УДК 006.91:574.64

ВСТАНОВЛЕННЯ МЕТРОЛОГІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИКИ БІОТЕСТУВАННЯ З ВИЗНАЧЕННЯ ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ ВОДИ НА ВОДОРОСТЯХ SCENEDESMUS QUADRICAUDA (TURP) BREB

Крайнюков О.М., Кривицька І.А., Крайнюков О.О.
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

Наведено результати експериментальних досліджень з встановлення метрологічних характеристик методики біотестування для визначення гострої токсичності води з використанням водоростей *Scenedesmus quadricauda (Turp) Breb.* Метрологічні характеристики методики встановлювали за умов внутрішньолабораторного експерименту. В якості еталонної речовини використано двохромовокислий калій ($K_2Cr_2O_7$).

Ключові слова: методика біотестування, гостра токсичність, метрологічні характеристики, еталонна речовина, похибка результатів, збіжність результатів, відтворюваність результатів, норматив оперативного контролю, діапазон реагування тест-об'єкта.

Постановка проблеми. Водним кодексом України [1] до комплексу нормативних документів щодо стандартизації у галузі використання і охорони вод та відтворення водних ресурсів, поряд з іншими об'єктами, віднесено методи, методики і засоби вимірювання складу та властивостей води.

Відповідно до Закону України «Про метрологію та метрологічну діяльність» [2] результати будь-яких видів вимірювань можуть бути офіційно визнаними лише за умови, якщо для методик, які використовуються, встановлені метрологічні характеристики.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Аналіз літературних та інших джерел у галузі стандартизації і метрологічної атестації методик вимірювань показників складу і властивостей води свідчить про те, що існує ряд нормативних документів, які визначають вимоги до встановлення метрологічних характеристик для методик вимірювання фізико-хімічних показників якості води [3]. Що стосується метрологічного забезпечення методик біотестування, за допомогою яких визначають рівні токсичності води, така інформація практично відсутня у вітчизняних публікаціях.

Розробці та опису різних методів і процедур біотестування гострої і хронічної токсичності, прийомів і підходів до обліку результатів біотестування окремих забруднюючих речовин і стічних вод присвячено численні роботи зарубіжних авторів, опублікованих у різні періоди [4-6].

Сфера застосування біотестів не обмежується їх використанням для оцінки і контролю якості стічних і природних вод. Більшого значення набувають токсикологічні дослідження при розробці критеріїв якості води. Для цих цілей застосовується комплекс стандартних методів, заснованих на використанні реакцій прісноводних і морських організмів [7].

У зв'язку з цим, на початку 80-х років почали проводитися широкомасштабні дослідження, метою яких була розробка науково-обґрунтованих і економічно доцільних практичних підходів до біологічної оцінки стічних вод. У процесі здійснення різних програм з визначення токсичності стічних вод окремих виробництв та оцінки їх впливу на рівень токсичного забруднення природних вод, сформувалося кілька проблем. Серед них особливо слід виділити: можливість інтерпретації лабораторних біотестів на стан водних біоценозів; підбір тест-об'єктів і їх реакцій для використання в методиках біотестування; динамічність складу стічних вод, що підлягають біотестуванню та чутливість тест-організмів до токсичної дії різних категорій стічних вод; прийоми встановлення екологічно безпечного рівня токсичності для водних організмів за результатами біотестування.

Аналіз результатів впровадження еколого-токсикологічних методів в систему оцінки і контролю якості природних і стічних вод в різних зарубіжних країнах показав, що в США досить ефективно було вирішено проблему охорони вод від токсичного забруднення [8]. Про це свідчить підготовлений Агенством з охорони навколишнього середовища (АОНС) документ «Стратегія в галузі дослідження вод» [9] в якому наголошується необхідність подальшого застосування біотестів для оцінки токсичності води. Можливо, що це єдиний реальний шлях урахування впливу сотень різних забруднюючих речовин, що надходять у природні води, на водні екосистеми. Зроблено висновки, що методи біотестування доцільно використовувати як для здійснення ефективної програми моніторингу якості води, так і для розробки концепції зниження токсичності, вони можуть мати величезну потенційну можливість в якості ефективного доповнення до хімічних аналізів при видачі дозволів на скидання стічних вод.

В останні роки набір методик біотестування, який застосовується підрозділами Агентства з охорони навколишнього середовища в США,включає біотести з використанням показників виживаності риб на ранніх стадіях розвитку, наприклад Pimephales promelas, виживаності та плодючості церіодафній Ceriodaphnia dubia, збільшення чисельності клітин водоростей Selenastrum capricornutum [10].

Підводячи підсумки, слід зазначити, що широкому впровадженню біотестів у водоохоронну практику в зарубіжних країнах у великій мірі сприяла уніфікація і особливо стандартизація методик біотестування. У цій галузі за теперішнього часу розроблено понад 50 різних стандартів як загальнотехнічного призначення, так і на конкретні методики біотестування.

© Крайнюков О.М., Кривицька І.А., Крайнюков О.О., 2016

Виклад основного матеріалу. Для методик біотестування встановлювали наступні метрологічні характеристики: похибку результатів біотестування; відтворюваність результатів біотестування; норматив оперативного контролю відтворюваності результатів біотестування; діапазон реагування тест-об'єкта.

Метрологічні характеристики методик встановлювали за умов внутрішньолабораторного експерименту. В якості еталонної речовини використовували двохромовокислий калій ($K_2Cr_2O_7$). З метою врахування сезонних коливань фізіологічного стану тест-об'єктів дослідження виконували у різні пори року. Для контролю і приготування розчинів з різними концентраціями $K_2Cr_2O_7$ використовували питну воду, яку попередньо дехлорували шляхом устоювання впродовж не менш як 7 діб, після чого аерували за допомогою мікропроцесора до досягнення концентрації розчиненого у воді кисню до 6 мг/дм^3. Під час проведення експериментів вміст розчиненого у воді кисню контролювали та підтримували на рівні 4 мг/дм^3.

Для встановлення похибки, відтворюваності та нормативу оперативного контролю результатів біотестування експерименти на водних розчинах еталонної речовини проводили за критеріями токсичності, які встановлено для кожної із методик біотестування відповідними нормативними документами.

Методика біотестування з визначення гострої токсичності води на водоростях *Scenedesmus quadricauda (Turp) Breb* (далі водорості) ґрунтується на встановленні різниці між інтенсивністю росту водоростей у воді, що аналізується – дослід, та у воді, яка не містить токсичних речовин – контроль. Критерієм гострої токсичності є пригнічення росту водоростей на 50% і більше у досліді порівняно з контролем за 96 годин біотестування.

При встановленні метрологічних характеристик методики біотестування з визначення гострої токсичності води на водоростях використовувалась процедура, наведена у нормативних документах [11; 12].

Результати біотестування водних розчинів еталонної речовини двохромовокислого калію ($K_2Cr_2O_7$) з використанням методики на водоростях наведено у табл.

На підставі підрахунку чисельності клітин водоростей у контролі і досліді визначали їх середні арифметичні, які використовували для розрахунку відсотка пригнічення росту у досліді за формулою (1):

$$I = \frac{m_k - m_d}{m_k} \times 100\%, \quad (1)$$

де I – відсоток пригнічення росту, %;

m_k – середня швидкість росту в контролі;

m_d – середня швидкість росту в досліді.

На підставі отриманих результатів розраховували середню ефективну концентрацію розчину $K_2Cr_2O_7$ за 96 годин біотестування ($ЕК_{50-96}$). Усі подальші розрахунки виконували згідно з [4; 5]. Значення $ЕК_{50-96}$ перевіряли на наявність надмірної похибки за β-критерієм, для чого обчислювали значення середнього результату ($\overline{X}_l$) за формулою (2), відповідного середньо квадратичного відхилення (СКВ) S_l за формулою (3) та число ступенів свободи за формулою (4):

$$X_i = \frac{\sum_{n=1}^{N1} X_{ln}}{N_i}, \quad (2)$$

$$S_i = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^{N_i} (X_{ln} - \overline{X}_l)^2}{N_l - 1}}, \quad (3)$$

$$f_l = N_l - 1, \quad (4)$$

де l – номер виконавця (серії);

n – номер досліду у серії, n = 1, ….., N_l;

X_{ln} – результат досліду n в серії l;

f_l – число ступенів свободи, за якими обчислюють значення S_l.

Таблиця

Результати експериментальних досліджень

Номер досліду у серії, l_n	Концентрація водного розчину $K_2Cr_2O_7$, мг/дм^3			
	X_{ln}	$\overline{X}$	S_l	f_l
1	1,07	1,32	0,23	15
2	1,6			
3	1,09			
4	1,6			
5	1,25			
6	1,4			
7	1,6			
8	1,15			
9	1,2			
10	1,0			
11	1,4			
12	1,6			
13	1,09			
14	1,7			
15	1,6			
16	1,4			

Джерело: розроблено автором

Як видно з отриманих даних, найбільш підозрілим є результат № 10 (1,0), саме він найбільше відрізняється від середнього значення. Для його перевірки на наявність надмірної похибки складали і обчислювали відношення:

$$\beta = \frac{\left| X_{ln} - \overline{X}_n \right|}{S_i} = 0,24,$$

де S_l – середнє квадратичне відхилення.

Обчислене значення β менше, ніж табличне $\beta_{табл.}$ для ступенів свободи f_1 = 15. $\beta_{табл.\,(15)}$ = 2,44, з чого витікає відсутність надмірної похибки.

Відтворюваність σвл.в. водного розчину $K_2Cr_2O_7$ розраховували за формулою:

$$\sigma_{вл.в.} = S_{вл.в.} * \gamma(f) = 0,23 \times 1,017 = 0,23;$$

$$\sigma_{вл.в.}(\%) = \frac{S_{вл.в.} * \gamma(f)}{\overline{X}} * 100 = 17,4\%.$$

Значення відтворюваності перевірили на однорідність та отримали наступне значення $\sigma^*_{вл.в.}$ = 17,4%.

Похибку результату визначення токсичності обчислювали за формулами:

Δ = 1,96 * $\sigma_{вл.в.}$, (5)

δ (%) = 1,96 * $\sigma_{вл.в.}$ (%), (6)

Δ = 1,96 * 0,23 мг/дм^3 = 0,45 мг/дм^3;

δ (%) = 1,96 * 17,4% = 34%.

Отже, відтворюваність результатів біотестування розчину $K_2Cr_2O_7$ становить 0,23 мг/дм^3 (17%); похибка результатів біотестування розчину $K_2Cr_2O_7$ становить 0,45 мг/дм^3 (34%).

На підставі отриманих результатів встановили норматив оперативного контролю відтворюваності результатів біотестування на водоростях,. який розраховували за формулою:

$$D = 2{,}77 * \sigma_{вл.в.}, \quad (7)$$

$$D = 2{,}77 * 0{,}23 = 0{,}64 \text{ (мг/дм}^3\text{)}.$$

Отже, норматив оперативного контролю відтворюваності результатів біотестування розчину $K_2Cr_2O_7$ становить 0,64 мг/дм^3.

Для встановлення діапазону реагування культури водоростей було використано критерій токсичності – зниження коефіцієнту приросту чисельності клітин водоростей на 50% і більше у досліді порівняно з контролем за 48 години біотестування.

В експериментах визначали концентрацію $K_2Cr_2O_7$, яка викликає зниження коефіцієнту приросту чисельності клітин водоростей за 48 годин експерименту (ЕК$_{50\text{-}48}$).

За результатами експериментів було отримано такі значення ЕК$_{50\text{-}48}$: 1,6; 2,4; 2,2; 1,6; 1,8; 1,7; 1,5; 1,7; 2,0; 1,9; 2,2; 2,4; 1,6; 1,8; 1,7; 1,7 мг/дм^3 $K_2Cr_2O_7$.

Далі обчислювали значення середнього результату і відповідного СКВ за формулами:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{l=1}^{L}\sum_{n=1}^{N_l} X_{\ln}}{N_l} = 1{,}9 мг/дм^3, \quad (8)$$

$$S_{вл.в.} = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^{L}\sum_{n=1}^{N_l}(X_{\ln} - \bar{X})^2}{\sum_{l=1}^{L} N_l - 1}} = 0{,}29 мг/дм^3, \quad (9)$$

$$f = \sum_{l=1}^{L} N_l - 1 = 15, \quad (10)$$

$$\gamma_{(15)} = 1{,}015$$

Далі перевіряли отримані результати експериментів за β-критерієм на наявність надмірних похибок. Із наведених вище концентрацій $K_2Cr_2O_7$ найбільш підозрілим є результат 2,4 мг/дм^3. Для нього обчислювали відношення:

$$\beta = \frac{X_{\ln} - \bar{X}}{S_l} = 0{,}26$$

де S_l – середнє квадратичне відхилення.

За табличними даними [300] знаходили значення β-критерію для f = 15, $\beta_{табл.}$ = 2,44, яке більше, ніж обчислене значення, що свідчить про відсутність у виборці результатів з надмірними похибками, та значення γ (f) для f = 15, яке становить 1,017.

$$\sigma_{вл.в.} = 1{,}017 * 0{,}29 = 0{,}30$$

Діапазон реагування водоростей обчислювали за формулою:

$$X - 1{,}96 * \sigma < X_к < X + 1{,}96 * \sigma, \quad (7)$$

де $X_к$ – концентрація, за якої досягається критерій токсичності;

σ – $\sigma_{вл.в.}$ у залежності від умов отримання результатів дослідів.

Діапазон реагування тест-об'єктів водоростей становить:

$$1{,}9 - 1{,}96 * 0{,}30 < ЛК_{50\text{-}24} < 1{,}9 + 1{,}96 * 0{,}30,$$

$$1{,}3 < ЛК_{50\text{-}24} < 2{,}5.$$

Висновки. Для методики біотестування з визначення гострої токсичності води на водоростях встановлено наступні метрологічні характеристики: похибка результатів біотестування становить 0,45 мг/дм^3 (34%); відтворюваність результатів біотестування становить 0,23 мг/дм^3 (17%); норматив оперативного контролю відтворюваності результатів біотестування становить 0,64 мг/дм^3; діапазон реагування водоростей становить 1,3-2,5 мг/дм^3.

Список літератури:

1. Водний кодекс України. Затверджено Верховною Радою України від 06.06.1985 р.
2. Закон України про метрологію і метрологічну діяльність. Затв. Постановою Верховної Ради України від 11.02.1998. № 113/98-ВР.
3. КНД 211.0.0.061-97. Метрологічне забезпечення. Оцінка стану вимірювань в галузі охорони навколишнього природного середовища та раціонального використання природних ресурсів. Затв. наказом Мінекобезпеки України від 02.06.1997 р. № 83. – 31 с.
4. Thurston R.V., Thomas A. Comparative toxicity of ten organic chemicals to ten common aquatic species // Water Research. – 1985. – № 9. – P. 1145-1155.
5. Broderius S., Kahl M. Acute toxicity of organic chemical mixtures to the Fathead minnow // Aquatic toxicology. – 1985. – P. 307-322.
6. Norberg T.J., Mount D.J. A new Fathead minnow (Pimephales Proraelas) subchronic toxicity test // Environm. Toxicol. and Chem. – 1985. – P. 711-718.
7. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater // Washington D.C. – 1979. – P. 115-145.
8. Peltier W.H. Impact of an industrial effluent on aquatic organisms: EPA region IV case history. Proc. Pellston Environ. Workshop, Cody, Wyo., 22-27 Aug., 1982. – New York, 1986. – P. 216-227.
9. Стратегия в области исследования вод. Агенство по охране окружающей среды. Вашингтон, ДК – 10460. – 1982. – 33 с.
10. USEPA // Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. – 3rd Ed. /Ed. P.A. Lewis, D.J. Klemm, J.M. Lazorchak et al.). – USEPA/600/4-91/002. – 1994.
11. ДСТУ 4166-2003. Якість води. Випробування на гальмування росту прісноводних водоростей із застосуванням Scenedesmus subspicatus та Selenastrum capricornutum (ISO 8692:1998, MOD).
12. КНД 211.1.4.058-96. Методика визначення гострої токсичності води на водоростях Scenedesmus quadricauda (Turp) Breb. Затв. наказом Мінприроди України від 21.05.97 № 68.

Крайнюков А.Н., Кривицкая И.А., Крайнюков А.А.
Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина

УСТАНОВЛЕНИЕ МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИКИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ВОДЫ НА ВОДОРОСЛЯХ SCENEDESMUS QUADRICAUDA (TURP) BREB

Аннотация
Приведены результаты экспериментальных исследований по установлению метрологических характеристик методики биотестирования для определения острой токсичности воды с использованием водорослей *Scenedesmus quadricauda (Turp) Breb.* Метрологические характеристики методики устанавливали в условиях внутрилабораторного эксперимента. В качестве эталонного вещества использовано двухромовокислый калий ($K_2Cr_2O_7$).
Ключевые слова: методика биотестирования, острая токсичность, метрологические характеристики, эталонная вещество, погрешность результатов, сходимость результатов, воспроизводимость результатов, норматив оперативного контроля, диапазон реагирования тест-объекта.

Krainiukov A.N., Kryvytska I.A., Krainiukov A.A.
V.N. Karazin Kharkiv National University

INSTALLATION METHOD BIOASSAY METROLOGICAL CHARACTERISTICS WITH THE DEFINITION OF ACUTE TOXICITY TO ALGAE WATER SCENEDESMUS QUADRICAUDA (TURP) BREB

Summary
The results of experimental studies on establishing metrological characteristics bioassay methods for determining the acute toxicity of water using algae *Scenedesmus quadricauda (Turp) Breb.* Metrological characteristics under conditions established methods internal laboratory experiment. As reference material used potassium bichromate ($K_2Cr_2O_7$).
Keywords: bioassay method, acute toxicity, the metrological characteristics, reference substance, error results, reproducibility, reproducibility, standard operational control, the range of responses test object.