляшенко. – СПб: ГТУРП, 2012. – 67 с.
55. Тица Н.У. Клиническое руководство по лабораторным тестам / Под ред. Н.У.Тица. // М.:ЮНИМЕД-ПРЕСС, 2003. – 942 с.

56. Механізми гематотоксичної дії сполук свинцю Апихтіна О.Л., Дмитруха Н.М., Коцюруба А.В. та ін.// Журнал НАМН України. – 2012. – т.18, № 1. – С.100-109.
57. Комаров Ф.И. Биохимические исследования в клинике/ Комаров Ф.И., Коровин Б.Ф.// М.: Наука – 2001. – 215 с.
58. Березов Т.Т. Биологическая химия / Березов Т.Т., Коровин Б.Ф.// М.: Наука. 2004. – 540 с.
59. Архипчук В.В., Гончарук В.В. // Химия и технология воды. – 2004. – 26. – № 4. – С. 403–414.
60. Мокиенко А.В., Петренко Н.Ф., Гоженко А.И. // Гигиена населенных мест. – 2006. – Вып. 47. – С.120-130.
61. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. – М.: Колос, 1993. - 175 с.
62. Жданов В.М., Львов Д.К. Эволюция возбудителей инфекционных болезней. М.: Медицина, 1984. – 275 с.
63. Ashbolt N. J. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions // Toxicol – 2004. – №198. – P. 229-38.
64. Boller K. Chemische Mutagenese das Knochenmark des Chinesischen Hamster als in vivo Testsystem. Hamatologische Befunde nach Behandlung mit Treniomom / K. Boller, W. Schmid // Humangenetik. – 1970. – V.11. – P. 35-54.
65. Siou M.G. Activite mutagene du bezene et du benzo(a)pyrene mice en evidence par la technique des corps de Howell-Jolly (micronucleus test) / M.G. Siou, M.L. Connan, M.A. Doinel // Cahirs de notes docum. – 1977. – V.89, N 4. – P. 434-444.
66. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность [Ильинских Н.Н., Новицкий В.В., Варгунова Н.И., Ильинских И.Н.] – Томск: Изд-во Томского ун-та, 1991. – 272 с.
67. Ding G.-R. Induction of kinetochore-positive and kinetochore-negative micronuclei in CHO cells by ELF magnetic fields and/or X-rays / G.-R. Ding, T. Nakahara<sup>1</sup>, J. Miyakoshi<sup>1</sup> // Mutagenesis. – 2003. – V. 18, N 5. – P. 439-443.

68. Hose J.E. Cytogenetic and cytologic anomalies induced in purple sea urchin embryos by baterna exposure to benzopyrene / J.E. Hose, H.W. Puffer // *Marine biology letters*. – 1983. – V. 4, N 2. -- P. 87-95.
69. Takatsuji T. Induction of micronuclei in germinating onion seed root tip cells irradiated with high energy heavy ions / T. Takatsuji, H. Takayanagi, K. Morishita [et al.] // *Journal of Radiation Research (Tokyo)*. – 2010. – V.51, N 3. – P. 315-23.
70. Richardson J. C., Proudlock R. J., Richolds M. The evaluation of the mutagenic potential of 4-chlormethylbiphenyl using the micronucleus test // *Mutat. Res.* – 1982. – V. 100, N 1. – P. 375—381.
71. Kissling G.E. Sensitivity of the erythrocyte micronucleus assay: dependence on number of cells scored and inter-animal variability / G.E. Kissling, S.D. Dertinger, M. Hayashi, J.T. MacGregor // *Mutat Res.* – 2007. – V. 634, N 1-2. – P. 235-40.
72. Torous D.K. Comparative Scoring of Micronucleated Reticulocytes in Rat Peripheral Blood by Flow Cytometry and Microscopy / D.K. Torous, N.E. Hall, F.G. Murante [et al.] // *Toxicological Sciences*. – 2003. -- V. 74. – P. 309-314.
73. Suzukia H. A liver micronucleus assay using young rats exposed to diethylnitrosamine: methodological establishment and evaluation / H. Suzukia, T. Shirotorib, M. Hayashi // *Cytogenetic and genome research*. – 2004. – V.104. – P. 299-303.
74. Tolga Ç. Micronucleus test in fish cells: A bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment / Ç. Tolga, E.-G. Serap // *Environmental and molecular mutagenesis*. – 2005. – V. 46, №1. – P. 64-70.
75. Rodriguez-Cea A. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys / A. Rodriguez-Cea, F. Ayllon, E. Garcia-Vazquez // *Ecotoxicology and environmental safety*. – 2003. – V. 56. – P. 442–448.
76. Machado Da Rocha C. A. The Micronucleus assay in fish species as an important tool for xenobiotic exposure risk assessment – A brief review and an example using neotropical fish exposed to methylmercury / C.A. Machado Da Rocha,

R.A. Dos Santos [et al.] // Reviews in fisheries science. – 2009. – V. 17, N 4. – P. 478 – 484.

77. Barsiene J. Analysis of Micronuclei in Blue Mussels and Fish from the Baltic and North Seas / J. Barsiene, J. Lazutka, J. Syvokiene [et al.] // Environmental Toxicology. – 2004. – V. 19. – P. 365–371.

78. Perez C. Induction of micronuclei in V79 cells after combined treatments with heterocyclic aromatic amines / C. Perez, A. Lopez de Cerain, J. Bello // Food and Chemical Toxicology. – 2002. – V. 40, №10. – P. 1463-1467.

79. Eichenbaum G. Assessment of the genotoxic and carcinogenic risks of p-nitrophenol when it is present as an impurity in a drug product / G. Eichenbaum M. Johnson, D. Kirkland, P. O'Neill [et al.] // Regulatory Toxicology and Pharmacology. – 2009. – V. 55, № 1. – P. 33-42.

80. Al-Sabti K. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water / K. Al-Sabti, C.D. Metcalfe // Mutation Research. –1995. – V. 23. – P. 121-135.

81. Al-Sabti K. Handbook of Genotoxic Effects and Fish Chromosomes/ K. Al-Sabti. – Joseph Stephane Institute, Ljubljana, Yugoslavia, 1991. – 222p.

82. Fagr K. A. Micronucleus test in fish genome: A sensitive monitor for aquatic pollution / K.A. Fagr, A.M. El-Shehawi, M.A. Seehy // African Journal of Biotechnology. – 2008. – V. 7, N 5. – P. 606-612.

83. Jiraungkoorskul W Evaluation of micronucleus test`s sensitivity in freshwater fish species / W. Jiraungkoorskul, P. Kosai, S. Sahaphong, P. Kirtputra, J. Chawlab, S. Charucharoen // Research Journal of Environmental Sciences. – 2007. – V. 1, N 2. – P. 56-63.

84. Talapatra S.N. Detection of micronucleus and abnormal nucleus in erythrocytes from the gill and kidney of Labeo bata cultivated in sewage-fed fish farms / S.N. Talapatraa, S.K. Banerjee // Food and Chemical Toxicology. – 2007. – V. 45, N 2.– P. 210-215.

85. Захидов С.Т. Цитогенетическое изучение кроветворных клеток рыб из водоемов Норило-Пясинской водной системы (Таймыр) / С.Т. Захидов, Ю.В.

Чеботарева, К.А. Савваитова, В.А. Максимов // Известия РАН. Сер. биологическая. — 1996. — № 2. — С. 10–15.

86. Anand M.J. Clastogenicity of lanthanides — induction of micronuclei in root tips of *Vicia faba* / M.J. Anand, C. S. Akhilesh // Mutation Research. — 1994. — V. 322, N 3, — P. 169-172.

87. Евсеева Т.И. Цитогенетические эффекты раздельного и совместного действия нитратов Th и Cd на клетки корневой меристемы *Allium cepa* / Т.И. Евсеева, С.А. Гераськин, Е.С. Храмова // Цитология. — 2001. -- Т43, №8. -- С.803—808.

88. Довгальук А.И. Оценка фито-и цитотоксической активности соединений тяжелых металлов и алюминия с помощью корневой апикальной меристемы лука / Довгальук А.И., Калиняк Т.Б., Блюм Я.Б. // Цитология и генетика. -- 2001. — №1. — С.3—9.

89. Klumpp A. Tradescantia micronucleus test indicates genotoxic potential of traffic emissions in European cities / A. Klumpp // Environmental Pollution. — 2006. — V. 139, N 3. — P.515-522.

90. Yang G. Tradescantia-micronucleus assay on the water quality of lake Hongzhe in Jiangsu Province, China / G. Yang // Mutation Research. — 1999. — V. 426. — P. 155–157.

91. De Marko A. Induction of micronuclei in *Vicia faba* root tips treated with heavy metals (cadmium and chromium) in the presence of NTA / A. De Marko, S. Paglialuga, M. Rizzoni, A. Testa // Mutation research: Genetic toxicology test. — 1988. -- V. 206, N 3. — P. 311-315.

92. Milosevic-Djordjevic O. Micronuclei in cord blood lymphocytes as a biomarker of transplacental exposure to environmental pollutants / O. Milosevic-Djordjevic et al. // The Tohoku Journal of Experimental Medicine. — 2007. — V. 213, N 3. — P. 231-239.

93. Heddele J.A. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future / J.A. Heddele, M.C. Cimino, M. Hayashi [et al.] // Environmental and Molecular Mutagenesis. — 1991. — V.18, N 4. — P. 277-291.

94. Optimization and pre-validation of an in vitro test strategy for predicting human acute toxicity / C. Clemedson [et al.] // ALTEX. – 2006. - № 23 (suppl.). – P. 254-258.
95. Combes R.D. The use of human cells in biomedical research and testing // Altern. Lab. Anim. – 2004. - № 32. – P.43-49.
96. Токсикометрия химических веществ, загрязняющих окружающую среду. – М.: Центр международных проектов ДКНТ. – 1986. – 426 С.
97. Атраментова Л.А., Утевская О.М. Статистичні методи в біології. Посібник для студентів вищих навчальних закладів – Горлівка: «Видавництво Ліхтар» – 2008. – 247 С.
98. Бариляк І.Р., Бишовець Т.Ф. Дослідження генотоксичної активності біфенілу і його хлорпохідних. // Медична генетика: Респ. Міжвід. зб. – Київ. – МОЗ УРСР. – 1990. – Вип. 1. – С. 119 – 122.
99. Захаров А.Ф., Бенюш В.А., Кулешов Н.П. и др. Хромосомы человека. Атлас: – М., Медицина – 1982 – 264 С.
100. Палагіна І.А., Девейкіс Д.Н., Вашук Н.А., Калюжний Г.Л. Виявлення генотоксичної і мутагенної активності дисперсних азобарвників з метою їх гігієнічного нормування // Медицина праці та промисл. екологія. – 1995. – №5. – С. 12-15.
101. Назаренко С.А., Тимошевський В.А. Порівняльний аналіз частоти анеуплоїдії в покійних і діляться клітинах людини при впливі шкідливих факторів зовнішнього середовища // Генетика. – 2005. – Т. 41. – №3. – С. 391 - 395.
102. Худолей В.В., Мізгирьов І.В. Шляхи розвитку та перспективи екологічної онкології // Питання онкології. – 1997. – Т. 43. – № 1. – С. 116 - 119.
103. Duesberg P., Rasnick D. Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own // Cell Motility and Cytoskeleton. – 2000. – V. 47. – P. 81 - 107.
104. Дыгай А.М., Семченко В.В., Лебедев И.Н. и др. Регенеративная биология и медицина. Клеточные технологии в медицине. – Монография / Под



общей редакцией В.П. Пузырёва, А.М. Дыгая, И.Н. Лебедева и В.В. Семченко. - Москва - Омск: Омская типография. 2017. - 774 с.

105. Монахов А., Семіглазов В., Брежнева Т. Цитогенетичні маркери в 100% лімфоцитів крові у трьох членів сім'ї з високою схильністю до розвитку раку // J. Exp. Clin. Cancer Res. – 1995. – Vol. 14. – С.265 - 269.

106. Монахов А., Гуляєв А., Савожкіна І. Медико-генетичні і цитогенетичні дослідження сім'ї з високою схильністю до злоякісних захворювань шлунково-кишкового тракту в трест // J. Exp. Clin. Cancer Res. – 1997. – Т.16. – С.385 - 388.

107. Виленчик М.М. Нестабильность генома и отдельные последствия влияния излучений – М: Энергоиздат. – 1987. – 192 С.

108. Знаєвська І.А. Особливості цитогенетичного ефекту в лімфоцитах периферійної крові дітей, які зазнали впливу деяких мутагенних факторів фізичної та хімічної природи малої інтенсивності: дисертація к-та. мед. наук. – К. – 1997. – 146 С.

109. Пилинський М.А., Шеметун А.М., Дибська С.С. [та ін.] Цитогенетичний моніторинг осіб, які постраждали від аварії на Чорнобильській АЕС // Цитологія та генетика. –1994. – Т. 28. – № 3. – С. 18 - 24.

110. Керівництво по короткострокових тестах для виявлення мутагенних і канцерогенних хімічних речовин: ВООЗ, – Женева. – 1989. – 212 С.

111. Болтина І.В. Метод підрахунку анеуплоїдних клітин при метафазному аналізі аберацій хромосом в культурі лімфоцитів периферичної крові людини. – Свідectво про реєстрацію авторських прав на твір. – 2003. – ПА № 8332.

112. Міллер Е.С. Мутагенність хімічних канцерогенів: кореляції, проблеми та інтерпретації / Під ред. Холлендера А.- Хімічні мутагени: принцип і методи їх виявлення. – 1971. – Нью-Йорк, Лондон, Plenum Press. – С. 83 - 119.

113. Патент України на винахід. № 201004569 від 25.08.2011. Бюл.№16. Спосіб визначення генотоксичності водного середовища Гончарук В.В., Верголяс М.Р., Болтіна І.В.

114. Сапожников А.Г. Гистологическая и микроскопическая техника: Руководство / А.Г.Сапожников, А.Е.Дорошевич. – Смоленськ: САУ, 2000. 476 с.

115. 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).
116. Козинец Г.И. Исследование системы крови в клинической практике / Г.И.Козинец, В.А.Макаров. – М.: Триада–Х, 1997. – 480 с.
117. Меннинг У.Д.,Федер У.А. Биомониторинг загрязнения атмосферы с помощью растений. — Л.: Гидропромиздат., 1985. — 175 с.
118. Manning W.J. Feder W.A. Biomonitoring air pollutions with plants. Appl. Sci. Publ. LTD. London.: 1980. – p.135-141.
119. Ma T.H. Tradescantia micronucleus bioassay and pollen tube aberration test for in situ monitoring and mutagen screening // Environmental Health Perspectives. — 1981 a. — 37. — p. 85 - 90.
120. U.S. EPA Publication, Current status of bioassays in genetic toxicology Gene-Tox, December 3–5, 1980, p. 1- 69.
121. Rizzoni M., Gustavino B., Ferrari C., Gatti L.G., Fano E.A. An integrated approach to the assesment of the environmental quality of the Tiber river in the urban area of Rome: a mutagenesis assay (micronucleus test) and an analysis of macrobenthic community structure // Sci. Total Environ. — 1995. — 162. — p. 127 - 137.
122. Ma T.H. The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China // Mutation Research. - 1999.- 426, — p.103–106.
123. David H. Phillips, Stanley Venitt. Enviromental mutagenesis. Bios Scientific Publishers. — 1995— p. 401.
124. Ennever F.K., Andreano G., Rosenkranz H.S. The ability of plant genotoxicity to predict carcinogenicity // Mutat Res. – 1988. Vol. 205. – p. 99-105.
125. ДСТУ 4174:2003. Якість води. Визначення хронічної токсичності хімічних речовин та води на *Daphnia magna* Straus і *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (*Cladocera*, *Crustacea*). – Київ, Держстандарт України, 2004.

126. Верголяс М.Р., Головков А.Н, Наниева А.В., Пелишенко А.В., Гончарук В.В. Генотоксическое влияния фтора питьевой воды // Фактори експериментальної еволюції організмів. - Київ, 2016 г., - Т.18, С. 33-35.
127. ДСТУ ISO 7346-1:1996. Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] – Part 1: Static method.
128. ДСТУ ISO 7346-2:1998. Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to freshwater fish [Brachidanio rerio (changed to Danio rerio) Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] – Part 2: Semi-static method.
129. ДСТУ ISO 12890:2005 Якість води. Визначення токсичності на ембріонах та ікрі прісноводних риб. Напівстатичний метод.
130. ДСТУ ISO 5667-2:2003. Якість води. Відбирання проб. Частина 2. Настанови щодо методів Відбирання проб (ISO 5667-2:1991, IDT). – Київ, Держспоживстандарт України, 2004.
131. ДСТУ ISO 11885:2005 Якість води. Визначання 33 елементів методом атомно-емісійної спектроскопії з індуктивно-зв'язаною плазмою К.: Держспоживстандарт України, 2006. – 12 с.
132. Руководство по клинической лабораторной диагностике /Под ред. В.В. Меньшикова. –М.: Медицина, 1982. - 235 с.
133. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / [Беркало Л.В., Бобович О.В., Боброва Н.О. та ін.]; за ред. Кайдашева І.П. – Полтава: Полімет, 2003. – 320 с.
134. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах. Перший національний конгрес з біоетики, Київ, 2001 р. // Ендокринологія. – 2003. – № 8 (1). – С. 142–145.
135. Методичні рекомендації. Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів /Трахтенберг І.М., Ульберг З.Р., Чекман І.С., Дмитруха Н.М. та ін. Київ, 2011. – 108 с.

136. Болтина І.В., Кравчук А.П. Метод вивчення мутагенної активності речовин (метафазного аналізу аберацій хромосом в культурі лімфоцитів периферичної крові людини) *in vitro* з метаболічною активацією. – Свідectво про державну реєстрацію прав автора на твір. – 2001. – ПА № 4301.
137. Hungerford D.A. Leucocytes cultured from small inoculate of whole blood and preparation metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl. // *Stain Techn.* – 1965. – Vol. 40. – P. 333 - 338.
138. Марон Д.М., Еймс В.Н. Доопрацювання для випробування на мутагенність *Salmonella* // *Експериментальна генетика*. – 1983. – Т. 113. – С.172 - 215.
139. Западнюк І.П., Западнюк В.І., Захарія Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторні тварини. Розведення, утримання, використання в експерименті – К: Наука. – 1983 – 383 С.
140. Lowry O.N., Roserbrough N.J., Fart A.L., Randal R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – V. 193. – P.265 - 275.
141. Виленчик М.М. Нестабильность генома и отдельные последствия влияния излучений – М: Энергоиздат. – 1987. – 192 С.
142. Завгородній І.В., Грабовецька Є.Р., Пишнов Г.Ю. Токсикогеноміка як один із пріоритетних напрямків в сучасній профілактичній токсикології // *Сучасні проблеми токсикології*. – 2006 р. – № 3. – С. 30 - 36.
143. Захаров А.Ф., Бенюш В.А., Кулешов Н.П. и др. Хромосомы человека. Атлас: – М., Медицина – 1982 – 264 С.
144. Глянц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
145. Лакин Г. Ф. Биометрия. - М.: Высш. шк., 1980. – 293 с.
146. Статистичний збірник “Довкілля України” за 2003 рік / Державний комітет статистики України: під загальним керівництвом Ю.М. Остапчука. – К., 2004. – 264 с.

147. Національна доповідь “Щодо якості питної води та стану питного водопостачання в Україні у 2003 році” / Державний комітет України з питань житлово-комунального господарства. – К., 2004. – 142 с.
148. Романенко В.Д., Жукинський В.М., Оксик О.П. Методика екологічної оцінки поверхневих вод за відповідними категоріями. – К.: Символ-Т, 1998. 28 с.
149. Хоружей П.Д., Хомутецька Т.П., Хоружей В.П. Ресурсозберігаючі технології водопостачання. – К.: Аграрна наука, 2008. – 534 с.
150. Іщенко Ю.Д. Гігієнічна оцінка хімічного складу питної води в різних регіонах України // Вісник проблем біології і медицини. – 2010. – Вип.. 1. С.82-85.
151. Прокопов В.О., Кузьминець О.М., Соболев В.А. Гігієнічна оцінка централізованого господарсько-питного водопостачання України // Довкілля та здоров'я. – 2008. - №4. – С.14-18.
152. Никифоров В.В., Штрбова Э.Д. Биотестирование в системе гидроэкологического мониторинга // Екологічна безпека. – 2011. - №1 (11). – С.31-35.
153. Бондаренко В.І., Задорожна В.І., Доан С.І., Бура Т.О. Забруднення вірусами водопровідної води // Вода і водоочисні технології. – 2002. - №1. – С.56-60..
154. Фролов А.Ф., Задорожна В.І., Доан С.І Вода як фактор передачі вірусних інфекцій // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2006. - №1 (3). – С.65-69.
155. Гончарук В.В. Руденко А.В., Коваль Э.З., Савлук О.С. Проблема инфицирования воды возбудителями микозов и перспектива ее решения // Химия и технология воды. – 2004. – т.26, №2. – С.120-144.
156. Рябцев В.Е., Коваленко Ю.Л., Тарасенко Л.О. Про якість питної води та стан безпеки водних ресурсів України // Проблеми водопостачання, водовідведення та гідравліки: Наук.-техн. Зб. Вип..5. – К.: КНУБА, 2005. – С.414.
157. Осадчий В.І. Хімічний склад та якість поверхневих вод України: автореф. на здобуття наук. ступеня д-р геогр.. наук. – К., 2008. – 23 с.

158. Троякина А.С. Анализ качества поверхностных вод, используемых для питьевых целей // Вісник Донбаської національної академії будівництва і архітектури. – 2011. - №5 (91). – С.59-63.
159. Коршикова И.А. Состояние водных ресурсов Донецкой области и их диагностика // Екологічний вісник Донбасу. – 2011. - №1 (23). – С.27-30.
160. Екологічний атлас Києва. – К.: Агентство Інтермедіа, 2003. – 60 с.
161. Дудар Т.В., Зосимович А.В. Екологічна оцінка якості поверхневих вод в районі Києва // Вісник НАУ. – 2011. - №2. – С.125-130.
162. Петімко П.І., Царін М.Ф., Кобзар В.В., Кириченко О.І. Водопостачання Києва, 1872-1997 рр. – К.: Логос, 1997. – 360 с.
163. Третьяков О.В., Понамаренко Р.В. Предотвращение возникновения чрезвычайных ситуаций техногенного характера, связанных с загрязнением поверхностных источников водоснабжения ионами тяжелых металлов // Проблеми надзвичайних ситуацій. Зб. Наук. праць. Вип.. 8. – Харків: УЦЗУ, 2008. – С.207-214.
164. Барабаш О.В. Оцінка рівня екологічної безпеки водних об'єктів м. Києва // Вісник Національного транспортного університету. Науково-технічний збірник: в 2 ч. Ч. 1: Серія «Технічні науки». – К. : НТУ, 2014. – Вип. 30.
165. Ісламов В.О., Верголяс М.Р., Мосійчук Т.В. Оцінка якості артезіанських та бутильованих питних вод методами біотестування. – Охорона водного басейну та контроль якості води. – Київ, 2004. – С.121-124.
166. Орель Л.Ю., Шевцова Р.Г. Биотест-объект *Daphnia magna* Straus в оценке питьевых природных источников Белгородской области // Природно-ресурсный потенциал, экология и устойчивое развитие регионов России: 2 Междунар. научно-практ. конф.- Пенза, 2002.- С.124-127.
167. Зекцер И.С. Подземные воды как компонент окружающей среды. – М.: Научный мир, 2001. – 328 с.
168. Тугай А.М., Прокопчук И.Т. Водоснабжение из подземных источников: Справочник. – К.: Урожай, 1990. – 264 с.

169. Блінов П.В. Проблеми й перспективи використання питних підземних вод в Україні // Вода і водоочисні технології. – 2004. - №3. – С.19-22.
170. Василенко В.А. Водные ресурсы устойчивого развития // Экология. – 2006. - №2. – С.128-137.
171. Яковлев В.В., Сурикова Е.Н. Дополнительная инфильтрация в подземные воды на территории крупных городов // Комунальне господарство міст. Науково-техн. зб. – 2011. – Вип..97. – С.344-348.
172. Яковлев В.В. Інженерні заходи покращення якості колодязних вод // Комунальне господарство міст. Науково-техн. зб – 2011. – Вип..97. – С.86-92.
173. Смикун Н.В., Фурман С.С. Біотестування колодязної води з використанням деяких рослин родини Роасеae // Вісник Запорізького національного університету. – 2008. - №2. – С.183-185.
174. Онищенко Г., Некрасова Л. Нечисті води криничні // Надзвичайна ситуація. – 2006. - №8. – С. 54-57.
175. Фомин Г.С., Фомина О.Н. Бутилированная вода. Требования мировых и европейских стандартов к качеству и безопасности. – М.: Протектор, 210.– 320 с.
176. Урюпин Э.А. Развитие рынка безалкогольных напитков // Пиво и напитки. – 2006. – С. 15-18.
177. Стрикаленко Т.В. Бутилированные питьевые воды как социальный феномен. Сравнительный анализ ситуации // Актуальні питання якості води в Україні. – К.: УкрНДНЦ, 2006. – С. 85-90.
178. Архипчук В.В., Гончарук В.В. Проблемы качества питьевых бутилированных вод // Химия и технология воды. – 2004. – т.26, №4. – С.403-414.
179. Архипчук В.В., Гончарук В.В. Оценка качества питьевых бутилированных вод методами биотестирования // Химия и технология воды – 2004. – т.26, №5. – С. 485-525.
180. И. В. Болтина, Е. Л. Костик, М. Р. Верголяс. Применение краткосрочных тестов для исследования мутагенной активности бутилированной питьевой воды // Пробл. харчування : наук.-практ. журн. - 2011. - N 1/2. - С. 70-74.

181. 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.
182. ДСТУ ГОСТ 27384: 2005. Вода. Норми похибки вимірювань показників складу і властивостей (ГОСТ 27384-2002, IDT) . – Київ, 2006.
183. ГОСТ 2874-82 Вода питьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством. – М.,1983.
184. Державні санітарні правила і норми «Вода питна. Гігієнічні вимоги до якості води централізованого господарсько-питного водопостачання»-136/1940, затверджений МОЗ України, від 23.12.96 р.Наказ № 383
185. Директива ЄС 98/83/ЄС Щодо якості води, призначеної для споживання людиною. – Київ, 1999.
186. Патики В.П., Макаренко Н.А., Моклячук Л.І. та ін. Агроекологічна оцінка мінеральних добрив та пестицидів: Монографія / За ред. В.П.Патики. – К.:Основа, 2005. – 300 с
187. ДЕРЖАВНІ САНІТАРНІ НОРМИ ТА ПРАВИЛА "Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною" (ДСанПіН 2.2.4-171-10).
188. Верголяс М.Р. Определение токсичности нитратов с использованием цитоморфологических параметров разных тканей рыб как биомаркера // *Scientific Journal "ScienceRise"* № 9/4 (14).2015 P 10-13.
189. Davoren M., Fogarty A.M. Ecotoxicological evaluation of biocidal agents sodium o-phenilphenol, sodium o-benzyl-p-chlorophenol, and sodium p-tertiary aqmylphenol // *Ecotoxicol Environ Saf.*, 2005, №60 (2). – P.203-212.
190. Yen J.H., Lin K.H., Wang Y.S. // Acute lethal toxicity of environmental pollutants to aquatic organism // *Ecotoxicol Environ Saf.*, 2002, №52 (2). – P.113-116.
191. 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.



192. M.R. Vergolyas, V.V. Goncharuk. Toxic effects of heavy metals on the hydrobionts' organism // Journal of Education, Health and Sport. 2016. - №6(6). – P. 436-444. eISSN 2391-8306. DOI.
193. О.О. Кравченко, І. А. Злацький, В. Ф. Коваленко, В. І. Максін Вплив наноаквацитратів перехідних металів на ембріональний розвиток *Danio rerio* / // Біоресурси і природокористування. - 2014. - Т. 6, № 1-2. - С. 19-25.
194. Yen J.H., Lin K.H., Wang Y.S. // Acute lethal toxicity of environmental pollutants to aquatic organism // *Ecotoxicol Environ Saf.*, 2002, №52 (2). – P.113-116.
195. Repetto G., Jos A., et all // A test battery for ecotoxicological evaluation of pentachlorophenol // *Toxicol In Vitro.* – 2001, №15 (4-5). – P.503-509.
196. Трахтенберг І.М., Дмитруха Н.М. Наночастинки металів, методи отримання, сфери застосування, фізико-хімічні та токсичні властивості // Український журнал з проблем медицини праці 4(37) '2013 – С. 62-74.
197. Евтушенко Н.Ю. Интенсивность метаболических процессов у рыб под воздействием повышенных концентраций ТМ в воде //Первая Все-с. кона, по рыбохозяйственной токсикологии:Тез.докл. Рига. -1988,-4.1. -С. 132-133.
198. Евтушенко Н.Ю. Проблемы и задачи ихтиотоксикологического биомониторинга. //2-я Всесоюз. Конф. по рыбохозяйственной токсикологии:Тез. докл. СПб.,1991,- Т.1. -С. 172-173.
199. Евтушенко Н.Ю., Сытник Ю.М. Накопление тяжелых металлов рыбами при их тепловодном выращивании. // 2-я Всесоюз. Конф. по рыбохозяйственной токсикологии:Тез. докл.-СПб.,1991-, Т.1. -С.173-175.
200. Евтушенко Н.Ю., Сытник Ю.М., Осадчая Н.Н. Формы нахождения тяжелых металлов в воде и накопление их рыбами в условиях тепловодного выращивания // 2-я Всес. конф. по р/х токсикологии: Тез. докл. -СПб.,1991.-Т.1.- С.178-179.
201. Scott, G.R., Sloman, K.A. The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity // *Aquat. Toxicol.* – 2004. – Т.68. - P.369–392.

202. Adrian J.Hill, Hiroki Teraoka, Warren Heideman. Zebrafishasa Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity // Toxicological Sciences. - 2005. – V.86, №1. P. 6–19.
203. Goncharuk V.V., Vergolyas M.R., Toxic impact of Escherichia coli bacteria depending on their content in water on test organisms // Journal of Water Chemistry and Technology. - 2014. – 36(1). С. 46-50.
204. Современная микробиология. Прокариоты. Том 1 / под.ред. Ленгеера Й., Дрекса Е., Шлегеля Г. – М.: Мир, 2005. – 656 с.
205. Современная микробиология. Прокариоты. Том 2 / под.ред. Ленгеера Й., Дрекса Е., Шлегеля Г. – М.: Мир, 2005. – 496 с.
206. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія. – К.: НУХТ, 2004. – 471 с.
207. Kurtzman C.P. , Fell J.W. The Yeastes: a taxonomic study. – 4 th ed. – Amsterdam etc.: Elsevier, 1998. – 1055 p. 42 12.
208. Kurtzman C.P. Systematics and Taxonomy of Yeasts. In: Dimorphism in Human Pathogenic and Apathogenic Yeasts / Ed. E.J.F. Schmidt. - Contrib. Microbiol. Basel. Karger. – 2000. – Vol. 5. – P. 1 – 14. 13.
209. The Prokaryotes. An evolving electronic resource for the microbiological community / Eds.: M.Dvorkin, S.Falkow, E.Rosenberg, K.H.Schleifer, E.Stackebrandt. – 3 rd ed. – Online version. Springer Link, 1999.
210. Імунологія: підручник / Л.В.Кузнецова, В.Д.Бабаджан, Н.В.Харченко та ін.; за ред. Л.В.Кузнецова, В.Д.Бабаджан, Н.В.Харченко. – Вінниця: ТОВ «Меркьюрі Поділля», 2013.- с
211. Гербициды и экологические аспекты их применения: Учебное пособие. М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2010. — 152 с.
212. Коваль В.В, Наталочка В.О., Ткаченко С.К., Міненко О.В. Динаміка залишкових кількостей пестицидів у водах сільськогосподарського призначення в умовах Полтавщини // Вісник Полтавської державної аграрної академії. - 2011. - №1. - С. 22-26.
213. Писаренко В.М., Писаренко П.В., Писаренко В.В. Агроекологія. - Полтава, 2008. - 255 с.

214. Ляшенко О.А. Биоиндикация и биотестирование в охране окружающей среды. - СПб: ГТУРП, 2012. - 67 с.
215. Верголяс М. Р. Визначення токсичної вплив гербіцидів на тест-організми у воді // Екологічні науки : наук.-практ. журнал. Київ : ДЕА, 2019. № 26. С. 84–87.
216. О. П. Мелехова, Е. И. Егорова, Т. И. Евсеева и др.; под ред. О. П. Мелеховой и Е. И. Егоровой. – Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование : учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений - М.: Издательский центр «Академия», 2007. - 288 с.
217. Федоров Л.А. Пестициды – удар по биосфере и человеку / Л.А. Федоров, А.В. Яблоков –М.: Наука, 1999. – 462 с.
218. Яблоков А. В. О недооценке отрицательных последствий применения пестицидов и о важности разработки иных путей развития сельского хозяйства / А .В. Яблоков – Пущино, 1988. - 100 с.
219. Матвеева Р.А. Экологическая оценка миграции пестицидов в природных средах / Р.А. Матвеева - М.: Колос, 1982. - 126 с.
220. Николенко А.Г., Амирханов Д.В. Сравнительная оценка опасности инсектицидов из разных классов химических веществ для коллембол и полезной энтомофауны в лабораторных и полевых условиях // Агрохимия. – 1992. С. 117-125.
221. Beketov M.A. Comparative sensitivity to insecticides deltamethrin and esfenvalerate of several aquatic insects (Ephemeroptera and Odonata) and *Daphnia magna* // Russian Journal of Ecology. – 2004.
222. Dorn PB, Rodgers J, Jop K // Environ Toxicol. And Chem. – 1987, №6, 6, P. 435 – 444
223. В.В.Никифоров, Т.Ф. Козловська. Химико-биологические причины ухудшения качества природной воды / Вісник КДПУ.2002. Вип. 6 (17). С. 82-85.
224. Н. М. Шахова, Л. К. Антипова, Н. І. Коцюрубенко, В. С. Кривогуз Вплив інсектицидів на зниження шкодочинності шкідливої черепашки на півдні України // Наука на службі сільського господарства. Миколаїв, 2007. - С. 49-54.

225. Архипчук В.В. // Экологические аспекты современных технологий охраны водной среды. – К: Наукова думка, 2005. – гл. 10. – С.322-347.
226. Токсикометрия химических веществ, загрязняющих окружающую среду. – М.: Центр международных проектов ДКНТ. – 1986. – 426 С
227. Трахтенберг И. Книга о ядах и отравлениях. /Трахтенберг И. // – Киев. «Наукова думка» – 2000, - 368 с.
228. Сердюк А.М. Екологічна безпека України. / Сердюк А.М. //Довкілля та здоров'я. - №1, 1996. – С.4-12.
229. Агрохимия СЗР. // Ежемесячный информационно-аналитический бюллетень. - №1(25), январь 2014 г., с. 1-26.
230. Державні санітарні правила і гігієнічні норми «Гігієнічна класифікація пестицидів за ступенем небезпечності» ДСП 8.8.1.2.002-98.
231. А.Е. Маркевич, Ю.Н. Немировец. Основы эффективного применения пестицидов. Справочник по механизации и контролю качества применения пестицидов в сельском хозяйстве / А.Е. Маркевич, Ю.Н. Немировец // Минск.: МГТУ, 2008. – 60 с.
232. Атраментова Л.А., Утевская О.М. Статистичні методи в біології. Посібник для студентів вищих навчальних закладів – Горлівка: «Видавництво Ліхтар» – 2008. – 247 С.
233. Васильев В.П., Морозова Р.П., Кочергина Л.А. Практикум по аналитической химии. – М.: Химия, – 2000. – 328 С.
234. Мордерер Є.В. Гербіциди: монографія: у 2 т. Т. 1 : Механізми дії та практика застосування / Є. Ю. Мордерер, Ю. Г. Мережинський. - К. : [б.в.], 2009. - 379 с.
235. Симочко Л.Ю. Спрямованість мікробіологічних процесів у ґрунті агробіогеоценозів при застосуванні різних агрозаходів / Л.Ю. Симочко, В.В. Симочко, І.Й. Бігарій // Науковий Вісник Ужгородського університету (Серія: Біологія). — 2010. — № 28. — С. 47–51.

236. Curran W. Effectiveness of herbicides for control of hairy vetch (*Viciavillosa*) in winter wheat / W.S. Curran, J.M. Wallace, S.B. Mirksy, B.C. Crockett // *Weed Technol.* – 2015. – №29. – P. 509-518.
237. Rashid B. Herbocodes and pesticides as potential pollutants / B. Rashid, T. Husnain, S. Riazuddin // *Plant adaptation and Phytoremediation.* – 2010. – Part 2. – P. 427-447
238. Брогинский К.К., Маковский В.Н. Применение пестицидов и охрана окружающей среды. // Киев: ВиТни, 1979.- 207 с.
239. Герцюк М.Н. Химико-аналитические аспекты идентификации запрещенных и непригодных пестицидов. / Герцюк М.Н. // *Сотрудничество для решения проблемы отходов.* Х.: 2004, С.226.
240. Верголяс М. Р. Альтернативный метод оценки качества питьевых вод при помощи биотестирования // *Актуальные проблемы транспортной медицины.* 2016. № 4 (46). С. 159–167.
241. Крайнюкова А.Н. Система інтегральної токсикологічної оцінки природних і стічних вод // *Східно-європейський журнал передових технологій.* – 2009. – №1 (37). – С.30-34.
242. Бресткина М.Д., Тушмалова Н.А., Данильченко О.П. Экспресс-метод определения токсичности водной среды по регенерации пресноводной гидры *Hydra attenuate* // *Теоретические вопросы биотестирования.* – Волгоград, 1983. – С.133-136.
243. КНД 211.1.4.055-97. Методика визначення гострої летальної токсичності води на ракоподібних *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg. Затв. наказом Мінприроди України від 21.05.97 № 68.
244. Методика екологічної оцінки якості поверхневих вод за відповідними категоріями / Наказ Міністерства екології та природних ресурсів України від 31.03.1998 р. № 44. – Київ: Символ-Т, 1988. – 28 с.
245. ДСТУ 4074-2001. Якість води. Визначання гострої летальної токсичності хімічних речовин та води на прісноводній рибі [*Brachydanio rerio* Hamilton - Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. Статичний метод (ISO 7346-1 : 1996, MOD).

246. Vergolyas M. R., Goncharuk V. V. Evaluation of water quality control by using test organisms and their cells // Journal of Water Chemistry and Technology. 2016. 38 (1). P. 62–66.
247. Гідроекологічна токсикометрія та біоіндикація забруднень/ за ред. І. Т. Олексіва та Л. П. Брагінського. – Львів: Світ, 1995. – 437 с.
248. Даденко Е.В. Оценка применимости показателей ферментативной активности в биодиагностике и мониторинге почв / Е.В. Даденко, Т.В. Денисова, К.Ш. Казев, С.И. Колесников // Поволжский экологический журнал. - 2013. – №4. – С. 385-393.
249. МВ 10.2.1-113-2005 Санітарно – мікробіологічний контроль якості питної води. Методичні вказівки.
250. ISO 12890 : 1999 Water quality – Determination of toxicity to embryos and larvae of freshwater fish – Semi – static method.
251. Токсикометрия химических веществ, загрязняющих окружающую среду. – М.: Центр международных проектов ДКНТ. – 1986. – 426 С.
252. Куриленко В.В. Основы экогеологии, биоиндикации и биотестирования водных экосистем: Учеб. пособие. / Под ред. В.В. Куриленко. – СПб.: Изд-во СПбГУ. 2004. – 448 с.
253. Мелехова О.П. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: Учеб. пос. / Под ред. О.П. Мелеховой, Е.И. Егоровой. – М.: Академия, 2007. – 288 с.
254. . В. Кухар, Є. Кузьмінський, О. Ігнатюк, Н. Голуб. Екобіотехнологія та біоенергетика: проблеми становлення та розвитку // Вісн. НАН України. - 2005. - № 9. - С. 3–18.
255. Усенко О.В. Оцінка геннотоксичності об'єктів навколишнього середовища / /Вестн. ХНАДУ. - 2011. - Вип. 52. - С. 178–180.
256. Шалімов М.О. Біоіндикація : конспект лекцій/ М.О. Шалімов. — Одеса: Наука і техніка, 2011. - 123 с.

257. В.В. Яковлев, Т.Ю. Бирюкова, С.А. Мацюк Биотестирование природных вод Харьковской области для оценки их токсичности // Научнотехн. сб. - 2008. - № 84. - С. 102–110.
258. Trottier S., Blaise C., Kusui T., Johnson E.M. // Environ. Toxicol. Water Qual. – 1997. – 12. – Р. 265 – 271.
259. Методическое руководство по биотестированию вод РД 118-02-90 // Биотестирование с использованием ракообразных. – С.5-33.
260. Захаров А.Ф., Бенюш В.А., Кулешов Н.П. и др. Хромосомы человека. Атлас: – М., Медицина – 1982 – 264 С.
261. Болтина И. В. , Костик Е. Л., Верголяс М. Р. Применение краткосрочных тестов для исследования мутагенной активности бутылированной питьевой воды // Проблемы харчування: наук.-практ. журнал. 2011. № 1/2. С. 70–74.
262. Палагина І.А., Девейкіс Д.Н., Ващук Н.А., Калюжний Г.Л. Виявлення генотоксичної і мутагенної активності дисперсних азобарвників з метою їх гігієнічного нормування // Медицина праці та промисл. екологія. – 1995. – №5. – С. 12-15.
263. ISO 12890 : 1999 Water quality – Determination of toxicity to embryos and larvae of freshwater fish – Semi – static method.
264. Вишневецкий В.Ю. Принципы построения биотестовой системы / Вишневецкий В.Ю., Булавкова Н.Г., Ледяева В. С.// Известия ЮФУ. 6 2011. 6 № 9. 6 Т. 122. 6 С. 12-17.
265. Квасневська Н.Ф., Лебедєва Т.Л., Бадюк Н.С., Гоженко А.І. Біотестування в оцінці якості питних вод // Актуальные проблемы транспортной медицины. № 1 (39), 2015 г. – С. 24-35
266. Дегтярь С.В. Сравнительный анализ результатов биотестирования водопровод' ной воды в Кременчугском районе // Екологія та неосферологія. – 2012. – № 12. – Т.23. – С. 79 - 83.
267. В.В. Артамонов, М.Г. Василенко Токсичность воды поверхностного источника водоснабжения. [Электронный ресурс] [http:// www.ecologylife.ru /voda'i'zdorovje'2002/ toksichnost'vodyi'poverhnostnogo. html](http://www.ecologylife.ru/voda'i'zdorovje'2002/toksichnost'vodyi'poverhnostnogo.html)

268. Никифоров В.В., Штрбова Э.Д. Биотестирование в системе гидроэкологического мониторинга // Екологічна безпека. 2011. №1(11). 6 С. 35.
269. Е.С. Фомина, Е.А.Трошина Биоиндикация и биотестирование как методы определения загрязненности водных объектов. / Сборник статей V Международной научной конф. студентов и аспирантов “Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов”, 12 - 14 апреля 2006 г, Донецк.
270. Relyea R. A. The Impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities / Rick A. Relyea // Ecological Applications. – 2005. – 15(6). – P. 618–627.
271. В. В. Вембер, І. Г. Дітяшова Каталазна активність як індикаторна ознака чутливості тест-рослин до дії гербіцидів // XVIII Міжнар. наук.-практич. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених «Екологія. Людина. Суспільство» (Київ, 27–29 травня 2015 р.) : зб. тез доп. / укл. Д. Е. Бенатов. – К. : НТУУ «КПІ», 2015. – С. 22–23.
272. Худoley В.В., Мізгирьов І.В. Шляхи розвитку та перспективи екологічної онкології // Питання онкології. – 1997. – Т. 43. – № 1. – С. 116 - 119.
273. Duesberg P., Rasnick D. Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own // Cell Motility and Cytoskeleton. – 2000. – V. 47. – P. 81 - 107.
274. Isenrin R. Pesticide reduce the biodiversity / Richard Isenrin // Pesticides News 88, June 2010, P.4-7.
275. Крук Л.С. Екотоксична дія пестицидів в агроценозах України як функція фізико-хімічної будови їх молекул : Автореф. дис.канд. с.-г. наук: - К., 2001. - 19 с.
276. В. Д. Логвинский, О. П. Негроров, Т. В. Логвинская, Пестициды. Современные проблемы природопользования / Воронежский государственный университет. - 2010. – 32 с.
277. Величко А.К., Соловьев В.Б., Генгин М.Т. Методы лабораторного определения общей перекись разрушающей активности ферментов растений //



- Известия Пензенского государственного педагогического университета им. В.Г. Белинского. - 2009. - Вып. 14, № 18. — С. 44–48.
278. Лемешко Б. Ю., Лемешко С. Б., Горбунова А. А. О применении и мощности критериев проверки однородности дисперсий. Ч. I. Параметрические критерии // Измерительная техника. — 2010. — № 3. — С. 10-16.
279. Лемешко Б. Ю., Лемешко С. Б., Горбунова А. А. О применении и мощности критериев проверки однородности дисперсий. Ч. II. Непараметрические критерии // Измерительная техника.- 2010.- № 5. - С. 11-18.
280. Учебно-методический комплекс дисциплины «Статистика» - часть 2.
281. Тихонов В.Н. Анализ изменений массы внутренних органов в токсикологическом эксперименте / В.Н. Тихонов, В.К. Шитиков, Н.А. Мирошниченко, А.Ф. Ковалев // Фармакология и токсикология. 1984. – Т. 47. – № 5.-С. 113-116.
282. Трахтенберг И.М. Методы изучения хронического действия химических и биологических загрязнителей / Трахтенберг И.М. Тимофиевская Л.А., Квятковская И.Я.// Рига, Зинатис, 1987. 172 с.
283. Тица Н.У. Клиническое руководство по лабораторным тестам / Под ред. Н.У.Тица. // М.:ЮНИМЕД-ПРЕСС, 2003. – 942 с.
284. Механізми гематотоксичної дії сполук свинцю Апихтіна О.Л., Дмитруха Н.М., Коцюруба А.В. та ін.// Журнал НАМН України, 2012, т.18, № 1. – С.100-109.
285. "Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною" (ДСанПіН 2.2.4-171-10).
286. Комаров Ф.И. Биохимические исследования в клинике/ Комаров Ф.И., Коровин Б.Ф.// М.: Наука – 2001. – 215 с.
287. Березов Т.Т. Биологическая химия / Березов Т.Т., Коровин Б.Ф.// М.: Наука. 2004. – 540 с.
288. Медицинские лабораторные технологии. Справочник / Под ред. Проф. А.И. Карпищенко. – Санкт-Петербург: Интермедика, 2002. – 600 с.

289. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Липиды, липопротеиды и атеросклероз. –СПб: ПитерПресс, 1995, -304 с.
290. Ганда О. Дислипидемия. В кн. Эндокринология. /Под ред. Н. Лавина. Пер с англ. –М., Практика, 1999. -1128 с.
291. Меньшикова Е.Б. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. / Е.Б. Меньшикова, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин [и др.] – Новосибирск: АР-ТА, 2008. – 284 с.
292. Антиоксидантна система захисту організму/ Бєленічев І.Ф., Є.Л.Левицький, Ю.І.Губський та інші// Совр. пробл. токсикол. – 2002. -№3. – С. 24-31.
293. Цудзевич Б.О. Антиоксидантна система в тканинах щурів за умови інтоксикації важкими металами / Б.О.Цудзевич, І.В.Калінін, Н.А.Петрук // Совр. Пробл. токсикол. – 2012. – №2. – С.36-39.
294. Клінічна імунологія та алергологія: Підручник / [Драннік Г. М., Прилуцький О. С, Бажора Ю. І. та ін.]; за ред. проф. Г. М. Дранніка. –К.: Здоров'я, 2006. – 888 с.
295. Вершигора А.Ю., Пастер Є.У., Колибо Д.В. та ін. Імунологія: Підручник. К.: Вища школа, 2005. – 599 с.
296. Насонов Е.Л., Сура В.В. Взаимосвязь аутоиммунной и иммунокомплексной патологии: современное состояние проблемы // Терапевтический архив. – 1984. – Т. LVI, № 10. – С. 4–9.
297. Система иммунитета при заболеваниях внутренних органов [ Ганжа И.М., Мягкая И.П., Сахарчук В.М. и др.]; под ред. И.М. Ганжи. – К.: здоров'я, 1985. – 280 с.
298. . Adams L.A., Angulo P., Lindor K.D. Nonalcoholic fatty liver disease // CMAJ.- 2005.- Vol. 172.— P. 899—905.
299. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease // N. Engl. J. Med.- 2002.- N 346.— P. 1221—1231.
300. Bellentani S., Bedogni G., Miglioli L. et al. The epidemiology of fatty liver // Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.— 2004.— N 16.— P. 1087—1093.

301. Bloomgarden Z.T. Third Annual World Congress on the Insulin Resistance Syndrome: Mediators, antecedents, and measurement // *Diabetes Care*.— 2006.— Vol. 29, N 7.— P. 1700—1706.
302. Hamaguchi M., Kojima T., Takeda N. et al. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease // *Ann. Intern. Med.*— 2005.— Vol. 143.— P. 722—728.
303. Marchesini G., Bugianesi E., Forlani G. et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis and the metabolic syndrome // *Hepatology*.— 2003.— Vol. 37.— P. 917—923.
304. Perez. Agutlar F. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis // *Gastroenterol. Hepatol.*— 2005.— N 28 (7).— P. 396—406.
305. Балаховський І.С. Руководство по клинической лабораторной диагностике /Под ред. В.В. Меньшикова. —М.: Медицина, 1982, 235 с.
306. Instruction manual of ZP HEMATOFLUOROMETER Models 206 and 206 D, 1996.
307. Иммунология: Практикум / Е.У. Пастер, в.В. Овод, В.К. Позур, Н.Е. Вихоть. — К.: Віща шк. Изд-во при Киев. Ун-те, 1989. — 304 с.
308. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / [Беркало Л.В., Бобович О.В., Боброва Н.О. та ін.]; за ред. Кайдашева І.П. — Полтава: Полімет, 2003. — 320 с.
309. Vergolyas M. Assessment of drinking water quality at the cellular level. *Adv Tissue Eng Regen Med Open Access*. 2019;5(1):53–55. DOI: 10.15406/atroa.2019.05.00099.
310. Стойка Р. Перспективи створення наноносіїв для доставки генетичного матеріалу в клітини. // *Вісник НАН України*. 2018. № 3. С.8-12.
311. Клименко О.М. Морфометрична оцінка стану імунних органів коропових риб: методичні рекомендації / О.М. Клименко, В.І. Марченко, О.М. Шандрук. — Рівне, 1998. —15 с.

312. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах. Перший національний конгрес з біоетики, Київ, 2001 р. // Ендокринологія. – 2003. – № 8 (1). – С. 142–145.
313. Антомонов М.Ю. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных /М.Ю. Антамонов. - К. : ФМД, 2006.- 558 с.
314. Горальський Л.П. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології : навчальний посібник / Леонід Горальський, Володимир Хомич, Олексій Кононський. – Житомир: Полісся, 2005. – 288 с. – Бібліогр. с. 275–276.
315. Остякова М.Е. Диагностика болезней и терапия животных, патология, онкология и морфология животных / М.Н. Остякова // Вестник КрасГАУ. – Краснодар, 2015. – № 12. – С. 195–198.
316. Vergolyas M. R., Trakhtenberg I. M., Dmytrukha N. M. Assessment of toxic effects of drinking water from various sources on indicators rats Wistar immune system. Journal of Education, Health and Sport. – 2016;6(9). – P. 855-866. eISSN 2391-8306. DOI.
317. Федоренко В.І. Оцінка комбінованої дії свинцю і кадмію на рівень середньо смертельних доз в підгострих дослідках за показниками безумовно- 385 рефлексорної діяльності та емоційної реактивності білих щурів / В.І. Федоренко, Ю.В. Федоренко // Гігієна населених місць. 2010. № 55. – С. 80–85.
318. Carpine hepatic lipidosis induced through the intake of low levels of dietary cobalt / E.H. Johnson, K. Al-Habsi, E. Kaplan [et al.] // Veterinary Journal. – 2004. – Vol. 168, N 2. – P. 174–179.
319. Vergolyas M. Research of cytotoxic activity of water from different water supply sources. Adv Tissue Eng Regen Med Open Access. 2019;5(3):92–96. DOI: 10.15406/atroa.2019.05.00105.
320. Братівнік Л.І. Оцінка мутагенної активності регуляторів росту рослин в культурі лімфоцитів людини // Тези Доповіді II з'їзду медичних генетиків України – Львів. – 1995. – С. 24.

321. Фонштейн Л.М., Абилов С.К., Бобринев Е.В. [и др.] Методы первичного выявления генетической активности с помощью бактериальных тест-систем (методические указания: – М. – 1985. – 21 С.
322. Бариляк І.Р., Бишовець Т.Ф. Дослідження генотоксичні активності біфенілу і його хлорпохідних. // Медична генетика: Респ. Міжвід. зб. – Київ. – МОЗ УРСР. – 1990. – Вип. 1. – С. 119 – 122.
323. Захаров А.Ф., Бенюш В.А., Кулешов Н.П. и др. Хромосомы человека. Атлас: – М., Медицина – 1982 – 264 С.
324. Палагина І.А., Девейкіс Д.Н., Вашук Н.А., Калюжний Г.Л. Виявлення генотоксичної і мутагенної активності дисперсних азобарвників з метою їх гігієнічного нормування // Медицина праці та промисл. екологія. – 1995. – №5. – С. 12-15.
325. Дуган А.М. Суммарная мутагенная активность вод из артезианских скважин и смешанного водопровода г. Киева // Проблемы екологічної та медичної генетики і клінічної імунології: Зб. Наук. Праць. – Київ, Луганськ. – 1998. – Вип. 9. – С. 18 – 21.
326. Худолей В.В., Мізгирьов І.В. Шляхи розвитку та перспективи екологічної онкології // Питання онкології. – 1997. – Т. 43. – № 1. – С. 116 - 119.
327. Duesberg P., Rasnick D. Aneyploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own // Cell Motility and Cytoskeleton. – 2000. – V. 47. – P. 81 - 107.
328. Патент України № 201000606 від 25.03.2011. Бюл.№6 Спосіб визначення мутагенної активності питної води і культуральне середовище для його реалізації Гончарук В.В., Болтіна І.В., Верголяс М.Р.
329. И.В. Болтина, Е. Л. Костик, М. Р. Верголяс Применение краткосрочных тестов для исследования мутагенной активности бутылированной питьевой воды // Пробл. харчування : наук.-практ. журн. - 2011. - N 1/2. - С. 70-74.
330. Виленчик М.М. Нестабильность генома и отдельные последствия влияния излучений – М: Энергоиздат. – 1987. – 192 С.
331. Знаєвська І.А. Особливості цитогенетичного ефекту в лімфоцитах периферійної крові дітей, які зазнали впливу деяких мутагенних факторів

фізичної та хімічної природи малої інтенсивності: дисертація к-та. мед. наук. – К. – 1997. – 146 С.

332. Пилинський М.А., Шеметун А.М., Дибська С.С. [та ін.] Цитогенетичний моніторинг осіб, які постраждали від аварії на Чорнобильській АЕС // Цитологія та генетика. – 1994. – Т. 28. – № 3. – С. 18 - 24.

333. Керівництво по короткострокових тестах для виявлення мутагенних і канцерогенних хімічних речовин: ВООЗ, – Женева. – 1989. – 212 С.

334. Болтина І.В. Метод підрахунку анеуплоїдних клітин при метафазному аналізі аберацій хромосом в культурі лімфоцитів периферичної крові людини. – Свідectво про реєстрацію авторських прав на твір. – 2003. – ПА № 8332.

335. Міллер Е.С. Мутагенність хімічних канцерогенів: кореляції, проблеми та інтерпретації // [під ред. Холлендера А.] Хімічні мутагени: принцип і методи їх виявлення. – 1971. – Нью-Йорк, Лондон, Plenum Press. – С. 83 - 119.

336. Болтина І.В., Кравчук А.П. Метод вивчення мутагенної активності речовин (метафазного аналізу аберацій хромосом в культурі лімфоцитів периферичної крові людини) *in vitro* з метаболічною активацією. – Свідectво про державну реєстрацію прав автора на твір. – 2001. – ПА № 4301.

337. Hungerford D.A. Leucocytes cultured from small inoculate of whole blood and preparation metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl. // Stain Techn. – 1965. – Vol. 40. – P. 333 - 338.

338. Марон Д.М., Еймс В.Н. Доопрацювання для випробування на мутагенність *Salmonella*. // Експериментальна генетика. – 1983. – Т. 113. – С.172 - 215.

339. Западнюк І.П., Западнюк В.І., Захарія Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторні тварини. Розведення, утримання, використання в експерименті – К: Наука. – 1983 – 383 С.

340. Lowry O.N., Roserbrough N.J., Farr A.L. and Randal R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193. – P.265 - 275.

341. Завгородній І.В., Грабовецька Є.Р., Пишнов Г.Ю. Токсикогеноміка як один із пріоритетних напрямків в сучасній профілактичній токсикології // Сучасні проблеми токсикології. – 2006 р. – № 3. – С. 30 - 36.
342. Альтернативні методи і тест-системи / І.М. Трахтенберг, В.М. Коваленко, Н.В. Кокшарева, П.Г. Жмінько та ін. К.: ВД «Авіцена», 2008. – 268 с.
343. Биотестирование природных вод Харьковской области / В.В. Яковлев, Т.Ю. Бирюкова, С.А. Мацюк // Научно-технический сборник Коммунальное хозяйство городов. – 2008. – №84. – С. 102-110.
344. Optimization and pre-validation of an in vitro test strategy for predicting human acute toxicity / C. Clemedson [et al.] //ALTEX. – 2006. - № 23 (suppl.). – P. 254-258.
345. Combes R.D. The use of human cells in biomedical research and testing // Altern. Lab. Anim. – 2004. - № 32. – P.43-49.
346. Методичні рекомендації. Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів /Трахтенберг І.М., Ульберг З.Р., Чекман І.С., Дмитруха Н.М. та ін. Київ, 2011. – 108 с.
347. Щодо токсичності хлорованої водопровідної води / О. М. Якубчак, В. О. Загребельний, Л. В. Адаменко // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Сер. : Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва. - 2013. - Вип. 188(3). - С. 182-185.
348. *Fiskesjö G.* // Hereditas. – 1985. - 102. – P.99-112.
349. *Goncharuk V.V., Vergolyas M.R.* // J. Water Chem. and Technol. - 2014. - 36, № 1. - P. 83-91.
350. Postel S. // State of the world 1987. – New York: W.W. Norton, 1987. – P. 169-173.
351. ДСТУ 7527:2014 Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості.
352. Батян А.Н. Основы общей и экологической токсикологии / А.Н. Батян, Г.Т. Фрумин, В.Н. Базылев — СПб.: СпецЛит, 2009. — 352 с.

353. Башкин В.Н. Оценка риска при расчетах критических нагрузок на экосистемы. Тяжелые металлы в окружающей среде. / В.Н. Башкин — Пушино: ОНТИ НББИ, 1997.— С. 172–181.
354. Безель В.С. Популяционная экотоксикология млекопитающих/ В.С. Безель - М.: Наука. 1987. — 129 с.
355. Безель В.С. Экологическая токсикология: популяционный и биоценотический аспекты / В.С. Безель - Екатеринбург: Изд-во «Гощицкий», 2006. - 280 с.
356. Левич А. П., Булгаков Н. Г., Максимов В. Н. Теоретические и методические основы технологии регионального контроля природной среды по данным экологического мониторинга. М.: НИА-Природа, 2004. 271 с.
357. Жмур Н.С. Государственный и производственный контроль токсичности вод методами биотестирования в России / Н.С. Жмур - М.: Международный Дом Сотрудничества, 1997. - 117 с.
358. Западнюк И.П. Лабораторные животные. Разведение и содержание, использование в эксперименте / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк и др. - Киев: Высш.школа, 1983. - 383 с.
359. Экологический мониторинг. Современные проблемы мониторинга пресноводных экосистем. Ч. VIII: учеб. Пособие / Под/ред. проф. Д.Б. Гелашвили, проф. Г.В. Шургановой. – Н. Новгород: Изд/ ННГУ, 2014. – 374 с.
360. Ройт А. Иммунология / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. — М.: Мир, 2000. — 581с.
361. Carins, J. Ecological toxicity testing: scale, complexity and relevance / J. Carins, B.R. Niederlehner. – Chelsea: Lewis Publishers, Inc., 1995. – М. I. – 222 p. Chemical Weapons Convention. The Harvard Sussex program on CBW armament and arms limitation. – 1993.
362. Сапин М.Р. Иммунная система человека / М.Р. Сапин, Л.Е. Этинген — М.: Медицина, 1996. — 302 с.
363. Сапин М.Р. Лимфатический узел / М.Р. Сапин, Н.А. Юринга, Л.Е. Этинген — М.: Медицина, 1978. — 272 с.



364. Иммунологические методы исследований / Под ред. И. Лефковитса, Б. Перниса. — М.: Мир, 1988. — 530 с. 3
365. Йегер Л. (Jager L.) Структура и функция иммунной системы. Клиническая иммунология и аллергология / Л. Йегер (L. Jager) М.: Медицина, (в 3-х томах) т. 1., 1990. — С.17-60.
366. Kammen, D.M. Should we risk it? Exploring environmental, health, and technological problem solving / D.M. Kammen, D.M. Hassenzahk. — Princeton: Princeton University Press, 1999. — 404 p.
367. Lenian, J.M.A. Activation analysis and public health / Symp. on nucl. Activation techniques in the life science / J.M.A. Lenian. — Vienna, 1967. — P. 601.
368. Lim, R.K. A method for the evolution of cumulation and tolerance by the determination of acute and subchronic median effective doses / R.K. Lim, K.C. Runk, H.G. Glass, F. Soaje-Fchague // Arch. inter. pharm. — Ther., 1961. — Vol. 130. —P. 336–352.
369. Lindquist, L. Influence of life history and sex on metal accumulation in two beetles species (Insecta: Coleoptera) / L. Lindquist, M. Block / Bull. Environ. Contam. and Toxicol. — 1997. — Vol. 58. — № 4. — P. 518–522.
370. Nyholm, N.E.I. Monitoring of terrestrial environmental metal pollution by ns of free-living insectivorous birds / N.E.I. Nyholm / Annali di chimica. — 1995. — Vol. 85. —P. 343–351.
371. Nyholm, N.E.I. Influence of heavy metal exposure during different phases of the ontogeny on the development of pied flycatchers, *Ficedula hypoleuca*, in natural populations / N.E.I. Nyholm // Arch. environ. contam. toxicol. — 1998. — Vol. 35. —P. 632–637.
372. Sawicka-Kapusta, K. Heavy metals in tits from polluted forests in southern Poland / K. Sawicka-Kapusta, J. Kozłowski, T. Sokolowska // Environ. pollut. (Series A). — 1986. — Vol. 42. — P. 297–310.
373. Sinha, J. Reprogramming bacteria to seek and destroy an herbicide / J. Sinha, J.S. Reyes, J.P. Gallivan // Nature chemical biology. — 2010. — Vol. 6. — P. 464–470.

374. Таран О. П., Пармон В. Н., Верголяс М. Р. Каталитические, сорбционные, микробиологические и интегрированные методы для защиты и ремедиации окружающей среды: монография. Новосибирск : Изд-во СО РАН, 2013. 298 с.
375. Верголяс М.Р. Екотоксикологічна оцінка якості питних вод на тест-організмах // SCIENCES OF EUROPE 2016p., № 8 (8), С. 4-8.
376. Norppa H., Falck G.C. What do human micronuclei contain? // Mutagenesis. — 2003. — 18, N 3. — P. 221–233
377. Архипчук В.В., Малиновская М.В. Применение комплексного подхода в биотестировании природных вод // Хімія і технологія води. — 2000. — 22. — № 4. — С. 428—443.
378. Архипчук В.В., Гончарук В.В. Биотестирование качества воды на клеточном уровне // Хімія і технологія води - 2001. - 23. - № 5. - С. 531-544.
379. Kusui T. Japanese application of bioassays for environmental management // Scientific World Journal. - 2002. - 2. - P. 537 - 541.
380. Guzzella L., Monarca S., Zani Z., Feretti D., Zerbini I. In vitro potential genotoxic effects of surface drinking water treated with chlorine and alternative disinfectants // Mutat. Res. — 2004. — 564 (2). — P. 179—193.
381. Верголяс М. Р. Альтернативный метод оценки качества питьевых вод при помощи биотестирования // Актуальные проблемы транспортной медицины. 2016. № 4 (46). С. 159–167.
382. Inoue A., Yokomori K., Tanabe H. et al. // Int. J. Cancer. — 1997. — P. 10705 1077.
383. Верголяс М. Р. Кровь как интегральная система организма // ScienceRise. — 2016. — Т. 2. — №. 1 (19). — С. 7511.
384. Гончарук В.В., Верголяс М.Р. Спосіб визначення цитотоксичності водного середовища. Патент України № 20001532 від 06.02.2008 р. Бюл. № 6.
385. Екологічна токсикологія та екотоксикологічний контроль. Л. І. Григор'єва, Ю. А. Томілін. — Миколаїв : Вид-во ЧДУ імені Петра Могили. — Миколаїв, 2015. — 240 с.

386. Трахтенберг І. М. Проблеми нормування в токсикології / І. М. Трахтенберг та інші. – М. : Медицина. – 1991. – 208 с.
387. Екологічна токсикологія та вимоги до знешкодження токсикантів «Екологічна токсикологія на порозі сторіччя» / Глухівський І. В., Шумейко В. М., Овруцький В. М. – К., 1997. – С. 12–25.
388. Иваненко Н. В. Экологическая токсикологи : [учебное пособие] / Н. В. Иваненко. – М., 2005. – 205 с.
389. Израэль Ю. А. Экология и контроль состояния природной среды / Ю. А. Израэль. – М. : Гидрометеиздат, 1984. – 559 с.
390. Vergolyas M. Assessment of drinking water quality at the cellular level // Adv Tissue Eng Regen Med Open Access. 2019. № 5 (1). P. 53–55.
391. Орлов Д. С. Экология и охрана биосферы при химическом загрязнении / Д. С. Орлов, Л. К. Садовникова, И. Н. Лозановская. - М. : Высш. шк., 2002. – 334 с. 35.
392. Основы экотоксикологии: Методические указания к выполнению лабораторного практикума и СРС. – Улан-Удэ : Изд-во ВСГГУ, 2006 р. - 123 с.
393. Никифоров В.В. Биотестирование в системе гидроэкологического мониторинга // Екологічна безпека. – 2011. - №1 (11). – С.31-35.
394. Никифорова О.О. Сакун О.А. Огляд сучасних класифікацій екосистем Екологічна безпека. – Кременчук: КрНУ, 2011. – Вип. 1 (11). – С. 44–49.
395. Романенко В.Д. Основы гидроэкологии. – К.: Обереги, 2001.
396. Руководство по методам гидробиологического анализа поверхностных вод и донных отложений// Под ред. Абакумова В.А. – Л. :Гидрометеиздат, 1983.
397. Яшнов В.А. Практикум по гидробиологии. – М.: Высшая школа, 1969.
398. Яковлев В.В. Некоторые направления совершенствования нормативов качества питьевой воды // Коммунальное хозяйство городов. – 2010 - №93. – С.42-51.
399. Прокопов В.О., Бердик Ю.В., Чичковська Г.В. та ін. // Довкілля та здоров'я. – 2003. - №3 (26). – С. 18-21.

400. Методы биоиндикации и биотестирования природных вод / [под ред. В. А. Брызгалю]. – Л. : Гидрометеиздат, 1979. – 274 с.
401. Брагінський Л. П. Біотестування як метод контролю токсичності природних і стічних вод / Л. П. Брагінський // Гідроекологічна токсикометрія та біоіндикація забруднень. – Львів : Світ, 1993. – С. 27-37.
402. Стецюк Л. М. Використання методів біоіндикації та біотестування для оцінки стану водних екосистем // Серія «Сільськогосподарські науки» Випуск 2(62) 2013 – С. 171-185
403. Загороднюк Ю.В., Омельчук С.Т., Загородню К.Ю., Василенко М.Г. Закономірності утворення хлорорганічних сполук у процесах очищення та транспортування питної води // Медичні перспективи. 2011. – т.16, №1. – С. 1-8.
404. Залявська О.В., Роговий Ю.Є. Вплив води низького поверхневого натягу на екскреторну функцію нирок інтактних щурів // Буковинський медичний вісник. – 2010. – т.14, №3 (55). – С. 106-108.
405. Vergolyas M.R., Lutsenko T.V., Zlatskii I.A., Goncharuk V.V. Determination of the quality of artesian waters // Journal of Water Chemistry and Technology. 2014. 36 (5). P. 252–256.
406. М.Р. Верголяс, Н.М. Дмитруха, І.М. Андрусишина Особливості впливу питної води з різних джерел водопостачання на організм щурів вістар // Современные проблемы токсикологии, Киев, 2016г.
407. Т.Ф. Петренко, Л. Л. Новицька, О. О. Єфремова, Н.В. Семенюк Біотестування водних розчинів екотоксикантів // Наукові записки. Т.21. Біологія та екологія. Національний університет «Києво-Могилянська академія». – 2003. – С. 78 – 82.

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІНФРАСТРУКТУРИ ТА ТЕХНОЛОГІЙ  
вул. Кирилівська, 9, м. Київ, 04071, Україна  
тел./факс: (044) 463-74-70, 482-51-26  
E-mail: duit.kyiv@ukr.net  
Код ЄДРПОУ 413303257



MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE  
OF UKRAINE  
STATE UNIVERSITY OF INFRASTRUCTURE  
AND TECHNOLOGIES  
9, Kyrylivska St., Kyiv, Ukraine, 04071  
tel./fax: (+38044) 463-7470, 482-51-26  
E-mail: duit.kyiv@ukr.net

Від «06» 06 2019 р. № 04/Н-489  
На № \_\_\_\_\_ від «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

ЗАТВЕРДЖУЮ  
Директор Київського інституту  
водного транспорту ім. гетьмана  
Петра Конашевича-Сагайдачного  
Державного університету  
інфраструктури та технологій  
д.т.н., професор



О.М.Тимошук

«6» 06 2019 р.

## АКТ

впровадження у навчальний процес результатів дисертаційної роботи  
Верголяс М.Р. «Екотоксикологічна оцінка якості та безпечності питної води» на  
здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук  
за спеціальністю 03.00.16 «Екологія»

Комісія я у складі: голови – завідувача кафедри природничо-технічного  
забезпечення діяльності водного транспорту к.т.н., доцента Гораліка Є.Т. та  
членів: к.т.н., доцента Міхеєва О.І. та ст. викладача Самойленко В.М. встановила,  
що результати наукових досліджень, а саме:

1) комплекс методів з підвищення ефективності моніторингу якості води, що  
увійшли до двох Національних стандартів України: «Якість води. Метод  
визначення цито- та генотоксичності води і водних розчинів на клітинах крові  
прісноводної риби Даніо rerіо (Brachydanіo rerіо Hamilton-Buchanan)» (ДСТУ  
7387:2013), «Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості» (ДСТУ

7525:2014);

2) метод визначення якості питної води з використанням різних біологічних об'єктів, культури клітин людини і тварин;

3) методики для визначення цитогенетичних показників у біотестуванні природних і питних вод, що можуть бути використані для оцінки токсичності речовин, що містяться у воді;

4) вплив питної води на живий організм залежить від комбінації самих домішок та від їх концентрацій на живий організм за умов відповідності встановленим санітарно гігієнічним нормам. У воді можуть бути присутні біологічно активні домішки, що негативно впливають на живі організми. Сучасні фізико-хімічні методи аналізу складу води не дають можливості вичерпно оцінювати її якість і прогнозувати вплив присутніх в ній речовин на біологічні об'єкти.

Запропоновані автором матеріали мають наукове та практичне значення та використовувались при створенні курсу лекцій для підготовки бакалаврів та магістрів зі спеціальності 271 Річковий та морський транспорт з дисциплін: «Основи охорони праці та навколишнього середовища», «Основи охорони праці, безпека життєдіяльності та медична допомога», «Нормативні документи з охорони праці в міжнародному судноплавстві».

Голова:



Є.Т.Горалік

Члени:



О.І.Міхеев

В.М.Самойленко



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор Державного підприємства  
«Національний центр превентивної  
токсикології, харчової та хімічної  
безпеки імені академіка Л.І.Медведя  
Міністерства охорони здоров'я  
України»  
Продавчук М.І.

«22» 10 2018 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва запропонованих для впровадження Методичних вказівок:  
Патент України № 201004569 від 25.08.2011. Бюл.№16. Спосіб визначення  
генотоксичності водного середовища.

2. Ким запропоновано, адреса, виконавці:  
Інститут колоїдної хімії та хімії води ім. А.В.Думанського НАН України, 03142, м.  
Київ, бул. Академіка Вернадського, 42.

Виконавці: В. Гончарук, М. Верголяс, І. Болтіна.

3. Джерело інформації:  
Методичні рекомендації, консультації спеціалістів.

4. При проведенні яких робіт впроваджена пропозиція:  
Під час проведення токсиколого-гігієнічних досліджень з оцінки якості водних  
зразків.

5. Ефективність впровадження:  
Запропонований спосіб визначення генотоксичності водного середовища з  
використанням еритроцитів периферичної крові риб дає можливість визначити  
повний набір аномалій ядер за впливу низьких концентрацій токсикантів,  
підвищити чутливість та інформативність мікроядерного тесту, що сприяє більш  
об'єктивній оцінці впливу токсикантів на організм.

6. Зауваження та пропозиції:  
Зауважень немає.

Відповідальний за впровадження:  
завідуючий відділом «Інститут  
експериментальної токсикології і  
медико-біологічних досліджень  
д.б.н. Жмійко П.Г.

«22» 10 2018 р.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор Державного підприємства  
«Науковий центр превентивної  
токсикології, харчової та хімічної  
безпеки імені академіка Л.І.Медведя  
Міністерства охорони здоров'я  
України»  
Проданчук М.Г.

«22» 10 2018 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва запропонованих для впровадження Методичних вказівок:  
Патент України № 201000606 від 25.03.2011. Бюл.№6 Спосіб визначення мутагенної активності питної води і культуральне середовище для його реалізації.
2. Ким запропоновано, адреса, виконавці:  
Інститут колоїдної хімії та хімії води ім. А.В.Думанського НАН України, 03142, м. Київ, бул. Академіка Вернадського, 42.  
Виконавці: В. Гончарук, І. Болтіна, М. Верголяс.
3. Джерело інформації:  
Методичні рекомендації, консультації спеціалістів.
4. При проведенні яких робіт впроваджена пропозиція:  
Під час проведення токсиколого-гігієнічних досліджень з оцінки якості водних зразків.
5. Ефективність впровадження:  
Спосіб визначення мутагенності активності води на культурі лімфоцитів периферичної крові людини дозволяє визначити наявність мутагенів і промутагенів у водному середовищі. Висока результативність даного способу досягається використанням складу культурального середовища. Запропонований спосіб визначення мутагенної активності питної води розширює інформативність одержаних цитогенетичних показників і дає можливість охарактеризувати негативних вплив на організм людини.
6. Зауваження та пропозиції:  
Зауважень немає.

Відповідальний за впровадження:  
завідуючий відділом «Інститут  
експериментальної токсикології і  
медико-біологічних досліджень  
д.б.н. Жмійко П.Г.

«22» 10 2018 р.



## «ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор Державного підприємства  
«Національний центр превентивної  
токсикології та харчової та хімічної  
безпеки імені академіка Л.І.Медведя  
Міністерства охорони здоров'я України»  
Григорук М.

«08» 11 2018 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

### 1. Назва запропонованих для впровадження Методичних вказівок:

Патент України № 201012982 від 10.01.2012. Бюл.№1 Спосіб підготовки біологічного об'єкта для визначення токсичності води.

### 2. Ким запропоновано, адреса, виконавці:

Інститут колоїдної хімії та хімії води ім. А.В.Думанського НАН України, 03142, м. Київ, бул. Академіка Вернадського, 42.

Виконавці: В. Гончарук, М. Верголяс.

### 3. Джерело інформації:

Методичні рекомендації, консультації спеціалістів.

### 4. При проведенні яких робіт впроваджена пропозиція:

Під час проведення токсиколого-гігієнічних досліджень для оцінки можливого антропогенного забруднення водного середовища.

### 5. Ефективність впровадження:

Поряд із стандартними методами токсикологічних досліджень запровадження данного способу підготовки біологічного об'єкту для визначення токсичності води значно підвищило інформативність результатів дослідження щодо цито- і генотоксичності водних зразків, що сприяло об'єктивізації оцінки їх шкідливого впливу на організм.

### 6. Зауваження та пропозиції:

Зауважень немає.

Відповідальні за впровадження:

Зав. відділом «Інститут експериментальної  
токсикології і медико-біологічних досліджень  
д.б.н. Жмійко П.Г.

Зав.лабораторією екогігієни і  
токсикології небезпечних відходів  
к.б.н. Повякель Л.І.

«08» 11 2018 р.

«08» 11 2018 р.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор Державного підприємства  
«Науковий центр превентивної  
токсикології, харчової та хімічної  
безпеки імені академіка Л.І.Медведя  
Міністерства охорони здоров'я  
України»

Проданчук М.Г.

«14» січня 2019 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва запропонованих для впровадження Методичних вказівок:

ДСТУ 7387:2013 Якість води. Метод визначення цито- та генотоксичності води і водних роз-чинів на клітинах крові прісноводної риби Даніо rerіо (Brachydanіо rerіо Hamilton-Buchanan).

2. Ким запропоновано, адреса, виконавці:

Інститут колоїдної хімії та хімії води ім. А.В.Думанського НАН України, 03142, м. Київ, бул. Академіка Вернадського, 42.

Виконавці: В. Гончарук, М. Верголяє.

3. Джерело інформації:

Методичні рекомендації, консультації спеціалістів.

4. При проведенні яких робіт впроваджена пропозиція:

Під час проведення токсиколого-гігієнічних досліджень з оцінки якості водних зразків.

5. Ефективність впровадження:

Поряд із стандартними методами токсикологічних досліджень запропонований метод визначення цито- і генотоксичності на клітинах крові прісноводної риби значно підвищує інформативність результатів досліджень і сприяє об'єктивізації оцінки шкідливого впливу токсичних речовин водного середовища на організм.

6. Зауваження та пропозиції:

Зауважень немає.

Відповідальний за впровадження:

завідуючий відділом «Інститут експериментальної токсикології і медико-біологічних досліджень

д.б.н. Жмійко П.Г.

«14» 01 2019 р.



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор Державного підприємства

«Національний центр превентивної

токсикології, гігієни та хімічної

безпеки імені академіка Л.І.Медведя

Міністерства охорони здоров'я

України

Продавчук М.Г.



«10» 12 2018 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва запропонованих для впровадження Методичних вказівок:

Патент України № 201113123 від 10.01.2014. Бюл.№1 Спосіб визначення цито- та генотоксичності питної води.

2. Ким запропоновано, адреса, виконавці:

Інститут колоїдної хімії та хімії води ім. А.В.Думанського НАН України, 03142, м. Київ, бул. Академіка Вернадського, 42.

Виконавці: В. Гончарук, М. Верголяс.

3. Джерело інформації:

Методичні рекомендації, консультації спеціалістів.

4. При проведенні яких робіт впроваджена пропозиція:

Під час проведення токсиколого-гігієнічних досліджень з оцінки якості водних зразків.

5. Ефективність впровадження:

Запропонований метод дає можливість одночасно визначити цито- і генотоксичність питної води та водного середовища за наявності в них токсикантів у малих концентраціях, що сприяє більш об'єктивній оцінці шкідливого впливу ксенобіотиків на організм.

6. Зауваження та пропозиції:

Зауважень немає.

Відповідальний за впровадження:

завідуючий відділом «Інститут експериментальної токсикології і медико-біологічних досліджень д.б.н. Жмілько П.Г.

 «10» 12 2018 р.



«ЗАТВЕРДЖУЮ»  
Директор ДІІ УКРНДІ МТ МОЗ  
УКРАЇНИ, д.мед.н., проф.  
А.І.Гоженко  
«18» квітня 2019 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва запропонованих для впровадження Методичних вказівок:  
Патент України № 201000606 від 25.03.2011. Бюл.№6 Спосіб визначення мутагенної активності питної води і культуральне середовище для його реалізації.
  2. Ким запропоновано, адреса, виконавці:  
Інститут колоїдної хімії та хімії води ім. А.В.Думанського НАН України, 03142, м. Київ, бул. Академіка Вернадського, 42.  
Виконавці: В. Гончарук, І. Болтіна, М. Верголяс.
  3. Джерело інформації:  
Методичні рекомендації, консультації спеціалістів.
  4. При проведенні яких робіт впроваджена пропозиція:  
Під час проведення експериментальних токсиколого-гігієнічних досліджень з оцінки впливу водних зразків на організм.
  5. Ефективність впровадження:  
Додання до стандартних методів експериментальних досліджень запропонованих критеріїв оцінки дозволило значно підвищити надійність і сприяло об'єктивізації оцінки отриманих результатів.
  6. Зауваження та пропозиції:  
Зауважень немає.
- Відповідальний за впровадження:  
завідуюча лабораторією гігієни та екології води,  
д.б.н, с.н.с. Петренко Н.Ф.

  
«17» квітня 2019 р.



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ДІ УКРНДІ МТ МОЗ

УКРАЇНИ, д.мед.н., проф.

А.І.Гоженко

«18» квітня 2019 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва запропонованих для впровадження Методичних вказівок:

Патент України № 201113123 від 10.01.2014. Бюл.№1 Спосіб визначення цито- та генотоксичності питної води.

2. Ким запропоновано, адреса, виконавці:

Інститут колоїдної хімії та хімії води ім. А.В.Думанського НАН України, 03142, м. Київ, бул. Академіка Вернадського, 42.

Виконавці: В. Гончарук, М. Верголяс.

3. Джерело інформації:

Методичні рекомендації, консультації спеціалістів.

4. При проведенні яких робіт впроваджена пропозиція:

Під час проведення експериментальних токсиколого-гігієнічних досліджень з оцінки впливу водних зразків на організм.

5. Ефективність впровадження:

Додання до стандартних методів експериментальних досліджень запропонованих критеріїв оцінки дозволило значно підвищити надійність і сприяло об'єктивізації оцінки отриманих результатів.

6. Зауваження та пропозиції:

Зауважень немає.

Відповідальний за впровадження:

завідуюча лабораторією гігієни та екології води,  
д.б.н, с.н.с. Петренко Н.Ф.

«17» квітня 2019 р.





«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ДП УКРНДІ МТ МОЗ  
УКРАЇНИ, д.мед.н., проф.

А.И.Гоженко

«18» квітня 2019 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва запропонованих для впровадження Методичних вказівок:  
Патент України № 201004569 від 25.08.2011. Бюл.№16. Спосіб визначення генотоксичності водного середовища.
2. Ким запропоновано, адреса, виконавці:  
Інститут колоїдної хімії та хімії води ім. А.В.Думанського НАН України, 03142, м. Київ, бул. Академіка Вернадського, 42.  
Виконавці: В. Гончарук, М. Верголяс, І. Болтіна.
3. Джерело інформації:  
Методичні рекомендації, консультації спеціалістів.
4. При проведенні яких робіт впроваджена пропозиція:  
Під час проведення експериментальних токсиколого-гігієнічних досліджень з оцінки впливу водних зразків на організм.
5. Ефективність впровадження:  
Додання до стандартних методів експериментальних досліджень запропонованих критеріїв оцінки дозволило значно підвищити надійність і сприяло об'єктивізації оцінки отриманих результатів.
6. Зауваження та пропозиції:  
Зауважень немає.

Відповідальний за впровадження:  
завідуюча лабораторією гігієни та екології води,  
д.б.н, с.н.с. Петренко Н.Ф.

«17» квітня 2019 р.



«ЗАТВЕРДЖУЮ»  
Директор ДП УкрНДІ МТ МОЗ  
України, д.мед.н., проф.  
А.І.Гоженко  
«18» квітня 2019 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва запропонованих для впровадження Методичних вказівок:  
Патент України № 201012982 від 10.01.2012. Бюл.№1 Спосіб підготовки біологічного об'єкта для визначення токсичності води.
2. Ким запропоновано, адреса, виконавці:  
Інститут колоїдної хімії та хімії води ім. А.В.Думанського НАН України, 03142, м. Київ, бул. Академіка Вернадського, 42.  
Виконавці: В. Гончарук, М. Верголяє.
3. Джерело інформації:  
Методичні рекомендації, консультації спеціалістів.
4. При проведенні яких робіт впроваджена пропозиція:  
Під час проведення експериментальних токсиколого-гігієнічних досліджень з оцінки впливу водних зразків на організм.
5. Ефективність впровадження:  
Додання до стандартних методів експериментальних досліджень запропонованих критеріїв оцінки дозволило значно підвищити надійність і сприяло об'єктивізації оцінки отриманих результатів.
6. Зауваження та пропозиції:  
Зауважень немає.

Відповідальний за впровадження:  
завідуюча лабораторією гігієни та екології води,  
д.б.н, с.н.с. Петренко Н.Ф.

«17» квітня 2019 р.



Погоджено  
Проректор з навчальної та  
виховної роботи

Кваша С.М.  
(Прізвище, ініціали)

«05»

08

2019

Затверджую  
Перший проректор

(підпис)

Іоатулін І.І.

(Прізвище, ініціали)

р.

р. «07»



## А К Т

про впровадження/використання результатів  
докторської дисертаційної роботи у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «Екотоксикологічна оцінка якості та безпечності питної води», що представлена на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.16 «Екологія», виконаної Верголяс Майєю Розтетівною впроваджено у навчальну програму при викладанні дисципліни: «Екологія у тваринництві » на кафедрі біології тварин факультету тваринництва та водних біоресурсів Національного університету біоресурсів та природокористування України. Запропоновані автором матеріали мають наукове та практичне значення при створенні курсу лекції для підготовки бакалаврів за спеціальністю «Технологія виробництва та переробки продукції тваринництва».

Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри біології тварин

Протокол № 15 від 5.08.2019

Т.в.о. завідувача кафедри  
канд. с-г. наук, доцент

Афанасенко В.Ю



## «ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ДУ «Інститут медицини  
праці імені Ю.І. Кундієва НАМН»  
д.м.н., проф., член-кор. НАМНУ

Чернюк В.І.



## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва запропонованих для впровадження Методичних вказівок:  
ДСТУ 7525:2014 Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості.

2. Ким запропоновано, адреса, виконавці:  
Інститут колоїдної хімії та хімії води ім. А.В.Думанського НАН України, 03142, м. Київ, бул. Академіка Вернадського, 42.

Виконавці: В. Гончарук, Є. Гончарук, О. Возіанов, С. І. Гаркавий, І. Чекман, А. Крайнюкова, І. Запатріна, В. Рудой; А. Гоженко, А. Руденко, М. Ситенко; А. Скрипник; І. Болтіна, С. С. Гаркавий; Н. Музичук, Н. Мешкова-Клименко, Н. Кушевська, Л. Глоба, А. Чернявська, О. Савлук, Г. Терлецька, Г. Пшинко, М. Верголяс, В. Кравченко, Л. Юрчак; О. Лисюк; Є. Яковлєв.

3. Джерело інформації:  
Методичні рекомендації, консультації спеціалістів.

4. При проведенні яких робіт впроваджена пропозиція:  
Під час проведення експериментальних токсиколого-гігієнічних досліджень з оцінки якості питної води на організм.

5. Ефективність впровадження:  
Застосування запропонованих критеріїв оцінки якості питної води значно підвищило надійність і сприяло об'єктивізації оцінки отриманих результатів.

6. Зауваження та пропозиції:  
Зауважень немає.

Відповідальний за впровадження:  
старший науковий співробітник  
лабораторії аналітичної хімії і моніторингу токсичних речовин  
к.б.н, с.н.с. Андрусихина І.М.

  
« 10 » 02 2017 р.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ДУ «Інститут медицини  
праці імені Ю.І. Кундієва НАМН»  
д.м.н., проф., член-кор. НАМНУ

Чернюк В.І.



## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва запропонованих для впровадження Методичних вказівок:  
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).
2. Ким запропоновано, адреса, виконавці:  
Інститут колоїдної хімії та хімії води ім. А.В.Думанського НАН України, 03142, м. Київ, бул. Академіка Вернадського, 42.  
Виконавці: В. Гончарук, М. Верголяс.
3. Джерело інформації:  
Методичні рекомендації, консультації спеціалістів.
4. При проведенні яких робіт впроваджена пропозиція:  
Під час проведення експериментальних токсиколого-гігієнічних досліджень з оцінки якості зразків питної води на організм.
5. Ефективність впровадження:  
Застосування запропонованих критеріїв оцінки якості питної води значно підвищило надійність і сприяло об'єктивізації оцінки отриманих результатів.
6. Зауваження та пропозиції:  
Зауважень немає.

Відповідальний за впровадження:  
старший науковий співробітник  
лабораторії аналітичної хімії і моніторингу токсичних речовин  
к.б.н, с.н.с. Андрусишина І.М.

« 19 » 10 2018 р.



## «ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ДУ «Інститут медицини  
праці імені Ю.І. Кундієва НАМН»  
д.м.н., проф., член-кор. НАМНУ

Чернюк В.І.



## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

**1. Назва запропонованих для впровадження:**

Патент України № 201012982 від 10.01.2012. Бюл.№1 «Спосіб підготовки біологічного об'єкта для визначення токсичності води».

**2. Ким запропоновано, адреса, виконавці:**

Інститут колоїдної хімії та хімії води ім. А.В.Думанського НАН України, 03142, м. Київ, бул. Академіка Вернадського, 42.

Виконавці: В. Гончарук, М. Верголяс.

**3. Джерело інформації:**

Патент України, консультації спеціалістів.

**4. При проведенні яких робіт впроваджена пропозиція:**

Для розширення спектру експериментальних токсиколого-гігієнічних досліджень з оцінки якості зразків води.

**5. Ефективність впровадження:**

Використання запропонованого авторами способу значно підвищило ефективність підготовки об'єкта для визначення якості води і оцінки отриманих результатів.

**6. Зауваження та пропозиції:**

Зауважень немає.

**Відповідальний за впровадження:**

старший науковий співробітник  
лабораторії аналітичної хімії і моніторингу токсичних речовин,  
к.б.н, с.н.с. Андрусишина І.М.

  
« 11 » 11 2012 р.

Погоджено  
ПВНЗ «Міжнародна академія  
екології та медицини»



В.о. ректора

Грідчин С.В.

06 2019 р.

М.П.

Затверджую  
Національний університет  
біоресурсів і природокористування  
України

Перший проректор

Ібатуллін І.І.

«01»



р.

## А К Т

### про впровадження/використання результатів докторської дисертаційної роботи у виробництво

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему «Екотоксикологічна оцінка якості та безпечності питної води», яка представлена на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.16 «Екологія», виконаної Верголяс Майєю Розметівною впроваджені у Національному університеті біоресурсів і природокористування України.

1. Вид впроваджуваних результатів

Комплекс методів з підвищення ефективності моніторингу якості води.

2. Новизна отриманих результатів

Національні стандарти України: «Якість води. Метод визначення цито- та генотоксичності води і водних розчинів на клітинах крові прісноводної риби Даніо реріо (Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan)» (ДСТУ 7387:2013); «Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості» (ДСТУ 7525:2014).

3. Практичне впровадження/використання результатів

Методи щодо біотестування природних і питних вод використані для оцінки токсичності речовин, що містяться у воді, та застосовані в роботі Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК.

4. Значущість отриманих результатів

Методи біотестування з використанням оптимальних наборів тест-організмів і їх клітинних параметрів об'єктивно характеризує біологічну складову якості води. Використання тест-об'єктів при дослідженні токсичності води є більш перспективним, зручним, економічним, доступним, експресивним та інформативним.

5. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

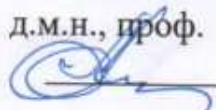
«Впровадження сучасних технологій, організації висококваліфікованої та спеціалізованої медичної допомоги населенню з використанням міжнародного досвіду як формування екологічної безпеки країни в період економічної кризи»



№ Держреєстрації 0118U006640. «Розробка нових підходів до оцінки та кондиціювання якості води», III-1-12, № Держреєстрації 0112U000040. «Створення концепції управління біологічною активністю та фізико-хімічними властивостями води, у тому числі її ізотопним складом, при очищенні природних вод з урахуванням сучасних вимог до якості питної води», III-2-12, № Держреєстрації 0112U000038.

**Від ПВНЗ «Міжнародної академії  
екології та медицини»**

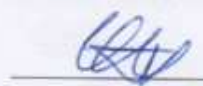
В.о.декана медичного факультету  
д.м.н., проф.

 Абдуллаєв Ф.Р.

«15» 06 2019 р.

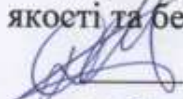
**Від Національного  
університету біоресурсів і  
природокористування України**

Начальник науково-дослідної частини

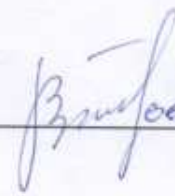
 Отченашко В.В.

«01» серпня 2019 р.

Директор Української лабораторії  
якості та безпеки продукції АПК

 Ушкалов В.О.

«01» серпня 2019 р.

Дисертант  Верголяс М.Р.

«15» 06 2019 р.



НАЦІОНАЛЬНИЙ СТАНДАРТ УКРАЇНИ

---

# ВОДА ПИТНА

Вимоги та методи контролювання якості

ДСТУ 7525:2014

*Видання офіційне*

БЗ № 10–2014/213



Київ  
МІНЕКОНОМРОЗВИТКУ УКРАЇНИ  
2014