

УДК 006.91:574.64

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

МЕТРОЛОГІЧНЕ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ОЦІНКИ ТОКСИЧНОСТІ ВОДИ МЕТОДОМ БІОТЕСТУВАННЯ

Наведено результати експериментальних досліджень з встановлення метрологічних характеристик методики біотестування для визначення хронічної токсичності води з використанням ракоподібних *Ceriodaphnia affinis Lilljeborg*. В якості еталонної речовини використано двохромовоокислий калій ($K_2Cr_2O_7$).

Ключові слова: методика, біотестування, хронічна токсичність, метрологічні характеристики, еталонна речовина, похибка, збіжність, відтворюваність, норматив оперативного контролю, діапазон реагування, тест-об'єкт

Krainiukov A. N. METROLOGY PROVIDING OF WATER TOXICITY EVALUATION BY BIOTESTING METHOD

The results of experimental researches are presented to metrology descriptions establishment of biotesting methodology for determine the chronic toxicity water with the usage of *Ceriodaphnia affinis Lilljeborg* crustaceans. It has been used the potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) as an etalon substance.

Key words: biotesting, methodology, chronic toxicity, metrology descriptions, etalon substance, accuracy, convergence, reproducibility, norm of operative control, range reacting, f test-object

Крайнюков А. Н. МЕТРОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ ВОДЫ МЕТОДОМ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Представлены результаты экспериментальных исследований по установлению метрологических характеристик методики биотестирования для определения хронической токсичности воды с использованием ракообразных *Ceriodaphnia affinis Lilljeborg*. В качестве эталонного вещества использован двухромовокислый калий ($K_2Cr_2O_7$).

Ключевые слова: методика биотестирования, хроническая токсичность, метрологические характеристики, эталонное вещество, погрешность, сходимость, воспроизводимость, норматив оперативного контроля, диапазон реагирования, тест-объект

Вступ

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.

Одним із напрямів екологічно спрямованого захисту водних ресурсів і забезпечення екологічного благополуччя водних екосистем є визначення умов скидання зворотних вод у водні об'єкти. Зокрема, у Статті 70 ВКУ відзначається, що «водокористувачі зобов'язані здійснювати заходи щодо запобігання скиданню стічних вод чи його припинення, якщо вони ...містять токсичні речовини...». Наявність у зворотних

водах токсичних речовин, до яких, в першу чергу, відносяться важкі метали, СПАР, феноли, вуглеводні, пестициди та ін. обумовлює токсичні властивості води, що характеризує її здатність порушувати життєдіяльність водних організмів. Токсичність води вимірюють шляхом біотестування – експериментального визначення зміни відповідної тест-реакції певного тест-об'єкта.

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 стану проблеми

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 [1, 2]. 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 [3, 4] наведено результати експериментів, метою яких було отримання даних для стандартизації методик біотестування. Так у роботі [3] 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.

Спеціалістами університету в м. Гетебург [4] 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, оскільки характеризується простотою, оперативністю і точністю.

Мета та завдання досліджень. Враховуючи вимоги до методик біотестування щодо наявності 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 хронічної токсичності води з використанням найбільш чутливого до впливу хімічних речовин тест-об'єкту – представника ракоподібних *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg.

Для встановлення метрологічних характеристик методики біотестування на церіодфніях розроблено програму експериментальних досліджень. Програма включала: визначення кількості виконавців, вимог до їх кваліфікації, переліку метрологічних характеристик, що встановлюються; підготовку алгоритму встановлення метрологічних ха-

рактеристик, визначення еталонних речовин, що використовуються в експерименті, вимог до умов отримання результатів.

Експериментальні дослідження із встановлення метрологічних характеристик методики біотестування з визначення хронічної токсичності води проводили за алгоритмом, який наведено в [5].

Результати дослідження

Для методики біотестування з визначення хронічної токсичності води на ракоподібних *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg встановлено такі метрологічні характеристики: похибка результатів визначення токсичності; збіжність та відтворюваність результатів визначення токсичності; норматив оперативного контролю відтворюваності; діапазон реагування тест-об'єкта.

Метрологічні характеристики методики встановлено за умов внутрішньо-лабораторного експерименту. Експериментальні дослідження проведено протягом року на розчині еталонної речовини – двохромовокислого калію ($K_2Cr_2O_7$).

Для встановлення відтворюваності результатів визначення хронічної токсичності води на ракоподібних *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg біотестування проводилося протягом 7 діб у відповідності до методики [6]. З метою врахування сезонних коливань фізіологічного стану тест-об'єктів дослідження

виконано у різні пори року. Для контролю і приготування розчинів з різними концентраціями двохромовокислого калію використано питну воду згідно з ГОСТ 2874-82. Питну воду попередньо дехлоровано шляхом устоювання не менш 7 діб і аеровано за допомогою мікропроцесора до досягнення концентрації розчиненого кисню не менше 6 мг/дм³.

Під час біотестування вміст кисню у воді був не менше 4 мг/дм³, температура води під час біотестування становила (25±1)°C, загибель тест-об'єктів у контролі не перевищувала 10%.

Результати експериментальних досліджень наведено в таблиці.

На підставі отриманих результатів розраховано максимальну концентрацію розчину двохромовокислого калію, за якої не виявлено хронічної токсичності за показниками виживаності і (або) плодючості.

Таблиця

Результати експериментальних досліджень

Номер серії (виконавця), l	Номер досліду у серії, ln	Концентрація двохромовокислого калію, мг/дм ³			
		X_{ln}	\bar{X}	S_l	f_l
1	1	0,6	0,45	0,105	5
	2	0,5			
	3	0,5			
	4	0,4			
	5	0,3			
	6	0,4			
2	1	0,3	0,38	0,075	5
	2	0,4			
	3	0,3			
	4	0,4			
	5	0,4			
	6	0,5			
3	1	0,4	0,33	0,137	5
	2	0,1			
	3	0,3			
	4	0,3			
	5	0,5			
	6	0,4			

Для цього визначено значення середнього результату (\bar{X}_l) за формулою (1), відповідне середнє квадратичне відхилення (СКВ) S_l за формулою (2) та число ступенів свободи за формулою (3):

$$\bar{X}_l = \frac{\sum_{n=1}^{N_l} X_{ln}}{N_l} \quad (1)$$

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

$$f_l = N_l - 1 \quad (3)$$

де l – номер виконавця (серії), $l = 1, \dots, L$ ($L \geq 2$);

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

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

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

Отримані значення перевірено на наявність надмірної похибки за β -критерієм за формулою (4):

$$\beta = \frac{|X_{ln} - \bar{X}_l|}{S_l} \quad (4)$$

Як видно із таблиці, у серії 1 найбільш підозрілим є результат № 5 (0,3); у серії 2 – результати №№1 та 3 (0,3) та у серії 3 результат №2 (0,1), бо саме ці результати найбільше відрізняються від середнього значення. Для перевірки їх на наявність надмірної похибки визначено відношення (4). Розраховані значення $\beta = 1.36, 1.14, 1.64$, відповідно, є меншими, ніж табличне $\beta_{табл.}$ для ступенів свободи $f_l = 5$ ($\beta_{табл.(5)} = 1.82$), – з чого витікає відсутність надмірної похибки для всіх серій.

Для встановлення збіжності результатів отримані значення вибірових СКВ перевірено на відповідність одній генеральній виборці за критерієм Фішера за формулою (5) з урахуванням того, що у нашому випадку $S_{max} = S_1 = 0,137$, а $S_{min} = S_2 = 0,075$.

$$F_l = \frac{(S_l)_{max}^2}{(S_l)_{min}^2} \quad (5)$$

Розраховане значення $F_l = 3.33$ – менше, ніж табличне значення F-критерію для $f_{max} = 5$ і $f_{min} = 5$, $F_{табл.(5,5)} = 5,1$. Таким чином, вибірки, що відповідають серіям результатів 1÷3, можна вважати однорідними. Визначене за формулою (6) середньозважене СКВ характеризує збіжність результатів на розчині двохромовоокислого калію, яке становить 29% :

$$\sigma_{зб}(\%) = \frac{S_{зб} * \gamma(f)}{\bar{X}} * 100 \quad (6)$$

Де: $\gamma(f)$ – коефіцієнт, що враховує змішаність оцінки СКВ;

$$S_{зб} = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L f_l S_l^2}{\sum_{l=1}^L f_l}} ;$$

$$\bar{X} = \frac{\sum_{l=1}^L f_l \bar{X}_l}{\sum_{l=1}^L f_l} ;$$

$$f = \sum_{l=1}^L f_l = \sum_{l=1}^L (N_l - 1) = L(N - 1) ;$$

$$\gamma(15) = 1.017$$

Для оцінювання внутрішньо-лабораторної відтворюваності розраховано значення середнього результату $\bar{X} = 0.38$ і відповідного СКВ ($S_{в.л.в} = 0.12$) як:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{l=1}^L \sum_{n=1}^{N_l} X_{ln}}{N} \quad (7)$$

$$S_{в.л.в} = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L \sum_{n=1}^{N_l} (X_{ln} - \bar{X})^2}{\sum_{l=1}^L N_l - 1}} \quad (8)$$

при врахуванні, що $f=17$ і $\gamma(17) = 1.015$

Внутрішньо-лабораторну відтворюваність $\sigma_{в.л.в.}$ розраховано за формулою (9):

$$\sigma_{в.л.в} = S_{в.л.в} * \gamma(f) \quad (9)$$

$$\sigma_{в.л.в}^*(\%) = \frac{S_{в.л.в} * \gamma(f)}{\bar{X}} * 100 \quad (10)$$

Значення відтворюваності на розчині еталонної речовини двохромовоокислого калію перевірено на однорідність та отримано наступні значення: $\sigma_{в.л.в.} = 0.12$ та $\sigma_{в.л.в.}^* = 32\%$.

Похибку результату визначення токсичності обчислено як:

$$\Delta = 1,96 * \sigma_{в.л.в.} = 0,23 \text{ мг/дм}^3 ;$$

$$\delta(\%) = 1,96 * \sigma_{в.л.в.}(\%) = 63\% .$$

Таким чином, збіжність та відтворюваність результатів визначення токсичності розчину еталонної речовини двохромовоокислого калію ($K_2Cr_2O_7$) становлять 0,11 мг/дм³ (29%) та 0,12 мг/дм³ (32%), відповідно; похибка результату визначення токсичності розчину еталонної речовини двохромовоокислого калію ($K_2Cr_2O_7$) становить 0,23 мг/дм³ (63%).

На підставі отриманих результатів встановлено норматив оперативного контролю відтворюваності результатів визначення хронічної токсичності води на ракоподібних *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg, який розраховано як:

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

Таким чином, норматив оперативного контролю відтворюваності результатів ви-

значення токсичності розчину еталонної речовини двохромовокислого калію ($K_2Cr_2O_7$) становить 0,33 мг/дм³.

Для встановлення діапазону реагування культури ракоподібних *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg, яка використовується як тест-об'єкт для визначення хронічної токсичності води, використано наступний критерій токсичності: загибель 50% тест-об'єктів у досліді порівняно з контролем за 24 год. біотестування.

У різні пори року різними виконавцями за умов однієї лабораторії виконано 16 незалежних дослідів. Як еталонну речовину використано двохромовокислий калій. Біотестування проведено у відповідності до методики. Визначено концентрацію двохромовокислого калію, яка викликає загибель 50% тест-об'єктів за 24 год. експерименту (ЛК₅₀₋₂₄).

За результатами експериментів отримано такі значення ЛК₅₀₋₂₄: 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/дм³ $K_2Cr_2O_7$.

Середню арифметичну ЛК₅₀₋₂₄ розраховано за формулою (1), яка становить 2.1 мг/дм³, а середнє квадратичне відхилення за формулою (2) становить 0.6 :

Далі перевірено отримані результати експериментів за β -критерієм на наявність надмірних похибок. Із наведених вище концентрацій $K_2Cr_2O_7$ найбільш підозрілим є результат 0,95 мг/дм³. Для нього обчислювали відношення:

$$\beta = \frac{X_{In} - \bar{X}}{S_1}$$

де S_1 – середнє квадратичне відхилення.

Значення β дорівнює 1.92. За табличними даними значення β -критерію для $f=15$, β табл. = 2,44, що більше, ніж отримане значення, що свідчить про відсутність у виборці результатів з надмірними похибками.

За табличними даними значення γ (f) для $f = 15$, яке становить 1,017.

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

Діапазон реагування культури ракоподібних *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg розраховано як:

$$X - 1,96 * \sigma < X_k < X + 1,96 * \sigma,$$

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 тест-об'єктів церіодафній становить:

$$0,9 < ЛК_{50-24} < 3,3.$$

Висновки

Для встановлення метрологічних характеристик методики визначення хронічної токсичності води на ракоподібних *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg було використано двохромовокислий калій ($K_2Cr_2O_7$). Експериментальні дослідження проводили за спеціальним алгоритмом і програмою.

На підставі експериментальних досліджень встановлені наступні метрологічні характеристики: похибка результатів ви-

значення токсичності становить 0,23 мг/дм³ (63%); збіжність та відтворюваність результатів визначення токсичності становлять 0,11 мг/дм³ (29%) та 0,12 мг/дм³ (32%) відповідно; норматив оперативного контролю відтворюваності результатів визначення токсичності становить 0,33 мг/дм³; діапазон реагування тест-об'єкта становить 0,9-3,3 мг/дм³.

ЛІТЕРАТУРА

1. КНД 211.1.2.008 -94. Метрологічне забезпечення. Гідросфера. Правила контролю складу і властивостей стічних та технологічних вод. Затв. наказом Мінекобезпеки України від 28.12.1994. №124. – 13с.
2. 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. №83. – 31с.
3. Bellas J. A standardisation of ciona intestinalis (Chordata, Ascidiacea) embryo-larval bioassay for ecotoxicological studies. / J. Bellas, R. Beiras, E.

Vazquez.// Water Research, 37 (19). Elsevier Science Publishing Company, Inc. – 2003. – P. 4613-4622.

4. Pica-Granados Y. Bioassay standardization for water quality monitoring in Mexico. / Y. Pica-Granados, G. D. Trujillo, H. S. Hernández.// Environmental Toxicology, Vol. 15, Issue 4, John Wiley & Sons, Inc.- 2000. – P. 322–330.

5. КНД 211.1.0.051-96. Атестація методик біотестування. Затв. наказом Мінекобезпеки України від 22.01.97 р. №9. – 33 с.

6. КНД 211.1.4.056-97. Методика визначення хронічної токсичності води на ракоподібних *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg. Затв. наказом Мінприроди України від 21.05.97 № 68. – 25 с.

Надійшла до редколегії 13.04.2012

