

Стельмашук В., Антонюк Т. А.

## БІОТЕСТУВАННЯ ВОДНИХ РОЗЧИНІВ ЦІАНІСТОГО НАТРІЮ І ЦІАНІСТОГО КАЛІЮ НА ТЕСТОВОМУ МАТЕРІАЛІ *SPIROSTOMUM AMBIGUUM*

Розглянуто можливість біотестування водних розчинів ціанідів натрію і калію на тестовому матеріалі *Spirostomum ambiguum*.

### Вступ

Фізико-хімічне визначення кількісного складу зараження поверхневих вод не дає повної інформації про їх токсичність, тому що їх сумарний токсичний вплив може виявитися іншим, ніж окремих компонентів. Дослідження токсичності хімічних сполук шляхом дослідів на тваринних об'єктах розширює діапазон знань про властивості речовин і дає можливість знайти співвідношення між токсичною дією на людей і тварин. Як об'єкти тестування використовувались різні види хребетних (*Vertebrata*) (земноводні (*Amphibia*), риби і безхребетні (*Invertebrata*) (коловертки (*Rotatoria*), війкові хробаки (*Turbellaria*), нематоди/нитчасті хробаки (*Nematodes*), червоногі/гастроподи (*Gastropoda*), зябродишні (*Bronchiata*), ракоподібні (*Crustacea*), водяні комахи, водяний ослик (*Asellus*), джгутики, амеби та ін.) [1, 2, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 29]. Хібнер одним із перших визначив реакційну здатність найпростіших *Spirostomum ambiguum* в аспекті можливості застосування їх як тестового об'єкта в дослідженнях забруднення природного середовища токсичними сполуками [1, 2].

Перші дослідження з біотестування диверсійних отрут із застосуванням *Spirostomum ambiguum* почав В. Стельмашук [21, 25].

Для експериментального біотестування були відібрані потенційні диверсійні отрути – ціаністий натрій і ціаністий калій, що можуть бути введені в міський водопровід, резервуари очищеної води, водозабори тощо [26, 28, 30].

### Біотестовий аналіз

Біотест водних розчинів NaCN і KCN проводили для повного діапазону концентрацій, тобто від концентрацій, що не викликають загибелі найпростіших *Spirostomum ambiguum*, до кон-

центрацій, які викликають смерть 100 % об'єктів тестування. Часові виміри біотесту проводили через 15 і 30 хвилин, а також через 1, 2, 4, 12, 24, 48, 72 і 96 годин з моменту введення NaCN і KCN у водне середовище *Spirostomum ambiguum* [21, 25, 29].

Для графічного опису біотесту застосовували інтерполяційні кубічні сплайни, апроксимаційні В-сплайни і криві Без'єра. Названі функції використовувалися для позначення  $LC_{50}$  за графіком % смертності ( $S$ ) у функції концентрації ( $C$ ) водного розчину токсичної сполуки ( $\% S = f(C)$ ). Триразове повторення кожної серії вимірів дало можливість статистичної обробки тесту разом із визначенням стандартного відхилення й довірчих інтервалів [25].

Криві залежності *доза-ефект* відображають зв'язок між дозою й величиною градуйованого ефекту в окремих об'єктів або в популяції. Такі криві можуть мати різні форми, у межах розмаху даних доз вони іноді можуть бути лінійними. Фінней [4, 17] продемонстрував різні способи їх перетворення, що можуть бути використані для побудови лінійних кривих *доза-ефект*.

Графіки біотесту — криві *доза-ефект* показують зв'язок між дозою та пропорцією індивідуумів, у яких проявляється ефект. Як правило, криві *доза-ефект* мають S-подібну, зростаючу форму й верхню та нижню асимптоти, але не завжди 0 % і 100 % [17, 30]. Однією з можливих інтерпретацій форми кривих *доза-ефект* може слугувати теза, що кожен індивідуум у популяції має властиву лише йому стійкість, і тому необхідна визначена доза для розвитку ефекту. У принципі існує низька доза, на яку не відповідає жоден організм, і висока доза, на яку реагують усі без винятку.

Правильний опис залежності *доза-ефект* повинен базуватися на великій кількості експериментальних даних, з урахуванням розмаху доз,

що викликають реакцію, від мінімальної до максимальної, а також враховувати статистичний аналіз біотесту [4]. Форма кривої *доза-ефект* для певної речовини й виду тварин може змінюватися разом із умовами експерименту [17].

### Експериментальна частина

У дослідженнях застосовували неорганічні сполуки ціаністий натрій і ціаністий калій. Фізико-хімічні властивості NaCN і KCN та їхню токсичність описують С. Франке [5, 6] і В. Стельмашук [22, 23, 24] та ін. [20].

Концентрації ціанідів визначали калометрично на фотоспектрометрі в скляних кюветах товщиною 0,999 см. Кількісне визначення ціаністого натрію і ціаністого калію проводили з використанням бензидину та барбітурової кислоти. Екстинцію розчину ціанідів вимірювали після 5 хвилин від моменту додавання барбітурового реагенту при довжині хвилі 585 нм [5, 6, 20].

### Тестований матеріал *Spirostomum ambiguum*

Для розробки швидкої і повторюваної ідентифікації ціаністого натрію і ціаністого калію у водних розчинах слугували найпростіші *Spirostomum ambiguum*, які належать до типу *Ciliata*.

*Spirostomum ambiguum* є одною з великих за розмірами форм найпростіших. Їхнє тіло має форму тупо закінченого циліндра. Довжина *Spirostomum ambiguum* (буквально спірохета) становить 1–3 мм. Уся поверхня клітини рівномірно покрита короткими й густими війками. Клітина найпростіших містить численні ядерні апарати (макро- і мікронуклеуси) у формі ланцюгового ядра. *Spirostomum ambiguum* – це гетеротрофний організм, що харчується в природному середовищі бактеріями й малими джгутиковими. Живуть у мезотрофічних мулах і стічних водах/нечистотах. Вони також є характерними мешканцями водойм, наповнених листям, яке розкладається. Ці найпростіші також присутні в активних опадах.

Застосовувані в дослідженнях *Spirostomum ambiguum* розводилися у власній лабораторії.

### Лабораторне розведення (культивування) *Spirostomum ambiguum*

Найпростіші *Spirostomum ambiguum* розводилися в колбах Ерленмеєра (Erlenmeyera) об'ємом 250 см<sup>3</sup>, закупорених ватними пробками. У кол-

би вводили поживне середовище, приготоване способом, що описаний нижче, у кількості близько 90–100 см<sup>3</sup>. Потім у колби з поживним середовищем вводили декілька крапель відібраних із наявних культур найпростіших. При зміні поживного середовища зливали його верхній шар, об'ємом близько 70–80 см<sup>3</sup>, потім поповнювали свіжим поживним середовищем до близько 100 см<sup>3</sup>, додаючи 2–3 вівсяних пластівці. Через 14 днів після введення поживного середовища найпростіші осідали на дно колби, після чого знову вводили нове поживне середовище.

### Виготовлення поживного середовища

*Розчин 1.* Заготовлені 5,0 г сіна перекип'ятили в 0,5 дм<sup>3</sup> дистильованої води. Після охолодження колбу разом із поживним середовищем залишили на 5 годин, потім проводили фільтрацію відвару, фільтрат поповнювали до 1,0 дм<sup>3</sup>, додаючи дистильовану воду.

*Розчин 2.* Промите в дистильованій воді листя зеленого салату сушили на сонці, потім у сушарці при температурі 60 °С протягом одного дня. Відміряли 1,5 г порошкоподібного роздрібненого салату й кип'ятили в 1,0 дм<sup>3</sup> дистильованої води (варили на повільному вогні близько 10 хв). Після охолодження відвар профільтрували.

Після сполучення розчину 1 і 2 одержували поживне середовище, яке в разі потреби швидкого застосування не вимагало стерилізації.

У зв'язку з поступовим процесом старіння культури (згущення найпростіших на дні колби, зайве виділення продуктів обміну речовин) необхідно було розвивати нові культури найпростіших. Для цього брали 1–3 краплі розчину з найпростішими зі старої культури й переносили їх у колби з новим поживним середовищем.

### Приготування скла для розведення культури і біотестування

Колби Ерленмеєра, у яких вирощували *Spirostomum ambiguum*, ретельно мили в теплій воді з додаванням детергенту, використовуючи м'які щітки. Помиті колби ретельно полоскали під проточною водою для повного видалення детергенту. Потім скло полоскали в дистильованій воді, після цього колби мили повторно з додаванням лимонної кислоти, кілька разів полоскали в дистильованій воді й сушили при температурі 160 °С протягом години.

Інший посуд для біотестування мили таким самим способом.

### Лабораторне скло й устаткування, необхідне для проведення біотестування

Для проведення біотестового аналізу із застосуванням *Spirostomum ambiguum* як матеріал тестування необхідне таке лабораторне устаткування: 1) мірні колби об'ємом 200 см<sup>3</sup> і 250 см<sup>3</sup>; 2) піпетки Пастера з гумовими струминними насосами; 3) піпетки об'ємом 5 см<sup>3</sup>, 25 см<sup>3</sup>, 50 см<sup>3</sup>, 100 см<sup>3</sup>; 4) скляні циліндри з пробкою об'ємом 100 см<sup>3</sup> (20 штук); 5) скляні циліндри об'ємом 10 см<sup>3</sup>, 50 см<sup>3</sup>, 100 см<sup>3</sup>, 250 см<sup>3</sup>, 500 см<sup>3</sup>, 1000 см<sup>3</sup>; 6) хімічна склянка об'ємом 1000 см<sup>3</sup>; 7) комплект пластинок для біотестування із заглибинами об'ємом 0,5 см<sup>3</sup>, виготовлених із прозорої штучної пластмаси; 8) годинникові скельця; 9) чашки Петрі; 10) вагові стаканчики; 11) лабораторна сушилка; 12) лабораторні ваги; 13) газовий палик; 14) мікроскоп; 15) годинник; 16) мікропіпетки.

### Хід біотестування

За три-чотири дні до проведення досліду найпростішим не змінювали поживного середовища. *Spirostomum ambiguum* брали піпеткою Пастера з натягнутим гумовим струминним насосом і переносили на годинникове скло. Таким чином приготувані найпростіші якнайшвидше використовували в досліді. По дві особини поміщали в 21 заглибину пластинки (розмірами 250 мм × 25 мм), що зроблені в органічному склі з плексигласу. У кожне заглиблення відмірювали по 0,5 см<sup>3</sup> розчину фторорганічної токсичної речовини з визначеною концентрацією із приготовленого заздалегідь аналітичного ряду розведень. Пластинки з органічного скла поміщали в чашки Петрі, вистелені промокальним папером, щоб уникнути надмірного випаровування токсичної речовини.

Спостерігали за поведінкою тестованих об'єктів під мікроскопом, визначаючи час смерті 42 особин на кожній пластинці. Замір повторювали для кожної концентрації в 7 циклах.

### Підготовка аналітичного ряду розведень

Для приготування аналітичного ряду розведень (при знаменнику геометричної прогресії 2,0) у мірний циліндр об'ємом 100 см<sup>3</sup>, що містить 50 см<sup>3</sup> поживного середовища (сіна), відміряли 50 см<sup>3</sup> вихідного розчину токсичної речовини. Вміст циліндра багаторазово перемішували й відміряли 50 см<sup>3</sup> розчину, вливали в черговий циліндр, що містить також 50 см<sup>3</sup> поживного се-

редовища (сіна). Тим самим способом робили чергові розведення фторорганічної токсичної сполуки в аналітичному ряді при знаменнику 2,0.

У випадку ряду розведень при іншому знаменнику геометричної прогресії спосіб приготування був таким самим, змінювалися тільки співвідношення поживного середовища (сіна) й досліджуваного токсичного вихідного розведення. На 10,0 см<sup>3</sup> токсичного вихідного розчину при знаменнику геометричної прогресії 1,3 брали 3,0 см<sup>3</sup> поживного середовища, при знаменнику прогресії 1,1 – 1,0 см<sup>3</sup> поживного середовища, при знаменнику 1,05 – 0,5 см<sup>3</sup> поживного середовища.

### Результати біотестування

Після розміщення найпростіших *Spirostomum ambiguum* у дослідному середовищі спостерігали за поведінкою цих організмів. Спостереження проводили із застосуванням мікроскопа через 15 хв, 30 хв, 1, 2, 3, 4, 12, 24, 48, 72 і 96 годин від моменту їх введення в досліджувані токсичні розчини. Результати досліджень наведено в таблицях.

Тестовою реакцією, що відзначено в таблицях, була смерть тестованих організмів. За момент смерті прийняте абсолютне припинення руху найпростіших і розлиття вакуоль назовні клітини.

### Розрахунок результатів біотестування

Для обчислення концентрацій  $LC_{50}$  застосовували метод Мюнха-Ріда, що рекомендується Польською Нормою (Polska Norma). У таблиці 1 представлено реєстр даних і розрахунків: визначено середню концентрацію  $LC_{50}$ , що викликає смерть 50 % тестованих *Spirostomum ambiguum*, стандартне відхилення  $S$ , а також довірчі інтервали  $\overline{LC}_{50} \pm d$  для  $d = t_L \frac{S}{\sqrt{n}}$ .

Визначено також значення  $LC_{50}$  на основі кубічних сплайнів і В-сплайнів. Статистичні розрахунки ( $LC_{50}$ , стандартні відхилення, інтервали довіри) зроблено для аналітичного ряду розведень 1,3.

### Математична і комп'ютерна обробка експериментальних даних

Для побудови графіків відсотків смертності у функції концентрації водного розчину NaCN і KCN були використані криві, побудовані на базі В-сплайнів, кривих Без'єра й кубічних сплайнів,

а також метод Мюнха-Ріда, рекомендований Польською Нормою (рис. 1, 2) [25, 29].

### Метод Мюнха-Ріда

В основу методу Мюнха-Ріда покладено таке припущення: якщо деяка доза токсичної сполуки викликає ураження всієї групи тестованих об'єктів, то доза, яка більша за неї, також, безсумнівно, вражає 100 % об'єктів. Якщо ж деяку дозу переживуть усі піддослідні тварини, то меншу дозу, без сумніву, переживуть також.

Відмічається число організмів мертвих і живих, визначається концентрація токсичних сполук.

Величина  $LC_{50}$  обчислюється за формулами:

а) Обчислення коефіцієнта відхилення підсумованих відсотків експериментальної смертності від 50 % смертності. Коефіцієнт відхилення ( $k$ ) обчислюється за формулою:

$$k = \frac{50 - P_1}{P_2 - P_1}, \quad (1)$$

де  $P_1$  – підсумований відсоток смертності, найближчий до нижчого за 50 %,  $P_2$  – підсумований відсоток смертності, найближчий до вищого за 50 %.

б) Обчислення токсичної концентрації. Токсична концентрація  $LC_{50}$  обчислюється за формулою:

$$LD_{50} = N \lg (\lg x + \lg i) \quad (2)$$

де  $N \lg$  – антилогарифм,  $x$  – концентрація, що викликає найближчу до нижчої за 50 % смертність,  $k$  – коефіцієнт відхилення, розрахований за (1),  $i$  – знаменник геометричної прогресії, застосовуваний у дослідженнях.

Як результат слід взяти середнє арифметичне результатів кількох чергових значень, що відрізняються між собою не більш ніж на 20 % найвищого результату. У випадку значних розбіжностей аналіз слід повторити.

### Параметричні В-сплайни

Позначаючи концентрацію токсичних сполук  $x_i$ , а смертність тестованих об'єктів  $y_i$ , склали таблицю залежності  $[x_1, y_1; x_2, y_2; \dots; x_n, y_n]$ . Крива апроксимації, зображена в таблиці результатів, визначається за такими формулами, залежними від параметра  $t$ :

$$x(t) = \sum_{i=1}^n x_i N_{i,k}(t) \quad (a)$$

$$y(t) = \sum_{i=1}^n y_i N_{i,k}(t) \quad k = 2, n - 1, t \in (t_p, t_k), (b)$$

де  $(x_i, y_i)$  – дані точки,  $N_{i,k}(t)$  – базова функція В-сплайнів  $k$ -ряду, що відповідає  $i$ -точці.

Базові функції В-сплайнів мають здатність визначати коефіцієнт ваги в сумах (а) і (б) таким чином, що для відповідного значення параметра  $t$  при встановленому  $i$  координати  $x_i$  і  $y_i$  враховуються з найвищим ваговим коефіцієнтом, а  $k - l$  граничних точок, відповідно менші коефіцієнти ваги, і з нульовим ваговим коефіцієнтом решта. Стандартні базові функції В-сплайнів можна визначити рекурентними формулами в такий спосіб:

$$N_{i,k}(t) = \frac{(t - x_i) N_{i,k-1}(t)}{x_{i+k-1} - x_i} + \frac{(x_{i+k} - t) N_{i+1,k-1}(t)}{x_{i+k} - x_{i+1}}$$

### Криві Безієра

Для одержання апроксимації для кривих, які з великою чистотою описують відсоток смертності тестованих об'єктів залежно від концентрації токсичних сполук, використано криві Безієра, що визначаються як сполучення багаточленів Бернштейна

$$x(t) = \sum_{i=1}^n x_i I_{n,i}(t)$$

$$y(t) = \sum_{i=1}^n y_i I_{n,i}(t),$$

де  $x_i, y_i, i = 1, \dots, n$  – координати точок спостереження,  $n$  – число точок,

$$I_{n,i}(t) = \binom{n}{i} t^i (1-t)^{n-i} \quad t \in [0,1] \text{ – параметр.}$$

Багаточлени Бернштейна забезпечують здатність апроксимації, за якою на значення найближчої точки найбільший вплив має задана точка  $x_i, y_i$ , а на більш віддалені – менший.

### Кубічні сплайни

При заданій умові, щоб криві залежності, котрі описують залежності, розташовувалися точно в даних пунктах спостережень, для побудови кривої використовуються кубічні сплайни. Основною ідеєю побудови кубічного сплайну є визначення кубічного багаточлена, що сполучає дві чергові точки спостережень  $(x_i, y_i)$  і  $(x_{i+1}, y_{i+1})$ . Цей багаточлен для заданих  $x_i, x_{i+1}$  повинен прямувати до значень  $y_i, y_{i+1}$ , причому в даній точці  $(x_i, y_i)$  кут падіння кривої, зумовлений багаточленами в лівому й правому інтервалах,

повинен бути однаковий, що забезпечує чистоту кривої.

Для будь-якої точки кривої  $(x, y)$ , координати якої  $x \in (x_i, x_{i+1})$ ,  $i = l, \dots, n-1$ , кубічний сплайн може бути представлено у вигляді

$$S(x) = y_i + b_i(x - x_i) + c_i(x - x_i)^2 + d_i(x - x_i)^3, \\ i = 1, \dots, n-1.$$

Зазначені умови, задані сплайну, дають можливість точно визначити коефіцієнти  $b_i, c_i, d_i$ ,  $i = l, \dots, n-1$ .

### Статистична обробка результатів дослідження

Оцінку точності результатів досліджень проведено із застосуванням стандартного відхилення обчислених концентрацій  $LC_{50}$  і довірчого інтервалу.

Довірчий інтервал концентрації  $LC_{50}$  обчислено на основі формули:

$$S(x) = \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n-1},$$

де  $n$  – число вимірів,  $x_i$  – концентрація, обчислена для аналітичного  $i$ -ряду розведень,  $\bar{x}$  – середнє арифметичне концентрацій  $LC_{50}$ , обчислене для трьох аналітичних рядів після певного часу спостережень.

Довірчий інтервал інформує про ширину інтервалу  $d$  навколо оцінюваного середнього значення  $\bar{x}$ , щоб через обґрунтовану ймовірність  $P$  можна було констатувати, що шукане значення  $E(x)$  знаходиться в цьому інтервалі. Сказане можна представити у вигляді залежності:

$$\bar{x} - d \langle E(x) \rangle \bar{x} + d, \\ \bar{x} - t_L \frac{S}{\sqrt{n}} \langle E(x) \rangle (x + t_L \frac{S}{\sqrt{n}}), \\ t_L = t_{0,05},$$

де  $t$  – критичне значення розподілу випадкової змінної  $t$ -Стюдента,  $L$  – рівень істотності (прийняте  $L = 0,05$ ),  $S$  – стандартне відхилення.

### Аналіз і оцінка біотесту ціаністого натрію у водних розчинах на тестовому матеріалі *Spirostomum ambiguum*

У роботі представлено результати комп'ютерного визначення  $LC_{50}$  для водних розчинів ціаністого натрію на тестованому матеріалі *Spirostomum ambiguum* (табл. 1). На графіках (мал. 1, 2) зображено відсоток смертності най-

простіших *Spirostomum ambiguum* у функції концентрації водного розчину NaCN і KCN. Заміри зробили після 15 і 30 хвилин, а також після 1, 2, 4, 24, 72 і 96 годин з моменту введення досліджуваної речовини у водний розчин середовища *Spirostomum ambiguum*. Зробили по три цикли вимірів для ряду розведень 1, 3. Попередні дослідження проводили для ряду розведень 2. Вимір повторювали 21 раз для даної концентрації в одному циклі.

Довірчі інтервали для NaCN позначили для критичного значення розкладу випадкової змінної  $t$ -Стюдента  $t_\alpha = 4,303$  й рівня значимості  $\alpha = 0,05$ .

Значення  $LC_{50}$  для NaCN обчислили на основі інтерполяційних кубічних сплайнів, апроксимаційні параметричні В-сплайни 3-го ряду, а також криві Безієра. Помістили 2 схеми. Для порівняння наводяться розрахунки  $LC_{50}$  за традиційним методом Мюнха-Ріда (Polska Norma).

У таблиці 1 наводяться значення  $LC_{50}$  водних розчинів NaCN після 15 і 30 хвилин, а також через 1, 2, 4, 24, 96 годин. Визначено середню концентрацію  $LC_{50}$ , що викликає смерть 50 % тестованих об'єктів, стандартне відхилення  $S$ , а також довірчі інтервали  $LC_{50} \pm d$ , для  $d = t_\alpha \frac{S}{\sqrt{n}}$ .

Для ціаністого натрію значення  $LC_{50}$  для визначеного часу, незалежно від методу визначення, дуже близькі. Як і у випадку названих вище сполук, найнижчі стандартні відхилення для короткого часу аналізу отримали у випадку застосування методу Мюнха-Ріда (час біотестування 15, 30 хвилин, а також 1 і 2 години). Після 4 годин експерименту найбільш точні значення  $LC_{50}$  були отримані для функцій кубічного сплайну і В-сплайну, після 24 год – В-сплайни і криві Безієра, а після 96 год – найнижче стандартне для кривих Безієра і В-сплайнів. Значення  $LC_{50}$ , отримане після 15 хвилин, – близько 45 мг/дм<sup>3</sup> зменшується до 9,2 мг/дм<sup>3</sup> у випадку 96-годинного біотестування.

Порівнюючи токсичність досліджуваних ціанідів на *Spirostomum ambiguum* (графіки 1, 2) можна зауважити, що більш токсичною сполукою був ціаністий натрій, небагато менш токсичним – ціанід калію.

### Обговорення результатів досліджень і зібраних матеріалів

У результаті експериментальних досліджень доведено, що *Spirostomum ambiguum* може бути

використаний як тестований об'єкт для визначення  $LC_{50}$  водних розчинів ціаніду натрію і ціаніду калію.

Констатовано, що можливим є наближений кількісний аналіз водних розчинів ціанідів на основі стандартних кривих (відсоток смертності у функції концентрації водного розчину) чи комп'ютерних результатів при використанні функції Безієра, В-сплайнів і кубічних сплайнів. Криві Безієра можуть бути застосовані для обчислення  $LC_{50}$ . Поділ кривої на будь-яку кількість відрізків (комп'ютерні результати) дозволяє з великою точністю визначити відсоток смертності для будь-якої концентрації. Застосований метод оцінки біотестування дозволяє швидше й для більш тривалих проміжків часу точніше, ніж поданий в Польській Нормі метод Мюнха-Ріда, визначити шукані значення. Цей метод містить весь апроксимаційний діапазон концентрацій від мінімальної (0 %) до максимальної (100 %) смерт-

ності. Параметричні В-сплайни також можуть бути використані для опису залежностей *доза-ефект* (реакція). Залежно від розміщення точок потрібно підібрати ряд сплайнів, сплайни ряду  $n - 1$  ( $n$  – кількість точок замірів) будуть наближені до функції Безієра. Інтерполяційні кубічні сплайни дають результати з найбільшою похибкою виміру. Їх застосування має бути особливо обґрунтованим при невеликій кількості вимірвальних точок.

Для *Spirostomum ambiguum* ціаністий натрій є дуже токсичним –  $LC_{50}$  після 1 год тестування перебуває в межах 16,5–20,0 мг/дм<sup>3</sup> залежно від інтерполяційної або апроксимаційної. Після 24 і 96 год  $LC_{50}$  знаходиться в межах 10,1–11,1 і 8,9–9,3 мг/дм<sup>3</sup>.

Отримано схожі результати як для ціаніду калію, так і для ціаніду натрію, однак KCN менш токсичний.

Таблиця. Обчислення  $LC_{50}$  [мг/дм<sup>3</sup>] на тестованому матеріалі *Spirostomum ambiguum* для водних розчинів NaCN

Статистичні обчислення		NaCN Комп'ютерні розрахунки за			
		кубічними сплайнами	В-сплайнами	кривими Безієра	методом Мюнха-Ріда
Цикл $LC_{50}$ через 15 хв	1	40,6	40,7	38,8	43,1
	2	52,9	53,6	54,5	52,1
	3	40,4	40,4	39,3	43,0
$\overline{LC}_{50}$		44,6	44,9	44,2	46,1
$S$		7,1598	7,5359	8,9236	5,2253
$\overline{LC}_{50} - d$		26,8	27,5	22,0	33,1
$\overline{LC}_{50} + d$		62,4	62,3	66,4	59,1
Цикл $LC_{50}$ через 30 хв	1	24,9	24,2	11,6	23,4
	2	35,9	34,7	19,5	18,4
	3	22,7	22,6	23,6	22,8
$\overline{LC}_{50}$		27,8	27,2	18,2	21,5
$S$		7,0720	6,5729	6,0995	2,7301
$\overline{LC}_{50} - d$		10,2	10,9	3,1	14,7
$\overline{LC}_{50} + d$		45,4	43,5	33,4	28,3
Цикл $LC_{50}$ через 1 год	1	20,9	10,7	11,4	20,2
	2	16,2	18,0	19,1	18,4
	3	20,4	20,7	21,7	21,4
$\overline{LC}_{50}$		19,2	16,5	17,4	20,0
$S$		2,5813	5,1733	5,3563	1,5100
$\overline{LC}_{50} - d$		12,8	3,7	4,1	16,3
$\overline{LC}_{50} + d$		25,6	29,4	30,7	23,8

Цикл $LC_{50}$ через 2 год	1	10,1	10,8	11,2	11,4
	2	16,0	16,2	16,7	16,1
	3	16,9	17,0	17,6	16,9
$\overline{LC}_{50}$		14,3	14,7	15,2	14,8
$S$		3,6592	3,3724	3,4646	2,9715
$\overline{LC}_{50} - d$		5,2	6,3	6,6	7,4
$\overline{LC}_{50} + d$		23,4	23,1	23,8	22,2
Цикл $LC_{50}$ через 4 год	1	10,0	10,8	11,0	10,8
	2	10,2	11,0	11,4	11,7
	3	9,9	10,7	11,0	11,0
$\overline{LC}_{50}$		10,0	10,8	11,1	11,2
$S$		0,1528	0,1528	0,2309	0,4726
$\overline{LC}_{50} - d$		9,6	10,4	10,5	10,0
$\overline{LC}_{50} + d$		10,4	11,2	11,7	12,4
Цикл $LC_{50}$ через 24 год	1	10,0	10,8	11,0	10,8
	2	10,4	11,0	11,3	11,3
	3	9,9	10,7	11,0	10,8
$\overline{LC}_{50}$		10,1	10,8	11,1	11,0
$S$		0,2646	0,1528	0,1732	0,2887
$\overline{LC}_{50} - d$		9,4	10,4	10,7	10,3
$\overline{LC}_{50} + d$		10,8	11,2	11,5	11,7
Цикл $LC_{50}$ через 96 год	1	8,8	9,0	9,3	9,1
	2	9,1	9,2	9,3	9,4
	3	8,8	9,0	9,2	9,1
$\overline{LC}_{50}$		8,9	9,1	9,3	9,2
$S$		0,1732	0,1155	0,0577	0,1732
$\overline{LC}_{50} - d$		8,5	8,8	9,2	8,8
$\overline{LC}_{50} + d$		9,3	9,4	9,4	9,6

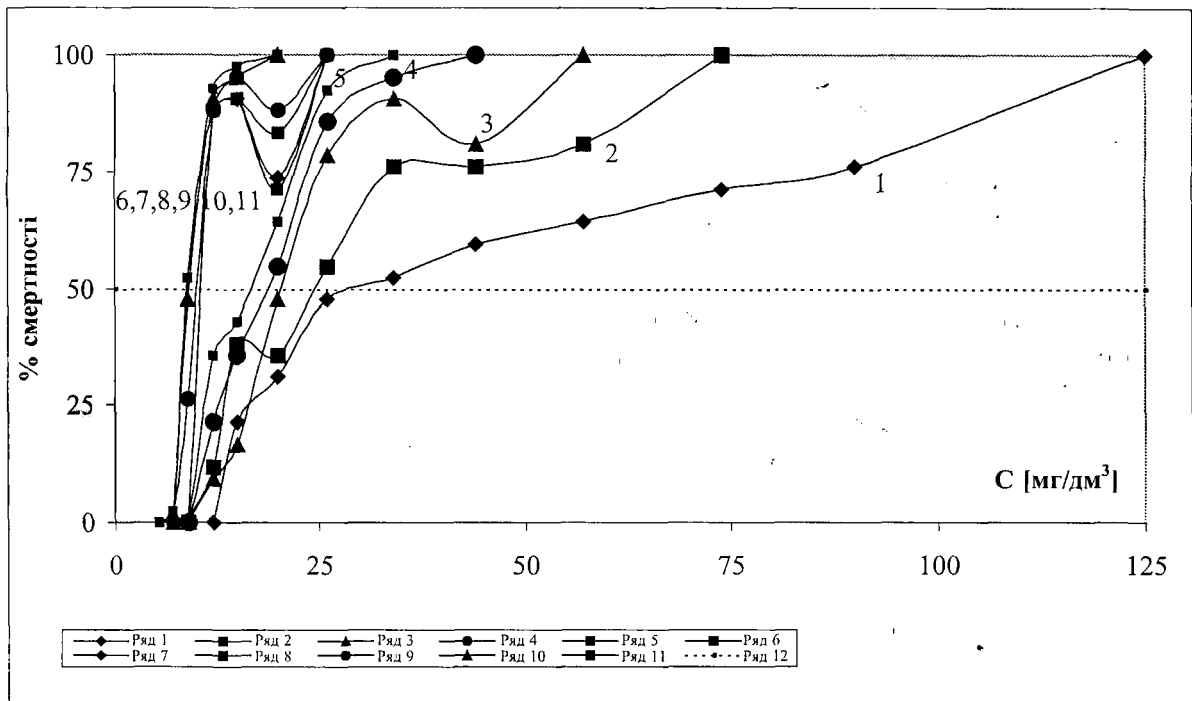


Рис. 1. Біотест водних розчинів NaCN в [мг/дм<sup>3</sup>], а також обчислення  $LC_{50}$  в [мг/дм<sup>3</sup>] на тестовому матеріалі *Spirostomum ambiguum*. Цикл 1. Ряд розведень 1,3. Біотест через проміжки часу: ряд 1 – 15 хв, ряд 2 – 30 хв, ряд 3 – 1 год, ряд 4 – 2 год, ряд 5 – 3 год, ряд 6 – 4 год, ряд 7 – 12 год, ряд 8 – 24 год, ряд 9 – 48 год, ряд 10 – 72 год, ряд 11 – 96 год, ряд 12 – лінія обчислення  $LC_{50}$

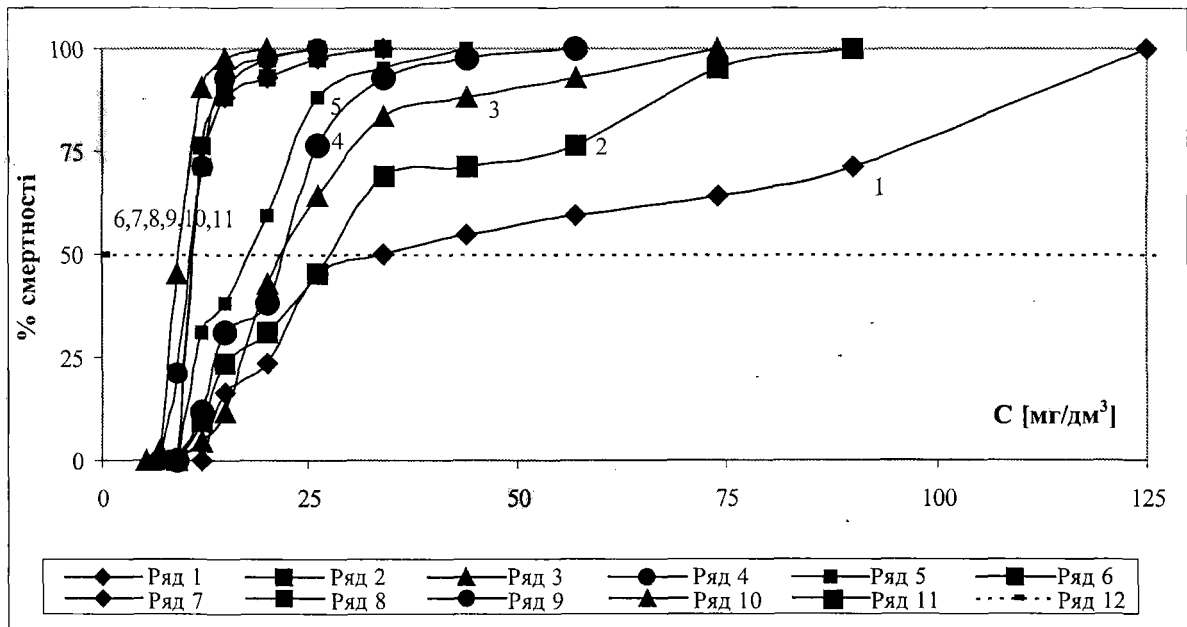


Рис. 2. Біотест водних розчинів KCN в [мг/дм<sup>3</sup>], а також обчислення  $LC_{50}$  в [мг/дм<sup>3</sup>] на тестовому матеріалі *Spirostomum ambiguum*. Цикл 1. Ряд розведень 1,3. Біотест через проміжки часу: ряд 1 – 15 хв, ряд 2 – 30 хв, ряд 3 – 1 год, ряд 4 – 2 год, ряд 5 – 3 год, ряд 6 – 4 год, ряд 7 – 12 год, ряд 8 – 24 год, ряд 9 – 48 год, ряд 10 – 72 год, ряд 11 – 96 год, ряд 12 – лінія обчислення  $LC_{50}$

Порівнюючи ціаніди з токсичними фторорганічними сполуками, можна констатувати, що табуна менш токсичний для *Spirostomum ambi-*

*gum*, ніж ціаніди. Наближеною токсичністю до табуна (насамперед за гідролізом табуна до іона  $CN^-$ , високотоксичного для *Spirostomum am-*

*biguim*) характеризується зарин, найнижчою токсичністю стосовно *Spirostomum ambiguum* характеризується DFP [25].

Приміром, табун при вимірах після 1 год дії виявляється в понад 20 разів менш токсичним, а зарин майже в 30 разів менш токсичним для *Spirostomum*, ніж ціанід натрію.  $LC_{50}$  – для табуна після 1, 24 і 96 годин тестування перебуває в межах (залежно від функції, що описує) 409,0–411,2; 35,9–37,7 мг/дм<sup>3</sup>, а також 14,0–14,7 мг/дм<sup>3</sup> [25].

У випадку зарину  $LC_{50}$  для аналогічного часу виміру розташовується в межах 587,2–594,3 мг/дм<sup>3</sup>, а також 131,6–138,1 мг/дм<sup>3</sup>, і 54,6–55,9 мг/дм<sup>3</sup> [25].

Для найменш токсичної сполуки DFP після 1,

24 і 96 годин одержали значення  $LC_{50}$  у межах 1861,7–1986,4 мг/дм<sup>3</sup> і 554,5–597,4 мг/дм<sup>3</sup>, а також 275,8–282,2 мг/дм<sup>3</sup> [25].

## Висновки

1. Цілком можливий і виправданий кількісний аналіз водних розчинів ціаніду натрію і ціаніду калію на основі кривих відсотків смертності у функції концентрації NaCN і KCN у розчині при використанні як *Spirostomum ambiguum* тестованого об'єкта.

2. Криві Безієра, В-сплайни й кубічні сплайни, а також метод Мюнха-Ріда можуть бути застосовані для обчислення  $LC_{50}$  водних розчинів ціаністого натрію й ціаністого калію.

1. Bratkowska W., Hübner H. Badania nad reaktywnością pierwotniaka *Spirostomum ambiguum*.– Wyd. Biul.– WAM.– 1978.– T. 21.– Z. 1.– S. 30–36.
2. Bratkowska W., Martynelis M., Hübner H. *Spirostomum ambiguum* jako obiekt testowy w badaniach nad ochroną środowiska naturalnego.– Biul. WAM.– 1978.– T. 21.– Z. 1.– S. 36–42.
3. Dojlido I. Instrumentalne metody badania wody i ścieków.– Warszawa: Arkady, 1980.
4. Finney P. J. Statistical Method in Biological Assay.– London, 1952.
5. Franke S. Lehrbuch der Militarchemie.– Berlin, 1975.
6. Franke S. Chimija otrawljajuszczich wieszczestw.– Moskwa: Chimija, 1973. Франке З. Химия отравляющих веществ.– М.: Химия, 1973.– Т. 1, 2.
7. Hermanowicz W., Dożańska W., Dojlido I., Koziorowski B. Fizyczno-chemiczne badanie wody i ścieków.– Warszawa: Arkady, 1976.
8. Елизарова О. Н. Определение пороговых доз промышленных ядов при пероральном введении.– М.: Гос. изд. мед. лит., 1962.
9. Kamiński A. Biologiczna analiza testowa śladowych ilości trucizn esterazy cholinowej na hodowanych skorupiakach wodnych (*Asellus*, *Daphnia*).– Rocznik WIHIE.– 1965.– Z. 2.– S. 19–48.
10. Количественная токсикология.– Л.: Медицина, 1973.
11. Kołodziejczyk L., Mańkowski S., Rubik M. Pomiaru w inżynierii sanitarnej.– Warszawa: Arkady, 1980.
12. Методика биологических исследований по водной токсикологии.– М.: Наука, 1971.
13. Методы определения токсичности и опасности химических веществ (токсикометрия) / Ред. Саноцкий И. В.– М.: Медицина, 1970.
14. Липт С. И. Основы культивирования микроорганизмов и клеток.– М.: Мир, 1978.
15. Polska Norma. PN-72/C-04610.– Arkusz 03.
16. Polska Norma. PN-72/C-04610.– Arkusz 04.
17. Principy i metody oceny toksyczności chemicznych wieszczestw.– Geneva: WHO, 1981.
18. Простейшие активного ила.– Л.: Наука, 1983.
19. Solski A. (w:) Bioindykacja skażeń przemysłowych i rolniczych.– Wrocław, 1983.– S. 237.
20. Stachlewska-Wróbłowa A. Analiza skażeń chemicznych. Wyd.– Warszawa: WAT, 1981.
21. Stelmaszuk W. Biotestowa analiza ilościowa cyjanku sodu, iperytu siarkowego i iperytu azotowego na materiale testowym *Spirostomum ambiguum* // Zesz. Nauk. Pol. Biał. Białystok, 1993.– S. 65–79.
22. Stelmaszuk W., Rubin A., Surynowicz T., Majewski S. Cyjanowodór. Cyjanki // Związki ogólnotrujące.– Wyd. II.– Białystok: Wyd. Naukowe EKOglob, 1995.– S. 15–56.
23. Стельмашук В. Адсорбция цианистого кальция из водных растворов // Химия и технология воды, Национальная академия наук Украины.– К., 1999.– Т. 21.– № 1.– С. 55–60.
24. Stelmaszuk W., Salek M. Toksyczność cyjanoków. Adsorpcyjne oczyszczanie wody zanieczyszczonej cyjankiem sodu // Awaryjne i katastrofy. Skażenia i zakażenia ludności oraz środowiska naturalnego, pod redakcją naukową W. Stelmaszuka i S. Radev. Białystok: Wyd. Naukowe EKOglob, 1998.– S. 159–172.
25. Stelmaszuk W. Biotest of water polluted with selected toxic compounds with application of *Spirostomum ambiguum* as test object // Polish Journal of Environmental Studies.– Hard Olsztyn, 1996.– S. 41–47.
26. Stelmaszuk W. Oczyszczanie wody skażonej związkami toksycznymi w efekcie awarii, katastrof i akcji terrorystycznych // Chemia w Ochronie Środowiska. Materiały Konferencji Naukowej. “Główne problemy ochrony środowiska w Polsce”. Lublin. 11–13 stycznia 1993.– Lublin 1993.– 106–114.
27. Stelmaszuk W. Terroryzm chemiczny jako potencjalne zagrożenie ludności i środowiska przyrodniczego // Materiały II Ogólnopolskiej Konferencji “Chemia w ochronie środowiska”. Lublin. 18–20 listopada 1993.– Lublin 1993.– S. 19–37.
28. Stelmaszuk W., Salek Z., Podedworny I. Terroryzm. Terroryzm chemiczny, nuklearny i biologiczny // Związki ogólnotrujące. Wydanie II.– Białystok: Wydawnictwo Fundacji EKOglob, 1995.– S. 97–129.
29. Wierzbicki T., Stelmaszuk W., Grabowski M., Puziuk M. Analiza biotestowa wodnych roztworów fenolu, podchlorynu i detergentu na materiale testowym *Spirostomum ambiguum* // Zesz. Nauk. Pol. Biał.– Białystok, 1987.– S. 63, 87–101.
30. Zarys toksykologii wojskowej.– Warszawa: Wyd. MON, 1964.– 259 s.



*V. Stelmaszuk, T. Antoniuk*

BIOTESTING OF SODIUM CYAN AND POTASIIUM CYAN WATER SOLUTIONS  
ON *SPIROSTOMUM AMBIGUUM* AS TESTING MATERIAL

*This article is about the possibility of biotesting of sodium cyan and potasium cyan water solutions on Spirostomum ambiguum as testing material.*