

УДК 574.64:574.2

О. М. КРАЙНЮКОВ, докт. геогр. наук, доц.
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна
майдан Свободи, 6, 61022, Харків, Україна
e-mail: alkraynukov@gmail.com

АЛГОРИТМИ І СПОСОБИ ВИЗНАЧЕННЯ РІВНІВ ГОСТРОЇ ЛЕТАЛЬНОЇ І ХРОНІЧНОЇ ТОКСИЧНОСТІ ВОДИ

Мета. Визначення рівнів гострої летальної і хронічної токсичності води. **Методи.** Біотестування. **Результати.** Представлено результати експериментального дослідження, в рамках виконання якого розроблені алгоритми і способи кількісного визначення рівнів гострої летальної і хронічної токсичності води за допомогою методик біотестування на церіодафніях. Розроблені класифікаційні шкали базуються на узагальненні великого масиву багаторічних експериментальних даних з визначення токсичності понад 3600 проб стічних вод підприємств різних галузей економіки та якості близько 2000 проб води поверхневих водних об'єктів у басейнах Сіверського Донця, Дніпра, Дністра, Дунаю, Західного Бугу та Південного Бугу. **Висновки.** Для методик біотестування встановлено такі метрологічні характеристики: похибку результатів біотестування; відтворюваність результатів біотестування; норматив оперативного контролю відтворюваності результатів біотестування; діапазон реагування тест-об'єкта.

Ключові слова: біотест, токсичність, стічні води, поверхневі води, гостра токсичність, хронічна токсичність, генотоксичні і мутагенні властивості

Krainiukov A. N.

V. N. Karazin Kharkiv National University

ALGORITHMS AND METHODS DETERMINATION OF ACUTE BIOASSAY LETHAL AND CHRONIC TOXICITY WATER

Purpose. Determination of lethal levels of acute and chronic toxicity of water. **Methods.** Biotesting. **Results.** The paper presents the results of experimental studies within the implementation of which was developed algorithms and how to quantify the levels of lethal acute and chronic toxicity of water using bioassay techniques for tseriodafniyah. The classification scale based on a synthesis of a large array of many years of experimental data to determine the toxicity of more than 3600 samples of wastewater enterprises of various sectors of the economy and the quality of some 2,000 water samples in surface water basins Seversky Donets, Dnieper, Dniester, Danube, Southern Bug and Western Bug. **Conclusions.** For these bioassay methods, the following metrological characteristics: error bioassay results; reproducibility bioassay; standard operational control reproducibility bioassay results; range response test object.

Keywords: biotest, toxic, waste water, surface water test, acute toxicity, chronic toxicity, genotoxic and mutagenic properties

Крайнюков А. Н.

Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина, г. Харьков

АЛГОРИТМЫ И СПОСОБЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЕЙ ОСТРОЙ ЛЕТАЛЬНОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ ВОДЫ

Цель. Определение уровней острой летальным и хронической токсичности воды. **Методы.** Биотестирование. **Результаты.** Представлены результаты экспериментального исследования, в рамках выполнения которого были разработаны алгоритмы и способы количественного определения уровней острой летальной и хронической токсичности воды с помощью методик биотестирования на церіодафніях. Разработанные классификационные шкалы базируются на обобщении большого массива многолетних экспериментальных данных по определению токсичности более 3600 проб сточных вод предприятий различных отраслей экономики и качества около 2000 проб воды поверхностных водных объектов в бассейнах Северского Донца, Днепра, Днестра, Дуная, Западного Буга и Южного Буга. **Выводы.** Для методик биотестирования установлены такие метрологические характеристики: погрешность результатов биотестирования; воспроизводимость результатов биотестирования; норматив оперативного контроля воспроизводимости результатов биотестирования; диапазон реагирования тест-объекта.

Ключевые слова: биотест, токсичность, сточные воды, поверхностные воды, острая токсичность, хроническая токсичность, генотоксические и мутагенные свойства

Вступ

Постановка проблеми. Для оцінки дії токсикантів на живий організм використовуються протиставлення двох біологічних феноменів: «життя – смерть» і «норма – патологія», тобто реакцією на отруйні речовини є або смерть організму, або порушення його життєво важливих функцій і перехід у хворобливий, патологічний стан, який може повернутися до норми, завершитись смертю, або перейти у тривалий (хронічний) патологічний стан, який урешті-решт призведе до смерті.

Отже, основним критерієм токсичності є смерть отруєного організму, яка є якісним критерієм. Токсикометричним поняттям для кількісної оцінки зазначеного критерію є смертність (або обернена до неї величина – виживання), яка характеризується статистично вірогідним відсотком загибелі особин із певної кількісно обґрунтованої вибірки представників одного виду, однакових за віком, розмірами і масою тіла. Смертність (або виживання) залежать від дози токсичної речовини, тобто його маси, яка припадає на одиницю маси живого організму (індивідуума), і від тривалості дії, тому залежність смертності від дози виражається кривою «доза – ефект», що однозначно (за стабільних умов) характеризує токсичність певної речовини для даного організму [1].

Стосовно водних організмів, особливо дрібних, поняття дози не завжди можна застосувати, оскільки їхню масу в досліді не визначають, у зв'язку з чим користуються поняттям ефективної концентрації і відповідно будують криві «концентрація – ефект».

Розрізняють мінімально допустиму концентрацію (МДК), летальну (ЛК₁₀₀), при якій гине 100% піддослідних тест-об'єктів. Ці концентрації встановлюють в 1, 2, 3 та 4-х добових досліді з визначення гострої летальної токсичності та позначають ЛК²⁴₁₀₀, ЛК⁴⁸₁₀₀, ЛК⁷²₁₀₀, ЛК⁹⁶₁₀₀ відповідно. Найбільш прийнятним показником токсичності визнають медіанна летальна концентрація – ЛК₅₀, переважно за 48 годин (ЛК⁴⁸₅₀). Діапазон концентрацій від МДК до ЛК₁₀₀ називається зоною токсичної дії. Зона гострої токсичної дії (Z_г) – це відношення середньо смертельної концентрації ЛК₅₀ до порогу гострого впливу (Lim_г).

$$Z_g = \frac{LK_{50}}{Lim_g}, \quad (1)$$

Це відношення показує розмах концентрацій, які чинять вплив на організм від початкових до летальних концентрацій.

Порогом токсичної дії прийнято вважати мінімальну концентрацію, яка викликає зміну показників, що характеризують стан життєдіяльності організму.

Зона хронічної токсичної дії (Z_х) – це відношення порогу гострого впливу (Lim_г) до порогу хронічного впливу (Lim_х).

$$Z_x = \frac{Lim_g}{Lim_x}, \quad (2)$$

Дане відношення показує наскільки великий розрив між концентраціями, що викликають токсичний вплив на організм від початкової інтоксикації до гостролетальної дії. Чим менше зона гострого впливу, тим небезпечніша речовина, оскільки навіть невелике перевищення порогової концентрації може викликати смертельний результат. Чим ширше зона хронічного впливу, тим небезпечніша речовина, оскільки концентрації, які чинять хронічний вплив, значно менші тих, що викликають гостру токсичність [1].

За визначенням М. С. Строганова [2], токсичність речовини для водного організму є величиною, оберненою до медіанної летальної концентрації, яку виявляють впродовж 48 або 96 годинного експерименту. Разом з тим, такий підхід до позначення результатів біотестування можливо застосовувати лише для окремих речовин, тоді як при визначенні токсичності стічної або природної води, які мають багатокомпонентний склад, необхідно використовувати спеціальний методичний прийом. У такому випадку результат біотестування відображає інтегральний характер дії суміші речовин на тест-об'єкти.

Відповідно до вимог українського законодавства в галузі водоохоронної діяльності, для використання на офіційному рівні даних будь-яких вимірювань складу і властивостей води необхідно умовою є кількісне вираження їх результатів та наявність метрологічного забезпечення методик, за якими отримано результати вимірювань.

Результати дослідження

У межах експериментального дослідження розроблено алгоритми і способи кількісного визначення рівнів гострої летальної та хронічної токсичності води за допомогою методик біотестування на церіодафніях, як найбільш ефективних за результатами апробації [3, 4].

Спосіб визначення рівня гострої летальної токсичності води ґрунтується на встановленні різниці між кількістю загиблених церіодафній у дослідній воді, та їх кількістю у воді, яка не містить токсичних речовин – контрольній воді. Критерієм гострої летальної токсичності є загибель 50% церіодафній і більше у дослідній воді порівняно з контрольною водою за 48 годин.

Спосіб визначення рівня гострої летальної токсичності води полягає у внесенні церіодафній в контрольну і дослідну воду, експонуванні протягом 48 годин без годування, підрахунку живих церіодафній і розрахунку відсотка загиблених у дослідній воді відносно кількості живих церіодафній у контрольній воді через 48 годин експонування з подальшою оцінкою токсичності води за критерієм загибелі 50% і більше церіодафній. При цьому із дослідної води готують ряд розбавлень, в яких експонують церіодафній та наприкінці експонування підраховують живих церіодафній і розраховують відсоток загиблених у контрольній воді, дослідній воді та розбавленнях дослідної води. Рівень токсичності дослідної води визначають шляхом розрахунку її середнього летального розбавлення з урахуванням експериментально встановленого коефіцієнту, що забезпечує виживаність церіодафній близько 100%.

Алгоритм процедури біотестування наступний:

Біотестування здійснюють у 10-кратній повторності для контрольної, дослідної води та її розбавлень. Як контрольну воду використовують питну воду або штучну прісну воду. Тривалість біотестування становить 48 годин, після чого візуально підраховують кількість живих церіодафній. За результатами підрахунку кількості живих церіодафній у контрольній, дослідній воді та у кожному її розбавленні визначають їх середні арифметичні, які використовують для розрахунку кількості загиблених церіодафній у дослідній воді та її розбав-

леннях відносно контрольної води за формулою:

$$A = \frac{\overline{Xk} - \overline{X_{3в}}}{\overline{Xk}} 100, \quad (3)$$

де А – кількість загиблених церіодафній у дослідній воді відносно контрольної води, %;

\overline{Xk} - середнє арифметичне кількості живих церіодафній у контрольній воді, екземпляри;

$\overline{X_{3в}}$ - середнє арифметичне кількості живих церіодафній у дослідній воді та у кожному її розбавленні, екземпляри.

Вода виявляє гостру летальну токсичність, якщо А становить 50 і більше відсотків церіодафній. Для кількісної оцінки токсичності дослідної води визначають середнє летальне розбавлення (ЛР₅₀) за допомогою одного із методів лінійної регресії, наприклад, графічного способу на логарифмічній шкалі з використанням пробітних величин (додаток Д).

Рівень гострої летальної токсичності (РТГ) дослідної води визначають за формулою:

$$РТГ = ЛР_{50} * k, \quad (4)$$

де ЛР₅₀ – середнє летальне розбавлення дослідної води;

k – експериментально встановлений коефіцієнт, урахування якого забезпечує виживаність церіодафній на рівні близько 100 %. Значення k дорівнює 2.

РТГ виражають в умовних одиницях гострої летальної токсичності (ОТГ). Одиниця гострої летальної токсичності дослідної води – величина, яка відповідає кратності її розбавлення, за якою забезпечується виживаність близько 100 % церіодафній.

У випадку, коли проба дослідної води не виявляє гострої летальної токсичності, значення ЛР₅₀ приймають рівним 0,5.

Якість води оцінюють за класами, ступенем та рівнями її гострої летальної токсичності відповідно до класифікаційної шкали (табл. 1).

Спосіб визначення рівня хронічної токсичності води ґрунтується на встановленні різниці між показниками виживаності та (або) плодючості організмів у воді, що аналізується (дослід) та аналогічними показниками у воді, яка не містить токсичних

Таблиця 1

Класифікація якості води за класами, ступенем та рівнями гострої летальної токсичності [3]

Клас токсичності	Ступінь токсичності	Рівень гострої летальної токсичності, OT _r
I	нетоксична	1,0
II	слабко токсична	1,1-3,0
III	середньо токсична	3,1-5,0
IV	високотоксична	5,1-10,0
V	надзвичайно токсична	> 10,0

речовин (контроль). В якості тест-об'єктів використовують церіодафній віком до 24 годин. Біотестуванню підлягають контрольна, дослідна вода та її розбавлення.

Критерієм хронічної токсичності є вірогідне зниження показників виживаності та (або) плодючості церіодафній у дослідній воді порівняно з контрольною впродовж трьох послідовних пометів за (7±1) діб.

Біотестування здійснюють у 10-кратній повторності для контрольної, дослідної води та її розбавлень. Щодоби у кожній посудині з церіодафніями проводять заміну контрольної та дослідної води на відповідну свіжо приготовану і вносять корм. Під час заміни води підраховують кількість живих вихідних церіодафній та новонароджених особин. Після підрахунку новонароджених особин видаляють.

Біотестування закінчують після того, як у контролі 60% вихідних самок дадуть по три послідовних помети. Тривалість біотестування становить (7±1) діб.

Вірогідність різниці між дослідною і контрольною водою за показниками вижи-

ваності та плодючості встановлюють за критерієм Ст'юдента ($St_{теор}$). Для цього розраховують фактичний критерій вірогідності різниці ($St_{факт}$) і порівнюють його з теоретичним ($St_{теор}$).

Значення $St_{факт}$ знаходять за формулою

$$St_{факт} = \frac{\overline{X}_к * \overline{X}_д}{\sqrt{S_к^2 + S_д^2}}, \quad (5)$$

де $\overline{X}_к, \overline{X}_д$ - середні арифметичні показників виживаності або плодючості у контрольній та дослідній воді;

$S_к, S_д$ - похибки середніх арифметичних у контрольній та дослідній воді.

Значення $St_{табл}$ - таблична величина.

При довірчій імовірності P=0,95 і числі ступенів свободи ($v=n+n-2=10+10-2=18$) воно складає 2,10 (табл. 2).

Таблиця 2

Значення критерію Ст'юдента

Число ступенів свободи	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
$St_{теор}$	2,20	2,18	2,16	2,14	2,13	2,12	2,11	2,10	2,09	2,09

Якщо $St_{факт} \geq St_{табл}$, то різниця між результатами біотестування у дослідній та контрольній воді вважається вірогідною. Тобто спостерігається вірогідне зменшення кількості живих вихідних церіодафній і

(або) зменшення кількості новонароджених особин (у розрахунку на одну вихідну самку) у дослідній порівняно з контрольною водою впродовж трьох послідовних пометів за (7±1) діб. На цій підставі роблять висно-

вок про те, що проба води або її розбавлення чинить хронічну токсичну дію.

Для кількісної оцінки хронічної токсичності проби води встановлюють найменшу кратність розбавлення води, за якою не виявляється хронічна токсична дія.

Рівень хронічної токсичності (PT_x) проби води дорівнює мінімальній кратності розбавлення, за якою хронічна токсичність

води не виявляється. PT_x виражають в умовних одиницях хронічної токсичності. Одиниця хронічної токсичності води (OT_x) – величина, що визначається через мінімальну кратність розбавлення, за якою хронічна токсичність води не виявляється.

Якість води оцінюють за класами, ступенем та рівнями її забрудненості відповідно до класифікаційної шкали (табл. 3).

Таблиця 3

Класифікація якості води за класами, ступенем та рівнями забрудненості [4]

Клас якості	Ступінь забрудненості	Рівень хронічної токсичності, OT_x
I	чиста	1,0
II	слабко забруднена	1,1-2,0
III	помірно забруднена	2,1-4,0
IV	брудна	4,1-8,0
V	дуже брудна	> 8,0

Розроблені класифікаційні шкали базуються на узагальненні великого масиву багаторічних експериментальних даних з визначення токсичності понад 3600 проб стічних вод підприємств різних галузей економіки та якості близько 2000 проб води поверхневих водних об'єктів у басейнах Сіверського Донця, Дніпра, Дністра, Дунаю, Західного Бугу та Південного Бугу.

Важливою позитивною характеристикою запропонованих способів є можливість співставлення експериментально встановлених значень кратності розбавлення стічної води на випуску у водний об'єкт за результатами визначення її гострої летальної токсичності з кратністю розбавлення стічної води водою водоприймача у контрольному створі, що дозволяє врахувати асимілюючу спроможність водоприймача стічних вод при встановленні гранично допустимого антропогенного навантаження на поверхневі води.

Водним кодексом України [5] до комплексу нормативних документів щодо стандартизації у галузі використання і охорони

води 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» [6] результати будь-яких видів вимірювань можуть бути офіційно визнаними лише за умови, якщо для методик, які використовуються, встановлені метрологічні характеристики.

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 [7]. Що стосується метрологічного забезпечення методик біотестування, за допомогою яких визначають рівні токсичності води, така інформація практично відсутня у вітчизняних публікаціях.

Висновки

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 лабора-

торії є використання атестованих методик. У зв'язку з цим, у процесі підготовки лабораторії еколого-токсикологічних досліджень Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна до атестації у 2011 року було проведено серію експериментів за спеціально розробленими програмою і алгоритмом з метою отримання да-

них, необхідних для перевірки наведених у відповідних методиках їх метрологічних характеристик для методик біотестування на інфузоріях, водоростях, ракоподібних та рибах, за допомогою яких в лабораторії виконуються дослідження з визначення токсичних властивостей різних категорій вод [8].

Для зазначених методик біотестування встановлено наступні метрологічні ха-

рактеристики: похибку результатів біотестування; відтворюваність результатів біотестування; норматив оперативного контролю відтворюваності результатів біотестування; діапазон реагування тест-об'єкта.

Алгоритм, детальний опис процедури встановлення та метрологічні характеристики методик біотестування на інфузоріях, водоростях, ракоподібних та рибах подано у [9].

Література

1. Гідроекологічна токсикометрія та біоіндикація забруднень/ за ред. І. Т. Олексіва та Л. П. Брагінського. – Львів: Світ, 1995. – 437 с.
2. Строганов Н. С. Методика определения токсичности водной среды/ Н. С. Строганов// Методики биологических исследований по водной токсикологии. – М.: Наука, 1971. – С. 14-61.
3. Патент на корисну модель №65090. Спосіб визначення рівня гострої летальної токсичності зворотної води / О.М. Крайнюков, А.М. Крайнюкова; зареєстровано в державному реєстрі патентів України на корисні моделі 25.11.2011. (11) 65090 (13)U (51) МПК (2011) G01N 33/18.
4. Патент на корисну модель №67014. Спосіб визначення рівня хронічної токсичності природної води/ О. М. Крайнюков, А. М. Крайнюкова; зареєстровано в державному реєстрі патентів України на корисні моделі 25.01.2012. (11) 67014 (13)U (51) МПК (2012) G01N 33/18.
5. Водний кодекс України. Затверджено Верховною Радою України від 06.06.1995р.
6. Закон України про метрологію і метрологічну діяльність. Затв. Постановою Верховної Ради України від 11.02.1998. №113/98-ВР. 1998.
7. Метрологічне забезпечення. Оцінка стану вимірювань в галузі охорони навколишнього природного середовища та раціонального використання природних ресурсів: КНД 211.0.0.061 – 97. Затв. наказом Мінекобезпеки України від 02.06.1997р. – Київ, 1997. №83. – 31с.
8. Крайнюков О. М. Метрологічне забезпечення оцінки токсичності води методом біотестування / О. М. Крайнюков // Людина і довкілля. Проблеми неоекології. – 2012. – №1-2. – С. 45-49.
9. Крайнюков О. М. Науково-методичні основи нормування антропогенного забруднення аквальних ландшафтів. Монографія / О. М. Крайнюков; за ред. А. В. Гриценка, А. М. Крайнюкової. – Х.: Екограф, 2013. – 260 с.

Надійшла до редколегії 11.05.2016