

Maciej BILEK¹
 Maria RYBAKOWA²

Azotany (III) i (V) w wodzie pitnej studni kopanych i wierconych z terenu Podkarpacia jako czynniki ryzyka methemoglobinemii

¹Katedra Inżynierii Produkcji Rolno-Spożywczej, Wydział Biologiczno-Rolniczy Uniwersytetu Rzeszowskiego

Kierownik:
 Prof. dr hab. inż. Stanisław Sosnowski

²Emerytowany kierownik Kliniki Endokrynologii Dzieci i Młodzieży Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Dodatkowe słowa kluczowe:

woda pitna
 chromatografia jonowa
 azotany (V)
 azotany (III)
 methemoglobinemia

Additional key words:

drinking water
 ion chromatography
 nitrates
 nitrites
 methemoglobinemia

Celem pracy było oszacowanie zawartości azotanów (III) i (V) w próbach wody z czternastu użytkowanych na co dzień studni kopanych i wierconych z terenu Podkarpacia, jak również podsumowanie przeprowadzonych wcześniej tego typu badań. Prywatne ujęcia wody nie są objęte nadzorem organów Państwowej Inspekcji Sanitarnej, stanowią więc poważne ryzyko zdrowotne w przypadku przekroczeń norm przekazanych przez rozporządzenia ministra zdrowia, normujące wymagania dla wód pitnych. Dotyczy to szczególnie przekroczeń zawartości azotanów (III) i (V), mogących być przyczyną m.in. methemoglobinemii, najniebezpieczniejszej dla dzieci i niemowląt. Analizę przeprowadzono metodą chromatografii jonowej, dzięki czemu możliwe było jednoczesne określenie stężeń azotanów (III) i (V). Nie odnotowano obecności azotanów (III) w badanych wodach, natomiast stężenia azotanów (V), przekraczające dopuszczalną normę 50 mg/litr, stwierdzono w pięciu próbkach wody ze studni kopanych. W przypadku dwóch studni stężenia azotanów (V) były znaczne, wynosząc 96,53 mg/litr i 204,65 mg/litr.

Wstęp

Azotany (III), według dawnej nomenklatury azotyny, oraz azotany (V) traktowane są jako jedne z groźniejszych czynników toksycznych, występujących zarówno w żywności, jak i w środowisku człowieka. Wrazem tego są normy prawne, stanowiące o maksymalnym stężeniu azotanów (III) i (V) w wodzie pitnej [1,2], w wodzie powierzchniowej przeznaczonej do wykorzystania do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia [3] oraz o dopuszczalnym dziennym pobraniu wraz z pokarmami [4].

Azotany (III) powodują utlenienie jonów żelaza dwuwartościowego, występujących w hemoglobinie, do żelaza trójwartościowego. Powstaje wówczas methemoglobina, która nie wykazuje zdolności wiązania tlenu. Efektem jest tzw. methemoglobinemia, będąca rezultatem niedotlenienia tkanek organizmu, a szczególnie ośrodkowego układu nerwowego i mięśnia sercowego. Objawami methemoglobinemii są bóle brzucha,

The aim of the study was to determine the nitrates and nitrites content in water samples taken from fourteen dug and drilled wells from the area of Podkarpacie, as well as a summary of the previously performed analysis. Private water intakes are not under the supervision of the State Sanitary Inspection. So in the case of exceeding the standards provided by the Regulation of the Minister of Health, regulating the requirements for drinking water, private water intakes can be a serious threat to the health of consumers. Particularly at risk are infants, in whom nitrates and especially nitrites can cause, among others, methemoglobinemia. The analysis was performed by ion chromatography method, making it possible to simultaneously determining the concentrations of nitrates and nitrites. As it turned out there was no presence of nitrites in the water of the tested wells. In five samples taken from the dug wells nitrates concentration exceeding the norm of 50 mg/L have been reported. In two cases, exceeding the nitrate concentrations were significant: 96.53 mg/L and 204.65 mg/L.

zaczernienie twarzy i skóry, zawroty głowy, sine zabarwienie skóry, duszność, spadek ciśnienia krwi, aż do wystąpienia zapaści. Nie tylko azotany (III) powodują methemoglobinemię: około 25% wchłoniętych azotanów (V) przedostaje się z krwi do śliny, gdzie na skutek działania mikroflory jamy ustnej ulega redukcji do azotanów (III), które trafiają ponownie do przewodu pokarmowego, wykazując swój toksyczny efekt [5-7]. Działanie szkodliwe mają także i same azotany (V), drażniąc śluzówkę jelita cienkiego, a przy narażeniu chronicznym powodując wtórny zespół złego wchłaniania z tzw. płaską śluzówką [8].

Najczęściej wymienianym źródłem narażenia zarówno na azotany (III), jak i (V) jest żywność, głównie mięsa i sery, do których konserwowania związki te są często wykorzystywane. Bogatym źródłem azotanów (V) są warzywa liściowe, rzepowate i korzeniowe oraz napary herbat ziołowych. Azotany (III) mogą powstawać w czasie przechowywania

Adres do korespondencji:

Maciej Bilek
 Katedra Inżynierii Produkcji Rolno-Spożywczej,
 Wydział Biologiczno-Rolniczy Uniwersytetu Rzeszowskiego,
 ul. Żelwerowicza 4, 35-601 Rzeszów;
 tel. (017) 785 50 60;
 e-mail: mbilek@univ.rzeszow.pl

produktów spożywczych, na skutek mikrobiologicznej redukcji azotanów (V) [6,7].

Problem toksycznego działania azotanów (III) i (V) dotyczy przede wszystkim małych dzieci, ze względu na udział w ich krwi hemoglobiny płodowej, znacznie podatniejszej na utlenienie, a także ze względu na nie w pełni wykształcony system enzymatyczny, oznaczający się niską aktywnością reduktazy methemoglobiny zależnej od NADH (dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego), która ma wpływ na powtórny redukcję methemoglobiny [8]. Świadczy o tym doniesienia, opisujące przypadki rozpoznanej methemoglobinemii (ang. *blue baby syndrome*, syndrom „niebieskiego dziecka”), związanej m.in. z narażeniem na benzokainę, pochodzącą z płynów do płukania jamy ustnej [9], a także azotanami, występującymi w wodzie studziennej, służącej do przygotowania pokarmów dla niemowląt [10]. W krakowskim Ośrodku Informacji Toksykologicznej, w latach 1982-1996, na 239 konsultacji związanych z methemoglobinemią, aż 90% stanowiły przypadki dzieci zatrutych z powodu zanieczyszczeń środowiska [11]. Z kolei dane pochodzące ze Stanów Zjednoczonych mówią o sześciu przypadkach śmiertelnych w okresie od 1979 do 1996 roku, z czego jeden dotyczył zejścia na skutek spożycia wody skażonej azotanami [10]. Duża podatność dzieci na toksyczne działanie azotanów (V) wynika także z faktu, iż w ich żołądkach panuje znacznie niższe pH i dochodzi do szybszej redukcji azotanów (V) do azotanów (III) [5]. Z tego też powodu US-EPA (*United States Environmental Protection Agency*, Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska) zaleca, by dzienna dawka azotanów (V) dla niemowląt w wieku do trzech miesięcy nie przekraczała 1,6 mg/kg masy ciała przy narażeniu ciągłym [12]. Chroniczna ekspozycja dzieci i niemowląt na azotany (III) i (V) odbija się w sposób znaczny na rozwoju psychicznym i fizycznym niemowląt i małych dzieci, wpływając negatywnie na przyrost masy ciała, zaburzając wchłanianie składników pokarmowych, wywołując zaburzenia czynności tarczycy i ośrodkowego układu nerwowego [8,10].

Najpowszechniejszym, choć ciągle niedocenianym źródłem azotanów (III) i (V) jest woda przeznaczona do spożycia przez człowieka [11], za której monitoring odpowiada Państwowa Inspekcja Sanitarna [13]. Zgodnie z rozporządzeniami ministra zdrowia z dnia 29 marca 2007 „W sprawie jakości wody do spożycia przez ludzi” oraz z dnia 20 kwietnia 2010 roku „Zmieniającym rozporządzenie w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi” stężenie azotanów (V) nie powinno przekraczać 50 mg/litr, zaś azotanów (III) 0,5 mg/litr [1,2]. Z kolei dla wód mineralnych, stołowych i źródłanych rozporządzenie ministra zdrowia podaje dopuszczalne normy na azotany (V) wynoszące 50 mg/l (10,0 mg/l dla naturalnych wód mineralnych wydobywanych na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej) oraz na azotany (III) 0,1 mg/l. Rozporządzenie podaje jednocześnie normy, dzięki którym wody mineralne, stołowe i źródlane są „odpowiednie dla przygotowywania żywności dla niemowląt”: dla azotanów (III) 0,02 mg/l,

zaś dla azotanów (V) 10 mg/l [14].

Wspomniane rozporządzenia z roku 2007 i 2010 wskazują, że prywatne ujęcia wody pitnej nie podlegają kontroli przez organy PIS z wyłączeniem wody wykorzystywanej do działalności handlowej lub publicznej oraz tych indywidualnych ujęć wodnych, które zaopatrują co najmniej 50 osób lub które dostarczają co najmniej średnio 10 m³ wody w ciągu doby [1,2]. Tymczasem woda z indywidualnych ujęć wodnych w roku 2011 zaspakajała według danych Państwowej Inspekcji Sanitarnej potrzeby aż 5 milionów mieszkańców Polski [15]. Grupa narażona na pobranie substancji toksycznych wraz z niekontrolowaną wodą z ujęć indywidualnych jest zatem w naszym kraju bardzo duża, tym bardziej, że ujęcia te, jako znajdujące się najczęściej na terenach wiejskich, są szczególnie narażone na zanieczyszczenia środowiskowe: użyźnianie gleb nawozami azotowymi i przesiąkanie przez grunt ścieków bytowych-gospodarczych, przemysłowych i rolnych [16].

Podjęte zostały zatem we własnym zakresie regularne badania użytkowanych na co dzień studni z terenu województwa podkarpackiego.

Material i Metody

Pobrano zostało czternaście próbek wody studziennej, pochodzącej z losowo wybranych indywidualnych ujęć wodnych z terenu województwa podkarpackiego. Niezwłocznie po pobraniu w maju 2014 roku, próbki poddawane były analizie w Wydziałowym Laboratorium Analiz Zdrowotności Środowiska i Materiałów Pochodzenia Rolniczego Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego.

Analizę chromatograficzną poprzedzało półgodzinne odgazowywanie próbek na płucze ultradźwiękowej i przesączenie ich przez filtr strzykawkowy MCE o średnicy porów 0,45 µm. Do analiz stosowano chromatograf jonowy Dionex ICS 1000, sterowany przez program Chromeleon w wersji 6.8. Roztwór wzorcowy, zawierający siedem anionów, pochodził z firmy Thermo

Scientific. Fazę ruchomą sporządzono rozcieńczając stukrotnie roztwór wyjściowy węglanu i wodorowęglanu sodu (0,8M Na₂CO₃/0,1M NaHCO₃) firmy Thermo Scientific, dedykowany kolumnie analitycznej AS 14A. Stosowano przepływ izokratyczny o natężeniu strumienia fazy ruchomej wynoszącym 1 ml/min. Objętość dozowanych próbek wynosiła 25 µl. Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie analitycznej IonPack AS 14A wraz z kolumną ochronną AS 14G firmy Thermo Scientific. Kolumnę termostatowano w temperaturze 30°C. Stosowano detekcję konduktometryczną, a temperatura celki pomiarowej wynosiła 35°C. Do tłumienia przewodnictwa fazy zastosowano supresor ASRS-4 mm. Częstotliwość szczytowania danych ustalono na 5.0 Hz. Chromatogramy opracowywano w programie Chromeleon 6.8.

Analizę zawartości anionów nieorganicznych prowadzono w oparciu o własną, zwalidowaną procedurę analityczną. Specyficzność metody została potwierdzona poprzez porównanie czasów retencji pików uzyskanych dla badanych próbek z czasami retencji wzorców azotanów (III) i azotanów (V). Określona została liniowość odpowiedzi detektora na zadane stężenia roztworów wzorcowych w zakresie od 1,0 do 50,0 mg/litr dla badanych anionów – azotanów (III) i azotanów (V). W sytuacji przekroczenia wartości 50 mg/litr próbki były rozcieńczane i powtórnie analizowane. Precyzję opisaną metody analitycznej potwierdzano poprzez trzykrotne powtarzanie nastrzyku zestawu wzorców i każdej z próbek. Analizy poprzedziło wykonanie kalibracji z użyciem zestawu wzorców siedmiu anionów nieorganicznych w tym azotanów (III) oraz azotanów (V) i wykreślenie pięciopunktowej krzywej kalibracyjnej.

Wyniki

Stężenia anionów nieorganicznych w próbkach wody pitnej, pobranej z czternastu użytkowanych na co dzień tradycyjnych studni kopanych i wierconych, zestawiono w tabeli.

Tabela I
Zawartość azotanów (III) i azotanów (V) w próbkach wody, pobranych ze studni kopanych i wierconych.
Nitrates and nitrites content in the samples taken from the dug and drilled wells.

Nazwa próbki	Azotany (III) [mg/litr], (n=3) ± SD	Azotany (V) [mg/litr], (n=3) ± SD
Studnia kopana, Kraczkowa	-	71,89±0,131
Studnia kopana, Husów	-	10,9±0,098
Studnia kopana, Gać	-	58,58±0,123
Studnia wiercona, Monastyrz	-	3,47±0,062
Studnia kopana, Nowosielce	-	20,68±0,014
Studnia kopana, Dębów	-	69,16±0,22
Studnia wiercona, Biecz	-	19,87±0,114
Studnia kopana, Jasło	-	9,85±0,28
Studnia kopana, Dubiecko	-	16,02±0,142
Studnia kopana, Pogwizdów Stary	-	204,65±0,485
Studnia kopana, Lutorsz	-	96,53±0,172
Studnia kopana, Harta	-	35,9±0,16
Studnia kopana, Rzeszów	-	12,09±0,098
Studnia kopana, Rzeszów	-	35,01±0,12

W próbkach wody nie stwierdzono obecności azotanów (III), we wszystkich odnotowano natomiast obecność azotanów (V) w zakresie od 3,47 do 19,87 mg/litr dla studni wierconych i od 9,85 do 204,65 mg/litr dla studni kopanych. Średnie stężenie azotanów (V) dla studni wierconych wynosiło 11,67 mg/litr, zaś średnie stężenie dla studni kopanych 47,47 mg/litr. W badanych próbkach wody, pobranych ze studni wierconych nie stwierdzono przekroczenia norm dla stężeń azotanów (V). Natomiast w przypadku wody ze studni kopanych przekroczenia normy 50 mg/litr odnotowano w pięciu przypadkach: 71,89 mg/litr, 58,58 mg/litr, 69,16 mg/litr, 204,65 mg/litr oraz 96,53 mg/litr.

Dyskusja

W prowadzonych wcześniej analizach skontrolowano z kolei czternaście losowo wytypowanych studni z terenu Podkarpacia, porównując wodę z siedmiu studni kopanych i siedmiu wierconych. W przypadku studni wierconych nie odnotowano obecności azotanów (III), natomiast dla dwóch prób stwierdzono stężenia azotanów (V) przekraczające normę 50 mg/litr: o 6,4 mg/litr oraz o 10,57 mg/litr. Średnie stężenie azotanów (V) dla pozostałych prób wynosiło 16,35 mg/litr. W przypadku jednej studni kopanej odnotowano stężenie azotanów (III) wynoszące 8,25 mg/litr, przekraczające dopuszczalną normę szesnastokrotnie. Dla dwóch prób wody ze studni kopanych odnotowano przekroczenia normy dla azotanów (V) o 6,59 mg/litr i 33,67 mg/litr. Średnie stężenie azotanów (V) w pozostałych próbach wynosiło 12,56 mg/litr [wyniki badań niepublikowane]. W serii drugiej badano wyłącznie wodę ze studni kopanych z terenu dwóch sąsiadujących ze sobą miejscowości powiatu dębickiego. Przekroczenia stwierdzono dla dwóch studni: w jednej odnotowano obecność azotanów (III) ze stężeniem 11,02 mg/litr, przekraczającym normę ponad dwudziestokrotnie, w drugiej zaś stwierdzono stężenie azotanów (V) wynoszące 74 mg/litr i przekraczające dopuszczalną normę o 24 mg/litr. Zakres stężeń azotanów (V) w ośmiu kolejnych studniach wyniósł od 10,05 do 36,56 mg/litr przy średniej wynoszącej 25,47 mg/litr [17].

Rezultaty trzech serii badań (łącznie 38 studni kopanych i wierconych z terenu Podkarpacia), potwierdzają wyniki przedstawione m.in. przez Lutyńskiego i wsp. [11] oraz Raczuk i wsp. [18,19], wskazując, że spożycie wody z ujęć prywatnych może być istotnym czynnikiem ryzyka methemo-

globinemii. Przekroczenia dopuszczalnych norm dotyczących azotanów (V) są w podkarpaccy studniach stosunkowo częste. Odnotowano je w 10 przypadkach na 38 pobranych próbek, co stanowi 26% badanych studni. Aczkolwiek w ośmiu przypadkach przekroczenia normy dla wody pitnej 50 mg/litr [1,2] były nieznaczne, mieszcząc się w zakresie lub nieznacznie przekraczając tzw. maksymalne wartości czasowych odstępstw parametrów chemicznych wody, wynoszące dla azotanów (V) 70 mg/litr [20]. Jedyne w przypadku dwóch próbek odnotowano blisko dwukrotne oraz ponad czterokrotne przekroczenie normy dla wody pitnej. Natomiast przekroczenia normy 0,5 mg/litr dla azotanów (III) [1,2] są znacznie rzadsze. Stwierdzono je w dwóch próbkach na 38 pobranych, za to w ilościach szesnasto- i dwudziestokrotnie przewyższających normę dla wody pitnej. Przy uwzględnieniu norm dla wód „odpowiednich dla przygotowywania żywności dla niemowląt” [13] najwyższe odnotowane stężenia azotanów (V) wskazują na dwudziestokrotne przekroczenie normy, natomiast dla azotanów (III) na przekroczenia pięćsetpięćdziesięciokrotne.

Wnioski

1. W dotychczasowych badaniach wód studziennych Podkarpacia odnotowano dziesięć przekroczeń dopuszczalnego stężenia azotanów (V) w wodzie pitnej;

2. Przekroczenia obowiązującej normy dla wody pitnej dla azotanów (V) odnotowano zarówno dla studni wierconych, jak i tradycyjnych studni kopanych, lecz jedynie w studniach kopanych przekroczenia były znaczne (dwu- i czterokrotne);

3. Przekroczenia norm dla wody pitnej dla azotanów (III) odnotowano w przypadku dwóch badanych studni i były one znaczne (szesnasto- i dwudziestokrotne);

4. Odnotowane przekroczenia norm dla stężeń azotanów (III) i (V) stanowią przyczynek do włączenia pytań o pochodzenie wody pitnej w wywiadzie anamnestycznym w podejrzaniu methemoglobinemii u dzieci;

5. Konsumenty korzystający z prywatnych ujęć wody pitnej powinni regularnie kontrolować jakość wody, szczególnie pod kątem zawartości azotanów (III) i (V) gdy woda służy do przygotowywania napojów i posiłków dla dzieci i niemowląt.

Piśmiennictwo

1. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 „W sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi”. Dz.U. 2007; 61: 3726-3743.
2. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 23 kwietnia

2010 „Zmieniające rozporządzenie w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi”. Dz.U. 2010; 72: 6333-6342.

3. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 27 listopada 2002 „W sprawie wymagań, jakim powinny odpowiadać wody powierzchniowe wykorzystywane do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia”. Dz.U. 2002; 204: 12738-12751.
4. Nitrate in vegetables. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. The EFSA J. 2008; 6, 1-79.
5. Sikorski Z. (red.): Chemia żywności. Odżywcze i zdrowotne właściwości składników żywności. Tom 3. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2009.
6. Gerig H, Duda G: Żywność, a zdrowie i prawo. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2004.
7. Gerig H: Żywność a zdrowie. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1996.
8. Szydłowska E, Zaręba S: Ocena zawartości azotanów III i V w produktach spożywczych przeznaczonych do żywienia niemowląt i małych dzieci. Ann. UMCS. Sect. DDD. 2005; 18: 15-18.
9. Kreshak AA, Ly BT, Edwards WCD, Carson SH: A 3-year-old boy with feler and oral lesions. Ped. Ann. 2009; 38: 613-616.
10. Knobloch L, Saina B, Hogan A, Postle J, Anderson H: Blue babies and nitrate-contaminated well water. Environ Health Perspect. 2000; 108: 675-678.
11. Lutyński R, Steczek-Wojdyła M, Wojdyła Z, Kroch S: Stężenie azotanów i azotynów w żywności i środowisku a występowanie ostrych toksycznych methemoglobinemii. Przegl Lek. 1996; 53: 351-355.
12. Nitrates and Nitrites. Teach Chemical Summary. United States Environmental Protection Agency. Dostęp w Internecie [29.08.2014] http://www.epa.gov/teach/chem_summ/Nitrates_summary.pdf
13. Ustawa z dnia 14 marca 1985 r. „O Państwowej Inspekcji Sanitarnej”. Dz.U. 1985; 12: 117-121.
14. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 31 marca 2011 r. „W sprawie naturalnych wód mineralnych, wód źródlanych i wód stołowych”. Dz.U. 2011; 85: 5239-5248.
15. Jakość wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi – stan w 2011 roku. Dostęp w Internecie [29.08.2014] [http://www.gis.gov.pl/ckfinder/userfiles/files/BW/\(woda%20do%20spo%20C5%BCyia%202011_.pdf\)](http://www.gis.gov.pl/ckfinder/userfiles/files/BW/(woda%20do%20spo%20C5%BCyia%202011_.pdf))
16. Piotrowski J. (red.): Podstawy toksykologii. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2006.
17. Bilek M, Matlok N: Azotany(III) i (V) w wodach studziennych z terenu Podkarpacia. XI Konferencja Naukowa Żywność XXI wieku: Żywność a bezpieczeństwo zdrowotne. Kraków 18-19 września 2014. Materiały pokonferencyjne. Str. 26.
18. Raczuk J, Biardzka E, Michalczyk M: Związki azotu w wodzie studziennej w świetle ryzyka zdrowotnego mieszkańców gminy Wodynie (woj. Mazowieckie). Woda Środ Obsz Wiej. 2009; 9: 87-97.
19. Raczuk J, Dziuban E, Biardzka M: Nitrates in drinking water as a factor of Health risk to the Płaterow commune inhabitants (Mazovian province). Env Prot Nat Res. 2013; 24: 5-9.
20. Proponowane maksymalne wartości czasowych odstępstw wybranych parametrów chemicznych wody przeznaczonej do spożycia. Dostęp w Internecie [29.08.2014] http://www.gis.gov.pl/ckfinder/userfiles/files/BW/WPDSpl/wartosci_czasowych_odstepstw.pdf