

## **ИЗУЧЕНИЕ ЭМБРИОТОКСИЧНОСТИ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ «КУПРУМ-АКТИВ» НА ЛАБОРАТОРНОМ ОБЪЕКТЕ ДАНИО РЕРИО (*DANIO RERIO*)**

**Н. В. БАРУЛИН, А. О. ВОРОБЬЕВ, А. О. ЖАРИКОВА**

*УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»,  
г. Горки, Республика Беларусь, 213407*

**И. Н. ДУБИНА**

*РУП Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышеселского,  
г. Минск, Республика Беларусь, 220063*

*(Поступила в редакцию 20.01.2021)*

*Целью работы являлась оценка эмбриотоксичности кормовой добавки «Купрум-Актив» на эмбрионы и личинки рыб. Исследования выполнялись на базе кафедры ихтиологии и рыбоводства в 2020 г., в студенческой научно-исследовательской лаборатории «Физиология рыб». В ходе исследований тестировалась кормовая добавка «Купрум-Актив» с концентрациями 0,5 мг/л, 2,5 мг/л, 5 мг/л, 10 мг/л, 20 мг/л, 40 мг/л, 80 мг/л, 400 мг/л, 800 мг/л, 1000 мг/л, 5000 мг/л и 10000 мг/л. В исследованиях регистрировались параметры: выживаемость эмбрионов и личинок, поведение личинок (проплываемая дистанция, скорость проплываемой дистанции).*

*Исследования установили, что при концентрации кормовой добавки 20 мг/л и выше наблюдался остротоксический эффект, который выражался в виде 100 % смертности эмбрионов. Наименее токсичными (нетоксичными) концентрациями для эмбрионов были 0,5 мг/л, 2,5 мг/л и 5 мг/л (выживаемость 100 %). Регистрация поведения личинок опытных групп (0,5–5 мг/л) в поведенческом тесте не выявило достоверных отличий от контрольных значений. Дальнейшие наблюдения за выживаемостью личинок также не выявили достоверных отличий от контрольных значений. Концентрация «Купрум-Актив» 10 мг/л оказывает влияние на снижение выживаемости эмбрионов и личинок, а также на поведение личинок рыб.*

*Таким образом, в результате проведенных исследований установили, что кормовая добавка «Купрум-Актив» в концентрации до 5 мг/л не оказывает эмбриотоксического действия на рыб, на примере данлио рерио.*

**Ключевые слова:** *данлио рерио, эмбрионы, личинки, кормовая добавка «Купрум-Актив», поведение рыб, плавательная активность, выживаемость.*

*The aim of the work was to evaluate the embryotoxicity of the feed additive «Cuprum Active» and its effect on fish embryos and larvae. The research was carried out on the basis of the Department of Ichthyology and Fish Farming in 2020, in the student research laboratory "Fish Physiology". During the studies, the feed additive «Cuprum-Active» was tested with concentrations of 0.5 mg/l, 2.5 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 20 mg/l, 40 mg/l, 80 mg/l, 400 mg/l, 800 mg/l, 1000 mg/l, 5000 mg/l and 10000 mg/l. The following parameters were recorded in the studies: the survival rate of embryos and larvae, the behavior of larvae (swimming distance, speed*

during the swimming distance).

Studies have found that at the feed additive concentration of 20 mg/l or higher, toxic effect was acute and resulted in 100 % embryo mortality. The least toxic (non-toxic) concentrations for the embryos were 0.5 mg / l, 2.5 mg / l, and 5 mg / l (100 % survival rate). The behavior record of the larvae from the experimental groups (0.5–5 mg/l) in the behavioral test did not reveal significant differences from the control values. The "Cuprum-Active" concentration of 10 mg / l reduces survival rate of embryos and larvae, as well as has an effect on the behavior of fish larvae.

Thus, it was established that the feed additive "Cuprum-Active" in the concentration of up to 5 mg/l does not have an embryotoxic effect on fish (through the example of zebra fish).

**Key words:** zebra fish, embryos, fish larvae, feed additive «Cuprum-Active», fish behaviour, swimming activity, survival rate.

**Введение.** Медь – важный микроэлемент для животных, необходимый для роста тела, костей и шерсти, пигментации, здоровых нервных волокон и функции лейкоцитов. Однако функции и влияние этого минерала еще предстоит полностью понять, особенно при кормлении сельскохозяйственных животных, где медь используется в качестве «стимулятора роста». Исходя из понимания меди, как кормовой добавки, необходимы дальнейшие исследования основных функций и токсичности меди на организм животного. В большинстве случаев, в организм сельскохозяйственных животных (КРС, коз, овец, лошадей), медь попадает с зелеными кормами, во время выпаса их на пастбищах, которые удобрялись медью, но так же практикуется использование меди в качестве кормовых добавок [7].

Улучшение иммунитета, повышение жизнестойкости и выживаемости рыб, на начальных стадиях развития, играет одну из ведущих целей для изучения [6].

У животных медь участвует в образовании гемоглобина. Недостаток меди в тканях животного может возникать из-за дефицита элемента в кормах. Также недостаток может иметь, т.н. сложный тип, при котором рацион содержит нормальное количество меди, но другие факторы препятствуют некоторым способам усвоения его животными [7].

Однако, превышение концентраций меди, пагубно влияет на центральную нервную систему с дальнейшими осложнениями. Токсичность меди может быть острой и хронической. Овцы очень подвержены хроническому отравлению медью. Крупный рогатый скот и другие жвачные животные реже страдают от хронического воздействия меди в рационе. Животные с однокамерным желудком гораздо лучше переносят избыток меди в рационе, чем жвачные [5].

Медь играет большую роль и в аквакультуре для борьбы с водорослями и паразитами в морских и пресноводных системах, а также для повышения выживаемости и улучшения кроветворения у рыб. Однако

концентрация меди, необходимая для лечения, может быть опасна или летальна для других видов рыб и беспозвоночных. Сублетальные и токсические уровни меди повреждают жабры и другие ткани рыб, а также подавляют иммунную систему [1].

Рыбы являются удобным объектом исследований при изучении влияния различных факторов на физиологические процессы животных.

Данио рерио (*Danio rerio*) – вид лучеперых рыб семейства карповых (*Cyprinidae*) является пресноводной рыбой речных систем Азии, от Пакистана до Индии, в том числе в Юго-Восточной Азии [3].

Этот вид рыбы получил большое распространение в качестве модельного объекта в лабораторных медико-биологических исследованиях. Скорость развития эмбрионов данио зависит от температуры. Лабораторные эмбрионы и личинки рыбок данио обычно содержатся в инкубаторах в течение 7 дней после оплодотворения. В отличие от новорожденных млекопитающих личинка данио в основном поддерживается питательными веществами, полученными из желтка, который не истощается до 7 дней после оплодотворения [2].

Известно, что в развитии личинок рыб медь влияет на ключевые параметры, такие как выживаемость и активность, но медь – это тяжелый металл, превышая концентрации которого приводят к гибели организма [5].

Кормовая добавка «Купрум Актив», разработанная ООО «БИОНОРМ» (г. Витебск) используется в качестве дополнительного источника меди, при кормлении сельскохозяйственных животных и птиц, а также при изготовлении ветеринарных препаратов [2]. При кормлении рыб данная кормовая добавка еще не использовалась.

Целью работы являлось оценка эмбриотоксичности кормовой добавки «Купрум Актив» на эмбрионы и личинки рыб.

**Основная часть.** Исследования выполнялись на базе кафедры ихтиологии и рыбоводства в 2020 г., в студенческой научно-исследовательской лаборатории «Физиология рыб» (научный руководитель лаборатории – Барулин Н. В.). В качестве объектов исследований использовали эмбрионов и личинок данио рерио дикого типа, находящиеся на стадии икринки и, впоследствии, перешедших на активное питание. Эмбрионы рыб получались от индивидуального нереста (1 самец – 1 самка). Самец и самка накануне, вечером, отсаживались в 3-литровый лоток-нерестовик (лоток, имеющий нерестовый субстрат), 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 естественного нереста. После извлечения эмбрионов из лотка-нерестовика (в 11.00), они промывались от загрязнений, помещались в инкубационную среду. Инкубацию эмбрионов осуществляли в 90 мм полистирольных чашках Петри, которые помещались в охлаждаемые инкубаторы с системой охлаждения и нагревания ST 5 SMART (Pol-Eko-Aragatura, Польша). Температура инкубации эмбрионов составляла 27,5 °С. Объем инкубационной среды в каждой чашке Петри составлял 40 мл. В каждую чашку Петри помещались по 30 экз. эмбрионов спустя 24 часа после оплодотворения. После размещения эмбрионов по чашкам Петри, были созданы следующие экспериментальные группы – контрольная и 12 опытных групп с разными дозировками вещества. Опытные группы имели следующие концентрации кормовой добавки «Купрум-Актив» (мг/л): группа №1 – 0,5, группа №2 – 2,5, группа №3 – 5, опытная группа №4 – 10, опытная группа №5 – 20, опытная группа №6 – 40, группа №7 – 80, группа №8 – 400, группа №9 – 800, группа №10 – 1000, группа №11 – 5000 и группа №12 – 10000 мг/л.

Для анализа поведения личинок в LDT (light dark test) тесте использовали стандартный 96 луночный планшет для ИФА-анализов с круглыми лунками, в каждую лунку которого помещали по 1 личинке даanio рерио. 96 луночный планшет размещался на платформе с инфракрасным освещением и затем накрывался затемненным боксом с поддержанием температуры. Продолжительность адаптации личинок в затемненных условиях составляла 30 минут. Затем осуществлялось последовательное включение и выключение белых светодиодов с 10 минутными интервалами. В ходе LDT теста осуществлялась запись подвижности личинок каждые 2 минуты, в течение 2 минут, при помощи камеры для микроскопа Basler, снабженной инфракрасным фильтром и ПО rylon Viewer с дальнейшим анализом траекторий движения в ПО EthoVision XT (от компании Noldus) в режиме DanioVision.

Результаты исследований установили, выживаемость в опытных группах №5 – №12 составила 0 %, то есть, концентрации 20, 40, 80, 400, 800, 1000, 5000 и 10000,0 мг/л оказались летальными для эмбрионов. В контрольной группе выживаемость эмбрионов составила 100 %, так же в опытных группах №1, №2 и №3 выживаемость составила 100 %. В опытной группе №4 выживаемость составила 50 %. Результаты выживаемости представлены в табл. 1.

Таблица 1. Влияние «Купрум-Актив» на выживаемость эмбрионов данно рерио в период инкубации

Группа	Дозировка, мг / л	Выживаемость, %
Контроль	0	100
Опытная 1	0,5	100
Опытная 2	2,5	100
Опытная 3	5	100
Опытная 4	10	50
Опытная 5	20	0
Опытная 6	40	0
Опытная 7	80	0
Опытная 8	400	0
Опытная 9	800	0
Опытная 10	1000	0
Опытная 11	5000	0
Опытная 12	10000	0

Исследования скорости подвижности в LDT-тесте, при выключении видимого света, показали следующие результаты максимальных средних значений: в контрольной группе –  $0,43 \pm 0,08$  мм/с,  $0,38 \pm 0,06$  мм/с,  $0,31 \pm 0,04$  мм/с,  $0,29 \pm 0,04$  мм/с,  $0,42 \pm 0,05$  мм/с,  $0,39 \pm 0,03$  мм/с; в исследуемой группе №1 (с концентрацией кормовой добавки 0,5 мг/л):  $0,82 \pm 0,07$  мм/с,  $0,71 \pm 0,05$  мм/с,  $0,60 \pm 0,05$  мм/с,  $0,41 \pm 0,06$  мм/с,  $0,48 \pm 0,05$  мм/с и  $0,60 \pm 0,05$  мм/с. Скорость подвижности свободных эмбрионов в опытной группе №1 была в среднем выше чем в контрольной группе, что можно проследить на рис. 1.

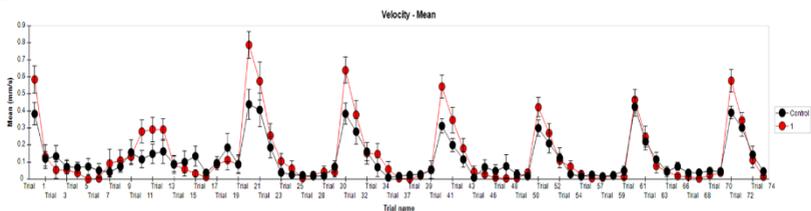


Рис. 1. Результаты влияния «Купрум-Актив» в концентрации 0,5 мг/л на скорость подвижности эмбрионов данно рерио в сравнении с контрольной группой в LDT тесте

Исследования скорости подвижности в LDT-тесте, при выключении видимого света в исследуемой группе №2 (с концентрацией кормовой добавки 2,5 мг/л), показали следующие результаты максимальных средних значений:  $0,75 \pm 0,08$  мм/с,  $0,60 \pm 0,06$  мм/с,  $0,56 \pm 0,05$  мм/с,  $0,44 \pm 0,07$  мм/с,  $0,55 \pm 0,06$  мм/с,  $0,59 \pm 0,07$  мм/с, что также было выше, чем в контрольной группе (рис. 2).

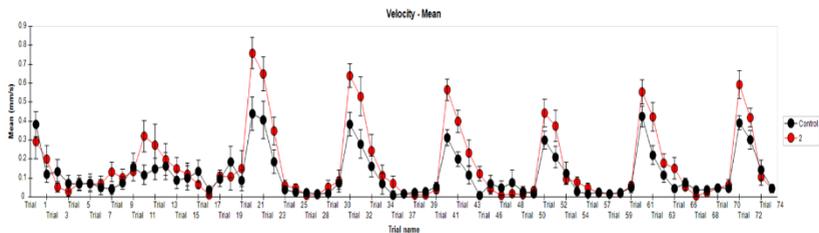


Рис. 2. Результаты влияния «Купрум-Актив», в концентрации 2,5 мг/л на скорость подвижности эмбрионов данио рерио в сравнении с контрольной группой в LDT тесте

Показатели скорости подвижности эмбрионов в опытной группе №3, с концентрацией кормовой добавки 5,0 мг/л, достоверно не отличались от опытной группы №2. Нами были установлены следующие результаты:  $0,77 \pm 0,09$  мм/с,  $0,69 \pm 0,10$  мм/с,  $0,64 \pm 0,09$  мм/с,  $0,62 \pm 0,08$  мм/с,  $0,49 \pm 0,08$  мм/с,  $0,59 \pm 0,09$  мм/с.

Исследования скорости подвижности в LDT-тесте, при выключении видимого света в исследуемой группе №4 (с концентрацией кормовой добавки 10,0 мг/л), показали следующие результаты максимальных средних значений:  $0,28 \pm 0,10$  мм/с,  $0,24 \pm 0,10$  мм/с,  $0,23 \pm 0,10$  мм/с,  $0,26 \pm 0,09$  мм/с,  $0,25 \pm 0,09$  мм/с и  $0,26 \pm 0,09$  мм/с (рис. 3).

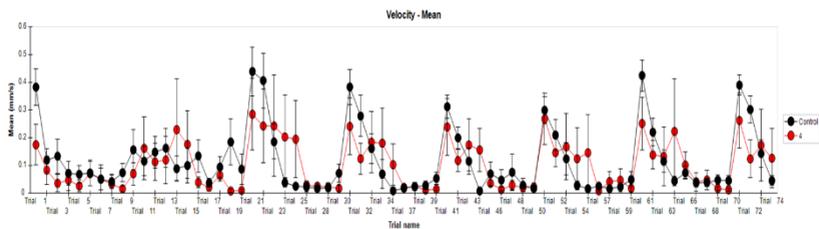


Рис. 3. Результаты влияния «Купрум-Актив», в концентрации 10,0 мг/л на скорость подвижности эмбрионов данио рерио в сравнении с контрольной группой в LDT тесте

Исходя из полученных результатов, нами были рассчитаны общие средние величины скорости подвижности в контрольной и опытных группах (при выключении видимого света): контрольная группа –  $0,16 \pm 0,009$  мм/с, группа №1 –  $0,22 \pm 0,012$  мм/с, группа №2 –  $0,24 \pm 0,012$  мм/с, группа №3 –  $0,26 \pm 0,014$  и группа №4 –  $0,15 \pm 0,015$  мм/с. При включении света: контрольная группа –  $0,05 \pm 0,006$  мм/с, группа №1 –  $0,02 \pm 0,004$  мм/с, группа №2 –  $0,04 \pm 0,005$  мм/с, группа №3 –  $0,04 \pm 0,005$  мм/с и группа №4 –  $0,02 \pm 0,003$  мм/с.

Общие средние показатели проплываемой дистанции у исследуе-

мых групп были следующими (при выключении видимого света): контрольная группа –  $19,5 \pm 1,12$  мм, группа №1 –  $26,6 \pm 1,50$  мм, группа №2 –  $30,1 \pm 1,54$  мм, группа №3 –  $31,9 \pm 1,72$  мм и группа №4 –  $18,3 \pm 1,84$  мм. При включении света: контрольная группа –  $6,22 \pm 0,76$  мм, группа №1 –  $3,34 \pm 0,52$  мм, группа №2 –  $4,93 \pm 0,71$  мм, группа №3 –  $5,16 \pm 0,69$  мм и группа №4 –  $3,44 \pm 0,46$  мм.

Дальнейшее наблюдение за исследуемыми группами установили следующие результаты выживаемости личинки (табл. 2).

Таблица 2. Влияние «Купрум-Актив» на выживаемость 7 суточных личинок данио рерио

Группа	Дозировка, мг / л	Выживаемость, %
Контроль	0	40
Опытная 1	0,5	40
Опытная 2	2,5	40
Опытная 3	5	30
Опытная 4	10	30

В дальнейшем мы осуществляли наблюдение за личинками из исследуемых групп. В результате были установлены следующие значения выживаемости 7 суточных личинок данио рерио: контрольная группа – 40 %, опытная группа №1 – 40 %, опытная группа №2 – 40 %, опытная группа №3 – 30%, опытная группа №4 – 30 %.

**Заключение.** Таким образом, проведенные исследования по оценке эмбриотоксичности кормовой добавки «Купрум-Актив» на личинок данио рерио установили, что концентрации кормовой добавки «Купрум-Актив» 0,5 мг/л, 2,5 мг/л, 5,0 мг/л не оказывают достоверного эмбриотоксического эффекта на эмбрионы и личинки данио рерио. Концентрация 10 мг/л оказывает влияние на снижение выживаемости эмбрионов и личинок, а также на поведение личинок. Превышенные концентрации «Купрум-Актив» более 20 мг/л, оказывает остротоксическое влияние на выживаемость эмбрионов и личинок данио рерио.

Вызывает интерес влияние «Купрум-Актив» на дальнейший рост и развитие рыб, однако это тема наших дальнейших исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Yanong, R. Use of Copper in Marine Aquaculture and Aquarium Systems / R. Yanong // FA164. Gainesville: University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences, 2010 – P. 1–5.

2. Порошок минеральный «Купрум Актив». [Электронный ресурс] / Качество.Бел. Продукция и услуги Республики Беларусь /. – Режим доступа: <https://xn--80aaisxqh1b.xn--90ais/produkcija/item/poroshok-mineralny-kuprum-aktiv-143823> – Дата доступа: 17.01.2021.

3. Sneddon, L. U. NIH Animal Program Director Guidelines for Zebrafish Larvae In-

cubators / L.U. Sneddon // Office of Intramural Research: Office of Animal Care and Use, 2013 – P. 1–4.

3. Dahm, R. Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species / R. Dahm, R. Geisler / *Mar Biotechnol.* – 2006. – Vol. 8(4). – 329.

4. Daiane da, S. A. Copper at low levels impairs memory of adult zebrafish (*Danio rerio*) and affects swimming performance of larvae / S. A. Daiane // *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2016 – P. 122–130.

5. Johnson, A. The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos / A. Johnson // *Aquatic Toxicology*, 2007 – P. 431–438.

6. Павлов, Д. С. Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов / Д. С. Павлов // *Российская академия наук. Федеральное агентство научных организаций*, 2015 – С. 11–16.

7. Copper deficiency in sheep and cattle. [Electronic resource] / Department of Primary Industries and Regional Development | Agriculture and Food / – Access mode: <https://www.agric.wa.gov.au/feeding-nutrition/copper-deficiency-sheep-and-cattle> – Date of access: 14.02.2021.

8. Плавский, В. Ю. Роль поляризации и когерентности оптического излучения во взаимодействии со сперматозоидами осетровых рыб / В. Ю. Плавский, Н. В. Барулин // *Вопросы рыбного хозяйства Беларуси : сборник научных трудов / РУП «Институт рыбного хозяйства», РУП «Научно–практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству», Белорусский государственный университет ; под. общ. ред. М. М. Радько. – Минск : РУП «Институт рыбного хозяйства», 2009. – Вып. 25. – С. 56–63.*

9. Барулин, Н. В. Комплекс диагностического мониторинга физиологического состояния ремонтно–маточных стад осетровых рыб в установках замкнутого водоснабжения / Н. В. Барулин // *Вестник Государственной полярной академии.* – 2014. – № 1 (18). – С. 19–20.

10. Рекомендации по воспроизводству осетровых рыб в рыбоводных промышленных комплексах с применением инновационных методов / Н. В. Барулин [и др.]. – Горки: БГСХА, 2016. – 204 с.