

ЦЕНТР ЭКОПЕСТИЦИДНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ «ЭПИцентр»

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор Центра

Р.С. Аптикаев

«25» декабря 2023 г.



ОТЧЕТ

о научно-исследовательской работе

«Определение острой токсичности агрохимиката

Жидкое минеральное удобрение Элькиксир марка: Элькиксир Медь

для дождевых червей»

за 2023 год

Научный руководитель
и ответственный исполнитель работы
кандидат биологических наук

Р.А. Стрелецкий

Москва - 2023 г.

Оглавление

Реферат	3
Введение	4
1. Объекты и методы исследования.....	5
1.1. Характеристика тестируемого препарата и действующего вещества	5
1.2. Методика тестирования.....	6
1.2.1. Дождевые черви	6
1.2.2. Искусственная почва.....	6
1.2.3. Обработка почвы препаратом	7
1.2.4. План исследования	7
1.2.5. Условия опыта	8
1.2.6. Учет результатов	8
2. Аттестация метода.....	8
3. Результаты тестирования препарата Эльксир марка: Эльксир Медь и их обсуждение.....	9
Выводы	13
Литература	14
Приложение 1.....	15

Реферат

Отчет изложен на 16 страницах, содержит 8 таблиц и 1 рисунок.

В лабораторных условиях определены показатели острой токсичности препарата Эль-иксир марка: Эльиксир Медь для дождевых червей тестового вида *Eisenia fetida*. По полученным показателям ($LC_{50} = 937,379$ мг/кг) препарат относится к слаботоксичным агрохимикатам (3 класс опасности). Препарат Эльиксир марка: Эльиксир Медь влиял на живой вес дождевых червей в проведенном эксперименте при концентрации выше 500 мг/кг.

Ключевые слова: минеральное удобрение, Эльиксир, Эльиксир Медь, дождевые черви, острая токсичность.

Список исполнителей

Инженер-испытатель

Р.И. Пилик

Лаборант

Е.Ю. Смольский

Введение

Эльксир марка: Эльксир Медь – рекомендован к применению в качестве жидкого минерального удобрения с микроэлементами для предпосевной обработки семян и внесения в подкормку под различные сельскохозяйственные культуры и декоративные насаждения в открытом и защищенном грунте на всех типах почв и питательных субстратов.

Цель данного исследования – определение токсичности препарата Эльксир марка: Эльксир Медь для дождевых червей. Определение этого показателя является частью исследований, проводимых при регистрации агрохимикатов в Российской Федерации (раздел 7, п. 7.1., п. 7.1.1. «Сведения об агрохимикате»).

Работы выполнены в Центре экопестицидных исследований «ЭПИцентр», допущенном Минприроды РФ и Минсельхозом РФ к проведению регистрационных испытаний по экологической оценке пестицидов и агрохимикатов в Российской Федерации.

1. Объекты и методы исследования

1.1. Характеристика тестируемого препарата и действующего вещества

Нижеприведённые свойства взяты из заявки на регистрацию препарата [1].

Наименование препарата: Эликсир марка: Эликсир Медь.

Назначение: минеральное удобрение

Регистранты: ООО «ЦЕНТР РЕГИСТРАЦИИ» 123557, г. Москва, вн.тер.г. муниципальный округ Пресненский, ул. Малая Грузинская, д. 28, этаж 14, ком./офис 10/47, тел.: 8(926) 327-95-69, 8(929) 576-21-99, e-mail.: innovationmsk@mail.ru.

Изготовители продукта:

ООО «ЦЕНТР РЕГИСТРАЦИИ») 123557, г. Москва, вн.тер.г. муниципальный округ Пресненский, ул. Малая Грузинская, д. 28, этаж 14, ком./офис 10/47, тел.: 8(926) 327-95-69, 8(929) 576-21-99, e-mail.: innovationmsk@mail.ru.

Адрес производственной площадки:

225149, Республика Беларусь, Пружанский район, Брестская область, д. Оранчицы, ул. Сельхозтехники 8.

Культуры: см. таблица 1

Способ применения: см. таблица 1

Кратность обработок: см. таблица 1

Норма применения: см. таблица 1

Таблица 1. Сведения о применении препарата Эликсир марка: Эликсир Медь

Культура	Норма расхода препарата, л/га.	Способ, время обработки, особенности применения	Сроки ожидания (кратность обработок)	Расход рабочего раствора л/га
Зерновые, зернобобовые, технические, кормовые, овощные, бахчевые, цветочно-декоративные культуры	0,1-0,3	некорневая подкормка растений в течение вегетационного периода	- (1-4)	100-300
плодово-ягодные культуры, виноград	0,1-0,3	некорневая подкормка растений в течение вегетационного периода	- (1-4)	800-1000
технические, кормовые, овощные, бахчевые, плодово-ягодные, цветочно-декоративные культуры	0,5-1,5	– корневая подкормка растений (внесение с поливными водами) в течение вегетационного периода	- (1-4)	в зависимости от нормы полива

На испытание заказчиком (ООО «ЦЕНТР РЕГИСТРАЦИИ») был представлен образец препарата – Элькиксир марка: Элькиксир Медь в пластиковом флаконе заводского производства. Основные сведения о представленном в качестве образца для исследования препарате представлены в таблице 2.

Таблица 2. Основные сведения о препарате Элькиксир марка: Элькиксир Медь

Состав препарата	Действующие вещества: - хелат меди (ЭДТА) - № CAS 14025-15-1; - калий фосфорнокислый однозамещенный - № CAS 7778-77-0; - калий фосфорнокислый двухзамещенный 3-водный - № CAS 16788-57-1; - хелат цинка (ЭДТА) - № CAS 14025-21-9; - калий азотнокислый - № CAS 7757-79-1; - карбамид - № CAS 57-13-6; - вода водопроводная - № CAS 7732-18-5
Количество действующих веществ	Азот (N) общий, % не менее 3,0 Фосфор водорастворимый (P2O5), % не менее 1,6 Калий (K2O), % не менее 0,7 Цинк (Zn), % не менее 0,25 Медь (Cu), % не менее 5,5
Препаративная форма	Жидкость
Нормативная и/или техническая документация	Паспорт безопасности (Приложение 1)

1.2. Методика тестирования

Оценку острой токсичности препарата для дождевых червей проводили по методике, изложенной в ГОСТе 33036-2014 «Определение острой токсичности для дождевых червей» [2].

1.2.1. Дождевые черви

Тестируемые животные в количестве 180 шт., вида *Eisenia fetida fetida*, живой массой около 300-600 мг двухмесячного возраста (половозрелые) получены в результате разведения в лабораторных условиях согласно рекомендациям ГОСТа. Это не совсем типичный почвенный вид, хотя он и обнаружен в почвах, богатых органическими остатками. *Eisenia foetida* – основной вид, используемый для оценки токсичности пестицидов. Черви этого вида более чувствительны к химикатам, чем черви подлинных почвенных видов.

1.2.2. Искусственная почва

Искусственная почва, используемая в тесте, приготовлена из следующих компонентов:

70 % – Кварцевый песок (с преобладанием частиц 50 – 200 мкм – более 50 %);

20 % – Каолиновая глина (содержание каолина – более 30 %);

10% – Сфагновый торф (рН 5,5 – 6,0, верховой, воздушно-сухой влажности);

рН искусственной почвы находился в пределах 6,0 – 6,5.

Компоненты искусственной почвы тщательно перемешивали и доводили до влажности 35 %, которую рассчитывали по формуле:

$$W = m_1/m_2 \times 100 \%, \text{ где}$$

W – влажность почвы, %;

m₁ – масса воды в почве, г;

m₂ – масса сухой почвы, г

1.2.3. Обработка почвы препаратом

Червей помещали в стеклянные сосуды ёмкостью 1л с почвой, обработанной водным раствором препарата Эльксир марка: Эльксир Медь:

Таблица 3

Основной тест

Группа	Обработка	Концентрация препарата Эльксир марка: Эльксир Медь (в почве (мг/кг))
1	Контроль	0,0
2	Эльксир марка: Эльксир Медь	125
3	Эльксир марка: Эльксир Медь	250
4	Эльксир марка: Эльксир Медь	500
5	Эльксир марка: Эльксир Медь	1000
6	Эльксир марка: Эльксир Медь	1200

1.2.4. План исследования

План исследований представлен в таблице 4.

Таблица 4.

План исследования

День 0	Помещение червей в сосуд с искусственной почвой для акклиматизации
День 1	Обработка почвы препаратом. Взвешивание и посадка червей в сосуды по 10 шт.
День 14	Взвешивание и учет червей

1.2.5. Условия опыта

Сухую искусственную почву помещали в сосуды, затем добавляли дистиллированную воду, чтобы влажность почвы была около 30%. Затем растворяли тестируемое вещество в небольшом количестве дистиллированной воды и приливали к почве, доводя её влажность до требуемой (35%). В контроле использовали только дистиллированную воду без препарата. Масса влажной почвы в каждом сосуде составляла 750 г.

Дождевых червей для акклиматизации за сутки до проведения теста помещали в сосуд с необработанной искусственной почвой, а в первый день опыта, промыв червей в дистиллированной воде, пересаживали на поверхность обработанной почвы, расфасованной по сосудам. Сосуды накрывали стеклом.

Освещение поддерживалось круглосуточно в пределах 480 – 530 лк с помощью ламп дневного света. Температура в течение опыта находилась в пределах $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

1.2.6. Учет результатов

Подсчёт червей:

На 14-й день содержимое сосудов опрокидывали и исследовали. Погибшим считался червь, не реагирующий на механические раздражения, производимые по направлению от переднего конца к заднему.

Смертность:

Учет погибших червей и особей с патологическим поведением проводили по каждой группе и каждой повторности

Живая масса:

Взвешивание червей проводили на 1 и 14 дни

2. Аттестация метода

Для аттестации метода предварительно было проведено тестирование с веществом сравнения, в качестве которого использовался хлорацетамид. В связи с тем, что значение полураспада для этого вещества известно, можно судить о нашей компетенции.

Аттестация проводилась в апреле 2022 года.

Вещество сравнения:

Хлорацетамид

Условия аттестации:

Искусственная почва, приготовленная, как указано

выше. рН почвы находился в пределах $6,0 \pm 0,5$. Влажность почвы 35%. Температура $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Освещение 500 ± 100 лк.

Подопытные животные:

Дождевые черви *Eisenia fetida*

возрасте 3 – 3,5 месяца живой массой около 300-400 мг.

Количество червей – 240 шт.

Концентрация:

В связи с тем, что ориентировочное значение LC_{50} нам было известно, границы ранжированного ряда концентрации были следующими: 5 – 100 мг хлорацетамида/кг почвы.

Результаты:

Результаты аттестации приведены ниже в табл. 5

Таблица 5

Результаты определения LC_{50} хлорацетамида для дождевых червей вида *Eisenia fetida*

Группа	Концентрация вещества в почве, мг/кг	Количество червей в группе	Погибло червей на		Смертность, %
			7 день	14 день	
1	Контроль 0	30	0	0	0
2	Хлорацетамид 5	30	0	0	0
3	Хлорацетамид 20	30	15	8	76,7
4	Хлорацетамид 40	30	30	0	100
5	Хлорацетамид 80	30	30	0	100
6	Хлорацетамид 100	30	30	0	100

Значение LC_{50} для хлорацетамида составляет 19,00 мг/кг. По опубликованным данным LC_{50} для хлорацетамида составляет 10-40 мг/кг почвы [3]. Таким образом, условия проведения теста и квалификация персонала удовлетворяют необходимым требованиям.

3. Результаты тестирования препарата Элькиксир марка: Элькиксир Медь и их обсуждение

В основном тесте использовали 6 концентраций, их ранжированный ряд находился в пределах 0 – 1200 мг/кг препарата Элькиксир марка: Элькиксир Медь. Для каждой концентрации использовали 3 повторности (30 червей). Результаты определения смертности червей при проведении основного теста приведены в табл. 6. Смертность червей была отмечена с 1000 мг/кг. EC_{50} была рассчитана на основании данных, приведенных в таблице 6, с использованием логистической функции (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 8 («Продвинутые линейные/нелинейные модели» – «нелинейная оценка»). Применимость данной модели для наших данных подтверждается значимостью подобранных коэффициентов при $p=0,05$ (табл. 6).

Таблица 6

Результаты определения токсичности препарата Эльксир марка: Эльксир Медь для дождевых червей вида *Eisenia fetida*

Группа	Концентрация в почве, мг/кг препарата Эльксир марка: Эльксир Медь	Количество червей в группе	Погибло червей на 14 день	Смертность, %
1	Контроль, 0	30	0	0
2	125	30	0	0
3	250	30	0	0
4	500	30	0	0
5	1000	30	28	93
6	1200	30	30	100

Таблица 7

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	937,3788	4,593011	204,0881	0,000000	922,7618	951,9958
a	40,8084	3,061021	13,3316	0,000912	31,0669	50,5499

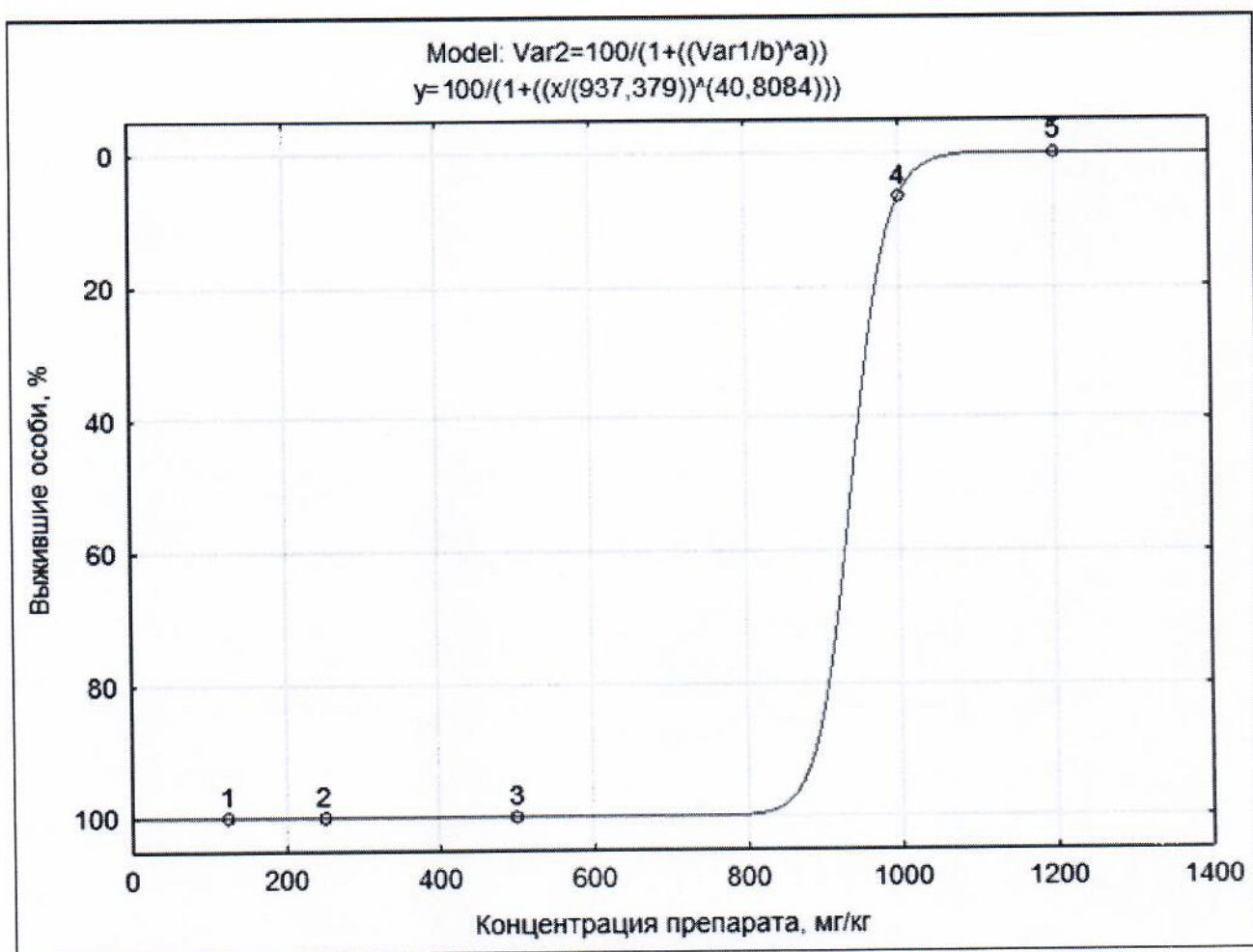


Рисунок 1. Зависимость смертности от концентрации препарата

Для препарата Эльксир марка: Эльксир Медь было установлено значение $LC_{50} = 937,379$ мг/кг (Рис. 1). Установлено, что препарат Эльксир марка: Эльксир Медь относится к слаботоксичным агрохимикатам (3 класс опасности) для дождевых червей.

Значимое уменьшение живой массы выживших червей при воздействии препарата Эльксир марка: Эльксир Медь отмечено при концентрации выше 500 мг/кг (табл. 8).

Нижний предел доверительного интервала $481,400$ мг/кг, верхний – $1825,256$ мг/кг. 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.

Таблица 8

Изменение живой массы дождевых червей в период проведения основного теста

Группа	Концентрация препарата Эльксир марка: Эльксир Медь, мг/кг почвы	Повторность	Живая масса червей (мг)		Изменение живой массы червей за 14 дней %
			1 сутки	14 сутки	
1	Контроль, 0	A	3590	2870	-20,1
		B	3640	2860	-21,4
		C	3670	2740	-25,3
		Средняя по группе	3633	2823	-22,3
2	125	A	3520	3120	-11,4
		B	3450	3090	-10,4
		C	3370	3030	-10,1
		Средняя по группе	3447	3080	-10,6
3	250	A	3620	3190	-11,9
		B	3480	3150	-9,5
		C	3290	2780	-15,5
		Средняя по группе	3463	3040	-12,3
4	500	A	3450	2820	-18,3
		B	3380	2710	-19,8
		C	3410	2740	-19,6
		Средняя по группе	3413	2757	-19,2
5	1000	A	3320	0	-100,0
		B	3150	340	-89,2
		C	3280	0	-100,0
		Средняя по группе	3250	113	-96,4
6	1200	A	3150	0	-100,0
		B	3410	0	-100,0
		C	3290	0	-100,0
		Средняя по группе	3283	0	-100,0

Выводы

Результаты лабораторных исследований по определению острой токсичности агрохимиката Эльксир марка: Эльксир Медь на дождевых червях вида *Eisenia fetida* показали следующее:

1. LC_{50} препарата для дождевых червей вида *Eisenia fetida* составила 937,379 мг/кг.
2. Препарат Эльксир марка: Эльксир Медь относится к слаботоксичным агрохимикатам (3 класс опасности).
3. Сублетальные эффекты, проявляющиеся в снижении живого веса червей, были отмечены в концентрации препарата свыше 500 мг/кг почвы.

Литература

1. СВЕДЕНИЯ ОБ АГРОХИМИКАТЕ Эльксир марка: Эльксир Медь, ООО «ЦЕНТР РЕГИСТРАЦИИ», 33 с.
2. ГОСТ 33036-2014 «Определение острой токсичности для дождевых червей». М., Стандартиформ, 2015, 8 с.
3. Ecotoxicology of Earthworms. General Editors: P.W. Greig-Smith, H. Becker, P.J. Edwards, F. Heimbach. Intercept Ltd, 1992, 269 pp.
4. Finney D.J. Probit Analysis (2nd Ed.). Journal of the Institute of Actuaries. 1952, v.78, № 3, p. 388-390.

Приложение 1.

ТУ 20.15.79 – 001 – 57155585 – 2022. Жидкое минеральное удобрение ЭльИксир	РПБ № Действителен до	стр. 3 из ...
-------------------------------------------------------------------------------	--------------------------	------------------

1 Идентификация химической продукции и сведения о производителе и/или поставщике

1.1 Идентификация химической продукции

1.1.1 Техническое наименование

1.1.2 Краткие рекомендации по применению
(в т.ч. ограничения по применению)

Применяется в качестве удобрения для предпосевной (предпосадочной) обработки семян (посадочного материала), корневых и некорневых подкормок всех сельскохозяйственных культур и декоративных насаждений, выращиваемых в открытом и защищенном грунтах на различных типах почв.

1.2 Сведения о производителе и/или поставщике

1.2.1 Полное официальное название организации

Общество с ограниченной ответственностью «ЦЕНТР РЕГИСТРАЦИИ»

1.2.2 Адрес
(почтовый и юридический)

почтовый: 127550, г. Москва ул. Прянишникова д.31А., каб. 320
юридический: 123557, г. Москва, вн.тер.г муниципальный округ Пресненский, ул. Малая Грузинская, д. 28, этаж

1.2.3 Телефон, в т.ч. для экстренных консультаций и ограничения по времени

8(926) 327-95-69, 8(929) 576-21-99

1.2.4 E-mail

innovationmsk@mail.ru

2 Идентификация опасности (опасностей)

2.1 Степень опасности химической продукции в целом
(сведения о классификации опасности в соответствии с законодательством РФ (ГОСТ 12.1.007-76) и СГС (ГОСТ 32419-2013, ГОСТ 32423-2013, ГОСТ 32424-2013, ГОСТ 32425-2013))

3 класс (умеренно опасные вещества) в соответствии с гигиенической классификацией пестицидов и агрохимикатов по ГОСТ 12.1.007-76. [2, 3, 4]
Согласно положениям ГОСТ 32419-2013 и ГОСТ 32423-2013 агрохимикат, может быть классифицирован как:

Класс 3 - по степени воздействия на кожу

Класс 3 – по степени воздействия на слизистую глаз.

Агрохимикат, не представляет опасности для окружающей среды и не подпадает под классификацию ГОСТ 32424-2013 и ГОСТ 32425-2013. [5,6,7,8,9]

2.2 Сведения о предупредительной маркировке по ГОСТ 31340-2013

2.2.1 Сигнальное слово

ОПАСНО

2.2.2 Символы (знаки) опасности

«Восклицательный знак», «Жидкости, выливающиеся из двух про-бюрок и поражающие металлы и руку», «Опасность для здоровья человека»



стр. 4 из ...	РГБ № Действителен до	ТУ 20.15.79 – 001 – 57155585 – 2022. Жидкое минеральное удобрение ЭльИксир
------------------	--------------------------	-------------------------------------------------------------------------------

2.2.3 Краткая характеристика опасности (H-фразы) H-316: При попадании на кожу вызывает слабое раздражение
H-320: При попадании в глаза вызывает раздражение
H-290: «Может вызывать коррозию металлов» [4,9,10]

3 Состав (информация о компонентах)

3.1 Сведения о продукции в целом

3.1.1 Химическое наименование

Отсутствует

(по IUPAC)

3.1.2 Химическая формула

Нет, смесь заданного состава.

3.1.3 Общая характеристика состава

(с учетом марочного ассортимента; способ получения)

Агрохимикат производится путем растворения в воде и смешивания в определенных соотношениях неорганических солей макро- и микроэлементов, комплексообразователей, хелатирующих агентов.

3.2 Компоненты

(наименование, номера CAS и EC, массовая доля (в сумме должно быть 100%), ПДК р.з. или ОБУВ р.з., классы опасности, ссылки на источники данных)

Таблица 1 [2]

Компоненты (наименование)	Массовая доля, %	Гигиенические нормативы в воздухе рабочей зоны		№ CAS	№ EC
		ПДК р.з., мг/м ³	Класс опасности		
Жидкое минеральное удобрение ЭльИксир марка: ЭльИксир Медь					
Вода водопроводная	42,43	нет	нет	7732-18-5	231-791-2
Хелат меди ЭДТА	40,0	нет	нет	14025-15-1	-
Калий фосфорнокислый однозамещенный	1,25	10,0	4	7778-77-0	231-913-4
Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный	2,74	10,0	4	16788-57-1	нет
Хелат цинка ЭДТА	2,0	нет	нет	14025-21-9	нет
Калий азотнокислый	1,29	5,0	3	7757-79-1	231-818-8
Карбамид	10,29	10,0	3	57-13-6	200-315-5