

# БІОЛОГІЧНІ НАУКИ

DOI: <https://doi.org/10.32839/2304-5809/2019-2-66-70>

УДК 574.64:504.064

Кривицька І.А., Крайнюков А.О.

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

## ВСТАНОВЛЕННЯ МЕТРОЛОГІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИКИ БІОТЕСТУВАННЯ З ВИЗНАЧЕННЯ ГОСТРОЇ ЛЕТАЛЬНОЇ ТОКСИЧНОСТІ ВОДИ НА РАКОПОДІБНИХ CERIODAPHNIA AFFINIS LILLJEBORG

**Анотація.** Наведено результати експериментальних досліджень з встановлення метрологічних характеристик методики біотестування для визначення гострої токсичності води з використанням ракоподібних *Ceriodaphnia affinis Lilljeborg*. Біотестування проводили з використанням еталонної речовини двохромовокислого калію ( $K_2Cr_2O_7$ ). Для методики біотестування з визначення гострої летальної токсичності води на ракоподібних церіодафніях встановлено наступні метрологічні характеристики: похибка результатів біотестування становить 0,65 мг/дм<sup>3</sup> (61%); відтворюваність результатів біотестування становить 0,33 мг/дм<sup>3</sup> (31%); норматив оперативного контролю відтворюваності результатів біотестування становить 0,91 мг/дм<sup>3</sup>; діапазон реагування церіодафній становить 0,9-3,3 мг/дм<sup>3</sup>.

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

Kryvytska Ivetta, Krainiukov Andrii

V.N. Karazin Kharkiv National University

## INSTALLATION OF METROLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE BIOTECHNOLOGY METHOD FOR DETERMINATION OF ACUTE LETTAL TOXICITY OF WATER ON ECONOMIC DEVELOPMENT CERIODAPHNIA AFFINIS LILLJEBORG

**Summary.** The use of bioanalysis to assess environmental pollution, in particular for aquatic ecosystems, has become relevant and has become widespread in recent decades. The standardization of the conditions of the bio test should be better defined to ensure applicability as an effective analytical tool. The results of experimental researches on the establishment of metrological characteristics of the biotesting technique for the determination of acute water toxicity using crustacean *Ceriodaphnia affinis Lilljeborg* are presented. Biotesting was performed using a reference substance of potassium bromochloride ( $K_2Cr_2O_7$ ). The method of biotesting for the determination of acute lethal toxicity of water on crustacean *Ceriodaphnia affinis Lilljeborg* is based on the determination of the difference between the number of dead tseriodafni in tested water and the amount of water in it that does not contain toxic substances – control. The criterion for acute lethal toxicity is the death of 50% ceriodaphnia and more in the experiment compared with the control for 48 hours of bioassay. The following metrological characteristics are established for the method of biotesting to determine the acute lethal toxicity of water on crustacean ceriodaphytes: the biotesting result is 0.65 mg/dm<sup>3</sup> (61%); Reproducibility of biotesting results is 0.33 mg/dm<sup>3</sup> (31%); the standard of operational control of the reproducibility of biotesting results is 0.91 mg/dm<sup>3</sup>; The reaction range of the ceriodaphne is 0.9-3.3 mg/dm<sup>3</sup>.

**Keywords:** biotesting technique, acute toxicity, metrological characteristics, reference substance, error of results, reproducibility of results, norm of operational control, test response range.

**Постановка проблеми.** Водним кодексом України (ВКУ), зокрема, статтею 34 «Стандартизація в галузі використання і охорони вод та відтворення водних ресурсів» до комплексу нормативних документів із стандартизації, поряд з іншими об'єктами віднесено, методи, методики і засоби визначення складу та властивостей вод, а також метрологічні норми і правила.

Згідно зі статтею 10 «Вимірювання та використання їх результатів» Закону України від 15.06.2004 р. № 1765-IV «Про метрологію та метрологічну діяльність», результати будь-яких видів вимірювань можуть бути використані лише за умови, якщо відомі відповідні характеристики похибок вимірювань, у зв'язку з чим методики виконання вимірювань повинні бути атестованими.

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** Використання біоаналізу для оцінки забруднення

навколишнього середовища, зокрема, для водних екосистем, набуло актуальності та знайшло широке застосування протягом останніх десятиліть. Стандартизація умов біопроб має бути краще визначена, щоб забезпечити застосовність як ефективного аналітичного інструменту. У статті [1] розглянуто сучасну міжнародну ситуацію та специфіку практики культивування та використання тест-організмів для біоаналізу. Стандартизація біопроб вимагає використання відповідних джерел тест-культур і забезпечення відповідних умов культивування. У статті розглядаються рекомендації щодо вибору видів випробувань та їх культивування в контексті встановлених екологічних цілей та оцінки чутливості до різних токсичних речовин. Висвітлено значення якості води, що використовується для тест-культур. Проаналізовано вимоги до якості води та можливості

Результати експериментальних досліджень

Номер досліджу у серії, $ln$	Концентрація водного розчину $K_2Cr_2O_7$ , мг/дм <sup>3</sup>			
	$X_{ln}$	$\bar{X}$	$S_l$	$f_l$
1	1,67	1,08	0,33	23
2	1,29			
3	1,55			
4	1,02			
5	1,17			
6	1,16			
7	1,00			
8	1,39			
9	1,31			
10	1,33			
11	1,31			
12	1,00			
13	1,35			
14	1,45			
15	0,93			
16	0,77			
17	0,74			
18	0,73			
19	0,75			
20	0,46			
21	0,54			
22	0,65			
23	0,96			
24	1,35			

Джерело: розроблено автором

застосування синтетичних середовищ. У роботі [2] відтворюваність тесту на токсичність визначали з використанням 12 еталонних токсикантів. Коефіцієнт мінливості ЕК50 коливався від 6,95% до 55,37%, а варіабельність була порівнянна з такою, що спостерігалася для *D. magna* та інших моделей для випробувань водних середовищ. Дослідження показало необхідність включити ракоподібних в батарею біотестів для виявлення присутності небезпечних хімічних речовин у ґрунтах, шламах стічних вод, донних відкладах і водних системах.

**Виклад основного матеріалу.** Методика біотестування з визначення гострої летальної токсичності води на ракоподібних *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (далі періодафній) ґрунтується на встановленні різниці між кількістю загинлих періодафній у воді, що аналізується – дослід, та їх кількістю у воді, яка не містить токсичних речовин – контроль. Критерієм гострої летальної токсичності є загинь 50% періодафній і більше у досліді порівняно з контролем за 48 годин біотестування.

При встановленні метрологічних характеристик методики біотестування з визначення гострої летальної токсичності води на ракоподібних використовувалась процедура, наведена у нормативних документах [3; 4].

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

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

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

де  $A$  – кількість загинлих періодафній у досліді відносно контролю, %;

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

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

На підставі отриманих результатів розраховували середню летальну концентрацію розчину  $K_2Cr_2O_7$  за 48 годин біотестування (ЛК<sub>50-48</sub>). Усі подальші розрахунки виконували згідно з [3,4]. Значення ЛК<sub>50-48</sub> перевіряли на наявність надмірної похибки за  $\beta$ -критерієм. Для цього обчислювали значення середнього результату ( $\bar{X}_l$ ) за формулою (2), відповідного середнього квадратичного відхилення (СКВ)  $S_l$  за формулою (3) та число ступенів свободи за формулою (4):

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

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

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

де  $l$  – номер виконавця (серії);

$n$  – номер досліджу у серії,  $n = 1, \dots, N_l$ ;

$X_{ln}$  – результат досліджу  $n$  в серії  $l$ ;

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

Як видно із отриманих даних, найбільш підозрілим є результат № 20 (0,46), який найбільше відрізняється від середнього значення. Для його перевірки на наявність надмірної похибки склали і обчислювали відношення:

$$\beta = \frac{|X_{ln} - \bar{X}_n|}{S_l} = 1,87,$$

де  $S_l$  – середнє квадратичне відхилення.

Обчислене значення  $\beta$  менше, ніж табличне  $\beta_{табл.}$  для ступенів свободи  $f_1=23$ .  $\beta_{табл.(23)}=2,67$ , з чого витікає відсутність надмірної похибки.

Відтворюваність результатів біотестування  $\sigma_{вл.в.}$  водного розчину  $K_2Cr_2O_7$  розраховували за формулою:

$$\sigma_{вл.в.} = S_{вл.в.} * \gamma(f) = 0,33 * 1,013 = 0,33 \text{ мг / дм}^3; \quad (5)$$

$$\sigma_{вл.в.} (\%) = \frac{S_{вл.в.} * \gamma(f)}{\bar{X}} * 100 = \frac{0,33}{1,08} * 100 = 31\%,$$

Значення відтворюваності перевірили на однорідність та отримали наступне значення  $\sigma^*_{вл.в.} = 31\%$ .

Похибку результатів біотестування обчислювали за формулами:

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

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

$$\Delta = 1,96 * 0,33 \text{ мг/дм}^3 = 0,65 \text{ мг/дм}^3;$$

$$\delta (\%) = 1,96 * 31\% = 61\%.$$

Отже, відтворюваність результатів біотестування розчину  $K_2Cr_2O_7$  становить 0,33 мг/дм<sup>3</sup> (31%); похибка результатів біотестування становить 0,65 мг/дм<sup>3</sup> (61%).

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

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

$$D = 2,77 * 0,33 = 0,91 \text{ (мг/дм}^3\text{)}.$$

Отже, норматив оперативного контролю відтворюваності результатів біотестування розчину  $K_2Cr_2O_7$  становить 0,91 мг/дм<sup>3</sup>.

Для встановлення діапазону реагування періодафній 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 періодафній за 24 години (ЛК<sub>50-24</sub>).

За результатами експериментів було отримано такі значення ЛК<sub>50-24</sub>: 1,76; 1,75; 1,90; 2,39; 1,01; 2,52; 2,40; 2,34; 2,00; 2,60; 2,53; 2,46; 0,95; 2,70; 2,65; 1,59 мг/дм<sup>3</sup>  $K_2Cr_2O_7$ .

Середню арифметичну ЛК<sub>50-24</sub> розраховували за формулою (2):

$$\bar{X} = \frac{33,6}{16} = 2,1 \text{ (мг / дм}^3\text{)},$$

де  $X_{in}$  – результат досліді;

$n$  – номер досліді,  $n = 1, \dots, N_i$ .

Середнє квадратичне відхилення розраховували за формулою:

$$S_{в.в.} = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L \sum_{n=1}^{N_l} (X_{ln} - \bar{X})^2}{\sum_{l=1}^L N_l - 1}} = 0,6 \text{ (мг / дм}^3\text{)},$$

Далі перевіряли отримані результати експериментів за  $\beta$ -критерієм на наявність

надмірних похибок. Із наведених вище концентрацій  $K_2Cr_2O_7$  найбільш підозрілим є результат 0,95 мг/дм<sup>3</sup>. Для нього обчислювали відношення:

$$\beta = \frac{X_{ln} - \bar{X}}{S_l} = 1,92,$$

де  $S_l$  – середнє квадратичне відхилення.

За табличними даними [5] знаходили значення  $\beta$ -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.

$$\sigma_{в.в.} = 1,017 * 0,6 = 0,61$$

Діапазон реагування періодафній обчислювали за формулою:

$$X - 1,96 * \sigma < X_k < X + 1,96 * \sigma, \quad (10),$$

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

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

Діапазон реагування тест-об'єктів періодафній становить:

$$2,1 - 1,96 * 0,61 < ЛК_{50-24} < 2,1 + 1,96 * 0,61;$$

$$0,9 < ЛК_{50-24} < 3,3.$$

**Висновки.** Для методики біотестування з визначення гострої летальної токсичності води на ракоподібних періодафніях встановлено наступні метрологічні характеристики:

похибка результатів біотестування становить 0,65 мг/дм<sup>3</sup> (61%);

відтворюваність результатів біотестування становить 0,33 мг/дм<sup>3</sup> (31%);

норматив оперативного контролю відтворюваності результатів біотестування становить 0,91 мг/дм<sup>3</sup>;

діапазон реагування періодафній становить 0,9-3,3 мг/дм<sup>3</sup>.

## Список літератури:

1. Terekhova Vera A., Kirit Wadhia, Fedoseeva Elena V., Uchanov Pavel V. 2018. Bioassay standardization issues in freshwater ecosystem assessment: test cultures and test conditions Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems, EDP Sciences (France), 419(32): 32–41.
2. Khangarot B.S., Das S. (2009). Acute toxicity of metals and reference toxicants to a freshwater ostracod, *Cypris subglobosa* Sowerby, 1840 and correlation to EC50 values of other test models. J Hazard Mater, 172: 641–649.
3. ДСТУ 4173-2003. Якість води. Визначання гострої летальної токсичності на *Daphnia magna* Straus та *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (Cladocera, Crustacea) (ISO 6341:1996, MOD).
4. КНД 211.1.4.055-97. Методика визначення гострої летальної токсичності води на ракоподібних *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg. Затв. наказом Міністерства Природи України від 21.05.97 № 68.
5. Большев Л.Н., Смирнов Н.В. Таблицы математической статистики. Москва : Наука, 1983. 416 с.

## References:

1. Terekhova Vera A., Kirit Wadhia, Fedoseeva Elena V., Uchanov Pavel V. (2018) Bioassay standardization issues in freshwater ecosystem assessment: test cultures and test conditions Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems, EDP Sciences (France), 419(32): 32–41.
2. Khangarot B.S., Das S. (2009). Acute toxicity of metals and reference toxicants to a freshwater ostracod, *Cypris subglobosa* Sowerby, 1840 and correlation to EC50 values of other test models. J Hazard Mater, 172: 641–649.
3. DSTU 4173-2003. Yakist' vody. Vyznachannya hostroyi letalnoyi toksychnosti na *Daphnia magna* Straus ta *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (Cladocera, Crustacea) (ISO 6341:1996, MOD).
4. KND 211.1.4.055-97. Metodyka vyznachennya hostroyi letalnoyi toksychnosti vody na rakopodibnykh *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg. Zatv. nakazom Minprirody Ukrainy vid 21.05.97. № 68.
5. Bolshev L.N., Smirnov N.V. (1983). Tablytsy matematycheskoy statystyky. Moskva : Nauka, 416 p.