

**ВЛИЯНИЕ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ «КУПРУМ-АКТИВ» НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ И ПОВЕДЕНИЕ ЛИЧИНОК МОДЕЛЬНОГО ОБЪЕКТА ДАНИО РЕРИО В ЭКСПЕРИМЕНТЕ  
*IN VIVO***

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

**Воробьев Артем Олегович**

**Жарикова Анастасия Олеговна**

**Белорусская государственная сельскохозяйственная академия**

Barulin Nikolai, PhD, barulin@list.ru

Vorobiev Artem

Zharikova Anastasia

Belarusian State Agricultural Academy

*Исследования установили, что при концентрации кормовой добавки 20 мг/л и выше наблюдался остротоксический эффект, который выразился 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%)*

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

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

Медь - важный микроэлемент для животных, необходимый для роста сельскохозяйственных животных [3]. Улучшение иммунитета, повышение жизнестойкости и выживаемости рыб, на начальных стадиях развития, играет одну из ведущих целей для изучения [4].

Медь играет большую роль и в аквакультуре для борьбы с водорослями и паразитами в морских и пресноводных системах, а так же 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 [5].

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

**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 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-х 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-Aparatura, 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 данио 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-х минут, при помощи камеры для микроскопа Basler, снабженной инфракрасным фильтром и ПО pylon Viewer с дальнейшим анализом траекторий движения в ПО EthoVision XT (от компании Noldus) в режиме DanioVision.

**Результаты исследований и их обсуждение.** 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%.

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.

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 так же было выше, чем в контрольной группе.

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.

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 исследуемых 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.

В дальнейшем мы осуществляли наблюдение за личинками из исследуемых групп. В результаты 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.

#### 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 промышленных 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. 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.
4. 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.
5. 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.