

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ФУЛЬВОВЫХ КИСЛОТ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ЛИГНИТА И СТЕБЛЕЙ КУКУРУЗЫ НА МОДЕЛЬНОМ ОБЪЕКТЕ ДАНИО РЕРИО

А. О. ЖАРИКОВА, Н. В. БАРУЛИН

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

(Поступила в редакцию 27.03.2024)

В результате проведенных исследований нами осуществлено сравнение нейрофизиологических эффектов фульвовых кислот, полученных из лигнита и стеблей кукурузы на модельном объекте данио рерио. Нами установлено, что как «кукурузная», так 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, а также результаты, полученные в ходе определения полудлетальных доз фульвовой кислоты, полученной из лигнита и кукурузного сырья, 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 использовании ее в качестве кормовой добавки в животноводстве и рыбоводстве.

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

As a result of our research, we compared the neurophysiological effects of fulvic acids obtained from lignite and corn stalks on the model object zebrafish. We have found that both “corn” and “lignite” 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 pushes by the embryos in the STC test and the average amount of swimming distance in the LMR test. However, the most irritating effect is caused by “lignite” fulvic acid. The difference between the effect averaged for all dosages between “corn” and “lignite” 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, as well as those obtained in the determination of semi-lethal doses of fulvic acid obtained from lignite and corn raw materials, provide evidence that “lignitic” fulvic acid has a higher irritant 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 livestock and fish farming.

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

Введение. В современных исследованиях в области животноводства и аквакультуры активное внимание уделяется фульвово́й 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 её низком молекулярном весе и высоком содержании кислорода, что делает её 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, включая лигнит – древесный материал, претерпевший угольный процесс под воздействием времени, давления и температуры [10]. Также современные технологии позволяют синтезировать её из растительного сырья, например, из кукурузы [11].

В этой связи вызывает интерес потенциальная возможность различных источников сырья, из которых изготавливают ФК, оказывать разный физиологический эффект. В наших предыдущих исследованиях нами 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 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 (производство Китай), а также из кукурузного сырья (производство Российской Федерации).

В качестве объектов исследований использовали эмбрионов и личинок данио рерио дикого типа в возрасте 6–144 часов после оплодотворения (hpf), находящихся на стадии икринки и, впоследствии, перешедших на активное питание. Эмбрионы рыб получали от индивидуального нереста (1 самец – 1 самка). Самец и самка накануне, вечером, отсаживались в 3-литровый лоток-нерестовик, в котором имелась прозрачная перегородка, отделяющая самца от самки. 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 (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 полистироловых чашках Петри, которые помещались в инкубаторы с системой охлаждения и нагрева 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.

Приготовление концентраций ФК (как из лигнита, так из кукурузного сырья) в диапазоне 0–100 мг/л осуществлялось по следующей методике. Вначале приготавливался стоковый раствор в концентрации 2500 мг/л (100 мг сухой ФК в 40 мл EW). Затем из стокового раствора приготавливались разнokonцентрированные растворы для 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-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. Кончик наконечника отрезался ножницами, чтобы избежать травмирования эмбрионов. Затем эмбрионы в 96-луночном планшете перемещались в термостат для инкубации при температуре 27,5–28,0 °C. Замена экспозиционных растворов у эмбрионов осуществлялась ежедневно.

Через 24 и 144 часов после оплодотворения эмбрионы проходили тестирование в тесте спонтанного сворачивания хвоста (spontaneous tail coiling, STC) и в тесте локомоторного ответа (locomotor response, LMR), соответственно. При STC-тесте, 96-луночный планшет с эмбрионами помещали на платформу с инфракрасной подсветкой и затем накрывали затемненным боксом, поддерживающим температуру (28,0 °C). Видео активности эмбрионов записывали в течение 1 минуты в темноте, после 5 минут адаптации. Для записи активности эмбрионов использовали камеру Basler, оснащенную инфракрасным фильтром. После последнего измерения 96-луночный планшет с эмбрионами помещали в термостат для дальнейшей инкубации. Для проведения LMR-теста, 96-луночный планшет со свободными эмбрионами, также помещали на платформу с инфракрасной подсветкой и затем накрывали затемненным боксом, поддерживающим температуру (28,0 °C). Видеозаписи подвижности личинок записывали с использованием следующих настроек освещения при температуре 28 °C после 5 мин. темновой адаптации: 5 мин. (световая фаза, свет) 5 мин. (темновая фаза, темнота) 5 мин. (свет) 10 мин. (свет) 20 мин. (темнота) 10 мин. (свет) и анализировали с помощью программного обеспечения EthoVision XT (Noldus, Нидерланды) в режиме DanioVision с использованием камеры микроскопа Basler, оснащенной инфракрасным фильтром. Интервал записи составлял 15 секунд.

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

Таблица 1. Влияние «кукурузной» и «лигнитной» ФК на среднее количество толчков (в процентах к контролю) эмбрионов данио рерио в возрасте 24 часа после оплодотворения в STC-тесте в зависимости от различных концентраций

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

Примечание: жирным шрифтом выделены достоверные различия

В результате изучения влияния «кукурузной» ФК на среднее количество толчков (в процентах к контролю) эмбрионов данио рерио в возрасте 24 часа после оплодотворения в STC-тесте в зависимости от различных концентраций нами было установлено, 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 дозировках. Максимальный статистически достоверный эффект наблюдался в группе, на эмбрионы которых воздействовали «кукурузной» ФК в концентрации 40 мг/л. Усредненный эффект от всех дозировок составил 170,26 %.

Однако наиболее значимые эффекты в STC-тесте нами наблюдались при воздействии «лигнитной» ФК, под влиянием которой проис-

ходило увеличение толчков эмбрионов на 50–317 %, в зависимости от дозировки. При этом достоверное увеличение толчков эмбрионов было обнаружено в 8 из 10 дозировках. Максимальный статистически достоверный эффект наблюдался в группе, на эмбрионы которых воздействовали «лигнитной» ФК в концентрации 50 мг/л. Усредненный эффект от всех дозировок составил 243,7 %.

Таблица 2. Среднее проплываемое расстояние (в процентах к контролю) личинками данио рерио в возрасте 144 часов после оплодотворения в LMR-тесте (световая фаза) в зависимости от различной концентрации «кукурузной» и «лигнитной» ФК

Группа (дозировка, мг/л)	Среднее значение, %	Стандартная ошибка среднего	Среднеквадратическое отклонение	p-уровень значимости (критерий Краскела-Уоллиса)
«Кукурузной» ФК				
0	100,0	14,33	157,0	–
10	60,3	8,63	94,5	0,426
20	91,7	9,57	104,8	0,867
30	90,0	11,06	121,2	1,000
40	159,3	19,71	215,9	0,382
50	87,8	10,98	120,2	0,998
60	118,2	12,05	132,0	0,245
70	53,8	8,79	96,3	<0,001
80	101,7	13,67	149,8	0,998
90	118,6	10,54	115,5	0,008
100	125,4	13,92	152,5	0,999
«Лигнитная» ФК				
0	100,0	6,10	94,4	–
10	189,4	13,44	208,2	0,016
20	242,2	15,19	235,3	<0,001
30	232,6	20,59	319,0	0,982
40	201,7	14,43	223,5	0,046
50	191,7	11,99	185,8	<0,001
60	197,9	11,78	182,4	<0,001
70	156,0	8,00	124,0	<0,001
80	253,5	17,46	270,5	<0,001
90	73,0	8,22	90,0	0,084

Примечание: жирным шрифтом выделены достоверные различия.

В результате изучения влияния «кукурузной» ФК на среднее проплываемое расстояние (в процентах к контролю) личинками данио рерио в возрасте 144 часов после оплодотворения в LMR-тесте (световая фаза) нами наблюдалось снижение эффекта на 46,2 %, а также увеличение эффекта на 59,3 %, в зависимости от дозировок. Однако, достоверные различия мы наблюдали в 2 из 10 дозировок. Максималь-

ный статистически достоверный эффект наблюдался в группе, на эмбрионы которых воздействовали «кукурузной» ФК в концентрации 90 мг/л. Усредненный эффект от всех дозировок составил 100,68 %.

В результате изучения влияния «лигнитной» ФК на среднее проплываемое расстояние (в процентах к контролю) личинками данио рерио в возрасте 144 часов после оплодотворения в LMR-тесте (световая фаза) нами было установлено резкое увеличение среднего проплываемого расстояния личинками от 56,0 до 153,5 % (за исключением дозировки 90 мг/л). Мы наблюдали достоверные статистические различия в 7 из 9 дозировок. Максимальный статистически достоверный эффект наблюдался в группе, на эмбрионы которых воздействовали «лигнитной» ФК в концентрации 80 мг/л. Усредненный эффект от всех дозировок составил 193,11 %.

Таблица 3. Среднее проплываемое расстояние (в процентах к контролю) личинками данио рерио в возрасте 144 часов после оплодотворения в LMR-тесте (темновая фаза) в зависимости от различной концентрации «кукурузной» ФК

Группа (дозировка, мг/л)	Среднее значение, %	Стандартная ошибка среднего	Среднеквадратическое отклонение	p-уровень значимости (критерий Краскела-Уоллиса)
«Кукурузной» ФК				
0	100,0	17,6	176	-
10	60,5	14,8	148	<0,001
20	101,0	22,5	225	0,472
30	89,0	23,0	230	0,048
40	194,3	19,9	199	<0,001
50	78,6	20,0	200	0,054
60	107,5	20,5	205	0,995
70	80,2	18,1	181	0,083
80	107,7	15,1	151	1,000
90	125,8	13,5	135	0,104
100	111,3	21,4	214	0,999
«Лигнитная» ФК				
0	100,0	5,90	83,5	-
10	296,0	18,67	264,1	<0,001
20	249,0	24,77	350,3	0,013
30	206,0	21,81	308,5	1,000
40	219,0	18,57	262,6	<0,001
50	220,0	18,34	259,3	<0,001
60	237,0	17,85	252,5	<0,001
70	204,0	18,37	259,8	0,127
80	264,0	19,30	273,0	<0,001
90	136,0	10,40	104,0	0,210

Примечание: жирным шрифтом выделены достоверные различия.

В результате изучения влияния «кукурузной» ФК на среднее проплываемое расстояние (в процентах к контролю) личинками данио рерио в возрасте 144 часов после оплодотворения в LMR-тесте (темновая фаза) нами наблюдалось снижение эффекта на 39,5 %, а также увеличение эффекта на 94,3 %, в зависимости от дозировок. Однако, достоверные различия мы наблюдали в 3 из 10 дозировок. Максимальный статистически достоверный эффект наблюдался в группе, на эмбрионы которых воздействовали «кукурузной» ФК в концентрации 40 мг/л. Усредненный эффект от всех дозировок составил 105,59 %.

В результате изучения влияния «лигнитной» ФК на среднее проплываемое расстояние (в процентах к контролю) личинками данио рерио в возрасте 144 часов после оплодотворения в LMR-тесте (световая фаза) нами было установлено резкое увеличение среднего проплываемого расстояния личинками от 36,0 до 196,5 %. Мы наблюдали достоверные статистические различия в 6 из 9 дозировок. Максимальный статистически достоверный эффект наблюдался в группе, на эмбрионы которых воздействовали «лигнитной» ФК в концентрации 10 мг/л. Усредненный эффект от всех дозировок 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 как «кукурузная» так 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 дозировок 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 полуметальных доз ФК, полученной 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 дозировок ФК при использовании ее в качестве кормовой добавки в животноводстве и рыбоводстве.

ЛИТЕРАТУРА

1. Капитонова Е. А., Арефьев П. В., Мищенко Л. П. Биохимические показатели крови цыплят-бройлеров при введении фульвокислоты в различных концентрациях // 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. Влияние фульвой 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.
5. Жарикова А. О., Барулин Н. В., Воробьев А. О. Оценка влияния фульвой кислоты на размножение данио рерио в эксперименте *in vivo* // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы: сборник научных трудов. Том 52. – Гродно: Гродненский государственный аграрный университет, 2021. – С. 16–23.
6. Жарикова А. О., Барулин Н. В. Оценка влияния фульвой кислоты на размножение данио рерио // 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., Барулин Н. В. Определение полулетальной дозы (ЛД50) фульвой кислоты, как потенциальной кормовой добавки в аквакультуре, полученной из лигнита и кукурузного сырья, на модельном объекте данио рерио // 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 // 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.