

БІОЛОГІЧНІ НАУКИ

УДК 504.4.06(477.54):665.66

ВСТАНОВЛЕННЯ МЕТРОЛОГІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИКИ БІОТЕСТУВАННЯ З ВИЗНАЧЕННЯ ГОСТРОЇ ЛЕТАЛЬНОЇ ТОКСИЧНОСТІ ВОДИ НА РИБАХ *BRACHYDANIO RERIO HAMILTON-BUCHANAN*

Крайнюков О.М., Стріян К.О., 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 риб *Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan*. Метрологічні характеристики методики встановлювали за умов внутрішньолабораторного експерименту. В якості еталонної речовини використано двохромовоокислий 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 фізико-хімічних показників якості води з метою забезпечення єдності виконання вимірювань, результати яких використовуються у сфері поширення державного метрологічного нагляду [3]. Що стосується метрологічного забезпечення методик біотестування для визначення рівня токсичності води, то такої інформації практично не знайдено в публікаціях вітчизняних авторів. У роботах зарубіжних вчених [4; 5] наведено результати експериментів, метою яких було отримання даних для стандартизації методик біотестування. Так у роботі [4] представлено результати експериментів, які проводились у Мексиканському інституті гідротехніки, спеціалісти якого приймали участь у підготовці до стандартизації системи біотестів (Water Tox), яка включала в якості тест-об'єктів представників різних трофічних рівнів наземної і водної екосистем. Розробник системи Water Tox – Дослідницький центр міжнародного розвитку (IDRC). Результати випробування біотестів, які було отримано в серії експериментів (всього 24), показали, що загальний коефіцієнт варіації складав 22%, збіжність і відтворюваність вимірювань токсичності було визнано прийнятними для більшості використаних біотестів.

Мета та завдання досліджень. Враховуючи вимоги до методик біотестування щодо наявно-

сті для них метрологічних характеристик, оскільки лише за таких умов можлива їх атестація та подальше використання для вирішення водоохоронних проблем, метою досліджень було встановлення метрологічних характеристик методики біотестування для визначення гострої летальної токсичності води з використанням тест-об'єкту – *Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan* (далі риби).

Для встановлення метрологічних характеристик методики біотестування на рибах було розроблено програму експериментальних досліджень. Програма включала: визначення кількості виконавців, вимог до їх кваліфікації, переліку метрологічних характеристик, що встановлюються; підготовку алгоритму встановлення метрологічних характеристик, визначення еталонних речовин, що використовуються в експерименті, вимог до умов отримання результатів.

Виклад основного матеріалу. Методика визначення гострої летальної токсичності води на *Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan*, ґрунтується на встановленні різниці між загибеллю риб у воді, що аналізується – дослід, та у воді, яка не містить токсичних речовин – контроль. Критерієм гострої летальної токсичності є загибель 50 і більше відсотків риб у досліді порівняно з контролем за 96 годин біотестування.

При встановленні метрологічних характеристик методики біотестування з визначення гострої летальної токсичності води на рибах використовувалась процедура, наведена у нормативному документі [6].

Результати біотестування еталонної речовини двохромовоокислого калію ($K_2Cr_2O_7$) з використанням методики на рибах наведено у табл. 1.

На підставі підрахунку кількості живих риб у контролі і досліді визначали середні арифметичні, які використовували для розрахунку кількості загинув риб у досліді відносно контролю за формулою:

$$A = \frac{\bar{X}_k - \bar{X}_d}{\bar{X}_k} \times 100\%, \quad (1)$$

де А – кількість загинув риб у досліді відносно контролю, %;

\bar{X}_k – середнє арифметичне кількості живих риб у контролі, екз;

\bar{X}_d – середнє арифметичне кількості живих риб у досліді, екз.

На підставі отриманих результатів розраховували середню летальну концентрацію розчину $K_2Cr_2O_7$ за 96 годин біотестування (ЛК₅₀₋₉₆). Усі подальші розрахунки виконували згідно з [6]. Значення ЕК50-96 перевіряли на наявність надмірної похибки за β -критерієм. Для цього обчислювали значення середнього результату (\bar{X}_l) за формулою (2), відповідного середньо квадратичного відхилення (СКВ) S_l за формулою (3) та число ступенів свободи за формулою (4):

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

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

$$f_i = N_i - 1, \quad (4)$$

де l – номер виконавця (серії);

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

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

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

Таблиця 1
Результати експериментальних досліджень

Номер досліду у серії, ln	Концентрація водного розчину $K_2Cr_2O_7$, мг/дм ³			
	X_{ln}	\bar{X}	S_l	f_l
1	86	99	21	15
2	92			
3	78			
4	88			
5	84			
6	91			
7	74			
8	107			
9	149			
10	82			
11	110			
12	100			
13	94			
14	89			
15	132			
16	126			

Джерело: розроблено автором

Як видно з отриманих результатів, найбільш підозрілим є результат № 9 (149), саме він найбільше відрізняється від середнього значення. Для його перевірки на наявність надмірної похибки склали і обчислювали відношення:

$$\beta = \frac{|X_{ln} - \bar{X}_l|}{S_l} = 2,38,$$

де S_l – середнє квадратичне відхилення.

Обчислене значення $\beta=2,38$ менше, ніж табличне $\beta_{табл.}$ для ступенів свободи $f_1 = 15$. $\beta_{табл.(15)}=2,44$, з чого витікає відсутність надмірної похибки.

Відтворюваність $\sigma_{в.в.}$ розраховували за формулою:

$$\sigma_{в.в.} = S_{в.в.} * \gamma(f) = 21 \times 1,017 = 21,4 \text{ мг} / \text{дм}^3;$$

$$\sigma_{в.в.}(\%) = \frac{S_{в.в.} * \gamma(f)}{\bar{X}} * 100 = 21,2\%, \quad (5)$$

Значення відтворюваності перевірили на однорідність та отримали наступне значення $\sigma_{в.в.}^* = 21,2\%$.

Похибку результатів визначення токсичності обчислювали за формулами:

$$\Delta = 1,96 * \sigma_{в.в.}, \quad (6)$$

$$\delta(\%) = 1,96 * \sigma_{в.в.}(\%), \quad (7)$$

$$\Delta = 1,96 * 21,4 \text{ мг} / \text{дм}^3 = 42,0 \text{ мг} / \text{дм}^3;$$

$$\delta(\%) = 1,96 * 21,2\% = 42\%.$$

Отже, відтворюваність результатів біотестування розчину $K_2Cr_2O_7$ становить 21,4 мг/дм³ (21,2%); похибка результатів біотестування розчину $K_2Cr_2O_7$ становить 42,0 мг/дм³ (42%).

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

$$D = 2,77 * \sigma_{в.в.}, \quad (8)$$

$$D = 2,77 * 21,2 = 59 \text{ (мг/дм}^3\text{)}.$$

Отже, норматив оперативного контролю відтворюваності результатів біотестування розчину $K_2Cr_2O_7$ становить 59 мг/дм³.

Для встановлення діапазону реагування культури риб було використано критерій токсичності – загибель 50% і більше тест-об'єктів у досліді порівняно з контролем за 24 години біотестування.

В експериментах визначали концентрацію $K_2Cr_2O_7$, яка викликає загибель 50% і більше риб за 24 години (ЛК₅₀₋₂₄).

За результатами експериментів було отримано такі значення ЛК₅₀₋₂₄: 140; 141; 138; 133; 141; 120; 154; 177; 174; 120; 120; 140; 140; 140; 118; 142 мг/дм³ $K_2Cr_2O_7$.

Обчислювали значення середнього результату і відповідного СКВ за формулами:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{l=1}^L \sum_{n=1}^{N_l} X_{ln}}{N_l} = 140 \text{ мг} / \text{дм}^3, \quad (2)$$

$$S_{в.в.} = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L \sum_{n=1}^{N_l} (X_{ln} - \bar{X})^2}{\sum_{l=1}^L N_l - 1}} = 17,3 \text{ мг} / \text{дм}^3, \quad (3)$$

$$f = \sum_{l=1}^L N_l - 1 = 15, \quad (4)$$

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

Далі перевіряли отримані результати експериментів за β -критерієм на наявність надмірних похибок. Із наведених вище концентрацій $K_2Cr_2O_7$ найбільш підозрілим є результат 177 мг/дм³. Для нього обчислювали відношення:

$$\beta = \frac{X_{ln} - \bar{X}}{S_l} = 2,14,$$

де S_l – середнє квадратичне відхилення.

За табличними даними [7] 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 $\gamma(f)$ для $f = 15$, яке становить 1,017.

$$\sigma_{в.в.} = 1,017 * 17,3 = 17,6$$

Діапазон реагування риб обчислювали за формулою:

$$X - 1,96 * \sigma < X_K < X + 1,96 * \sigma, \quad (9)$$

де X_K – концентрація, за якої досягається критерій токсичності;

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

Таким чином, діапазон реагування риб становить:

$$140 - 1,96 * 17,6 < ЛК_{50-24} < 140 + 1,96 * 17,6,$$

$$106 < ЛК_{50-24} < 175.$$

Отже, для методики біотестування з визначення гострої летальної токсичності води на рибках встановлено наступні метрологічні характеристики:

похибка результатів біотестування становить 42 мг/дм³ (42%);

відтворюваність результатів біотестування становить 21 мг/дм³ (21%);

норматив оперативного контролю відтворюваності результатів біотестування становить 59 мг/дм³; діапазон реагування риб становить 106-175 мг/дм³.

Висновки. На підставі експериментальних досліджень встановлені наступні метрологічні характеристики для методики біотестування з визначення гострої летальної токсичності води на рибках:

похибка результатів біотестування становить 42 мг/дм³ (42%);

відтворюваність результатів біотестування становить 21 мг/дм³ (21%);

норматив оперативного контролю відтворюваності результатів біотестування становить 59 мг/дм³;

діапазон реагування риб становить 106-175 мг/дм³.

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. Kenneth Lee, Gary Wohlgeschaffen, Gilles H. Tremblay, B. Thomas Johnson, Gary A. Sergey, Roger C. Prince, Chantal C. Guénette and Edward H. Owens, Toxicity Evaluation with the Microtox® Test to Assess the Impact of In Situ Oiled Shoreline Treatment Options: Natural Attenuation and Sediment Relocation, Spill Science & Technology Bulletin, 8, 3, (273), (2003).
5. Brenda Karen González-Pérez, S.S.S. Sarma and S. Nandini, Effects of selected pharmaceuticals (ibuprofen and amoxicillin) on the demography of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus havanaensis* (Rotifera), The Egyptian Journal of Aquatic Research, 10.1016/j.ejar.2016.09.003, 42, 3, (341-347), (2016).
6. 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).
7. Большев Л.Н. Таблицы математической статистики / Л.Н. Большев, Н.В. Смирнов. – М.: Наука, 1983. – 416 с.

Крайнюков А.Н., Стриян К.А., Крайнюков А.А.

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина

УСТАНОВЛЕНИЕ МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИКИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТРОЙ ЛЕТАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ВОДЫ НА РИБАХ BRACHYDANIO RERIO HAMILTON-BUCHANAN

Аннотация

Приведены результаты экспериментальных исследований по установлению метрологических характеристик методики биотестирования для определения острой токсичности воды с использованием рыб *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan. Метрологические характеристики методики устанавливали в условиях внутрилабораторного эксперимента. В качестве эталонного вещества использовано двухромовокислый калий (K₂Cr₂O₇).

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

Krainiukov A.N., Striian K.A., Krainiukov A.A.

V.N. Karazin Kharkiv National University

INSTALLATION OF METROLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE BIOTECHNOLOGY METHOD FOR DETERMINATION OF GREASE LETTAL TOXICITY OF WATER ON BRACHYDANIO RERIO HAMILTON-BUCHANAN FISH

Summary

The results of experimental studies on establishing metrological characteristics bioassay methods for determining the acute toxicity of water using fish *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan. Metrological characteristics under conditions established methods internal laboratory experiment. As reference material used potassium bichromate (K₂Cr₂O₇).

Keywords: bioassay method, acute toxicity, the metrological characteristics, reference substance, error results, reproducibility, reproducibility, standard operational control, the range of responses test object.