

## ВЛИЯНИЕ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ СИСТЕМ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ НА ДЕГИДРОГЕНАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ИЛА

© 2010 Н.И. Шаталаев

Самарский государственный медицинский университет

Поступила в редакцию 29.09.2010

В работе представлены данные о методике априорного планирования эксперимента в многофакторных биологических системах с выраженными межфакторными взаимодействиями. Выявлены эффекты синергизма, антагонизма и аддитивности среди многих токсикантов органического и неорганического происхождения.

Ключевые слова: *многокомпонентные системы, загрязнители, ил*

Первые работы в области планирования экстремального многофакторного эксперимента принадлежат Боксу и Уилсону. Метод был назван методом крутого восхождения и является одним из многих путей поиска оптимума в многофакторных процессах. В нашей стране планирование многофакторного эксперимента начало развиваться в начале шестидесятых годов благодаря трудам В.В. Налимова [1]. В дальнейшем это направление было использовано в химии, биологии, микробиологии, металлургии, экономике и других сферах науки. Сложность планирования эксперимента в биологии заключается в наличии некоторых особенностей биологических процессов. Прежде всего, наличие большого количества факторов, значительная ошибка воспроизводимости эксперимента, существование временного дрейфа в биологических системах и, наконец, наличие межфакторных взаимодействий. Теоретически математические методы планирования эксперимента рассчитаны на одновременное изучение любого количества факторов. Однако при планировании эксперимента в многофакторных биологических системах с выраженными межфакторными взаимодействиями неизбежно возникает ряд сложностей, связанных с трудоёмкостью планирования [2]. Значительная ошибка воспроизводимости опыта в биологических исследованиях связана с наличием неучтенных факторов и особенностью внутреннего механизма регуляции биологической системы. По этой причине реакция системы на изменение факторов не всегда будет адекватной. Кроме того, многие биологические системы

в той или иной мере подвержены временному дрейфу, поэтому величина их отклика может быть различной, даже при строгом поддержании постоянных условий эксперимента [3]. Из этого следует, что при реализации выбранного плана необходимо всю серию опытов ставить одновременно.

Самой существенной особенностью гидроэкосистем является наличие многоуровневых межфакторных взаимодействий. При комбинированном токсическом действии нескольких веществ с одинаковыми показателями токсичности для гидроэкосистемы сумма отношений концентраций каждого вещества к его предельно допустимой концентрации не должна превышать единицы. Однако эта закономерность не соблюдается при совместном действии веществ с выраженным токсическим влиянием на гидроэкосистемы. Кроме того, при этом не учитываются эффекты синергизма, антагонизма и аддитивности. На наш взгляд, эти проблемы успешно могут быть решены методом Бокса-Уилсона.

Технология очистки сточных вод в аэротенках в основном соответствует требованиям, которые предъявляет математическое планирование многофакторного эксперимента. Это относится к выбору параметра оптимизации и структурных факторов системы. В качестве параметра оптимизации была использована дегидрогеназная активность ила. Кроме того, в этом случае имеется реальная возможность измерять активность дегидрогеназ в любой комбинации выбранных уровней факторов. Наконец, параметр оптимизации выражается одним числом.

Роли факторов, влияющих на параметр оптимизации, выполняют соединения, содержащиеся в загрязненных водах органических производств. Они управляемы, так как заданную концентрацию того или иного фактора можно поддерживать на постоянном уровне в течение всего эксперимента и варьировать в любых пределах и на любых уровнях. Точность измерения фактора максимальная, факторы однозначны, совместимы и независимы. За оптимум было принято снижение активности дегидрогеназы ила на 20% в сравнении с контролем.

**Цель работы:** определение тех уровней факторов (концентраций загрязнителей), при которых параметр оптимизации (дегидрогеназная активность ила) принимает оптимальное значение (снижается на 20% от исходной активности).

**Материалы и методы исследования.** В 4 центрифужные пробирки вносили по 5 мл тщательно перемешанной иловой суспензии, 1 мл фосфатного буферного раствора и по 0,1 мл 1%-ного раствора ТТХ. Первую пробирку оставляли в качестве контроля, во вторую и третью добавляли по 1 мл растворов компонентов загрязнителей определенной концентрации. В четвертую пробирку приливали по 1 мл растворов определяемых компонентов. Содержимое пробирок тщательно перемешивали, инкубацию проводили в термостате при температуре

37°C в течение 30 минут. По истечении 30 минут пробы центрифугировали, надосадочную жидкость сливали, а к осадку приливали по 5 мл этанола. Затем энергичным перемешиванием проводили экстракцию формазана, после чего пробы центрифугировали 3 мин. при 3000-4000 об/мин. Окрашенные спиртовые растворы колометрировали на ФЭКе с зеленым светофильтром № 5 (490 нм) в кювете толщиной слоя 1,00 см. О степени и характере комбинированного токсического действия 2 компонентов судили по величине изменения дегидрогеназной активности ила в сравнении с контрольной пробой и пробами, содержащими отдельные компоненты загрязнителей.

Для определения комбинированного токсического воздействия нескольких компонентов загрязнителей на дегидрогеназы микросообществ модельных гидроэкосистем использовали аналогичный метод. Смеси компонентов определенных концентраций составляли после разработки матрицы планирования эксперимента. В пробирки добавляли составленные смеси, 2 пробирки служили в качестве контроля. О степени и характере комбинированного токсического действия многокомпонентных смесей судили по величине изменения дегидрогеназной активности ила в сравнении с контролем и по результатам компьютерной обработки экспериментального материала.

**Таблица 1.** Матрица планирования пятифакторного эксперимента

Осн.уров.	25,0	25,0	25,0	10,0	1,0	(мг/г ила)													
	Интерв.вар.	5,0	5,0	5,0	2,0		0,2												
Верх.уров.	30,0	30,0	30,0	12,0	1,2														
Нижн.уров.	20,0	20,0	20,0	8,0	0,8														
№ опыта	Кодовые значения переменных															Значения Y			
	X <sub>0</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> = X <sub>3</sub> X <sub>5</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> = X <sub>2</sub> X <sub>5</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>5</sub> = X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>4</sub> X <sub>5</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>4</sub> = X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> = X <sub>2</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub>	X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> = X <sub>1</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub>	Y <sub>ср.</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>
1	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	78,5	77,3	79,7
2	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	82,0	83,6	80,5
3	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	70,7	71,1	70,3
4	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	74,2	77,0	71,4
5	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	75,8	77,8	73,8
6	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	76,3	76,3	76,3
7	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	73,0	71,4	74,7
8	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	70,2	69,7	70,5
9	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	71,6	68,0	75,2
10	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	69,6	66,4	72,8
11	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	66,8	67,2	66,4
12	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	69,5	71,7	67,4
13	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	76,4	74,6	78,3
14	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	71,4	73,9	68,8
15	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	69,8	68,2	71,4
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	67,2	65,6	68,8
<b>b<sub>i</sub></b>	72,687	-0,137	-2,512*	-0,174	-2,399*	-0,350	0,237	-1,100*	-0,724	0,050	0,549	1,087*	0,062	0,650	0,062	0,787			

Примечание: \* - значимые коэффициенты уравнения регрессии

**Результаты и их обсуждение.** Предварительно было проведено планирование опытов по выяснению интегрального токсического влияния, оказываемого на дегидрогеназную активность элементами сточных вод производств синтетических моющих средств (СМС) «Прогресс», синтетических жирных кислот и дибутилпаракрезола. Отдельные загрязнители были закодированы и приняли следующие значения:  $X_1$  – фенол,  $X_2$  – паракрезол,  $X_3$  – СМС «Прогресс»,  $X_4$  – хинолин,  $X_5$  – цинка сульфат. Матрица планирования опытов составлена по методу, описанному Адлером, и представлена в таблице 1. Интервалы варьирования соответствуют средней точности фиксирования уровня факторов и составляют 20% от основного уровня.

Для полного пятифакторного эксперимента при варьировании факторов на двух уровнях необходимо провести  $2^5$  опытов. Однако для получения достаточно полной информации о системе без утраты её оптимальных качеств можно ограничиться  $2^{5-1}$  опытами. При этом пятому фактору был присвоен вектор-столбец матрицы, принадлежащий взаимодействию  $X_1X_2X_3$ , которым на основании априорной информации можно пренебречь. Таким образом, была получена полуреплика полного пятифакторного эксперимента  $2^5$  с числом опытов 16. Разрешающая способность полуреплики, заданная генерирующим соотношением  $X_5 = X_1X_2X_3$  достаточно высока. После составления матрицы планирования были определены значения параметра оптимизации, в таблице они обозначены символом  $Y$  (табл. 1). Критерий Кохрена  $G=0,209$ . Табличное значение критерия для 16 опытов и одной степени свободы равно 0,471. Гипотеза об однородности дисперсий не отвергается. Дисперсия воспроизводимости  $S^2_y=3,860$ . По экспериментальным данным было составлено следующее уравнение регрессии:

$$Y = 72,687 - 0,137 X_1 - 2,512 X_2 - 0,174 X_3 - 0,240 X_4 - 0,350 X_5 + 0,237 X_1X_2 - 1,100 X_1X_3 - 0,724 X_1X_4 + 0,050 X_1X_5 + 0,549 X_2X_4 + 1,087 X_3X_4 + 0,062 X_4X_5 + 0,650 X_1X_2X_4 + 0,062 X_1X_3X_4 - 0,787 X_2X_3X_4.$$

На основании расчета остаточной суммы квадратов, значения дисперсии адекватности и критерия Фишера соответственно равны:  $S^2_y=6,928$  и  $F=1,794$ . Табличное значение критерия Фишера равно 2,4. Линейная модель адекватна.

Для установления значимости коэффициентов регрессии был вычислен доверительный интервал по формуле:

$$\Delta b_i = \pm \sqrt{S^2 b_i}; \quad (1)$$

где  $t$  – критерий Стьюдента. В данном случае  $t_{(0,05)}=2,12$ ;  $S^2 b_i$  – дисперсия коэффициента регрессии;  $\Delta b_i = \pm 1,041$ .

Серия экспериментов по определению значения параметра оптимизации показала, что в стационарную область (т.е. область, близкую к оптимуму), мы вышли во второй серии. При уровнях факторов, заданных в этой серии экспериментов, значение параметра оптимизации приняло величину 82,0% (снижение на 18%). В исследуемой области уровней факторов значимыми оказались коэффициенты регрессии:  $b_2, b_4, b_1b_3, b_2b_5$  и  $b_3b_4$ . Таким образом, в данной области определения наибольшим влиянием на параметр оптимизации обладают паракрезол и хинолин. Кроме того, коэффициенты регрессии указывают также на значимость таких парных взаимодействий, как: фенол + СМС «Прогресс»; паракрезол + цинка сульфат и СМС «Прогресс» + хинолин. Полученные данные подтверждают наличие межкомпонентных взаимодействий, приводящих к различным эффектам.

Тройные взаимодействия во всех экспериментах оказались незначимыми, то есть эффекты тройных взаимодействий на данных уровнях варьирования факторов не влияют на величину параметра оптимизации.

Далее провели априорное планирование экспериментов для выявления токсического воздействия, оказываемого на дегидрогеназную активность ила десятью наиболее характерными загрязнителями промышленных вод нефтехимических производств. Исследуемые компоненты были закодированы следующими символами:  $X_1$  – фенол,  $X_2$  – паракрезол,  $X_3$  – гидрохинон,  $X_4$  – парахлорфенол,  $X_5$  – СМС «Прогресс»,  $X_6$  – хинолин,  $X_7$  – пиридин,  $X_8$  – цинка сульфат,  $X_9$  – никеля сульфат и  $X_{10}$  – калия бихромат. Матрицу планирования составили как было указано выше. Интервалы варьирования соответствуют, как и в пятифакторном эксперименте, средней точности фиксирования уровня факторов, то есть 20% от основного уровня. Для реализации полного десятифакторного эксперимента при варьировании факторов на двух уровнях требуется провести  $2^{10}$  опытов. Однако, нами было принято решение провести  $2^{10-6}$  опытов. Это сделано на том основании, что пятому фактору был присвоен вектор-столбец матрицы, принадлежащий взаимодействию  $X_1X_2$ , шестому –  $X_2X_3$ , седьмому –  $X_1X_3$ , восьмому –  $X_2X_4$ , девятому –  $X_1X_2X_3$ , десятому –  $X_1X_2X_4$ , а взаимодействием этих факторов можно пренебречь по априорной информации. После составления матрицы планирования было проведено 16 серий экспериментов по определению значений параметра оптимизации, который на табл. 2 представлен, как  $Y$ .

**Таблица 2.** Матрица планирования десятифакторного эксперимента

Осн. уров.	12,5	5,0	5,0	2,5	12,5	12,5	150,0	2,5	1,25	1,25	мг/г ила								
Интерв. вар.	2,5	1,0	1,0	0,5	2,5	2,5	30,0	0,5	0,25	0,25									
Верх. уров.	15,0	6,0	6,0	3,0	15,0	15,0	180,0	3,0	1,50	1,50									
Нижн. уров.	10,0	4,0	4,0	2,0	10,0	10,0	120,0	2,0	1,00	1,00									
№ опыта	Кодовые значения переменных																Значения Y		
	X <sub>0</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>4</sub> X <sub>6</sub>	X <sub>3</sub> X <sub>10</sub>	X <sub>4</sub> X <sub>7</sub>	Y <sub>ср.</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>
1	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	71,5	74,0	69,0
2	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	61,5	61,0	62,0
3	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	83,0	83,0	83,0
4	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	81,0	77,0	85,0
5	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	62,5	63,0	62,0
6	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	66,0	66,0	66,0
7	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	71,0	68,0	74,0
8	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	77,0	84,0	70,0
9	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	63,0	65,0	61,0
10	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	64,5	61,0	68,0
11	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	67,5	68,0	67,0
12	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	58,0	60,0	56,0
13	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	71,0	68,0	74,0
14	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	62,5	63,0	62,0
15	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	63,5	63,0	64,0
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	61,0	64,0	58,0
<b>b<sub>i</sub></b>	67,781	-1,343	2,468*	0,968	-3,906*	0,343	-1,156	1,156	-3,843*	0,718	-0,968	-1,031	1,593*	0,281	1,406	-1,531*			

Примечание: \* - значимые коэффициенты уравнения регрессии

Обработка экспериментальных данных и расчет коэффициентов регрессии, как и в предыдущем случае – компьютерная. Критерий Кохрена  $G=0,409$ . Табличное значение критерия для 16 опытов и одной степени свободы равно 0,471. Гипотеза об однородности дисперсий не отвергается. Дисперсия воспроизводимости  $S^2_y=7,484$ . Экспериментальные данные позволили составить следующее уравнение регрессии:

$$Y = 67,781 - 1,341 X_1 + 2,468 X_2 - 0,968 X_3 - 3,906 X_4 + 0,343 X_5 - 1,156 X_6 + 1,156 X_7 - 3,843 X_8 + 0,718 X_9 - 0,968 X_{10} - 1,031 X_1 X_4 + 1,593 X_3 X_4 + 0,281 X_4 X_6 + 1,406 X_3 X_{10} - 1,531 X_4 X_7.$$

На основании расчета остаточной суммы квадратов, значения дисперсии адекватности и критерия Фишера соответственно равны:  $S^2_y=12,807$  и  $F=1,711$ . Табличное значение критерия Фишера равно 2,9. Линейная модель адекватна. Установление значимости коэффициентов регрессии проводили после вычисления доверительного интервала (формула 1). Значение  $\Delta b_i=1,449$ .

Эксперименты по определению значений параметра оптимизации показали, что в область, близкую к оптимуму мы вышли в четвертой серии. При уровнях факторов, заданных в этой серии экспериментов, параметр оптимизации принял значение 81% (снижение на 19%). В исследуемой области уровней факторов значимыми оказались коэффициенты

регрессии:  $b_2, b_4, b_8, b_3 b_4, b_4 b_7, b_1 b_5, b_3 b_6, b_4 b_8, b_7 b_9, b_2 b_8, b_5 b_{10}, b_2 b_4, b_1 b_{10}, b_6 b_8, b_9 b_{10}, b_6 b_{10}$  и  $b_8 b_9$ . Таким образом, в исследуемой области концентраций наибольшее влияние на параметр оптимизации оказывают парахлорзол, парахлорфенол и цинка сульфат. Значения коэффициентов уравнения регрессии свидетельствуют о наличии парных взаимодействий, оказывающих влияние на величину параметра оптимизации. Сюда относятся следующие пары факторов: гидрохинон + парахлорфенол; парахлорфенол + пиридин; фенол + СМС «Прогресс»; гидрохинон + хинолин; парахлорфенол + цинка сульфат; пиридин + никеля сульфат; парахлорзол + цинка сульфат; СМС «Прогресс» + калия бихромат; парахлорзол + парахлорфенол; фенол + калия бихромат; хинолин + цинка сульфат; никеля сульфат + калия бихромат. Тройные взаимодействия, как и в пятифакторном эксперименте, оказались незначимыми и не оказывающими влияния на величину параметра оптимизации.

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что при наличии достаточной информации о факторах (компонентах загрязнителей) метод априорного планирования многофакторного эксперимента позволяет установить допустимые концентрации загрязнителей при приеме сточных вод на биологическую очистку. Он же дает возможность охарактеризовать степень влияния каждого из факторов на величину интегрального параметра оптимизации в любых пределах и на любых уровнях.

Исследования многокомпонентных систем загрязнителей промышленных вод с помощью метода априорного планирования эксперимента свидетельствуют о наличии в них существенных межфакторных взаимосвязей. Информация о последних необходима для разработки требований к приему на биологическую очистку производственных промышленных вод. Результаты приведенных исследований обосновывают возможность и целесообразность планирования многофакторного эксперимента в водной токсикологии и практике очистки промышленных вод.

**Вывод:** при наличии достаточной информации о компонентах-загрязнителях про-

мышленных вод метод априорного планирования функционирования многофакторной системы позволяет определить не только концентрации факторов при приеме сточных вод на очистные сооружения, но и выявить существенные межфакторные взаимодействия в изучаемой системе.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Налимов, В.В.* Теория эксперимента. – М.: Наука, 1971. 120 с.
2. *Максимов, В.Н.* Многофакторный эксперимент в биологии. – М.: МГУ, 1980. 279 с.
3. Математическое моделирование и планирование эксперимента. УНИХИМ. Под ред. *Г.Н. Богатова, Д.И. Мильмана* и др. – Л.: Химия, 1971. 192 с.

## INFLUENCE OF MULTICOMPONENT POLLUTANT SYSTEMS ON DEHYDROGENASE ACTIVITY OF THE SLUDGE

© 2010 N.I. Shatalaev

Samara State Medical University

In work data about a technique of aprioristic planning experiment in multifactorial biological systems with the expressed interfactorial interactions are presented. Effects of synergy, antagonism and additivity among many pollutants of organic and inorganic parentage are taped.

Keywords: *multicomponent systems, pollutants, sludge*