

ЗООТЕХНИЯ

УДК 636:39.087.7

НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ФУЛЬВОВЫХ КИСЛОТ НА МОДЕЛЬНОМ ОБЪЕКТЕ ДАНИО РЕРИО

А. О. ЖАРИКОВА

УО «Белорусская государственная орденов Октябрьской Революции и
Трудового Красного Знамени сельскохозяйственная академия»,
г. Горки, Республика Беларусь, 213407

(Поступила в редакцию 15.10.2024)

В современных научных исследованиях в области животноводства и аквакультуры активное внимание уделяется фульвовой кислоте как эффективной добавке в корма. Её использование способствует улучшению качества производимой продукции и здоровья сельскохозяйственных животных.

Фульвовая кислота может быть получена из различных источников сырья, таких как лигнит – древесный материал, также из растительного сырья, например, из кукурузы. В связи с этим вызывает интерес потенциальная возможность различных источников, из которых изготавливают фульвовые кислоты, оказывать разный физиологический эффект. В настоящее время тестирование различных эффектов воздействия химических веществ на человека и окружающую среду в значительной степени опирается на животные модели, такие как грызуны и взрослые рыбы. В качестве альтернативы, эмбрионы данио рерио оказались перспективной моделью благодаря своей способности предсказывать токсичность.

В результате проведенных исследований осуществлено сравнение и дана оценка нейрофизиологическим эффектам фульвовых кислот, полученным из лигнита и стеблей кукурузы на модельном объекте данио рерио. Установлено, что «кукурузная» и «лигнитная» фульвовые кислоты оказывают раздражающее действие на нервную систему эмбрионов и личинок данио рерио, что выражалось в увеличении количества толчков эмбрионами в STC-тесте и среднего количества проплываемого расстояния в LMR-тесте. Однако наиболее раздражающий эффект оказывает «лигнитная» фульвовая кислота. Разница между усредненным для всех дозировок эффектом между «кукурузной» и «лигнитной» фульвовыми кислотами составила: 1,4 раза в STC-тесте, 1,9 раз в световой фазе LMR-теста и 2,1 раза в темновой фазе LMR-теста. Эти результаты являются доказательством того, что «лигнитная» фульвовая кислота обладает более высоким раздражающим и токсическим эффектом. Это необходимо учитывать при установлении и разработке дозировок фульвовой кислоты, при ее использовании в качестве кормовой добавки в животноводстве и рыбоводстве.

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

In modern scientific research in the field of animal husbandry and aquaculture, active attention is paid to fulvic acid as an effective additive to feed. Its use helps to improve the quality of manufactured products and the health of farm animals.

Fulvic acid can be obtained from various raw material sources, such as lignite – a woody material, as well as from plant raw materials, for example, from corn. In this regard, the potential for different sources from which fulvic acids are produced to have different physiological effects is of interest. Currently, testing the various effects of chemicals on humans and the environment relies heavily on animal models such as rodents and adult fish. As an alternative, zebrafish embryos have proven to be a promising model due to their ability to predict toxicity.

As a result of the conducted studies, the neurophysiological effects of fulvic acids obtained from lignite and corn stalks on the model object zebrafish were compared and evaluated. It was found that "corn" and "lignitic" fulvic acids have an irritating effect on the nervous system of zebrafish embryos and larvae, which was expressed in an increase in the number of embryonic kicks in the STC test and the average distance swum in the LMR test. However, "lignitic" fulvic acid has the most irritating effect. The difference between the effect averaged for all dosages between "corn" and "lignitic" fulvic acids was: 1.4 times in the STC test, 1.9 times in the light phase of the LMR test and 2.1 times in the dark phase of the LMR test. These results are evidence that "lignitic" fulvic acid has a higher irritating and toxic effect. This must be taken into account when establishing and developing dosages of fulvic acid, when using it as a feed additive in animal husbandry and fish farming.

Key words: zebrafish, fulvic acid, lignite, corn raw materials, neurophysiological effects, toxicity.

Введение

В современных научных исследованиях в области животноводства и аквакультуры активное внимание уделяется фульвовой кислоте (ФК) как эффективной добавке в корма. Её использование способствует улучшению качества производимой продукции и здоровья сельскохозяйственных животных [1–6].

ФК представляет собой естественное соединение с широким спектром действия, являющееся одним из продуктов микробного метаболизма [2]. Отличительные особенности заключаются в ее низком молекулярном весе и высоком содержании кислорода, что делает ее более растворимой в воде и доступной для живых организмов, в отличие от гуминовой кислоты, имеющей крупные молекулы с высоким содержанием углерода и хуже растворимой в воде [7–9].

ФК может быть получена из различных источников сырья, включая лигнит – древесный материал, претерпевший угольный процесс под воздействием времени, давления и температуры [10]. Также современные технологии позволяют синтезировать ФК из растительного сырья, например, из кукурузы [11].

В связи с этим вызывает интерес потенциальная возможность различных источников, из которых изготавливают ФК, оказывать разный физиологический эффект. В наших предыдущих исследованиях было установлено, что между токсичностью ФК, полученных из лигнита и кукурузного сырья, существует разница [12].

В настоящее время тестирование различных эффектов воздействия химических веществ на человека и окружающую среду в значительной степени опирается на животные модели, такие как грызуны и взрослые рыбы [13]. В качестве альтернативы, эмбрионы данио рерио оказались перспективной моделью благодаря своей способности предсказывать токсичность [14].

Потенциал выявления взаимодействия химических веществ с нервной системой с помощью поведенческих тестов на данио рерио был признан мировым сообществом [7]. При этом наиболее часто используемые поведенческие тесты это: тест спонтанного сворачивания хвоста (spontaneous tail coiling, STC) и тест локомоторного ответа (locomotor response, LMR) [15].

Цель работы заключалась в изучении и оценке нейрофизиологических эффектов ФК, полученных из лигнита и стеблей кукурузы на модельном объекте данио рерио.

Основная часть

Исследования выполнялись на кафедре ихтиологии и рыбоводства Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. В исследованиях использовали ФК, полученную из лигнита, а также из кукурузного сырья. В качестве объектов исследований использовали эмбрионов и личинок данио рерио дикого типа (рис. 1) в возрасте 6–144 часов после оплодотворения (hpf), находящихся на стадии икринки и, впоследствии, перешедших на активное питание.

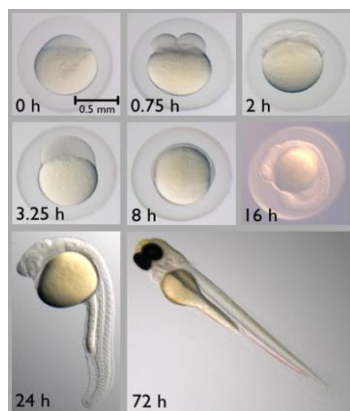


Рис. 1. Эмбрионы и личинки данио рерио в возрасте 0–72 hpf

Эмбрионы рыб получали от индивидуального нереста (1 самец – 1 самка). Самец и самка (рис. 2) накануне, вечером, отсаживались в 3-литровый лоток-нерестовик, в котором имела прозрачная перегородка, отделяющая самца от самки.

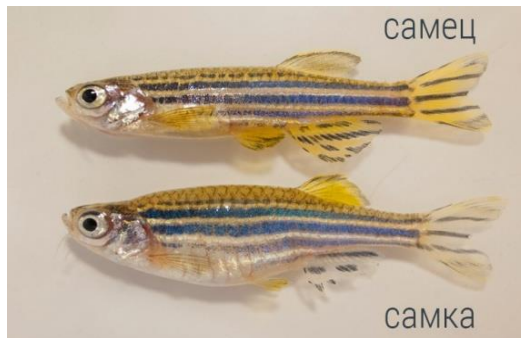


Рис. 2. Взрослые половозрелые особи данио рерио

Лоток находился на общем водоснабжении водой из вивария. Температура воды при нересте составляла 27 °С. Утром, в 9:00, перегородка убиралась, и через 10–15 минут происходило начало нереста. После извлечения эмбрионов из лотка-нерестовика, 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 гептагидрата ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$); 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 полистироловых чашках Петри, которые помещались в инкубаторы с системой охлаждения и нагревания. Температура инкубации эмбрионов составляла 27,5–28,0 °С. Объем инкубационной среды в каждой чашке Петри составлял 40 мл.

Приготовление концентраций ФК в диапазоне 0–100 мг/л осуществлялось по следующей методике. Вначале приготавливался маточный раствор в концентрации 2500 мг/л (100 мг сухой ФК в 40 мл EW). Затем из маточного раствора приготавливались растворы разных концентраций для экспозиции. Экспозиционные растворы приготавливались перед непосредственным добавлением к эмбрионам и хранились в отдельных пробирках.

Через 6 hpf у собранных эмбрионов удалялись неоплодотворенные икринки. Затем эмбрионы переносились в отдельные емкости по 8 эмбрионов в 2–3-кратной 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-луночный планшет: по одному эмбриону в каждую лунку вместе с 400 мкл экспозиционного раствора соответствующей концентрации. Затем эмбрионы в 96-луночном планшете перемещались в термостат для инкубации при температуре 27,5–28,0 °С. Замена экспозиционных растворов осуществлялась ежедневно.

Через 24 и 144 hpf эмбрионы проходили тестирование в тесте спонтанного сворачивания хвоста (spontaneous tail coiling, STC) и в тесте локомоторного ответа (locomotor response, LMR) соответственно.

Тест STC – это оценка первой двигательной активности, генерируемой развивающейся нейронной сетью, которая возникает в результате иннервации мышцы. Предполагается, что это событие важно для вылупления эмбриона из хориона [16]. Частотные изменения STC используются в качестве инструмента для обнаружения воздействия нейроактивных химических веществ на развивающийся эмбрион.

Тест LMR – это оценка как спонтанного, так и индуцированного чередование света, локомоторного ответа свободных эмбрионов (личинки). При LMR-тесте эмбрионы слабо двигаются при освещении светом, но демонстрируют увеличение активности при переключении со света на темноту [15]. Поэтому для мониторинга такого поведения применяют циклы свет-темнота. LMR оценивается путем регистрации различных конечных точек плавательной активности, таких как время плавания, расстояние плавания, скорость плавания (рассчитанная из расстояния и времени) и угол плавания.

Основной целью вышеперечисленных тестов является выявление гипо- и/или гиперактивности эмбрионов под влиянием различных химических веществ.

Результаты изучения нейрофизиологических эффектов ФК, полученных из лигнита и стеблей кукурузы на данио рерио, представлены в табл. 1–3.

Таблица 1. Влияние различных фульвовых кислот на среднее количество толчков эмбрионов данио рерио в возрасте 24 hpf в STC-тесте

Группа (дозировка, мг/л)	Среднее значение, %		Стандартная ошибка среднего		Среднеквадратическое отклонение		p-уровень значимости (критерий Краскела-Уоллиса)	
«Кукурузная» фульвовая кислота					«Лигнитная» фульвовая кислота			
0	100,0	100,0	16,1	14,9	61,5	68,2	—	—
10	85,1	150,0	17,6	19,7	68,1	92,2	0,994	0,781
20	123,8	208,0	15,0	22,7	82,6	101,4	1,000	0,024
30	167,9	234,0	24,2	21,1	70,1	105,6	0,090	0,002
40	232,8	247,0	19,4	27,0	105,5	132,1	0,003	0,003
50	181,7	317,0	20,5	20,6	92,9	105,2	0,080	<0,001
60	225,5	271,0	18,2	20,2	93,8	108,8	0,002	<0,001
70	187,0	305,0	20,9	25,5	87,4	132,6	0,052	<0,001
80	207,3	261,0	16,5	20,0	98,1	104,1	0,016	<0,001
90	190,0	252,0	10,8	38,9	81,1	102,9	0,013	0,047
100	101,5	192,0	16,1	38,7	50,7	102,4	1,000	0,408

Примечание (здесь и далее): жирным шрифтом выделены достоверные различия.

По результатам табл. 1 видно, что под влиянием «кукурузной» ФК происходило увеличение среднего количества толчков на 1,5–132,8 %, в зависимости от дозировки. При этом достоверное увеличение толчков эмбрионов было обнаружено в 4 из 10 дозирровок (40 мг/л, 60 мг/л, 80 мг/л, 90 мг/л). Максимальный статистически достоверный эффект наблюдался в группе, на эмбрионы которых воздействовали «кукурузной» ФК в концентрации 40 мг/л. Усредненный эффект от всех дозирровок составил 170,26 %.

Однако наиболее значимые эффекты в STC-тесте наблюдались при воздействии «лигнитной» ФК, под влиянием которой происходило увеличение толчков эмбрионов на 50 – 317 %, в зависимости от дозировки. При этом достоверное увеличение толчков эмбрионов было обнаружено в 8 из 10 дозирровок (кроме 10 мг/л, 100 мг/л). Максимальный статистически достоверный эффект наблюдался в группе, на эмбрионы которых воздействовали «лигнитной» ФК в концентрации 50 мг/л. Усредненный эффект от всех дозирровок составил 243,7 %.

Таблица 2. Влияние «кукурузной» фульвой кислоты на среднее проплываемое расстояние личинками данио рерио в возрасте 144 hpf в LMR-тесте

Группа (дозировка, мг/л)	Среднее значение, %		Стандартная ошибка среднего	Среднеквадратическое отклонение			p-уровень значимости (критерий Краскела-Уоллиса)	
«Кукурузная» фульвовая кислота								
Световая фаза				Темновая фаза				
0	100,0	100,0	14,33	17,6	157,0	176	–	–
10	60,3	60,5	8,63	14,8	94,5	148	0,426	<0,001
20	91,7	101,0	9,57	22,5	104,8	225	0,867	0,472
30	90,0	89,0	11,06	23,0	121,2	230	1,000	0,048
40	159,3	194,3	19,71	19,9	215,9	199	0,382	<0,001
50	87,8	78,6	10,98	20,0	120,2	200	0,998	0,054
60	118,2	107,5	12,05	20,5	132,0	205	0,245	0,995
70	53,8	80,2	8,79	18,1	96,3	181	<0,001	0,083
80	101,7	107,7	13,67	15,1	149,8	151	0,998	1,000
90	118,6	125,8	10,54	13,5	115,5	135	0,008	0,104
100	125,4	111,3	13,92	21,4	152,5	214	0,999	0,999

В результате изучения влияния «кукурузной» ФК на среднее проплываемое расстояние личинками данио рерио в возрасте 144 hpf в LMR-тесте (световая фаза) (табл. 2), наблюдалось снижение эффекта на 46,2 %, а также увеличение эффекта на 59,3 %, в зависимости от дозирровок. Однако достоверные различия наблюдались в 2 из 10 дозирровок (70 мг/л, 90 мг/л). Максимальный статистически достоверный эффект наблюдался в группе, на эмбрионы которых воздействовали «кукурузной» ФК в концентрации 70 мг/л. Усредненный эффект от всех дозирровок составил 100,68 %.

В LMR-тесте (темновая фаза) наблюдалось снижение эффекта на 39,5 %, а также увеличение эффекта на 94,3 %, в зависимости от дозирровок. Однако, достоверные различия наблюдались в 3 из 10 дозирровок (10 мг/л, 30 мг/л, 40 мг/л). Максимальный статистически достоверный эффект наблюдался в группе, на эмбрионы которых воздействовали «кукурузной» ФК в концентрации 40 мг/л. Усредненный эффект от всех дозирровок составил 105,59 %.

Таблица 3. Влияние «лигнитной» фульвой кислоты на среднее проплываемое расстояние личинками данио рерио в возрасте 144 hpf в LMR-тесте

Группа (дозировка, мг/л)	Среднее значение, %		Стандартная ошибка среднего		Среднеквадратическое отклонение		p-уровень значимости (критерий Краскела-Уоллиса)	
«Лигнитная» фульвовая кислота								
Световая фаза					Темновая фаза			
0	100,0	100,0	6,10	5,90	94,4	83,5	–	–
10	189,4	296,0	13,44	18,67	208,2	264,1	0,016	<0,001
20	242,2	249,0	15,19	24,77	235,3	350,3	<0,001	0,013
30	232,6	206,0	20,59	21,81	319,0	308,5	0,982	1,000
40	201,7	219,0	14,43	18,57	223,5	262,6	0,046	<0,001
50	191,7	220,0	11,99	18,34	185,8	259,3	<0,001	<0,001
60	197,9	237,0	11,78	17,85	182,4	252,5	<0,001	<0,001
70	156,0	204,0	8,00	18,37	124,0	259,8	<0,001	0,127
80	253,5	264,0	17,46	19,30	270,5	273,0	<0,001	<0,001
90	73,0	136,0	8,22	10,40	90,0	104,0	0,084	0,210

По результатам табл. 3 было установлено резкое увеличение среднего проплываемого расстояния личинками от 56,0 до 153,5 % (за исключением дозировки 90 мг/л) (световая фаза). Наблюдались достоверные статистические различия в 7 из 9 дозирок (кроме 30 мг/л, 90 мг/л). Максимальный статистически достоверный эффект наблюдался в группе, на эмбрионы которых воздействовали «лигнитной» ФК в концентрации 80 мг/л. Усредненный эффект от всех дозирок составил 193,11 %.

В LMR-тесте (темновая фаза) было установлено резкое увеличение среднего проплываемого расстояния личинками от 36,0 до 196,5 %. Наблюдались достоверные статистические различия в 6 из 9 дозирок (кроме 30 мг/л, 70 мг/л, 90 мг/л). Максимальный статистически достоверный эффект наблюдался в группе, на эмбрионы которых воздействовали «лигнитной» ФК в концентрации 10 мг/л. Усредненный эффект от всех дозирок составил 225,66 %.

Заключение

В результате проведенных исследований осуществлено сравнение нейрофизиологических эффектов ФК, полученных из лигнита и стеблей кукурузы на модельном объекте данио рерио. Установлено, что «кукурузная» и «лигнитная» ФК оказывают раздражающее действие на нервную систему эмбрионов и личинок данио рерио, что выражалось в увеличении количества толчков эмбрионами в STC-тесте и среднего количества проплываемого расстояния в LMR-тесте. Однако наиболее раздражающий эффект оказывает «лигнитная» ФК. Разница между усредненным для всех дозирок эффектом между «кукурузной» и «лигнитной» ФК составила: 1,4 раза в STC-тесте, 1,9 раз в световой фазе LMR-теста и 2,1 раза в темновой фазе LMR-теста. Эти результаты, а также результаты, полученные в ходе определения полулетальных доз ФК, полученных из лигнита и кукурузного сырья [12], являются доказательством того, что «лигнитная» ФК обладает более высоким раздражающим и токсическим эффектом. Это необходимо учитывать, при установлении и разработке дозирок ФК при ее использовании в качестве кормовой добавки в животноводстве и рыбоводстве.

ЛИТЕРАТУРА

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. Rumyantsev [et al.] // Doklady Earth Sciences. – 2023. – Vol. 510, № 1. – P. 349–352.
3. Effects of supplemental fulvic acid on survival, growth performance, digestive ability and immunity of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) larvae / C. Zhang [et al.] // Frontiers in Physiology. – 2023. – Vol. 14. – P. 1159320.
4. Барулин, Н. В. Влияние фульвокислоты 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.
5. Жарикова, А. О. Оценка влияния фульвокислоты 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.
6. Жарикова, А. О. Оценка влияния фульвокислоты 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.
7. Chemical heterogeneity of humic substances: characterization of size fractions obtained by hollow-fibre ultrafiltration / I. Christl [et al.] // European journal of soil science. – 2000. – Vol. 51(4). – P. 617–625.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Жарикова, А. О. Определение полулетальной дозы (ЛД50) фульвокислоты, как потенциальной кормовой добавки в аквакультуре, полученной из лигнита и кукурузного сырья, на модельном объекте данио рерио / А. О. Жарикова, Н. В. Барулин // Современные достижения и актуальные проблемы животноводства : Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 90-летию биотехнологического факультета и кафедр генетики и разведения сельскохозяйственных животных, технологии производства продукции и механизации животноводства, кормления сельскохозяйственных животных, Витебск, 12–13 октября 2023 года. – Витебск: Витебская государственная академия ветеринарной медицины, 2023. – С. 200–204.
13. Alternative approaches to vertebrate ecotoxicity tests in the 21st century: a review of developments over the last 2 decades and current status / A. Lillicrap [et al.] // Environ Toxicol Chem. – 2016. – Vol. 35. – P. 2637–2646.
14. 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.
15. Hypo- or hyperactivity of zebrafish embryos provoked by neuroactive substances: a review on how experimental parameters impact the predictability of behavior changes / A. Ogungbemi [et al.] // Environ Sci Eur. – 2019. – Vol. 31. – P. 88.
16. Kimmel, C. B. The development and behavioral characteristics of the startle response in the zebra fish / C. B. Kimmel, J. Patterson, R. O. Kimmel // Dev Psychobiol. – 1974. – Vol. 7. – P. 47–60.