

**ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
МЕТИЛОВОГО ЭФИРА РАПСОВОГО МАСЛА
НА ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ВЕТВИСТОУСЫХ
РАКООБРАЗНЫХ И РЫБ**

© 2023 г. Е.А. Федорова, Н.И. Щербакова

*Азово-Черноморский филиал Всероссийский научно-исследовательский
институт рыбного хозяйства и океанографии (АзНИИРХ),
Ростов-на-Дону, 344002
E-mail: scherbakova_n_i@azniirkh.ru*

Поступила в редакцию 28.11.2022 г.

Исследовано воздействие метилового эфира рапсового масла (МЭРМ) на ветвистоусых ракообразных – дафнии (*Daphnia magna*), эмбрионов и предличинок рыб – бычка-кругляка (*Neogobius melanostomus*). Установлено, что при увеличении содержания МЭРМ в воде отмечалось снижение выживаемости, плодовитости, численности и биомассы популяции дафний; снижение выживаемости эмбрионов и мальков бычка-кругляка, линейного и весового роста мальков. МЭРМ не оказывал тератогенного действия на эмбрионов и мальков бычка-кругляка в исследованном диапазоне концентраций в 1,25–100,0 мг/л. По экспериментальным данным установлены недействующие и пороговые концентрации МЭРМ.

Ключевые слова: метиловый эфир рапсового масла (МЭРМ), ветвистоусые ракообразные, эмбрионы рыб, предличинки рыб, токсичность, выживаемость, плодовитость, численность, биомасса, длина, масса, тератогенный эффект.

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия всё более актуальной становится проблема поиска альтернативных видов топлива, получаемых из возобновляемых источников энергии, способных заменить традиционное нефтяное. Всё большее распространение на транспорте, в том числе и водном, получает использование топлива растительного происхождения. Сырьём для производства биодизельного топлива служат масла различных растений. Так в Европе – это рапс, в США – соя, в Индонезии и на Филиппинах – пальмы (пальмовое масло), в Китае, Японии, Индонезии – арахис (Марков и др., 2008; Девянин и др., 2008). Концепцией развития аграрной

науки и научного обеспечения агропромышленного комплекса Российской Федерации на период до 2025 г., утверждённой приказом Минсельхоза России от 25 июня 2007 г. № 342, одним из приоритетных направлений развития аграрной науки и научного обеспечения агропромышленного комплекса России является разработка оборудования с использованием возобновляемых источников энергии, в том числе биотоплива. Наиболее перспективное направление – использование в отечественных транспортных дизелях альтернативного топлива – метилового эфира рапсового масла (Марков и др., 2010).

Однако, поступая из антропогенных источников, МЭРМ может оказывать влияние на водные экосистемы как

пресноводные, так и морские. Степень токсического воздействия МЭРМ на водные биоценозы не установлена, не исследована его потенциальная опасность для гидробионтов.

В связи с этим, целью работы стало исследование степени токсического действия МЭРМ на гидробионтов – представителей наиболее чувствительных тест-объектов при проведении токсикологических исследований – ветвистоусых ракообразных, эмбрионов и мальков рыб (Патент..., 2012).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследований были представители ветвистоусых ракообразных – *Daphnia magna* (Straus) и рыб – эмбрионы и мальки бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* (Pallas).

Материалом для исследований служил метиловый эфир рапсового масла (МЭРМ), No. CAS 85586-25-0. Производитель – фирма «Байер КропСайенс АГ» (Германия).

Постановка экспериментов осуществлялась в соответствии с Методическими указаниями по разработке нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения, утвержденными Приказом Росрыболовства от 4 августа 2009 г. №695 (с изменениями на 22 декабря 2016 года).

Диапазон исследуемых концентраций МЭРМ на дафний – от 1,0 до 250,0 мг/л, на эмбрионов бычка – от 6,25 до 100,0 мг/л, на мальков бычка – от 1,25 до 50,0 мг/л.

При проведении эксперимента на дафниях в химические ёмкости вносили исследуемое вещество, создавая ряд

заданных концентраций. Регистрировали показатели выживаемости дафний путем систематического наблюдения и учёта живых и погибших организмов на протяжении острого опыта продолжительностью 48 ч. Устанавливалась зависимость выживаемости дафний от концентрации МЭРМ и времени его воздействия. Температура при проведении эксперимента поддерживалась на уровне 18–22°C, содержание растворенного кислорода – 7–8 мг/л. Исследовались биологические показатели жизнедеятельности зоопланктонных организмов: выживаемость, скорость полового созревания, плодовитость, численность, биомасса и возрастной состав популяции. Продолжительность эксперимента составляла 20 сут.

Икра бычка-кругляка собиралась в природном морском водоёме (Таганрогский залив) в период массового нереста. Оплодотворённую в естественных условиях икру на стадии ранней гаструлы снимали с субстрата и помещали в ёмкости объёмом 1 литр с растворами МЭРМ. Продолжительность эксперимента составляла 14 сут. Токсическое действие МЭРМ на развивающихся эмбрионах оценивали по следующим показателям: выживаемость, скорость прохождения стадий, длительность инкубационного периода, динамика выклева, аномалии в развитии (тератогенный эффект).

Влияние МЭРМ на раннее постэмбриональное развитие изучали на мальках бычка-кругляка, выклюнувшихся в лабораторных условиях. Экспозиция опытов составляла 7 сут. (от выклева до полного рассасывания желточного мешка). В течение эксперимента наблюдали за выживаемостью мальков. В конце опыта определяли темп линейного и весового роста мальков.

Все варианты опыта проводили по три раза. Контрольные варианты ставили в аналогичных условиях, но без внесения МЭРМ. Полученные в экспериментах результаты подвергали статистической обработке, используя критерий Стьюдента (t).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для предварительной оценки токсичности МЭРМ был проведён острый опыт по выживаемости *Daphnia magna* в токсических растворах с различным содержанием пестицида. Токсикометрические параметры МЭРМ, рассчитанные на основе выживаемости ветвистоусых ракообразных, в остром эксперименте (табл. 1).

Рассчитанная среднелетальная концентрация позволила определить, что МЭРМ относится к группе малотоксичных пестицидов для дафний ($50,0 < ЛК_{50} < 500,0$ мг/л) (Лесников, Врочинский, 1974). Для определения границ чувствительности ветвистоусых ракообразных к действию МЭРМ проводились хронические эксперименты, в ходе которых изучались процессы жизнедеятельности дафний. На основе изучения выживаемости дафний в токсических средах МЭРМ определены токсикометрические параметры (табл. 2). Исследования показали, что при концентрации метилового эфира рапсового масла в 1,0 мг/л гибель рачков не наблюдалась. При концентрациях в 5,0 мг/л и

Таблица 1. Основные токсикометрические параметры МЭРМ для дафний в остром эксперименте, мг/л

Экспозиция опыта, сутки	Концентрация, мг/л	Количество, экз.	Количество погибших рачков		Токсикометрические параметры, мг/л
			экз.	%	
2	Контроль	30	0	0	$ЛК_0 = 5,0$
	5,0		0	0	$ЛК_{16} = 20,44$
	10,0		2	7	$ЛК_{50} = 82,49$
	50,0		12	40	$ЛК_{84} = 116,54$
	100,0		18	60	$ЛК_{100} = 201,77$
	250,0		30	100	

Таблица 2. Основные токсикометрические параметры пестицида МЭРМ для дафний в хроническом эксперименте, мг/л

Экспозиция опыта, сутки	Концентрация, мг/л	Количество экз.	Количество погибших рачков		Токсикометрические параметры, мг/л
			экз.	%	
20	Контроль	30	0	0	$ЛК_0 = 1,0$
	1,0		0	0	$ЛК_{16} = 6,07$
	5,0		3	10	$ЛК_{50} = 32,87$
	10,0		12	40	$ЛК_{84} = 74,61$
	50,0		19	63	$ЛК_{100} = 98,52$
	100,0		30	100	

10,0 мг/л гибель животных составила 10% и 40% по сравнению с контролем. Высокой токсичностью отличалась концентрация в 50,0 мг/л, при которой погибло 63% дафний. При концентрации пестицида в 100,0 мг/л наблюдалась полная гибель рачков.

Дафнии являются организмами с коротким биологическим циклом развития, что дало возможность определить воздействие различных концентраций пестицидов на ряд поколений и определить накопление их отрицательного влияния в трёх последовательных генерациях рачков. Так, в хроническом эксперименте установлено, что МЭРМ в концентрации 5,0 мг/л угнетающе действовал на репродуктивную функцию рачков исходного поколения. Плодовитость особей материнского поколения (исходного), экспонируемых в растворах МЭРМ, достоверно ниже плодовитости у дафний в контрольном варианте. Плодовитость экспонируемого в растворе МЭРМ особей в трёх последующих поколениях также достоверно ниже плодовитости рачков в контроле. Снижение плодовитости происходило за счёт увеличения времени созревания и уменьшения количества помётов. При концентрации в 50,0 мг/л МЭРМ снижение плодовитости дафний достигло максимального значения в третьем поколении и составило 38%. На уровне контроля реальная плодовитость дафний, определяемая общим количеством народившейся жизнеспособной молодежи от одной самки, в исходном и последующих трёх поколениях оставалась лишь при концентрации в 1,0 мг/л МЭРМ (табл. 3).

Изучение возрастного состава популяции зоопланктёров при действии неблагоприятных факторов среды необходимо для прогнозирования колебаний численности организмов: снижение численности молодежи является сим-

птомом неблагополучия, тем более что для кладоцер характерны популяции с постоянным возрастным составом (Гилларов, 1987). Численность молодежи и половозрелых особей в растворах с концентрацией 1,0 мг/л МЭРМ достоверно не отличалась от контроля. Снижение общей численности популяций дафний начиналось в растворах с содержанием 5,0 мг/л МЭРМ, где расхождение с контролем составляло 26%, при этом снижалось как количество молодежи, так и число половозрелых особей. С увеличением концентрации пестицида признаки, характеризующие неблагоприятное состояние популяции, характеризовались более ярко. Так, в растворах с максимальной исследованной концентрацией МЭРМ (50,0 мг/л) расхождение с контролем по показателю общей численности составило 46%, при этом количество молодежи снизилось на 56%, а половозрелых особей на 44%. МЭРМ во всех исследованных концентрациях не оказывал существенного влияния на соотношение возрастных групп в популяции дафний. Ювенильные особи по численности доминировали над половозрелыми рачками (табл. 4).

Отрицательное влияние на биомассу популяции дафний пестицид оказывал при тех же концентрациях 5,0 мг/л, 10,0 мг/л и 50,0 мг/л, где она снизилась на 25%, 41% и 48% соответственно. При концентрации МЭРМ в 1,0 мг/л биомасса ракообразных находилась на уровне контроля.

Исследования на эмбрионах и мальках бычка-кругляка показали следующее. С увеличением концентраций МЭРМ снижалась выживаемость эмбрионов бычка-кругляка. Установленная в эксперименте концентрация МЭРМ, недействующая на выживаемость эмбрионов, равна 6,25 мг/л. Выживаемость бычка-кругляка в эм-

ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

Таблица 3. Показатели плодовитости дафний трёх поколений в различных концентрациях МЭРМ

Концентрация, мг/л	Наступление половой зрелости, сутки	Появление I помета, сутки	Количество пометов	Реальная плодовитость одной самки (шт.)		
				M±m	t	p
Исходное поколение						
Контроль	6	8	4	7,51±0,85		
1,0	6	8	4	6,51±0,60	1,0	>0,05
5,0	6	8	4	5,51±0,55	2,0	<0,05
10,0	6	8	4	5,04±0,55	2,5	<0,05
50,0	6	8	4	4,67±0,46	2,9	<0,05
I поколение						
Контроль	5	7	4	7,63±0,52		
1,0	5	7	4	7,56±0,61	0,1	>0,05
5,0	5	7	4	5,76±0,64	2,3	<0,05
10,0	5	7	4	4,74±0,51	3,9	<0,05
50,0	5	7	4	4,35±0,46	4,7	<0,05
II поколение						
Контроль	6	8	4	7,75±0,51		
1,0	6	8	4	6,49±0,56	1,7	>0,05
5,0	6	8	4	5,83±0,51	2,7	<0,05
10,0	6	8	4	5,32±0,55	3,2	<0,05
50,0	6	8	4	4,64±0,49	4,4	<0,05
III поколение						
Контроль	7	9	4	6,14±0,52		
1,0	7	9	4	5,13±0,49	1,4	>0,05
5,0	7	9	4	4,47±0,63	2,0	<0,05
10,0	7	9	4	4,06±0,35	3,3	<0,05
50,0	7	9	4	3,81±0,38	3,6	<0,05

Примечание: P – вероятность.

бриональный период в растворах при концентрациях МЭРМ в 12,5 мг/л, 25,0 мг/л, 50,0 мг/л и 100,0 мг/л статистически достоверно отличалась от контроля (табл. 5). В растворах с концентрацией 100,0 мг/л погибли почти все исследуемые организмы. Массовая гибель эмбрионов наступила на этапе, когда начинались первые сокращения сердца. Продолжительность этапов эм-

бриогенеза бычка-кругляка в опытных растворах МЭРМ не отличалась от контроля. Единичный и массовый выклев бычка-кругляка в растворах с диапазоном концентраций МЭРМ в 6,25–50,0 мг/л также проходил синхронно с контролем. Отклонений от нормы в строении выклюнувшихся мальков бычка, развивающихся в МЭРМ, не выявлено.

Таблица 4. Изменение численности, возрастного состава и биомассы популяции дафний в различных концентрациях МЭРМ

Концентрация, мг/л	Статист. показатели	Численность, экз.			Соотношение молоди и взрослых	Биомасса, мг
		молодь	самки	всего		
Контроль	M±m	179,67±0,88	34,33±3,48	214,0±4,36	5,2:1	193,67±5,78
1,0	M±m	175,33±2,03	25,0±2,89	200,33±4,37	7,0:1	189,33±0,67
	t	2,0	2,1	2,2		0,7
	p	>0,05	>0,05	>0,05		>0,05
5,0	M±m	134,67±0,33	24,33±0,67	159,0±1,0	5,5:1	145,0±5,0
	t	47,7	2,8	12,3		6,4
	p	<0,05	<0,05	<0,05		<0,05
10,0	M±m	115,0±5,0	18,33±0,33	133,33±5,17	6,3:1	115,0±8,67
	t	12,7	4,6	12,0		7,6
	p	<0,05	<0,05	<0,05		<0,05
50,0	M±m	100,33±5,81	15,0±0,58	115,33±5,49	6,7:1	100,33±6,06
	t	13,5	5,5	14,1		11,1
	p	<0,05	<0,05	<0,05		<0,05

Таблица 5. Влияние МЭРМ на выживаемость эмбрионов бычка-кругляка

Концентрация, мг/л	Количество выживших, экз.	Выживаемость в эмбриональный период, %		
		M ± m	p	t
Контроль	88	97,78±1,11		
6,25	87	96,67±0,00	p>0,05	1
12,50	82	92,22±1,11	p<0,05	3,54
25,00	73	70,00±1,92	p<0,05	12,51
50,00	56	51,11±4,44	p<0,05	10,19
100,00	1	1,11±1,11	p<0,05	61,58

Выживаемость мальков в растворах с концентрациями МЭРМ в 1,56–6,25 мг/л в течение 7 сут. была на уровне выживаемости в контроле (табл. 6). В растворах с концентрациями МЭРМ в 12,5 мг/л и 25,0 мг/л выживаемость мальков составила 9,0% и 16,7% соответственно. Воздействие концентрации МЭРМ в 50,0 мг/л на бычка-кругляка вызвало гибель всех мальков.

Длина и масса мальков, развивающихся в опытных растворах с концентрацией МЭРМ в 1,25 мг/л достоверно не отличалась от контроля. С увеличением концентраций МЭРМ происходило снижение темпа линейного и весового роста мальков. Длина и масса мальков в растворах МЭРМ с концентрацией в 3,12 мг/л была ниже контроля на 8,3% и 8,7% соответственно. При

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

концентрации в 6,25 мг/л происходило угнетение линейного и весового роста мальков на 16,9% и 19,3% соответственно (табл. 7).

Тератологический анализ, проведённый в период постэмбрионального развития рыб, показал, что МЭРМ в исследованном диапазоне концентраций в 1,56–25,00 мг/л не оказывал тератогенного действия на мальков бычка-кругляка.

В результате статистической обработки данных установлены недействующие (NOEC) и пороговые (LOEC) концентрации МЭРМ для дафний, для эмбрионов и мальков бычка-кругляка по изученным показателям в хронических экспериментах (табл. 8).

Таким образом, проведённые исследования показали, что МЭРМ оказывал

Таблица 6. Влияние МЭРМ на выживаемость мальков бычка-кругляка

Концентрация, мг/л	Количество выживших, экз.	Выживаемость, %		
		М ± m	p	t
Контроль	57	19,00±0,58		
1,56	56	18,67±0,33	p>0,05	0,50
3,12	54	18,00±0,58	p>0,05	1,22
6,25	55	18,33±0,33	p>0,05	0,71
12,50	50	16,67±0,67	p<0,05	2,65
25,00	27	9,00±0,58	p<0,05	12,25

Таблица 7. Влияние МЭРМ на морфометрические показатели мальков бычка-кругляка

Статистические показатели	Концентрации, мг/л			
	контроль	1,56	3,12	6,25
Длина, мм				
M±m	8,99±0,09	8,82±0,11	8,24±0,07	7,47±0,09
t-критерий Стьюдента		1,17	6,51	12,06
p		>0,05	<0,05	<0,05
Масса, мг				
M±m	4,04±0,06	3,96±0,07	3,69±0,06	3,26±0,07
t		0,86	4,11	8,13
p		>0,05	<0,05	<0,05

Таблица 8. Недействующие (NOEC) и пороговые (LOEC) концентрации МЭРМ, мг/л

Тест-объект	NOEC	LOEC
Дафнии	1,0	6,07
Эмбрионы бычка-кругляка	6,25	12,5
Мальки бычка-кругляка	1,56	3,12

минимальное токсическое действие на дафний и мальков бычка уже при концентрациях в 6,07 мг/л и 3,12 мг/л соответственно, что свидетельствует о его потенциальной токсичности для гидробионтов и необходимости продолжения изучения токсического действия МЭРМ на других тест-объектах, а также установление предельно допустимой концентрации для водоёмов рыбохозяйственного значения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гиляров А.М. Динамика численности пресноводных планктонных ракообразных. М.: Наука, 1987. 189 с.

Девянин С.Н., Марков В.А., Семенов В.Г. Растительные масла и топлива на их основе для дизельных двигателей. М.: ИЦ ФГОУ ВПО «МГАУ им. В. П. Горячкина», 2008. 340 с.

Лесников Л.А., Врочинский К.К. Классификация пестицидов с рыбохозяйственных позиций // Известия ГосНИОРХ. 1974. Т. 98. С. 68–79.

Марков В.А., Гайворонский А.И., Грехов Л.В. Работа дизелей на нетрадиционных топливах: учебное пособие. М.: Легион-Автодата, 2008. 464 с.

Марков В.А., Шустер А.Ю., Девянин С.Н. Особенности применения метилового эфира рапсового масла в качестве топлива для дизелей // Вестник МГТУ им. Н. Э. Баумана. Сер. «Машиностроение». 2010. № 3. С. 56–69.

Патент № 2446396 Российская Федерация, МПК G01N 33/18 (2006.01). Способ оценки токсического действия пестицидов на водные объекты: № 2009147671/15; заявл. 21.12.2009; опубл. 27.03.2012 / И. Л. Левина, Н. И. Щербакова, А. Я. Полуян. 2 с.

FISHERY TOXICOLOGY

ASSESSMENT OF THE TOXIC EFFECT OF RAPESEED OIL METHYL ETHER ON CLADOCERANS AND FISH

E.A. Fedorova, N.I. Shcherbakova

Azov-Black Sea Branch of the Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Rostov-on-Don, 344002

The effect of rapeseed oil methyl ether (RME) on cladocerans (water flea *Daphnia magna* Straus) and fish embryos and prolarvae (round goby *Neogobius melanostomus* (Pallas)) is investigated. It has been determined that, with the increase of RME content in the water, the decrease in the survival rate, fecundity, abundance, and biomass of *Daphnia* population is observed, as well as the decrease in the survival rate of round goby embryos and fry and in the linear and weight growth rate of the fry. RME did not produce any teratogenic effect on the round goby embryos and fry in the investigated range of concentrations 1,25–100,0 mg/L. Based on the experimental data, no observed effect and lowest observed effect concentrations of RME have been identified.

Keywords: rapeseed oil methyl ether (RME), cladocerans, fish embryos, fish prolarvae, toxicity, survival, fecundity, abundance, biomass, length, weight, teratogenic effect.