

Оценка токсичности регулятора роста растений на почвенных беспозвоночных *Eisenia fetida* и гидробионтов *Daphnia magna*

© 2017. О. В. Зайцева¹, магистрант,
С. М. Севостьянов², к. б. н., зав. лаб.,
Д. В. Дёмин², к. б. н., с. н. с.,

¹ Пущинский государственный естественно-научный институт,
142290, Россия, Московская обл., г. Пущино, проспект Науки, 3,

² Институт фундаментальных проблем биологии РАН,
142290, Россия, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, 2,
e-mail: lutralutra1992@mail.ru, Sevost2000@rambler.ru, nimedd@yandex.ru

Представлены результаты тестирования стимулятора роста растений Natural plant growth regulator (Biochemical Pesticide) на живых тест-объектах: почвенных беспозвоночных – червях *Eisenia fetida* Savigny и гидробионтах – *Daphnia magna* Straus. Препараты для стимуляции роста представляют собой сухой экстракт, полученный выделением физиологически активной фракции при ультра-фильтрационном разделении водорастворимых компонентов клеточного сока растительного сырья картофеля *Solanum tuberosum*. Препарат предназначен для предпосевной обработки семян и растений во время вегетационного периода. Для оценки безопасности препаратов для экосистем была проведена оценка его воздействия на живые организмы с целью определения безопасных концентраций. Показано, что для тест-объектов действующие концентрации значительно отличаются, при этом они значительно выше концентраций, рекомендуемых к использованию для обработки растений. Концентрация 10 мг/л оказалась безопасной для живых организмов (за исключением фильтрата для дафний в хроническом опыте).

Ключевые слова: биотестирование, стимулятор роста, *Eisenia fetida*, *Daphnia magna*, острая токсичность, субхроническая токсичность.

Evaluation of the toxicity of plant growth regulator on soil invertebrates *Eisenia fetida* and aquatic *Daphnia magna*

O. V. Zaytseva¹, S. M. Sevostyanov², D. V. Demin²,

¹ Pushchino State Institute of Natural Sciences,

3 Prospect of Science, Pushchino, Moscow region, Russia, 142290,

² Institute of Basic Biological Problems Russian Academy of Sciences,

2 Institutskaya St., Pushchino, Moscow region, Russia, 142290,

e-mail: lutralutra1992@mail.ru, Sevost2000@rambler.ru, nimedd@yandex.ru

The production of environmentally friendly products is one of the promising directions in agriculture. Using of biological growth stimulants is an important direction that allows spurring the growth and cultivation of plants at various stages of development without big expenses on chemical products and promoting one-time shoots, reducing the probability of damage by pests, especially at the early stages of ontogeny. The assessment of safety of biological plant growth stimulants for the environment is one of the important points in the study of them. In our article natural plant growth regulator (Biochemical Pesticide) test results are shown on the living test objects, such as invertebrate earthworms *Eisenia fetida* Savigny and hydrobionts *Daphnia magna* Straus. Samples of the plant growth regulator are presented in the form of a dry extract that was obtained by separation of physiologically active fraction of potato plant (*Solanum tuberosum*) cells via ultrafiltration. It was designed for plant leaves treatment and seeds preparation prior to planting. It was tested for ecosystem safety compliance by exposure to living organisms in order to estimate a safe concentration. It was shown that concentrations used for a test objects were significantly higher than the ones recommended for plants treatment. Content 10^{-3} proved safe for living organisms (except filtrate for *Daphnia* in chronic experiment). Concentration offered for use is 10^{-3} – 10^{-9} %. In addition, it was found that after dilution of the preparation of the dry extract, over time, it quickly loses its properties, i. e. it is not persistent, so when in use it will not have any negative impact on the environment.

Keywords: biological testing, augmenter, *Eisenia fetida*, *Daphnia magna*, acute toxicity, sub-chronic toxicity.

Стремление добиться увеличения объёма и качества урожая побуждает исследователей искать пути к повышению эффективности агротехнологий. В последние десятилетия интенсивно ведутся работы по поиску физиологически активных веществ, обладающих ростостимулирующей активностью. К числу приёмов, направленных на повышение энергии прорастания и всхожести семян, можно отнести их предпосевную обработку методом замачивания в растворах сверхмалых концентраций регуляторов роста растений [1].

Важным фактором для применения стимуляторов роста является их безопасность для почвенных организмов и обитателей поверхностных вод.

Одним из таких перспективных препаратов является стимулятор роста растений «Рафитур» (РФУ) [1], который представляет собой сухой растительный экстракт после ультрафильтрационной сепарации и лиофильной сушки продуктов водной экстракции в процессе механохимической активации растительного сырья (проростки *Solanum tuberosum*).

Целью нашего исследования являлась оценка воздействия данного препарата и его фракций на живые организмы для оценки безопасности их применения.

Объекты и методы

Препарат «Рафитур» представляет собой сухой растительный экстракт после ультрафильтрационной сепарации ($\Delta P = 0,2$ атм.) и лиофильной сушки продуктов водной экстракции в процессе механохимической активации растительного сырья (проростки *Solanum tuberosum*) методом истирания и экструзии. В ходе подбора оптимальных параметров ультрафильтрационного фракционирования компонентов растительного экстракта были выделены три варианта препарата:

1) РФУ – концентрат (ретант, полученный на полуволоконном модуле Faserkraft УФ-3-30-ПС с номинально отсекаемой молекулярной массой 30 кДа) (препарат 1);

2) РФУ – фильтрат (пермеат, полученный на полуволоконном модуле Faserkraft УФ-3-30-ПС с номинально отсекаемой молекулярной массой 30 кДа) (препарат 2);

3) Рафитур М001 – фильтрат (пермеат, полученный на полуволоконном модуле Faserkraft УФ-3-1-ПВХ с номинально отсекаемой молекулярной массой 1 кДа) (препарат 3).

Общий состав стимулятора роста растений: белок, моно- и дисахариды (фруктоза,

глюкоза, сахароза, мальтоза), свободные аминокислоты (гидроксипролин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, пролин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, тирозин), микро- и макроэлементы (калий, натрий, кальций, магний, фосфор, железо, марганец, цинк), оксикарбоновые кислоты (лимонная, яблочная).

В качестве тест-объектов в исследовании были использованы почвенные беспозвоночные – дождевые черви *Eisenia fetida*, водные беспозвоночные – ракообразные-фильтраторы дафнии *Daphnia magna*.

Тестирование острой токсичности препарата для дождевых червей проводили по модификации методики международного стандарта ИСО 11268 [2]. Контролем служил субстрат следующего состава: 80 г суглинок, 20 г каолинит, 350 г песок, 50 г торф по сухому весу. РФУ в субстрат вносили в виде растворов, обеспечивающих концентрацию 0,1; 0,5 г/кг. Количество и массу червей определяли на 7 и 14 сутки эксперимента.

Культура *Daphnia magna* получена в НИЦ «Токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов» в 1999 г., и культивируется в лабораторных условиях в лаборатории функциональной экологии Института фундаментальных проблем биологии РАН (г. Пущино) для биотестирования [3]. Для тестирования токсичности в сосуды наливали по 100 мл контрольной или тестируемой воды. В каждый сосуд помещали по 10 односуточных дафний и экспонировали при оптимальных условиях в течение 96 часов. Повторность трёхкратная. При кратковременном биотестировании дафний не кормили, учёт выживаемости проводили через 1, 6, 24, 48, 72 и 96 часов. Если в любой учитываемый период времени гибло 50 и более процентов дафний, биотестирование прекращали. рН растворов в начале эксперимента составляло РФУ-ретант 1000 мг/кг – 6,84; РФУ-пермиант 1000 мг/кг – 6,89 (препараты 1 и 2 соответственно).

Оценка субхронической токсичности на дафниях проводилась следующим образом: объём пробы воды или водной вытяжки для биотестирования без разбавления составлял 1 литр. Далее в сосуды наливали по 300 мл контрольной и тестируемой водной вытяжки. Повторность трёхкратная. В каждый сосуд вносили одинаковое количество корма, помещали по 10 дафний (самок). Дафний кормили ежесуточно. Три раза в неделю в сосудах с дафниями проводили смену контрольного и тестируемого раствора на свежеприготов-

ленные. При смене воды дафний кормили за 3 часа до смены. С момента появления молоди в те сутки, когда меняли воду, производили учёт выживших исходных самок и выметанной молоди. Для этого самок с помощью стеклянной трубки пересаживали в заранее подготовленные сосуды с контрольной и тестируемой водой и подсчитывали их количество в каждом сосуде. Оставшуюся воду процеживали через сито из мельничного газа. При этом на сите оставалась выметанная молодь, которую подсчитывали и удаляли [3, 4]. Учёт показателей жизнедеятельности дафний производили на 3, 7, 15 и 23 сутки эксперимента.

Результаты и их обсуждение

Тестирование острой токсичности препарата для дождевых червей показало, что препараты 1 и 3 являются безопасными в концентрациях 0,1 г/кг (достоверного отличия с контролем по U-критерию Манна-Уитни нет). Препараты 1 и 2 не оказывают негативного эффекта при их содержании в количестве 0,5 г/кг (табл. 1 и 2).

Оценка острой и субхронической токсичности препарата для дафний показала, что при концентрации 10 мг/л в остром опыте выживаемость дафний составила 100%. При более высоких концентрациях появляется разброс данных. Для препаратов 1 и 2 при 50 мг/л и 100 мг/л в растворах фиксируется 100% гибель через 72 часа, кроме раствора фильтрата с концентрацией 100 мг/л, где

гибель зафиксирована через 48 часов. При концентрации 500 мг/л обоих препаратов 100% гибель наступает в течение 6 часов. Для препарата 3 при концентрации 50 мг/л наблюдалась гибель всех тест-объектов через 96 часов, при 100 мг/л и 500 мг/л – через 48 часов. Следовательно, препарат 3 был менее токсичен, чем 1 и 2 (табл. 3).

В хроническом опыте с дафниями определено, что растворы фильтрата и концентрата в концентрациях 10 мг/л приводят к увеличению гибели взрослых дафний по сравнению с контролем. Достоверное отличие (то есть наличие токсического действия среды на дафнии [4]) наблюдается только в варианте с использованием фильтрата в концентрации 10 мг/л. При этой же концентрации получена максимальная плодовитость, она была выше, чем в контроле и при концентрации 1 мг/л (табл. 4). При этом в концентрации 1 мг/л (массовая доля 10^{-6}) выживаемость взрослых дафний была равной контролю. Объяснением такого результата могут быть свойства растворов, а именно, их нестойкость во времени. После перемещения дафний в свежий раствор (по методике каждые трое суток) они испытывают максимальное воздействие, что приводит со временем к гибели наименее устойчивых особей. Далее происходит потеря активности растворов, учитывая малые концентрации и внесение корма. Так как данные растворы не оказывают негативного воздействия на почвенные микроорганизмы, логично предположить, что они не оказывают выраженного

Таблица 1
Острая летальная токсичность для червей стимулятора роста растений «Рафитур» (РФУ) и его фракций

Сутки	Вариант						
	Контроль	РФУ-к			РФУ-ф		
		0,1 г/кг	0,5 г/кг	1 г/кг	0,1 г/кг	0,5 г/кг	1 г/кг
7	10	10	8,67±2,31	0	10	0	0
14	10	10	8,67±2,31	0	10	0	0

Примечание: РФУ-к – РФУ-концентрат, РФУ-ф – РФУ-фильтрат.

Таблица 2
Изменение массы червей под действием стимулятора роста растений «Рафитур» (РФУ)

Сутки	Вариант						
	Контроль	РФУ-к			РФУ-ф		
		0,1 г/кг	0,5 г/кг	1 г/кг	0,1 г/кг	0,5 г/кг	1 г/кг
0	5,97±0,31	5,53±0,31	5,65±0,11	5,97±0,21	5,62±0,05	5,57±0,24	5,98±0,50
7	5,90±0,26	5,63±0,25	4,50±1,76	0,00	5,66±0,23	0,00	0,00
14	5,91±0,37	5,53±0,27	4,40±1,78	0,00	5,44±0,08	0,00	0,00

Примечание: РФУ-к – РФУ-концентрат, РФУ-ф – РФУ-фильтрат.

Таблица 3

Выживаемость *Daphnia magna* в остром эксперименте в ряду разведений препарата «Рафитур» (РФУ) и его фракций

Концентрация	Препарат	Время экспозиции, часы					
		1 ч	6 ч	24 ч	48 ч	72 ч	96 ч
Контроль	вода	10	10	10	10	10	9,3±0,6
	вода	10	10	10	10	10	10
	вода	10	10	10	10	10	10
10 мг/л	РФУ-к	10	10	10	10	10	10
	РФУ-ф	10	10	10	10	10	10
	Рафитур М001-ф	10	10	10	10	10	10
50 мг/л	РФУ-к	10	9,0±1,7	7,7±3,2	1,7±1,2	0	0
	РФУ-ф	10	10	8,3±1,5	3,0±2,7	0	0
	Рафитур М001-ф	10	10	10	5,3±1,2	3,0±2,0	0
100 мг/л	РФУ-к	10	9,7±0,6	6,0±1,0	0,3±0,6	0	0
	РФУ-ф	10	8,7±1,5	6,3±4,6	0	0	0
	Рафитур М001-ф	10	8,3±1,2	8,3±1,2	0	0	0
500 мг/л	РФУ-к	0	0	0	0	0	0
	РФУ-ф	0	0	0	0	0	0
	Рафитур М001-ф	10	9,3±0,6	1,3±0,6	0	0	0

Примечание: РФУ-к – РФУ-концентрат, РФУ-ф – РФУ-фильтрат.

Таблица 4

Показатель плодовитости дафний в субхроническом опыте с препаратом «Рафитур» (РФУ) и его фракциями

Сутки	Контроль	РФУ-к		РФУ-ф	
		10 мг/л	1 мг/л	10 мг/л	1 мг/л
3	0,04±0,04	0,04±0,04	0,07±0,04	0,08±0,08	0,03±0,03
7	0,94±0,31	0,31±0,19	0,46±0,24	0,66±0,36	0,50±0,14
15	1,10±0,62	1,96±0,30	0,91±0,18	5,03±3,65	0,97±0,28
23	1,07±0,24	1,36±0,75	0,60±0,08	2,51±1,28	0,7±0,24

Примечание: РФУ-к – РФУ-концентрат, РФУ-ф – РФУ-фильтрат.

негативного влияния на микроводоросли, используемые для корма. Таким образом, в условиях регулярного обновления растворов на свежеприготовленные, при концентрации 10 мг/л, происходит гибель наиболее чувствительных особей.

Действие препаратов на тест-объекты проявляются по разному, общей безопасной концентрации нами не обнаружено: для червей – от 100 мг/кг (10^{-4}), для дафний – абсолютно безопасна концентрация 10 мг/л (10^{-5}).

Таким образом, предлагаемые для использования препараты концентрации 10^{-3} – 10^{-9} % [1] значительно меньше концентраций, оказавших негативное воздействие на тест-объекты в опытах.

После разведения препараты со временем теряют свои свойства, то есть не являются стойкими, поэтому исследуемые препараты, при их использовании, не могут оказывать негативного воздействия на окружающую среду в рекомендуемых концентрациях.

В заключении следует отметить, что методы биотестирования сами по себе не раскрывают причин токсичности и не заменяют аналитического контроля химического состава исследуемых объектов, а лишь дополняют его, позволяя прогнозировать воздействие объектов на биоту [6]. Другим важным моментом проведённых исследований является сопоставимость результатов аналогичных методик биотестирования, выполненных в различных лабораториях [7]. Результаты биотестирования с использованием живых организмов являются общепринятым в мировой практике критерием оценки безопасности регуляторов роста растений.

Литература

1. Багнавец Н.Л., Белоухов С.Л., Филиппова А.В. Применение биопрепарата РФУ для предпосевной обработки риса // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2015. № 4 (54). С. 41–43.

2. Фомин Г.С., Фомин А.Г. Определение загрязнения по острой летальной токсичности у земляных червей (ИСО 11268) / Почва. Контроль качества и экологической безопасности по международным стандартам: Справочник. М.: Издательство «Протектор», 2001. 304 с.

3. Методика биотестирования загрязнителей почвы. НИЦ ТБП, 1996. 10 с.

4. Москалёв А.А., Новаковский А.Б. Статистические методы в экологии с использованием R, Statistica, Excel и SPSS: учебное пособие. Сыктывкар: Изд-во СыктГУ, 2014. 197 с.

5. Брагинский Л.П. Методологические аспекты токсикологического биотестирования на *Daphnia magna* Str. и других ветвистоусых ракообразных (критический обзор) // Гидробиологический журнал. 2000. Т. 36. № 5. С. 50–70.

6. Селивановская С.Ю., Латыпова В.З. Обоснование системы экспериментальной оценки класса токсичности осадков сточных вод и выбора способов их утилизации // Экологическая химия. 2001. Т. 10. Вып. 2. С. 124–134.

7. Броновицкая Е.А., Петраш В.В., Ашихмина Т.Я., Кондакова Л.В. Сопоставительная оценка токсичности поверхностных вод и почвы по результатам биотестирования двумя независимыми лабораториями // Теоретическая и прикладная экология. 2015. № 4. С. 59–63.

References

1. Bagnavets N.L., Belopukhov S.L., Filippova A.V. Application of the vegetative phyto-regulator of yields

in pre-sowing rice treatment // Izvestia Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. 2015. № 4 (54). P. 41–43 (in Russian).

2. Fomin G.S., Fomin A.G. Identification of pollution by acute lethal toxicity of earthworms (ISO 11268) / Soil. Control of quality and environmental safety by international standards. Spravochnik. M.: “Protector”, 2001. 304 p. (in Russian).

3. Methods of biological testing of soil pollutants. NITS TBP, 1996. 10 p. (in Russian).

4. Moskalev A.A., Nowakowski A.B. Statistical methods in ecology with using R, Statistica, Excel and SPSS: a tutorial. Syktyvkar: Izd-vo SyktGU, 2014. 197 p. (in Russian).

5. Braginsky L.P. Methodological aspects of toxicology bioassay on *Daphnia magna* Str. and other cladocerans (critical review) // Gidrobiol. Zhurn. 2000. T. 36. № 5. P. 50–70 (in Russian).

6. Selivanovskaya S.Y., Latypova V.Z. Justification of system experimental evaluation toxicity class of sewage sludge and the choice of methods for their disposal // Ecologicheskaya khimiya. 2001. T. 10. Vyp. 2. P. 124–134 (in Russian).

7. Bronovitskaya E.A., Petrash V.V., Ashikhmina T.Ya., Kondakova L.V. Comparative evaluation of toxicity of surface water and soil according to the results of biotesting by two independent laboratories // Theoretical and Applied Ecology. 2015. № 4. P. 59–63 (in Russian).