

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛУЛЕТАЛЬНОЙ ДОЗЫ (ЛД₅₀) ФУЛЬВОВОЙ КИСЛОТЫ, ПОЛУЧЕННОЙ ИЗ ЛИГНИТА И КУКУРУЗНОГО СЫРЬЯ, НА ПРИМЕРЕ МОДЕЛЬНОГО ОБЪЕКТА ДАНИО РЕРИО

Жарикова Анастасия Олеговна, аспирант кафедры ихтиологии и рыбоводства, УО БГСХА

Барулин Николай Валерьевич, профессор кафедры ихтиологии и рыбоводства, УО БГСХА

Аннотация. Исследования установили, что между токсичностью фульвовых кислот (ФК), полученных из лигнита и кукурузного сырья, есть различие. ЛД₅₀ «лигнитной» ФК, составила 83,18 мг/л, что относит ее к категории «Средняя токсичность». ЛД₅₀ «кукурузной» ФК, составила 130,81 мг/л, что относит ее к категории «Умеренная токсичность».

Ключевые слова: фульвовая кислота, данио рерио, лигнит, кукурузное сырье, токсичность.

Введение. В настоящее время исследователями в области животноводства уделяется внимание фульвовой кислоте (ФК), в качестве эффективной кормовой добавки, использование которой способствует улучшению качества получаемой продукции и здоровья сельскохозяйственных животных [1 – 5].

ФК, один из продуктов микробного метаболизма, представляет собой естественное соединение с широким спектром действия [2]. Ее относят к группе гумусовых кислот. Отличительные особенности ФК от гуминовой кислоты, следующие: ФК обычно имеет более низкий молекулярный вес и содержит больший процент кислорода. Это делает её более растворимой в воде и доступнее для живых организмов. Гуминовая кислота обычно имеет темнее цвет, и она хуже растворима в воде, чем ФК [6 – 8].

ФК может иметь разное происхождение и быть полученной из различных сырьевых источников. Один из таких источников – это лигнит, который представляет собой древесный материал, превратившийся в уголь под воздействием давления и температуры на протяжении миллионов лет [8]. Кроме того, благодаря современным технологиям, ФК может быть синтезирована из растительного сырья, например из кукурузы [9].

Цель наших исследований заключалась в определении полулетальной дозы (ЛД₅₀) различных ФК, как перспективных кормовых добавок, на примере модельного объекта данио рерио.

Материал и методы исследований. В исследованиях использовали ФК, полученную из лигнита (производство Китай), а также из кукурузного сырья (производство Российской Федерации).

Для получения эмбрионов использовали племенное поголовье данио

рерио дикого типа (wild type) не подвергавшихся заражению с хорошо задокументированным коэффициентом оплодотворяемости икры [10, 11]. Рыбы были свободны от макроскопически различимых симптомов инфекций и болезней и не подвергались никакому фармацевтическому лечению в течение 2 месяцев до нереста. Содержание маточного стада осуществлялось в специализированном виварии, предназначенном для содержания данио рерио. Виварий представлял собой лабораторную установку замкнутого водоснабжения общим объемом 320 л, которая оснащена системой аэрации, биофильтрации, обеззараживания, регулирования температуры и освещения. Основные параметры водной среды соответствовали оптимальным параметрам содержания данио рерио: рН 8,5, кислород 7,0 мг/л, нитриты, нитраты и аммонийный азот отсутствовали. Объем подмены свежей воды составлял в среднем 30 % от общего объема воды в виварии в сутки.

Половозрелые рыбы содержались при температуре воды 27 °С, со световым режимом 14 часов (день) : 10 часов (ночь), постоянной циркуляцией воды, фильтрацией и аэрацией. В лотках для выращивания самки и самцы постоянно содержались вместе, с примерным соотношением 1 : 2. Оптимальная скорость фильтрации отрегулирована; избыточная скорость фильтрации, вызывающая сильное колебание воды, избегалась. Избыточное кормление избегалось, качество воды и чистота аквариумов регулярно контролировалась.

Основной рацион сформированных групп включал в себя корм Tetra «TetraMin. Granules».

В качестве объектов исследований использовали эмбрионов и личинок данио рерио в возрасте 6 – 144 часов после оплодотворения (hpf), находящихся на стадии икринки и, впоследствии, перешедших на активное питание. Эмбрионы рыб получали от индивидуального нереста. Самец и самка накануне, вечером, отсаживались в 3-х литровый лоток-нерестовик (лоток, имеющий нерестовый субстрат), в котором имелась прозрачная перегородка, отделяющая самца от самки. Утром, в 9:00, перегородка убиралась, и через 10-15 минут происходило начало нереста. После извлечения эмбрионов из лотка-нерестовика (в 11:00), они промывались от загрязнений и помещались в инкубационную среду. Состав инкубационной среды (EW): 294,0 мг/л хлорида кальция дигидрат ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$); 123,3 мг/л сульфата магния гепта-гидрата ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$); 63,0 мг/л бикарбоната натрия (NaHCO_3); 5,5 мг/л хлорида калия (KCl). Указанные соли растворялись в дистиллированной воде. Перед использованием инкубационная среда аэрировалась и выдерживалась при температуре 27 °С.

Инкубацию эмбрионов осуществляли в 90 мм полистирольных чашках Петри, которые помещались в инкубаторы с системой охлаждения и нагревания ST 5 SMART (Pol-Eko-Aparatura, Польша). Температура инкубации эмбрионов составляла 27,5 – 28,0 °С. Объем инкубационной среды в каждой чашке Петри составлял 40 мл.

Процент вылупления в контрольной группе составлял $\geq 80\%$ к концу 96-часовой экспозиции.

Экспозиционные растворы приготавливались перед непосредственным добавлением к эмбрионам и хранились в отдельных пробирках.

Через 6 часов после оплодотворения у собранных эмбрионов удалялись неоплодотворенные икринки. Затем эмбрионы переносились в отдельные емкости по 8 эмбрионов в двух-трехкратной повторности для каждой концентрации. Далее у эмбрионов оперативно удалялась вода и сразу добавлялся экспозиционный раствор соответствующей концентрации.

После этого, эмбрионы с каждой группы (концентрации) переносились в стандартный 96-ти луночный планшет: по одному эмбриону в каждую лунку вместе с 400 мкл экспозиционного раствора соответствующей концентрации. Переноска эмбрионов осуществлялась с помощью дозатора с регулируемым объемом 100 – 1000 мкл. Затем эмбрионы в 96-ти луночном планшете перемещались в термостат для инкубации при температуре 27,5 – 28,0 °С.

Замена экспозиционных растворов у эмбрионов осуществлялась ежедневно. Также, ежедневно осуществляли подсчет погибших эмбрионов и личинок.

Результаты исследований. Результаты определения ЛД50 ФК, полученной из лигнита и кукурузного сырья на эмбрионах данио рерио, представлены в таблице 1.

Таблица 1

**Смертность эмбрионов и личинок данио рерио через 144 hpf
под влиянием различных концентраций ФК**

Концентрация ФК, мг/л	Смертность эмбрионов, %	
	«лигнитная» ФК	«кукурузная» ФК
0	25,0	4,16
10	47,50	33,33
20	50,00	8,33
30	50,00	8,33
40	37,50	25,0
50	37,50	8,33
60	27,50	16,66
70	40,00	20,83
80	35,00	20,83
90	85,00	4,16
100	58,92	20,83
200	41,66	100,00
400	91,66	100,00
800 – 102400	100,00	100,00

В наших исследованиях мы наблюдали, что под влиянием ФК, полученной из лигнита, смертность эмбрионов и личинок данио рерио была выше, чем под влиянием ФК, полученной из кукурузного сырья. В диапазоне дозировок от 10 до 100 мг/л, смертность эмбрионов и личинок данио рерио под влиянием «лигнитной» ФК колебалась от 27,5 до 85,0 %, тогда как под

влиянием «кукурузной» ФК смертность в данном диапазоне дозировок колебалась от 4,16 до 33,3 %. При переходе в диапазон от 100 до 1000 мг/л смертность эмбрионов и личинок данио рерио резко возрастала в двух группах до 100 %.

Расчет ЛД50 осуществлялся при помощи статистической платформы R. Выбор лучшей модели, определяющей наиболее точную ЛД50, осуществляли на основании значения АИС-критерия. Наименьшие значения АИС-критерия соответствовали лучшей модели. Результаты расчета ЛД50 для двух типов ФК представлены в таблице 2.

Таблица 2

Расчет ЛД50 и АИС-критерия для эмбрионов и личинок данио рерио через 144 hpf под влиянием различных концентраций ФК

Критерий	Пробит / Концентрация	Пробит (ln) / Концентрация	Логит / Концентрация	Логит (ln) / Концентрация
«Лигнитная» ФК				
АИС	94,67	129,77	95,43	134,17
ЛД50, мг/л	83,18	51,82	82,35	52,74
«Кукурузная» ФК				
АИС	76,07	132,26	73,89	124,34
ЛД50, мг/л	131,76	121,77	130,81	123,26

В результате проведенных расчетов нами было установлено, что для определения ЛД50 «лигнитной» ФК пробит модель является лучшей, т.к. обладает наименьшим значением АИС-критерия. Для определения ЛД50 «кукурузной» ФК лучшей моделью является логит модель. Расчеты установили, что ЛД50 «лигнитной» ФК составила 83,18 мг/л, ЛД50 «кукурузной» ФК составила 130,81 мг/л.

Заключение. Результаты исследований установили, что между токсичностью ФК, полученных из лигнита и кукурузного сырья, существует разница. ЛД50 ФК, полученной из лигнита, составила 83,18 мг/л, что относит ее к категории «Средняя токсичность» ($10 \text{ мг/л} < \text{ЛД50} < 100 \text{ мг/л}$). ЛД50 ФК, полученной из кукурузного сырья составила 130,81 мг/л, что относит ее к категории «Умеренная токсичность» ($100 \text{ мг/л} < \text{ЛД50} < 1000 \text{ мг/л}$).

Основные причины, указывающие на то, что токсичность ФК из лигнита выше токсичности ФК из кукурузного сырья, по нашему мнению, следующие:

1. Примеси: лигнит, как природный материал, может содержать различные примеси, включая тяжелые металлы, органические соединения и другие вещества, которые могут повысить токсичность;
2. Остаточные соединения: процессы извлечения ФК из лигнита могут оставлять остаточные соединения, которые могут иметь токсичные свойства.

Библиографический список

1. Капитонова, Е.А. Биохимические показатели крови цыплят-бройлеров при введении фульвокислоты в различных концентрациях / Е.А. Капитонова,

П.В. Арефьев, Л.П. Мищенко // Зоотехническая наука Беларуси : сборник научных трудов. – 2021. – Т. 56, № 2 – С. 132-139.

2. The Influence of Fulvic Acid on Egg Laying of the Queen Bee in the Spring Period and the Productivity of the Bee Colony / V.A. Romyantsev [et al.] // Doklady Earth Sciences. – 2023. - Vol. 510, № 1. – P. 349-352.

3. Барулин, Н.В. Влияние фульвово́й кислоты на эмбриотоксичность данио рерио в эксперименте *in vivo* / Н.В. Барулин, А.О. Жарикова, А.О. Воробьев, И.Н. Дубина // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. – 2021. – № 24-1. – С. 102-111.

4. Жарикова, А.О. Оценка влияния фульвово́й кислоты на размножение данио рерио в эксперименте *in vivo* / А.О. Жарикова, Н.В. Барулин, А.О. Воробьев // Сельское хозяйство - проблемы и перспективы : сборник научных трудов. Том 52. – Гродно : Гродненский государственный аграрный университет, 2021. – С. 16-23.

5. Жарикова, А.О. Оценка влияния фульвово́й кислоты на размножение данио рерио / А.О. Жарикова, Н.В. Барулин // Инжиниринг: теория и практика : Материалы II международной научно-практической конференции, Пинск, 06 мая 2022 года / Редколлегия: В.И. Дунай [и др.]. – Пинск: Полесский государственный университет, 2022. – С. 61-65.

6. Molecular features of humic acids and fulvic acids from contrasting environments / J. Schellekens [et al.] // Environmental Science & Technology. – 2017. – Vol. 51(3). – P. 1330-1339.

7. Duarte, R.M., Santos, E.B., Duarte, A.C. (2003). Spectroscopic characteristics of ultrafiltration fractions of fulvic and humic acids isolated from an eucalyptus bleached Kraft pulp mill effluent / R.M. Duarte, E.B. Santos, A.C. Duarte // Water Research. – 2003. – Vol. 37 (17). – P. 4073-4080.

8. Extraction of fulvic acid from lignite and characterization of its functional groups / G. Gong et al. // ACS omega. – 2020. – Vol. 5, № 43. – P. 27953-27961.

9. Extraction and characterization of fulvic acid from corn straw compost by alkali solution acid precipitation / M. Chi [et al.] // Industrial Crops and Products. 2023. – Vol. 198. – P. 116678.

10. Барулин, Н.В. Перспективы использования данио рерио (*Danio rerio* (Hamilton, 1822)) для медико-биологических исследований / Н.В. Барулин, А.О. Жарикова, А.О. Воробьев, В.В. Лесневская // Зоологические чтения – 2021 : Материалы VI международной научно-практической конференции, посвящённой 130-летию доктора биологических наук, профессора Анатолия Владимировича Федюшина, Гродно, 24–25 марта 2021 года / Редколлегия: О.В. Янчуревич (гл. ред.), А.В. Рыжая, А.Е. Каревский. – Гродно: Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, 2021.

11. Барулин, Н.В. Современные методы использования данио рерио (*zebrafish*) для оценки нейротоксичности химических веществ / Н.В. Барулин // Актуальные проблемы и инновации в современной ветеринарной фармакологии и токсикологии : Материалы VI Международного съезда ветеринарных фармакологов и токсикологов, Витебск, 09–11 июня 2022 года / Редколлегия: Н.И. Гавриченко (гл. ред.) [и др.]. – Витебск: Учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2022. – С. 11-15.