

БІОЛОГІЧНІ НАУКИ

УДК 006.91:574.64

ВСТАНОВЛЕННЯ МЕТРОЛОГІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИКИ БІОТЕСТУВАННЯ З ВИЗНАЧЕННЯ ТОКСИЧНОСТІ ВОДИ НА ІНФУЗОРИЯХ *TETRAHYMENA PYRIFORMIS* (EHRENBERG) SCHEWIAKOFF

Крайнюков О.М., Кривицька М.І., 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 інфузорій *Tetrahymena pyriformis* (Ehrenberg) Schewiakoff. Метрологічні характеристики методики встановлювали за умов внутрішньолaborаторного експерименту. В якості еталонної речовини використано двоохромоокислий 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. При впровадженні результатів біотестування у водоохоронну практику виникає необхідність в атестації лабораторій на право виконання досліджень з визначення токсичних властивостей компонентів навколишнього середовища та окремих хімічних речовин у відповідності до галузі атестації. Необхідною умовою атестації лабораторії є використання атестованих методик.

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 [1]. Що стосується метрологічного забезпечення методик біотестування, за допомогою яких визначають рівні токсичності води, така інформація практично відсутня у вітчизняних публікаціях. У роботах зарубіжних авторів наведено результати експериментів, метою яких було отримання даних для стандартизації методик біотестування. У роботі [2] представлено результати експериментів, що проводились у Мексиканському інституті гідротехніки у зв'язку з підготовкою до стандартизації системи біотестів Watertox, розробником якої є Дослідницький центр міжнародного розвитку (IDRC). Результати випробування біотестів, які було отримано в серії експериментів (всього 24), показали, що збіжність і відтворюваність вимірювань токсичності відповідали вимогам, встановленим відповідними нормативними документами у галузі стандартизації методик вимірювання.

Спеціалістами Гетебурзького університету [3] проводились експерименти з вимірювання токсичності морської води за допомогою біотесту з використанням ембріонів та личинок морського їжака. Метою роботи було отримання достатньої вибірки даних для обчислення похибки вимірювань токсичності проб води. За результатами

експериментів встановлено, що похибка вимірювань складала 0,05%, у зв'язку з чим зроблено висновок, що ембріонно-личиночний метод біотестування може бути використано в екотоксикологічних дослідженнях.

У процесі підготовки лабораторії екологіко-токсикологічних досліджень Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна у 2016 році було проведено серію експериментів за спеціально розробленими програмою і алгоритмом з метою отримання даних, необхідних для перевірки наведених у відповідних методиках їх метрологічних характеристик методики біотестування (інфузорій, водоростей, ракоподібних та риб), за допомогою яких, поряд з іншими, в лабораторії виконуються дослідження з визначення токсичних властивостей різних категорій вод і окремих хімічних речовин [4].

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 внутрішньолaborаторного експерименту. В якості еталонної речовини використовували двоохромоокислий 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/дм³. Під час проведення експериментів вміст розчиненого у воді кисню контролювали та підтримували на рівні 4 мг/дм³.

Для встановлення похибки, відтворюваності та нормативу оперативного контролю результатів біотестування експерименти на водних роз-

чинах еталонної речовини проводили за критеріями токсичності, які встановлено для кожної із методик біотестування відповідними нормативними документами.

Виклад основного матеріалу. Методика біотестування з визначення токсичності води на інфузоріях *Tetrahymena pyriformis* (Ehrenberg) *Schewiakoff* (далі інфузорії) ґрунтується на встановленні різниці між кількістю інфузорій у воді, що аналізується – дослід, і кількістю інфузорій у 0,1%-ому розчині хлористого натрію (NaCl) у дистильованій воді – контроль. Критерієм токсичності є вірогідне зниження коефіцієнта приросту кількості інфузорій у досліді порівняно з контролем за встановлений час – 24 (короткострокове біотестування) або 96 годин (довгострокове біотестування). Як тест-об'єкт використовували 3-добову лабораторну культуру інфузорій. Щільність суспензії клітин у культурі повинна становити $6-8 \cdot 10^4$ кл./см³.

При встановленні метрологічних характеристик методики біотестування з визначення токсичності води на інфузоріях використовувалась процедура, наведена у нормативному документі [5].

Результати біотестування водних розчинів еталонної речовини двохромовоокислого калію (K₂Cr₂O₇) з використанням методики на інфузоріях наведено у табл.

Для підрахунку інфузорій використовували камеру Горяєва.

На підставі результатів підрахунку клітин у кожній краплі визначали кількість інфузорій в 1 см³ (M) за формулою:

$$M = \frac{m}{n \cdot V} \cdot 1000, \quad (1)$$

де m – кількість підрахованих інфузорій у камері, екз;

V – об'єм частини камери, яка має площу маленького квадрата;

n – кількість підрахованих квадратів.

Для кожного з паралельних визначень у досліді та контролі обчислювали середнє арифметичне кількості інфузорій в 1 см³ (\bar{X}) за формулою:

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}, \quad (2)$$

де X_i – кількість інфузорій в одній краплі, кл./см³;

n – кількість крапель суспензії.

Для визначення токсичності водного розчину K₂Cr₂O₇ розраховували коефіцієнт приросту кількості інфузорій (K) у контролі та досліді за формулою:

$$K = \frac{N_t}{N_o}, \quad (3)$$

де N_t – кількість інфузорій у контролі або досліді через проміжок часу t . кл./см³;

N_o – вихідна кількість інфузорій у контролі або досліді, кл./см³.

На підставі отриманих результатів розраховували середню ефективну концентрацію розчину K₂Cr₂O₇ за 96 години біотестування (ЕК₉₆). Значення ЕК₉₆ перевіряли на наявність надмірної похибки за β -критерієм, для чого обчислювали значення середнього результату (\bar{X}_i) за формулою (4), відповідного середнього квадратичного відхилення (СКВ) $S_{в.в.}$ за формулою (5) та число ступенів свободи за формулою (6):

$$X_i = \frac{\sum_{n=1}^{N_i} X_{ln}}{N_i}, \quad (4)$$

$$S_{в.в.} = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^{N_i} (X_{ln} - \bar{X}_i)^2}{N_i - 1}}, \quad (5)$$

$$f_i = N_i - 1, \quad (6)$$

де l – номер виконавця (серії);

n – номер досліді у серії, $n = 1, \dots, N_i$;

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

f_i – число ступенів свободи, за якими обчислюють значення S_i .

Таблиця

Результати експериментальних досліджень

Номер досліді у серії, ln	Концентрація водного розчину K ₂ Cr ₂ O ₇ , мг/дм ³			
	X_{ln}	X	$S_{в.в.}$	f_l
1	0,18	0,29	0,08	15
2	0,19			
3	0,31			
4	0,29			
5	0,31			
6	0,32			
7	0,26			
8	0,33			
9	0,31			
10	0,4			
11	0,27			
12	0,31			
13	0,28			
14	0,31			
15	0,33			
16	0,31			

Джерело: розроблено авторами

Як видно з отриманих результатів, найбільш підозрілим є результат № 10 (0,4), який найбільше відрізняється від середнього значення. Для його перевірки на наявність надмірної похибки склали і обчислювали відношення:

$$\beta = \frac{|X_{ln} - \bar{X}_n|}{S_i} = 1,0,$$

де S_i – середнє квадратичне відхилення.

Обчислене значення $\beta = 1,0$ менше, ніж табличне $\beta_{табл.}$ для ступенів свободи $f_i = 15$. $\beta_{табл. (15)} = 2,44$, з чого витікає відсутність надмірної похибки.

Відтворюваність результатів біотестування $\sigma_{в.в.}$ водного розчину K₂Cr₂O₇ розраховували за формулою:

$$\sigma_{в.в.} = S_{в.в.} \cdot \gamma(f) = 0,08 \times 1,017 = 0,08 \text{ мг} / \text{дм}^3;$$

$$\sigma_{в.в.} (\%) = \frac{S_{в.в.} \cdot \gamma(f)}{\bar{X}} \cdot 100 = 29,5\%, \quad (7)$$

Значення відтворюваності перевірили на однорідність та отримали наступне значення $\sigma^*_{в.в.} = 29,5\%$.

Похибку результатів біотестування обчислювали за формулами:

$$\Delta = 1,96 * \sigma_{\text{в.в.}} = 0,16 \text{ мг/дм}^3, \quad (8)$$

$$\delta (\%) = 1,96 * \sigma_{\text{в.в.}} (\%) = 60\%, \quad (9)$$

Отже, відтворюваність результатів біотестування розчину $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ становить $0,08 \text{ мг/дм}^3$ (29,5%); похибка результатів біотестування становить $0,16 \text{ мг/дм}^3$ (60%).

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

$$D = 2,77 * \sigma_{\text{в.в.}}, \quad (10)$$

$$D = 2,77 * 0,08 = 0,23 \text{ (мг/дм}^3\text{)}.$$

Отже, норматив оперативного контролю відтворюваності результатів біотестування розчину $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ становить $0,23 \text{ мг/дм}^3$.

Для встановлення діапазону реагування культури інфузорій було використано критерій токсичності – зниження коефіцієнта приросту кількості інфузорій за 24 години біотестування (ЕК_{24}).

За результатами експериментів було отримано такі значення ЕК_{24} : 0,25; 0,2; 0,37; 0,28; 0,33; 0,33; 0,32; 0,4; 0,33; 0,32; 0,26; 0,3; 0,32; 0,28; 0,31; $0,27 \text{ мг/дм}^3 \text{ K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

Далі обчислювали значення середнього результату і відповідного СКВ за формулами:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{l=1}^L \sum_{n=1}^{N_l} X_{ln}}{N_l} = 0,304 \text{ мг / дм}^3, \quad (4)$$

$$S_{\text{в.в.}} = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L \sum_{n=1}^{N_l} (X_{ln} - \bar{X})^2}{\sum_{l=1}^L N_l - 1}} = 0,099 \text{ мг / дм}^3, \quad (5)$$

$$f = \sum_{l=1}^L N_l - 1 = 15, \quad (6)$$

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

Далі перевіряли отримані результати експериментів за β -критерієм на наявність надмірних похибок. Із наведених вище концентрацій $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ найбільш підозрілим є результат $0,4 \text{ мг/дм}^3$. Для нього обчислювали відношення:

$$\beta = \frac{X_{ln} - \bar{X}}{S_l} = 0,97$$

де S_l – середнє квадратичне відхилення.

За табличними даними [6] знаходили значення β -критерію для $f = 15$, $\beta_{\text{табл.}} = 2,44$, яке більше, ніж обчислене значення, що свідчить про відсутність у виборці результатів з надмірними похибками, та значення $\gamma(f)$ для $f = 15$, яке становить 1,017.

$$\sigma_{\text{в.в.}} = 1,017 * 0,099 = 0,1$$

Діапазон реагування культури інфузорій обчислювали за формулою:

$$X - 1,96 * \sigma < X_k < X + 1,96 * \sigma, \quad (11)$$

де X_k – концентрація, за якої досягається критерій токсичності;

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

Отже, діапазон реагування тест-об'єктів інфузорій становить:

$$0,304 - 1,96 * 0,1 < \text{ЛК}_{50-24} < 0,304 + 1,96 * 0,1;$$

$$0,1 < \text{ЛК}_{24} < 0,5.$$

Висновки. Для методики біотестування з визначення токсичності води на інфузоріях встановлено наступні метрологічні характеристики:

похибка результатів біотестування становить $0,16 \text{ мг/дм}^3$ (60%);

відтворюваність результатів біотестування становить $0,08 \text{ мг/дм}^3$ (29,5%);

норматив оперативного контролю відтворюваності результатів біотестування становить $0,23 \text{ мг/дм}^3$;

діапазон реагування інфузорій становить $0,1-0,5 \text{ мг/дм}^3$.

Список літератури:

1. 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.
2. Bellas J., Beiras R., Vazquez E., A standardisation of ciona intestinalis (Chordata, Ascidiacea) embryo-larval bioassay for ecotoxicological studies // Water Research, 37(19). Elsevier Science Publishing Company, Inc. - 2003. – P. 4613-4622.
3. Pica-Granados Y., Trujillo G. D., Hernández H. S., Bioassay standardization for water quality monitoring in Mexico // Environmental Toxicology, Vol. 15, Issue 4, John Wiley & Sons, Inc. – 2000. – P. 322-330.
4. Крайнюков О. М. Метрологічне забезпечення оцінки токсичності води методом біотестування / О. М. Крайнюков // Людина і довкілля. Проблеми неоекології. – Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна. – 2012. – № 1,2. – С. 45-49.
5. КНД 211.14.059-97. Визначення токсичності води на інфузоріях *Tetrahymina pyriformis* (Ehrenberg) Schewiakoff. Затв. наказом Мінекобезпеки України від 21.05.1997 р. № 68.
6. Большев Л. Н. Таблицы математической статистики / Л. Н. Большев, Н. В. Смирнов. – М.: Наука, 1983. – 416 с.

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

УСТАНОВЛЕНИЕ МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИКИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ВОДЫ НА ИНФУЗОРИЯХ *TETRAHYMENA PYRIFORMIS* (EHRENBERG) SCHEWIAKOFF

Аннотация

Приведены результаты экспериментальных исследований по установлению метрологических характеристик методики биотестирования для определения острой токсичности воды с использованием инфузорий *Tetrahymena pyriformis* (Ehrenberg) Schewiakoff. Метрологические характеристики методики устанавливали в условиях внутрилабораторного эксперимента. В качестве эталонного вещества использовано двуххромовокислый калий ($K_2Cr_2O_7$).

Ключевые слова: методика биотестирования, острая токсичность, метрологические характеристики, эталонное вещество, погрешность результатов, сходимость результатов, воспроизводимость результатов, норматив оперативного контроля, диапазон реагирования тест-объекта.

Krainsiukov A.N., Kryvytska M.I., Krainsiukov A.A.
V.N. Karazin Kharkiv National University

INSTALLATION METHOD BIOASSAY METROLOGICAL CHARACTERISTICS WITH THE DEFINITION OF ACUTE TOXICITY TO ALGAE WATER *TETRAHYMENA PYRIFORMIS* (EHRENBERG) SCHEWIAKOFF

Summary

The results of experimental studies on establishing metrological characteristics bioassay methods for determining the acute toxicity of water using infusorians *Tetrahymena pyriformis* (Ehrenberg) Schewiakoff. 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.