

**ВЛИЯНИЕ ФУЛЬВОВОЙ КИСЛОТЫ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ,  
ЖИЗНЕСТОЙКОСТЬ И ПОВЕДЕНИЕ ЛИЧИНОК МОДЕЛЬНОГО  
ОБЪЕКТА ДАНИО РЕРИО В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO***

**Барулин Николай Валерьевич, к.с.-х.н., доцент**

**Жарикова Анастасия Олеговна**

**Воробьев Артем Олегович**

**Белорусская государственная сельскохозяйственная академия**

Barulin Nikolai, PhD, barulin@list.ru

Zharikova Anastasia

Vorobiev Artem

Belarusian State Agricultural Academy

*Проведенные исследования установили, что фульвовая кислота при внесении 60 %-го концентрата в инкубационные среды для эмбрионов модельного объекта данио рерио не оказывает эмбриотоксический эффект в дозировках 0,1 – 1 %. При дозировке 5 % был обнаружен эмбриотоксический эффект, который выразился в снижении выживаемости эмбрионов и личинок, а также в снижении двигательной активности свободных эмбрионов. Дозировки 0,1–0,5 % оказывают стимулирующее влияние личинок данио рерио в тесте на жизнестойкость.*

**Ключевые слова:** *данио рерио, фульвовая кислота, выживаемость, эмбриотоксичность, жизнестойкость, поведение.*

**Введение.** Рыбы являются удобной моделью для оценки влияния различных факторов на физиологические показатели живых организмов [1, 2].

Фульвовая кислота (*fulvic acid, FA*) – это один из двух классов натурального кислотного органического полимера, который может быть извлечен (экстрагирован) из гумуса, обнаруженного в почве, осадке или водной среде. Его название происходит от латинского *fulvus*, обозначая его желтый цвет. Это органическое вещество растворимо в сильной кислоте (pH = 1) и имеет усредненную химическую формулу  $C_{135}H_{182}O_{95}N_5S_2$  [3]. Широкое применение фульвовая кислота получила в медицине благодаря своему влиянию на организм человека. Основными положительными воздействиями являются: детоксикация, антиоксидантная активность, транспорт веществ, пребиотическая функция, защита от аллергенов, помощь в борьбе с вирусами [4].

В промышленном рыбоводстве специалисты часто прибегают к добавкам к воде на основе фульвовых кислот или, к продуктам на основе гуминовых веществ из сектора кормов для животных [5]. Несмотря на перспективно положительные характеристики фульвовой кислоты, ее использование в области кормления рыб является малоизученным. Также открытым остается вопрос в дозировании данной кислоты при ее использовании в аквакультуре.

Целью наших исследований являлась оценка эмбриотоксичности различных дозировок фульвовой кислоты в эксперименте *in vivo*.

**Материал и методика исследований.** 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 данио рерио на стадии икры и на стадии свободного эмбриона, а также личинки перешедшие на активное питание. В эксперименте использовали 60 % концентрат фульвовой кислоты. Инкубацию эмбрионов осуществляли в 90 мм полистирольных чашках Петри. 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. Дополнительно в инкубационные среды опытных групп перед началом инкубации вносился концентрат фульвовой кислоты в дозировках, обеспечивающих концентрацию 0,1 % (опытная группа 1); 0,5 % (опытная группа 2); 1,0 % (опытная группа 3); 5,0 % (опытная группа 4) от исходного 60-го % концентрата фульвовой кислоты. В контрольную группу фульвовая кислота не вносилась. Каждая опытная и контрольная группа имела дополнительно 2 дубликата. После внесения фульвовой кислоты в опытные группы, ежедневно регистрировали выживаемость эмбрионов. После перехода эмбрионов из стадии икры, в стадию свободного эмбриона, осуществляли регистрацию частоты сердечных сокращений и активность кровотока в хвостовой вене при помощи биологического микроскопа и камеры для микроскопа Basler acA2040-55uc. Захват изображений осуществляли при помощи ПО pylonViewer, с дальнейшим обработкой видео на специализированном ПО DanioScope (Noldus). После перехода свободных эмбрионов на плав, осуществляли тестирование подвижности эмбрионов в LDT тесте (light dark test) в 96 луночном планшете с круглыми лунками. Запись подвижности эмбрионов осуществляли при помощи камеры Basler, снабженной инфракрасным фильтром и ПО pylon Viewer с дальнейшим анализом траекторий движения в ПО EthoVision XT (Noldus) в режиме DanioVision. Для статистической обработки использовали программу R с пакетами RCommander и др. В дальнейшем осуществляли контроль выживаемости и размерных показателей у личинок, перешедших на активное питание в обычных условиях, и в условиях теста на жизнестойкость (в условиях отсутствия аэрации, подмены воды, высоких концентрациях аммония, аммиака, нитритов, нитратов).

**Результаты исследований и их обсуждение.** В результате проведенных исследований было установлено, что различные дозировки фульвовой кислоты способны оказывать как отрицательный, так и положительный эффект на эмбрионы и личинки данио рерио в условия *in vivo*. Так, выживаемость в период инкубации эмбрионов в контрольной и в опытных группах 1 – 3 составила 100 %. В опытной группе 4 выживаемость эмбрионов составила 40 %. Исследования ЧСС и активности кровотока в хвостовой вене не выявила достоверных различий между исследуемыми группами. Исследования ЧСС и активности кровотока в хвостовой вене в опытной группе 4 не осуществлялись по причине задержки их эмбрионального развития.

В опытной группе 3 происходило увеличение ЧСС. Однако статистический анализ не выявил достоверных различий.

Исследования подвижности свободных эмбрионов в LTD тесте установили достоверное снижение общего проплываемого расстояния и средней скорости подвижности в опытной группе 4. В остальных группах не было установлено достоверных различий по отношению в контрольной группе.

Свободные эмбрионы в контрольной группе хорошо реагировали на изменение светового режима. При выключении видимого света подвижность свободных личинок заметно активизировалась, что выражалось в колоколообразных кривых на графике, в отличие от опытной группы 4, свободные эмбрионы которой практически не реагировали на выключение видимого света.

Средняя скорость подвижности за весь период LTD теста в темноте составила  $0,458 \pm 0,029$  мм/с в контрольной группе и  $0,005 \pm 0,001$  мм/с в опытной группе 4.

Дальнейшие наблюдения за личинками, перешедшими на активное питание установили, что в опытной группе 4 происходило достоверное снижение выживаемости по отношению к контрольной группе, которое составило 30 % (75 % в контрольной группе). При этом в опытных группах 1 и 2 происходило достоверное повышение выживаемости, относительно контрольной группы – 90 и 85 %, соответственно.

Достоверных отличий между исследуемыми группами по средней длине обнаружено не было.

С целью исследования влияния фульвово́й кислоты на жизнестойкость личинок, перешедших на активное питание в условиях отсутствия аэрации, подмены воды и высоких концентрациях азотных веществ (по причине использования сухих кормов), нами были сформированы исследуемые группы: контрольная, опытная 1 (внесение в воду 0,05 % фульво́вой кислоты), опытная 2 (внесение в воду 0,1 % фульво́вой кислоты), опытная 3 (внесение в воду 0,5 % фульво́вой кислоты). В тесте на жизнестойкость, в опытных группах с дозировками внесения концентрата фульво́вой кислоты 0,1 и 0,5 %, были продемонстрированы наибольшие показатели выживаемости личинок – 50 и 55 %, соответственно (достоверной разницы между этим группами обнаружено не было), тогда как в контрольной группе, а также в опытной группе с дозировкой концентрата 0,05 %, наблюдалась 100 % смертность личинок. В опытных группах в которых выжили личинки, достоверной разницы по средней длине не наблюдалось.

Такие результаты жизнестойкости под влиянием фульво́вой кислоты можно объяснить ее потенциальными токсикорезистентными свойствами. Кроме того, повышение жизнестойкости опытных групп 2 и 3 в условиях высокой концентрации азотных веществ относительно контрольной группы и опытной группы 1 (0,05 %) можно объяснить тем, что под влиянием фульво́вой кислоты происходило снижение pH, что снижало долю  $\text{NH}_3$  в соединении  $\text{NH}_3\text{--NH}_4$ .

**Заключение.** Таким образом, проведенные исследования установили, что фульво́вая кислота при внесении 60 %-го концентрата в инкубационные среды для эмбрионов модельного объекта данио рерио не оказывает эмбриотоксического эффекта в дозировках 0,1 – 1 %. При дозировке 5 % нами был обнаружен эмбриотоксический эффект, который выражался в снижении выживаемости эмбрионов и личинок, а также в снижении двигательной активности свободных эмбрионов. Дозировки 0,1 – 0,5 % оказывают стимулирующее влияние на личинок данио рерио в тесте на жизнестойкость. Мы полагаем, что такой эффект можно объяснить тем, что при добавлении фульво́вой кислоты в воду происходило снижения токсичности азотных веществ.

#### Список использованных источников

1. 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.

2. Барулин, Н. В. Рекомендации по воспроизводству осетровых рыб в рыбоводных индустриальных комплексах с применением инновационных методов / Н. В. Барулин, В. Ю. Плавский, К. Л. Шумский, Л. О. Атрощенко, Е. Г. Новикова, С. В. Роговцов, М. С. Лиман – Горки : БГСХА, 2016. – 204 с.

3. Britannica [Electronic resource]: Fulvic acid chemical compound. – Mode of access: <https://www.britannica.com/science/fulvic-acid>. – Date of access: 18.01.2021.

4. Арт Лайф [Электронный ресурс] / Чем полезна фульвовая кислота для человека. – Режим доступа: <https://www.artlife.ru/blog/zdorove/chem-polezna-fulvovaya-kislota-dlya-cheloveka?> – Дата доступа: 18.01.2021.

5. German technology. Humic substances based products [Electronic resource]: What fulvic acids do for your aquarium. – Mode of access: <https://www.humintech.com/livestock-breeding/blog/what-fulvic-acids-do-for-your-aquarium>. – Date of access: 20.01.2021.