

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛУЛЕТАЛЬНОЙ ДОЗЫ (ЛД50) ФУЛЬВОВОЙ КИСЛОТЫ,
КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ В АКВАКУЛЬТУРЕ,
ПОЛУЧЕННОЙ ИЗ ЛИГНИТА И КУКУРУЗНОГО СЫРЬЯ,
НА МОДЕЛЬНОМ ОБЪЕКТЕ ДАНИО РЕРИО**

Жарикова А.О., Барулин Н.В.

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

*Результаты исследований установили, что между токсичностью фульвовых кислот, полученных из лигнита и кукурузного сырья, существует разница. ЛД50 фульвовой кислоты, полученной из лигнита, составила 83,18 мг/л, что относит ее к категории «Средняя токсичность» (10 мг/л < ЛД50 < 100 мг/л). ЛД50 фульвовой кислоты, полученной из кукурузного сырья, составила 130,81 мг/л, что относит ее к категории «Умеренная токсичность» (100 мг/л < ЛД50 < 1000 мг/л). **Ключевые слова:** фульвовая кислота, данио рерио, лигнит, кукурузное сырье, токсичность.*

**DETERMINATION OF A SEMI-LETHAL DOSE (LD50) OF FULVIC ACID
AS A POTENTIAL AQUACULTURE FEED ADDITIVE DERIVED FROM LIGNITE
AND CORN ON A MODEL OBJECT ZEBRAFISH**

Zharikova A.O., Barulin N.V.

EI «Belarusian State Agricultural Academy», Gorki, Republic of Belarus

*The results of the study established that there was a difference between the toxicity of fulvic acids obtained from lignite and corn raw material. The LD50 of fulvic acid obtained from lignite was 83.18 mg/L, which categorizes it as "Medium toxicity" (10 mg/L < LD50 < 100 mg/L). The LD50 of fulvic acid derived from corn raw material was 130.81 mg/L, which categorizes it as "Moderate toxicity" (100 mg/L < LD50 < 1000 mg/L). **Keywords:** fulvic acid, zebrafish, lignite, maize raw material, toxicity.*

Введение. В настоящее время исследователями в области животноводства уделяется внимание фульвовой кислоте, в качестве эффективной кормовой добавки, использование которой способствует улучшению качества получаемой продукции и здоровья сельскохозяйственных животных [1-6].

Фульвовая кислота, один из продуктов микробного метаболизма, представляет собой естественное соединение с широким спектром действия [2]. Ее относят к группе гумусовых кислот. Отличительные особенности фульвовой кислоты от гуминовой кислоты следующие: фульвовая кислота обычно имеет более низкий молекулярный вес и содержит больший процент кислорода. Это делает её более растворимой в воде и доступнее для живых организмов; гуминовая кислота включает в себя более крупные молекулы с высоким содержанием углерода. Гуминовая кислота обычно имеет темнее цвет, и она хуже растворима в воде, чем фульвовая кислота [7-9].

Фульвовая кислота может иметь разное происхождение и быть полученной из различных сырьевых источников. Один из таких источников – это лигнит, что представляет собой древесный материал, который превратился в уголь под воздействием давления и температуры на протяжении миллионов лет [10]. Кроме того, благодаря современным технологиям, фульвовая кислота может быть синтезирована из растительного сырья, например из кукурузы [11].

Цель наших исследований заключалась в определении полулетальной дозы (ЛД50) раз-

личных фульвовых кислот, как перспективных кормовых добавок, полученных из лигнита и кукурузного сырья, на модельном объекте данио рерио.

Материал и методы исследований. В исследованиях использовали фульвовую кислоту, полученную из лигнита (производство Китай), а также из кукурузного сырья (производство Российской Федерации).

Для получения эмбрионов использовали племенное поголовье данио рерио дикого типа (wild type) не подвергавшихся заражению с хорошо задокументированным коэффициентом оплодотворяемости икры [12, 13]. Рыбы были свободны от макроскопически различимых симптомов инфекций и болезней и не подвергались никакому фармацевтическому (острому или профилактическому) лечению в течение 2 месяцев до нереста. Осуществлялась адаптация рыбы к условиям лабораторных установок замкнутого водоснабжения и к условиям вивария. Содержание маточного стада осуществлялось в специализированном виварии, предназначенном для содержания данио рерио. Виварий представлял собой лабораторную установку замкнутого водоснабжения общим объемом 320 л, которая оснащена системой аэрации, биофильтрации, обеззараживания, регулирования температуры и освещения. Основные параметры водной среды соответствовали оптимальным параметрам содержания данио рерио: рН 8,5, кислород 7,0 мг/л, нитриты, нитраты и аммонийный азот отсутствовали. Объем подмены свежей воды составлял в среднем 30 % от общего объема воды в виварии в сутки.

Половозрелые рыбы содержались при температуре воды 27 °С, со световым режимом 14 часов (день) : 10 часов (ночь), постоянной циркуляцией воды, фильтрацией и аэрацией. В лотках для выращивания самки и самцы постоянно содержались вместе, с примерным соотношением 1 : 2. Оптимальная скорость фильтрации отрегулирована; избыточная скорость фильтрации, вызывающая сильное колебание воды, избегалась. Избыточное кормление избегалось, качество воды и чистота аквариумов регулярно контролировалась.

Основной рацион сформированных групп включал в себя корм Tetra "TetraMin. Granules".

В качестве объектов исследований использовали эмбрионы 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-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 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 полистирольных чашках Петри, которые помещались в инкубаторы с системой охлаждения и нагревания 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.

Общая оплодотворяемость всех собранных эмбрионов составляла $\geq 70\%$. Процент вылупления в контрольной группе составлял $\geq 80\%$ к концу 96-часовой экспозиции.

Приготовление концентраций фульвовой кислоты (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 разноконцентрированные растворы для экспозиции.

Приготовление концентраций ФК (как из лигнита, так из кукурузного сырья) в диапа-

зоне 100-102 400 мг/л осуществлялось по следующей методике. Вначале приготавливался стоковый раствор в концентрации 102 400 мг/л (2,048 г сухой ФК в 20 мл EW). Затем из стокового раствора приготавливались разноконцентрированные 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-ти 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-ти луночном планшете перемещались в термостат для инкубации при температуре 27,5-28,0 °С.

Замена экспозиционных растворов у эмбрионов осуществлялась ежедневно.

Также, ежедневно осуществляли подсчет погибших эмбрионов и личинок, а также замену экспозиционных растворов на свежеприготовленные растворы до возраста 144 hpf.

Расчет ЛД50 осуществляли в программной среде R по результатам итоговой смертности. Тип функции модели выбирали на основании минимальной величины АИС-критерия при сравнении двух возможных моделей.

Результаты исследований. Результаты определения полулетальной дозы фульвовой кислоты, полученной из лигнита и кукурузного сырья на эмбрионах данио рерио, представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Смертность эмбрионов и личинок данио рерио через 144 часов после оплодотворения (hpf) под влиянием различных концентраций фульвовой кислоты, полученной из лигнита и кукурузного сырья

Концентрация фульвовой кислоты, мг/л	Смертность эмбрионов, %	
	«лигнитная» фульвовая кислота	«кукурузная» фульвовая кислота
0	25,0	4,16
10	47,50	33,33
20	50,00	8,33
30	50,00	8,33
40	37,50	25,0
50	37,50	8,33
60	27,50	16,66
70	40,00	20,83
80	35,00	20,83
90	85,00	4,16
100	58,92	20,83
200	41,66	100,00
400	91,66	100,00
800	100,00	100,00
1600	100,00	100,00
3200	100,00	100,00
6400	100,00	100,00
12800	100,00	100,00
25600	100,00	100,00
51200	100,00	100,00
102400	100,00	100,00

В наших исследованиях мы наблюдали, что под влиянием фульвовой кислоты, полученной из лигнита, смертность эмбрионов и личинок данио рерио была выше, чем под влия-

нием фульвовой кислоты, полученной из кукурузного сырья. В диапазоне дозировок от 10 до 100 мг/л, смертность эмбрионов и личинок данио рерио под влиянием «лигнитной» фульвовой кислоты колебалась от 27,5 до 85,0 %, тогда как под влиянием «кукурузной» фульвовой кислоты смертность в данном диапазоне дозировок колебалась от 4,16 до 33,3 %. При переходе в диапазон от 100 до 1000 мг/л смертность эмбрионов и личинок данио рерио резко возрастала в двух группах до 100 %.

Результаты расчета ЛД50 для двух типов фульвовых кислот представлены в таблице 2. Расчет ЛД50 осуществлялся при помощи статистической платформы R. Выбор лучшей модели, определяющей наиболее точную ЛД50, осуществляли на основании значения АИС-критерия. Наименьшие значения АИС-критерия соответствовали лучшей модели.

Таблица 2 – Результаты расчета ЛД50 и АИС-критерия для эмбрионов и личинок данио рерио через 144 часов после оплодотворения (hpf) под влиянием различных концентраций фульвовой кислоты, полученной из лигнита и кукурузного сырья

Критерий	Пробит / Концентрация	Пробит (ln) / Концентрация	Логит / Концентрация	Логит (ln) / Концентрация
«Лигнитная» фульвовая кислота				
АИС	94,67	129,77	95,43	134,17
ЛД50, мг/л	83,18	51,82	82,35	52,74
«Кукурузная» фульвовая кислота				
АИС	76,07	132,26	73,89	124,34
ЛД50, мг/л	131,76	121,77	130,81	123,26

В результате проведенных расчетов нами было установлено, что для определения ЛД50 «лигнитной» фульвовой кислоты пробит модель является лучшей, т.к. обладает наименьшим значением АИС-критерия. Для определения ЛД50 «кукурузной» фульвовой кислоты лучшей моделью является логит модель. Расчеты установили, что ЛД50 «лигнитной» фульвовой кислоты составила 83,18 мг/л, ЛД50 «кукурузной» фульвовой кислоты составила 130,81 мг/л.

Заключение. Результаты исследований установили, что между токсичностью фульвовых кислот, полученных из лигнита и кукурузного сырья, существует разница. ЛД50 фульвовой кислоты, полученной из лигнита, составила 83,18 мг/л, что относит ее к категории «Средняя токсичность» ($10 \text{ мг/л} < \text{ЛД50} < 100 \text{ мг/л}$). ЛД50 фульвовой кислоты, полученной из кукурузного сырья составила 130,81 мг/л, что относит ее к категории «Умеренная токсичность» ($100 \text{ мг/л} < \text{ЛД50} < 1000 \text{ мг/л}$).

Основные причины, указывающие на то, что токсичность фульвовой кислоты из лигнита выше токсичности фульвовой кислоты из кукурузного сырья по нашему мнению следующие:

1. Примеси: лигнит, как природный материал, может содержать различные примеси, включая тяжелые металлы, органические соединения и другие вещества, которые могут повысить токсичность.
2. Остаточные соединения: процессы извлечения фульвовой кислоты из лигнита могут оставлять остаточные соединения, которые могут иметь токсичные свойства.
3. Различия в структуре и свойствах: фульвовая кислота из лигнита и кукурузного сырья может иметь разную структуру и химический состав. Эти различия могут привести к разным уровням токсичности.
4. Механизмы токсичности: возможно, что фульвовая кислота из лигнита воздействует на организмы через более эффективные или интенсивные механизмы, что приводит к повышенной токсичности.

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. – 1159320. 4. Барулин, Н.В. Влияние фульвовой кислоты на эмбриотоксичность дацио 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 фульвовой кислоты на размножение дацио 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 фульвовой кислоты на размножение дацио 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. Барулин, Н.В. Перспективы использования дацио рерио (*Danio rerio* (Hamilton, 1822)) для медико-биологических исследований / Н. В. Барулин, А. О. Жарикова, А. О. Воробьев, В. В. Лесневская // *Зоологические чтения - 2021* : Материалы VI международной научно-практической конференции, посвящённой 130-летию доктора биологических наук, профессора Анатолия Владимировича Федюшина, Гродно, 24–25 марта 2021 года / Редколлегия: О.В. Янчуревич (гл. ред.), А.В. Рыжая, А.Е. Каревский. – Гродно: Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, 2021. 13. Барулин, Н. В. Современные методы использования дацио 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.

УДК 619

ЭНЗИМАТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ КАРОЛИНА

Измайлович И.Б., Садомов Н.А.

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

*В результате эксперимента было установлено, что при сочетанном применении витамина А и препарата «Каролин» в пропорциях 50:50МЕ по биологической активности, включая витамин К₃ в количестве равном общепринятой дозе его введения в рацион, цыплята-бройлеры лучше усваивали корм, при этом наблюдалось увеличение живой массы, снижение затрат кормов, повышение переваримости питательных веществ рациона. Зафиксирована тенденция увеличения антиоксидантов, происходила активизация гемопоеза и повышение сохранности поголовья. Установлено увеличение выхода потрошенной тушки, повысился уровень аминокислот в мясе птицы и интенсифицировалось отложение витамина А в печени. **Ключевые слова:** Каролин, витамин А, цыплята-бройлеры, кормление.*

THE ENZYMATIC POTENTIAL OF CAROLIN

Izmailovich I.B., Sodomov N.A.

EI «Belarusian State Agricultural Academy» Gorki, Republic of Belarus

As a result of the experiment, it was found that with the combined use of vitamin A and the Carolin preparation in proportions of 50:50 IU in terms of biological activity, including vitamin K₃