

ЦЕНТР ЭКОПЕСТИЦИДНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ «ЭПИцентр»

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор Центра

Р.С. Аптикаев

«28» ноября 2023 г.



Отчет

о научно-исследовательской работе

**«Оценка токсичности и определение класса опасности
препарата Новосил, ВЭ для водных организмов (дафний, рыб
и зеленых водорослей) при остром воздействии»**

Ответственный исполнитель:
к.б.н., Стрелецкий Р.А.

Москва, 2023 г.

ЦЕНТР ЭКОПЕСТИЦИДНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ «ЭПИцентр»

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор Центра

Р.С. Аптикаев



«28» ноября 2023 г.

Отчет
о научно-исследовательской работе
«Оценка токсичности и определение класса опасности
препарата Новосил, ВЭ для водных организмов (дафний, рыб
и зеленых водорослей) при остром воздействии»

Ответственный исполнитель:
к.б.н., Стрелецкий Р.А.

A handwritten signature in blue ink, likely belonging to R.A. Streletskiy, written over a horizontal line.

Москва, 2023 г.

Реферат

Оценено действие регулятора роста растений Новосил, ВЭ на три группы пресноводных гидробионтов – ракообразных (*Daphnia magna*), рыб (*Danio rerio*) и зеленых водорослей (*Desmodesmus subspicatus*) в соответствии с методами, рекомендованными для испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды [1,2,3]. В ходе испытаний воздействия препарата использовали следующие руководства ГОСТ 32536-2020 «Определение острой токсичности для дафний» (OECD, Test No. 202:2004, IDT), ГОСТ 32473-2013 «Определение острой токсичности для рыб» (OECD, Test No. 203:1992, IDT) и ГОСТ 32293-2013 «Испытание водорослей и цианобактерий на задержку роста» (OECD, Test No. 201, IDT) в полном объеме. На основании испытаний предложены величины полуэффективных концентраций препарата для рыб, дафний и зеленых водорослей. Определены токсичность и класс опасности препарата Новосил, ВЭ.

Исполнители:

- инженер-испытатель Центра экопестицидных исследований, Пилик Р.И.
- инженер-испытатель Центра экопестицидных исследований, Зеленова Е.П.
- инженер-испытатель Центра лабораторных исследований пестицидов, Бауэр П.А.

Оценка острой токсичности проведена в лаборатории ООО «Эпицентр».

Ключевые слова: *регулятор роста растений, Новосил, острая токсичность, зоопланктон, рыбы, зеленые водоросли, токсичность, полуэффективная концентрация, полулетальная концентрация, токсичность, NOEC, LOEC, класс опасности*

Оглавление	
Введение	4
Часть 1. Характеристика препарата Новосил, ВЭ	5
Часть 2. Материалы и методы исследований	5
2.1. Оценка острой токсичности для <i>Daphnia magna</i>	8
2.1.1. Характеристика тест - объекта	8
2.1.2. Условия проведения опыта	8
2.1.3. Приготовление растворов	9
2.1.4. Проведение испытаний	9
2.1.5. Результаты	10
2.1.6. Определение EC ₅₀ препарата Новосил, ВЭ для <i>Daphnia magna</i>	10
2.2. Оценка острой токсичности для <i>Danio rerio</i>	12
2.2.1. Характеристика тест-объекта	12
2.2.2. Условия проведения опыта	12
2.2.3. Приготовление растворов	13
2.2.4. Проведение испытаний	14
2.2.5. Результаты	14
2.6. Определение LC ₅₀ препарата Новосил, ВЭ для <i>Danio rerio</i>	14
2.3. Оценка токсичности для зеленых водорослей (<i>Desmodesmus subspicatus</i>)	16
2.3.1. Характеристика тест-объекта	16
2.3.2. Условия проведения опыта	16
2.3.3. Приготовление растворов	16
2.3.4. Проведение испытаний	17
2.3.5. Результаты	17
2.3.6. Определение EC ₅₀ , NOEC, LOEC препарата Новосил, ВЭ для зеленых водорослей	18
Заключение	20
Список литературы	21
Приложение 1	22
Приложение 2	23

Введение

Одной из основных задач экологической оценки химической продукции является установление уровня ее допустимого воздействия на окружающую среду. В отличие от других загрязняющих химических веществ (продуктов) уровень воздействия пестицида на окружающую среду изначально задан рекомендуемым регламентом его применения (культурами, на которых применяется; нормами расхода; количеством, сроками и способами обработки; ограничениями применения), то есть заранее известно «когда, где и сколько» поступает пестицида в окружающую среду. Задача разработчика (регистранта) в процессе разработки пестицида - получить данные, обосновывающие безопасность пестицида для окружающей среды после его применения в соответствии с рекомендуемым регламентом. Задача регистрационных органов – оценить эти данные и установить безопасность рекомендуемого регламента применения пестицида, в частности, для водных организмов. Работа по оценке токсичности представленного препарата Новосил, ВЭ выполнена по заказу ООО НПП «Биохимзащита». Целью проведения исследований было получение полуэффективных (LC_{50}/EC_{50}) концентраций препарата для пресноводных тест-организмов - рыб (*Danio rerio*), ракообразных (*Daphnia magna*) и зеленых водорослей (*Desmodesmus subspicatus*) при остром воздействии.

Препарат Новосил, ВЭ – регулятор роста растений [4].

Часть 1. Характеристика препарата Новосил, ВЭ

Нижеприведённые свойства взяты из заявки на регистрацию препарата [4].

Наименование препарата: Новосил, ВЭ

Назначение: регулятор роста растений

Регистранты:

ООО НПП "Биохимзащита". 633009, Новосибирская Область, Г. Бердск, Ул. Зеленая Роща, Д.7/35. Тел.: +7-383-212-59-22; e-mail: naturzachita@yandex.ru

Изготовитель продукта и действующего вещества:

ООО НПП "Биохимзащита", 633009, Новосибирская Область, Г. Бердск, Ул. Зеленая Роща, Д.7/35. Тел.: +7-383-212-59-22; e-mail: naturzachita@yandex.ru

Культуры, доза применения, время и особенности применения: представлено в таблице 1.

Таблица 1. Культуры, доза применения, время и особенности применения

Культуры	Норма расхода препарата	Назначение	Способ, время обработки, норма расхода рабочей жидкости	Срок ожидания (кратность обработки)
Пшеница озимая	50 мл /т	Повышение полевой всхожести, усиление ростовых и формообразовательных процессов, повышение устойчивости к болезням, ускорение созревания, повышение урожайности	Предпосевная обработка семян. Расход – 10 л/т	-(1)
	30 мл/га			
Пшеница яровая	50 мл/т	Повышение полевой всхожести, усиление ростовых и формообразовательных процессов, повышение устойчивости к болезням, ускорение созревания, повышение урожайности	Опрыскивание растений: 1-е - в фазе кущения; 2-я - в фазе колошения. Расход 300 л/га	-(1)
	30 м л/ га			
Ячмень	50 мл/т	Усиление ростовых и формообразовательных процессов, ускорение созревания, повышение урожайности	Предпосевная обработка семян. Расход 10 л/т	-(1)
	30 мл/га			
Овес	60 мл /т,	Усиление ростовых и формообразовательных процессов, повышение устойчивости к болезням, ускорение созревания, повышение урожайности	Предпосевная обработка семян. Расход 10 л/т-	-(1)
	50 мл /га			
Кукуруза	50 мл/т	Усиление ростовых и формообразовательных процессов, повышение устойчивости к болезням, ускорение созревания,	Предпосевная обработка семян. Расход 10 л/т	-(1)
	50 мл/га			
Соя	20 мл/га	Усиление ростовых и формообразовательных процессов, ускорение созревания, повышение содержания масла в семенах.	Опрыскивание растений в фазе начала цветения.	-(1)
Гречиха	50 мл/га	Усиление ростовых и формообразовательных процессов, ускорение созревания, повышение урожайности	Опрыскивание 1-е – в фазе начала раскрытия цветков нижних соцветий, 2-е – в фазе массового цветения. Расход 300 л/га	-(2)
Подсолнечник	40 мл / га	Усиление ростовых и формообразовательных процессов, повышение устойчивости к болезням, ускорение созревания, повышение урожайности, увеличение содержания масла в семенах	Опрыскивание растений: 1-е - в фазе 2-4 листьев, 2-е - в фазе начала цветения. Расход 300 л/га	-(2)
Свёкла сахарная	20 мл / га	Усиление ростовых и формообразовательных процессов, повышение устойчивости к болезням, повышение урожайности	Опрыскивание растений: 1-е - в фазе образования 8-10 листьев, 2-ое - через 15 дней после первого опрыскивания. Расход 300 л/га	-(2)

Хлопчатник	75 мл / га	Усиление ростовых и формообразовательных процессов, повышение устойчивости к болезням, ускорение созревания, повышение урожайности, увеличение содержания масла в семенах, улучшение качества волокна	Опрыскивание растений: 1-е - в фазе начала бутонизации, 2-е - в фазе начала цветения. Расход 300 л/га	-(2)
Картофель	100 мл / га	Усиление ростовых и формообразовательных процессов, повышение устойчивости к болезням, ускорение созревания, повышение урожайности, увеличение выхода товарных клубней, повышение качества продукции	- Опрыскивание растений: 1-е - в фазе начала цветения, 2-е - в фазе массового цветения, 3-е - через 7 дней после второго опрыскивания. Расход 300 л/га	-(3)
Лук на семена	100 мл / га	Усиление ростовых и формообразовательных процессов, повышение устойчивости к болезням, повышение урожайности	Опрыскивание растений: 1-е - в фазе массового стрелкования, 2-е - через 7 дней после первого опрыскивания, 3-е - через 7 дней после второго опрыскивания. Расход 300 л/га	-(3)
Лук на репку		Усиление ростовых и формообразовательных процессов, повышение устойчивости к болезням, ускорение созревания, повышение урожайности	Опрыскивание растений: 1-е - в фазе образования 4-ого листа, 2-е - через 15 дней после первого опрыскивания. Расход - 300 л/га	-(2)
Томат	50 мл / га	Усиление ростовых и формообразовательных процессов, повышение устойчивости к болезням, ускорение созревания, повышение урожайности, увеличение выхода товарных плодов, повышение качества продукции	Опрыскивание растений: 1-е - в фазе цветения 1-ой кисти, 2-ое - в фазе цветения 2-ой кисти, 3-е - в фазе цветения 3-ей кисти. Расход - 300 л/га	
Фасоль	20 мл / га	Усиление ростовых и формообразовательных процессов, повышение устойчивости к болезням, ускорение созревания, повышение урожайности	Опрыскивание растений: 1-е - в фазе начала цветения, 2-е - в фазе массового цветения, 3-е - через 7 дней после второго опрыскивания. Расход 300 л/га	-(3)
Огурец	15 мл / га	Усиление ростовых и формообразовательных процессов, повышение устойчивости к болезням, ускорение созревания, повышение урожайности, увеличение выхода товарных плодов, повышение качества продукции	Опрыскивание растений: 1-е - в фазе образования 2-4 настоящих листьев, 2-е - в начале цветения, 3-е - в фазе массового цветения, 4-е - через 7 дней после третьего опрыскивания. Расход - 300 л/га	-(4)
Капуста белокочанная	40 мл / га	Усиление ростовых и формообразовательных процессов, повышение устойчивости к болезням, повышение урожайности, увеличение выхода товарных плодов, повышение качества продукции	Опрыскивание растений: 1-е - в фазе образования 6-7 листьев, 2-е - в фазе массового завязывания кочанов. Расход 300 л/га	-(2)
Виноград	50 мл / га	Усиление ростовых и формообразовательных процессов, повышение урожайности, повышение качества продукции	Опрыскивание растений: 1-е - в фазе цветения, 2-е - через 12 дней после первого опрыскивания. Расход 600 л/га	-(?)
Люцерна на семена	50 мл / га	Усиление ростовых и формообразовательных процессов, ускорение созревания, повышение урожайности	Опрыскивание растений: 1-е - в фазе бутонизации, 2-е - в фазе массового цветения. Расход 300 л/га	-(2)

На испытание заказчиком (ООО НПП «Биохимзащита») был представлен образец препарата – Новосил, ВЭ (100 г/л) в пластиковом флаконе заводского производства. Основные сведения о представленном в качестве образца для исследования препарате представлены в таблице 2.

Основные сведения о препарате Новосил, ВЭ

Состав препарата	Действующие вещества: ISO: Природная смесь тритерпеновых кислот из древесной зелени (хвои) пихты сибирской общей формулы C ₃₀ H ₄₄ O ₄ . IUPAC: 1) (24 E)-3,23-диоксо- 7,24-(9β)ланостадиен-26-овая кислота, 2) (24E)-23-оксо-7,14,24-(β)мериеситриен-3α-ол-26-овая кислота, CAS: 107584-83 -8
Количество действующих веществ	100 г/л
Препаративная форма	Водная эмульсия (ВЭ)
Внешний вид образца	Жидкость
Нормативная и/или техническая документация	Паспорт безопасности (Приложение 1)

Часть 2. Материалы и методы исследований

Оценку токсичности препарата Новосил, ВЭ проводили для трех групп пресноводных гидробионтов – ракообразных (*Daphnia magna*), рыб (*Danio rerio*) зеленых водорослей (*Desmodesmus subspicatus*). В ходе исследований оценивали начальное содержание растворенного кислорода (для дафний и рыб) и значения pH в исследуемых растворах препарата. Оценку достоверности полученных результатов проводили, используя методы математической статистики.

Используемое для исследований оборудование:

- Весы Adventurer AR2140, сер. № 1227120561 (свидетельство о поверке № С С-МА/04-09-2023/27546159 от 04.09.2023, действительно до 03.09.2024)
- Иономер Эксперт-001-3 (01), сер. № 2494 (свидетельство о поверке № С-ТТ/09-08-2023/268841252 от 09.08.2023, действительно до 08.08.2024)
- Люксметр Testo 540, сер. № 3903/208 (свидетельство о поверке № С-МА/01-09-2023/274542672 от 01.09.2023, действительно до 31.08.2024)
- Анализатор растворенного кислорода МАРК-302М, сер. № 2469 (свидетельство о поверке № С-МА/18-10-2023/287554562 от 18.10.2023, действительно до 17.10.2025)
- Термогигрометр Testo 608-H1 сер. № 45237768 (свидетельство о поверке № С-МА/02-05-2023/243030371 от 02.05.2023, действительно до 01.05.2024)
- Дистиллятор Liston A 210, сер. № B0388
- Деионизатор Elga D-56235, сер. № PL5111 02 000078
- Автоклав (до 1 атм.)
- Фотометр КФК-3-01, сер. № 0600977 (свидетельство о поверке № С-ДЦР/30-09-2022/189722352 от 30.09.2022, действительно до 29.09.2024)
- Термостат ХТ 3/40, сер. № 1072 (Аттестат № 23-0104А от 11.10.2023, действителен до 10.10.2024)

- Термостат ХТ 3/40, сер. № 1074 (Аттестат № 23-0105А от 11.10.2023, действителен до 10.10.2024)

- Колбы плоскодонные конические вместимостью 100 см³;
- Пипетки мерные вместимостью от 0,1 до 10 см³;
- Колбы мерные вместимостью от 50 до 1000 см³;
- Цилиндры мерные вместимостью 0,05 дм³, 2-го класса точности,
- Аквариумы, вместимость 10 дм³.

2.1. Оценка острой токсичности для *Daphnia magna*

Основная цель острых (краткосрочных) опытов на дафниях – установить концентрации исследуемого вещества, которые в водных объектах могут вызвать массовую гибель наиболее продуктивной части зоопланктона – фильтраторов, а также, установить концентрацию, начиная с которой следует проводить хронические (длительные) эксперименты [5,6]. По результатам острых опытов определяли концентрацию вещества, вызывающую гибель 50% подопытных организмов за 48 часов экспозиции (ЭК₅₀⁴⁸/ЕС₅₀⁴⁸) [1]. На основании данных показателей оценивали токсичность и класс опасности препарата Новосил, ВЭ для водных беспозвоночных животных [7,8].

2.1.1. Характеристика тест - объекта

Дафния magna (*Daphnia magna* Straus, 1785) – пресноводные планктонные ракообразные (*Anomopoda*, *Cladocera*, *Daphniidae*). Они обитают в стоячих и слабопроточных водоемах, особенно часто - во временных лужах, и распространены повсеместно на территории России. *Daphnia magna* является типичным бета-мезасапробом. В природе источником питания дафний являются бактерии, одноклеточные водоросли, детрит, растворенные органические вещества. В лаборатории при благоприятных условиях культивирования круглый год дафнии размножаются партеногенетически, появление самцов свидетельствует о стрессовых условиях содержания. С момента рождения до наступления половозрелости дафний проходит 7-9 суток при температуре 20⁰С. Эмбриональное развитие яиц длится 48 часов. Оптимальное содержание кислорода для дафний составляет 7-8 мг/л, однако, рачок способен переносить снижение концентрации кислорода до 2 мг/л. Оптимальные значения активной реакции среды рН составляют 7,0 - 8,0, однако, временные изменения рН в пределах 5,8 - 9,0 не подавляют существенно жизнедеятельность дафний. Для токсикологических испытаний использовали дафний из маточной лабораторной культуры – «*Daphnia magna* – 60», которую культивировали в лаборатории в соответствии с методическими рекомендациями [1,5,6].

2.1.2. Условия проведения опыта

Исследования проводили на базе лаборатории, полностью оснащенной для проведения токсикологических испытаний на базе ООО «ЭПИцентр».

Температуру воздуха в помещении поддерживали в пределах 20-22°C, стабильная температура в термостате была установлена на уровне 21,5°C. Испытания проводились в полной темноте.

Для культивирования дафний использовали модифицированную воду согласно ГОСТ 32536-2020. В качестве основы использовалась деионизированная вода с сопротивлением 18,2 мОМ/см с добавлением растворов минеральных солей (таблица 3).

Таблица 3. Приготовление модифицированной воды для проведения испытаний

Основной раствор (однокомпонентное вещество)		Объем основного раствора, см ³ , добавляемый к 1 дм ³ воды, для приготовления модифицированной среды
Реагент	Количество вещества, г, добавляемое к 1 дм ³ воды	
CaCl ₂ *2H ₂ O	11,76	25
MgSO ₄ *7H ₂ O	4,93	25
NaHCO ₃	2,59	25
KCl	0,23	25

Значения pH и растворенный кислород в тестируемых растворах, включая контроль, измеряли в начале и конце теста. Поскольку значения pH не отклонялись более чем на 1,5 ед. то согласно методике (ГОСТ 32536-2020) дополнительного регулирования не требовалось [1].

2.1.3. Приготовление растворов

Для исследований использовали искусственную воду (см. условия проведения опытов). Основные физико-химические свойства используемой искусственной воды представлены в таблице 4.

Таблица 4. Основные физико-химические свойства искусственной воды, используемой в испытаниях

Показатель	Значение, концентрация	Методика определения
Жесткость воды	225±50 мг/л (в пересчете CaCO ₃)	Иономер Эксперт-001-3 (01) Электрод ионоселективный на кальций и магний XC-Ca+Mg-001
pH	7,8±0,5	Иономер Эксперт-001-3 (01) Электрод стеклянный комбинированный ЭСК-1060/7
Содержание растворенного кислорода	≥7,0 мг O ₂ /л	Анализатор растворенного кислорода МАРК-302М

Для приготовления тестируемых растворов исследуемого препарата Новосил, ВЭ готовили исходный раствор с концентрацией 0,5 мг/мл, для чего 50 мг исследуемого препарата растворяли в 100 мл искусственной воды. Последовательным разведением приготавливали растворы с концентраций препарата до 160 мг/л.

2.1.4. Проведение испытаний

Согласно методическим рекомендациям, необходимо выбирать диапазон концентраций, которые обеспечат иммобилизацию от 0 до 100% в остром опыте продолжительностью 48 часов. Если иммобилизации не наблюдается при концентрации 100 мг/л, то препарат признается практически не токсичным. Любое наблюдаемое аномальное поведение фикси-

ровали. Полуэффективные концентрации рассчитывали на основе полученных данных. Оценка токсичности включала исследования воздействия препарата в концентрациях от 10 до 160 мг препарата/л. В стеклянные стаканы объемом 25 мл помещали по 20 мл растворов исследуемых препаратов или модифицированную воду (контрольные варианты). Рачков (*Daphnia magna*) в третьем поколении в возрасте не старше 24 часов отбирали из культуры, переносили в стаканы и затягивали пленкой Parafilm. Содержание кислорода в воде было идентичным для контрольных и тестовых групп. На каждый вариант эксперимента приходилось по 20 дафний, разделенных на 4 повторности, в каждую из которых помещали по 5 особей, таким образом, чтобы на каждую особь приходилось не менее 2 мл раствора [1]. Тест проводили в статичных условиях.

Данные по иммобилизованным особям фиксировали через 24 и 48 часов после постановки опыта. Особи дафний, неспособные плавать в течение 15 секунд после легкого встряхивания тестового сосуда, считались иммобилизованными [1]. Результаты, полученные в опытах, статистически обрабатывали, используя методы математической статистики. Сводная таблица проведенных опытов представлена в приложении 2, табл.1.

Регулярно оценивали чувствительность рачков из культуры к стандартному токсиканту – бихромату калия. EC_{50}^{24} бихромата калия для используемой культуры на момент испытаний составляла 0,68 мг/л (от 10.23), что соответствует требованиям стандарта [1,5,9].

2.1.5. Результаты

Препарат Новосил, ВЭ вызывал эффект гибели рачков (иммобилизации), начиная с концентрации 80 мг/л (табл. 5).

Таблица 5. Количество иммобилизованных особей *Daphnia magna* при воздействии препарата Новосил, ВЭ

Концентрация препарата, мг/л	Общее кол-во особей	Число иммобилизованных особей			
		24 часа	48 часов	Всего	%
Контроль (0)	20	0	0	0	0
10	20	0	0	0	0
20	20	0	0	0	0
40	20	0	0	0	0
80	20	17	0	17	85
160	20	20	-	20	100
Общее количество живых: 120 особей		Общее количество погибших: 37 особей			

Опыт показал, что препарат вызывал иммобилизацию дафний от 0 до 100% в диапазоне концентраций от 40 до 160 мг/л, что позволило рассчитать EC_{50} за 48 часов.

2.1.6. Определение EC_{50} препарата Новосил, ВЭ для *Daphnia magna*

Концентрация EC_{50} для *Daphnia magna* за период воздействия 48 часов была рассчитана на основании данных, приведенных в таблице 5, с использованием логистической функции (табл. 6, рис.1).

Для расчета EC_{50} вычисляли коэффициенты в логистическом уравнении:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b},$$

где

Y – процент выживших особей,

x – концентрация токсиканта, мг/л,

c – процент выживших особей, когда $x=0$,

x_0 – точка перегиба на графике зависимости Y от X ,

b – коэффициент угла наклона кривой зависимости Y от X .

Точка перегиба x_0 является EC_{50} .

Вычисление x_0 и b проводили при помощи программы Statistica («Продвинутые линейные/нелинейные модели» – «нелинейная оценка»). Применимость данной модели для наших данных подтверждается точностью подобранных коэффициентов при $p=0,05$ (таб. 6).

Таблица 6. Точность подбора коэффициентов в логистическом уравнении

Model is: $y=100/(1+((x/b)^a))$ (Spreadsheet1_logistic_curve) Dep. Var. : Y Level of confidence: 95.0% (alpha=0.050)						
	Estimate	Standard - error	t-value - df = 4	p-level	Lo. Conf - Limit	Up. Conf - Limit
b	74,672	0,169916	439,4628	0,000000	74,13117	75,21267
a	25,16742	0,830553	30,3020	0,000079	22,52423	27,81061

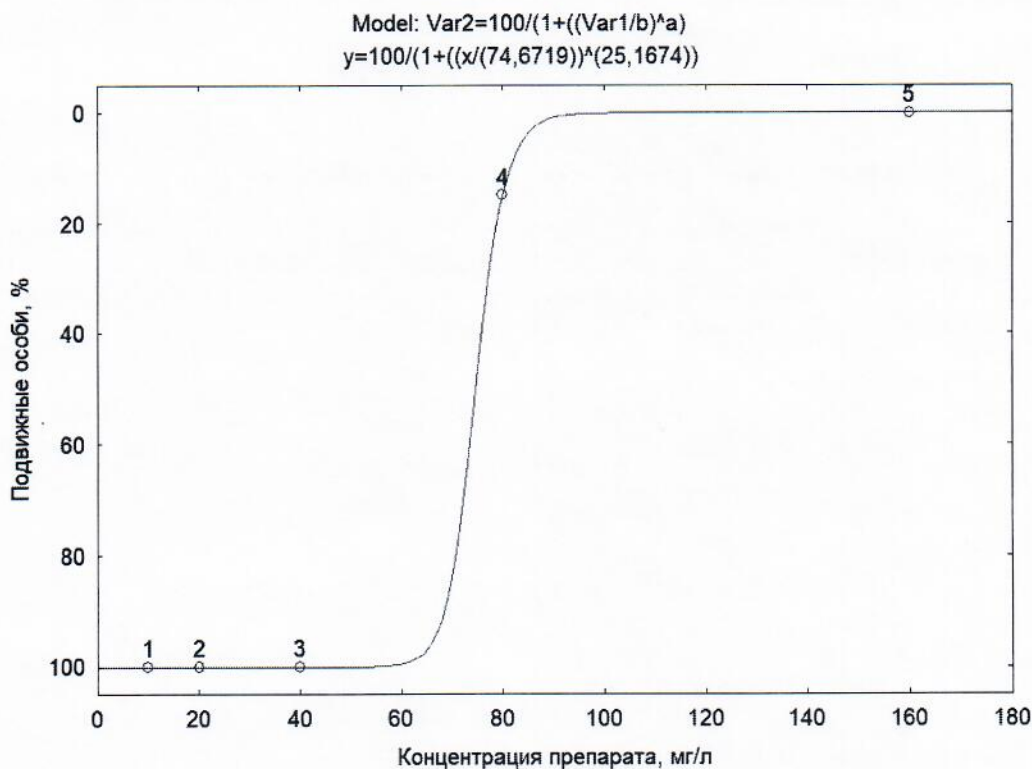


Рис. 1. Зависимость величины эффекта (иммобилизации) от концентрации препарата

Полуэффективная концентрация (EC_{50}) препарата Новосил, ВЭ для *Daphnia magna* за период воздействия 48 часов составляет 74,672 мг препарата/л.

Нижний предел доверительного интервала 36,860 мг/л, верхний – 151,271 мг/л. Доверительный интервал для X_i (50) рассчитан согласно формулам для линейной регрессии ($p=0,05$).

$$\hat{Y} - t_{\frac{\alpha}{2}, n-2} * S_{(Y|X_i)} \leq Y|X_i \leq \hat{Y} + t_{\frac{\alpha}{2}, n-2} * S_{(Y|X_i)}, \text{ где}$$

$$S_{(Y_{cp}|X_i)} = SE_y \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(X_i - \bar{X})^2}{SS_{xx}}}$$

, где

SS_{xx} сумма квадратов отклонений от среднего значений переменной X ;

SE_y – стандартная ошибка регрессии

SE – стандартная ошибка регрессии, рассчитывается как корень квадратный из дисперсии. Для расчета стандартной ошибки и доверительных интервалов необходимо представить концентрации в виде натуральных логарифмов, которые после расчета нужно перевести обратно в мг/л при помощи операции возведения в степень.

2.2. Оценка острой токсичности для *Danio rerio*

Рыбы (наряду с водными млекопитающими) находятся в области верхнего звена трофической цепи водных экосистем, поэтому очень важно установить токсичность и опасность вещества как для существования популяции рыб в водном объекте, так и с целью избежать угрозы здоровью человека при употреблении их в пищу.

2.2.1. Характеристика тест-объекта

Данио рерио (*Danio rerio*, син. *Brachydanio rerio*, Hamilton-Buchanan, 1822) — аквариумная рыбка семейства Карповые (*Cyprinidae*). Широко распространенный, достаточно чувствительный и удобный тест-объект, доступный для использования в исследованиях в течение всего года. Рыбы для опыта были получены из маточной аквариумной культуры *Danio rerio*, кафедры «Гидробиологии и общей экологии» Биологического факультета. Период адаптации перед посадкой рыб в опыт составил 14 суток. В опыт были отобраны молодые здоровые особи в возрасте 6-х месяцев. Средний вес рыб и плотность посадки были измерены и соответствовали методическим рекомендациям [2,6].

2.2.2. Условия проведения опыта

Исследования по острой токсичности препарата Новосил, ВЭ для рыб (*Danio rerio*) проводили на базе лаборатории, полностью оснащенной для проведения токсикологических испытаний на базе ООО «ЭПИцентр».

Действие препарата было исследовано в кратковременных (острых) опытах продолжительностью 96 часов [2,6]. Температура воды в течение всего исследования составляла

22,5±1,0 °С. Периодичность освещенности составляла 12 часов – свет, 12 часов - без света. Показатели концентрации кислорода, измеренные на момент начала опыта соответствовали значениям, при которых проводят исследования. Поскольку препарат хорошо смешивается с водой, то опытов в концентрации, равной «пределу растворимости» исследуемого вещества в тестовой среде не проводили. Оценка токсичности включала исследования воздействия препарата в концентрациях от 10 до 160 мг препарата/л. В опыте оценивали влияние препарата Новосил, ВЭ в выбранном диапазоне концентраций по 10 особей для каждой концентрации. Оценивали действие препарата на выживаемость рыб в кратковременных (острых) опытах продолжительностью 96 часов. На протяжении опыта животных не кормили. Особи, не подающие признаков жизни в течение 10 секунд после прикосновения стеклянной палочкой, признавали погибшими [6].

Средний вес особи размером 2,7-2,9 см перед посадкой в опыт в среднем составлял 0,3726 г., табл. 7. Таким образом, плотность посадки соответствует методике проведения исследований [2,6,10].

Таблица 7. Измерение средней массы тела рыб перед опытом

Концентрация	Вес особей на повторность	Вес одной особи, г
контроль	3,726	0,3726
10	3,714	0,3714
20	3,796	0,3796
40	3,684	0,3684
80	3,736	0,3736
160	3,698	0,3698
Плотность посадки: 0,3726 г/л		

Также проводили контрольный тест с водой, используемой для приготовления растворов исследуемого препарата. опыты проводили в статичных условиях, без смены растворов и кормления рыб.

2.2.3. Приготовление растворов

Для опыта брали водопроводную воду, отстоянную в течение 10 дней, со следующими характеристиками:

- рН – 8,1-8,2;
- общая жесткость – 4,2-4,4 мг-эquiv./л;
- содержание растворенного кислорода – 70-90 %.

Для приготовления ряда растворов исследуемого препарата Новосил, ВЭ готовили исходный раствор с известной концентрацией, для чего навеску исследуемого препарата растворяли в подготовленной воде, с последующим порционным разбавлением. Дополнительный растворитель не использовали, поскольку препарат хорошо смешивался с водой.

Тестируемые растворы выбранных концентраций готовили путем внесения определенного количества исходного раствора в сосуды для опыта с подготовленной водой.

2.2.4. Проведение испытаний

Согласно методическим рекомендациям, за время опыта (96 часов) диапазон выбранных концентраций, должен обеспечить эффект воздействия от нулевого до полного.

В процессе токсикологических опытов необходимо учитывать следующие показатели:

- выживаемость рыб,
- цвет тела и плавников,
- двигательную активность, аномалии в поведении,
- наличие кровоизлияний,
- картины естественной гибели и состояние тела погибших особей,
- и другие реакции.

Достоверность результатов оценивали с помощью стандартных статистических методов. На основе полученных данных рассчитывали концентрации, вызывающие определенный эффект за установленное время.

2.2.5 Результаты

Результаты исследований токсичности препарата Новосил, ВЭ для всех исследуемых концентрациях на рыб представлены в таблице 8.

Таблица 8. Смертность *Danio rerio* при воздействии препарата Новосил, ВЭ

Концентрация мг препарата/л	Общее кол-во особей	число погибших особей					
		24 часа	48 часов	72 часа	96 часов	Всего	В % от контроля
Контроль (0)	10	0	0	0	0	0	0
10	10	0	0	0	0	0	0
20	10	3	0	0	0	3	30
40	10	10	-	-	-	10	100
80	10	10	-	-	-	10	100
160	10	10	-	-	-	10	100
Общее количество живых: 60 особей				Общее количество погибших: 33 особи			

Опыт показал, что концентрации препарата в диапазоне 0,5 – 45 мг/л вызывали гибель рыб от 0 до 100%.

2.6 Определение LC₅₀ препарата Новосил, ВЭ для *Danio rerio*

Расчет полуэффективной концентрации по показателю выживаемости рыб проводили в соответствии с методическими рекомендациями [2,6,7]. На основании данных, представленных в таблице 8, с использованием уравнения линейной регрессии (табл. 9), была рассчитана LC₅₀ препарата для рыб (рис. 2) [2,11].

Таблица 9. LC₅₀⁹⁶ препарата Новосил, ВЭ для рыб

Концентрация (С)	Ln(C)	% гибели
10	2,302585093	0
20	2,995732274	30
40	3,688879454	100
80	4,382026635	100
160	5,075173815	100

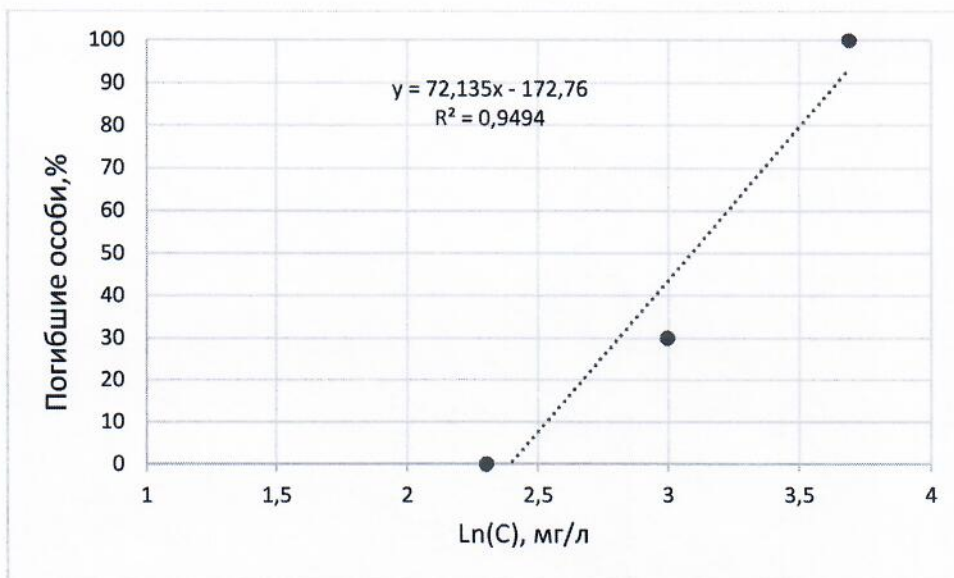


Рис. 2 Зависимость величины эффекта (гибели) от логарифма концентрации для *Danio rerio* за период воздействия 96 часов

Концентрация LC₅₀ для рыб составила **21,935** мг препарата/л. Нижний предел доверительного интервала **9,268** мг/л, верхний – **51,918** мг/л.

Доверительный интервал для X_i (50) рассчитан согласно формулам для линейной регрессии (p=0,05).

$$\hat{Y} - t_{\frac{\alpha}{2}, n-2} * S_{(Y|X_i)} \leq Y|X_i \leq \hat{Y} + t_{\frac{\alpha}{2}, n-2} * S_{(Y|X_i)}, \text{ где}$$

$$S_{(Y_{cp}|X_i)} = SE_y \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(X_i - \bar{X})^2}{SS_{xx}}}$$

, где

SS_{xx} сумма квадратов отклонений от среднего значений переменной X;

SE_y – стандартная ошибка регрессии

SE – стандартная ошибка регрессии, рассчитывается как корень квадратный из дисперсии.

Для расчета стандартной ошибки и доверительных интервалов необходимо представить концентрации в виде натуральных логарифмов, которые после расчета нужно перевести обратно в мг/л при помощи операции возведения в степень.

2.3. Оценка токсичности для зеленых водорослей (*Desmodesmus subspicatus*)

Фотосинтезирующие водоросли являются первичными продуцентами в водоемах и находятся в начале трофических цепей. Их гибель приводит к подрыву кормовой базы других обитателей водоемов и в конечном счете может вызвать необратимое сокращение разнообразия водного биоценоза. Также водоросли выделяют кислород важный для большинства обитателей водных экосистем и потребляют углекислый газ, участвуя тем самым в нейтрализации парникового эффекта.

2.3.1. Характеристика тест-объекта

В качестве тест-объекта использовали лабораторную альгологически чистую культуру одноклеточных зеленых водорослей *Desmodesmus subspicatus* (Chodat) E.Hegewald & A.W.F.Schmidt, полученную из ВНИРО. *Desmodesmus subspicatus* имеет овальные, как правило, единичные клетки. Размер клеток 7-15 на 3-12 мкм [3].

2.3.2. Условия проведения опыта

Исследования проводили в лаборатории ООО «ЭПИцентр», полностью оснащенной для проведения токсикологических испытаний.

Температура воздуха в термостате во время проведения исследования составляла $22,5 \pm 0,5$ °С. Интенсивность освещения составляла 7800 лк.

Питательной средой для культуры водорослей служила среда ЕРА (таблица 10).

Таблица 10. Состав питательной среды ЕРА

Компоненты среды	Концентрация в среде, мг/л
NaHCO ₃	15,0
NaNO ₃	25,5
MgCl ₂ *6H ₂ O	12,16
CaCl ₂ *2H ₂ O	4,41
MgSO ₄ *7H ₂ O	14,6
K ₂ HPO ₄	1,044
FeCl ₃ *6H ₂ O	0,160
Na ₂ EDTA*2H ₂ O	0,300
H ₃ BO ₃	0,186
MnCl ₂ *4H ₂ O	0,415
ZnCl ₂	0,00327
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,00143
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,00726
CuCl ₂ *2H ₂ O	0,000012

Предварительно оценивали чувствительность культуры водорослей к референтному токсиканту: K₂Cr₂O₇. Величина EC₅₀ (72 ч) составила 0,599 мг/л.

2.3.3. Приготовление растворов

Для приготовления растворов Новосил, ВЭ готовили исходный раствор с концентрацией 1 мг/мл, для чего 50 мг исследуемого препарата растворяли в 50 мл дистиллированной

воды. Исследовали концентрации препарата до 100 мг/л. Тестируемые растворы готовили путем разведения исходного раствора в среде для культивирования.

2.3.4. Проведение испытаний

Эксперимент проводился в конических плоскодонных колбах объемом 100 см³, содержащих по 20 см³ контрольных или опытных растворов.

В опыт брали культуру в экспоненциальной фазе роста. Начальная плотность клеток в эксперименте составляла 5,0 тыс.кл./мл.

Длительность тестирования составила 72 часа.

Повторность эксперимента – по 3 параллельных пробы опытных растворов, 6 параллельных проб контрольных растворов.

Численность клеток водорослей определяли по оптической плотности при помощи фотометра ЗОМЗ КФК-3-01 «ЗОМЗ» и прямого подсчета в камере Горяева.

Влияние препарата Новосил, ВЭ на водоросли оценивали по приросту за 3 суток. Прирост является разницей численности клеток в конце и начале тестирования.

В начале и конце опыта измеряли рН среды в экспериментальных сосудах.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием метода наименьших квадратов (линейная регрессия) и однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Допустимость применения линейной регрессии оценена при помощи проверки значимости взаимосвязи переменных. Уровень значимости при статистической обработке принят равным 0,05.

2.3.5. Результаты

Динамика численности клеток водорослей *Desmodesmus subspicatus* в контрольных пробах и растворах препарата Новосил, ВЭ, а также ингибирование прироста представлены в таблице 11. Динамика биомассы, измеренная по дням, кривые роста и изменение рН среды за время эксперимента представлены в приложении.

Таблица 11. Динамика численности клеток водорослей *Desmodesmus subspicatus* в контрольных пробах и растворах исследуемого вещества, ВР · 10⁵ кл./мл и ингибирование прироста (%)

№	Концентрация, мг/л	0 сут. ¹	3 сут.	Прирост	Ингибирование прироста, %
1	Контроль	0,05	5,75	5,70	-
2		0,05	6,06	6,01	
3		0,05	5,76	5,71	
4		0,05	5,71	5,66	
5		0,05	5,54	5,49	
6		0,05	5,21	5,16	
7	2,5	0,05	4,69	4,64	17,5
8		0,05	5,40	5,35	4,9

¹ Номинально привитая биомасса

9		0,05	5,50	5,45	3,1
10	5	0,05	3,89	3,84	31,7
11		0,05	3,77	3,72	33,9
12		0,05	4,62	4,57	18,7
13	10	0,05	2,95	2,90	48,5
14		0,05	2,43	2,38	57,7
15		0,05	3,70	3,65	35,1
16	20	0,05	2,73	2,68	52,4
17		0,05	1,99	1,94	65,4
18		0,05	2,46	2,41	57,1
19	40	0,05	1,25	1,20	78,6
20		0,05	1,66	1,61	71,3
21		0,05	1,47	1,42	74,7
22	100	0,05	0,12	0,07	98,7
23		0,05	0,25	0,20	96,4
24		0,05	0,56	0,51	90,9

Оценка статистической значимости различий численности клеток водорослей была проведена при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

2.3.6. Определение EC₅₀, NOEC, LOEC препарата Новосил, ВЭ для зеленых водорослей

Для расчета EC₅₀ была построена диаграмма рассеяния (рис. 3), где по оси Y ингибирование прироста в процентах, а по оси X – натуральный логарифм от концентраций. На диаграмму нанесены результаты измерений по параллельным (с добавкой токсиканта) пробам. Для расчета ингибирования прироста была использована средняя биомасса по шести контрольным пробам.

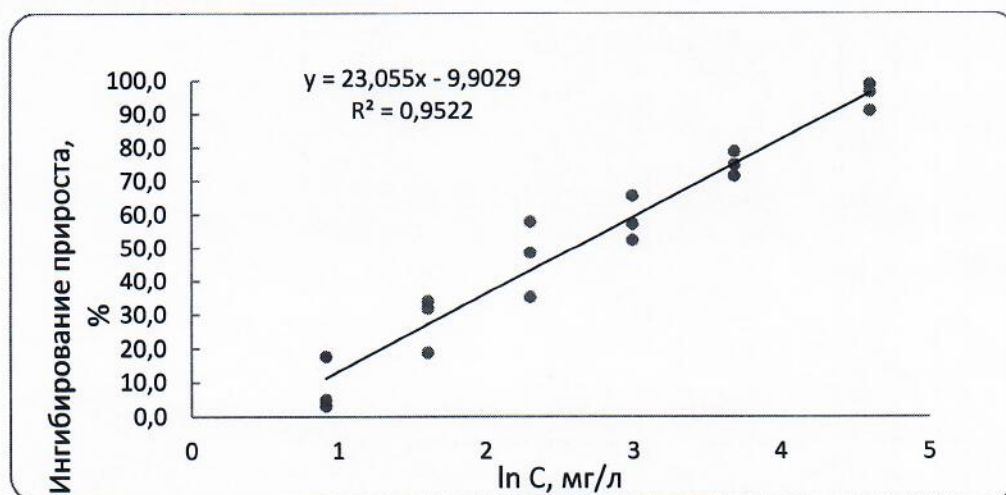


Рис. 3. Зависимость ингибирования прироста от концентрации токсиканта (линейная регрессия)

Коэффициенты уравнения линейной регрессии вида $y=ax-b$ (рис. 3) были использованы для расчета EC₅₀, по формуле $50=a*\ln(EC_{50})-b$, где $a=23,055$, $b=9,9029$. Для перевода

полученного значения в размерность мг/л поворачивалась обратная логарифмированию операция возведения в степень.

$EC_{50} = 13,440$ мг/л, нижний предел доверительного интервала $11,479$ мг/л, верхний – $15,736$ мг/л. Доверительный интервал для X_i (50) рассчитан согласно формулам для линейной регрессии ($p=0,05$).

$$\hat{Y} - t_{\frac{\alpha}{2}, n-2} * S_{(Y|X_i)} \leq Y|X_i \leq \hat{Y} + t_{\frac{\alpha}{2}, n-2} * S_{(Y|X_i)}, \text{ где}$$

$$S_{(Y_{cp}|X_i)} = SE_y \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(X_i - \bar{X})^2}{SS_{xx}}}$$

, где

SS_{xx} – сумма квадратов отклонений от среднего значений переменной X ;
 SE_y – стандартная ошибка регрессии

Наименьшая наблюдаемая эффективная концентрация LOEC составляет <5 мг/л. Ниже приведены результаты дисперсионного анализа, включающие варианты эксперимента - «контроль» и «2,5 мг/л» (таблица 12); и варианты «контроль», «2,5 мг/л» и «5 мг/л» (таблица 13). Данные анализа показывают, что препарат вызывает достоверное ингибирование прироста при экспериментальной концентрации менее 5 мг/л. Неэффективная наблюдаемая концентрация препарата (NOEC) для препарата была рассчитана как EC_{10} и составляет 2,371 мг/л.

Таблица 12

Однофакторный дисперсионный анализ для вариантов «контроль» и «2,5 мг/л»

Источник вариации	SS	df	MS	F	P-Значение*	F критическое
Между группами	4,576E+09	1	4,576E+09	4,06119	0,083716212	5,591447851
Внутри групп	7,887E+09	7	1,127E+09			
Итого	1,246E+10	8				

*Нулевая гипотеза не отвергается, препарат не подавляет рост водорослей

Таблица 13

Однофакторный дисперсионный анализ для вариантов «контроль», «2,5 мг/л» и «5 мг/л»

Источник вариации	SS	df	MS	F	P-Значение*	F критическое
Между группами	4,992E+10	2	2,496E+10	18,49407	0,000648911	4,256494729
Внутри групп	1,215E+10	9	1,35E+09			
Итого	62065468654	11				

*Нулевая гипотеза отвергается, препарат подавляет рост водорослей

Заключение

На основании результатов проведенных исследований для трех групп водных организмов выявлено, что наиболее чувствительным тест-организмом к воздействию препарата Новосил, ВЭ являются водоросли. Концентрации EC_{50} для *Desmodesmus subspicatus* и для *Daphnia magna* за период острого воздействия составляют соответственно 13,440 мг препарата/л и 74,672 мг препарата/л, концентрация LC_{50} для *Danio rerio* – 21,935 мг препарата/л, что характеризует препарат как **вредный (3 класс опасности)** (табл. 14).

Поскольку смесевая химическая продукция изучена и имеются экспериментальные данные, достаточные для проведения процедуры классификации опасности по наиболее чувствительному звену, то, в соответствии с ГОСТ 31340-2013 и ГОСТ Р 57455-2017 [9,12], препарат Новосил, ВЭ следует относить к «**вредным для водных организмов**», **3 классу опасности** (табл. 14).

Таблица 14. Классификация по острой токсичности и опасности для водных организмов [9]

Класс опасности	Токсичность	Беспозвоночные, рыбы, водоросли EC_{50}/LC_{50} , мг/л
1	Чрезвычайно токсичный	≤ 1
2	Токсичный	$>1 - \leq 10$
3	Вредный	$>10 - \leq 100$
Не классифицируется	Практически не токсичный	> 100

Результаты проведенных исследований можно включить в соответствующий раздел сведений о токсичности для водных организмов препарата Новосил, ВЭ. Концентрация препарата, не вызывающая статистически значимых негативных эффектов для дафний составила 40 мг/л, для рыб 10 мг/л. Для зеленых водорослей наименьшая наблюдаемая эффективная концентрация (ЛОЕС) составляет <5 мг/л, неэффективная наблюдаемая концентрация препарата (НОЕС) составляет 2,371 мг/л.

Список литературы

1. ГОСТ 32536-2020 Методы испытания химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Определение острой токсичности для дафний. - Стандартиформ.- 2020 г.
2. ГОСТ 32473-2013 Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Определение острой токсичности для рыб. -М: Стандартиформ.- 2014 г.
3. ГОСТ 32293-2013 «Испытание водорослей и цианобактерий на задержку роста». М., Стандартиформ, 2015, 26 с.
4. СВЕДЕНИЯ О ПЕСТИЦИДЕ Новосил, ВЭ, ООО НПП «Биохимзащита», 19 с. (конфиденциальная информация).
5. О.Ф. Филенко, Е.Ф. Исакова, Д.М. Гершкович, В.И. Ипатова, А.Г. Дмитриева. Биотестирование качества среды с использованием гидробионтов. – М.:2015г., 43 с.
6. Методические указания по разработке нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения /под редакцией к.б.н. С.А. Соколовой, М.В.) / М.: Изд-во ВНИРО, 2011г. – 165 с.
7. ГОСТ 32425-2013 Классификация опасности смесевой химической продукции по воздействию на окружающую среду.- Стандартиформ.- 2014 г.
8. ГОСТ 32424-2013 Классификация опасности химической продукции по воздействию на окружающую среду. Основные положения. М:Стандартиформ.- 2014 г.
9. ГОСТ Р 57455-2017 Руководство по применению критериев классификации опасности химической продукции по воздействию на окружающую среду. Острая токсичность для водной среды. - М.: Стандартиформ, 2017.
10. ГОСТ 33044-2014 Принципы надлежащей лабораторной практики (OECD Guide 1:1998, IDT) Издание официальное.- М:- Стандартиформ.-2015 г.
11. Согласованная на глобальном уровне система классификации и маркировки химических веществ (СГС) 4-е издание / Часть 4. Опасности для окружающей среды / Методические указания по оценке острой опасности для водной среды. Часть 9// Нью-Йорк и Женева, - 2013 г.
12. ГОСТ 31340-2013 Предупредительная маркировка химической продукции. Общие требования (Переиздание) - М:- Стандартиформ.- 2014 г.



Приложение 1

ПАСПОРТ БЕЗОПАСНОСТИ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ

Внесен в Регистр Паспортов безопасности

РПБ № 14399922-20-52409 от «20» июня 2018 г.
 Действителен до «20» июня 2029 г.

**Ассоциация «Некоммерческое партнерство
«Координационно-информационный центр государств-участников СНГ
по сближению регуляторных практик»**

Заместитель директора Муратова  **Н.М. Муратова**
 М.П. 

НАИМЕНОВАНИЕ

техническое (по ИД)	НОВОСИЛ, В/Э, 100 г/л
химическое (по IUPAC)	Отсутствует
торговое	Регулятор роста растений «НОВОСИЛ», В/Э, 100 г/л (тритерпеновые кислоты)
синонимы	Не имеет

Код ОКПД 2

20.20.13.120

Код ТН ВЭД

3808939000

Условное обозначение и наименование нормативного, технического или информационного документа на продукцию (ГОСТ, ТУ, ОСТ, СТО, (M)SDS)

ТУ 2449-003-03533895-01. НОВОСИЛ

ХАРАКТЕРИСТИКА ОПАСНОСТИ

Сигнальное слово	Осторожно
Краткая (словесная): Умеренно опасный продукт по степени воздействия на организм согласно ГОСТ 12.1.007. При попадании на кожу и в глаза вызывает раздражение. Вреден при вдыхании. При нарушении правил обращения и хранения может загрязнять объекты окружающей среды.	
Подробная: в 16-ти прилагаемых разделах Паспорта безопасности	

ОСНОВНЫЕ ОПАСНЫЕ КОМПОНЕНТЫ	ПДК р.л., мг/м ³	Класс опасности	№ CAS	№ ЕС
Тритерпеновые кислоты	не установлена	нет	нет	нет

ЗАЯВИТЕЛЬ: ООО НПП «БИОХИМЗАЩИТА», Новосибирская область, г. Бердск
 (наименование организации) (город)

Тип заявителя: производитель, поставщик, продавец, экспортер, импортер
 (ненужное зачеркнуть)

Код ОКПО 14399922

Телефон экстренной связи +7 (383) 212-59-22

Руководитель организации-заявителя

 **Фрольченко О. В.**
 (подпись) (расшифровка)



Приложение 2

Таблица 1. Измеренные значения показателей рН и растворенного кислорода в тестируемых растворах в эксперименте с дафниями

Вариант	рН, 0 ч	РК, 0 ч	рН, 48 ч	РК, 48 ч
Контроль	7,83	7,77	7,75	7,43
160 мг/мл	7,86	7,51	7,83	7,28

Таблица 2. Динамика численности клеток водорослей *Desmodesmus subspicatus* в контрольных пробах

Концентрация, мг/л	Биомасса, кл./мл, 24 ч	Биомасса, кл./мл, 48 ч	Биомасса, кл./мл, 72 ч
Контроль	19946	149593	575102
	19946	160674	606129
	18838	155134	576210
	18838	147377	570670
	18838	141836	554048
	16621	131864	520805

Таблица 3. Изменение специфической скорости роста в течение 72 ч в контрольных пробах

Параллельные контрольные пробы	24 ч	48 ч	72 ч	Ср.знач.	КИ ² в парал. пробах, %
К1	1,38	2,01	1,35	1,58	23,75
К2	1,38	2,09	1,33	1,60	26,44
К3	1,33	2,11	1,31	1,58	28,80
К4	1,33	2,06	1,35	1,58	26,23
К5	1,33	2,02	1,36	1,57	24,84
К6	1,20	2,07	1,37	1,55	29,74
КИ (< 7 %)	-			1,07	-
Ср. КИ (< 35 %)	-				26,63

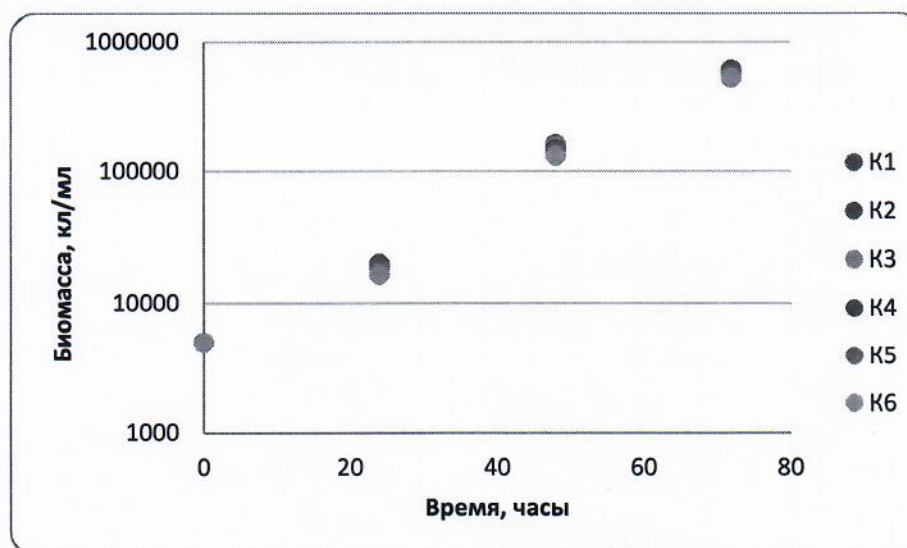


Рис.1. Кривые роста параллельных контрольных проб

² КИ – коэффициент изменчивости

Таблица 4. Изменение рН в контрольных пробах и растворах исследуемого вещества в эксперименте с *Desmodemus subspicatus*

№	Концентрация, мг/л	рН, 0 ч	рН, 72 часа
1	Контроль	7,41	7,49
2			7,48
3			7,45
4			7,49
5			7,51
6			7,45
9	100	7,41	7,44
10			7,43
11			7,46