

**НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР
«ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ
МЕДИЦИНИ»**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КУРБАЦЬКА ОЛЕНА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 619:579.843.4.083.13.043:615.9:637.07:636.085.34

**ДИСЕРТАЦІЯ
ТОКСИКОЛОГІЧНА ОЦІНКА КОРМІВ З ВИКОРИСТАННЯМ
БІОЛЮМІНЕСЦЕНТНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ**

21 – «Ветеринарія»

211 – «Ветеринарна медицина»

Подається на здобуття освітньо-наукового ступеня
доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело



О. В. Курбацька

Науковий керівник: Палій Анатолій Павлович, доктор ветеринарних наук,
професор

Харків– 2023

АНОТАЦІЯ

Курбацька О.В. Токсикологічна оцінка кормів з використанням біолоюмінесцентних мікроорганізмів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 – Ветеринарна медицина. – Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини».

Дисертаційна робота виконана у лабораторії токсикологічного моніторингу ННЦ «ІЕКВМ», відповідно до завдань: 38.02.02.02 П «Розробити нові методики визначення основних абіотичних токсикантів (пестициди, неорганічні елементи тощо) для отримання якісної і безпечної продукції тваринництва» (номер державної реєстрації 0119U100990) та 34.03.00.01 Ф «Дослідження впливу на організм тварин факторів навколишнього середовища (наночастки, важкі метали, мікотоксини, тощо) та розроблення сучасної системи забезпечення якості і безпечності сільськогосподарської продукції за основними маркерами контролю» (номер державної реєстрації 0121U108350).

У дисертації, на основі результатів досліджень розроблено експрес-методику визначення загальної токсичності кормів з використанням фотолоюмінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum*, визначено її валідаційні характеристики й експериментально доведено ефективність відносно пріоритетних токсикантів (мікотоксинів, важких металів, пестицидів та мікроелементів), розроблене поживне середовище для культивування *Ph. phosphoreum* та відпрацьовані оптимальні умови культивування мікроорганізму.

Наукова новизна одержаних результатів полягає у тому, що вперше в Україні було розроблено «Спосіб визначення загальної токсичності кормів за допомогою фотобактерій *Photobacterium phosphoreum*» (патент України на корисну модель № 147856) та удосконалено систему культивування даного

виду бактерій за рахунок розроблення «Поживного середовища для культивування фотолюмінісцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum*» (патент України на корисну модель № 143070). Вперше в Україні досліджено залежність інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* від вмісту в кормах таких забруднювачів як мікотоксини, важкі метали, пестициди та мікроелементи.

Практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що на основі вивчення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* під дією різних токсикантів розроблено науково-методичні рекомендації «Експрес-методика визначення загальної токсичності кормів з використанням фотолюмінісцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum*» (схвалено Науково-методичною радою Держпродспоживслужби: протокол № 1 від 12 травня 2021 р. Експрес-методика визначення загальної токсичності дозволяє швидко (1-1,5) год і з високою вірогідністю надавати токсикологічну оцінку кормам. Розроблене поживне середовище для культивування фотолюмінісцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum*, що, за рахунок введення нових компонентів, забезпечує достатньо високий рівень світіння бактерій, пришвидшує їх ріст і накопичення бактеріальної маси та більш економічно вигідніше.

Основні результати роботи. Розроблено експрес-методику визначення загальної токсичності кормів з використанням біолоюмінісцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum*. Методика базується на визначенні змін люмінесценції фотобактерій *Ph. phosphoreum* під дією токсичних речовин, які присутні в кормах, у порівнянні з контролем. Для кількісної оцінки впливу на люмінесценцію бактерій (визначення ступені токсичності зразка) використовують коефіцієнт пригнічення (γ) та індекс токсичності (Т). Висновок про ступінь токсичності корму роблять за величиною індексу токсичності за трьома граничними рівнями (зразок не токсичний, зразок токсичний і зразок сильно токсичний).

Визначено валідаційні характеристики методики: вона є специфічною, точною, лінійною, відтворюваною, межа детектування методики відносно

мікотоксину зеараленону становить $0,125 \text{ мкг/см}^3$, а межа визначення $0,25 \text{ мг/кг}$ корму. Оптимальні умови та термін зберігання для *Ph. phosphoreum*: у пробірках на щільному поживному середовищі за температури $(4,0 \pm 0,3)^\circ\text{C}$ зі щомісячним пересівом протягом 7-ми місяців, а оптимальні умови та термін культивування перед дослідженням: у пробірках на рідкому поживному середовищі за температури $(26,0 \pm 0,8)^\circ\text{C}$ через 24 години після висіву.

Досліджено вплив різних рівнів пестицидів, які регламентовані «Переліком максимально допустимих рівнів небажаних речовин у кормах...», на інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* та надана токсикологічна оцінка кормам за відсотком зниження інтенсивності світіння. Установлено, що всі пестициди дозозалежно пригнічували світіння *Ph. phosphoreum* в усіх досліджуваних дозах: гептахлор (ГХ) пригнічував світіння *Ph. phosphoreum* на 7,8-35,9 %, дихлордифеніл трихлорметилметан (ДДТ) – на 36,9-61,2 %, α -ізомер гексахлорциклогексану (ГХЦГ) – на 16,2-56,4 %, β -ізомер ГХЦГ – на 8,9-71,7 %, γ -ізомер ГХЦГ – 7,3-54,1 %, що дозволило оцінити корми з вмістом ГХ 0,0025-0,01 мг/кг, α -ізомеру ГХЦГ до 0,002 мг/кг, β -ізомеру ГХЦГ до 0,001 мг/кг, γ -ізомеру ГХЦГ менше 0,05-0,2 мг/кг як нетоксичні; за вмісту ГХ 0,05-2,0 мг/кг, ДДТ 0,01-0,05 мг/кг α -ізомеру ГХЦГ 0,02-0,2 мг/кг, β -ізомеру ГХЦГ 0,01 мг/кг, γ -ізомеру ГХЦГ 1,0 мг/кг – як токсичні і за вмісту ДДТ 0,1-1,0 мг/кг, α -ізомеру і γ -ізомеру ГХЦГ від 2,0 мг/кг, β -ізомеру ГХЦГ 0,1-1,0 мг/кг – як сильно токсичні корми.

Досліджено вплив різних рівнів гербіцидів на інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* та надана токсикологічна оцінка кормам за відсотком зниження інтенсивності світіння: препарат Сотейра (імазамокс+імазапір) повністю пригнічував світіння *Ph. phosphoreum* на усіх досліджуваних рівнях гербіциду в кормах, Грінфорт преміум (2,4-Д 2-етилгексилловий ефір+флорасулам) в середньому – на 18,9-74,2 %, Грінфорт хорс (хізалофоп-п-етил) – на 13,9-54,2 %, Скат (хізалофоп-п-тефуріл) – на 12,6-67,3 %, Агрошит супер (калійна сіль гліфосату) – на 16,5-71,0 %, Грінфорт екстра (метолахлор+тербутилазин) – 7,6-84,2 %, Астанес (ацетохлор) – на 25,3-67,9 %, Астралід (клопіралід) – 8,5-

71,0 %, Грінфорт НК 40 (нікосульфурон) – на 10,8-45,3 %, що дозволило оцінити корми з вмістом гербіцидів Грінфорт преміум менше 0,01 мг/кг, Грінфорт хорс менше 0,008-0,04 мг/кг, Скат менше 0,008-0,02 мг/кг, Агроцит супер менше 0,1-0,5 мг/кг, Грінфорт екстра менше 0,02-0,05 мг/кг, Астанес менше 0,006 мг/кг, Астралід менше 0,4-2,0 мг/кг, Грінфорт НК 40 менше 0,04-0,1 мг/кг як не токсичні; за вмісту Грінфорт преміум 0,025 мг/кг, Скат 0,04-0,08 мг/кг, Агроцит супер від 1,0 мг/кг, Грінфорт екстра від 0,1 мг/кг, Астанес 0,015 мг/кг, Грінфорт НК 40 від 0,2 мг/кг як токсичні і за вмісту препаратів Сотейра 0,01-0,25 мг/кг, Грінфорт преміум 0,05-0,25 мг/кг, Грінфорт хорс 0,08-0,2 мг/кг, Скат від 0,2 мг/кг, Агроцит супер від 2,5 мг/кг, Грінфорт екстра від 0,2 мг/кг, Астанес від 0,03 мг/кг, Астралід 4,0 мг/кг і вище як корми сильно токсичні.

Досліджено вплив різних рівнів фунгіциду Карбендазол (карбендазим+ципроконазол) на інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* та надана токсикологічна оцінка кормам за відсотком зниження інтенсивності світіння: за вмісту препарату від 0,01 до 0,25 мг/кг корму спостерігали повне пригнічення світіння *Ph. phosphoreum*, що дозволило оцінити корми з вмістом фунгіциду Карбендазол від 0,01 мг/кг включно як сильно токсичні.

Досліджено вплив різних рівнів інсектицидів на інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* та надана токсикологічна оцінка кормам за відсотком зниження інтенсивності світіння: інсектицид Велес (тіаклоприд+дельтаметрин) пригнічував світіння *Ph. phosphoreum* в середньому на 7,8-27,7 %, а інсектицид Вирій (тіаклоприд) – на 8,6-31,2 %, що дозволило оцінити корми з вмістом інсектициду Велес менше 0,004-0,02 мг/кг та Вирій менше 0,004-0,01 мг/кг корму як нетоксичні, а за вмісту 0,04-0,1 мг/кг та 0,02-0,1 мг/кг відповідно як токсичні.

Поряд з цим деякі гербіциди в малих дозах стимулювали світіння *Ph. phosphoreum*, зокрема, гербіцид Скат (хізалофоп-п-тефуріл) за вмісту препарату 0,008 мг/кг корму в середньому на 3,0 %, Астанес за 0,006 мг/кг – на 12,8 % і Астралід (клопіралід) за вмісту препарату 0,4 мг/кг корму – на 10,4 %.

Досліджено вплив різних рівнів мікотоксинів на інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* та надана токсикологічна оцінка кормам за відсотком зниження інтенсивності світіння: Т₂ токсин пригнічував інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* на 22,1-49,6 %, зеараленон – на 1,4-89,8 %, дезоксиніваленол – на 15,3-62,8 %, охратоксин А – на 10,4 і 41,8 %, фумонізін – на 17,7-55,6 %, афлатоксин В₁ – на 42,0-70,9 %, що дозволило оцінити корми з вмістом мікотоксину Т₂ менше 0,01-0,05 мг/кг, зеараленону менше 0,1 мг/кг, дезоксиніваленолу менше 0,05-0,1 мг/кг, охратоксину А менше 0,005-0,1 мг/кг, фумонізіну менше 0,5-1,0 мг/кг, афлатоксину В₁ менше 0,001-0,005 мг/кг корму як не токсичні; за вмісту Т₂ токсину 0,01-1,0 мг/кг, зеараленону 0,2 мг/кг, дезоксиніваленолу 0,5-1,0 мг/кг, охратоксину А 0,5 мг/кг, фумонізіну 5,0-10,0 мг/кг, афлатоксину В₁ 0,01 мг/кг – як токсичні і за вмісту зеараленону 1,0-10,0 мг/кг, дезоксиніваленолу від 2,0 мг/кг, фумонізіну від 15,0 мг/кг, афлатоксину В₁ 0,05 мг/кг – як сильно токсичні корми;

Поряд з цим деякі мікотоксини стимулювали світіння *Ph. phosphoreum*, зокрема, Т₂ токсин за вмісту мікотоксину 0,01 і 0,05 мг/кг в середньому на на 38,0 і 20,8 %, дезоксиніваленол за вмісту мікотоксину 0,05 мг/кг – на 7,9 %, охратоксин А за вмісту мікотоксину 0,005; 0,01 і 0,05 (показник МДР) мг/кг – на 26,0; 20,7 і 16,0 %, фумонізін за вмісту мікотоксину 0,5 мг/кг – на 12,1 % і афлатоксин В₁ за вмісту мікотоксину 0,001-0,005 мг/кг – в середньому на 69,8 %.

Досліджено вплив різних рівнів неорганічних елементів на інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* та надана токсикологічна оцінка кормам за відсотком зниження інтенсивності світіння: арсен пригнічував інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* на 5,4-42,6 %, кадмій – на 12,7-22,3 %, плумбум – на 0,48-40,8 %, меркурій – на 18,4-21,2 %, купрум – на 1,1-40,8 %, цинк – на 12,8-100,0 %, ферум – на 0,84-100,0%, кобальт – в середньому на 25,1 %, манган – на 18,2-100,0 %, селен – на 3,8-50,1 %, нікель – на 13,5-35,5 %, хром – на 12,8-23,9 %, бром – на 3,3-23,2 %, що дозволило оцінити корми з вмістом арсену менше 0,05-0,1 мг/кг, кадмію менше 0,04-0,4 мг/кг, плумбуму менше 0,5-1,0

мг/кг включно, меркурію менше 0,01-0,1 мг/кг, купруму менше 2,5-25,0 мг/кг та цинку менше 12,0-120,0 мг/кг, феруму менше 75,0 мг/кг, кобальту менше 0,2-2,0 мг/кг, мангану менше 12,0-120,0 мг/кг, селену менше 0,05-0,5 мг/кг, нікелю менше 0,3-3,0 мг/кг, хрому менше 0,1-1,0 мг/кг та брому менше 1,0-10,0 мг/кг як не токсичні; за вмісту арсену від 0,5-5,0 мг/кг, кадмію від 2,0-4,0 мг/кг, пльомбуму від 5,0-50,0 мг/кг, меркурію від 0,5-1,0 мг/кг, купруму від 125,0-250,0 мг/кг, феруму – 150,0 мг/кг, кобальту від 10,0-20,0 мг/кг, селену – 2,5 мг/кг, нікелю від 15,0-30,0 мг/кг та хрому від 5,0-10,0 мг/кг – як токсичні і за вмісту цинку і мангану від 600,0-1200,0 мг/кг, феруму від 750,0-7500,0 мг/кг, селену від 5,0 мг/кг та брому від 50,0-100,0 мг/кг – як сильно токсичні корми.

Поряд з цим деякі неорганічні елементи стимулювали світіння *Ph. phosphoreum*, зокрема, цинк - за вмісту мікроелементу 12,0 мг/кг корму стимулював інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* на 9,5 %, кобальт за вмісту мікроелементу 0,2-2,0 мг/кг – на 18,0-2,1 %, манган за вмісту мікроелементу 12,0-24,0 мг/кг – на 7,0-2,6 %, нікель за вмісту мікроелементу 0,3 мг/кг – на 4,2 % і бром за вмісту мікроелементу 1,0 мг/кг – на 2,9 %.

Слід зазначити, що більшість токсикантів на максимально допустимих рівнях у кормах характеризували їх як токсичні або сильно токсичні, а саме: ДДТ, α - і β -ізомерів ГХЦГ, діючі речовини гербіцидів (імазамокс+імазапір), (2,4-Д 2-етилгексилловий ефір+флорасулам), хізалофоп-п-тефуріл, калійна сіль гліфосату, (метолахлор+тербутилазин), ацетохлор, нікосульфурон, фунгіциду (карбендазим+ципроконазол), інсектициду (тіаклопрід), Т₂ токсину, дезоксиніваленолу, фумонізину, афлатоксину В₁, зеараленону, феруму, пльомбуму та арсену, що свідчить про необхідність подальших досліджень з вивчення токсикологічної характеристики вищевказаних речовин в організмі лабораторних і продуктивних тварин, можливо з подальшим переглядом (у бік зниження) МДР відповідного забруднювачів у кормах в Україні.

Ключові слова: біолюмінесценція; важкі метали; корми; мікотоксини; мікроелементи; пестициди; токсичність; *Photobacterium phosphoreum*

ABSTRACT

Kurbatska O.V. Toxicological assessment of feed using bioluminescent microorganisms – Qualifying scientific work on the rights of a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the specialty 211 – Veterinary Medicine – National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine".

The dissertation work was carried out in the laboratory of toxicological monitoring of the NSC "IECVM", in accordance with the tasks: 38.02.02.02 P "Development of new methods for determining the main abiotic toxicants (pesticides, inorganic elements, etc.) to obtain high-quality and safe livestock products" (state registration number 0119U100990) and 34.03.00.01 F "Investigation of the impact of environmental factors on the animal body (nanoparticles, heavy metals, mycotoxins, etc.) and development of a modern system for ensuring the quality and safety of agricultural products by the main control markers" (state registration number 0121U108350).

In this thesis, based on the research results, an express methodology for determining the total toxicity of feed using photoluminescent microorganisms *Photobacterium phosphoreum* was developed, its validation characteristics were determined and its effectiveness against priority toxicants (mycotoxins, heavy metals, pesticides and trace elements) was experimentally proven. A nutrient medium was developed for the cultivation of *Ph. phosphoreum*, and the optimal conditions for cultivating the microorganism were determined.

The scientific novelty of the results obtained is that for the first time in Ukraine, a "Method for determining the total toxicity of feed using photobacteria *Photobacterium phosphoreum*" was developed (patent of Ukraine for utility model No. 147856) and the system for cultivating this type of bacteria was improved by developing a "Nutrient medium for the cultivation of photoluminescent microorganisms *Photobacterium phosphoreum*" (patent of Ukraine for utility model No. 143070). For the first time in Ukraine, the dependence of the luminescence

intensity of *Ph. phosphoreum* on the content of such contaminants as mycotoxins, heavy metals, pesticides and trace elements in feed was studied.

The practical significance of the results obtained is that, based on the study of the intensity of luminescence of *Ph. phosphoreum* under the influence of various toxicants, scientific and methodological recommendations "Express methodology for determining the total toxicity of feed using photoluminescent microorganisms *Ph. phosphoreum*" were developed (approved by the Scientific and Methodological Council of the State Service of Ukraine for Food Safety and Consumer Protection: Protocol No. 1 of May 12, 2021). The express method for determining the total toxicity allows to provide a quick (1-1.5) hour and highly reliable toxicological assessment of feed. A nutrient medium for the cultivation of photoluminescent microorganisms *Photobacterium phosphoreum* has been developed, which, due to the introduction of new components, provides a sufficiently high level of bacterial luminescence, accelerates their growth and accumulation of bacterial mass, and is more cost-effective.

Main results of the work. A rapid method for determining the total toxicity of feeds using the bioluminescent microorganisms *Ph. phosphoreum* has been developed. The methodology is based on determining changes in the luminescence of *Ph. phosphoreum* photobacteria under the influence of toxic substances present in feeds compared to the control. The inhibition coefficient (γ) and toxicity index (T) are used to quantify the effect on bacterial luminescence (determining the degree of toxicity of the sample). The conclusion about the degree of toxicity of the feed is made by the value of the toxicity index at three limit levels (non-toxic sample, toxic sample and highly toxic sample).

The method's validation characteristics were determined. It is specific, accurate, linear, and reproducible. The limit of detection for zearalenone mycotoxin is 0.125 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, and the limit of detection for feed is 0.25 mg/kg.

Optimal conditions and storage time for *Photobacterium phosphoreum*: in tubes on dense nutrient medium at (4.0 ± 0.3) °C with monthly reseeded for 7 months,

and optimal conditions and cultivation time before the study: in tubes on liquid nutrient medium at (26.0 ± 0.8) °C for 24 hours after inoculation.

The effect of different levels of pesticides regulated by the "List of maximum permissible levels of unwanted substances in feed..." on the intensity of *Ph. phosphoreum* luminescence was investigated and a toxicological assessment of feeds was given by the percentage of decrease in luminescence intensity.

It was found that all pesticides dose-dependently inhibited the luminescence of *Ph. phosphoreum*: heptachlor (HC) suppressed the luminescence of *Ph. phosphoreum* by 7.8-35.9 %, dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) - by 36.9-61.2 %, α -isomer hexachlorocyclohexane (HCH) - by 16.2-56.4 %, β -isomer HCH - by 8.9-71.7 %, γ -isomer HCH - by 7.3-54.1 %, This allowed to evaluate feeds with a content of HC 0.0025-0.01 mg/kg, α -isomer HCH up to 0.002 mg/kg, β -isomer HCH up to 0.001 mg/kg, γ -isomer HCH less than 0.05-0.2 mg/kg as non-toxic; with HC content 0.05-2.0 mg/kg, DDT 0.01-0.05 mg/kg, α -isomer HCH 0.02-0.2 mg/kg, β -isomer HCH 0.01 mg/kg, γ -isomer HCH 1.0 mg/kg - as toxic and with DDT 0, 1-1.0 mg/kg, α -isomer and γ -isomer of HCH from 2.0 mg/kg, β -isomer of HCH 0.1-1.0 mg/kg - as highly toxic feed.

The effect of different levels of herbicides on the luminescence intensity of *Ph. phosphoreum* was studied and the toxicological assessment of feeds by the percentage of decrease in luminescence intensity was given: Soteira (imazamox + imazapyr) completely suppressed the luminescence of *Ph. phosphoreum* at all studied levels of herbicide in feed, Greenfort premium (2,4-D 2-ethylhexyl ether + florasulam) on average - by 18, 9-74.2%, Greenfort Horse (chisalofop-p-ethyl) - by 13.9-54.2%, Skat (chisalofop-p-tefuryl) - by 12.6-67.3%, Agroshield Super (potassium salt of glyphosate) - by 16, 5-71.0%, Greenfort Extra (metholachlor + terbutylazine) - 7.6-84.2%, Astones (acetochlor) - by 25.3-67.9%, Astralid (clopyralid) - 8.5-71.0%, Greenfort NK 40 (nicosulfuron) - by 10.8-45.3%, which allowed to evaluate feed with the content of Greenfort premium herbicides less than 0.01 mg/kg, Greenfort Horse less than 0.008-0.04 mg/kg, Skat less than 0.008-0.02 mg/kg, Agroshield Super less than 0.1-0.5 mg/kg, Greenfort Extra less than 0.02-0.05

mg/kg, Astanes less than 0.006 mg/kg, Astralid less than 0.4-2.0 mg/kg, Greenfort NK 40 less than 0.04-0.1 mg/kg as non-toxic; with the content of Greenfort Premium 0.025 mg/kg, Skat 0.04-0.08 mg/kg, Agroshield Super from 1.0 mg/kg, Greenfort Extra from 0.1 mg/kg, Astanes 0.015 mg/kg, Greenfort NK 40 from 0.2 mg/kg as toxic, and with the content of Soteira 0.01-0, 25 mg/kg, Greenfort Premium 0.05-0.25 mg/kg, Greenfort Horse 0.08-0.2 mg/kg, Skat from 0.2 mg/kg, Agroshield Super from 2.5 mg/kg, Greenfort Extra from 0.2 mg/kg, Astanes from 0.03 mg/kg, Astralid 4.0 mg/kg and above as highly toxic feed.

The effect of different levels of the fungicide Carbendazole (carbendazim + ciproconazole) on the intensity of *Ph. phosphoreum* luminescence was studied and the toxicological assessment of feeds was given by the percentage of decrease in the intensity of luminescence: at the content of the drug from 0.01 to 0.25 mg/kg of feed, complete suppression of *Ph. phosphoreum* luminescence was observed, which allowed to evaluate feeds with the content of the fungicide Carbendazole from 0.01 mg/kg inclusive as highly toxic.

The effect of different levels of insecticides on the luminescence intensity of *Ph. phosphoreum* was studied and the toxicological assessment of feeds by the percentage of decrease in luminescence intensity was given: the insecticide Veles (thiacloprid + deltamethrin) suppressed the luminescence of *Ph. phosphoreum* by an average of 7.8-27.7 %, and the insecticide Vyrii (thiacloprid) - by 8.6-31.2 %, which allowed to evaluate feeds with the content of insecticide Veles less than 0.004-0.02 mg/kg and Vyrii less than 0.004-0.01 mg/kg of feed as non-toxic, and with the content of 0.04-0.1 mg/kg and 0.02-0.1 mg/kg, respectively, as toxic.

At the same time, some herbicides in low doses stimulated the glow of *Ph. phosphoreum*, in particular, the herbicide Skat (chisalofof-p-tefuryl) at a drug content of 0.008 mg/kg of feed by an average of 3.0%, Astanes at 0.006 mg/kg - by 12.8% and Astralid (clopyralid) at 0.4 mg/kg of feed - by 10.4%.

The influence of different levels of mycotoxins on the luminescence intensity of *Ph. phosphoreum* was studied and the toxicological assessment of feeds by the percentage of decrease in luminescence intensity was given: T2 toxin inhibited the

luminescence intensity of *Ph. phosphoreum* by 22.1-49.6 %, zearalenone - by 1.4-89.8 %, deoxynivalenol - by 15.3-62.8 %, ochratoxin A - by 10.4 and 41.8 %, fumonisin - by 17.7-55.6 %, aflatoxin B₁ - by 42.0-70.9 %, which made it possible to assess feeds with a content of mycotoxin T₂ of less than 0.01-0.05 mg/kg, zearalenone of less than 0.1 mg/kg, deoxynivalenol of less than 0.05-0.1 mg/kg, ochratoxin A of less than 0.005-0.1 mg/kg, fumonisin of less than 0.5-1.0 mg/kg, aflatoxin B₁ of less than 0.001-0.005 mg/kg as non-toxic; with the content of T₂ toxin 0.01-1.0 mg/kg, zearalenone 0.2 mg/kg, deoxynivalenol 0.5-1.0 mg/kg, ochratoxin A 0.5 mg/kg, fumonisin 5.0-10.0 mg/kg, aflatoxin B₁ 0, 01 mg/kg - as toxic and at the content of zearalenone 1.0-10.0 mg/kg, deoxynivalenol from 2.0 mg/kg, fumonisin from 15.0 mg/kg, aflatoxin B₁ 0.05 mg/kg - as highly toxic feed.

At the same time, some mycotoxins stimulated the luminescence of *Ph. phosphoreum*, in particular, T₂ toxin at mycotoxin content of 0.01 and 0.05 mg/kg by 38.0 and 20.8 % on average, deoxynivalenol at mycotoxin content of 0.05 mg/kg - by 7.9 %, ochratoxin A at mycotoxin content of 0.005; 0.01 and 0.05 (MAL) mg/kg - by 26.0, 20.7 and 16.0%, fumonisin at a mycotoxin content of 0.5 mg/kg - by 12.1% and aflatoxin B₁ at a mycotoxin content of 0.001-0.005 mg/kg - by 69.8% on average.

The effect of different levels of inorganic elements on the luminescence intensity of *Ph. phosphoreum* was studied and the toxicological assessment of feeds was given by the percentage of decrease in luminescence intensity: arsenic suppressed the luminescence intensity of *Ph. phosphoreum* by 5.4-42.6 %, cadmium - by 12.7-22.3 %, plumbum - by 0.48-40.8 %, mercury - by 18.4-21.2 %, cuprum - by 1.1-40.8 %, zinc - by 12.8-100.0 %, ferrum - by 0, 84-100.0%, cobalt - by 25.1% on average, manganese - by 18.2-100.0%, selenium - by 3.8-50.1%, nickel - by 13.5-35.5%, chromium - by 12.8-23.9%, bromine - by 3.3-23.2%, which allowed to evaluate feeds with the content of arsenic less than 0.05-0.1 mg/kg, cadmium less than 0.04-0.4 mg/kg, plumbum less than 0.5-1.0 mg/kg inclusive, mercury less than 0.01-0.1 mg/kg, copper less than 2.5-25.0 mg/kg and zinc less than 12.0-120, 0 mg/kg, ferric less than 75.0 mg/kg, cobalt less than 0.2-2.0 mg/kg, manganese less than 12.0-120.0 mg/kg, selenium less than 0.05-0.5 mg/kg, nickel less than 0.3-

3.0 mg/kg, chromium less than 0.1-1.0 mg/kg and bromine less than 1.0-10.0 mg/kg as non-toxic; with arsenic content from 0.5-5.0 mg/kg, cadmium from 2.0-4.0 mg/kg, plumbum from 5.0-50.0 mg/kg, mercury from 0.5-1.0 mg/kg, copper from 125.0-250.0 mg/kg, ferrum - 150.0 mg/kg, cobalt from 10.0-20.0 mg/kg, selenium - 2.5 mg/kg, nickel from 15.0-30.0 mg/kg and chromium from 5.0-10.0 mg/kg - as toxic and at the content of zinc and manganese from 600.0-1200.0 mg/kg, ferrous from 750.0-7500.0 mg/kg, selenium from 5.0 mg/kg and bromine from 50.0-100.0 mg/kg - as highly toxic feed.

Along with this, some inorganic elements stimulated the luminescence of *Ph. phosphoreum*, in particular, zinc - at a microelement content of 12.0 mg/kg of feed stimulated the intensity of luminescence of *Ph. phosphoreum* by 9.5%, cobalt at a microelement content of 0.2-2.0 mg/kg - by 18.0-2.1%, manganese at a microelement content of 12.0-24.0 mg/kg - by 7.0-2.6%, nickel at a microelement content of 0.3 mg/kg - by 4.2% and bromine at a microelement content of 1.0 mg/kg - by 2.9%.

It should be noted that most of the toxicants at the maximum allowable levels in feed were characterized as toxic or highly toxic, namely: DDT, α - and β -isomers of HCH, herbicide active ingredients (imazamox+imazapyr), (2,4-D 2-ethylhexyl ether+florasulam), chisalofop-p-tetfuryl, potassium salt of glyphosate, (metholachlor + terbutylazine), acetochlor, nicosulfuron, fungicide (carbendazim + ciproconazole), insecticide (thiacloprid), T₂ toxin, deoxynivalenol, fumonisin, aflatoxin B₁, zearalenone, Ferrum, Plumbum and Arsenic, which indicates the need for further research on the toxicological characteristics of the above substances in laboratory and production animals, possibly with further revision (downward) of the MALs of the respective contaminants in feed in Ukraine.

Keywords: bioluminescence; heavy metals; feed; mycotoxins; trace elements; pesticides; toxicity; *Photobacterium phosphoreum*

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Монографії

1 Оробченко О.Л., Романько М.Є., Палій Анат. П., Палій Андр. П., Павліченко О.В., Коваленко Л.В., Ярошенко М.О., Коренєва Ю.М., **Курбацька О.В.**, Маслюк А.В. Основи токсикологічної безпеки кормів у сільському господарстві. Харків: ФОП Бровін О.В., 2023. 698 с. ISBN 978-617-8238-25-4 (*На основі власних досліджень дисертантка підготувала підрозділ монографії «лабораторна діагностика отруєнь»*).

Статті в зарубіжних періодичних наукових виданнях країн Організації економічного співробітництва та розвитку та/або Європейського Союзу

2 Orobchenko, O., **Kurbatska, O.**, Paliy, A. and Palii, A. (2023). Toxicological evaluation of feed contaminated with mycotoxins using luminescent microorganisms *Photobacterium phosphoreum*. *Veterinarska stanica*, 54 (2), 147-163. <https://doi.org/10.46419/vs.54.2.7> (*Дисертантка провела експериментальні дослідження, проаналізувала отримані результати та підготувала статтю до друку*).

Наукові статті у фахових виданнях України категорії «Б»

3 **Курбацька, О. В.**, Оробченко, О. Л. (2021). Валідація експрес-методики визначення загальної токсичності кормів з використанням біоломінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum*. «Ветеринарна медицина» міжвідомчий тематичний науковий збірник, 107, 56-61. <https://doi.org/10.36016/VM-2021-107-9> (*Дисертантка провела експериментальні дослідження, проаналізувала отримані результати та підготувала статтю до друку*).

4 **Курбацька, О. В.**, Оробченко, О. Л. (2021). Експрес-методика визначення загальної токсичності кормів з використанням біоломінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum*. Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних

препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин, 22(2), 217-224.
<https://doi.org/10.36359/scivp.2021-22-2.24> (Дисертантка провела експериментальні дослідження, проаналізувала отримані результати та підготувала статтю до друку).

5 **Курбацька, О. В.**, Оробченко, О. Л. (2022). Токсикологічна оцінка кормів із різними рівнями мікроелементів з використанням люмінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium Phosphoreum*. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина, 2(57), 26-37.
<https://doi.org/10.32845/bsnau.vet.2022.2.4> (Дисертантка провела експериментальні дослідження, проаналізувала отримані результати та підготувала статтю до друку).

6 **Курбацька, О. В.**, Оробченко, О. Л. (2022). Токсикологічна оцінка кормів із різними рівнями важких металів з використанням люмінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum*. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки, 24(106), 158–167.
<https://doi.org/10.32718/nvlvet10624> (Дисертантка провела експериментальні дослідження, проаналізувала отримані результати та підготувала статтю до друку).

Патенти України на корисну модель

7 Деклараційний патент України на корисну модель № 143070 МПК (51) С12N 1/20 / Поживне середовище для культивування фотолюмінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum* / Оробченко О.Л.; **Курбацька О.В.**; Куцан О.Т.; Калашник Н.В. ; заявник і власник патенту Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» ; заявл. 21.01.2020 – и 2020 00341; опубл. 10.07.2020, бюл. № 13/2020. – 4 с. (Дисертантка провела дослідження, отримала нові дані та брала участь в оформленні документів на патент)

8 Деклараційний патент України на корисну модель № 147856 МПК (51) G 01N 33/02, С12Q 1/02 / Спосіб визначення загальної токсичності кормів за

допомогою фотобактерій *Photobacterium phosphoreum* / **Курбацька О.В.**; Оробченко О.Л. ; заявник і власник патенту Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» ; заявл. 14.01.2021 – и 2021 00129; опубл. 16.06.2021, бюл. № 24/2021. – 2 с. (Дисертантка провела дослідження, отримала нові дані та брала участь в оформленні документів на патент)

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

Науково-практичні рекомендації

9 **Курбацька О.В.**, Оробченко О.Л. Науково-методичні рекомендації «Експрес-методика визначення загальної токсичності кормів з використанням фотолюмінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum*» розглянуто та затверджено на засіданні Методичної комісії Національно-наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»: протокол № 4 від 29 жовтня 2020 р. і схвалено Науково-методичною радою Держпродспоживслужби: протокол № 1 від 12 травня 2021 р. Харків: Стиль-Издат, 2021, 24 с. (Дисертантка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та оформленні методичних рекомендацій)

Тези та матеріали конференцій

10 **Курбацька О.**, Оробченко О. (2019). Вивчення впливу зеараленону на люмінесцентні властивості *Photobacterium phosphoreum* : матеріали Четвертого щорічного регіонального наукового симпозіуму в рамках концепції «Єдине здоров'я» за підтримки ПЗБЗ в Україні (20-24 травня 2019). Київ. С. 444. (Дисертантка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку)

11 **Курбацька О.В.**, Оробченко О.Л. (2020). Перспектива застосування фотолюмінесцентних мікроорганізмів для визначення загальної токсичності кормів. «Актуальні проблеми підвищення якості та безпека виробництва й переробки продукції тваринництва» : матеріали Міжнародної науково-практичної конференції. (14 лютого 2020 року). Дніпро. С. 331-333.

(Дисертантка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку)

12 **Курбацька О.В.**, Оробченко О.Л. (2021). Біоломінесценція у системі лабораторної діагностики отруєнь тварин. / «Сучасні досягнення та перспективи клінічної лабораторної медицини у діагностиці хвороб людини та тварин». Матеріали науково-практичної міжнародної дистанційної конференції (17 березня 2021 року). Т. 2. Х. : НФаУ. С. 63-64. *(Дисертантка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку)*

13 **Курбацька О.В.** (2022). Вплив залишкових кількостей пестицидів різних груп у кормах на люмінесценцію *Ph. phosphoreum*. Collection of theses of scientific and methodical reports of international scientific-practical conference «Science as a basis for the development of modern countries». January 27-28, Bratislava, Slovakia. 89-94.

14 **Курбацька О.В.**, Оробченко О.Л. (2022). Визначення оптимальних параметрів передліофілізаційної підготовки та відновлення культури *Photobacterium Phosphoreum* для еко-токсикологічних досліджень. «ЄДИНЕ ЗДОРОВ'Я - 2022»: матеріали Міжнародної наукової конференції присвяченої 100-річчю кафедр факультету ветеринарної медицини (22-24 вересня 2022 року). Київ. С. 134-135. *(Дисертантка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку)*

15 **Курбацька О.В.**, Оробченко О.Л. (2022). Токсикологічна оцінка кормів із різними рівнями неорганічних елементів з використанням біоломінесценції. «Сучасний стан розвитку ветеринарної медицини, науки і освіти»: матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченій 35-річчю заснування факультету ветеринарної медицини (12-13 жовтня 2022 року). Житомир: Поліський національний університет. С. 360-366. *(Дисертантка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку)*

16 **Курбацька О.В.** (2023). Сучасні методи біотестування для визначення безпечності кормів в Україні. «Актуальні аспекти розвитку ветеринарної

медицини в умовах євроінтеграції»: матеріали Міжнародної науково-практичної конференції науково-педагогічних працівників та молодих науковців (14-15 вересня 2023 року). Одеса: Одеський державний аграрний університет. С. 379-382 *(Дисертантка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку)*

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів	21
Вступ	22
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	28
1.1 Пріоритетні токсиканти кормів	28
1.2 Загальна токсичність (визначення, методологія та тест-об'єкти)	34
1.3 Біолоюмінесценція	39
1.3.1 Терміни та визначення понять, історія виявлення, системи біолоюмінесценції	39
1.3.2 Сфери застосування	41
1.3.3 Основні представники люмінесцентних бактерій	44
1.4 Культивування, збереження і відновлення люмінесцентних мікроорганізмів	46
1.5 Використання біолоюмінесценції для оцінки токсичності об'єктів довкілля. Біолоюмінесцентні датчики (біосенсори) та тести.	52
1.6. Висновок з огляду літератури	54
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	56
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	64
3.1 Удосконалення системи культивування та розроблення поживного середовища для біолоюмінесцентних мікроорганізмів <i>Ph. phosphoreum</i>	64
3.2 Розроблення та проведення валідації експрес-методики визначення загальної токсичності кормів з використанням біолоюмінесцентних мікроорганізмів	68
3.2.1 Розроблення експрес-методики визначення загальної токсичності кормів з використанням біолоюмінесцентних мікроорганізмів	68
3.2.2 Установлення валідаційних параметрів експрес-методики визначення загальної токсичності кормів з використанням біолоюмінесцентних мікроорганізмів	74

	20
3.3 Вивчення впливу різних рівнів пестицидів різних класів у кормах на люмінесценцію біоломінесцентних мікроорганізмів та їх токсикологічна характеристика	79
3.3.1 Дослідження впливу різних рівнів пріоритетних пестицидів у кормах на люмінесценцію біоломінесцентних мікроорганізмів та їх токсикологічна характеристика	79
3.3.2 Дослідження впливу різних рівнів гербіцидів у кормах на люмінесценцію біоломінесцентних мікроорганізмів та їх токсикологічна характеристика	88
3.3.3 Дослідження впливу різних рівнів фунгіцидів та інсектицидів у кормах на люмінесценцію біоломінесцентних мікроорганізмів та їх токсикологічна характеристика	105
3.4 Вивчення впливу різних рівнів мікотоксинів у кормах на люмінесценцію біоломінесцентних мікроорганізмів та їх токсикологічна характеристика	110
3.5 Вивчення впливу різних рівнів неорганічних елементів у кормах на люмінесценцію біоломінесцентних мікроорганізмів та їх токсикологічна характеристика	121
3.5.1 Вивчення впливу різних рівнів важких металів у кормах на люмінесценцію біоломінесцентних мікроорганізмів та їх токсикологічна характеристика.	121
3.5.2 Вивчення впливу різних рівнів мікроелементів у кормах на люмінесценцію біоломінесцентних мікроорганізмів та їх токсикологічна характеристика	131
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	144
Висновки	158
Пропозиції виробництву	162
Список використаних джерел	163
Додатки	195

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ,
СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

- ГХ – гептахлор,
ДДТ – дихлордифеніл трихлорметилметан,
ДСЗ – державні стандартні зразки,
ГХЦГ – гексахлорциклогексан,
кДа – кілоДальтон,
МДР – максимально допустимий рівень,
МЕ – мікроелементи,
ННЦ «ІЕКВМ» – Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,
СЗ – стандартні зразки,
США – Сполучені Штати Америки,
Т – індекс токсичності, що дорівнює співвідношенню інтенсивності світіння контролю й досліду при фіксованому часі експозиції зразку, що досліджується, з тест-об'єктом,
AFB1 – афлатоксин В₁,
DON (ДОН) – дезоксиніваленол,
ZON – зеараленон,
FBs – фумонізини,
ОТА – охратоксин А,
EC₅₀ (IC₅₀) – ефективна концентрація (об'єм зразку), що викликає пригнічення світіння фотобактерій на 50 % у порівнянні з контролем або напівмаксимальна інгібуюча концентрація,
RSD – відносне стандартне відхилення,
EPA (United States Environmental Protection Agency) – Агентство з охорони навколишнього середовища США

ВСТУП

Сильною стороною розвитку сучасної аналітичної токсикології в Україні є глибокий аналіз природних явищ із суто наукових позицій та спрямованість на вирішення нагальних потреб сьогодення під час розроблення методів експресного виявлення речовин, токсичних для живих організмів. Одним із перспективних шляхів підвищення інформативності й достовірності аналітичного контролю загального забруднення об'єктів довкілля є біотестування. Аналітичними індикаторами у методах біотестування виступають біологічні об'єкти та їхня реакція на дію хімічних агентів, яка є інтегральною оцінкою дії фізіологічно активних форм досліджуваної речовини [1-4].

Для вирішення цього питання у практиці ветеринарної медицини використовується метод біопроб на моделях різного рівня організації: цільові та лабораторні тварини, комахи, ракоподібні, інфузорії, бактерії, культури клітин, тощо [5-7]. Біопроба на лабораторних тваринах є найбільш показовою моделлю визначення токсичності кормів, але світове наукове товариство схиляється до мінімізації використання живих організмів у експериментах: принцип трьох R (The three Rs (Replace, Reduce, Refine), що в перекладі означає замінити, зменшити, вдосконалити) [8], тому розроблення альтернативних тестів з визначення токсичності є актуальним на сьогодні.

Особливо перспективним є напрямок, пов'язаний із застосуванням фотобіосенсорів, які вже широко використовуються для контролю стану природних середовищ та екосистем. При чому на перший план висуваються біотести з використанням живих біолоюмінесцентних бактерій, які вирізняються з поміж інших тим, що як параметр життєдіяльності вимірюється інтенсивність їх світіння [9-11].

Проте, не зважаючи на досить широкий спектр токсикантів та сполук, вплив яких досліджено на фотолоюмінесценцію бактерії, ці мікроорганізми зазвичай не використовувались для визначення токсичності кормів, тому на

сьогодні є актуальним розроблення скринінгових методик визначення токсичності кормів на основі біоломінесценції, що дозволить дати швидкі рекомендації відносно необхідності проведення подальшого хімічного аналізу для визначення основних забруднювачів кормів та застосування заходів очищення від них.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконували впродовж 2019–2023 рр. у лабораторії токсикологічного моніторингу Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» згідно з тематичними планами наукових досліджень: відповідно до завдань: 38.02.02.02 П «Розробити нові методики визначення основних абіотичних токсикантів (пестициди, неорганічні елементи тощо) для отримання якісної і безпечної продукції тваринництва» (номер державної реєстрації 0119U100990, 2019-2020 рр.) та 34.03.00.01 Ф «Дослідження впливу на організм тварин факторів навколишнього середовища (наночастки, важкі метали, мікотоксини, тощо) та розроблення сучасної системи забезпечення якості і безпечності сільськогосподарської продукції за основними маркерами контролю» (номер державної реєстрації 0121U108350, 2021-2025 рр.).

Мета і завдання досліджень. Метою роботи було надати токсикологічну оцінку кормам з використанням біоломінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum* та розробити експрес-методику біотестування кормів.

Для досягнення цієї мети необхідно було вирішити наступні завдання:

- Удосконалити систему культивування та розробити поживне середовище для біоломінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum*;
- Розробити та провести валідацію експрес-методики визначення загальної токсичності кормів з використанням біоломінесцентних мікроорганізмів;
- Вивчити вплив різних рівнів пестицидів різних класів у кормах на люмінесценцію біоломінесцентних мікроорганізмів та надати їм токсикологічну характеристику;

- Вивчити вплив різних рівнів мікотоксинів у кормах на люмінесценцію біоломінесцентних мікроорганізмів та надати їм токсикологічну характеристику;

- Вивчити вплив різних рівнів неорганічних елементів у кормах на люмінесценцію біоломінесцентних мікроорганізмів та надати їм токсикологічну характеристику.

Об'єкт дослідження – люмінесценція біоломінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum* під дією пріоритетних токсикантів кормів.

Предмет дослідження – корми з різними рівнями пріоритетних токсикантів, умови культивування *Ph. phosphoreum*, методика біотестування кормів з використанням *Ph. phosphoreum* та її валідаційні характеристики.

Методи дослідження: мікроскопічні і мікробіологічні (висів культур фотобактерій на поживні середовища, підрахунок кількості мікробних клітин), люменометрія, токсикологічні (визначення токсичності кормів відповідно до інтенсивності світіння) та статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів полягає у тому, що вперше в Україні було розроблено «Спосіб визначення загальної токсичності кормів за допомогою фотобактерій *Photobacterium phosphoreum*» (патент України на корисну модель № 147856), що включає екстрагування проби, фільтрування відібраного екстракту, внесення фільтрату в тест-культуру та визначення токсичності досліджуваного продукту (при цьому у якості екстрагента використовують етанол, а як тест-культуру – фотобактерії *Ph. phosphoreum*). Удосконалено систему культивування даного виду бактерій за рахунок розроблення «Поживного середовища для культивування фотолюмінісцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum*» (патент України на корисну модель № 143070), що містить збалансовані компоненти: натрій хлористий, гліцерин, пептон, амоній фосфорнокислий двозаміщений, магній сірчанокислий семиводний, калій фосфорнокислий двозаміщений, крейду та воду дистильовану. Вперше в Україні отримані нові знання відносно залежності інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* від вмісту в кормах таких

забруднювачів як мікотоксини, важкі метали, пестициди та мікроелементи, встановлено що, окрім пригнічення інтенсивності світіння, певні токсиканти в малих дозах можуть його стимулювати.

Практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що на основі вивчення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* під дією різних токсикантів розроблено науково-методичні рекомендації «Експрес-методика визначення загальної токсичності кормів з використанням фотолюмінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum*» (схвалено Науково-методичною радою Держпродспоживслужби: протокол № 1 від 12 травня 2021 р). Експрес-методика визначення загальної токсичності дозволяє швидко (1-1,5) год і з високою вірогідністю надавати токсикологічну оцінку кормам. Розроблене поживне середовище для культивування фотолюмінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum*, що, за рахунок введенням нових компонентів, забезпечує достатньо високий рівень світіння бактерій, пришвидшує їх ріст і накопичення бактеріальної маси та більш економічно вигідніше. Практичним аспектом роботи є й те, що більшість токсикантів на максимально допустимих рівнях у кормах характеризували їх як токсичні або сильно токсичні, а саме: ДДТ, α - і β -ізомерів ГХЦГ, діючі речовини гербіцидів (імазамокс+імазапир), (2,4-Д 2-етилгексилловий ефір+флорасулам), хізалофоп-п-тефуріл, калійна сіль гліфосату, (метолахлор+тербутилазин), ацетохлор, нікосульфурон, фунгіциду (карбендазим+ципроконазол), інсектициду (тіаклоприд), Т₂ токсину, дезоксиніваленолу, фумонізіну, афлатоксину В₁, зеараленону, феруму, плумбуму та арсену, що свідчить про необхідність подальших досліджень з вивчення токсикологічної характеристики вищевказаних речовин в організмі лабораторних і продуктивних тварин, можливо з подальшим переглядом (у бік зниження) МДР відповідного забруднювачів у кормах в Україні.

Особистий внесок здобувача. Дисертанткою здійснено пошук та аналіз літературних джерел вітчизняних та зарубіжних авторів за темою дисертаційної роботи. Проведено підбір і формування доз пріоритетних токсикантів для внесення в корм. Розроблено схему експериментальних досліджень та

узагальнено отримані результати. Сформульовано висновки та практичні пропозиції виробництву. Дисертантка виражає щиру подяку Головач Тетяні Миколаївні, кандидату біологічних наук, завідувачу Депозитарію мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного Національної академії наук України України за люб'язно наданий для дослідження штам *Ph. phosphoreum* (IMB B-7071; Sq3).

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації були обговорені та схвалені на звітних сесіях вченої ради ННЦ «ІЕКВМ» у 2020–2022 рр.. Основні результати експериментальної частини дисертації доповідалися та обговорювалися на 10-ми конференціях різного рівня, а саме: Четвертому щорічному регіональному науковому симпозиумі в рамках концепції «Єдине здоров'я» за підтримки ПЗБЗ в Україні (Київ, 20-24 травня 2019 року); Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми підвищення якості та безпека виробництва й переробки продукції тваринництва» : матеріали (Дніпро, 14 лютого 2020 року); Міжнародній науково-практичній конференції «Інноваційне, технічне та технологічне забезпечення галузі тваринництва» (Харків, 25-26 травня 2020 року); Науково-практичній міжнародній дистанційній конференції «Сучасні досягнення та перспективи клінічної лабораторної медицини у діагностиці хвороб людини та тварин» (Харків, 17 березня 2021 року); International scientific-practical conference «Science as a basis for the development of modern countries» (Bratislava, January 27-28, 2022); Міжнародній науковій конференції «Єдине здоров'я – 2022» (Київ, 22-24 вересня 2022 року); Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасний стан розвитку ветеринарної медицини, науки і освіти» (Житомир, 12-13 жовтня 2022 року); Міжнародній науково-практичній конференції науково-педагогічних працівників та молодих науковців «Актуальні аспекти розвитку ветеринарної медицини в умовах євроінтеграції»: матеріали (Одеса, 14–15 вересня 2023 року); XVI Всеукраїнській науково-практичній онлайн конференції молодих вчених «Науковий прогрес у тваринництві і птахівництві», присвяченій 120-річчю від дня народження доктора

сільськогосподарських наук, професора, академіка Даниленка Йосипа Абрамовича (Харків, 27 жовтня 2023 року); Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні аспекти біологічної безпеки за емерджентних інфекційних хвороб тварин у контексті стратегії ООН «Єдине здоров'я»», присвяченій 100-річчю заснування Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» (Харків, 16-17 листопада 2023 року).

Публікації. За темою дисертаційної роботи опубліковано 16 наукових праць, в тому числі: 4 статті у фахових наукових виданнях України; одна стаття у періодичному науковому виданні інших держав, які входять до складу Європейського Союзу; 2 патенти України на корисну модель; одна монографія; одні методичні рекомендації та 7 тез доповідей на наукових конференціях.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 231 сторінці комп'ютерного тексту і включає: анотацію, вступ, огляд літератури, матеріали й методи виконання роботи, результати власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів досліджень, висновки, пропозиції виробництву, список використаних джерел, додатки. Робота ілюстрована 5 таблицями та 44 рисунками. Список літератури містить 244 джерела.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Пріоритетні токсиканти кормів

У практиці ЄС та України концепція гарантування безпечності тваринницької продукції «від лану до столу» передбачає особливу увагу до кормів, призначених для годівлі тварин, що використовуються для виробництва сировини чи продуктів харчування, зокрема молока, м'яса та яєць. У директиві Європарламенту та Ради ЄС №220/32/ЄС зазначається, що продукти, призначені для годівлі тварин, можуть бути ввезені, введені в обіг та використовуватися у співтоваристві, тільки якщо є доброякісними, справжніми і придатними для продажу. Тобто, які при правильному використанні не представляють небезпеки для здоров'я людини, тварини чи навколишнього середовища і не чинять несприятливого впливу на продукцію тваринництва. Положення інших європейських регламентів щодо кормів адаптовані до вітчизняного законодавства, викладені у Законах України «Про ветеринарну медицину», «Про безпечність та гігієну кормів», «Про державний контроль за дотриманням законодавства про харчові продукти, корми, побічні продукти тваринного походження, здоров'я та благополуччя тварин» [12-15].

Нині за оцінкою EPA (United States Environmental Protection Agency) існує більше 5 млн. найменувань токсичних речовин, які використовуються людиною у ході господарської діяльності, а надалі, зі стоками, атмосферними опадами, ґрунтовими водами та іншими шляхами надходять у водні об'єкти і можуть потрапляти в кормові культури, проте перелік забруднювачів кормів і продукції тваринництва нині скорочений (до близько 70 зареєстрованих речовин, так званих пріоритетних токсикантів) [12, 16].

Забруднюючі речовини (забруднювачі, токсиканти) – це сполуки, які надходять у навколишнє середовище або утворюються у ньому у кількостях, що виходять за межі звичайної наявності – граничних природних коливань або середнього природного фону [17].

Основними ознаками пріоритетності забрудників вважають наступні [16]:

- глобальне поширення за рахунок здатності токсиканту до перенесення на значні відстані;
- надзвичайно висока стійкість до фізичних, хімічних і біологічних трансформацій;
- тривалий період руйнування у навколишньому середовищі;
- висока токсичність навіть у дуже низьких концентраціях;
- здатність до акумуляції у біологічних об'єктах за рахунок високої розчинності у жирах і ліпідах;
- здатність до біологічного концентрування шляхом передачі по трофічних ланцюгах.

Виходячи з цих ознак, до пріоритетних токсикантів кормів нині можна віднести: мікотоксини, солі важких металів, хлорорганічні та інші пестициди.

Мікотоксини є вторинними метаболітами мікроскопічних (цвілевих) грибів, які в основному належать до родів *Aspergillus*, *Penicillium* і *Fusarium*. За останні півстоліття вони визнані одними з найбільш шкідливих агентів для здоров'я людини і тварин. Їх токсична дія перевершує шкідливий вплив таких відомих токсикантів як синильна кислота та стрихнін, а за кількістю летальних випадків серед людей і тварин – пестициди [19-22].

Забруднення мікотоксинами кормової сировини та кормів для сільськогосподарських тварин може відбуватися як у польових умовах, так і при зберіганні [23, 24]. Було підраховано, що близько 25% посівів у світі можуть бути заражені мікотоксинами. Разом з пліснявою в кормах можуть бути багато мікотоксинів, що посилює їх шкідливий вплив на тварин [25, 26]. Окрім того, основні форми мікотоксинів можуть перетворюватися на метаболіти зі зміненою хімічною структурою та різними фізико-хімічними, хімічними та біологічними властивостями. У сировині, призначеній для виробництва кормів, можуть виникати модифіковані форми також і під час технологічних процесів. Модифіковані форми мікотоксинів можуть вироблятися грибами або як частина захисного механізму інфікованої рослини [27, 28].

Рівень мікотоксинів у кормах може істотно варіювати в залежності від сировини, що використовується для їх виробництва, і географічного розташування ферм (кліматичних умов), що створило передумови для встановлення допустимих рівнів мікотоксинів у кормах, зокрема, п'яти мікотоксинів AFB₁, DON, ZON, FB та OTA, які підпадають під дію законодавства ЄС (постанови або рекомендації) [23, 29]. На сьогоднішній день в Україні нормуванню в кормах та кормових матеріалах підлягають шість мікотоксинів: AFB₁, DON, ZON, FB, OTA та токсин T-2) [18].

Інтерес до мікотоксинів зумовлений головним чином їхніми фізико-хімічними властивостями, такими як їх висока стійкість до мінливих умов зовнішнього середовища та висока токсичність. Навіть невелика кількість мікотоксинів у кормах може призвести до серйозних наслідків для тварин. Мікотоксини – низькомолекулярні і термостабільні речовини, вони стійкі до більшості технічних процесів переробки, наприклад, сушіння, ліофілізації, екструдування, дистиляції та бродіння. Тривале вживання кормів, що містять мікотоксини, домашніми тваринами, може негативно вплинути на виробництво молока, м'яса або вовни, а також призвести до пригнічення і порушення функцій розмноження та розвитку тварин. Токсичний вплив мікотоксинів на біологічну продуктивність тварин, таких як свині та кури, було широко освітлено у літературних джерелах. Крім того, втрата ваги, імуносупресія, з підвищеним рівнем захворюваності та зниження репродуктивної здатності є одними з основних ризиків, пов'язаних з споживання харчових кормів, забруднених вторинними метаболітами грибів [30-33]. Окрім того, деякі мікотоксини володіють генотоксичними, мутагенними і тератогенними ефектами впливу на організм тварин [34, 35].

Найбільш часто мікотоксинами уражуються злаки і злакові корми, одночасно вони одні із самих уживаних, тому становлять особливу небезпеку. Частіше сировина забруднена кількома видами грибів і їх токсинами. Слід зазначити, що мікотоксини мають синергичний ефект, а низький рівень вторинних метаболітів пліснявих грибів несе не меншу небезпеку і внаслідок

тривалого щоденного вживання також може призвести до негативних наслідків і розвитку захворювань [36, 37].

У зв'язку з інтенсивним зростанням і розвитком промисловості, транспорту, індустріалізацією і хімізацією сільського господарства, прискоренням науково-технічного прогресу за останні роки значно збільшилась і продовжує наростати надходження в навколишнє середовище важких металів техногенного походження [38].

У наукових роботах, які присвячені проблемам забруднення природного довкілля і екологічного моніторингу, нині до важких металів відносять більше 40 металів періодичної системи Д. Менделєєва з атомною масою понад 50 атомних одиниць: V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Cd, Sn, Hg, Pb, Bi та ін. [39]. Проте, відповідно до міжнародних вимог, розробленими об'єднаною комісією ФАО/ВООЗ [40], необхідний, в першу чергу, контроль за вмістом в харчових продуктах важких металів – Pb, Cd, As, Hg, Zn, Cu. В даний час визначені допустимі рівні вмісту токсичних елементів в різних групах продовольчої сировини і харчових продуктів.

Тривалий токсичний вплив важких металів проявляється враженням травного тракту, серцево-судинної, ендокринної, нервової, репродуктивної, імунної систем, а також може призвести до віддалених ефектів, таких як: канцерогенний та мутагенний, причому кожен важкий метал має свої особливості впливу на організм [41-43].

Як відомо, важкі метали здатні накопичуватися на всіх рівнях екологічної піраміди, що значно посилює проблему, а особливо гостро постає проблема їх накопичення у кормах для сільськогосподарських тварин [44-47]. Виходячи з вищевказаного, контроль якості та безпеки кормів завжди був актуальним і залишається одним із напрямків роботи ветеринарної медицини України. Тому проведення досліджень в цьому напрямку актуальне в сучасних умовах, коли Україна вступила до Світової організації торгівлі та готується до входження у Європейський Союз.

Мікроелементи (МЕ) – це група хімічних елементів, які містяться в організмі людини й тварин у дуже малих кількостях, у межах 10^{-3} – 10^{-12} % від загальної маси тіла. Єдиною характерною рисою МЕ є їхня низька концентрація в живих тканинах. МЕ це не випадкові інгредієнти тканин і рідин живих організмів, а компоненти закономірно існуючої складної фізіологічної системи, що беруть участь у регулюванні життєвих функцій організмів на всіх стадіях розвитку [48]. Відповідно до класифікації МЕ за біологічною роллю для ссавців виділяють: життєво необхідні елементи (цинк, манган, молібден, йод, селен, ферум, купрум, кобальт), імовірно необхідні елементи (титан, ванадій, хром, нікель, арсен, бром, стронцій, кадмій) та елементи з маловивченою роллю (цирконій, бісмут, рубідій та інші) [49].

Мікроелементи, що надходять до організму із кормом та водою в оптимальних кількостях, завдяки включенню у біологічно активні сполуки (ензими, гормони, вітаміни) забезпечують нормальне функціонування організму (ріст, розвиток, здоров'я, розмноження) та беруть участь у багатьох фізіологічних, біохімічних і метаболічних процесах [50-55]. Проте МЕ за певних умов можуть викликати і токсичні реакції, зокрема, за безконтрольного застосування мінеральних добавок та преміксів чи знаходження тварин на території біогеохімічних провінцій з підвищеним вмістом МЕ в компонентах раціону і воді [56-61]. Саме тому надання токсико-гігієнічної оцінки токсичним контамінантам різного походження (в т. ч. й МЕ) широко проводяться у країнах Європи, Азії та Америки [62-64].

У вітчизняній аграрній економіці ринок пестицидів є одним із найбільш ємнісних сегментів загального ринку матеріально-технічних ресурсів для АПК, поступаючись за обсягами продажів лише ринку техніки та пально-мастильних матеріалів. У 2020 році, за даними досліджень, усі підприємства України придбали пестицидів (гербициди, інсектициди, фунгіциди та інші засоби захисту рослин) на суму близько 25,3 млрд гривень. На внутрішньому ринку пестицидів понад дві третини обсягів продажів припадає на сегмент гербицидів та фунгіцидів. Третю позицію займають інсектициди [65]. Відповідно до

Державного реєстру пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні на сьогодні застосовується 2210 препаратів [66].

Пестициди та агрохімікати кожної групи мають різну токсичність, оскільки відрізняються хімічною будовою, складом, фізичними властивостями. Токсична дія залежить від класу небезпеки, дози хімікату, тривалості надходження, кумулятивних властивостей, знешкодження в організмі і виділення. Потрапивши в організм, пестициди можуть уражати центральну нервову систему, печінку, нирки та інші внутрішні органи [67-69]. Іноді пестициди здатні викликати віддалені негативні наслідки впливу на гормональну систему, репродуктивну функцію чи провокувати онкологічні захворювання [70-72].

Широкий спектр хімічних речовин з різноманітним токсикологічним профілем використовується в усьому світі для захисту сільськогосподарських культур – це засоби проти паразитичних організмів (грибки, комахи та шкідники тощо) і рослин. Фосфорганічні сполуки, хлорорганічні сполуки, карбамати та піретроїди являють собою найбільш часто використовувані групи таких препаратів. За умов неконтрольованого застосування значна частка таких хімічних речовин потрапляє в річки, озера та струмки, забруднює ґрунти і потрапляє у рослини, що призводить до забруднення екосистем в цілому. Відповідно оцінка безпеки і екотоксикологічна оцінка таких хімічних речовин була в центрі уваги досліджень.

Значна частка досліджуваних проб, в яких виявлені пестициди, свідчить про гостроту проблеми їх поширення і потребу у вивченні токсичності цих ксенобіотиків [70].

Отже, на сьогодні в аграрному секторі України використовується значна кількість хімічних речовин, що можуть потрапляти в кормову сировину. Деякі з них або є токсичними і визначені як пріоритетні токсиканти (мікотоксини, пестициди, важкі метали), або можуть набувати токсичних характеристик внаслідок не правильного чи безконтрольного застосування (мікроелементи),

тому важливо своєчасно надавати токсико-гігієнічну оцінку кормам з наявністю забруднювачів різного походження.

1.2 Загальна токсичність (визначення, методологія та тест-об'єкти)

Оскільки токсичність може бути спричинена різними забруднюючими речовинами у лабораторній практиці використовується спеціальний термін «загальна токсичність кормів», яка визначається як здатність речовини або продукту в середніх дозуваннях викликати негативну реакцію у живого організму. Тобто, загальна токсичність – властивість кормів і кормових добавок, що характеризує вміст токсичних речовин вище за допустимий рівень, що може викликати захворювання або загибель тварин [73-76].

Визначення токсичності кормів є необхідною умовою, оскільки наявність токсинів значно знижує якість кормів, а також призводить до загибелі тварин. Для вирішення цього питання у практиці ветеринарної медицини використовується метод біопроби на моделях різного рівня організації.

Шкірна проба на кролику. Основним (арбітражним) методом для визначення токсичності корму є шкірна проба. Для цього спочатку готують екстракт із зразка корму одним із способів: а) 50 г подрібненого комбікорму поміщають в гільзи (пакети) із фільтрувального паперу і екстрагують в апараті Соксклета ефіром (петролейним або сірчанним) протягом 6 год. Екстракт переносять з бюкса й випаровують при кімнатній температурі у витяжній шафі до зникнення запаху розчинника; б) за відсутності апарата Соксклета 100 г подрібненого корму поміщають в 0,5 л банку з притертою пробкою і заливають ефіром так, щоб рідина покрила пробу корму на 2–3 см. Екстрагують протягом 24 год при кімнатній температурі, періодично струшуючи. Потім рідину зливають в бюкс і залишають у витяжній шафі до повного випаровування розчинника або ж посуд з екстрактами ставлять на водяну баню і випаровують при температурі (45,0–50,0) °С для прискорення випаровування. Постановка шкірної проби. Для постановки шкірної проби використовують кроликів (сірих,

білих), вагою не менше 2–3 кг, з непігментованою шкірою. За декілька годин до постановки досліду у ділянці боків коротко вистригають шерсть до повного оголення шкіри розміром 4 x 6 см (на кожному боці допускається проведення дослідів не більше трьох разів, залежно від величини кролика). Нанесення екстракту у наступні дні посилюється і до 4–5 дня досягає максимуму. В окремих випадках ці строки можуть не співпадати. Для визначення токсичності корму необхідно враховувати глибину і характер ураження шкіри після нанесення екстракту, так як це дає можливість судити про ступінь токсичності корму і зробити висновок про доцільність його використання. Після нанесення екстракту, одержаного із кормів, уражених токсичними грибами, на шкірі кролика можна встановити 4 ступені загальної реакції. Перший ступінь – почервоніння, підвищена чутливість, злущування шкіри, яке зникає через 1–2 доби після нанесення екстракту (токсичність корму незначна). Другий ступінь – почервоніння, болючість, незначне потовщення шкіри, мілкі одинарні, з просяне зерно або менші, жовтуваті пухирці, а згодом на їх місці – тоненькі шкірочки підсохлого ексудату, злущування шкіри, (корм слаботоксичний). Третій ступінь – почервоніння, сильне злущування, потовщення, болючість, складчастість шкіри. На всій поверхні ураження з'являються темнуваті виразки, суцільний тонкий струп (корм токсичний). Четвертий ступінь – почервоніння, сильний набряк у вигляді масивного валу на нижній межі вогнища, утворення виразок, що довго не загоюються, струп товстий, суцільний (корм дуже токсичний) [6].

Проби на мишах. Визначити токсичність всіх видів кормів можна шляхом введення внутрішньошлунково 0,5 мл екстракту мишам. Контрольній групі вводять по 0,5 мл нейтрального жиру (риб'ячий жир, соняшникову олію). Облік реакції. Від дуже токсичних кормів миші гинуть через 6–12 год або 2 доби. Екстракти із слаботоксичних кормів загибелі тварин не викликають, але на місці введення утворюються некрози, у контрольних мишей змін не встановлюють. Для визначення токсичності висівок, макухи, шротів, комбікормів і кормів тваринного походження в шлунок білим мишам вводять

екстракти із цих кормів. Проби подібного корму поміщають в колбу, заливають стерильним фізіологічним розчином у співвідношенні 1:2–1:5 (залежно від виду корму), залишають при температурі (4,0–6,0) °С на 24 год., періодично струшуючи, потім масу віджимають і екстракт фільтрують через марлевий фільтр. Одержану витяжку по 0,5 мл вводять кожний день протягом трьох діб у шлунок (до годівлі) через зонд 3–4 мишам. Замість зонду використовується надіта на шприц тупа, злегка зігнута голка довжиною 3–4 см або голка з оливою на кінці діаметром 1 мм [77, 78].

Проби на борідках курей. Визначається токсичність кормів, уражених грибами. Для дослідження готують спиртовоефірні екстракти у співвідношенні 1:2 або 1:3. Подрібнений корм заливають розчинником і екстрагують протягом 24 год., потім розчинник випаровують до повного зникнення запаху спирту та ефіру. До 0,5–1 мл екстракту додають 4,5–9 мл стерильного нейтрального жиру (риб'ячого, соняшникового) і ретельно перемішують. Маслянистий екстракт в дозі 0,1–0,2 мл вводять в одну з борідок курей. В іншу борідку, для контролю, вводять екстракт із доброякісного корму. Реакцію враховують за наявністю запального процесу, набряку, крововиливів та некрозу, у порівнянні з контрольною борідкою. Товщину борідки визначають кутиметром. Через 3–4 год. після введення токсичного екстракту на борідці курки розвивається дифузний набряк. Борідка відвисає, потовщується. Товщина може збільшуватися в 3–9 разів, у порівнянні з нормальною. Максимальний ступінь вираження набряку настає через 20–24 год. Набряк іноді розповсюджується і на міжщелепний простір і зберігається протягом 1–2 доби. Температура борідки підвищується. Від дуже токсичних екстрактів на місці набряку на 2 добу спостерігається крововилив. Борідка набуває синьо-фіолетового забарвлення. В подальшому на місці крововиливів утворюється некроз. Набряк може розсмоктатися через 4–8 діб. Загоювання борідки при розвитку некрозу відбувається через 7–35 діб. Від введення контрольного екстракту розвивається незначний обмежений набряк. Облік реакції. Різко позитивна – дифузний набряк борідки настає через 4–24 год. після введення екстракту, товщина

борідки 8 мм і більше, на другу добу – крововиливи в центрі набряку, з подальшим розвитком некрозу. Позитивна – дифузний набряк борідки розвивається через 24 год., товщина борідки 5–8 мм, некроз та крововиливи не розвиваються. Негативна – через 24 год. з'являється обмежена припухлість борідки, товщина її не більше 4 мм [74, 76].

Аліментарні проби. Токсичність багатьох видів кормів можна встановити також методом згодовування їх курчатам, голубам, мишам та морським свинкам. Добову норму кормів замінюють досліджуваним кормом і згодовують його дослідним тваринам не менше 10 днів підряд. Токсикоз проявляється швидше, якщо уражений корм згодовувати дослідним тваринам на голодний шлунок, для чого перед дослідом тварин залишають на 5–6 год. без корму (даванку води не обмежують). Для досліду беруть 3–6 тварин. Кожного дня враховують кількість використаного тваринам корму. Стосовно дослідних тварин кожен день ведуть клінічні дослідження [74, 76-78].

Біопроба на лабораторних тваринах є найбільш показовою моделлю визначення токсичності кормів, але світове наукове товариство схиляється до мінімізації використання живих організмів у експериментах: принцип трьох R (The three Rs (Replace, Reduce, Refine), що в перекладі означає замінити, зменшити, вдосконалити) [8], тому розроблення альтернативних тестів з визначення токсичності є актуальним на сьогодні.

В Україні, зокрема, із альтернативних методів (як арбітражний) для визначення токсичності кормів використовують біопробу на інфузоріях тетрахімена піриформіс, стилоніхіях та колподах [6, 79].

Далі наведемо методологію досліджень на прикладі тетрахімени піриформіс. Метод заснований на екстракції ацетоном з випробуваної проби токсичних речовин, в основному мікогенного походження, і подальшому впливі водних розчинів цих фракцій на інфузорії.

Наважку досліджуваного корму близько 50 г (зерно подрібнюють, комбікорми, висівки та інші розсипні корми використовують без подрібнення) висипають у плоскодонну колбу зі шліфом, приливають 100 см³ ацетону і

екстрагують на апараті для струшування рідин через одну годину в колбу або чашку для випарювання. Повторне екстрагування проводять 50 см³ екстрагента (ацетону) протягом 30 хв. Рідину зливають через паперовий фільтр, промивають його від 10 до 20 см³ екстрагента. Екстракти об'єднують і випарюють на водяній бані за температури від 50,0 до 60,0 °С у витяжній шафі до повного випаровування екстрагента. Перемішують і випарюють вміст до повного видалення запаху розчинника, фільтрують у флакони і доводять до рН 7-7,5. Паралельно, з метою визначення якості розчинника та середовища, готують контрольний екстракт. Дослідження кожної проби проводять 3 рази.

У 3 флакони для антибіотиків вносять по 1 см³ екстракту з корму, доливають 0,1 см³ 3-5-добової культури інфузорії тетрахімени піриформіс і залишають за кімнатної температури. Через 30 і 60 хв підраховують ефект біопроби в краплі, піпеткою, на предметному склі під мікроскопом (збільшення 7 × 10), переглядають весь обсяг краплі і всіх її шарів. У досліджуваних пробах підраховують наявність живих і загиблих інфузорій, що залежить від ступеня токсичності корму. Контрольні повинні бути живими. У разі загибелі інфузорій контроль повторюють на новому середовищі та культурі. Ступінь токсичності корму визначають за кількістю живих інфузорій через 30 і 60 хв.: слаботоксичний корм – морфологічні зміни і часткова (від 25 % до 30 %) загибель інфузорій протягом 60 хв спостережень; токсичний корм – загибель всіх інфузорій протягом 60 хв спостережень.

Як допоміжні методи використовують біопробу на цільових тваринах, комах, ракоподібних, бактеріях, культурах клітин тощо [5-7].

Особливо перспективним є напрямок, пов'язаний із застосуванням фотобіосенсорів, які вже широко використовуються для контролю стану природних середовищ та екосистем. При чому на перший план висуваються біотести з використанням живих біолоюмінесцентних бактерій, які вирізняються з поміж інших тим, що як параметр життєдіяльності вимірюється інтенсивність їх світіння [9-11]. Проте, не зважаючи на досить широкий спектр токсикантів та сполук, вплив яких досліджено на фотолоюмінесценцію бактерії, ці

мікроорганізми зазвичай не використовувались для визначення токсичності кормів.

Отже, нині в Україні досить багато методик визначення токсичності кормів, проте вони мають ряд принципових недоліків, а саме: використання живих організмів для проведення біопроби (лабораторні та цільові тварини), тривалість проведення досліджень (від однієї години до 14 діб), використання для екстракції проб прекурсорів (ацетон) та висока вартість реактивів. Тому на сьогодні є актуальним розроблення скринінгових методик визначення токсичності кормів на основі біолоюмінесценції, що дозволить дати швидкі рекомендації (до 30 хв) відносно необхідності проведення подальшого хімічного аналізу для визначення основних забруднювачів кормів та застосування заходів очищення від них.

1.3 Біолоюмінесценція

1.3.1 Терміни та визначення понять, історія виявлення, системи біолоюмінесценції. Біолоюмінесценція (грец. βίος – життя і лат. luminiscens – що світиться) – це світіння організмів, яке відбувається за рахунок спеціальних хімічних реакцій, які супроводжуються виділенням світла [80-85]. Цей процес у клітинах бактерій спостерігається безперервно, а в його основу покладено, наприклад, окиснення відновленого рибофлавін-5'-фосфату (флавінмоноклеотиду) (рис. 1.1) [86].

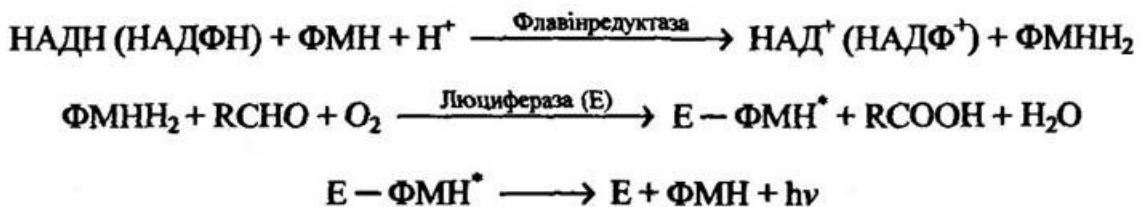


Рис. 1.1. Реакція окиснення рибофлавін-5'-фосфату, що супроводжується біолоюмінесценцією бактерій. Примітка. Позначка (*) означає, що даний атом перебуває в електронно збудженому стані [86].

Біоломінесценція на думку американських учених McElroy W. D. et. al., 1961 виникла на стадії переходу від анаеробних форм життя до аеробних, коли у початковій атмосфері Землі почав накопичуватися кисень [87]. Ймовірно, для анаеробних організмів, що існували тоді, кисень був токсичний і перевагу отримали організми, здатні швидко відновлювати його. При цьому в ряді випадків виділення енергії у світловій формі було вигідніше, ніж у тепловій. У найпростіших біоломінесцентних форм енергія, що звільняється при окисненні субстратів, виділялася у формі світла чи тепла, тобто зникала без користі для організму. Тому в ході подальшої еволюції набули переваги організми, у яких виник механізм акумуляції енергії. З появою таких форм окисні люмінесцентні реакції не давали переваг при природному відборі і навіть ставали шкідливими. Однак у результаті вторинних еволюційних процесів біоломінесценція могла зберегтися як рудиментарна ознака в окремих, не пов'язаних один з одним груп організмів, у яких вона набула інших функцій, наприклад, функції статевого сигналу у світляків [88-91].

За ступенем складності розрізняють 3 системи біоломінесценції організмів. Найпростіша, що складається тільки з люциферину і люциферази, є у *Cypridina* (цей рачок випромінює синьо-зелене світло з максимальною довжиною хвилі 440-460 нм), у риби *Argon* та ін. Більш складна система у бактерій, що світяться: тут крім люциферину та люциферази є ще довголанцюговий альдегід. Бактерії випромінюють зелене світло з максимальною довжиною хвилі близько 560 нм. Найбільш складна система світіння у комах, наприклад світляків. Їхні органи біоломінесценції випромінюють спалахи жовто-зеленого світла (близько 560 нм.), що викликаються нервовими імпульсами. Крім люциферину та люциферази, для реакції світіння комахами необхідні АТФ та магній. Енергія, що звільняється під час гідролізу АТФ, імовірно, активує люциферин-люциферазну систему і забезпечує окиснення люциферину з випромінюванням світла. За відсутності АТФ ця система не працює [92-95].

1.3.2 Сфери застосування. Біоломінесценція сьогодні досить широко застосовується у різних сферах, зокрема, у медицині. Так, цитозольний білок середнього розміру (36 кДа) корала, який виробляє постійний люмінесцентний сигнал (світло червоного спектру) використовується для біозображення та скринінгу ліків [96-99].

Невеликий (20 кДа) секретований білок, що виробляється малими ракоподібними з групи *Copepoda*, з високою швидкістю каталізу та винятковою термостабільністю. Сигнал *Gaussia luciferase* змінюється лінійно залежно від кількості досліджуваних клітин, що робить цю систему корисною для моніторингу прогресування пухлин та відповіді на ліки [100, 101].

Іншим модифікованим трипептидом, що випромінює блакитне світло, є ципридиновий люциферин, метаболіт, який міститься в остракоді *Cypridina* та біоломінесцентній риби-гардемарині *Porichthys*. широко використовується в імунологічних аналізах [102].

Люцифераза світляків: дуже популярна як репортерна молекула завдяки ранньому відкриттю, високому квантовому виходу біоломінесценції, доступності термостабільних мутантних варіантів із покращеними спектральними характеристиками та легкості виробництва. Люцифераза світляків широко використовується в різних системах *in vitro* та *in vivo* для виявлення патогенних бактерій [103, 104] та вірусів [105].

Сенсорна технологія, заснована на біоломінесценції, вже кілька десятиліть широко використовується в контролі гігієни. Зокрема, аналіз АТФ-біоломінесценції, регулярно використовується для моніторингу чистоти поверхонь у закладах охорони здоров'я, таких як лікарні та клініки, а також у молочній та м'ясопереробній промисловості [106, 107]. Нещодавно ці технології були застосовані для моніторингу чистоти не тільки поверхонь, але й хірургічних інструментів і зубних протезів [108, 109].

Бактеріальна біоломінесценція також використовується у харчовій промисловості для моніторингу поведінки Lux-мічених бактерій *in situ* в складних харчових системах, для вирішення проблем і для розробки

модифікованих і вдосконалених цілей обробки та зберігання [110]. Так, вимірювання біоломінесценції АТФ регулярно використовуються для моніторингу контролю якості та гігієни на підприємствах з переробки риби для визначення рівнів забруднення [111].

Молочна промисловість також отримує значну користь від біоломінесцентних аналізів АТФ, оскільки вони використовуються для визначення якості молока шляхом вибіркового вимірювання АТФ із соматичних клітин і псування молока шляхом визначення рівня АТФ від бактерій та інших мікроорганізмів як до, так і після УВТ-обробки для оцінки терміну зберігання [112]. На сьогоднішній день біоломінесцентні *E. coli* та *Listeria* використовувалися для моніторингу виживання цих бактерій після обробки в йогурті та сирі [113].

Для визначення проникнення та контамінації яєчної шкаралупи також використовували низку мічених Lux бактерій, таких як *Campylobacter jejuni* та *Salmonella enteritidis* [114].

Бактерії, мічені Lux-геном, також використовували в рослинництві для моніторингу розвитку бактеріальної інфекції в розсаді рослин (томатів) [115].

Lux-мічені бактерії вводили мишам для візуалізації *in vivo* результуючої бактеріальної інфекції – наприклад, було показано, що lux-мічені *L. monocytogenes* ростуть і локалізуються в жовчному міхурі мишей і спричиняють повторне зараження в кишечнику після виділення жовчі [116]. Бактерії, помічені lux, також використовувалися для виявлення біоплівки і розробки методів очищення від них, а також для перевірки ефективності засобів для дезінфекції та дезінфекції рук. Окрім моніторингу росту та розвитку патогенних бактерій, пробіотичні бактерії, помічені lux, також можна контролювати в харчових продуктах, які їх містять, а також відстежувати бактерії за допомогою візуалізації *in vivo*, щоб зрозуміти їхній життєвий цикл та середовище [117, 118].

Аналіз біоломінесценції АТФ також був адаптований для вимірювання рівня АТФ на поверхні старих творів мистецтва, щоб оцінити рівень бактерій,

грибків, дріжджів, водоростей і лишайників у антикварних роботах з метою збереження культурних та історичних пам'яток [119, 120].

Оскільки світловий вихід у біоломінесцентних реакціях залежить від умов аналізу *in vitro* або *in vivo*, його було модифіковано та адаптовано для визначення різних параметрів, таких як рН, концентрації іонів металів, глюкози, активних форм кисню, ензимів та молекули ліків. Ці сенсорні програми можуть використовувати або модифіковані люциферини, такі як клітинні структури люциферину, або модифіковані люциферази, які кон'юговані з сенсорними доменами у формі зондування на основі активності (ABS), де вихід оптичного сигналу залежить від внутрішньої хімічної активності біоаналіту. або з чутливим доменом люциферази, або з клітинним люциферином [121-123].

Технологія, що заснована на біоломінесценції, знайшла шляхи до ефекторних технологій, де світло від біоломінесцентної реакції можна використовувати для впливу на інші процеси або керування ними. В галузі оптогенетики, де зовнішні джерела світла використовуються для контролю фотоактивних білків та іонних каналів, а отже, клітин, таких як нейрони [124].

Фотофармакологія, включаючи фотодинамічну терапію, фотоуніверсалізацію та фотоізомерію, є областю, що викликає зростаючий інтерес у медичній хімії для розробки та розробки нових методів лікування. Біоломінесценція має потенціал для великого використання тут як джерело світла *in vivo* в безпосередній близькості до цікавих видів. Той факт, що люциферази зазвичай генетично закодовані, робить це складним завданням для людей і складним з кількох сторін. Проте з появою наночастинок, пов'язаних з люциферазою, незабаром може бути вирішено проблему доставки ензиму до потрібного місця дії [125].

Окрім вищевказаних сфер застосування біоломінесценція застосовується в токсикологічному моніторингу об'єктів природного середовища, проте, оскільки ці дослідження дуже близькі до наших, більш детально ми зупинемося на цьому в розділі 1.5.

1.3.3 Основні представники люмінесцентних бактерій. Узагалі до люмінесцентних належить 12 видів бактерій, які класифіковані чотирма родами: *Vibrio*, *Photobacterium*, *Shewanella*, *Xenorhabdus* (*Photorhabdus*). Більшість представників цієї групи є морськими видами, серед яких трапляються як вільноживучі, так і симбіотичні форми [126, 127]. (табл. 1.1)

Таблиця 1.1

Люмінесцентні бактерії [127]

Види	Репрезентативні середовища існування	Біоломінесцентний симбіоз
1	2	3
Морські		
<i>Vibrio fischeri</i>	Морська вода помірного узбережжя	Моноцентридна риба, деякі сепіолідні кальмари
<i>Vibrio harveyi</i>	Прибережний пояс від помірного до тропічного, морська вода, осад	—
<i>Vibrio logei</i>	Прибережна холодна морська вода, відкладення, Арктика і середземноморський	Деякі сепіолідні кальмари
<i>Vibrio mediterranea</i>	Середземне море Прибережна морська вода	—
<i>Vibrio orientalis</i>	Морська вода, поверхні креветок	—
<i>Vibrio salmonicida</i>	Ураження тканин атлантичного лосося	—
<i>Vibrio splendidus</i>	Прибережна морська вода, Перська затока	—
<i>Vibrio vulnificus</i>	Кров і тканини людини, США	—
Без назви	Ще не культивована	Аномалопідна риба
Без назви	Ще не культивована	Цератоїдна риба
<i>Photobacterium angustum</i>	Морська вода і рибні кишки, Море Кортеса	—

<i>Кінець таблиці 1.1</i>		
1	2	3
<i>Photobacterium leiognathi</i>	Прибережний від помірною до тропічного морська вода, лейогнатид	Акропоматида, апогоніди, деякі лолігіроїдні кальмари
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Прибережно-пелагічна холодна до помірної морська вода	Опістопротиди, хлорофтальміди, трахихтиїди, моріди, макруруси, риба штейндахнерид
<i>Shewanella hanedai</i>	Холодна морська вода та осад	—
<i>Shewanella woodyi</i>	Морська вода і чорнило кальмара, Альборанське море	—
Солончакові/Лиманні		
<i>Vibrio cholerae</i>	Від помірних до тропічних лиманів, затоки прибережної морської води	—
Наземні		
<i>Photorhabdus luminescens</i>	Личинки комах, заражені гетерорабдитидними нематодами	Ентомопатогенні нематоди
<i>Photorhabdus temperata</i>	Личинки комах, заражені гетерорабдитидними нематодами	Ентомопатогенні нематоди
<i>Photorhabdus asymbiotica</i>	Ураження шкіри людини США і Австралії	—
Примітки: «—» – симбіоз відсутній.		

Деякі з видів, перелічених у таблиці 1.1, були описані наприкінці 1990-х років минулого століття [128, 129]. Слід зазначити, що наявність і інтенсивність світіння не залежить від філогенетичної належності бактерій, проте найінтенсивніше світіння зареєстроване у представників родів *Vibrio* і *Photobacterium* [130, 131].

Отже, на сьогодні досить докладно вивчені механізми виникнення біолюмінесценції, визначені основні «люмінесцентні» організми, які належать до різних систем організації. Біолюмінесценція має досить широку сферу

застосування в різних галузях науки і техніки, проте майже відсутні дані відносно застосування цього явища при визначенні токсикологічних характеристик кормів.

1.4 Культивування, збереження і відновлення люмінесцентних мікроорганізмів

Бактерії, що світяться, можуть бути виділені як безпосередньо із морської води, так і зняті з мертвих кальмарів та риб. Звичайними мікробіологічними методами можна отримати чисті культури цих мікроорганізмів. Але культивування досить складне – бактерії часто спонтанно втрачають здатність до люмінесценції. Щоб зберегти цю їх властивість необхідно ретельно дотримуватися усіх умов, щодо живлення, рН та температури [132, 133].

Бактерії, що світяться – гетеротрофи, тому для забезпечення цих мікроорганізмів вуглецем та енергією необхідні органічні речовини, в якості яких, в основному, виступають амінокислоти. Щодо інших органічних сполук – цукрів, спиртів, органічних кислот, то їхня роль як джерела вуглецю для росту фотобактерій і як енергетичних субстратів неоднакова. Тільки *V. fisheri* може використовувати як єдине джерело вуглецю глюкозу або гліцерин, усім іншим фотобактеріям цукри, органічні кислоти, гліцерин будуть лише енергетичним субстратом [134, 135].

За типом азотного живлення більшість фотобактерій відноситься до аміногетеротрофів. Бактерії, що світяться, добре ростуть тільки на середовищах, що містять пептони, продукти неповного гідролізу білків або набори амінокислот. Так, аспарагін, аспарагінова кислота та гліцин можуть замінити пептон у поживних середовищах для фотобактерій, в той час як тирозин світіння інгібують [136, 137].

Бактерії, що світяться, є типовими галофілами – для них характерна специфічна потреба в іонах натрію, до них більш чутлива люмінесценція, ніж процес дихання. Світіння спостерігається лише у розчинах, що містять іони

натрію, тоді як хлористий калій та сахароза зменшували люмінесценцію, а хлориди Ca та Mg її повністю пригнічували [138, 139].

Бактерії, що світяться, культивуються на твердих та рідких поживних середовищах. Фотобактерії дуже чутливі до складу поживного середовища, а також до співвідношення його компонентів. Тому підбір середовищ для культивування люмінесцентних бактерій – дуже складне завдання. Для росту фотобактерій необхідні вітаміни (рибофлавін, піридоксаль, біотин, фолієва кислота), а також, можливо, невизначені речовини – фактори росту, які містяться в складних субстратах – пептоні, рибній або м'ясній витяжці, дріжджовому екстракті тощо. Тому основними для культивування фотобактерій залишаються емпіричні середовища, що містять складні органічні речовини [140].

Так, люмінесценція бактерій спостерігається в широкому діапазоні температур, причому нижній поріг різний у окремих видів і знаходиться від 0 до 10,0 °C, але верхня межа однакова для всіх – вище 40,0°C світіння не спостерігається. Оптимальна температура для люмінесценції також неоднакова для різних видів. Так, за даними літератури, у *Ph. phosphoreum* максимальна люмінесценція спостерігається при 20,0°, а у *V. fisheri* – при 28,0°. Слід відмітити, що в більшості випадків температурні оптимуми росту і світіння бактерій не співпадають. Звичайно оптимум люмінесценції лежить нижче температури для оптимуму росту: у *V. fisheri* – 28,0 та (35,0 – 39,0)°C відповідно; у *Ph. phosphoreum* – 20,0 та 35,0 °C відповідно. При температурах вище оптимальної починається теплова денатурація ензиму, яка з подальшим підвищенням температури йде все швидше. Теплова інактивація люциферази зворотня – знижене при нагріванні бактерій світіння можна повернути до початкового рівня охолодженням. Але відновити світіння таким чином можна, якщо температура підвищувалася не безмежно, а до визначеного рівня, а її вплив на бактерії був короткочасним [141-143].

Щодо гідростатичного тиску, то світіння бактерій і люмінесцентна реакція *in vitro* однаково реагують на його зміни. Так, при його підвищенні до

280 кГ/см² спостерігається збільшення рівня люмінесценції. За яким йде спад. Зняття тиску викликає різке падіння рівню світіння, який протягом 30 с повертається до початкового значення [144-146].

Ці два показники, температура і тиск, тісно пов'язані. Так, при збільшенні гідростатичного тиску на світіння бактерій зменшується, якщо вплив тиску здійснюється за температури, нижче оптимальної для люмінесценції. Якщо ж температура, за якої діє тиск, вище оптимальної, рівень світіння підвищується. Так, за однакової температури, яка для *V. fisheri* є оптимальною для світіння, а для *Ph. phosphoreum* – вище оптимальної, під дією гідростатичного тиску інтенсивність світіння у першого виду майже не змінюється, тоді як у другого – збільшується [147, 148].

Установлено, що різні буферні системи по різному впливають на люмінесценцію фотобактерій. Так, при однакових значеннях рН найяскравіше світіння *Ph. phosphoreum* спостерігалось у фосфатному буфері, значно слабше воно було в ацетатному та фталатному буферах. Пізніше до списку буферів, що послаблюють світіння були додані боратний та трис-буфер [149, 150].

Бактерії, що світяться можуть бути як облігатними аеробами (*V. indicus*), так і факультативними анаеробами (*Ph. phosphoreum*, *V. fisheri*). Однак світіння усіх фотобактерій – строго аеробний процес. Концентрація Оксигену, що потрібна для підтримки люмінесценції, дуже мала. Світіння бактерій залишається видимим для адаптованого до темряви оком, навіть якщо бактерії знаходяться в атмосфері Нітрогену, що містить лише $1 \cdot 10^{-10}$ частин Оксигену. Тому бактерії, що світяться – один з найчутливіших індикаторів на присутність молекулярного Оксигену [151, 152].

У лабораторній практиці в Україні на сьогодні для культивування бактерій роду *Photobacterium* застосовуються наступні поживні середовища.

Середовище для *Ph. mandapamensis*, яке містять наступні компоненти, мг/дм³: NaCl (натрій хлористий) (30,0), Na₂HPO₄•12H₂O (натрій фосфорнокислий двозаміщений дванадцяти водний) (6,0), KН₂PO₄ (калій фосфорнокислий однозаміщений) (1,0), (NH₄)₂HPO₄ (амоній фосфорнокислий)

(0,5), $\text{MgSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$ (магній сірчаноокислий семиводний) (0,2), бактопептон (5,0), глюкозу (1,0) і дистильовану воду до одного дм^3 [153].

Напівсинтетичне середовище для бактерій роду *Photobacterium*, яке містять наступні компоненти, мг/дм^3 : NaCl (30,0), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \bullet 12\text{H}_2\text{O}$ (10,0), KH_2PO_4 (1,0), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0,5), $\text{MgSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2), гліцерин (3,0), пептон (5,0-10,0), $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_7\text{Na}$ (натрію цитрат) (0,65) і дистильовану воду до одного дм^3 [154].

Середовище Єгорова Н.С. зі співавт. для фотобактерій, яке містять наступні компоненти, мг/дм^3 : NaCl (30,0), KH_2PO_4 (1,0), $\text{MgSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5), пептон (10,0), аспарагін (0,5) + рибна витяжка (0,5) і дистильовану воду до одного дм^3 [155].

Живильне середовище для бактерій *V. fischeri* та *Ph. phosphoreum*, яке містять наступні компоненти, мас.‰: NaCl (29,0-31,0), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \bullet 12\text{H}_2\text{O}$ (4,0-6,0), KH_2PO_4 (20,0), гліцерин (2,0-4,0), екстракт дріжджів (40,0 – 60,0), панкреатичний гідролізат кільки (150,0 – 250,0) [156].

Середовище для підтримання тривалої біоломінесценції бактерій *Ph. phosphoreum* ІМВ В-7071, що використовуються в біосенсорних пристроях для оцінки екологічних ризиків, яке складається з екзополісахариду (ЕПС) мікробного походження ксантану і екзополісахаридполіакриламід (ЕПАА) в комбінації 3:7 і 3 % розчину хлориду натрію [157].

Однак, ці середовища не забезпечують достатню швидкість накопичення бактеріальної маси та високий рівень світіння фотобактерій, а деякі компоненти мають високу вартість, зокрема, панкреатичний гідролізат кільки.

Як правило, колонії бактерій, що світяться, на твердому поживному середовищі округлі, прозорі або напівпрозорі часто переливчасті, їхня поверхня завжди гладенька. Блискуча, від сірувато-білого (*Ph. phosphoreum*) до жовтого кольору (*V. fisheri*). Розміри колоній варіюють від 0,5 (*V. fisheri*) до 0,8 мм (*V. harveyi*). Бактерії, що світяться – найчастіше паличкоподібної форми з розмірами від 0,5–1,5 (*V. fisheri*) до 0,5–2,5 мк (*V. harveyi*). Клітини *Ph. phosphoreum* являють собою коротенькі палички (зазвичай мають заокруглені кінці) або кококобацили з розмірами 1–2,5 або 0,4–1,0 мк. Усі вони

безспоріві, капсул не утворюють. Відмінною ознакою усіх видів бактерій, що світяться, є їх негативна реакція за Грамом [127, 158-160].

Бактерії, що світяться при культивуванні на твердому або рідкому поживному середовищі випромінюють видиме оком світіння, яке за своїм характером відрізняється від світіння інших живих організмів – воно здається суцільним, неімпульсним, його тривалість визначається часом життя бактеріальної популяції. Уявлення про неімпульсну природу світіння бактерій склалося за результатами візуального спостереження за цими мікроорганізмами у культурі. Видиме оком бактеріальне світіння являє собою поєднання світіння мільйонів і навіть мільярдів окремих клітин, проте світіння окремих клітин при візуальному і навіть інструментальному спостереженні не виявляється [126, 127, 136, 160].

За умов періодичного культивування ензими люмінесцентної системи синтезуються тільки на визначеній стадії росту, це пов'язано з наявністю складної системи регуляції у фотобактерій. Так, при внесенні культури у свіже поживне середовище припиняється синтез люциферази і відновлюється тільки після досягнення культурою визначеної концентрації. Це явище отримало назву «автоіндукція», і пояснюється тим, що для ініціації синтезу люциферази необхідне накопичення в середовищі специфічної речовини – «автоіндуктору», що виробляється бактеріями, та активування інгібітору, що міститься у складних середовищах для культивування фотобактерій [161, 162].

Саме тому великі труднощі виникають під час зберігання колекційних культур бактерій, що світяться. Розповсюджений метод консервації бактеріальних культур ліофілізацією не виправдовує себе – світіння відновлених бактерій завжди слабше вихідного, при чому яскравість світіння зменшується прямо пропорційно часу зберігання. Проте даний спосіб залишається на сьогодні єдиним доступним способом збереження і відновлення люмінесцентних мікроорганізмів.

Так, описано простий спосіб тривалого збереження люмінесцентних бактерій. Клітини *V. fischeri*, *Ph. leiognathi* і чотирьох штамів *Ph. phosphoreum*

суспендували в захисному середовищі з низькою іонною силою (1,0 % NaCl) з додаванням 15,0 % лактози і 2,0 % розчинного крохмалю, і ліофілізували. Відновлення люмінесцентних бактерій проводили через шість місяців шляхом додавання 2,0 % NaCl до початкового об'єму. Регідратовані клітини демонстрували 16-28 % початкової біолюмінесценції [163].

Для практичного застосування створеного з використанням генної інженерії штаму *Escherichia coli* DPD2540 (містить злитий ген *afabA::luxCDABE*) використовували сублімаційне сушіння. Було встановлено, що 12,0 % розчин сахарози з бульйоном Лурії-Бертані виявився найефективнішою композицією у якості розчину для ліофілізації. Поряд з цим швидке заморожування рідким Нітрогеном також дало найкращу життєздатність після ліофільної сушки порівняно зі зразками, замороженими за $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ і $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ [164].

Ще одне протективне середовище мало наступний склад: гліцерин 0,3 %, NaCl 3,0 % і сахароза 5,0 %, воно забезпечувало світіння *Ph. leiognathi*, *Ph. Phosphoreum*, *V. fischeri* і *V. harveyi* на рівні 55-60 % від початкового після регідратації 3,0 % розчином NaCl [165].

Для кріопротекції використовують різні речовини та їх композиції, зокрема, диметилсульфоксид, гліцерин, етиленгліколь, поліетиленгліколь, сахароза та трегалоза [166].

Є досвід зберігання музейних культур фотобактерій під вазеліновим маслом – автори стверджують, що такий спосіб консервування більш надійний, ніж ліофілізація, – яскравість світіння бактерій, що були висіяні з-під вазелінового масла, після чотирьох років зберігання не зменшувалась [167].

Отже, культивування, збереження і відновлення люмінесцентних мікроорганізмів є дуже складним процесом, оскільки на інтенсивність люмінесценції впливає дуже багато факторів. На сьогодні підібрані основні компоненти поживних середовищ для культивування, протективних середовищ та середовищ для регідратації, проте питання пошуку оптимального їх складу залишається відкритим.

1.5 Використання біоломінесценції для оцінки токсичності об'єктів довкілля. Біоломінесцентні датчики (біосенсиори) та тести.

Якщо ген *lux* експресується безперервно, люцифераза та люциферин утворюватимуться безперервно, і вихідна інтенсивність світла змінюватиметься після додавання цільового аналіту залежно від того, наскільки добре виживає бактеріальна клітина. Альтернативно, ген *lux* можна контролювати індукцибельним способом, коли він буде злитий з промотором, який регулюється сполукою, що представляє інтерес. У цьому випадку концентрація сполуки може бути кількісно визначена шляхом вимірювання інтенсивності біоломінесценції [168]. Раніше повідомлялося, що бактеріальні біоломінесцентні датчики аналізували різноманітні аналіти, включаючи Цинк, біодоступний толуол і Уран [169-171].

Деякі останні приклади розробки бактеріальних біоломінесцентних біосенсорів для виявлення різних аналітів у воді, що представляють екотоксикологічний інтерес наведено нижче.

Для виявлення поширених антибіотиків Jonkers et al., 2020 запропонували біосенсор з *Bacillus* WT і *E. coli* FhuAT з межею детектування 0,043-324,0 мкг/дм³ [172].

Kassim et al., 2020 створили біосенсор на основі *Ph. leiognathi* для виявлення Меркурію з межею детектування 9,87 мкг/дм³ [173].

Borisover et al., 2019 для виявлення Хлору використали *E. coli* mutants, межа детектування при цьому становила 1,0 мкг/дм³ [174].

Для виявлення гербіциду тербутрину Vermeirssen et al., 2018 використали *Aliivibrio fischeri* межа детектування при цьому становила 81,0 мкг/дм³ [175].

Dieudonne et al., 2020 детектували арсеніт біосенсором з *E. coli* межа детектування при цьому становила 39,6 мкг/дм³ [176].

Найбільшого розповсюдження за кордоном набув біотест Microtox (Strategic Diagnostics, Inc., Німеччина, США) (на основі *Ph. phosphoreum*, штам

NRRL-B-11177, що іноді також називається *V. fischerii*, штам NRRL-B-11177), який був розроблений першим та широко використовується в лабораторних та польових дослідженнях для контролю якості промислових та природних вод у декількох країнах, визначення ступеня токсичності хімічних сполук та фармакологічних препаратів, що створюються [177-178].

Розроблено біосенсорний тест ToxAlert 100® (Merck, Німеччина), в основі якого використовується інгібування біоломінесценції у ліофілізованих *V. fisheri*. Застосовується для аналізу ґрунтів та ґрунтових вод [179-180].

V. fisheri також застосовується у біосенсорній системі LUMISTox 300 (HACH LANGE, Німеччина), розроблена для екотоксикологічної оцінки вод, стічних вод та шламів [181-182].

Система BioTox™ створена на основі *Aliivibrio fischeri* і *Ph. phosphoreum*, виробляються декількома закордонними фірмами [30, 183] і також застосовується з метою токсикологічного моніторингу об'єктів водного середовища.

Окрім цього реалізовано комерційний випуск тестсистем: «Mitatox» (США) [184], «Vitotox» («GENAUR Molecular Products», Бельгія) [185] на основі *V. fischeri* та «Mutatox» [186] на основі *Aliivibrio fischeri*.

Біоломінесцентні тести затверджені нормативними документами в ЄС та інших закордонних країнах: французький стандарт (DIN 38412-1990), американський стандарт (ASTM D5660-1995), китайський стандарт (GB / T 15441-1995), європейський стандарт (EN ISO 11348) ISO 11348: Water Quality Luminescent Bacteria Test (включають дослідження стічних вод, водних екстрактів і продуктів вилужування, прісної води (поверхневі і ґрунтові води), морської води та мулових відкладень, речовин, що розчинні в воді, з будь-яких матриць.

Отже, використання біоломінесценції для оцінки токсичності об'єктів довкілля досить поширене в Світі, на її основі розроблено безліч біосенсорних систем та нормативних документів, що регламентують їх застосування, найпоширенішими люмінесцентними бактеріями в біосенсорах є *Ph. phosphoreum*

і *V. fischerii*. Проте, не дивлячись на вищевказане, методики для аналізу токсичності кормів з використанням люмінесцентних бактерій наразі не розроблені.

1.6. Висновок з огляду літератури

В аграрному секторі України використовується значна кількість хімічних речовин, що можуть потрапляти в кормову сировину. Деякі з них або є токсичними і визначені як пріоритетні токсиканти (мікотоксини, пестициди, важкі метали), або можуть набувати токсичних характеристик внаслідок не правильного чи безконтрольного застосування (мікроелементи), тому важливо своєчасно надавати токсико-гігієнічну оцінку кормам з наявністю забруднювачів різного походження.

Враховуючи вищесказане, нині в Україні досить багато методик визначення токсичності кормів, проте вони мають ряд принципових недоліків, а саме: використання живих організмів для проведення біопроби (лабораторні та цільові тварини), тривалість проведення досліджень (від однієї години до 14 діб), використання для екстракції проб прекурсорів (ацетон) та висока вартість реактивів. Тому на сьогодні є актуальним розроблення скринінгових методик визначення токсичності кормів на основі біолюмінесценції, що дозволить дати швидкі рекомендації (до 30 хв) відносно необхідності проведення подальшого хімічного аналізу для визначення основних забруднювачів кормів та застосування заходів очищення від них.

На сьогодні досить детально вивчені механізми виникнення біолюмінесценції, визначені основні «люмінесцентні» організми, які належать до різних систем організації. Біолюмінесценція має досить широку сферу застосування в різних галузях науки і техніки, проте майже відсутні дані відносно застосування цього явища при визначенні токсикологічних характеристик кормів.

Культивування, збереження і відновлення люмінесцентних мікроорганізмів є дуже складним процесом, оскільки на інтенсивність люмінесценції впливає дуже багато факторів. На сьогодні підібрані основні компоненти поживних середовищ для культивування, протективних середовищ та середовищ для регідратації, проте питання пошуку оптимального їх складу залишається відкритим.

Використання біолюмінесценції для оцінки токсичності об'єктів довкілля досить поширене в Світі, на її основі розроблено безліч біосенсорних систем та нормативних документів, що регламентують їх застосування, найпоширенішими люмінесцентними бактеріями в біосенсорах є *Ph. phosphoreum* і *V. fischeri*. Проте, не дивлячись на вищевказане, методики для аналізу токсичності кормів з використанням люмінесцентних бактерій наразі не розроблені.

Виходячи з вищесказаного для створення експрес-методики визначення загальної токсичності кормів з використанням біолюмінесцентних мікроорганізмів необхідно було вирішити наступні завдання:

- Удосконалити систему культивування та розробити поживне середовище для біолюмінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum*;
- Розробити та провести валідацію експрес-методики визначення загальної токсичності кормів з використанням біолюмінесцентних мікроорганізмів;
- Вивчити вплив різних рівнів пестицидів різних класів у кормах на люмінесценцію біолюмінесцентних мікроорганізмів та надати їм токсикологічну характеристику;
- Вивчити вплив різних рівнів мікотоксинів у кормах на люмінесценцію біолюмінесцентних мікроорганізмів та надати їм токсикологічну характеристику;
- Вивчити вплив різних рівнів неорганічних елементів у кормах на люмінесценцію біолюмінесцентних мікроорганізмів та надати їм токсикологічну характеристику.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Роботу виконували впродовж 2019–2022 рр. у лабораторії токсикологічного моніторингу Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» (ННЦ «ІЕКВМ») за загальною схемою, наведеною на рис. 2.1.

Дисертаційна робота виконана згідно з тематичними планами наукових досліджень лабораторії токсикологічного моніторингу ННЦ «ІЕКВМ», у рамках галузевої програми 38 «Наукове забезпечення контролю епізоотичного благополуччя тваринництва та систем біологічної та продовольчої безпеки України» (Епізоотичне благополуччя, біологічна та продовольча безпека) (2019-2020 рр.) за завданнями: «Розробити нові методики визначення основних абіотичних токсикантів (пестициди, неорганічні елементи тощо) для отримання якісної і безпечної продукції тваринництва» (номер державної реєстрації 0119U100990) та галузевої програми 34 Забезпечення стабільного епізоотичного благополуччя та продовольчої безпеки України у контексті реалізації стратегії МЕБ-ВООЗ-ФАО «Єдине здоров'я» (Єдине здоров'я, біологічна та продовольча безпека) (2021-2025 рр.) за завданням: «Дослідження впливу на організм тварин факторів навколишнього середовища (наночастки, важкі метали, мікотоксини, тощо) та розроблення сучасної системи забезпечення якості і безпечності сільськогосподарської продукції за основними маркерами контролю» (номер державної реєстрації 0121U108350).

У роботі використовували ліофілізовану культуру *Ph. phosphoreum* (штам ІМВ В-7071; Sq3) отриману із Депозитарію мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного Національної академії наук України (м. Київ).

Під час розробки методики використовували стандартні мікробіологічні методи (висів культур фотобактерій на поживні середовища, підрахунок кількості мікробних клітин, тощо).



Рис. 2.1. Загальна схема проведення дисертаційних досліджень

У процесі встановлення оптимальних умов культивування *Ph. phosphoreum* відпрацьовано декілька температурних режимів в діапазоні від 24,0 до 31,0°C та експозицій, які залежали від достатнього накопичення біомаси фотобактерій та прояву світіння, що оцінювалось візуально.

Під час досліду з підбору компонентів поживного середовища використовували наступні складові: NaCl, Na₂HPO₄•12H₂O, KH₂PO₄, (NH₄)₂HPO₄, MgSO₄•7H₂O, дріжджовий екстракт, крейда, гліцерин, бактопептон, амінокислоти, панкреатичні гідролізати кільки, агар. Ефективність середовищ, які досліджували, оцінювали за показниками росту та інтенсивністю світіння через 22 год культивування.

Для підготовки бактерій до ліофілізації проводили посів на рідке поживне середовище і культивували за (27,0±0,5) °C протягом 24 годин. До концентрату культури бактерій додавали стабілізатори: розчини сахарози у різних концентраціях з натрію хлоридом (1:1). Після деліофілізації проводили контроль збереження інтенсивності світіння, накопичення та життєздатності мікробних клітин. При відновленні життєздатності клітин *Ph. phosphoreum* та люмінесценції використовували різні склади розчинників (на основі натрію хлориду і розчин за складом наближений до морської води) та температурні режими.

Під час розробки експрес-методики як культуру-порівняння використовували культуру *Colpoda steinii* сушу для еколого-токсикологічних досліджень об'єктів зовнішнього середовища, продуктів тваринництва та птахівництва (РП № АВ-02438-01-11, виробництва ТОВ «Відродження», м. Одеса). Культуру *Colpoda steinii* використовували згідно листівки-вкладки.

Перед початком досліджень було проведено перевірку культури клітин *Ph. phosphoreum* на чистоту шляхом мікроскопії мазків забарвлених по Граму з подальшим висівом для збереження у пробірки на щільне середовище для фотобактерій. Зберігання культури клітин проводили за умов холодильника за температури (4,0±0,3)°C з щомісячним пересівом. Культуру *Colpoda steinii*

перед дослідженнями перевіряли на активність у висячій краплі під мікроскопом при збільшенні $\times 100$.

Культивування фотобактерій під час досліду здійснювали у термостаті за температури $(26,0-28,0 \pm 0,8) ^\circ\text{C}$ у пробірках на рідкому та щільному поживному середовищі, розробленому в нашій лабораторії; *Colpoda steinii* – за температури $(28,0 \pm 0,8) ^\circ\text{C}$.

Вимірювання інтенсивності світіння люмінесцентних бактерій проводили на люмінометрі EMILITE – 1003 A (БиоХимМак). Для кількісної оцінки впливу на люмінесценцію бактерій використовували коефіцієнт пригнічення (γ) та індекс токсичності (Т), щоб зробити висновок про ступінь токсичності зразка. Критерієм оцінки токсичності досліджуваних зразків кормів при тестуванні *Colpoda steinii* була рухливість інфузорій.

Валідаційні параметри експрес-методики визначення загальної токсичності з використанням фотолюмінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum* встановлювали згідно ISO 16140 [187]. При цьому проводили порівняльне дослідження альтернативного (визначення загальної токсичності кормів з використанням *Ph. phosphoreum*) та стандартного методу (визначення токсичності з використанням інфузорії *Colpoda Steinii* згідно з ДСТУ 3570-97 [6] (тест-набір виробництва ТОВ «Відродження», м. Одеса, РП № АВ-02438-01-11). Тест-об'єктом була зерноsumіш (ячмінь-пшениця 50:50). Токсикантом: мікотоксин зеараленон (Sigma-Aldrich, CRM46916).

Під час проведення валідації методики встановлювали наступні параметри: відносна специфічність, відносна точність, контроль внутрішньолабораторної відтворюваності, стабільність люмінесценції, лінійність, збіжність, межа детектування та межа визначення методу.

Вивчення валідаційного параметру відносна специфічність характеризує відповідну методику за однозначним визначенням токсичності кормів, як альтернативним, так і стандартним методом. Для визначення цього параметру досліджували у 10 повторностях зразки токсичного й нетоксичного кормів відповідно з використанням фотобактерій та інфузорій.

Визначення параметру *відносна точність*, який характеризує ступінь відповідності між результатом, отриманим стандартним методом, та результатом, отриманим альтернативним методом, встановлювали шляхом дослідження 10 ідентичних токсичних і нетоксичних зразків кормів для тварин.

Визначення *стабільності люмінесценції* під час зберігання/культивування визначали шляхом дослідження/вимірювання інтенсивності світіння в залежності від часу початку культивування (12 – 48) год та температури (18,0 – 30,0 ± 0,8) °С.

Контроль внутрішньолабораторної відтворюваності здійснювали шляхом повторних досліджень впливу слаботоксичних кормів на люмінесценцію за різних умов, які відповідали вищезазначеним під час визначення параметру стабільність люмінесценції.

Для вивчення параметру *лінійність* досліджували вплив на люмінесценцію проб кормів із різним рівнем токсиканту за однакових умов.

Параметр *збіжність* характеризує точність методики при її виконанні в одних і тих самих умовах протягом невеликого періоду. Для її визначення досліджували у 10 повторностях вплив на люмінесценцію проб кормів із однаковим вмістом токсиканту.

З метою встановлення *межі детектування* та *межі визначення* методу визначено найменшу кількість токсиканту у кормі (за умов штучного внесення), вплив якого на люмінесценцію фотобактерій можна детектувати на приладі та за допомогою саме цього методу.

Для виконання задачі з вивчення впливу різних рівнів пріоритетних токсикантів кормів у якості забруднювачів кормів були використані пестициди, мікотоксини та неорганічні елементи, які регламентовані Переліком максимально допустимих рівнів небажаних речовин у кормах та кормовій сировині для тварин [18].

За умов дослідження пестицидів у якості «матриці» було використано комбікорм, мікотоксинів та неорганічних елементів – кукурудзяну крупу, що не

володіли токсичними властивостями; у якості тест-культури – культуру *Ph. phosphoreum* (штам ІМВ В-7071; Sq3).

Пестициди використовували у формі державних стандартних зразків (ДСЗ) виробництва Державного підприємства «Спеціальне конструкторсько-технологічне бюро з дослідним виробництвом Фізико-хімічного інституту ім. О. В. Богатського Національної академії наук України», м. Одеса та комерційних препаратів різних груп, зареєстрованих за останні 5 років і дозволених до використання на території України відповідно, а саме гептахлор, дихлордифеніл трихлорметилметан, гексахлорциклогексан (α , β , γ) та Сотеїра, Карбендазол, Велес, Вирій, Грінфорт преміум, Грінфорт хорс, Скат, Агрошит супер, Грінфорт екстра, Астанес ацетохлор, Астралід, Грінфорт НК 40.

Мікотоксини використовували у формі СЗ, а саме: Т2-токсин (Sigma-Aldrich, 33947), зеараленон (Sigma-Aldrich, CRM46916), дезоксиніваленол (Sigma-Aldrich, CRM46911), охратоксин А (Sigma-Aldrich, CRM46912), фумонізін (Sigma-Aldrich, 32606) та афлатоксин В₁ (Sigma-Aldrich, CRM44647).

Неорганічні елементи використовували у формі ДСЗ, а саме: Арсен, кадмій, плюмбум, меркурій, ферум, кобальт, купрум, манган, цинк, селен, нікель, хром і бром. Перед внесенням неорганічних елементів у корм попередньо досліджували «матрицю» на їх вміст. Токсиканти вносили в «матрицю» у різних концентраціях (по 4-5 серій) з урахуванням «фону», що готували шляхом розведення в гексані (пестициди), етанолі (мікотоксини) та дистильованій воді (неорганічні елементи), залежно від максимально допустимого рівня (МДР). Матрицю перед початком експериментів досліджували на загальну токсичність згідно з [6]. Відповідно токсичних властивостей «матриці» не було виявлено.

Таким чином, було досліджено вплив наступних токсикантів у відповідних кількості в мг/кг корму (табл. 2.1).

Для отримання більш вірогідних даних дослідження були проведені у 6-ти повторностях. Отримані результати обробляли методами варіаційної статистики з використанням пакета програм дисперсійного аналізу (ANOVA)

StatPlus 5(6.7.0.3) (AnalystSoft Inc., США). Вірогідність отриманих результатів оцінювали за критерієм Фішера за рівня вірогідності 95,0 % ($p < 0,05$).

Таблиця 2.1

Токсиканти, які підлягали дослідженню відносно інтенсивності світіння люмінесцентних бактерій

Назва забруднювача (діючі речовини)	Досліджувані рівні (дозы), мг/кг корму	МДР, мг/кг корму
1	2	3
Гептахлор (ГХ)	0,0025; 0,01; 0,05 і 2,0	0,01*
Дихлордифеніл трихлорметилметан (ДДТ)	0,01; 0,05; 0,1 і 1,0	0,05*
Гексахлорциклогексан (ГХЦГ):		
α -ізомер	0,002; 0,02; 0,2 і 2,0	0,02*
β -ізомер	0,001; 0,01; 0,1 і 1,0	0,01*
γ -ізомер	0,05; 0,20; 1,0 і 2,0	0,20*
Гербициди:		
Сотейра (імазамокс+імазапір)	0,01; 0,025; 0,05; 0,1 і 0,25	0,05*** (імазамокс)
Грінфорт преміум (2,4-Д 2- етилгексилловий ефір+флорасулам)	0,01; 0,025; 0,05; 0,1 і 0,25	0,05*** (флорасулам)
Грінфорт хорс (хізалофоп-п-етил)	0,008; 0,02; 0,04; 0,08 і 2,0	0,04***
Скат (хізалофоп-п-тефурил)	0,008; 0,02; 0,04; 0,08 і 2,0	0,04***
Агроцит супер (калійна сіль гліфосату)	0,1; 0,5; 1,0; 2,5 і 5,0	1,00***
Грінфорт екстра (метолахлор+ тербутилазин)	0,02; 0,05; 0,1; 0,2 і 0,5	0,1 *** (метолахлор)
Астанес (ацетохлор)	0,006; 0,015; 0,03; 0,06 і 0,15	0,03***
Астралід (клопіралід)	0,4; 1,0; 2,0; 4,0 і 10,0	2,00***
Грінфорт НК 40 (нікосульфурон)	0,04; 0,1; 0,2; 0,4 і 1,0	0,20***
Фунгіциди:		
Карбендазол (карбендазим+ципроконазол)	0,01; 0,025; 0,05; 0,1 і 0,25	0,05 (ципроконазол)
Інсектициди		
Велес (тіаклоприд+дельтаметрин)	0,004; 0,01; 0,02; 0,04 і 0,1	0,02 (тіаклоприд)
Вирій (тіаклоприд)	0,004; 0,01; 0,02; 0,04 і 0,1	0,02 (тіаклоприд)

<i>Кінець таблиці 2.1</i>		
1	2	3
Мікотоксини		
Т ₂ -токсин	0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0	0,1*
Зеараленон	0,1; 0,02; 1,0; 5,0; 10,0	1,0*
Дезоксиніваленол (ДОН)	0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0	1,0*
Охратоксин А	0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5	0,05*
Фумонізин	0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0	5,0*
Афлатоксин В ₁	0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1	0,01*
Неорганічні елементи		
Арсен	0,05; 0,1; 0,5; 2,5; 5,0	0,5*
Кадмій	0,04; 0,08; 0,4; 2,00; 4,0	0,4*
Плюмбум	0,5; 1,0; 5,0; 25,0; 50,0	5,0*
Меркурій	0,01; 0,02; 0,1; 0,5; 1,0	0,1*
Ферум	75,0; 150,0; 750,0; 3750,0; 7500,0	750,0*
Кобальт	0,2; 0,4; 2,0; 10,0; 20,0	2,0*
Купрум	2,5; 5,0; 25,0; 125,0; 250,0	25,0*
Манган	12,0; 24,0; 120,0; 600,0; 1200,0	120,0*
Цинк	12,0; 24,0; 120,0; 600,0; 1200,0	120,0*
Селен	0,05; 0,1; 0,5; 2,5; 5,0	0,50*
Нікель	0,3; 0,6; 3,0; 15,0; 30,0	3,0**
Хром	0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0	1,0**
Бром	1,0; 5,0; 10,0; 50,0; 100,0	10,0****
Примітки: * – відповідно до [18], ** – згідно з [188], *** – відповідно до [189, 190], **** – згідно з [191]		

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Удосконалення системи культивування та розроблення поживного середовища для біоломінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum*

За удосконалення системи культивування фотолюмінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum* під час проведення досліджень використано музейну ліофілізовану тест-культуру люмінесцентних бактерій *Ph. phosphoreum* (IMB B-7071; Sq₃). У процесі роботи відпрацьовано декілька температурних режимів в діапазоні від $(24,0 \pm 0,8)^\circ\text{C}$ до $(31,0 \pm 0,8)^\circ\text{C}$ та експозицій, які залежали від достатнього накопичення біомаси фотобактерій та прояву світіння, що оцінювалось візуально.

Як показав дослід за температури у межах $(24,0 \pm 0,8)^\circ\text{C}$ достатнє накопичення біомаси та візуально помітне світіння клітин відбувалися лише через 48 год; за температури $(26,0 \pm 0,8)^\circ\text{C}$ – через (20 – 24) год; проте підвищення температури вище, ніж $(28,0 \pm 0,8)^\circ\text{C}$ давало інтенсивний розвиток накопичення бактеріальної маси без візуально помітного світіння.

Отже, на підставі цього встановлені оптимальні параметри культивування *Ph. phosphoreum*: температура $(26,0 \pm 0,8)^\circ\text{C}$ та експозиція культивування – (20 – 24) год.

У подальшому було відпрацьовано культивування на відомих поживних середовищах для вирощування бактерій *Photobacterium* spp., які містять наступні компоненти: NaCl (натрію хлорид), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (натрій фосфорнокислий двозаміщений дванадцятиводний), KH_2PO_4 (калій фосфорнокислий однозаміщений), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (амоній фосфорнокислий), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (магній сірчано-кислий семиводний), гліцерин, бактопептон, амінокислоти, гідролізати (табл. 3.1). Однак, ці середовища не забезпечували достатньо високий рівень світіння бактерій цього штаму та швидкість їх росту.

Аналіз відомих поживних середовищ для культивування фотобактерій,

Таблиця 3.1

Склад відомих та розробленого поживних середовищ для культивування *Ph. phosphoreum* (в дужках вказаний кількісний вміст компонентів, мг/дм³)

Середовище для <i>Ph. mandarumensis</i> [153] (1)	Напівсинтетичне середовище для бактерій роду <i>Photobacterium</i> [154] (2)	Середовище Єгорова Н.С. зі співавт. для фотобактерій [155] (3)	Живильне середовище для бактерій <i>Vibrio fischeri</i> та <i>Ph. phosphoreum</i> [156] (4)	Розроблене поживне середовище для культивування фотолюмінесцентних мікроорганізмів <i>Ph. phosphoreum</i> (5)
NaCl (30,0)	NaCl (30,0)	NaCl (30,0)	NaCl (29,0 - 31,0)	NaCl (25,0-27,0)
Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O (6,0)	Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O (10,0)	-	Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O (4,0 - 6,0)	-
KH ₂ PO ₄ (1,0)	KH ₂ PO ₄ (1,0)	KH ₂ PO ₄ (1,0)	KH ₂ PO ₄ 10,0 – (20,0)	K ₂ HPO ₄ (14,0-16,0)
(NH ₄) ₂ HPO ₄ (0,5)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (0,5)	-	-	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (0,4-0,6)
MgSO ₄ •7H ₂ O (0,2)	MgSO ₄ •7H ₂ O (0,2)	MgSO ₄ •7H ₂ O (0,5)	-	MgSO ₄ •7H ₂ O (0,1-0,2)
-	Гліцерин (3,0)	-	Гліцерин (2,0 – 4,0)	Гліцерин (2,0 – 4,0)
Пептон (5,0)	Пептон (5,0 - 10,0)	Пептон (10,0)		Пептон (4,0-6,0)
-	-	-	екстракт дріжджів (40,0 – 60,0)	екстракт дріжджів (сухий) (4,0-6,0)
Глюкоза (1,0)	C ₆ H ₇ O ₇ Na (0,65)	аспарагін (0,5) + рибна витяжка (0,5)	панкреатичний гідролізат кільки (150,0 – 250,0)	Крейда (0,1-0,3)
Вода дистильована (до 1,0 дм ³)			-	Вода дистильована (до 1,0 дм ³)

Примітка. «-» - компонент не використовується при приготуванні.

Ph. phosphoreum показав, що солі натрію фосфорнокислого двозаміщеного калію фосфорнокислого однозаміщеного, амонію фосфорнокислого двозаміщеного, магнію сірчаноокислого семиводного використовують і в інших відомих середовищах, однак використання їх в цих середовищах разом з іншими компонентами не забезпечувало тих властивостей, які вони виявляють в запропонованому рішенні, а саме поліпшення ростових властивостей поживного середовища при виключенні із середовища компонента натрію фосфорнокислого двозаміщеного.

Таким чином, розроблене поживне середовище для культивування фотолюмінесцентних мікрорганізмів *Ph. phosphoreum* шляхом вилучення натрію фосфорнокислого двозаміщеного, панкреатичного гідролізату кільки; заміни калію фосфорнокислого однозаміщеного калієм фосфорнокислим двозаміщеним та введенням до його складу нових компонентів, а саме: пептону, амонію фосфорнокислого двозаміщеного, магнію сірчаноокислого семиводного, крейди та води дистильованої, що забезпечує більше накопичення бактеріальної маси, належні ростові якості бактерій і їх світіння (рис. 1, табл. 3.2).

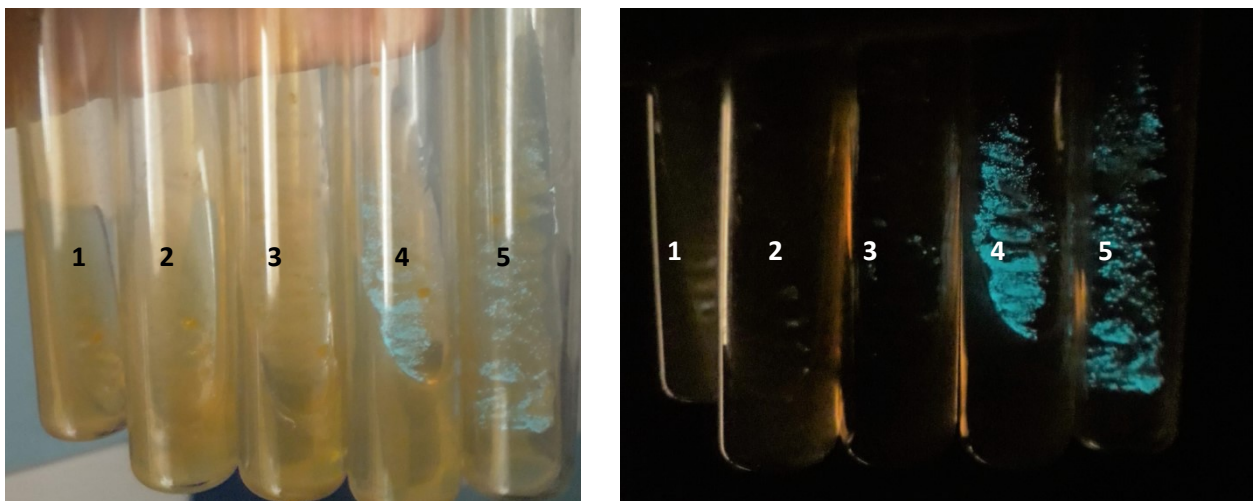


Рис. 3.1. Інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* у залежності від поживного середовища (1-5 відповідно табл. 3.1)

З матеріалів таблиці 3.2 видно, що за умов культивування *Ph. phosphoreum* на запропонованому поживному середовищі накопичення бактеріальної маси клітин становило від 2,4 млрд/см³ до 2,7 млрд/см³, а світіння фіксували на рівні від 27,6 ум. од. до 34,2 ум. од. відповідно.

Тоді як при вирощуванні цієї культури фотобактерій на класичному середовищі для бактерій *V. fischeri* та *Ph. phosphoreum* кількість бактеріальної маси клітин становила 1,1 млрд/см³, а інтенсивність світіння – 16,7 ум. од.

Таблиця 3.2

Рівень накопичення біомаси клітин *Ph. phosphoreum* за умов культивування на експериментальному середовищі у порівнянні з класичним (контроль)

Культура клітин	Класичне середовище (контроль)		Експериментальне середовище	
	накопичення бакмаси, млрд/см ³	світіння, ум.од.	накопичення бакмаси, млрд/см ³	світіння, ум.од.
<i>Ph. phosphoreum</i>	1,1	16,7	2,4 – 2,7	27,6 – 34,2

Аналіз отриманих даних засвідчив, що експериментальне середовище, яке пропонується, при оптимальному вмісті компонентів, забезпечує кращі умови для накопичення біомаси та світіння бактеріальних клітин *Ph. phosphoreum* у порівнянні з прототипом (класичне середовище для бактерій *V. fischeri* та *Ph. phosphoreum*).

Отже, за результатами проведеної роботи розроблено Поживне середовище для культивування фотолюмінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum* та отримано патент України на корисну модель № 143070 МПК (51) С12N 1/20 (заявл. 21.01.2020 – у 2020 00341; опубл. 10.07.2020).

Встановлено, що за використання 3 % розчину натрію хлориду і 5 % розчину сахарози у співвідношенні 1:1, у якості захисного середовища для

ліофілізації, світіння відновлюється на 2-4 год після розчинення ліофілізату і досягає максимального значення на 24-26 год. Відновлення культури після ліофілізації відбувалося у разі використання охолоджених до $(4\pm 0,3)$ °С розчинів 3 % натрію хлориду і солей за складом наближених до морської води з рН 6,4-6,9 і послідуною витримкою 30 хв у холодильнику і 60 хв за температури $(15,0-20,0\pm 0,6)$ °С.

Отже, визначено оптимальні параметри передліофілізаційної підготовки та відновлення культури *Ph. phosphoreum* для використання під час еко-токсикологічних досліджень, що забезпечать надійний захист бактеріальних клітин у процесі ліофілізації, а після відновлення – збереження належного рівня інтенсивності світіння, накопичення та життєздатності мікробних клітин.

Результати підрозділу опубліковані в роботах [192-195].

3.2 Розроблення та проведення валідації експрес-методики визначення загальної токсичності кормів з використанням біолюмінесцентних мікроорганізмів

3.2.1 Розроблення експрес-методики визначення загальної токсичності кормів з використанням біолюмінесцентних мікроорганізмів.

На першому етапі розробки методики оцінювали її можливість надавати адекватну оцінку у разі дії токсикантів. Так, було досліджено вплив етанольних розчинів мікотоксину зеараленону: 0,05; 0,075, 0,125, 0,175, 0,25, 0,5 і 0,75 мкг/мл на інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum*. Установлено, що інтенсивність світіння не змінювалася при дії 0,05 і 0,075 мкг/мл, тоді як застосування доз, починаючи з 0,125 мг/кг викликали дозозалежне зниження світіння, що вказувало на можливість методики виявляти токсичні концентрації. Слід зазначити, що більшість токсичних речовин, які можуть потрапляти в корми, мають органічне походження, тому у якості екстрагенту був обраний саме етанол.

На наступному етапі відпрацьовували пробопідготовку кормів до дослідження. У якості моделі використовували зерноsumіш ячмінь-пшениця

50:50), в яку вносили зеараленон у кількості 1,0 мг/кг (показник МДР для рослинної сировини).

Для встановлення оптимальної кількості наважки матеріалу для досліджень формували дві серії проб масою 5,0; 10,0; 15,0 і 20,0 г: перша (контроль) – без внесення зеараленону, друга (дослід) – з внесенням, для екстракції використовували 96°етанол у кількості 20,0 см³. У результаті досліджень було встановлено, що у першій серії зразків інтенсивність люмінесценції всіх чотирьох проб вірогідно не відрізнялася між собою і в середньому була на рівні $2,40 \pm 0,03$ фот/с, тоді як у другій серії за наважки 5,0 г спостерігали пригнічення світіння до $1,90 \pm 0,11$ фот/с, а за наважки 10,0-20,0 г інтенсивність світіння знижувалася до $1,48 \pm 0,07$; $1,48 \pm 0,05$ і $1,47 \pm 0,04$ фот/с. Отримані дані, свідчать про те, що наважки в 5,0 г не достатньо для адекватного виявлення токсиканта в кормі, а наважка 10,0 г є оптимальною для подальших досліджень.

Для встановлення оптимальної кількості екстрагенту (етанолу) також було сформовано дві серії проб: перша (контроль) – до наважки корму масою 10,0 г без внесення зеараленону додавали 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 та 70,0 см³ етанолу і друга (дослід) – до наважки корму масою 10,0 г з внесенням зеараленону додавали аналогічні кількості етанолу. Менший об'єм етанолу не брали в роботу, оскільки його було не достатньо для проведення екстракції. Проби екстрагували енергійним зтрушуванням протягом (15-20) хв з подальшим центрифугуванням за (1,5-2) тис. об./хв. протягом 10 хв. У результаті досліджень установлено (рис. 3.2), за об'єму етанолу 20,0-70,0 см³ не встановлено вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* у першій серії проб (без внесення токсиканту). Тоді як у другій серії проб (з внесенням зеараленону) за об'єму етанолу 20,0-50,0 см³ не встановлено вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а при екстрагуванні 70,0 см³ етанолу інтенсивність світіння вірогідно підвищувалася на 9,4 % відносно 20,0 см³, що свідчить про сильне розбавлення проби. Отже,

оптимальним об'ємом для екстрагування зеараленону з корму є 20,0-50,0 см³ (рис. 3.2).

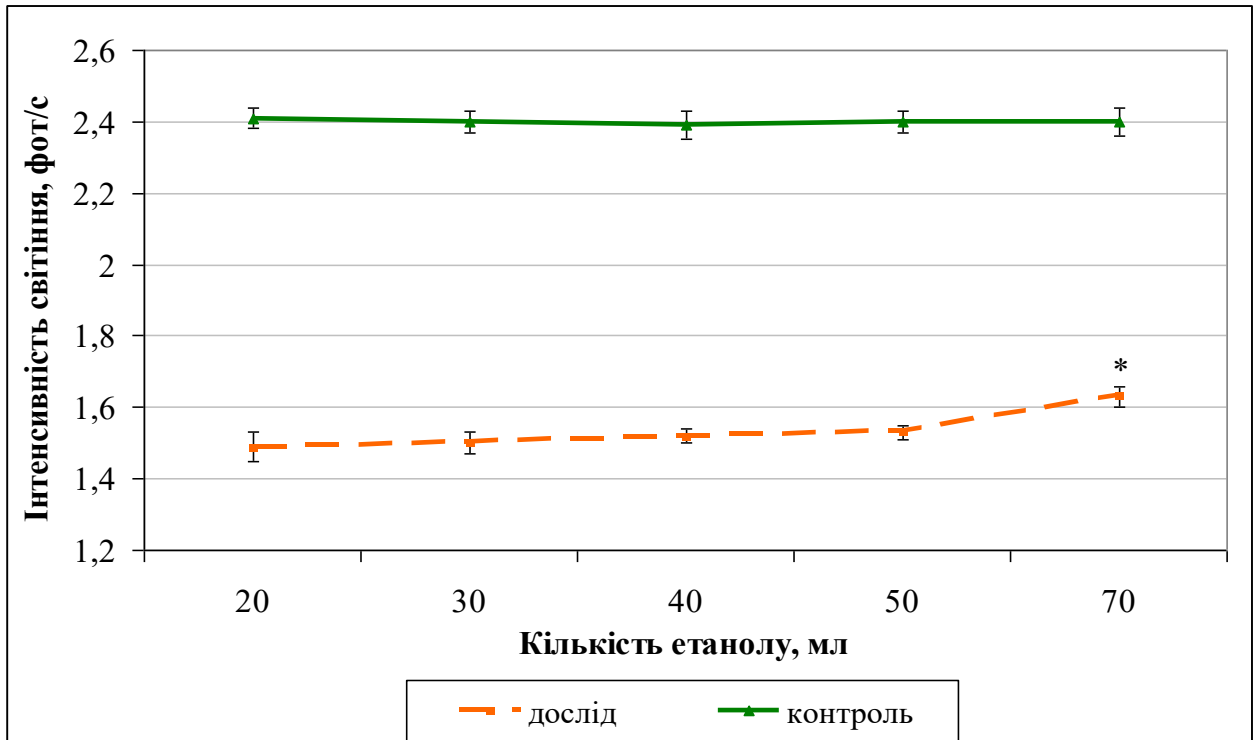


Рис. 3.2. Залежність інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* від об'єму екстрагента (етанолу) ($M \pm m$, $n=10$), * – $p < 0,05$ – відносно 20,0 см³.

Оптимальну експозицію для визначення токсичності корму вираховували наступним чином. До наважок корму масою 10,0 г з внесенням зеараленону (дослід) і без внесення (контроль) додавали 20,0 см³ етанолу і досліджували інтенсивність світіння через одну, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 і 60 хв. У результаті дослідження встановлено підвищення інтенсивності світіння в обох серіях проб з першої по 10 хв досліді, потім у дослідній серії спостерігали поступове зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, яке стабілізувалося, починаючи з 20 хв експерименту і було стабільним до 30-ої хвилини досліді. Починаючи з 30 хв інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* поступово знижувалася до 60 хв експерименту. Слід зазначити, що поступове зниження інтенсивності світіння спостерігали і в контрольній серії проб, починаючи з 25 хв досліді. Результати дослідження наведені на рис. 3.3.

На основі отриманих даних можна зробити висновок про те, що оптимальною експозицією для фіксування результату визначення загальної токсичності корму є 20-25 хв після внесення екстракту проби до культуральної рідини.

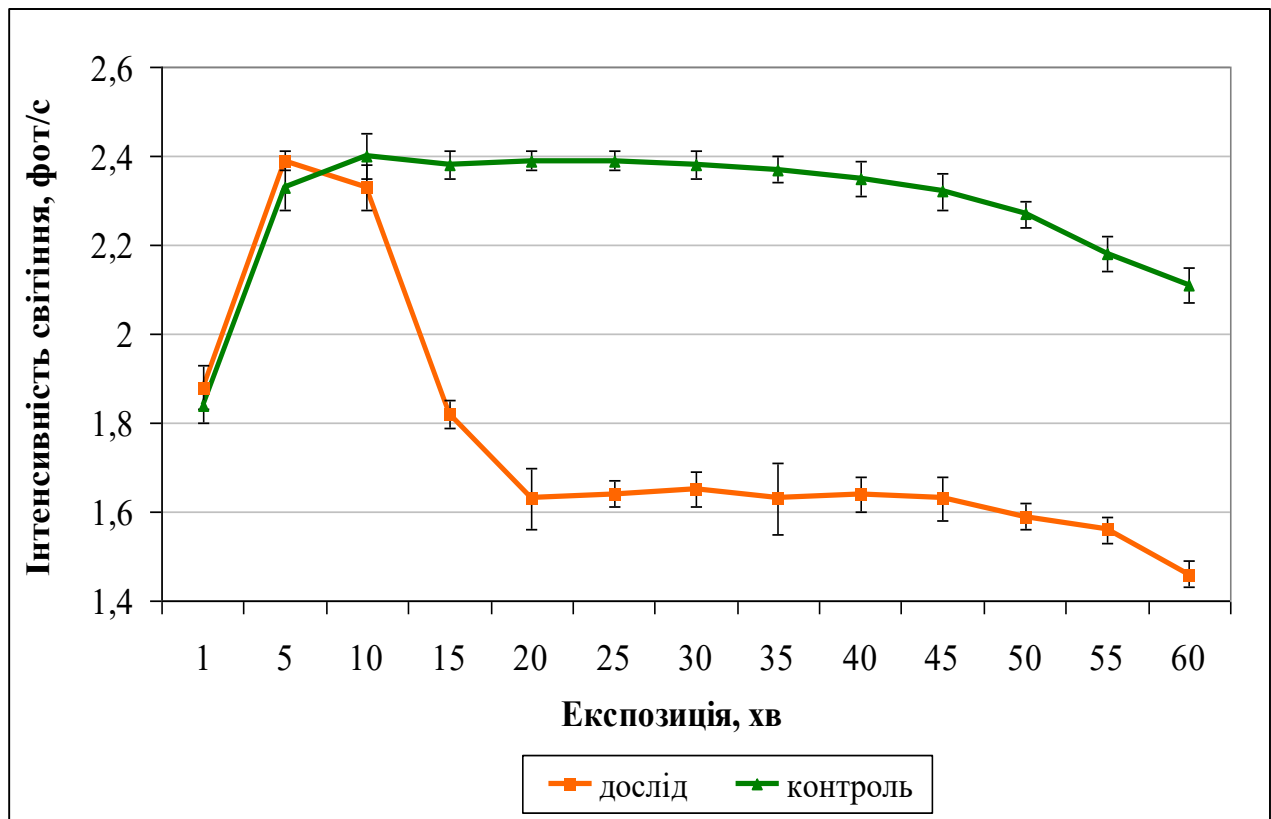


Рисунок 3.3. Залежність інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* від експозиції після внесення екстракту досліджуваної проби в культуру ($M \pm m$, $n=10$).

Об'єм культуральної рідини обмежений об'ємом кювети люменометра (max $1,2 \text{ см}^3$), тому для досліджень брали $1,0 \text{ см}^3$ культуральної рідини та $0,02 \text{ см}^3$ екстракту.

Однак зміни інтенсивності біоломінесценції можуть відбуватися під впливом різних зовнішніх факторів, тому для встановлення критерію токсичної дії необхідно встановлювати зміну інтенсивності світіння тест-об'єкту в пробі, що досліджується, у порівнянні з такою ж для проби з розчином, що не містить

токсичних речовин або еталонною пробою. Зменшення інтенсивності світіння пропорційно токсичному ефекту.

Кількісна оцінка показників тест-реакції передається у вигляді безрозмірної величини – індексу токсичності «Т», що дорівнює співвідношенню (формула 3.1)

$$T = \frac{I_0 - I}{I_0} \times 100, \text{ де} \quad (3.1)$$

де I_0 та I відповідно інтенсивність світіння контролю й досліді при фіксованому часі експозиції зразку, що досліджується, з тест-об'єктом.

Крім того, на основі даних з інгібування люмінесценції визначають коефіцієнт пригнічення (γ), який розраховують наступним чином (формула 3.2):

$$\gamma = \frac{I_0 - I}{I}, \text{ де} \quad (3.2)$$

де I_0 та I відповідно інтенсивність світіння контролю й досліді; тобто γ відображає залежність відношення втрати інтенсивності світіння проби до інтенсивності світіння, що залишилася.

Коефіцієнт γ зручний для визначення величин EC_{20} та EC_{50} – токсикологічних характеристик – шляхом екстраполяції графічної залежності, коли токсичність зразку дуже невелика або, навпаки, коли зразок дуже токсичний. Графік коефіцієнту γ в логарифмічних координатах проти різних концентрацій окремої речовини (або об'ємів зразку) – теоретична пряма реакції токсичної речовини з однією або декількома мішенями, що пов'язують ці токсиканти в тест-об'єкті.

Визначення токсикологічних параметрів проби необхідні для виявлення при яких концентраціях, у випадку окремої речовини (або яких об'ємах) вихідного слабо токсичного зразку досягається встановлена межа токсичності (EC_{20} та/або EC_{50}) та при яких розведеннях сильно токсичний зразок буде безпечним (величина менша EC_{20}).

EC_{50} – ефективна концентрація (об’єм зразку), що викликає пригнічення світіння фотобактерій на 50 % у порівнянні з контролем, отже зразок сильно токсичний. EC_{50} відповідає $\gamma = 1$. EC_{20} – відповідно, ефективна концентрація (об’єм зразку), що викликає гасіння світіння біосенсору на 20 % у порівнянні з контролем, отже зразок токсичний. Величини менші EC_{20} свідчать про те, що зразок безпечний.

Методика допускає три граничних рівня індексу токсичності (таблиця 3.3).

Таблиця 3.3

Класифікація токсичності речовини за величиною Т

Рівні	Значення Т	Висновок про ступінь токсичності
1	менше 20	граничний ступінь токсичності
2	від 20 до 50	зразок токсичний
3	дорівнює або більше 50	зразок сильно токсичний

Таким чином, експрес-методика визначення загальної токсичності кормів з використанням біолоюмінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum* виконується за наступним алгоритмом: наважку корму вагою 10,0 г подрібнюють, переносять до скляного флакону заливають 96° етанолом об’ємом 20 см³ (цей об’єм може бути доведений до 50 см³, щоб спирт повністю покрив зразок) та екстрагують при енергійному струшуванні (15-20) хв, потім центрифугують при (1,5-2,0) тис. об./хв. 10 хв, після чого відбирають надосадову рідину і досліджують на люмінометрі EMILITE – 1003 А. Під час тестування до культуральної рідини в об’ємі 1,0 см³ вносять 0,02 см³ екстракту, відмічають час експозиції та реєструють зміни інтенсивності люмінесценції на приладі через (20-25) хв. За тих же умов в якості контролю додають 96° етиловий спирт. Вимірювання проводять послідовно або парами контроль-дослід, або одразу всі повторності контрольних проб, а потім дослідних. Для

отримання більш достовірних значень рекомендуємо досліджувати не менше, ніж 4 повторності проб (кількість повторностей може бути збільшена до 10).

3.2.2 Установлення валідаційних параметрів експрес-методики визначення загальної токсичності кормів з використанням біоломінесцентних мікроорганізмів. З метою вирішення поставленої задачі досліджено валідаційний параметр *відносна специфічність*, який характеризує відповідну методику за однозначним визначенням токсичності кормів, як альтернативним, так і стандартним методом, шляхом дослідження у 10 повторностях зразків токсичного й нетоксичного кормів відповідно з використанням фотобактерій та інфузорій. Установлено, що тестування нетоксичних і токсичних зразків корму в 10-ти повтореннях як за стандартною, так і розробленою (альтернативною) методиками давали негативний результат при визначенні токсичності корму без внесення токсиканту і позитивний – при тестуванні токсичного (з внесенням токсиканту) корму, тобто розроблена методика є специфічною. Результати роботи наведені в протоколі валідації (додаток Д).

Проведено визначення параметру *відносна точність*, який характеризує ступінь відповідності між результатом, отриманим стандартним методом, та результатом, отриманим альтернативним методом, який встановили шляхом дослідження 10 ідентичних токсичних і нетоксичних зразків корму. Установлено, що при порівнянні нового методу з розробленим довірчий інтервал містив 0: для нетоксичного зразку від 1,6704 до мінус 0,5904; для токсичного – від мінус 1,7067 до мінус 10,4933, що свідчить про точність розробленої методики. Результати роботи наведені в протоколі валідації (додаток Д).

Визначення *стабільності люмінесценції* під час зберігання/культивування визначали шляхом вимірювання інтенсивності світіння в залежності від умов та термінів зберігання, часу початку культивування (12 – 48) год та температури (18,0 – 30,0) °С.

Установлено, що під час зберігання *Ph. phosphoreum* за температури $(4\pm 0,3)^\circ\text{C}$ зі щомісячним пересівом інтенсивність світіння була стабільною протягом 7-ми місяців (про що свідчить вірогідне зниження інтенсивності люмінесценції на 8-й місяць досліджень у 1,3 рази відносно початку експерименту).

Тоді як за температури зберігання $(26\pm 0,8)^\circ\text{C}$ з щотижневим пересівом інтенсивність світіння була стабільною лише 3 місяці, про що свідчило вірогідне зниження інтенсивності люмінесценції, починаючи з 4-го місяця досліджень: на 2,1; 2,1; 2,5; 5,9 і 38,7 % на 4-й, 5-й, 6-й, 7-й і 8-й місяці досліджень відповідно (рис. 3.4.). Результати роботи також наведені в протоколі валідації (додаток Д).

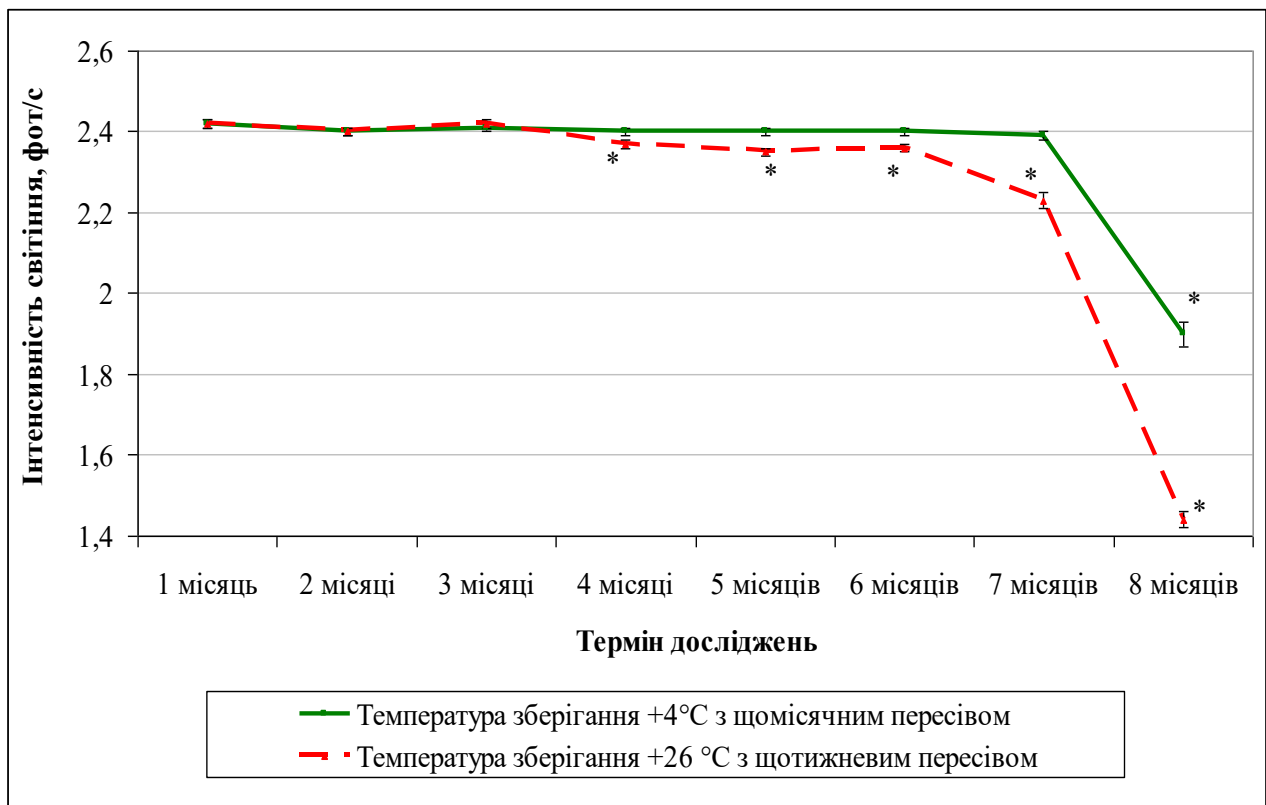


Рисунок 3.4. Залежність інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* від умов зберігання ($M\pm m$, $n=10$), * – $p < 0,05$ – відносно початку експерименту.

Під час культивування *Ph. phosphoreum* за температури $(18\pm 0,6)^\circ\text{C}$ максимальну інтенсивність світіння встановлено на 24 годину, що у 1,3 рази

вірогідно перевищувало показник 12-ти годинного культивування, на 36 і 48 годину культивування інтенсивність світіння знижувалася в 1,2 і 5,7 рази відповідно ($p < 0,001$) (рис. 3.5).

За температури культивування ($26 \pm 0,8$) °C спостерігали аналогічну динаміку інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*: вірогідне перевищення показника 12-ти годинного культивування становило 1,2 рази через 24 год культивування, а потім знижувалося в 1,2 і 6,3 відповідно на 36 і 48 год. Проте інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* в цій серії була вищою ($p < 0,001$) відносно серії культивування за ($18 \pm 0,6$) °C, про що свідчить підвищення показника в 1,3; 1,2 і 1,3 рази відповідно на 12; 24 і 36 год культивування, а на 48 год перевищення було не вірогідним (рис. 3.5).

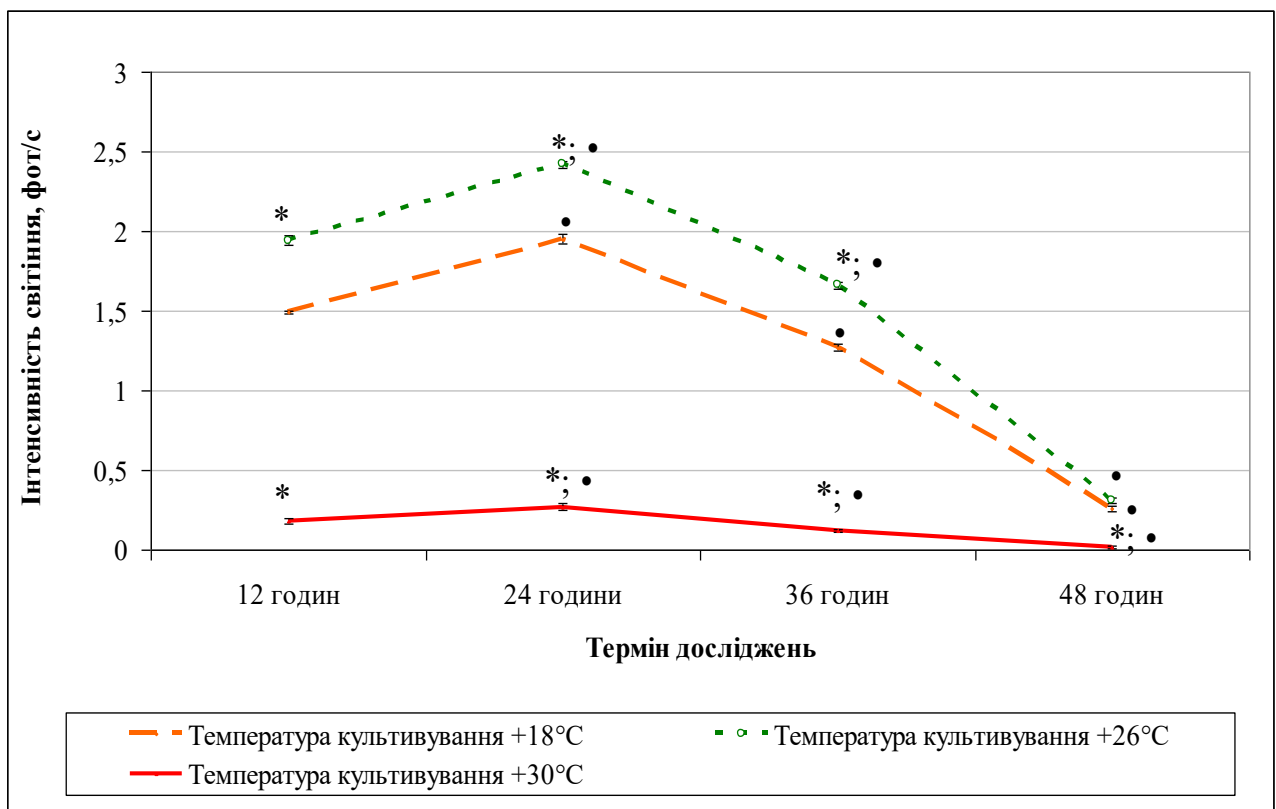


Рисунок 3.5. Залежність інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* від умов культивування ($M \pm m$, $n=10$), * – $p < 0,05$ – відносно температури культивування 18,0 °C; • – $p < 0,05$ – відносно 12 год.

За температури культивування ($30,0 \pm 0,8$) °C інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* була дуже низькою, про що свідчило вірогідне зниження

показників відносно серії культивування за $(18,0 \pm 0,8)^\circ\text{C}$ відносно початку досліду на всіх термінах досліджень у 8,3; 7,2; 10,6 і 13,0 рази, Хоча динаміка світіння не відрізнялася від досліджуваних серій за $(18,0$ і $26,0)^\circ\text{C}$: вірогідне перевищення на 24 годину (1,5 рази), а потім зниження в 1,5 рази на 36 і 9 разів на 48 годину (рис. 3.5).

Отже, оптимальні умови та термін зберігання для *Ph. phosphoreum*: у пробірках на щільному поживному середовищі за температури $(4 \pm 0,3)^\circ\text{C}$ зі щомісячним пересівом протягом 7-ми місяців, а оптимальні умови та термін культивування перед дослідженням: у пробірках на рідкому поживному середовищі за температури $(26 \pm 0,8)^\circ\text{C}$ через 24 години після висіву. Результати роботи також наведені в протоколі валідації (додаток Д).

Контроль внутрішньолабораторної відтворюваності здійснювали шляхом повторних досліджень впливу слаботоксичних кормів на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* за різних умов: різні оператори, режими екстракції проб та температура культивування. Під час досліджень не встановлено вірогідних відхилень між показниками світіння усіх 3-х серій досліджень, а стандартне відхилення різниць між серіями становить 0,035. (додаток Д).

Для вивчення параметру *лінійність* досліджували вплив на люмінесценцію проб кормів із різним рівнем токсиканту за однакових умов. Оскільки, при валідації біологічних методів не завжди можна встановити чіткі показники лінійності через нестандартність фактору відгуку (ISO 16140:2003), то оцінку лінійності проводили за залежністю інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* від концентрації зеараленону в 1 см^3 досліджуваної проби. Установлено, що концентрації мікотоксину $0,05$ і $0,075\text{ мкг/см}^3$ не призводили до пригнічення люмінесценції, що свідчить про відсутність токсичної дії, тоді як концентрації зеараленону $0,125$; $0,175$; $0,25$ і $0,5$ викликали вірогідне зниження інтенсивності світіння на $10,3$; $19,3$, $25,9$ і $37,4\%$ відповідно відносно концентрації $0,05\text{ мкг/см}^3$. Результати роботи наведені на рисунку 3.6 і в протоколі валідації (додаток Д).

Методика є лінійною в діапазоні концентрацій зеараленону (0,075-0,5 мкг/см³), оскільки RSD відгуку приладу становить 17,48 %, що не перевищує норму (20 %) (додаток Д).

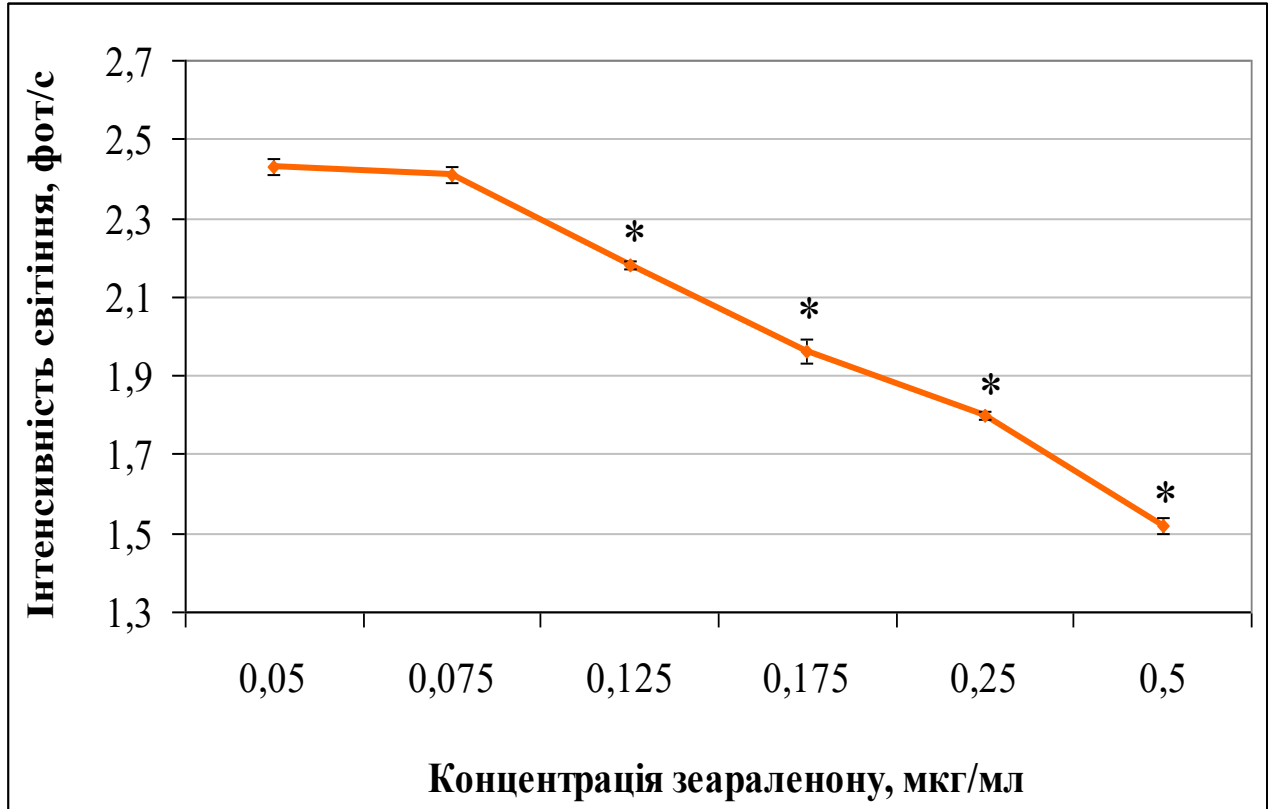


Рисунок 3.6. Залежність інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* від концентрації зеараленону в пробі (лінійність методики) ($M \pm m$, $n=6$), * – $p < 0,05$ – відносно концентрації 0,05 мкг/см³.

Параметр *збіжність* з одного боку характеризує точність методики при її виконанні в одних і тих самих умовах, а з іншого – відображає здатність аналітика в тих самих умовах надавати повторювані результати з незначним статистичним відхиленням. Для її визначення досліджували у 10 повторностях вплив на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* проб кормів із однаковим вмістом токсиканту та без нього. В результаті чого встановлено показник RSD: для нетоксичного корму він становив 2,09 %, а для токсичного – 1,66 %, що входить в межу норми (не більше 5 %). Результати роботи також наведені в протоколі валідації (додаток Д).

З метою встановлення *межі детектування* та *межі визначення* методу визначили найменшу кількість токсиканту у кормі (за умов штучного введення), вплив якого на люмінесценцію фотобактерій можна детектувати на приладі та за допомогою саме цього методу. За результатами досліджень межа детектування склала $0,125 \text{ мкг/см}^3$, а межа визначення $0,25 \text{ мг/кг}$ корму. (додаток Д).

Результати підрозділу опубліковані в роботах [196-200].

3.3 Вивчення впливу різних рівнів пестицидів різних класів у кормах на люмінесценцію біоломінесцентних мікроорганізмів та їх токсикологічна характеристика

3.3.1 Дослідження впливу різних рівнів пріоритетних пестицидів у кормах на люмінесценцію біоломінесцентних мікроорганізмів та їх токсикологічна характеристика. Пріоритетними, на нашу думку, є пестициди, які регулюються основним нормативним документом відносно МДР в Україні «Переліком максимально допустимих рівнів небажаних речовин у кормах та кормовій сировині для тварин» це гептахлор, дихлордифеніл трихлорметилметан, гексахлорциклогексан (α -, β - і γ -ізомери).

Вплив гептахлору на люмінесценцію в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.7. Так, за умов внесення гептахлору в усіх досліджуваних дозах на 5 хв експерименту спостерігали пригнічення світіння: за $0,0025 \text{ мг/кг}$ корму зниження інтенсивності світіння не мало вірогідних відхилень від контролю і становило 9,9 %, за $0,01 \text{ мг/кг}$ – 36,5 % ($p < 0,05$), за $0,05 \text{ мг/кг}$ – 42,3 % ($p < 0,05$) і за вмісту гептахлору в кормі $2,0 \text{ мг/кг}$ – 63,2 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На 10 хв досліді спостерігали аналогічну картину: за $0,0025 \text{ мг/кг}$ корму зниження інтенсивності світіння становило 10,1 %, за $0,01 \text{ мг/кг}$ – 22,3 % ($p < 0,05$), за $0,05 \text{ мг/кг}$ – 42,0 % ($p < 0,05$) і за вмісту гептахлору в кормі $2,0 \text{ мг/кг}$ – 57,4 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На 15 хв досліді за внесення $0,0025 \text{ мг}$ гептахлору на кг корму зниження інтенсивності світіння було вірогідним і становило 18,3 % ($p < 0,05$), за $0,01 \text{ мг/кг}$ – 24,6 %

($p < 0,05$), за 0,05 мг/кг – 44,7 % ($p < 0,05$) і за 2,0 мг/кг – 44,7 % ($p < 0,05$) відносно контролю.

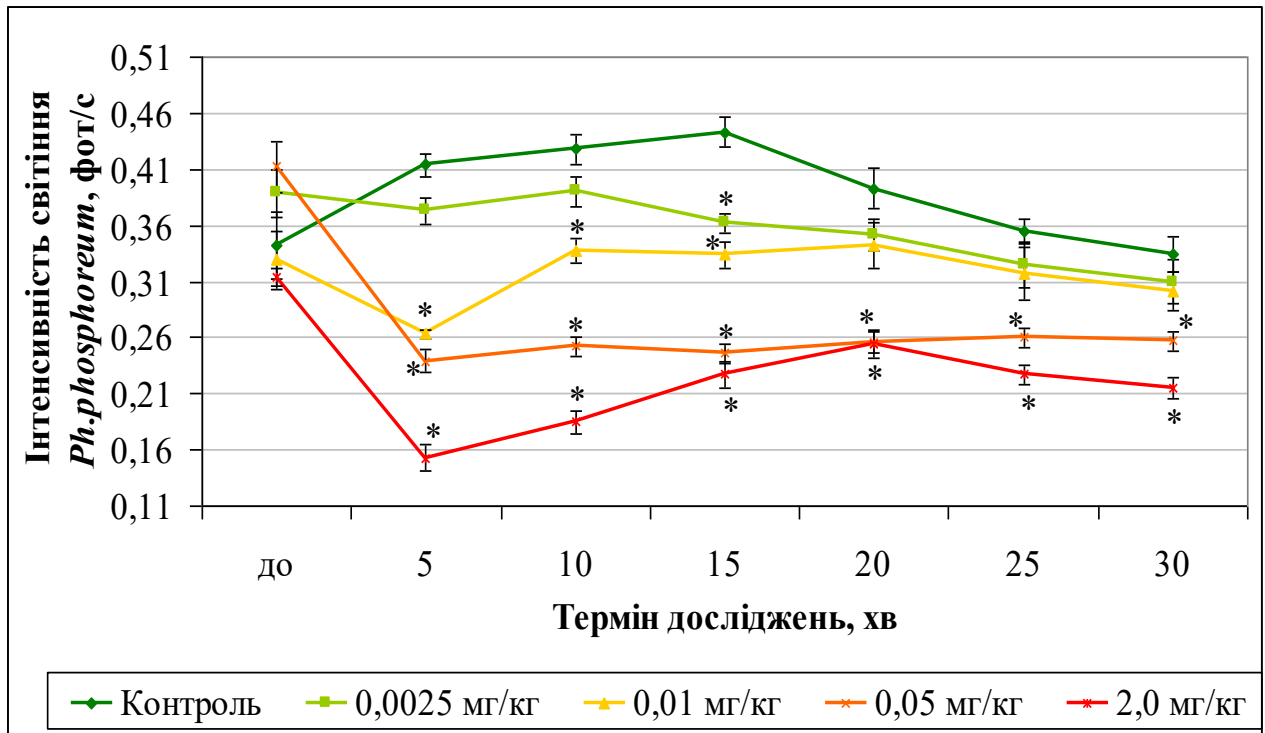


Рис. 3.7. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз гептахлору ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

На 20 хв експерименту за внесення 0,0025 і 0,01 мг гептахлору/кг корму зниження інтенсивності світіння було не вірогідним і становило 10,4 і 13,0 %, за 0,05 мг/кг – 34,9 % ($p < 0,05$) і за 2,0 мг/кг – 35,4 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На 25 хв досліджу спостерігали пригнічення світіння: за 0,0025 і 0,01 мг/кг корму зниження інтенсивності світіння становило 8,45 і 10,7 % та було не вірогідним, за 0,05 мг/кг – 26,8 % ($p < 0,05$) і за вмісту гептахлору в кормі 2,0 мг/кг – 36,1 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На останньому терміні досліджень (30 хв) спостерігали пригнічення світіння: за 0,0025 і 0,01 мг/кг корму зниження інтенсивності світіння становило 7,2 і 9,9 % та було не вірогідним, за 0,05 мг/кг – 23,1 % ($p < 0,05$) і за вмісту гептахлору в кормі 2,0 мг/кг – 35,6 % ($p < 0,05$) відносно контролю (рис. 3.7).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями гептахлору. Так, за вмісту пестициду 0,0025 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) у середньому становив 7,8; за вмісту 0,01 мг/кг корму (показник МДР) – 10,4; за 0,05 мг/кг корму – 24,9 і за 2,0 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 35,9. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом гептахлору від 0,0025 мг/кг до 0,01 мг/кг, є нетоксичними (індекс токсичності менше 20), тоді як за вмісту від 0,05 до 2,0 мг/кг корми токсичні (індекс токсичності від 20 до 50).

Вплив дихлордифеніл трихлорметилметану (ДДТ) на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.8.

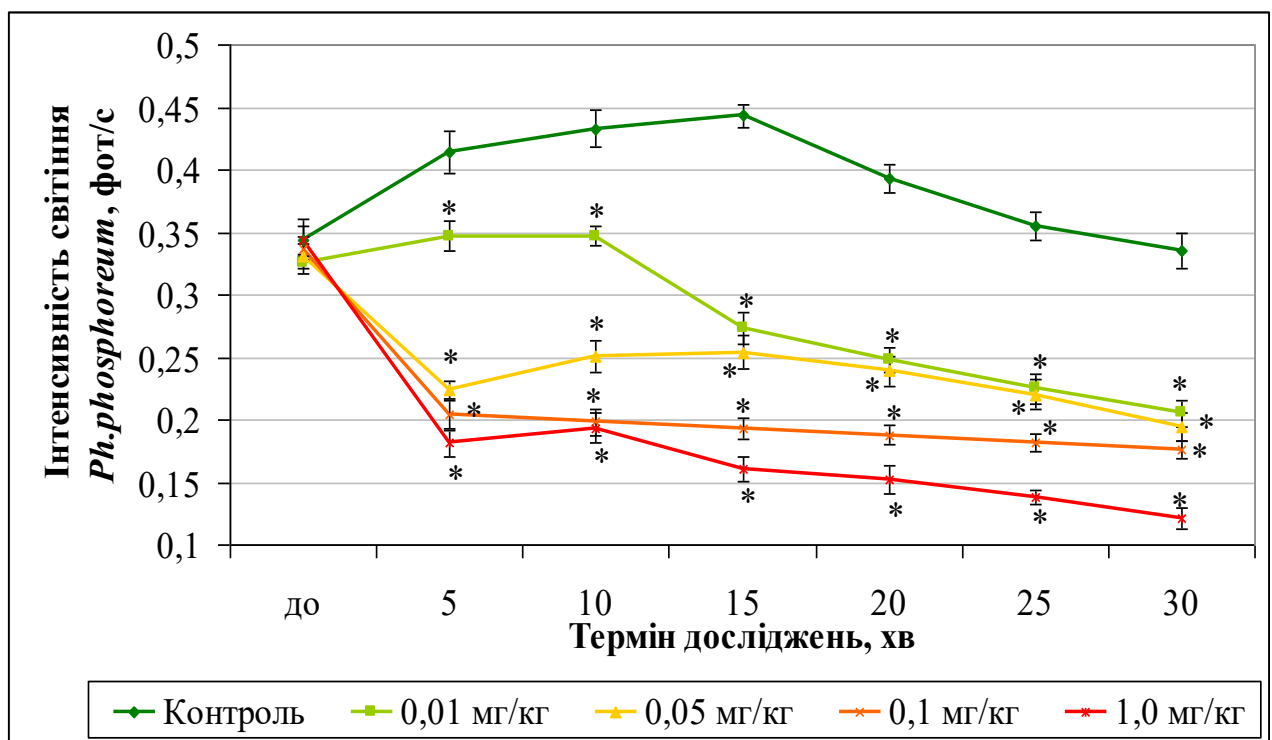


Рис. 3.8. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз ДДТ ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

За умов внесення ДДТ в усіх досліджуваних дозах на 5 хв після внесення спостерігали пригнічення світіння ($p < 0,05$): за 0,01 мг/кг корму зниження

інтенсивності світіння становило 16,2 %, за 0,05 мг/кг – 45,9 % ($p < 0,05$), за 0,1 мг/кг – 50,7 % ($p < 0,05$) і за вмісту ДДТ в кормі 1,0 мг/кг – 56,3 % ($p < 0,05$) відносно контролю.

На 10 хв досліду спостерігали аналогічну картину: за 0,01 мг/кг корму зниження інтенсивності світіння становило 19,9 %, за 0,05 мг/кг – 42,0 % ($p < 0,05$), за 0,1 мг/кг – 54,3 % ($p < 0,05$) і за вмісту ДДТ в кормі 1,0 мг/кг – 55,4 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На 15 хв досліду за внесення ДДТ 0,01 мг/кг корму зниження інтенсивності світіння становило 38,4 % ($p < 0,05$), за 0,05 мг/кг – 42,7 % ($p < 0,05$), за 0,1 мг/кг – 56,4 % ($p < 0,05$) і за 1,0 мг/кг – 63,6 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На 20 хв експерименту за внесення ДДТ 0,01 мг/кг корму зниження інтенсивності світіння становило 36,9 % ($p < 0,05$), за 0,05 мг/кг – 39,2 % ($p < 0,05$), за 0,1 мг/кг – 52,2 % ($p < 0,05$) і за 1,0 мг/кг – 61,3 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На 25 хв досліду спостерігали пригнічення світіння ($p < 0,05$) відносно контролю: за 0,01 мг/кг на 36,9 %, за 0,05 мг/кг на 38,0 %, за 0,1 мг/кг на 48,7 % і за 1,0 мг/кг на 61,1 %. На останньому терміні досліджень (30 хв) спостерігали пригнічення світіння ($p < 0,05$): за 0,01 і 0,05 мг/кг ДДТ в кормі зниження інтенсивності світіння становило 38,8 і 42,1 %, за 0,01 мг/кг – 47,5 % і за вмісту ДДТ в кормі 1,0 мг/кг – 63,9 % відносно контролю (рис. 3.8).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями ДДТ. Так, за вмісту пестициду 0,01 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) у середньому становив 36,9; за вмісту 0,05 мг/кг корму (показник МДР) – 38,8; за 0,1 мг/кг корму – 50,5 і за 1,0 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 61,2. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом ДДТ від 0,01 мг/кг до 0,05 мг/кг, є токсичними (індекс токсичності від 20 до 50), тоді як за вмісту від 0,1 до 1,0 мг/кг корми сильно токсичні (індекс токсичності більше 50).

Вплив α -ізомеру ГХЦГ на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.9. За умов внесення α -ізомеру ГХЦГ

в корм на 5 хв досліду у дозі 0,002 мг/кг корму спостерігали незначне посилення світіння (воно було не вірогідним і складало 10,6 %), тоді як за 0,02; 0,2 і 2,0 мг/кг корму інтенсивності світіння знижувалася ($p < 0,05$) відносно контролю на 28,5; 34,8 і 65,5 % відповідно. На 10 хв досліду спостерігали зниження інтенсивності світіння ($p < 0,05$): за 0,002 мг/кг корму воно становило 22,9 %, за 0,02 мг/кг – 37,4 %, за 0,2 мг/кг – 40,2 % і за вмісту α -ізомеру ГХЦГ в кормі 2,0 мг/кг – 72,8 % ($p < 0,05$) відносно контролю.

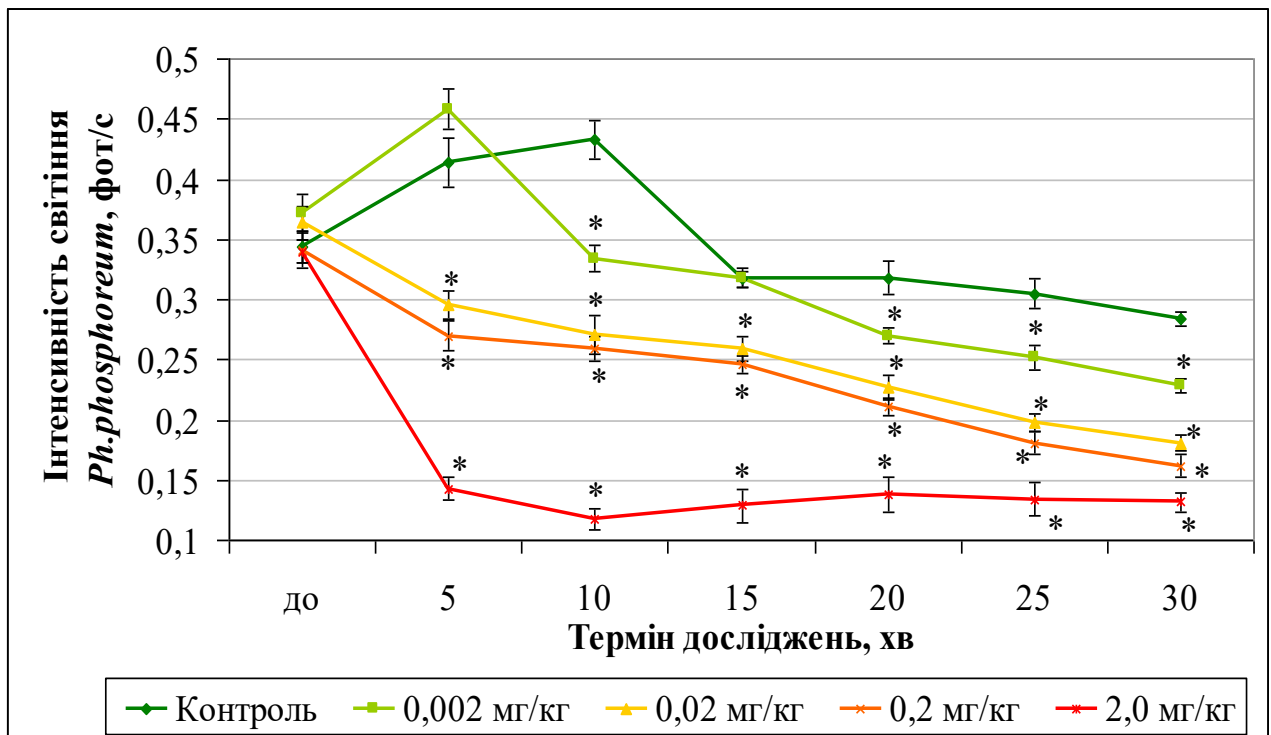


Рис. 3.9. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз α -ізомеру ГХЦГ ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

На 15 хв досліду за внесення α -ізомеру ГХЦГ в дозі 0,002 мг/кг корму не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння від контролю, тоді як за 0,02 мг/кг корму спостерігали зниження інтенсивності світіння на 18,6 % ($p < 0,05$), за 0,2 мг/кг – 22,6 % ($p < 0,05$) і за вмісту α -ізомеру ГХЦГ в кормі 2,0 мг/кг – 59,4 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На 20 хв експерименту за внесення α -ізомеру ГХЦГ в дозі 0,002 мг/кг корму зниження інтенсивності

світіння становило 15,1 % ($p < 0,05$), за 0,02 мг/кг – 28,6 % ($p < 0,05$), за 0,2 мг/кг – 33,6 % ($p < 0,05$) і за 2,0 мг/кг – 56,6 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На 25 хв досліді спостерігали пригнічення світіння ($p < 0,05$) відносно контролю: за 0,002 мг/кг на 17,4 %, за 0,02 мг/кг на 35,1 %, за 0,2 мг/кг на 40,7 % і за 2,0 мг/кг на 56,1 %. На останньому терміні досліджень (30 хв) спостерігали пригнічення світіння ($p < 0,05$): за 0,002 і 0,02 мг/кг α -ізомеру ГХЦГ в кормі зниження інтенсивності світіння становило 19,7 і 36,3 %, за 0,2 мг/кг – 43,0 % і за вмісту α -ізомеру ГХЦГ в кормі 2,0 мг/кг – 53,5 % відносно контролю (рис. 3.9).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями α -ізомеру ГХЦГ. Так, за вмісту пестициду 0,002 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) у середньому становив 16,2; за вмісту 0,02 мг/кг корму (показник МДР) – 31,9; за 0,2 мг/кг корму – 37,2 і за 2,0 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 56,4. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом α -ізомеру ГХЦГ до 0,002 мг/кг включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), від 0,02 до 0,2 мг/кг – токсичними (індекс токсичності від 20 до 50), а за вмісту від 2,0 мг/кг корми сильно токсичні (індекс токсичності більше 50).

Вплив β -ізомеру ГХЦГ на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.10. За умов внесення β -ізомеру ГХЦГ в усіх досліджуваних дозах на 5 хв після внесення спостерігали пригнічення світіння ($p < 0,05$): за 0,001 мг/кг корму зниження інтенсивності світіння становило 22,8 %, за 0,01 мг/кг – 46,3 % ($p < 0,05$), за 0,1 мг/кг – 59,7 % ($p < 0,05$) і за вмісту β -ізомеру ГХЦГ в кормі 1,0 мг/кг – 74,2 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На 10 хв досліді спостерігали аналогічну картину: за 0,001 мг/кг корму зниження інтенсивності світіння становило 15,8 %, за 0,01 мг/кг – 46,0 % ($p < 0,05$), за 0,1 мг/кг – 55,4 % ($p < 0,05$) і за вмісту β -ізомеру ГХЦГ в кормі 1,0 мг/кг – 76,2 % ($p < 0,05$) відносно контролю. За умов внесення β -ізомеру ГХЦГ в корм на 15 хв досліді у дозі 0,001 мг/кг корму спостерігали незначне

посилення світіння (воно було не вірогідним і складало 7,0 %), тоді як за 0,01; 0,1 і 1,0 мг/кг корму інтенсивності світіння знижувалася ($p < 0,05$) відносно контролю на 32,2; 43,9 і 65,9 % відповідно. За умов внесення β -ізомеру ГХЦГ в усіх досліджуваних дозах на 20 хв експерименту спостерігали пригнічення світіння: за 0,001 мг/кг корму зниження інтенсивності світіння не мало вірогідних відхилень від контролю і становило 5,7 %, за 0,01 мг/кг – 39,8 % ($p < 0,05$), за 0,1 мг/кг – 51,4 % ($p < 0,05$) і за вмісту β -ізомеру ГХЦГ в кормі 1,0 мг/кг – 68,9 % ($p < 0,05$) відносно контролю.

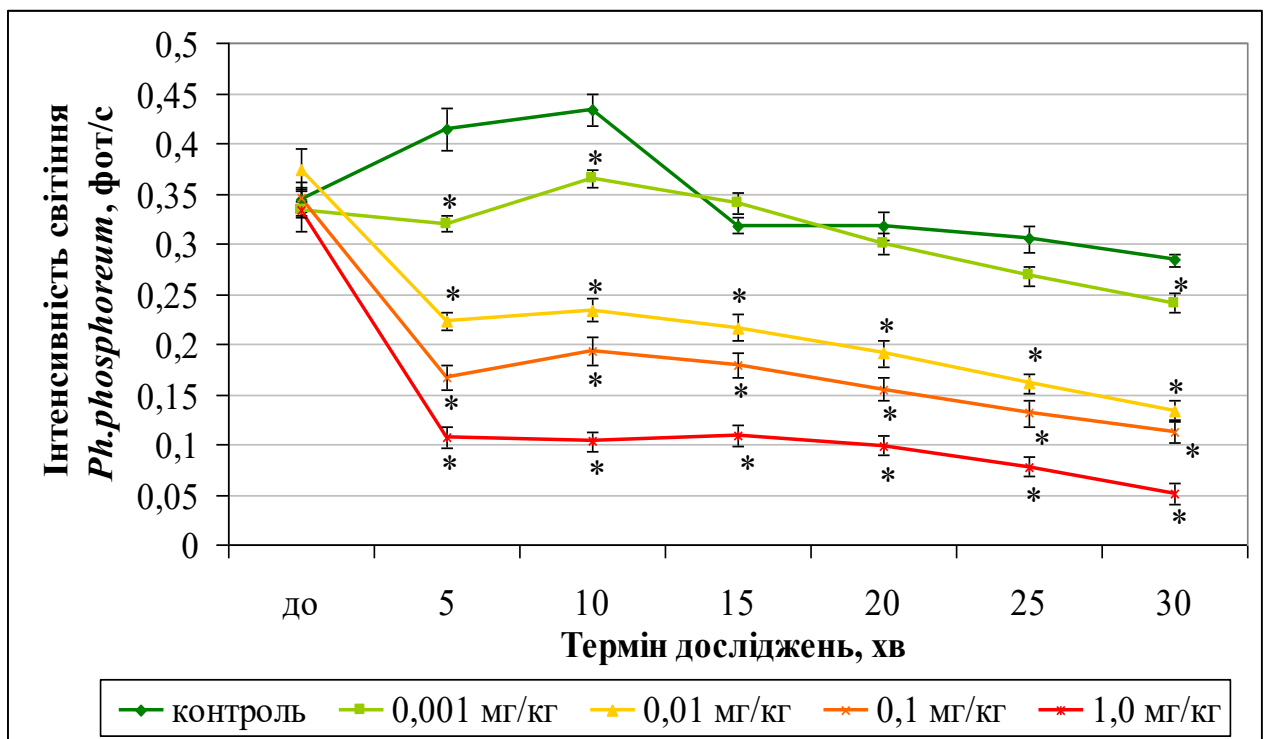


Рис. 3.10. Динаміка інтенсивності світіння *Ph.phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз β -ізомеру ГХЦГ ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

Аналогічну картину спостерігали і через 25 хв експерименту: пригнічення світіння за 0,001 мг/кг корму не мало вірогідних відхилень від контролю і становило 12,1 %, за 0,01 мг/кг – 47,2 % ($p < 0,05$), за 0,1 мг/кг – 57,0 % ($p < 0,05$) і за вмісту β -ізомеру ГХЦГ в кормі 1,0 мг/кг – 74,5 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На останньому терміні досліджень (30 хв) спостерігали

пригнічення світіння ($p < 0,05$): за 0,001 і 0,01 мг/кг β -ізомеру ГХЦГ в кормі зниження інтенсивності світіння становило 15,1 і 52,8 %, за 0,1 мг/кг – 60,7 % і за вмісту β -ізомеру ГХЦГ в кормі 1,0 мг/кг – 82,0 % відносно контролю (рис. 3.10).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями β -ізомеру ГХЦГ. Так, за вмісту пестициду 0,001 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) у середньому становив 8,9; за вмісту 0,01 мг/кг корму (показник МДР) – 43,5; за 0,1 мг/кг корму – 55,6 і за 1,0 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 71,7. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом β -ізомеру ГХЦГ до 0,001 мг/кг включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), за 0,01 мг/кг – токсичними (індекс токсичності від 20 до 50), а за вмісту від 0,1 до 1,0 мг/кг корми сильно токсичні (індекс токсичності більше 50).

Вплив γ -ізомеру ГХЦГ на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.11. За умов внесення γ -ізомеру ГХЦГ в усіх досліджуваних дозах на 5 хв після внесення спостерігали пригнічення світіння ($p < 0,05$): за 0,05 мг/кг корму зниження інтенсивності світіння становило 33,3 %, за 0,2 мг/кг – 50,7 % ($p < 0,05$), за 1,0 мг/кг – 37,0 % ($p < 0,05$) і за вмісту γ -ізомеру ГХЦГ в кормі 2,0 мг/кг – 45,0 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На 10 хв досліджу спостерігали аналогічну картину: за 0,05 мг/кг корму зниження інтенсивності світіння становило 26,8 %, за 0,2 мг/кг – 41,2 % ($p < 0,05$), за 1,0 мг/кг – 41,4 % ($p < 0,05$) і за вмісту γ -ізомеру ГХЦГ в кормі 2,0 мг/кг – 57,4 % ($p < 0,05$) відносно контролю. За умов внесення γ -ізомеру ГХЦГ в корм на 15 хв досліджу у дозі 0,05 мг/кг корму спостерігали незначне посилення світіння (воно було не вірогідним і майже не відрізнялося від такого в контролі), тоді як за 0,2; 1,0 і 2,0 мг/кг корму інтенсивність світіння знижувалася ($p < 0,05$) відносно контролю на 7,5; 16,7 і 46,5 % відповідно. За умов внесення γ -ізомеру ГХЦГ в усіх досліджуваних дозах на 20 хв

експерименту спостерігали пригнічення світіння: за 0,05 мг/кг корму зниження інтенсивності світіння не мало вірогідних відхилень від контролю і становило 4,0 %, за 0,2 мг/кг – 16,5 % ($p < 0,05$), за 1,0 мг/кг – 22,6 % ($p < 0,05$) і за вмісту γ -ізомеру ГХЦГ в кормі 2,0 мг/кг – 53,3 % ($p < 0,05$) відносно контролю.

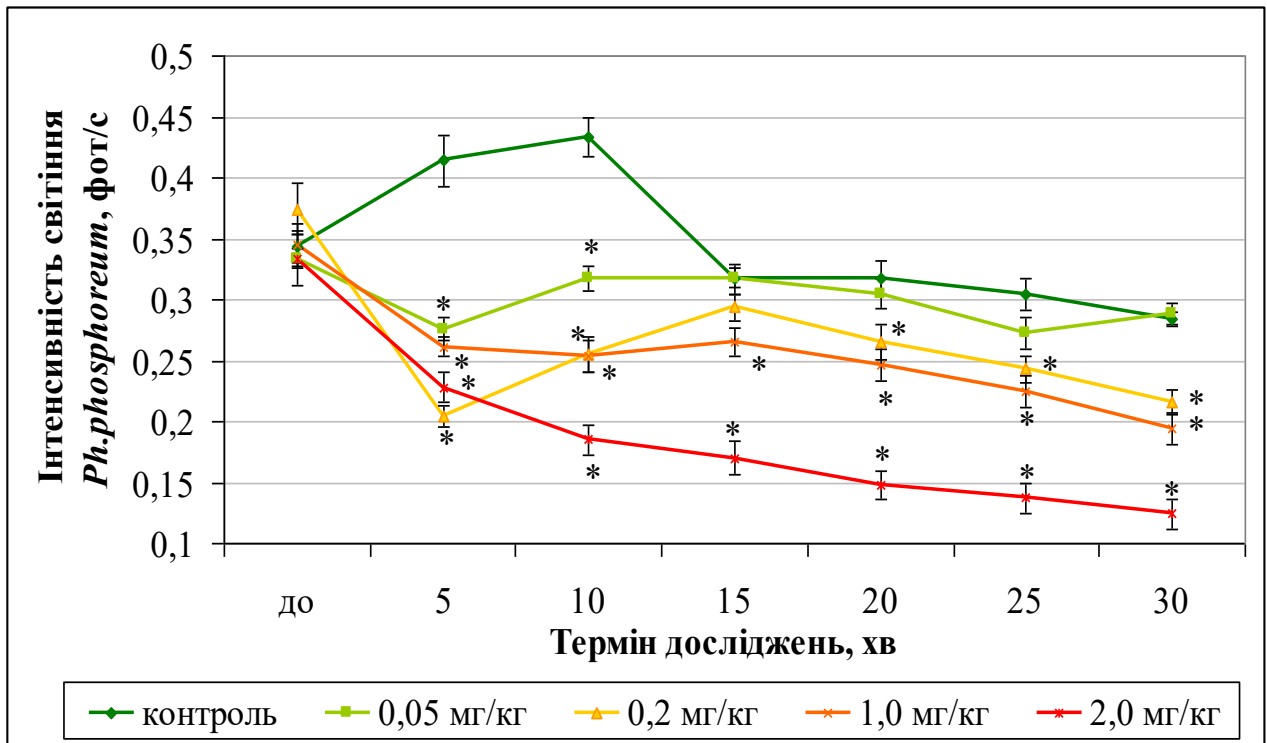


Рис. 3.11. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз γ -ізомеру ГХЦГ ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

На 25 хв експерименту спостерігали пригнічення світіння: за 0,05 мг/кг γ -ізомеру ГХЦГ в кормі воно не мало вірогідних відхилень від контролю і становило 10,6 %, за 0,2 мг/кг – 20,4 % ($p < 0,05$), за 1,0 мг/кг – 26,2 % ($p < 0,05$) і за вмісту γ -ізомеру ГХЦГ в кормі 2,0 мг/кг – 55,0 % ($p < 0,05$) відносно контролю. За умов внесення γ -ізомеру ГХЦГ в корм на 30 хв досліджу у дозі 0,05 мг/кг корму спостерігали незначне посилення світіння (воно було не вірогідним і майже не відрізнялося від такого в контролі), тоді як за 0,2; 1,0 і 2,0 мг/кг корму інтенсивність світіння знижувалася ($p < 0,05$) відносно контролю на 23,8; 31,6 і 56,5 % відповідно (рис 3.11).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями γ -ізомеру ГХЦГ. Так, за вмісту пестициду 0,05 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) у середньому становив 7,3; за вмісту 0,2 мг/кг корму (показник МДР) – 18,5; за 1,0 мг/кг корму – 27,1 і за 2,0 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 54,1. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом γ -ізомеру ГХЦГ менше 0,05 до 0,2 мг/кг включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), за 1,0 мг/кг – токсичними (індекс токсичності від 20 до 50), а за вмісту від 2,0 мг/кг корми сильно токсичні (індекс токсичності більше 50).

3.3.2 Дослідження впливу різних рівнів гербіцидів у кормах на люмінесценцію біоломінесцентних мікроорганізмів та їх токсикологічна характеристика. Вплив гербіциду Сотейра на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.12. За умов внесення гербіциду Сотейра в усіх досліджуваних дозах на 5 хв після внесення спостерігали пригнічення світіння ($p < 0,05$): за 0,01 мг/кг корму зниження інтенсивності світіння становило 66,5 %, за 0,025 мг/кг – 68,0 %, за 0,05 мг/кг – 83,5 %, за 0,1 мг/кг – 85,4 % і за вмісту гербіциду Сотейра в кормі 0,25 мг/кг – 78,2 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На 10 хв досліді спостерігали аналогічну картину: за 0,01 мг/кг корму зниження інтенсивності світіння становило 72,7 % ($p < 0,05$), за 0,025 мг/кг – 77,3 % ($p < 0,05$), за 0,05 мг/кг – 78,8 % ($p < 0,05$), за 0,1 мг/кг – 84,8 % ($p < 0,05$) і за вмісту гербіциду Сотейра в кормі 0,25 мг/кг – 90,9 % ($p < 0,05$) відносно контролю. Слід зазначити, що починаючи з 15 хв і до кінця досліді спостерігали повне пригнічення світіння за внесення препарату в усіх дозах.

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями гербіциду Сотейра. Оскільки на 25 і 30 хв експерименту індекс

токсичності становив 100 на усіх досліджуваних рівнях гербіциду, що свідчило про сильну токсичність кормів за наявності препарату в дозах (0,01-0,25) мг/кг.

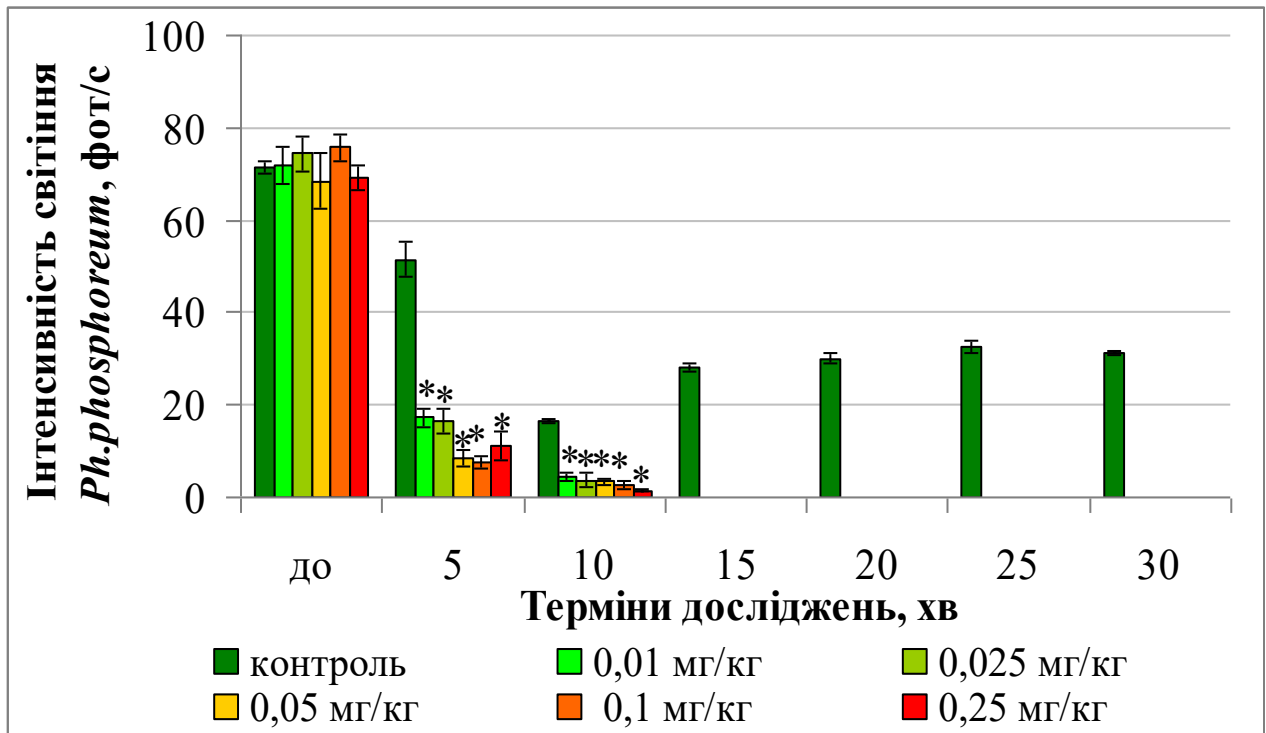


Рис. 3.12. Динаміка інтенсивності світіння *Ph.phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз гербіциду Сотейра (д.р. імазамокс+імазапір) ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

Вплив гербіциду Грінфорт преміум на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.13. Так, за умов внесення гербіциду Грінфорт преміум в усіх досліджуваних дозах на 5 хв після внесення спостерігали пригнічення світіння: за 0,01 і 0,025 мг/кг корму воно було не вірогідним (4,8 та 2,4 % відповідно), за 0,05 мг/кг – 29,1 % ($p < 0,05$), за 0,1 мг/кг – 37,1 % ($p < 0,05$) і за вмісту гербіциду Грінфорт преміум в кормі 0,25 мг/кг – 8,7 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На 10 хв після внесення спостерігали пригнічення світіння ($p < 0,05$): за 0,01 мг/кг корму зниження інтенсивності світіння становило 19,8 %, за 0,025 мг/кг – 14,1 %, за 0,05 мг/кг – 35,7 %, за 0,1 мг/кг – 49,8 % і за вмісту гербіциду Грінфорт преміум в кормі 0,25 мг/кг – 40,7 % відносно контролю. На 15 хв після внесення екстракту з проби корму

спостерігали пригнічення світіння ($p < 0,05$): за 0,01 мг/кг корму зниження інтенсивності світіння становило 27,2 %, за 0,025 мг/кг – 29,6 %, за 0,05 мг/кг – 46,3 %, за 0,1 мг/кг – 57,5 % і за вмісту гербіциду Грінфорт преміум в кормі 0,25 мг/кг – 47,0 % відносно контролю. Через 20 хв після внесення екстракту з проби корму спостерігали пригнічення світіння ($p < 0,05$): за 0,01 мг/кг корму зниження інтенсивності світіння становило 25,3 %, за 0,025 мг/кг – 36,3 %, за 0,05 мг/кг – 51,6 %, за 0,1 мг/кг – 61,2 % і за вмісту гербіциду Грінфорт преміум в кормі 0,25 мг/кг – 65,1 % відносно контролю.

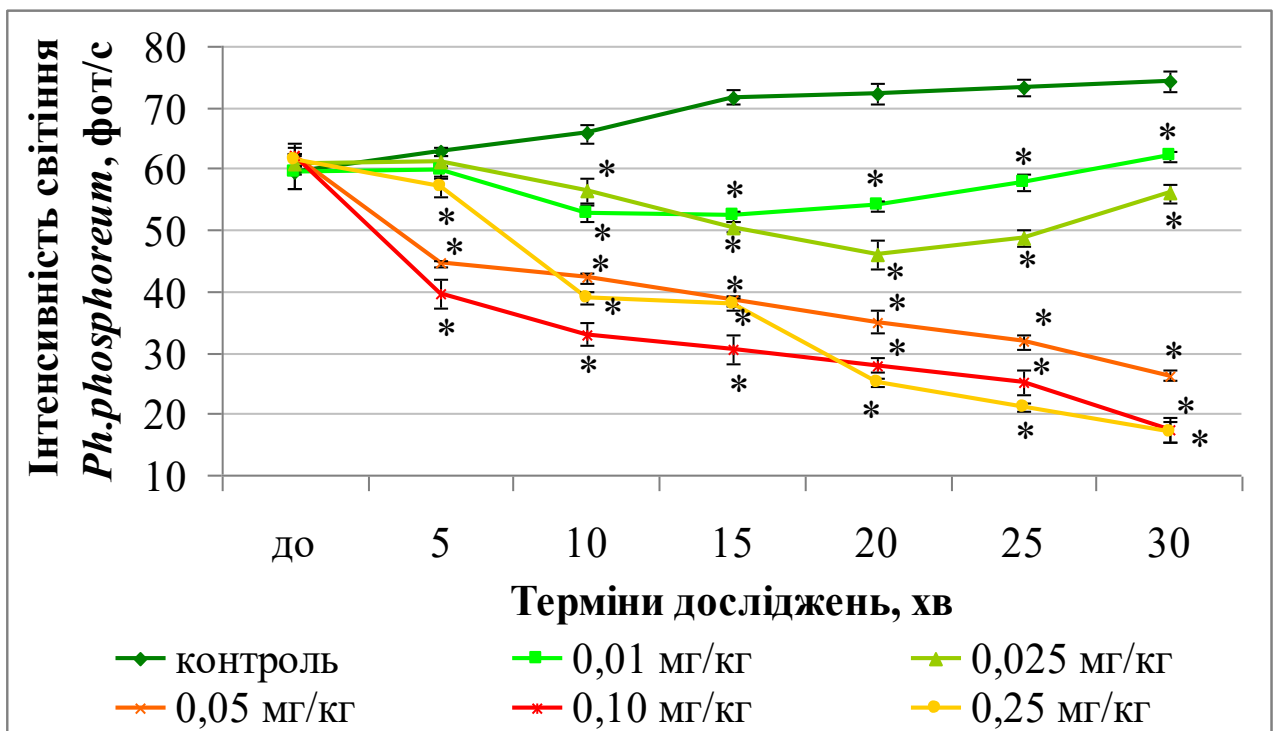


Рис. 3.13. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз гербіциду Грінфорт преміум (д.р. 2,4-Д 2-етилгексилловий ефір+флорасулам) ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

На 25 хв експерименту спостерігали пригнічення світіння ($p < 0,05$): за 0,01 мг/кг корму зниження інтенсивності світіння становило 21,2 %, за 0,025 мг/кг – 33,4 %, за 0,05 мг/кг – 56,7 %, за 0,1 мг/кг – 65,5 % і за вмісту гербіциду Грінфорт преміум в кормі 0,25 мг/кг – 71,2 % відносно контролю. На

останньому терміні досліджень (30 хв) зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* під дією гербіциду Грінфорт преміум становило ($p < 0,05$): за 0,01 мг/кг корму 16,5 %, за 0,025 мг/кг – 24,6 %, за 0,05 мг/кг – 64,6 %, за 0,1 мг/кг – 76,4 % і за вмісту гербіциду Грінфорт преміум в кормі 0,25 мг/кг – 77,1 % відносно контролю (рис. 3.13).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями гербіциду Грінфорт преміум. Так, за вмісту препарату 0,01 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) у середньому становив 18,9; за вмісту 0,025 мг/кг корму – 29,0; за 0,05 мг/кг корму (показник МДР) – 60,7; за 0,10 мг/кг корму – 71,0 і за 0,25 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 74,2. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом гербіциду Грінфорт преміум менше 0,01 мг/кг корму включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), за 0,025 мг/кг – токсичними (індекс токсичності від 20 до 50), а за вмісту від 0,05 до 0,25 мг/кг корми сильно токсичні (індекс токсичності більше 50).

Вплив гербіциду Грінфорт хорс на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.14. За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями гербіциду Грінфорт хорс до тест-культури на 5 хв після внесення спостерігали вірогідне підвищення інтенсивності світіння: за 0,008 і 0,02 мг/кг корму воно становило по 14,7 % відповідно ($p < 0,05$); за 0,04 і 0,08 мг/кг – рівень світіння вірогідно не відрізнявся від контролю і за вмісту гербіциду Грінфорт хорс в кормі 0,2 мг/кг спостерігали пригнічення світіння на 18,5 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На 10 хв експерименту за вмісту гербіциду Грінфорт хорс 0,008 мг/кг корму інтенсивність світіння була нижчою за контрольний показник, проте не вірогідно (на 6,7 %); за вмісту препарату 0,02 і 0,04 мг/кг корму інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* була вищою за контроль на 10,8 і 11,2 % ($p < 0,05$); а за 0,08 і 0,2 мг/кг – знижувалася відносно контролю на 19,3 і 30,5 % відповідно

($p < 0,05$). На 15 хв експерименту за вмісту гербіциду Грінфорт хорс 0,008 і 0,02 мг/кг корму інтенсивність світіння була не вірогідно вищою за контрольний показник, проте не вірогідно (на 2,4 і 5,8 % відповідно); за вмісту препарату 0,04 мг/кг корму інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* була вищою за контроль на 19,3 % ($p < 0,05$); а за 0,08 і 0,2 мг/кг – знижувалася відносно контролю на 10,6 і 22,7 % відповідно ($p < 0,05$).

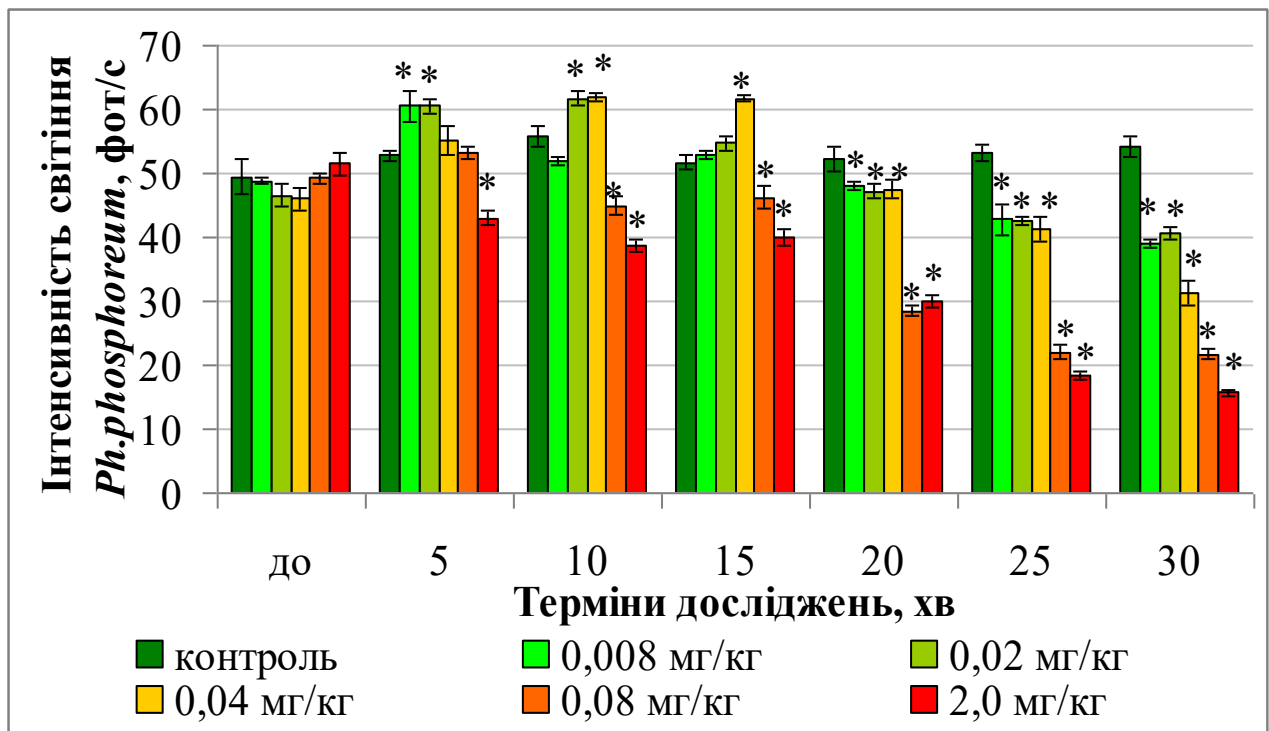


Рис. 3.14. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз гербіциду Грінфорт хорс (д.р. хізалофоп-п-етил) ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

Через 20 хв після внесення екстрактів кормів з різними рівнями гербіциду Грінфорт хорс до тест-культури спостерігали вірогідне зниження інтенсивності світіння ($p < 0,05$): за 0,008 мг/кг корму на 8,1 %; за вмісту препарату 0,02 мг/кг – на 9,6 %; за 0,04 мг/кг корму інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* була нижчою за контроль на 9,1 %; за 0,08 мг/кг – на 45,5 і за 0,2 мг/кг корму – на 42,6 % відповідно (рис. 2.8). Аналогічну картину спостерігали через 25 хв після внесення екстрактів кормів з різними рівнями гербіциду Грінфорт хорс до тест-

культури: вірогідне зниження інтенсивності світіння ($p < 0,05$) за 0,008 мг/кг корму складало 19,7 %; за вмісту препарату 0,02 мг/кг – 20,2 %; за 0,04 мг/кг корму 22,5 %; за 0,08 мг/кг – 58,7 і за 0,2 мг/кг корму – на 65,7 % відповідно. На останньому терміні досліджень (30 хв) зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* під дією гербіциду Грінфорт хорс становило ($p < 0,05$): за 0,008 мг/кг корму 28,1 %, за 0,02 мг/кг – 24,9 %, за 0,04 мг/кг – 42,4 %, за 0,08 мг/кг – 59,9 % і за вмісту гербіциду Грінфорт хорс в кормі 0,2 мг/кг – 71,0 % відносно контролю (рис. 3.14).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями гербіциду Грінфорт хорс. Так, за вмісту препарату 0,008 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) у середньому становив 13,9; за вмісту 0,02 мг/кг корму – 14,9; за 0,04 мг/кг корму (показник МДР) – 15,8; за 0,08 мг/кг корму – 52,1 і за 0,2 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 54,2. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом гербіциду Грінфорт хорс менше 0,008 до 0,04 мг/кг корму включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), а за вмісту від 0,08 до 0,2 мг/кг корми сильно токсичні (індекс токсичності більше 50).

Вплив гербіциду Скат на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.15. За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями гербіциду Скат до тест-культури на 5 хв після внесення спостерігали вірогідне підвищення інтенсивності світіння за 0,008; 0,02 і 0,04 мг/кг корму воно становило 46,3 %; 2,2 рази і 24,3 % відповідно ($p < 0,05$), тоді як за 0,08 і 0,20 мг/кг гербіциду Скат в кормі спостерігали пригнічення світіння на 83,8 і 80,1 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На 10 хв досліді за 0,008 мг/кг корму гербіциду Скат спостерігали підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* на 28,3 % ($p < 0,05$) відносно контролю, тоді як за вмісту 0,02 мг/кг – не спостерігали вірогідних відмінностей показнику, а за 0,04; 0,08 і 0,2 мг/кг корму інтенсивність світіння знижувалася

($p < 0,05$) на 12,6; 40,8 і 65,0 % відповідно відносно контролю. Аналогічну картину спостерігали на 15 хв експерименту: за 0,008 мг/кг корму гербіциду Скат спостерігали підвищення інтенсивності світіння *Ph.phosphoreum* на 12,1 % ($p < 0,05$) відносно контролю, тоді як за вмісту 0,02 мг/кг – не спостерігали вірогідних відмінностей показнику, а за 0,04; 0,08 і 0,2 мг/кг корму інтенсивність світіння знижувалася ($p < 0,05$) на 14,9; 34,2 і 69,0 % відповідно відносно контролю.

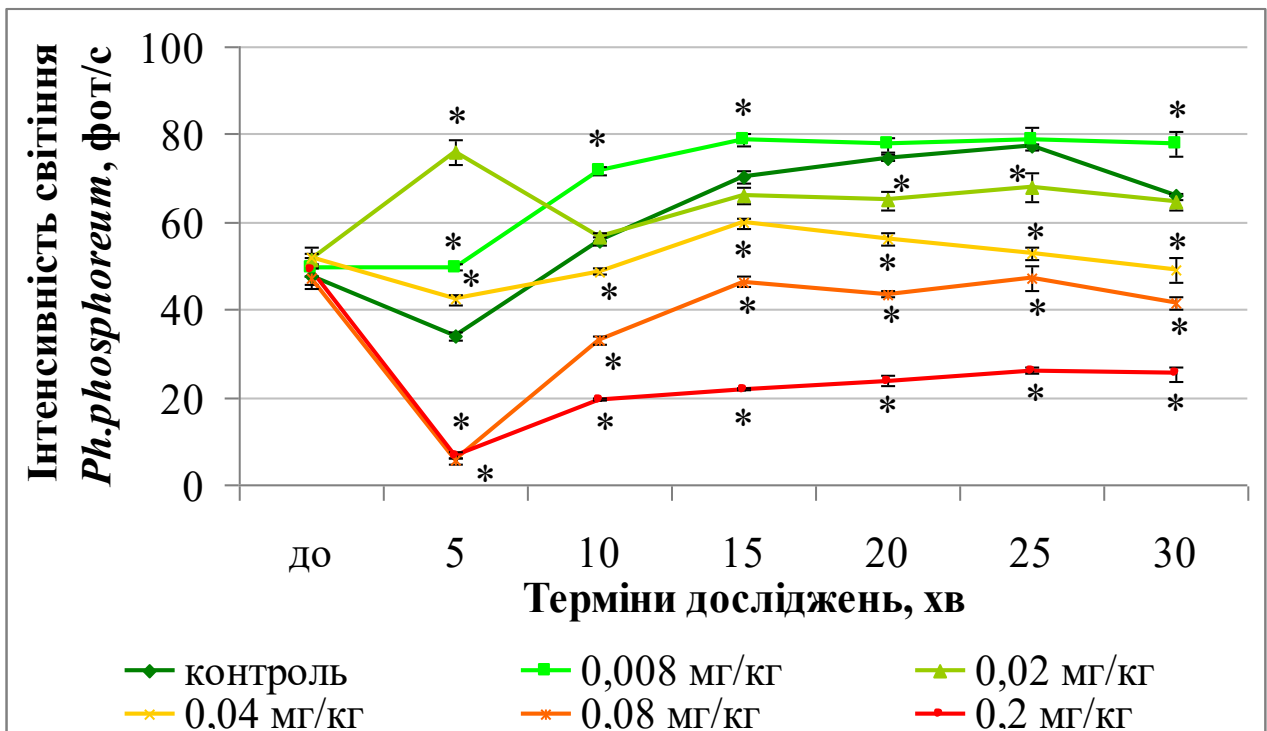


Рис. 3.15. Динаміка інтенсивності світіння *Ph.phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз гербіциду Скат (д.р. хізалофоп-п-тефурил) ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

На 20 хв досліду за 0,008 мг/кг корму гербіциду Скат не спостерігали вірогідних відмінностей показнику, тоді як за вмісту 0,02; 0,04; 0,08 і 0,2 мг/кг корму інтенсивність світіння знижувалася ($p < 0,05$) на 13,0; 24,7; 41,8 і 68,2 % відповідно відносно контролю. Схожу картину спостерігали на 25 хв експерименту: за 0,008 мг/кг корму гербіциду Скат не спостерігали вірогідних відмінностей показнику, тоді як за вмісту 0,02; 0,04; 0,08 і 0,2 мг/кг корму

інтенсивність світіння знижувалася ($p < 0,05$) на 12,3; 31,9; 39,4 і 66,5 % відповідно відносно контролю. На останньому терміні досліджень (30 хв) були встановлені наступні зміни інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* під дією гербіциду Скат: за 0,008 мг/кг корму спостерігали підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* на 17,8 % ($p < 0,05$) відносно контролю, тоді як за вмісту 0,02 мг/кг – не спостерігали вірогідних відмінностей показнику, а за 0,04; 0,08 і 0,2 мг/кг корму інтенсивність світіння знижувалася ($p < 0,05$) на 25,8; 37,1 і 61,7 % відповідно відносно контролю (рис. 3.15).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями гербіциду Скат. Так, за вмісту препарату 0,008 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) був від'ємний і у середньому становив $-3,0$; за вмісту 0,02 мг/кг корму – $12,6$; за 0,04 мг/кг корму (показник МДР) – $28,3$; за 0,08 мг/кг корму – $40,6$ і за 0,2 мг/кг корму середній індекс токсичності складав $67,3$. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом гербіциду Скат менше 0,008 до 0,02 мг/кг корму включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), за вмісту від 0,04 до 0,08 мг/кг корми токсичні (індекс токсичності більше від 20 до 50), а за вмісту від 0,2 мг/кг корми сильно токсичні (індекс токсичності більше 50).

Вплив гербіциду Агрошит супер на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.16. За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями гербіциду Агрошит супер до тест-культури на 5 хв після внесення спостерігали вірогідне зниження інтенсивності світіння ($p < 0,05$): за 0,1 мг/кг корму – на 24,3 %; за 0,5 мг/кг корму – на 16,9 %; за 1,0 мг/кг корму – на 28,7 %; за 2,5 мг/кг корму – на 25,0 % і за 5,0 мг/кг корму – на 56,6 % відносно контролю. На 10 хв досліду за 0,1 і 0,5 мг/кг корму гербіциду Агрошит супер не відмічали вірогідних змін інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відносно контролю, тоді як за вмісту 1,0; 2,5 і 5,0 мг/кг корму інтенсивність світіння знижувалася ($p < 0,05$) на 20,4; 19,4 і 40,8 % відповідно

відносно контролю. На 15 хв досліду за 0,1 мг/кг корму гербіциду Агроцит супер не відмічали вірогідних змін інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відносно контролю, тоді як за вмісту 0,5; 1,0; 2,5 і 5,0 мг/кг корму інтенсивність світіння знижувалася ($p < 0,05$) на 17,5; 18,6; 21,6 і 35,1 % відповідно відносно контролю. На 20 хв експерименту спостерігали вірогідне зниження інтенсивності світіння ($p < 0,05$): за 0,1 мг/кг корму – на 19,3 %; за 0,5 мг/кг корму – на 22,9 %; за 1,0 мг/кг корму – на 42,2 %; за 2,5 мг/кг корму – на 48,2 % і за 5,0 мг/кг корму – на 60,2 % відносно контролю.

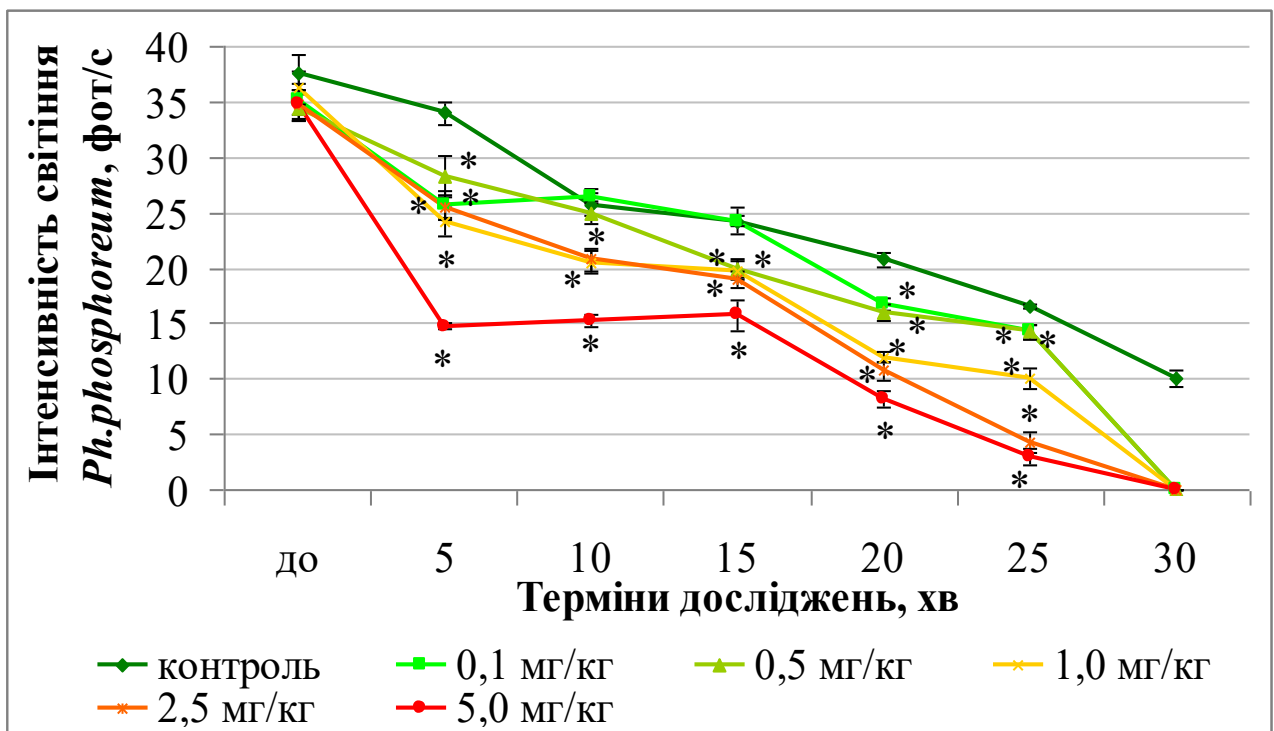


Рис. 3.16. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз гербіциду Агроцит супер (д.р. калійна сіль гліфосату) ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

Аналогічну картину спостерігали і на 25 хв експерименту: зниження інтенсивності світіння ($p < 0,05$): за 0,1 мг/кг корму становило 13,6 %; за 0,5 мг/кг корму – 13,6 %; за 1,0 мг/кг корму – 39,4 %; за 2,5 мг/кг корму – 74,2 % і за 5,0 мг/кг корму – 81,8 % відносно контролю. На останньому терміні

досліджень за внесення гербіциду Агроцит супер у всіх дозах спостерігали повне пригнічення світіння *Ph. phosphoreum* (рис. 3.16).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями гербіциду Агроцит супер. Так, за вмісту препарату 0,1 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) у середньому становив 16,5; за вмісту 0,5 мг/кг корму – 18,3; за 1,0 мг/кг корму (показник МДР) – 40,8; за 2,50 мг/кг корму – 61,2 і за 5,0 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 71,0. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом гербіциду Агроцит супер менше 0,1 до 0,5 мг/кг корму включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), за вмісту від 1,0 мг/кг корми токсичні (індекс токсичності більше від 20 до 50), а за вмісту від 2,5 мг/кг корми сильно токсичні (індекс токсичності більше 50).

Вплив гербіциду Грінфорт екстра на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.17. За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями гербіциду Грінфорт екстра до тест-культури на 5 хв після внесення спостерігали вірогідне підвищення інтенсивності світіння за 0,02 мг/кг корму воно становило 16,8 % ($p < 0,05$), тоді як за 0,05; 0,10; 0,20 і 0,50 мг/кг гербіциду Грінфорт екстра в кормі спостерігали пригнічення світіння на 31,1; 40,9; 42,4 і 45,4 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На 10 хв досліду спостерігали пригнічення світіння за 0,02 мг/кг корму, проте воно було не вірогідним (7,4 % відповідно), тоді як за 0,05 мг/кг воно становило 17,6 % ($p < 0,05$), за 0,1 і 0,2 мг/кг – по 41,2 % ($p < 0,05$) і за вмісту гербіциду Грінфорт екстра в кормі 0,5 мг/кг – 70,6 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На 15 хв експерименту спостерігали незначне посилення світіння *Ph. phosphoreum* за 0,02 мг/кг корму, проте воно було не вірогідним, тоді як за рештою доз препарату встановлювали пригнічення світіння ($p < 0,05$): за 0,05 мг/кг воно складало 31,3 %, за 0,1 мг/кг – 44,4 %, за 0,2 мг/кг – 41,6 % і за вмісту гербіциду Грінфорт екстра в кормі 0,5 мг/кг – 74,6 % ($p < 0,05$) відносно контролю.

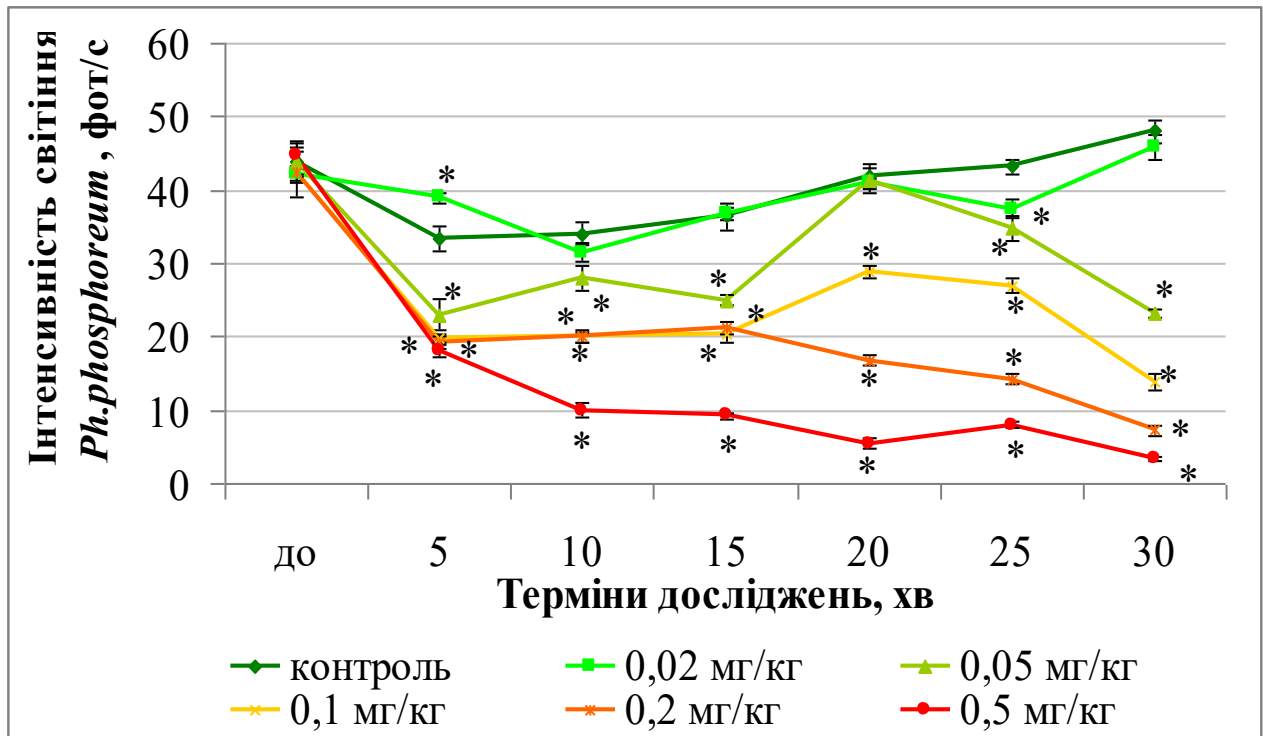


Рис. 3.17. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз гербіциду Грінфорт екстра (д.р. метолахлор+тербутилазин) ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

На 20 хв досліді спостерігали незначне пригнічення світіння *Ph. phosphoreum* за 0,02 і 0,05 мг/кг корму, проте воно було не вірогідним, тоді як за рештою доз препарату встановлювали пригнічення світіння ($p < 0,05$): за 0,1 мг/кг воно складало 31,2 %; за 0,2 мг/кг – 59,9 % і за вмісту гербіциду Грінфорт екстра в кормі 0,5 мг/кг – 86,8 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На 25 хв експерименту спостерігали вірогідне зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* ($p < 0,05$): за 0,02 мг/кг корму – на 13,2 %; за 0,05 мг/кг корму – на 19,6 %; за 0,1 мг/кг корму – на 37,5 %; за 0,2 мг/кг корму – на 67,0 % і за 0,5 мг/кг корму – на 81,5 % відносно контролю. На останньому терміні досліді (30 хв) спостерігали незначне пригнічення світіння *Ph. phosphoreum* за 0,02 мг/кг корму, проте воно було не вірогідним, тоді як за рештою доз препарату встановлювали пригнічення світіння ($p < 0,05$): за 0,05 мг/кг воно складало 51,6 %; за 0,1 мг/кг – 71,4 %, за 0,2 мг/кг корму – 84,9 % і за вмісту

гербициду Грінфорт екстра в кормі 0,5 мг/кг спостерігали повне пригнічення світіння (рис. 3.17).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями гербициду Грінфорт екстра. Так, за вмісту препарату 0,02 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) у середньому становив 7,6; за вмісту 0,05 мг/кг корму – 10,4; за 0,1 мг/кг корму (показник МДР) – 34,4; за 0,20 мг/кг корму – 63,5 і за 0,5 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 84,2. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом гербициду Грінфорт екстра менше 0,02 до 0,05 мг/кг корму включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), за вмісту від 0,1 мг/кг корми токсичні (індекс токсичності більше від 20 до 50), а за вмісту від 0,2 мг/кг корми сильно токсичні (індекс токсичності більше 50).

Вплив гербициду Астанес на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.18. Так, за умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями гербициду Астанес до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення спостерігали вірогідне підвищення інтенсивності світіння за 0,006 мг/кг корму воно становило 22,0 % ($p < 0,05$), тоді як за 0,015; 0,03; 0,06 і 0,15 мг/кг гербициду Астанес в кормі спостерігали пригнічення світіння на 19,2; 16,9; 14,7 і 33,4 % ($p < 0,05$) відносно контролю. Аналогічну картину спостерігали на 10 хв експерименту: вірогідне підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за 0,006 мг/кг корму, воно становило 16,9 % ($p < 0,05$), тоді як за 0,015; 0,03; 0,06 і 0,15 мг/кг гербициду Астанес в кормі спостерігали пригнічення світіння на 35,3; 20,6; 19,1 і 39,0 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На 15 хв експерименту спостерігали не вірогідне підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за 0,006 мг/кг корму та пригнічення світіння на 49,2; 27,2; 37,5 і 46,4 % ($p < 0,05$) відносно контролю за 0,015; 0,03; 0,06 і 0,15 мг/кг гербициду Астанес в кормі відповідно.

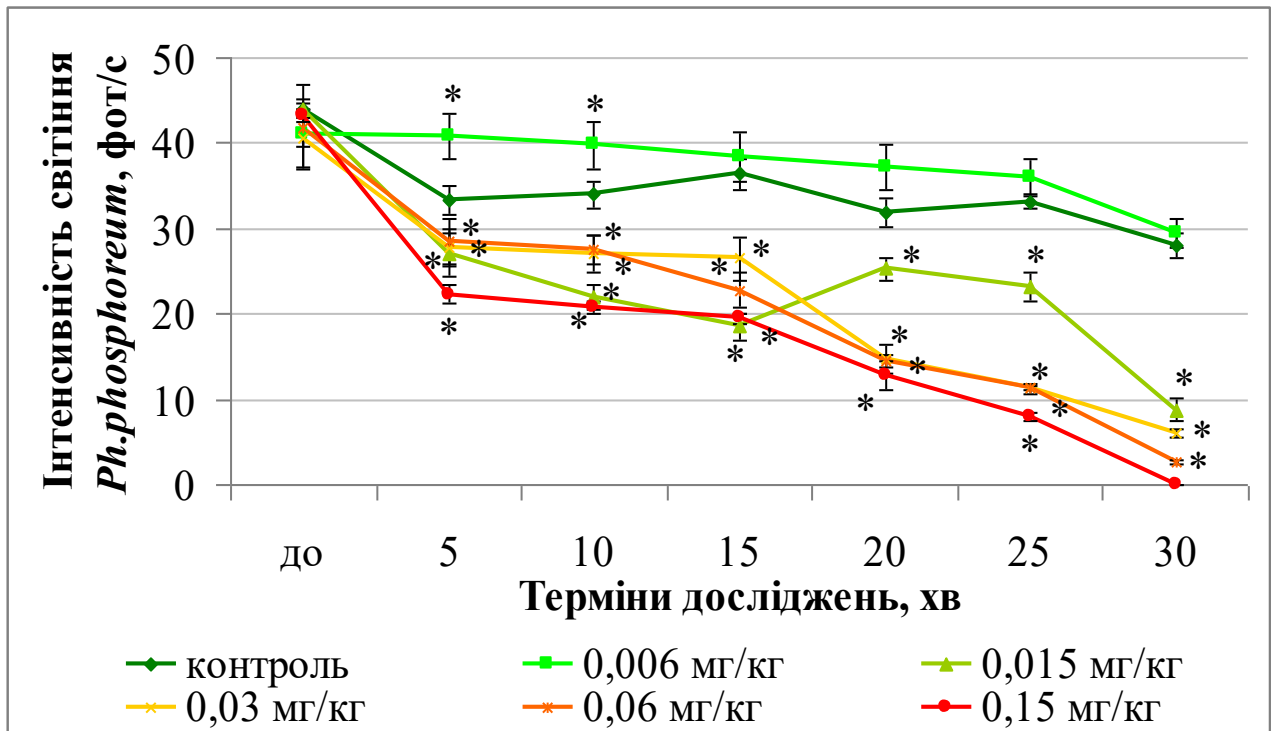


Рис. 3.18. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз гербіциду Астанес (д.р. ацетохлор) ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

На 20 хв експерименту спостерігали не вірогідне підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за 0,006 мг/кг корму та пригнічення світіння на 20,6; 53,6; 54,4 і 59,9 % ($p < 0,05$) відносно контролю за 0,015; 0,03; 0,06 і 0,15 мг/кг гербіциду Астанес в кормі відповідно. На 25 хв досліджу спостерігали не вірогідне підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за 0,006 мг/кг корму та пригнічення світіння на 30,0; 66,1; 66,1 і 75,9 % ($p < 0,05$) відносно контролю за 0,015; 0,03; 0,06 і 0,15 мг/кг гербіциду Астанес в кормі відповідно (рис. 3.18). І на останньому терміні досліджень (30 хв) спостерігали не вірогідне підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за 0,006 мг/кг корму, пригнічення світіння на 68,8; 78,6 і 90,2 % ($p < 0,05$) відносно контролю за 0,015; 0,03 і 0,06 мг/кг гербіциду Астанес в кормі відповідно, а за 0,15 мг/кг корму встановлено повне пригнічення світіння (рис. 3.18).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з

різними рівнями гербіциду Астанес. Так, за вмісту препарату 0,006 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) був від'ємний і у середньому становив $-12,8$; за вмісту 0,015 мг/кг корму – 25,3; за 0,03 мг/кг корму (показник МДР) – 59,9; за 0,06 мг/кг корму – 60,3 і за 0,15 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 67,9. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом гербіциду Астанес менше 0,006 мг/кг корму включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), за вмісту 0,015 мг/кг корми токсичні (індекс токсичності більше від 20 до 50), а за вмісту від 0,03 мг/кг корми сильно токсичні (індекс токсичності більше 50).

Вплив гербіциду Астралід на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.19.

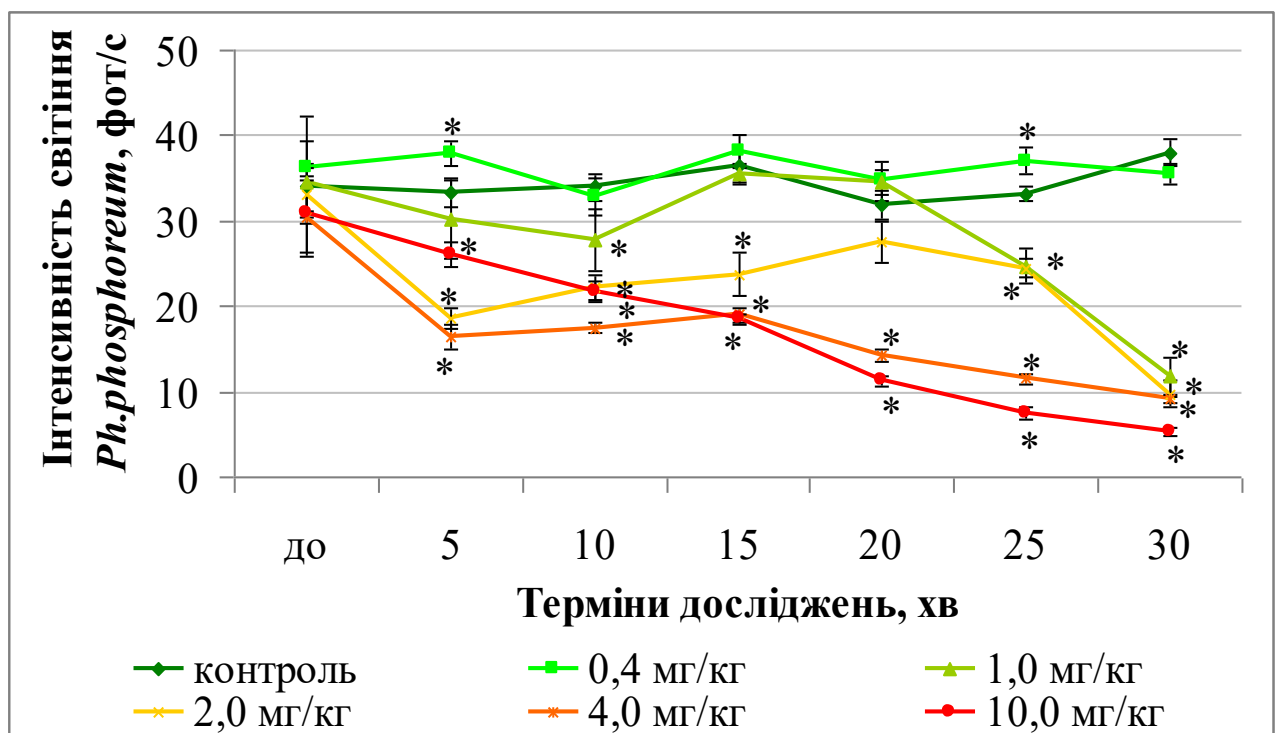


Рис. 3.19. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз гербіциду Астралід (д.р. клопіралід) ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями гербіциду Астралід до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення спостерігали вірогідне підвищення інтенсивності світіння за 0,4 мг/кг корму воно становило 13,8 % ($p < 0,05$), за вмісту 1,0 мг/кг корму вірогідних змін світіння не спостерігали, а за 2,0; 4,0 і 10,0 мг/кг гербіциду

Астралід в кормі спостерігали пригнічення світіння на 44,6; 50,6 і 22,2 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На 10 хв експерименту за 0,4 мг/кг корму не спостерігали вірогідних змін інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за 1,0; 2,0; 4,0 і 10,0 мг/кг гербіциду Астралід в кормі спостерігали пригнічення світіння на 18,4; 34,6; 48,5 і 36,0 % ($p < 0,05$) відносно контролю відповідно. На 15 хв експерименту не спостерігали вірогідних змін інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за вмісту гербіциду Астралід в кормі 0,4 і 1,0 мг/кг корму, а за 2,0; 4,0 і 10,0 мг/кг спостерігали пригнічення світіння на 34,8; 47,8 і 49,2 % ($p < 0,05$) відносно контролю відповідно. На 20 хв експерименту не спостерігали вірогідних змін інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за вмісту гербіциду Астралід в кормі 0,4; 1,0 і 2,0 мг/кг корму, а за 4,0 і 10,0 мг/кг спостерігали пригнічення світіння на 55,2 і 64,6 % ($p < 0,05$) відносно контролю відповідно. дещо інакшу картину спостерігали на 25 хв досліду: вірогідне підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відмічено за 0,4 мг/кг корму воно становило 11,4 % ($p < 0,05$), а за 1,0; 2,0; 4,0 і 10,0 мг/кг гербіциду Астралід в кормі спостерігали пригнічення світіння на 25,5; 26,2; 65,4 і 77,4 % ($p < 0,05$) відповідно відносно контролю. На останньому терміні досліджень (30 хв) за 0,4 мг/кг корму не спостерігали вірогідних змін інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за 1,0; 2,0; 4,0 і 10,0 мг/кг гербіциду Астралід в кормі спостерігали пригнічення світіння на 69,1; 74,3; 75,7 і 86,2 % ($p < 0,05$) відносно контролю відповідно (рис. 3.19).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями гербіциду Астралід. Так, за вмісту препарату 0,4 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників

флуоресценції) був від'ємний і у середньому становив $-10,4$; за вмісту $1,0$ мг/кг корму – $8,5$; за $2,0$ мг/кг корму (показник МДР) – $19,9$; за $4,0$ мг/кг корму – $60,3$ і за $10,0$ мг/кг корму середній індекс токсичності складав $71,0$. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом гербіциду Астралід менше $0,4$ та до $2,0$ мг/кг корму включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), а за вмісту $4,0$ мг/кг і вище корми сильно токсичні (індекс токсичності більше 50).

Вплив гербіциду Грінфорт НК 40 на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.20. За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями гербіциду Грінфорт НК 40 до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення не спостерігали вірогідних змін світіння за $0,04$ і $0,1$ мг/кг корму, а за $0,2$; $0,4$ і $1,0$ мг/кг гербіциду Грінфорт НК 40 в кормі спостерігали пригнічення світіння на $15,4$; $19,2$ і $37,9$ % ($p < 0,05$) відносно контролю.

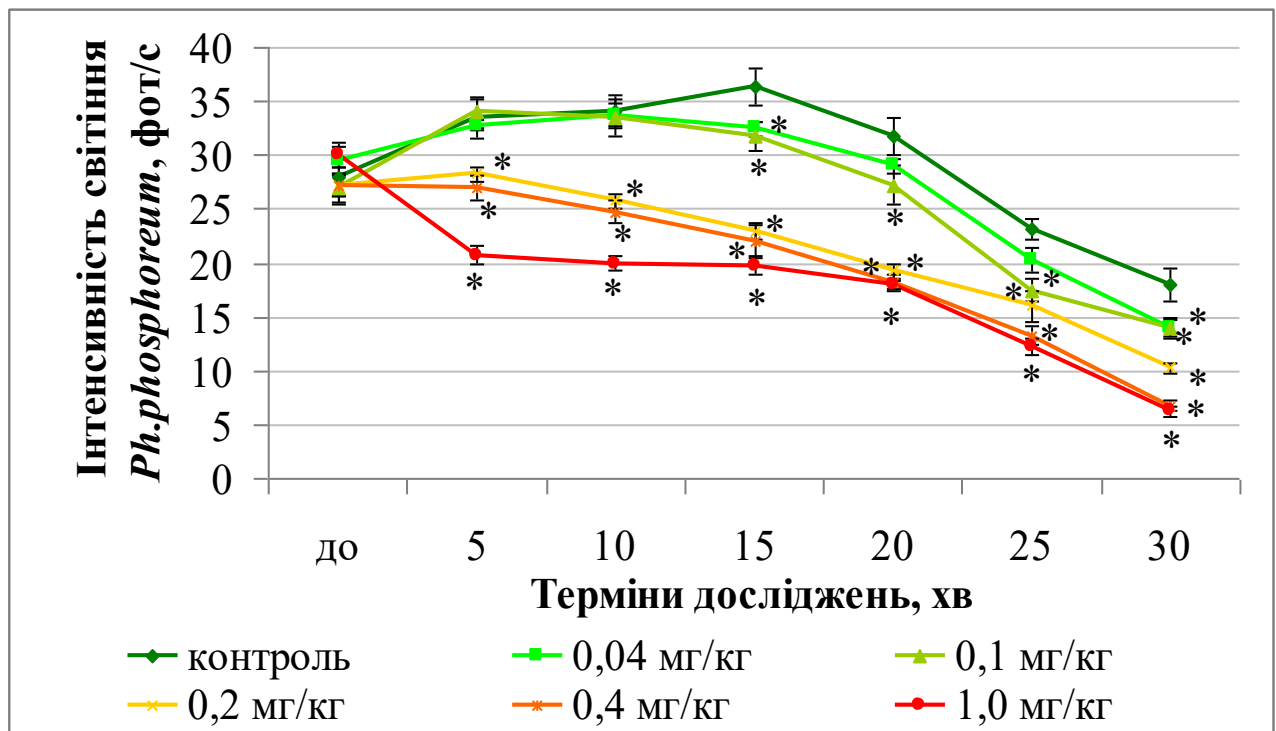


Рис. 3.20. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз гербіциду Грінфорт НК 40 (д.р. нікосульфурон) ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

Аналогічною була картина на 10 хв експерименту: за рівнів гербіциду Грінфорт НК 40 0,04 і 0,1 мг/кг корму не спостерігали вірогідних змін світіння, а за 0,2; 0,4 і 1,0 мг/кг в кормі спостерігали пригнічення світіння на 24,3; 27,2 і 41,2 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На 15 хв досліду відзначали пригнічення світіння *Ph. phosphoreum* за всіх досліджуваних рівнів препарату ($p < 0,05$): за 0,04 мг/кг – на 10,7 %; за 0,1 мг/кг – 12,8 %; за 0,2 мг/кг – на 36,8 %; за 0,4 мг/кг – 39,6 % і за рівня гербіциду Грінфорт НК 1,0 мг/кг корму інтенсивність світіння знижувалася на 45,7 %. На 20 хв після внесення екстрактів кормів з різними рівнями гербіциду Грінфорт НК 40 до тест-культури *Ph. phosphoreum* не спостерігали вірогідних змін світіння за 0,04 мг/кг корму, а за 0,1; 0,2; 0,4 і 1,0 мг/кг гербіциду Грінфорт НК 40 в кормі спостерігали пригнічення світіння ($p < 0,05$) на 14,3; 39,5; 42,6 і 43,4 % відносно контролю. Подібною була інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* і на 25 хв експерименту: за рівня гербіциду Грінфорт НК 40 0,04 мг/кг корму не спостерігали вірогідних змін світіння, а за 0,1; 0,2; 0,4 і 1,0 мг/кг гербіциду Грінфорт НК 40 в кормі спостерігали пригнічення світіння ($p < 0,05$) на 24,6; 31,0; 42,9 і 47,2 % відносно контролю. На останньому терміні досліду (30 хв) пригнічення світіння *Ph. phosphoreum* спостерігали на всіх рівнях гербіциду Грінфорт НК 40 в кормі ($p < 0,05$): за 0,04; 0,1; 0,2; 0,4 і 1,0 мг/кг корму на 22,2; 22,2; 43,1; 62,5 і 65,3 % відносно контролю (рис. 3.20).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями гербіциду Грінфорт НК 40. Так, за вмісту препарату 0,04 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) у середньому становив 10,8; за вмісту 0,1 мг/кг корму – 19,4; за 0,2 мг/кг корму (показник МДР) – 35,2; за 0,4 мг/кг корму – 42,7 і за 1,0 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 45,3. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом гербіциду Грінфорт НК 40 менше 0,04 та до 0,1 мг/кг корму включно є не токсичними (індекс токсичності

менше 20), а за вмісту від 0,2 мг/кг включно і вище корми токсичні (індекс токсичності від 20 до 50).

3.3.3 Дослідження впливу різних рівнів фунгіцидів та інсектицидів у кормах на люмінесценцію біоломінесцентних мікроорганізмів та їх токсикологічна характеристика. Вплив фунгіциду Карбендазол на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 2.21. Слід зазначити, що за внесення фунгіциду Карбендазол у корми в дозах 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 і 0,25 мг/кг, починаючи з 5 хв досліду спостерігали повне пригнічення світіння *Ph. phosphoreum*. Виняток становило пригнічення світіння на 5 хв досліду за 0,01 мг/кг фунгіциду в 19,6 разів відносно контролю (рис. 2.21).

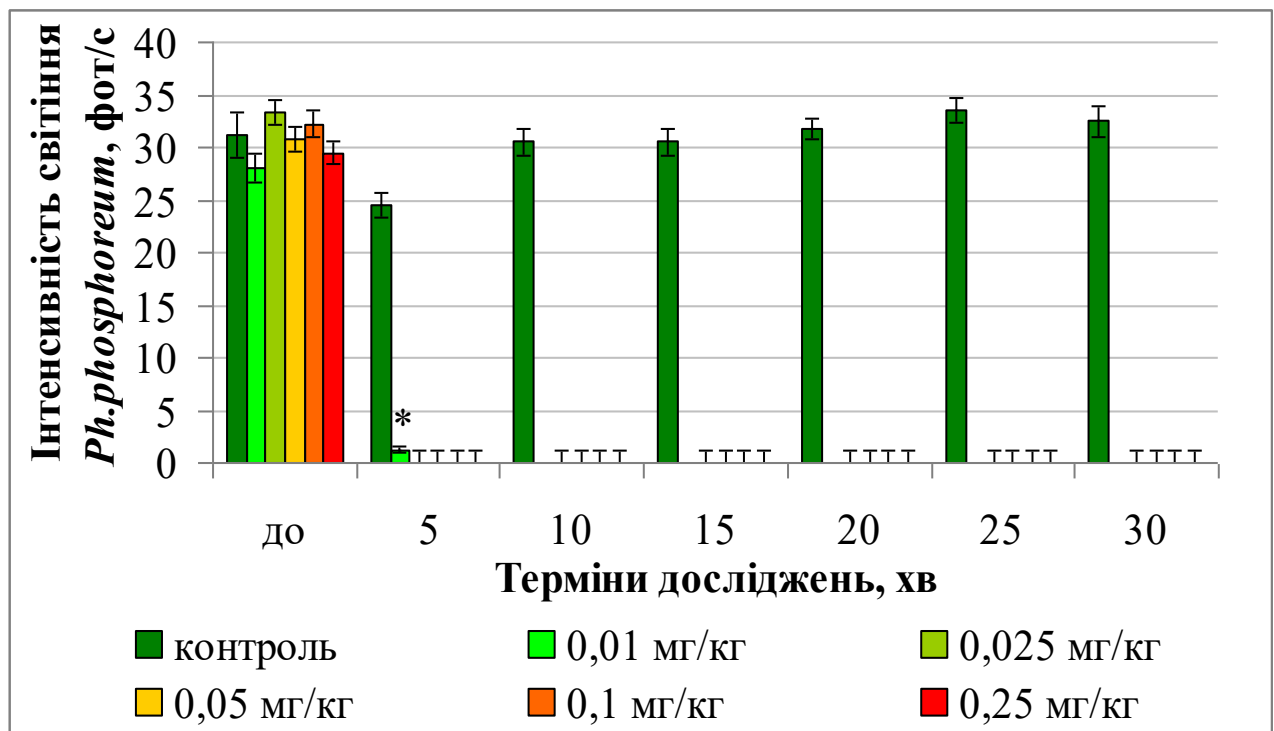


Рис. 3.21. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз фунгіциду Карбендазол (д.р. (карбендазим+ципроконазол) ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями фунгіциду Карбендазол. Так, за вмісту препарату від 0,01 до 0,25 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) у середньому становив 100,0 %. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом фунгіциду Карбендазол від 0,01 мг/кг включно є сильно токсичні (індекс токсичності більше 50).

Вплив інсектициду Велес на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 2.22. За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями інсектициду Велес до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення спостерігали вірогідне посилення світіння за усіх рівнів ($p < 0,05$): за 0,004 світіння посилювалося на 29,1 %; за 0,01 мг/кг корму – на 33,9 %; за 0,02 мг/кг – на 11,6 %; за 0,04 мг/кг – на 35,9 % і за 0,1 мг/кг корму інсектициду Велес на 15,5 % відносно контролю.

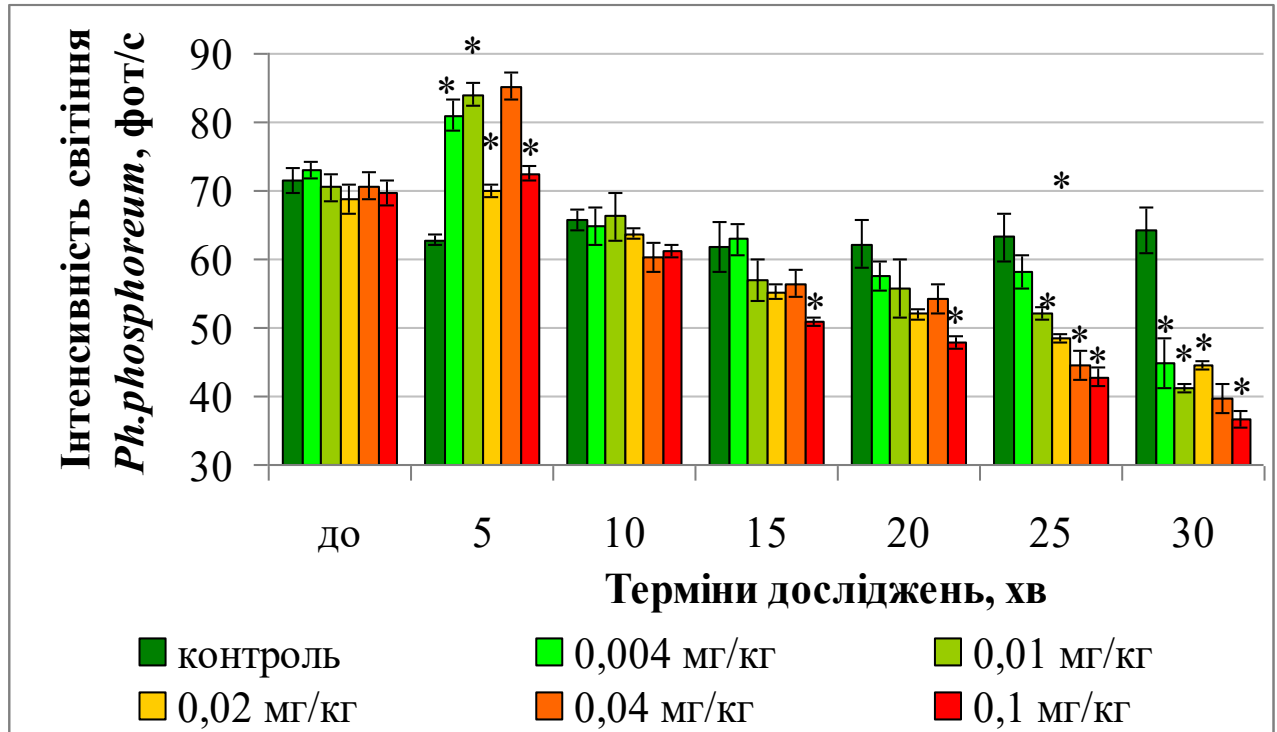


Рис. 3.22. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз інсектициду Велес (д.р. (тіаклоприд+дельтаметрин) ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

На 10 хв експерименту не спостерігали вірогідного відхилення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за усіх досліджуваних рівнів інсектициду Велес у кормах, хоча простежувалася дозозалежна тенденція до зниження. На 15 хв досліду не спостерігали вірогідного відхилення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за рівнів інсектициду Велес у кормах 0,004; 0,01; 0,02 і 0,04 мг/кг, а за рівня 0,1 мг/кг реєстрували зниження інтенсивності світіння на 17,4 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На 20 хв експерименту не спостерігали вірогідного відхилення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за рівнів інсектициду Велес у кормах 0,004; 0,01; 0,02 і 0,04 мг/кг, а за рівня 0,1 мг/кг реєстрували зниження інтенсивності світіння на 22,9 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На 25 хв експерименту не спостерігали вірогідного відхилення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* лише за рівня інсектициду Велес у кормах 0,004 мг/кг, а за рівнів 0,01; 0,02; 0,04 і 0,1 мг/кг реєстрували зниження інтенсивності світіння ($p < 0,05$) на 17,8; 23,3; 29,6 і 32,4 % відповідно відносно контролю. На останньому терміні досліджень (30 хв) спостерігали пригнічення світіння *Ph. phosphoreum* на всіх досліджуваних рівнях інсектициду Велес у кормах ($p < 0,05$): за 0,004 мг/кг на 30,4 %; за 0,01 мг/кг – 35,8 %; за 0,02 мг/кг – 30,7 %; за 0,04 мг/кг – 38,1 % і за 0,1 мг/кг – 42,8 % відносно контролю (рис. 2.22).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями інсектициду Велес. Так, за вмісту препарату 0,004 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) у середньому становив 7,8; за вмісту 0,01 мг/кг корму – 14,1; за 0,02 мг/кг корму (показник МДР) – 19,9; за 0,04 мг/кг корму – 21,2 і за 0,1 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 27,7. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом інсектициду Велес менше 0,004 та до 0,02 мг/кг корму включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), а за вмісту від 0,04 до 0,1 мг/кг включно корми токсичні (індекс токсичності від 20 до 50).

Вплив інсектициду Вирій на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 2.23. За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями інсектициду Вирій до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення спостерігали посилення світіння за усіх рівнів: за 0,004 світіння посилювалося на 67,6 % ($p < 0,05$); за 0,01 мг/кг корму – на 69,8 % ($p < 0,05$); за 0,02 мг/кг – на 27,9 % ($p < 0,05$); за 0,04 мг/кг – на 26,5 % ($p < 0,05$) і за 0,1 мг/кг корму інсектициду Вирій підвищення було не вірогідним (2,9 %) відносно контролю. На 10 хв експерименту спостерігали посилення світіння за рівнів інсектициду 0,004 (не вірогідне 1,8 %) і 0,01 мг/кг корму на 13,5 % ($p < 0,05$), тоді як за 0,02; 0,04 і 0,1 мг/кг інтенсивність світіння знижувалася ($p < 0,05$) на 18,8; 22,4 і 19,7 % відповідно відносно контролю.

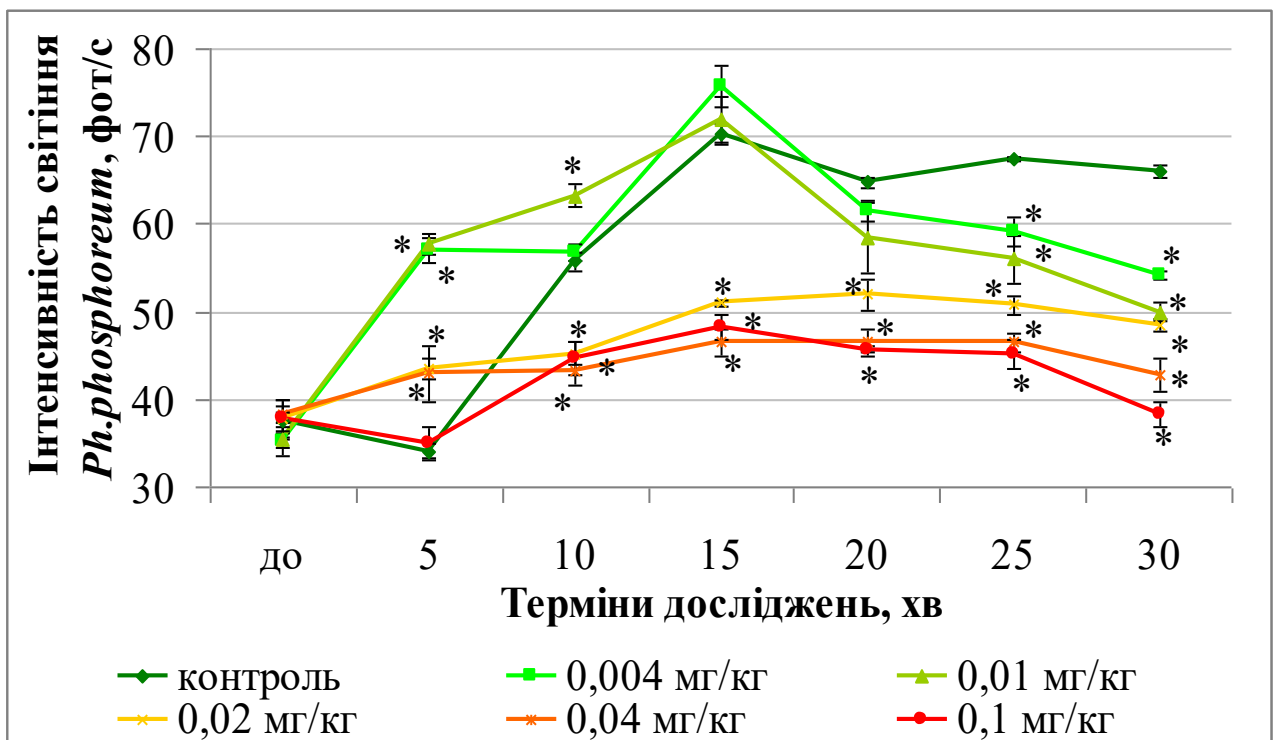


Рис. 3.23. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз інсектициду Вирій (д.р. тіаклоприд) ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

На 15 хв досліджу спостерігали посилення світіння за рівнів інсектициду Вирій 0,004 і 0,01 мг/кг корму, проте воно було не вірогідним (7,8 і 2,5 %

відповідно), тоді як за 0,02; 0,04 і 0,1 мг/кг інтенсивність світіння знижувалася ($p < 0,05$) на 27,4; 33,8 і 31,3 % відповідно відносно контролю. На 20 хв досліді спостерігали пригнічення світіння *Ph. phosphoreum* за усіх рівнів інсектициду Вирій, проте за 0,004 і 0,01 мг/кг корму воно було не вірогідним (5,0 і 9,7 % відповідно), а за 0,02; 0,04 і 0,1 мг/кг інтенсивність світіння знижувалася ($p < 0,05$) на 19,7; 28,2 і 29,3 % відповідно відносно контролю. На 25 хв експерименту спостерігали пригнічення світіння *Ph. phosphoreum* за усіх рівнів інсектициду Вирій у кормах ($p < 0,05$): 0,004 мг/кг на 12,2 %; за 0,01 мг/кг – 17,0 %; за 0,02; 0,04 і 0,1 мг/кг корму інтенсивність світіння знижувалася на 24,8; 31,1 і 32,9 % відповідно відносно контролю. Аналогічною була картина на останньому терміні досліджень (30 хв): за усіх рівнів інсектициду Вирій у кормах спостерігали пригнічення світіння *Ph. phosphoreum* ($p < 0,05$): за 0,004; 0,01; 0,02; 0,04 і 0,1 мг/кг на 17,8; 24,2; 26,5; 35,2 і 42,0 % відповідно відносно контролю (рис. 2.23).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями інсектициду Вирій. Так, за вмісту препарату 0,004 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) у середньому становив 8,6; за вмісту 0,01 мг/кг корму – 13,3; за 0,02 мг/кг корму (показник МДР) – 22,3; за 0,04 мг/кг корму – 29,6 і за 0,1 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 31,2. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом інсектициду Вирій менше 0,004 та до 0,01 мг/кг корму включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), а за вмісту від 0,02 до 0,1 мг/кг включно корми токсичні (індекс токсичності від 20 до 50).

Результати підрозділу опубліковані в роботі [201].

3.4 Вивчення впливу різних рівнів мікотоксинів у кормах на люмінесценцію біоломінесцентних мікроорганізмів та їх токсикологічна характеристика

Вплив мікотоксину T_2 на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.24.

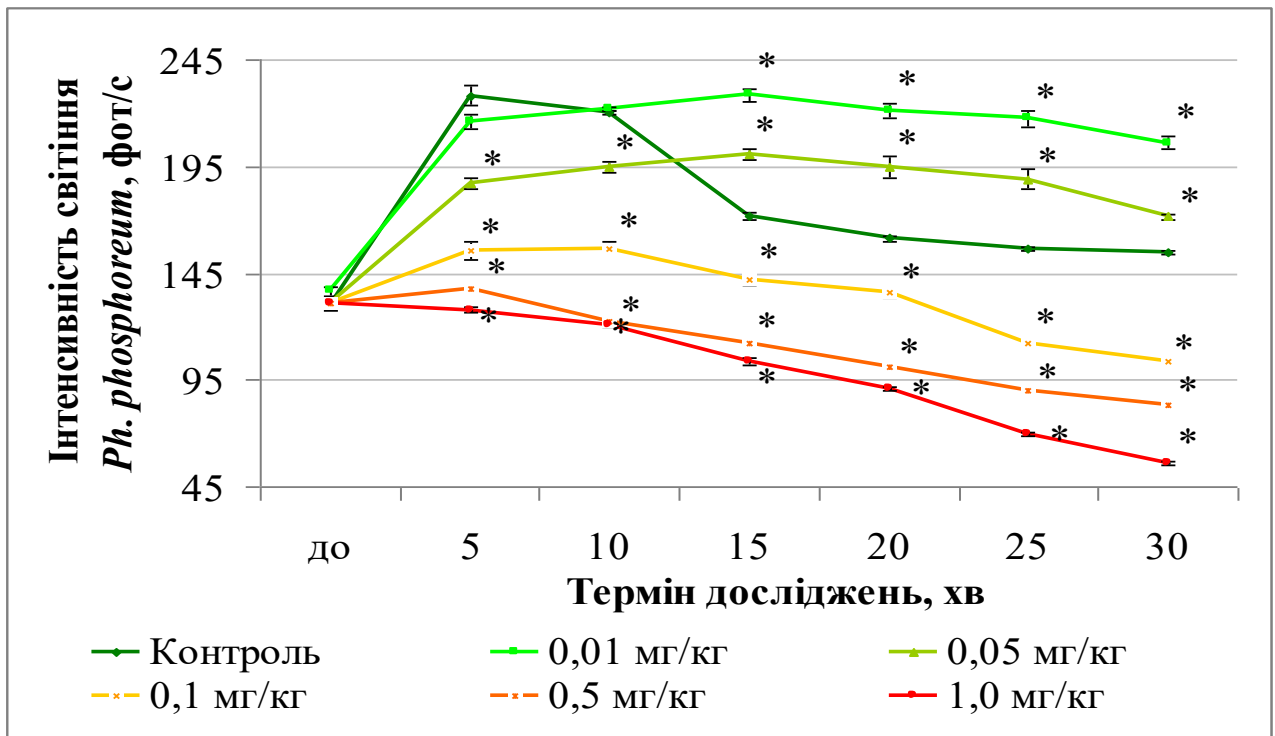


Рис. 3.24. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз T_2 мікотоксину ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями мікотоксину T_2 до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення спостерігали пригнічення світіння за усіх рівнів: за 0,01 мг/кг корму – не вірогідне (на 5,4 %); за 0,05 мг/кг корму – на 18,0 % ($p < 0,05$); за 0,1 мг/кг – на 31,9 % ($p < 0,05$); за 0,5 мг/кг – на 39,6 % ($p < 0,05$) і за 1,0 мг/кг корму мікотоксину T_2 інтенсивність світіння знижувалася на 44,0 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На 10 хв експерименту спостерігали посилення світіння за рівня мікотоксину T_2 в кормі 0,01 мг/кг (не

вірогідне 0,8 %), тоді як за 0,05; 0,1; 0,5 і 1,0 мг/кг корму інтенсивність світіння знижувалася ($p < 0,05$) на 11,6; 28,8; 49,5 і 45,1 % відповідно відносно контролю.

На 15 хв досліді спостерігали посилення світіння за рівнів мікотоксину T_2 0,01 і 0,05 мг/кг корму на 33,0 і 16,0 % відповідно ($p < 0,05$), тоді як за 0,1; 0,5 і 1,0 мг/кг інтенсивність світіння знижувалася ($p < 0,05$) на 17,5; 34,6 і 39,4 % відповідно відносно контролю. Аналогічну картину спостерігали на 20 хв досліді: посилення світіння за рівнів мікотоксину T_2 0,01 і 0,05 мг/кг корму на 37,2 і 20,8 % відповідно ($p < 0,05$), тоді як за 0,1; 0,5 і 1,0 мг/кг інтенсивність світіння знижувалася ($p < 0,05$) на 15,7; 37,2 і 43,6 % відповідно відносно контролю. На 25 хв після внесення екстрактів з кормів встановлено, що за рівнів мікотоксину T_2 0,01 і 0,05 мг/кг корму інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* посилювалася на 38,8 і 20,7 % відповідно ($p < 0,05$), а за рівнів 0,1; 0,5 і 1,0 мг/кг корму інтенсивність світіння знижувалася ($p < 0,05$) на 28,5; 42,7 і 55,5 % відповідно відносно контролю. Таку ж тенденцію спостерігали й на останньому терміні досліджень (30 хв): посилення інтенсивності світіння ($p < 0,05$) за рівня мікотоксину T_2 0,01 і 0,05 мг/кг корму на 33,3 і 10,8 % та зниження інтенсивності світіння ($p < 0,05$) за рівнів 0,1; 0,5 і 1,0 мг/кг корму на 33,0; 46,2 і 63,7 % відповідно відносно контролю (рис. 3.24).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями мікотоксину T_2 . Так, за вмісту мікотоксину 0,01 і 0,05 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) був від'ємний і у середньому становив мінус 38,0 і мінус 20,8; за вмісту 0,1 мг/кг корму (показник МДР) – 22,1; за 0,5 мг/кг корму – 40,0; і за 1,0 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 49,6. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом мікотоксину T_2 менше 0,01 та до 0,05 мг/кг корму включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), а за вмісту від 0,01 до 1,0 мг/кг включно корми токсичні (індекс токсичності від 20 до 50).

Вплив мікотоксину зеараленону на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.25.

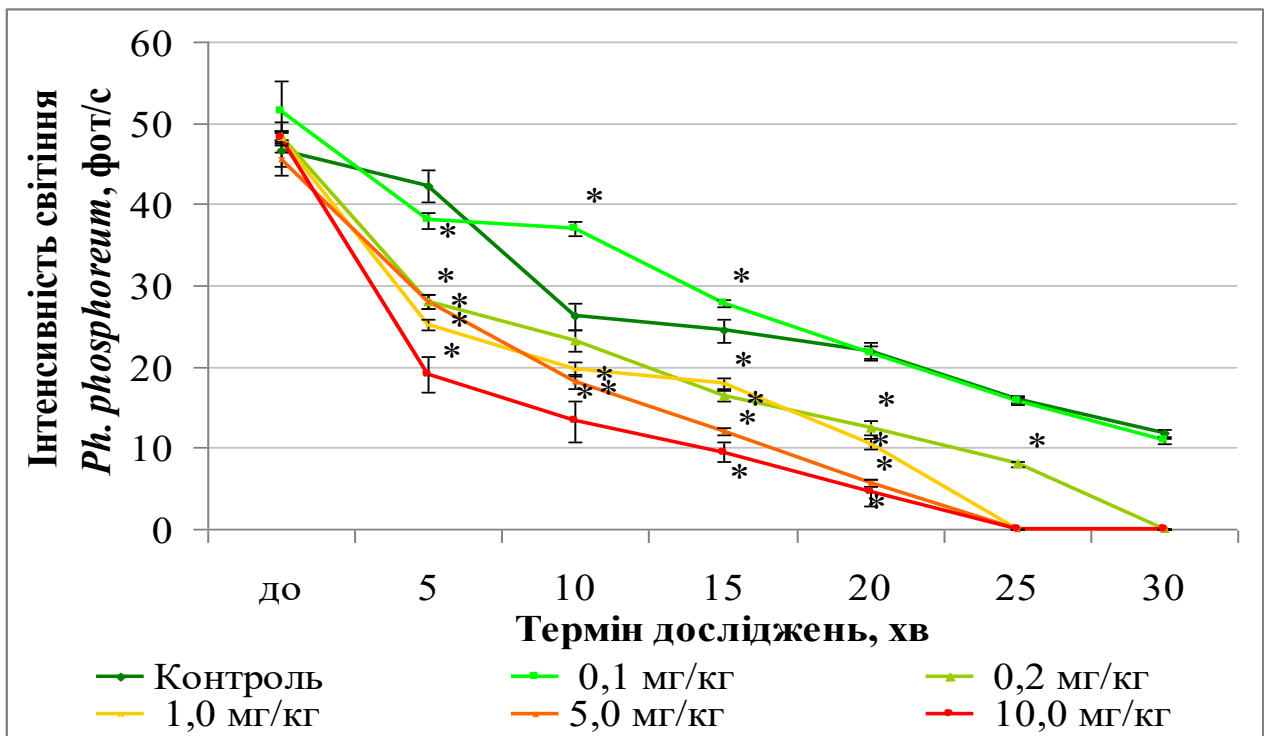


Рис. 3.25. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз зеараленону ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

Так, за умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями мікотоксину зеараленону до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення спостерігали пригнічення світіння за усіх рівнів ($p < 0,05$): за 0,1 мг/кг корму – на 10,1 %; за 0,2 мг/кг корму – на 33,7 %; за 1,0 мг/кг – на 40,2 %; за 5,0 мг/кг – на 33,7 % і за 10,0 мг/кг корму зеараленону інтенсивність світіння знижувалася на 55,0 % відносно контролю. На 10 хв експерименту спостерігали посилення світіння за рівня зеараленону в кормі 0,1 мг/кг ($p < 0,05$) на 41,0 %, а за рівня 0,2 мг/кг не відмічали вірогідних відхилень інтенсивності світіння (хоча вона знижувалася на 11,4 %), тоді як за 1,0; 5,0 і 10,0 мг/кг корму інтенсивність світіння знижувалася ($p < 0,05$) на 24,8; 30,5 і 49,5 % відповідно відносно контролю. Схожу динаміку спостерігали на 15 хв дослідження: за рівня зеараленону в кормі 0,1 мг/кг посилення світіння *Ph. phosphoreum* становило 13,3 %

($p < 0,05$), тоді як за рівнів 0,2; 1,0; 5,0 і 10,0 мг/кг корму інтенсивність світіння знижувалася ($p < 0,05$) на 32,6; 26,5; 51,0 і 61,2 % відповідно відносно контролю.

На 20 хв після внесення екстрактів кормів за рівня зеараленону в кормі 0,1 мг/кг не спостерігали вірогідних відмінностей від контролю, а за рівнів мікотоксину 0,2; 1,0; 5,0 і 10,0 мг/кг інтенсивність світіння знижувалася ($p < 0,05$) на 43,2; 52,3; 73,9 і 79,5 % відповідно відносно контролю. На 25 хв досліді за рівня зеараленону в кормі 0,1 мг/кг також не спостерігали вірогідних відмінностей інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, за рівня мікотоксину 0,2 мг/кг корму – вірогідне пригнічення світіння складало 50,0 %, а за рівнів 1,0; 5,0 і 10,0 мг/кг на даному терміні реєстрували повне пригнічення світіння. І на останньому терміні досліджень за рівня мікотоксину 0,1 мг/кг корму вірогідних відмінностей інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* не спостерігали, тоді як за рівнів зеараленону 0,2; 1,0; 5,0 і 10,0 мг/кг реєстрували повне пригнічення світіння (рис. 3.25).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями мікотоксину зеараленону. Так, за вмісту мікотоксину 0,1 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) становив 1,4; за вмісту 0,2 мг/кг корму – 46,6; за 1,0 мг/кг (показник МДР) – 76,2; за 5,0 мг/кг корму – 87,0 і за 10,0 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 89,8. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом мікотоксину зеараленону менше 0,1 включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), за вмісту 0,2 мг/кг корму – токсичні (індекс токсичності від 20 до 50), а за вмісту від 1,0 до 10,0 мг/кг включно корми сильно токсичні (індекс токсичності більше 50).

Вплив мікотоксину дезоксиніваленолу (ДОНу) на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.26. Так, за умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями мікотоксину ДОНу до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення спостерігали пригнічення світіння за усіх рівнів ($p < 0,05$): за 0,05 мг/кг корму – на 17,7 %; за

0,1 мг/кг корму – на 36,9 %; за 0,5 мг/кг – на 61,3 %; за 1,0 мг/кг – на 63,3 % і за 2,0 мг/кг корму ДОНу інтенсивність світіння знижувалася на 65,2 % відносно контролю. На 10 хв експерименту спостерігали аналогічну картину: за 0,05 мг/кг ДОНу в кормі інтенсивність світіння знижувалася на 23,5 %; за 0,1 мг/кг корму – на 35,6 %; за 0,5 мг/кг – на 60,6 %; за 1,0 мг/кг – на 63,1 % і за 2,0 мг/кг корму ДОНу інтенсивність світіння знижувалася на 71,6 % відносно контролю. На 15 хв досліду за рівня ДОНу 0,05 мг/кг корму спостерігали невірогідне підвищення інтенсивності світіння (7,1 %), тоді як за рівнів мікотоксину 0,1; 0,5; 1,0 і 2,0 мг/кг інтенсивність світіння знижувалася ($p < 0,05$) на 19,2; 50,4; 50,7 і 63,9 % відповідно відносно контролю. На 20 хв досліду за рівня ДОНу 0,05 мг/кг корму спостерігали невірогідне підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* (11,5 %), тоді як за рівнів мікотоксину 0,1; 0,5; 1,0 і 2,0 мг/кг інтенсивність світіння знижувалася ($p < 0,05$) на 15,2; 46,5; 48,2 і 62,5 % відповідно відносно контролю.

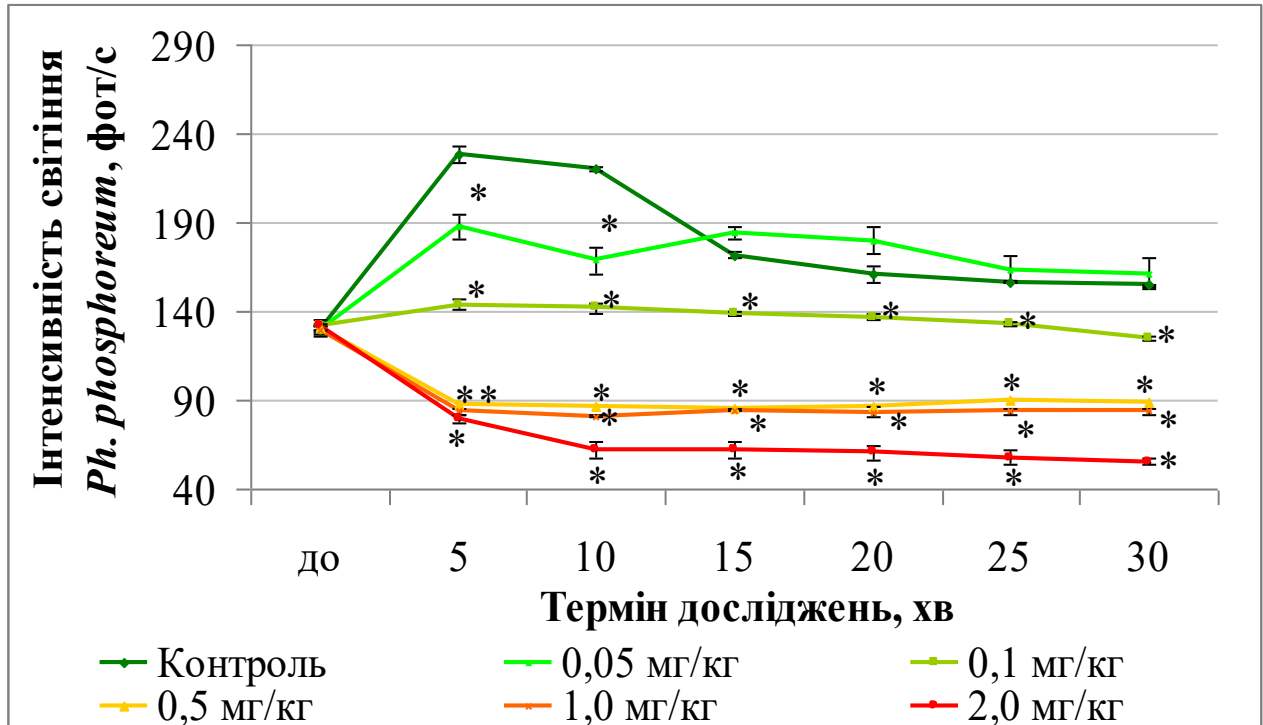


Рис. 3.26. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз ДОНу ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

На 25 хв досліду за рівня ДОНу 0,05 мг/кг корму спостерігали невірогідне підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* (4,3 %), тоді як за рівнів мікотоксину 0,1; 0,5; 1,0 і 2,0 мг/кг інтенсивність світіння знижувалася ($p < 0,05$) на 15,3; 42,6; 46,6 і 63,0 % відповідно відносно контролю. Аналогічною була динаміка світіння і на 30 хв досліду: за рівня ДОНу 0,05 мг/кг корму спостерігали невірогідне підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* (4,4 %), тоді як за рівнів мікотоксину 0,1; 0,5; 1,0 і 2,0 мг/кг інтенсивність світіння знижувалася ($p < 0,05$) на 19,4; 42,3; 45,9 і 64,1 % відповідно відносно контролю (рис. 3.26).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями мікотоксину ДОНу. Так, за вмісту мікотоксину 0,05 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) був від'ємний і у середньому становив мінус 7,9; за вмісту 0,1 мг/кг корму – 15,3; за 0,5 мг/кг – 44,6; за 1,0 мг/кг корму (показник МДР) – 47,4 і за 2,0 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 62,8. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом мікотоксину ДОНу менше 0,05 до 0,1 мг/кг включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), за вмісту 0,5 до 1,0 мг/кг корму – токсичні (індекс токсичності від 20 до 50), а за вмісту від 2,0 мг/кг включно корми сильно токсичні (індекс токсичності більше 50).

Вплив мікотоксину охратоксину А на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.27. Так, за умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями мікотоксину охратоксину А до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення за 0,005 мг/кг корму спостерігали незначне посилення інтенсивності світіння, тоді як на решті рівнів спостерігали пригнічення світіння ($p < 0,05$): за 0,01 мг/кг корму – на 5,7 %; за 0,05 мг/кг – на 11,5 %; за 0,1 мг/кг – на 12,7 % і за 0,5 мг/кг корму на 43,0 % відносно контролю.

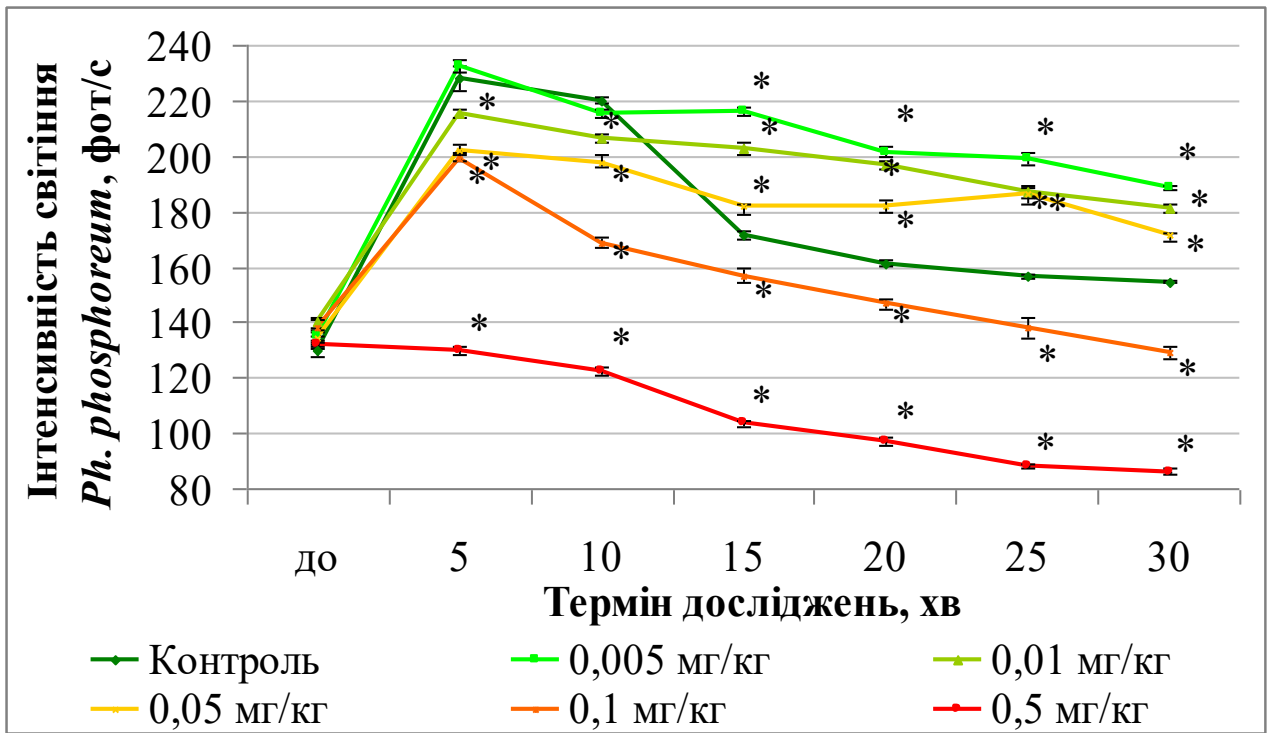


Рис. 3.27. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз охратоксину А ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

На 10 хв експерименту за рівня охратоксину А 0,005 мг/кг корму спостерігали незначне пригнічення інтенсивності світіння, тоді як на решті рівнів спостерігали вірогідне пригнічення світіння ($p < 0,05$): за 0,01 мг/кг корму – на 6,4 %; за 0,05 мг/кг – на 10,2 %; за 0,1 мг/кг – на 23,4 % і за 0,5 мг/кг корму на 44,5 % відносно контролю. На 15 хв досліджу за рівнів мікотоксину в кормі 0,005; 0,01 і 0,05 мг/кг реєстрували вірогідне підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* ($p < 0,05$) на 25,9; 18,0 і 5,8 % відповідно, тоді як за рівнів 0,1 і 0,5 мг/кг корму, навпаки, зниження – на 8,6 і 39,7 % ($p < 0,05$) відносно контролю. Схожою була динаміка інтенсивності світіння на 20 хв досліджу: за рівнів охратоксину А в кормі 0,005; 0,01 і 0,05 мг/кг реєстрували вірогідне підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* ($p < 0,05$) на 25,0; 22,0 і 12,9 % відповідно, тоді як за рівнів 0,1 і 0,5 мг/кг корму, навпаки, зниження – на 9,0 і 39,8 % ($p < 0,05$) відносно контролю. На 25 хв досліджу за рівнів охратоксину А в кормі 0,005; 0,01 і 0,05 мг/кг реєстрували вірогідне підвищення

інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* ($p < 0,05$) на 27,1; 19,3 і 19,1 % відповідно, тоді як за рівнів 0,1 і 0,5 мг/кг корму, навпаки, зниження – на 11,8 і 43,7 % ($p < 0,05$) відносно контролю.

І на останньому терміні досліджень за рівнів охратоксину А в кормі 0,005; 0,01 і 0,05 мг/кг реєстрували вірогідне підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* ($p < 0,05$) на 21,8; 17,1 і 10,7 % відповідно, тоді як за рівнів 0,1 і 0,5 мг/кг корму, навпаки, зниження – на 16,6 і 44,4 % ($p < 0,05$) відносно контролю (рис. 3.27).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями мікотоксину охратоксину А. Так, за вмісту мікотоксину 0,005; 0,01 і 0,05 (показник МДР) мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) був від'ємний і у середньому становив мінус 26,0; 20,7 і 16,0; а за вмісту 0,1 і 0,5 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 10,4 і 41,8. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом мікотоксину охратоксину А менше 0,005 до 0,1 мг/кг включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), за вмісту 0,5 мг/кг – токсичні (індекс токсичності від 20 до 50).

Вплив мікотоксину фумонізину на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.28. За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями мікотоксину фумонізину до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення за 0,5-10,0 мг/кг корму спостерігали посилення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, причому за 0,5; 1,0 і 5,0 мг/кг – вірогідне ($p < 0,05$) (на 50,6; 18,6 і 16,2 %), а за рівня 10,0 мг/кг – не вірогідне (1,6 %), тоді як за рівня мікотоксину 15,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 11,7 % ($p < 0,05$). На 10 хв експерименту за рівня мікотоксину 0,5 мг/кг корму спостерігали посилення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* на 44,3 % ($p < 0,05$), за рівнів 1,0 і 5,0 мг/кг – вірогідних відхилень від контролю не реєстрували, а за рівнів 10,0 і 15,0 мг/кг корму інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 18,3 і 35,3 % відповідно

($p < 0,05$). На 15 хв експерименту за рівня мікотоксину 0,5 мг/кг корму спостерігали посилення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* на 35,1 % ($p < 0,05$), за рівня 1,0 мг/кг – вірогідних відхилень від контролю не реєстрували, а за рівнів 5,0; 10,0 і 15,0 мг/кг корму інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 13,2; 41,6 і 49,0 % відповідно ($p < 0,05$). На 20 хв досліду за рівня мікотоксину 0,5 мг/кг корму спостерігали посилення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* на 23,9 % ($p < 0,05$), а за рівнів 1,0; 5,0; 10,0 і 15,0 мг/кг корму інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 14,9; 18,0; 47,8 і 54,3 % відповідно ($p < 0,05$). На 25 хв експерименту за рівня мікотоксину 0,5 мг/кг корму вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* не спостерігали, а за рівнів 1,0; 5,0; 10,0 і 15,0 мг/кг корму інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 20,5; 22,7; 52,2 і 56,8 % відповідно ($p < 0,05$).

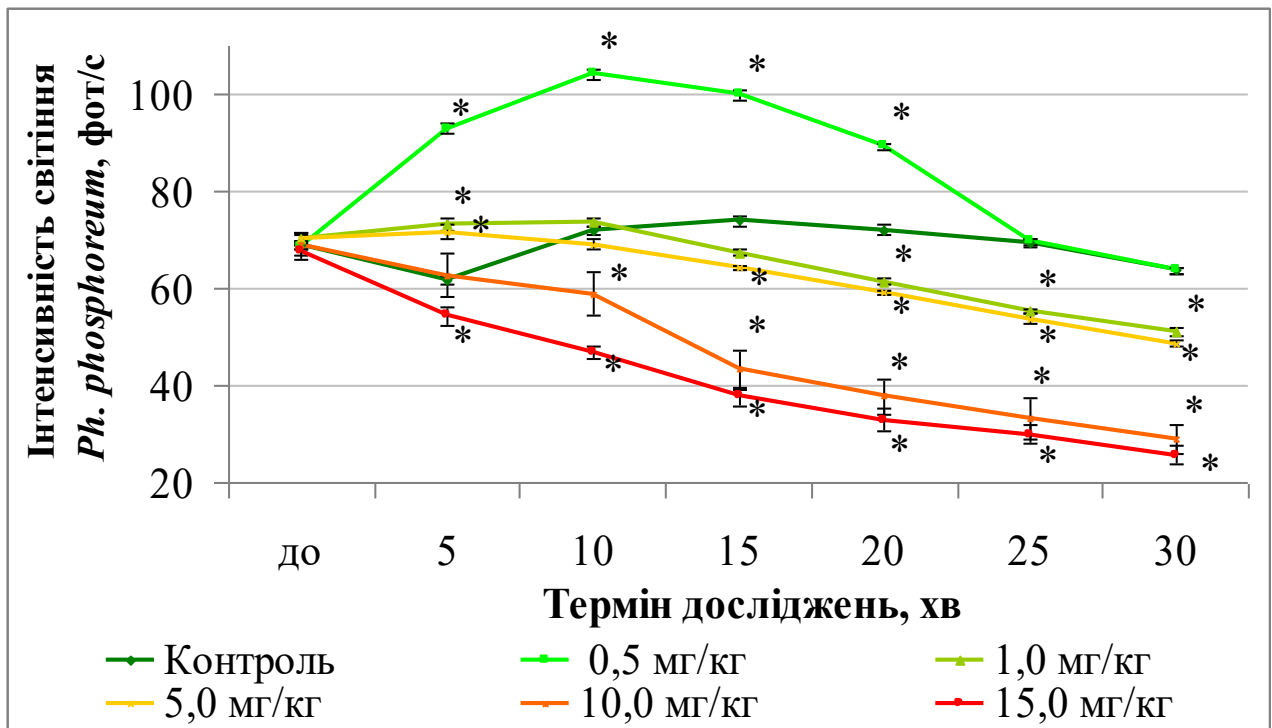


Рис. 3.28. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз фумонізіну ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

Аналогічну картину реєстрували і на останньому терміні досліджень: за рівня фумонізіну 0,5 мг/кг корму вірогідних відхилень інтенсивності світіння

Ph. phosphoreum не спостерігали, а за рівнів 1,0; 5,0; 10,0 і 15,0 мг/кг корму інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 19,6; 23,5; 54,5 і 59,6 % відповідно ($p < 0,05$) (рис. 3.28).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями мікотоксину фумонізину. Так, за вмісту мікотоксину 0,5 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) був від'ємний і у середньому становив мінус 12,1; а за вмісту 1,0; 5,0 (показник МДР); 10,0 і 15,0 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 17,7; 20,3; 50,0 і 55,6. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом мікотоксину фумонізину менше 0,5 до 1,0 мг/кг включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), за вмісту від 5,0 до 10,0 мг/кг – токсичні (індекс токсичності від 20 до 50) і за 15,0 мг/кг – корми сильно токсичні (індекс токсичності більше 50).

Вплив мікотоксину афлатоксину В₁ на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.29. За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями мікотоксину афлатоксину В₁ до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення за 0,001 і 0,005 мг/кг корму спостерігали посилення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* ($p < 0,05$) на 24,2 і 21,0 %, тоді як за рівнів мікотоксину 0,01; 0,05 і 0,1 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 19,3; 48,2 і 46,4 % ($p < 0,05$). На 10 хв досліді за рівнів афлатоксину В₁ 0,001 і 0,005 мг/кг корму спостерігали посилення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* ($p < 0,05$) на 62,2 і 21,6 %, тоді як за рівнів мікотоксину 0,01; 0,05 і 0,1 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 24,9; 49,1 і 56,9 % ($p < 0,05$). На 15 хв досліді за рівнів мікотоксину 0,001 і 0,005 мг/кг корму спостерігали посилення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* ($p < 0,05$) на 92,4 і 38,2 %, тоді як за рівнів мікотоксину 0,01; 0,05 і 0,1 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 22,8; 45,3 і 56,1 % ($p < 0,05$).

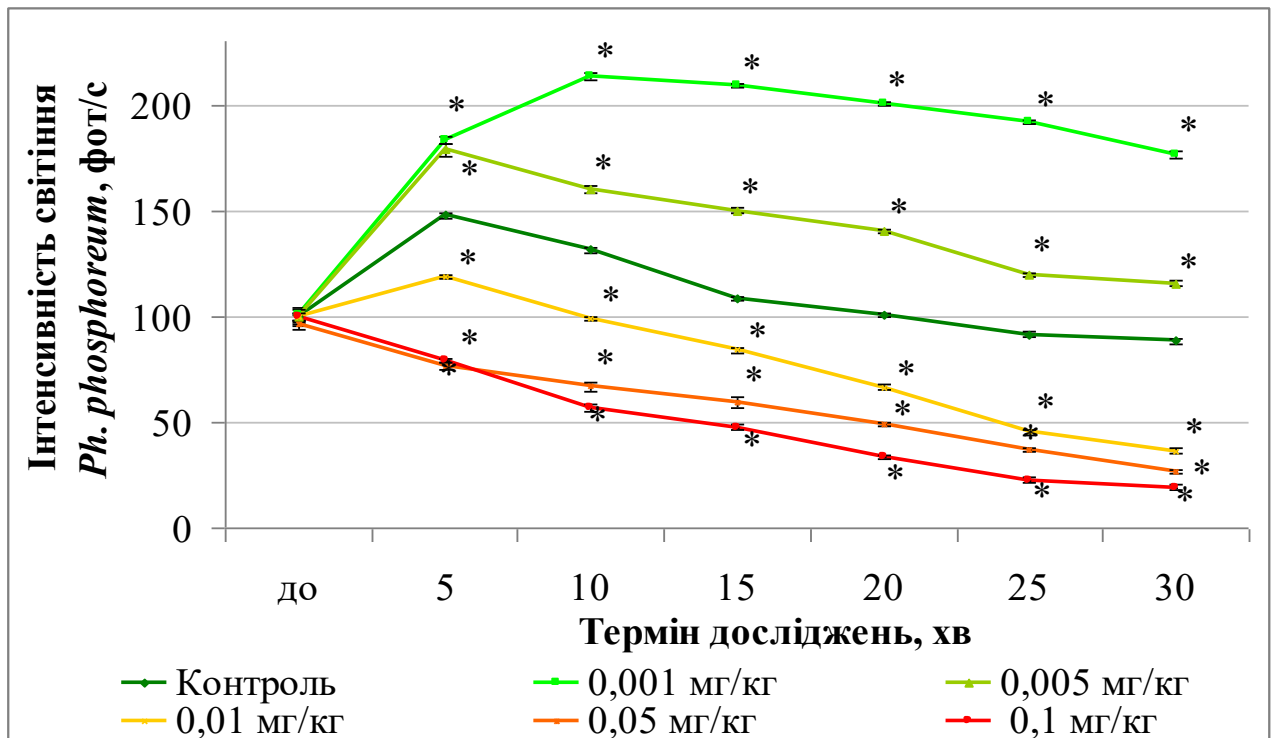


Рис. 3.29. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз афлатоксину В₁ ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

На 20 хв досліджу за рівнів мікотоксину 0,001 і 0,005 мг/кг корму спостерігали посилення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* ($p < 0,05$) на 99,0 і 39,2 %, тоді як за рівнів мікотоксину 0,01; 0,05 і 0,1 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 33,7; 51,4 і 66,7 % ($p < 0,05$). На 25 хв експерименту за рівнів афлатоксину В₁ 0,001 і 0,005 мг/кг корму спостерігали посилення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* ($p < 0,05$) на 109,8 і 30,9 %, тоді як за рівнів мікотоксину 0,01; 0,05 і 0,1 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 50,3; 59,8 і 75,1 % ($p < 0,05$). Аналогічну картину реєстрували і на останньому терміні досліджень: за рівнів афлатоксину В₁ 0,001 і 0,005 мг/кг корму спостерігали посилення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* ($p < 0,05$) на 99,4 і 30,8 %, тоді як за рівнів мікотоксину 0,01; 0,05 і 0,1 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 58,8; 70,1 і 78,2 % ($p < 0,05$) (рис. 3.29).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями мікотоксину афлатоксину В₁. Так, за вмісту мікотоксину 0,001 і 0,005 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) був від'ємний і у середньому становив мінус 104,4 і 35,1; а за вмісту 0,01 (показник МДР); 0,05 і 0,1 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 42,0; 55,6 і 70,9. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом мікотоксину афлатоксину В₁ менше 0,001 до 0,005 мг/кг включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), за вмісту 0,01 мг/кг – токсичними (індекс токсичності від 20 до 50) і за вище 0,05 мг/кг – корми сильно токсичні (індекс токсичності більше 50).

Результати підрозділу опубліковані в роботі [202].

3.5 Вивчення впливу різних рівнів неорганічних елементів у кормах на люмінесценцію біоломінесцентних мікроорганізмів та їх токсикологічна характеристика

3.5.1 Вивчення впливу різних рівнів важких металів у кормах на люмінесценцію біоломінесцентних мікроорганізмів та їх токсикологічна характеристика. Вплив арсену на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.30. За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями арсену до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення за 0,05 мг/кг корму не спостерігали вірогідних відмінностей світіння *Ph. phosphoreum*, тоді як за рівнів мікроелементу 0,1; 0,5; 2,5 і 5,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 14,9; 22,8; 29,9 і 47,4 % ($p < 0,05$). На 10 хв експерименту інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* була нижчою за контроль ($p < 0,05$) на всіх рівнях: за 0,05 мг/кг корму – на 6,0 %, за 0,1 мг/кг корму – на 16,4 %, за 0,5 мг/кг корму – на 36,10 %, за 2,5 мг/кг корму – на 38,4 % і за 5,0 мг/кг корму – на 50,0 %. Аналогічну картину спостерігали до кінця дослідження.

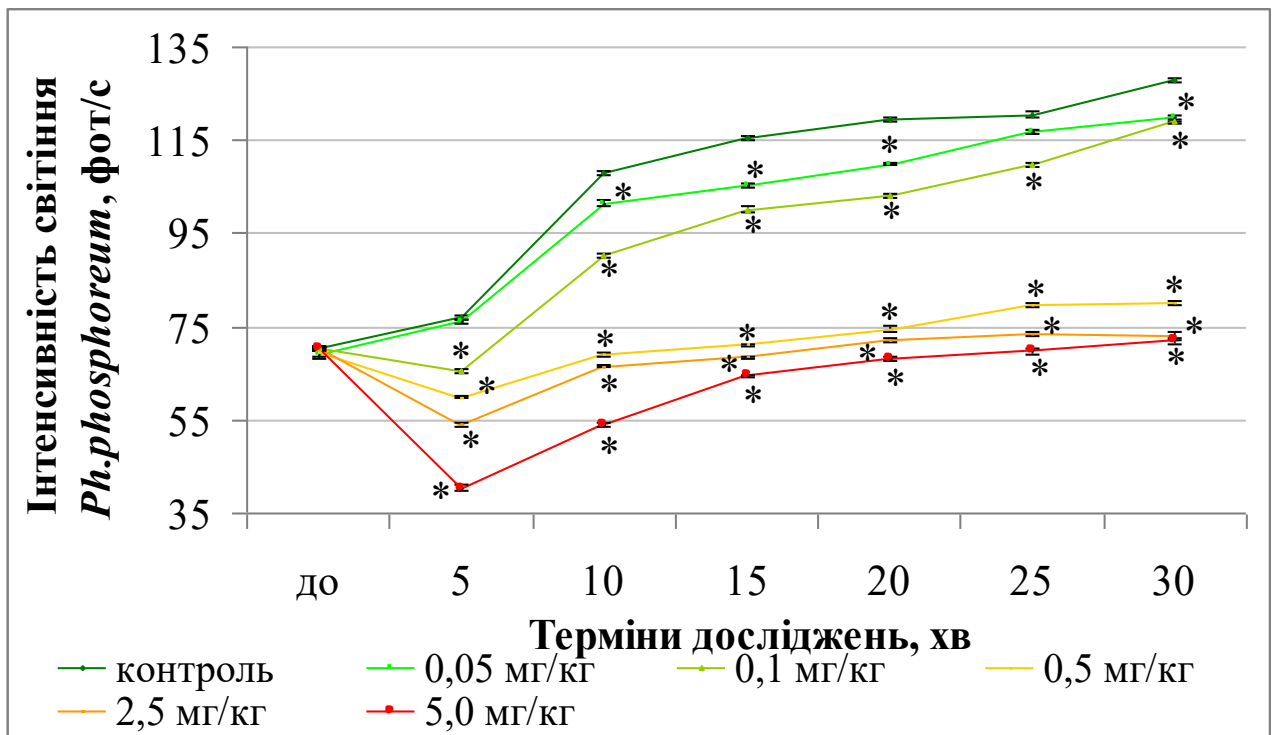


Рис. 3.30. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз арсену ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю)

Так, на 15 хв експерименту інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* була нижчою за контроль ($p < 0,05$): за рівнів мікроелементу 0,05; 0,1; 0,5; 2,5 і 5,0 мг/кг корму на 8,9; 13,2; 38,3; 40,7 і 44,2 % відповідно. На 20 хв зниження інтенсивності світіння становило на 7,9; 13,8; 37,7; 39,5 і 43,1 % відповідно ($p < 0,05$). На 25 хв за рівня арсену в кормі 0,05 мг/кг інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* була нижчою за контроль, проте не вірогідно (2,9 %), тоді як за 0,1; 0,5; 2,5 і 5,0 мг/кг корму виявляли вірогідне ($p < 0,05$) зниження інтенсивності світіння на 8,9; 33,8; 39,0 і 42,1 % відповідно. На останньому терміні досліджень інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* була нижчою за контроль ($p < 0,05$): за рівнів мікроелементу 0,05; 0,1; 0,5; 2,5 і 5,0 мг/кг корму на 6,3; 6,8; 37,4; 48,9 і 43,6 % відповідно (рис. 3.30).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями арсену. Так, за вмісту мікроелементу 0,05 і 0,1 мг/кг корму

індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) у середньому становив 5,4 і 11,4; а за вмісту 0,5 (показник МДР); 2,5 і 5,0 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 35,8; 39,3 і 42,6. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом арсену менше 0,05 до 0,1 мг/кг включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), за вмісту від 0,5 до 5,0 мг/кг – токсичними (індекс токсичності від 20 до 50).

Вплив кадмію на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.31.

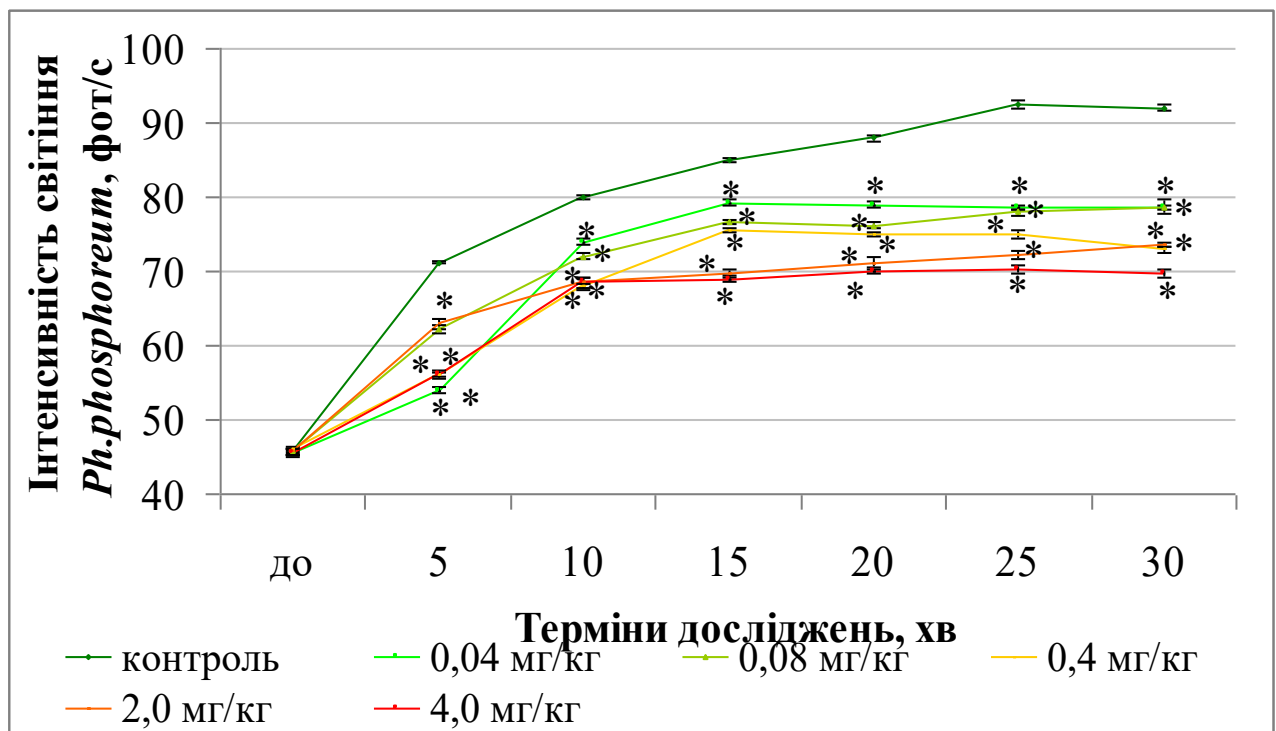


Рис. 3.31. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз кадмію ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями кадмію до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення спостерігали зниження інтенсивності світіння відносно контролю ($p < 0,05$) за рівнів мікроелементу 0,04; 0,08; 0,4; 2,0 і 4,0 мг/кг на 24,2; 12,6; 21,4; 11,6 і 21,1 %. На 10 хв експерименту інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* була нижчою за контроль

($p < 0,05$) на всіх рівнях мікроелементу: за 0,04 мг/кг корму – на 7,5 %, за 0,08 мг/кг корму – на 10,0 %, за 0,4 мг/кг корму – на 15,0 %, за 2,0 мг/кг корму – на 14,4 % і за 4,0 мг/кг корму – на 14,1 %. Аналогічну картину спостерігали до кінця дослідження. Так, на 15 хв експерименту інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* була нижчою за контроль ($p < 0,05$): за рівнів мікроелементу 0,04; 0,08; 0,4; 2,0 і 4,0 мг/кг корму на 6,8; 9,7; 11,2; 17,9 і 18,8 % відповідно. На 20 хв зниження інтенсивності світіння становило 10,2; 13,4; 14,7; 19,0 і 20,5 % відповідно ($p < 0,05$). На 25 хв за рівнів Кадмію в кормі 0,04; 0,08; 0,4; 2,0 і 4,0 мг/кг інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* була нижчою за контроль ($p < 0,05$) на 15,1; 15,7; 18,9; 21,9 і 24,1 % відповідно. На останньому терміні досліджень інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* була нижчою за контроль ($p < 0,05$): за рівнів мікроелементу 0,04; 0,08; 0,4; 2,0 і 4,0 мг/кг корму на 14,4; 14,7; 20,7; 20,1 і 24,2 % відповідно (рис. 3.31).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями Кадмію. Так, за вмісту мікроелементу 0,04; 0,08 і 0,4 (показник МДР) мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) у середньому становив 12,7; 14,5 і 16,8; а за вмісту 2,0 і 4,0 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 20,5 і 22,3. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом Кадмію менше 0,04 до 0,4 мг/кг включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), за вмісту від 2,0 до 4,0 мг/кг – токсичними (індекс токсичності від 20 до 50).

Вплив плумбуму на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.32. За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями плумбуму до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення за 0,5-1,0 мг/кг корму спостерігали посилення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* ($p < 0,05$) на 16,6 і 5,9 %, тоді як за рівня мікроелементу 5,0 мг/кг корму інтенсивність світіння була нижчою за контроль (не вірогідно 1,3 %), а за 25,0 і 50,0 мг/кг корму зниження було вірогідне ($p < 0,05$) і складало 21,8 і 37,8 % відповідно.

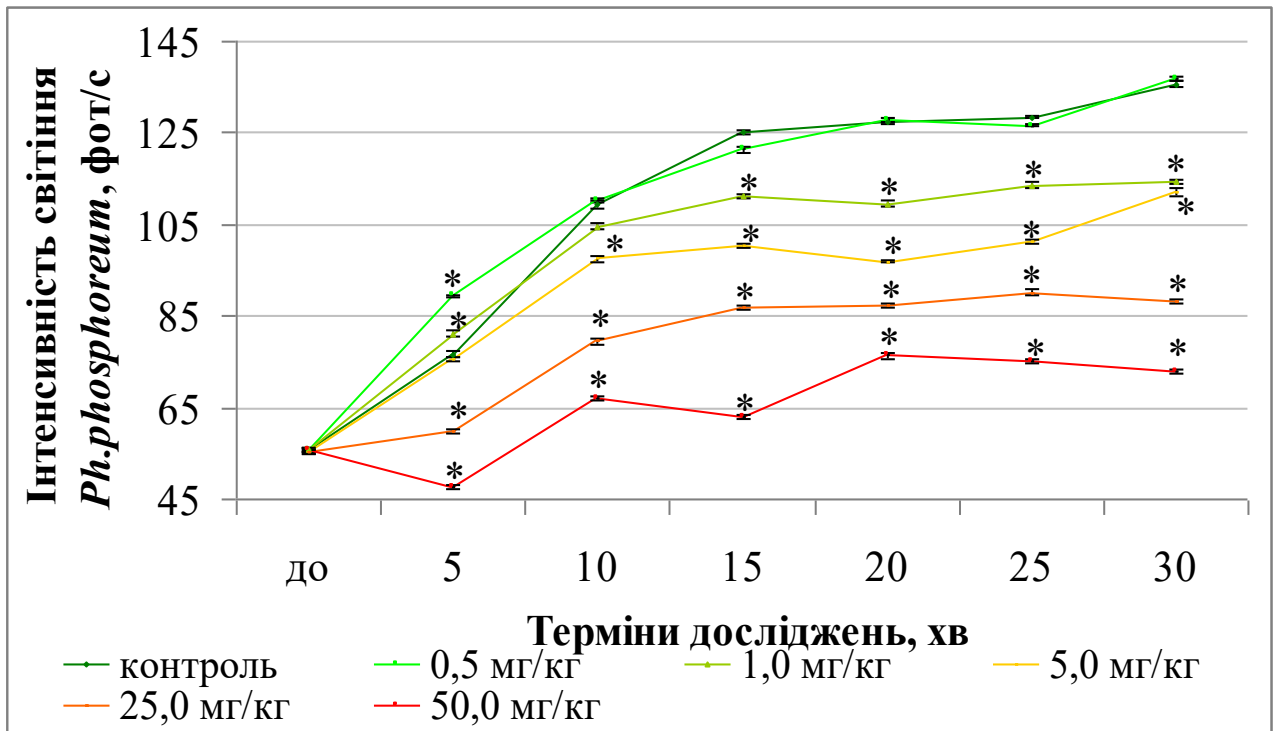


Рис. 3.32. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз плюмбуму ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

На 10 хв експерименту за рівня плюмбуму 0,5 мг/кг в кормі спостерігали посилення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* (проте воно було не вірогідним), а за рівня 1,0 мг/кг – зниження, яке також було не вірогідним, тоді як за рівнів плюмбуму в кормі 5,0; 25,0 і 50,0 мг/кг інтенсивність світіння знижувалася на 10,8; 27,2 і 38,4 % відповідно ($p < 0,05$). На 15 хв досліді на всіх рівнях реєстрували зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* (не вірогідне за рівня плюмбуму 0,5 мг/кг корму) та з вірогідністю ($p < 0,05$) за рівнів 1,0; 5,0; 25,0 і 50,0 мг/кг на 11,0; 19,8; 30,6 і 49,6 % відповідно відносно контролю. На 20 хв досліді за рівня плюмбуму в кормі 0,5 мг/кг не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, тоді як за рівнів 1,0; 5,0; 25,0 і 50,0 мг/кг інтенсивність світіння знижувалася на 13,9; 23,7; 31,4 і 39,9 % відповідно відносно контролю ($p < 0,05$). На 25 хв досліді на всіх рівнях реєстрували зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* (не вірогідне за рівня плюмбуму 0,5 мг/кг корму) та з вірогідністю ($p < 0,05$) за рівнів 1,0; 5,0;

25,0 і 50,0 мг/кг на 11,7; 21,2; 29,8 і 41,6 % відповідно відносно контролю. На 30 хв досліджу за рівня плумбуму в кормі 0,5 мг/кг не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, тоді як за рівнів 1,0; 5,0; 25,0 і 50,0 мг/кг інтенсивність світіння знижувалася на 15,8; 17,5; 35,0 і 46,4 % відповідно відносно контролю ($p < 0,05$) (рис. 3.32).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями Плумбуму. Так, за вмісту мікроелементу 0,5 і 1,0 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) у середньому становив 0,48 і 12,8; а за вмісту 5,0 (показник МДР), 25,0 і 50,0 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 22,5; 30,6 і 40,8. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом плумбуму менше 0,5 до 1,0 мг/кг включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), за вмісту від 5,0 до 50,0 мг/кг – токсичними (індекс токсичності від 20 до 50).

Вплив меркурію на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.33. За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями меркурію до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення спостерігали зниження інтенсивності світіння відносно контролю ($p < 0,05$) за рівнів мікроелементу 0,01; 0,02; 0,1; 0,5 і 1,0 мг/кг на 23,8; 15,8; 21,2; 21,7 і 19,7 %. На 10 хв експерименту інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* була також нижчою за контроль ($p < 0,05$) на всіх рівнях мікроелементу: за 0,01 мг/кг корму – на 18,6 %, за 0,02 мг/кг корму – на 18,1 %, за 0,1 мг/кг корму – на 19,0 %, за 0,5 мг/кг корму – на 18,6 % і за 1,0 мг/кг корму – на 20,7 %. Аналогічну картину спостерігали до кінця дослідження. На 15 хв експерименту інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* була також нижчою за контроль ($p < 0,05$) на всіх рівнях Меркурію: за 0,01 мг/кг корму – на 17,2 %, за 0,02 мг/кг корму – на 16,5 %, за 0,1 мг/кг корму – на 18,4 %, за 0,5 мг/кг корму – на 18,7 % і за 1,0 мг/кг корму – на 19,1 %. На 20 хв після внесення спостерігали зниження інтенсивності світіння відносно контролю ($p < 0,05$) за рівнів мікроелементу 0,01; 0,02; 0,1; 0,5 і 1,0 мг/кг на 18,6; 16,7; 18,6; 20,3 і 20,8 %.

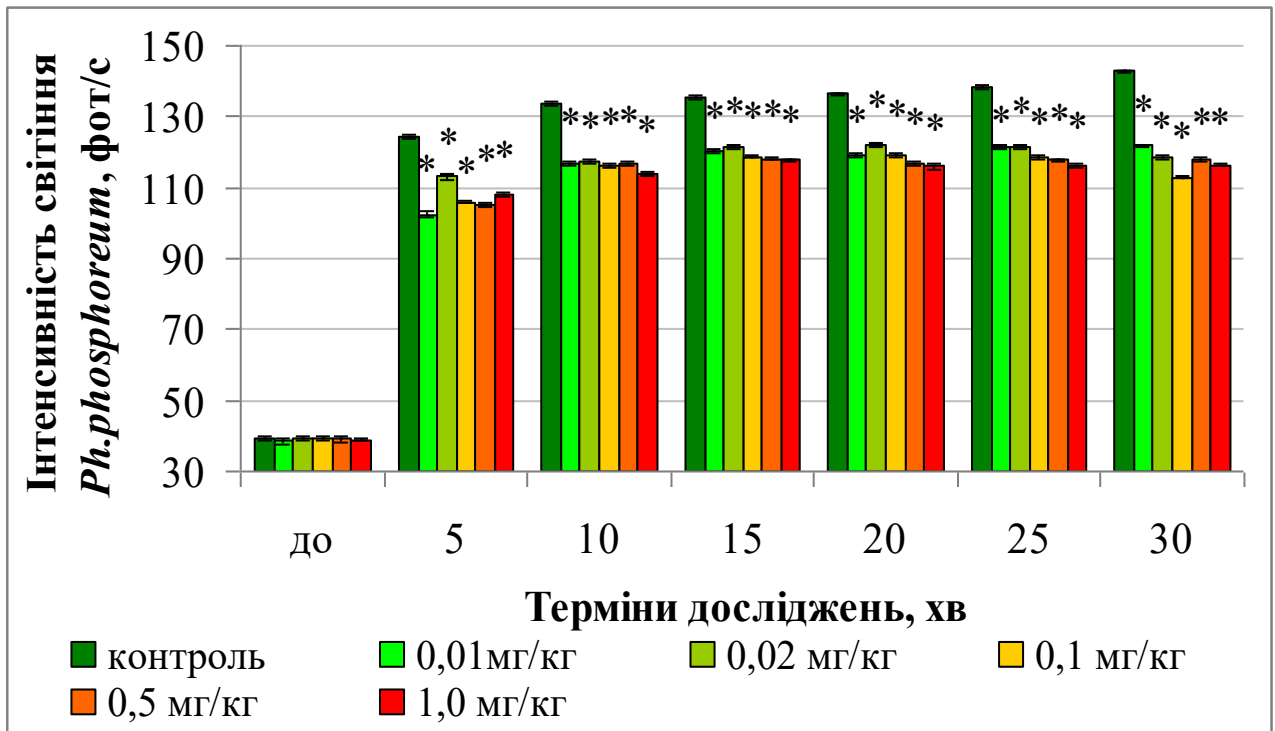


Рис. 3.33. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз меркурію ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

На 25 хв після внесення спостерігали зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відносно контролю ($p < 0,05$) за рівнів мікроелементу 0,01; 0,02; 0,1; 0,5 і 1,0 мг/кг на 18,2; 18,4; 20,0; 20,7 і 21,5 %. І на останньому терміні досліджень спостерігали зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відносно контролю ($p < 0,05$) за рівнів мікроелементу 0,01; 0,02; 0,1; 0,5 і 1,0 мг/кг на 20,3; 22,4; 26,0; 22,7 і 23,7 % (рис. 3.33).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями меркурію. Так, за вмісту мікроелементу 0,01; 0,02; 0,1 (показник МДР) мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) у середньому становив 18,4; 17,5 і 19,3; а за вмісту 0,5 і 1,0 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 20,5 і 21,2. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом меркурію менше 0,01 до 0,1 мг/кг включно є не токсичними (індекс токсичності менше

20), за вмісту від 0,5 до 1,0 мг/кг – токсичними (індекс токсичності від 20 до 50).

Вплив купруму на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.34. За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями купруму до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення за 2,5 і 5,0 мг/кг корму не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 25,0; 125,0 і 250,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 7,6; 20,1 і 30,3 % ($p < 0,05$). На 10 хв експерименту за рівня купруму в кормі 2,5 мг/кг не відмічали вірогідних змін інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 5,0; 25,0; 125,0 і 250,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 5,1; 17,1; 20,0 і 34,5 % ($p < 0,05$).

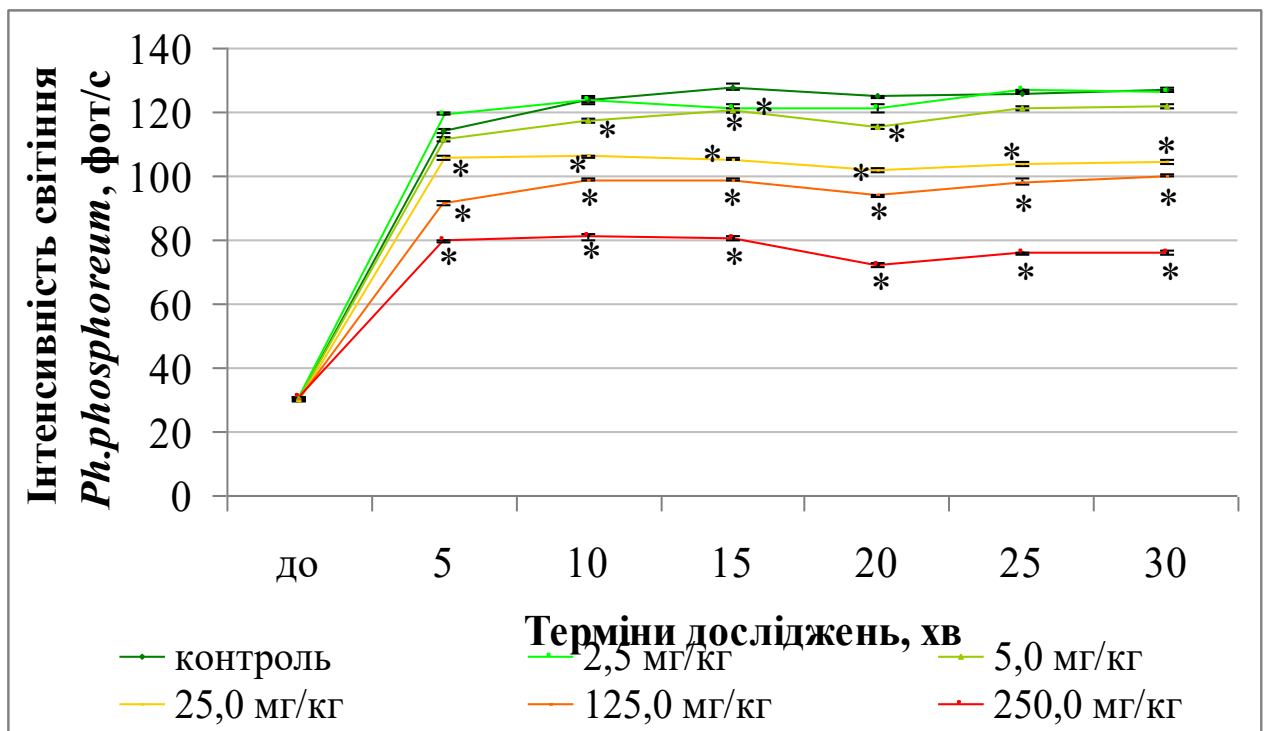


Рис. 3.34. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз купруму ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

На 15 хв експерименту на всіх рівнях купруму в кормі спостерігали пригнічення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* ($p < 0,05$): за 2,5 мг/кг – на 5,1 %, за 5,0 мг/кг – на 5,7 %, за 25,0 мг/кг – на 17,8 %, за 125,0 мг/кг – на 22,7 % і за рівня Купруму 250,0 мг/кг корму – на 36,9 %. На 20 хв експерименту за рівня Купруму в кормі 2,5 мг/кг не відмічали вірогідних змін інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 5,0; 25,0; 125,0 і 250,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 7,6; 18,4; 24,8 і 42,0 % ($p < 0,05$). На 25 хв досліджу за рівнів купруму в кормі 2,5 і 5,0 мг/кг не відмічали вірогідних змін інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 25,0; 125,0 і 250,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 17,7; 22,0 і 39,70 % ($p < 0,05$). Аналогічною була картина і на останньому терміні досліджень: за рівнів Купруму в кормі 2,5 і 5,0 мг/кг не відмічали вірогідних змін інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 25,0; 125,0 і 250,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 17,7; 21,1 і 40,0 % ($p < 0,05$) (рис. 3.34).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями купруму. Так, за вмісту мікроелементу 2,5; 5,0 і 25,0 (показник МДР) мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) у середньому становив 1,1; 5,7 і 18,0; а за вмісту 125,0 і 250,0 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 23,4 і 40,8. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом Купруму менше 2,5 до 25,0 мг/кг включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), за вмісту від 125,0 до 250,0 мг/кг – токсичними (індекс токсичності від 20 до 50).

Вплив цинку на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.35. За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями цинку до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення за 12,0 мг/кг корму не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 24,0; 120,0 і 600,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 10,8; 11,9 і 89,6 % ($p < 0,05$), тоді як за рівня цинку в кормі 1200,0 мг/кг світіння *Ph. phosphoreum* не

виявляли взагалі. Слід зазначити, що світіння *Ph. phosphoreum* за рівня цинку в кормі 1200,0 мг/кг не спостерігали до кінця дослідю). На 10 хв дослідю за рівнів цинку в кормі 12,0 і 24,0 мг/кг не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівня 120,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 18,5 % ($p < 0,05$), тоді як за рівня цинку в кормі 600,0 мг/кг світіння *Ph. phosphoreum* не виявляли взагалі. Слід зазначити, що світіння *Ph. phosphoreum* за рівня цинку в кормі 600,0 мг/кг не спостерігали до кінця дослідю. На 15 хв експерименту за рівня цинку 12,0 мг/кг корму спостерігали вірогідне підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* (на 11,7 %) відносно контролю, а за рівнів 24,0 і 120,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 8,4 і 14,0 % ($p < 0,05$).

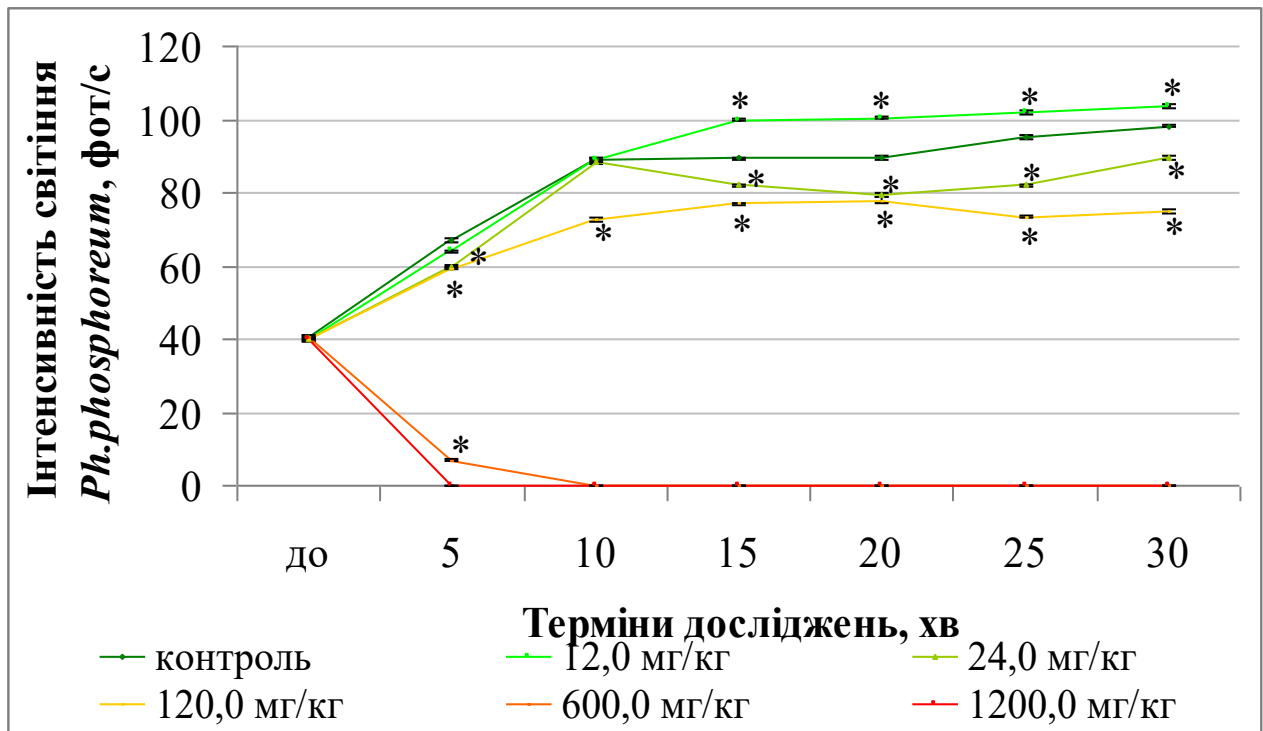


Рис. 3.35. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз цинку ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

На 20 хв експерименту за рівня Цинку 12,0 мг/кг корму спостерігали вірогідне підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* (на 12,0 %) відносно контролю, а за рівнів 24,0 і 120,0 мг/кг інтенсивність світіння була

нижчою за контроль на 11,7 і 13,1 % ($p < 0,05$). На 25 хв досліду за рівня цинку 12,0 мг/кг корму спостерігали вірогідне підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* (на 7,1 %) відносно контролю, а за рівнів 24,0 і 120,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 13,9 і 22,8 % ($p < 0,05$). На 30 хв експерименту за рівня цинку 12,0 мг/кг корму спостерігали вірогідне підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* (на 5,6 %) відносно контролю, а за рівнів 24,0 і 120,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 8,7 і 23,7 % ($p < 0,05$) (рис. 3.35).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями цинку. Так, за вмісту мікроелементу 12,0 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) був від'ємний і у середньому становив мінус 9,5; а за вмісту 24,0; 120,0 (показник МДР); 600,0 і 1200,0 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 12,8; 18,0; 100,0 і 100,0 відповідно. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом цинку менше 12,0 до 120,0 мг/кг включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), а за вмісту цинку від 600,0 до 1200,0 мг/кг – сильно токсичними (індекс токсичності більше 50).

3.5.2 Вивчення впливу різних рівнів мікроелементів у кормах на люмінесценцію біолюмінесцентних мікроорганізмів та їх токсикологічна характеристика. Вплив Феруму на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.36. За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями феруму до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення за 75,0 мг/кг корму спостерігали посилення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* ($p < 0,05$) на 10,4 %, а за рівня 150,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 38,3 % ($p < 0,05$), тоді як на рівнях 750,0-7500,0 мг/кг корму світіння *Ph. phosphoreum* не виявляли взагалі.

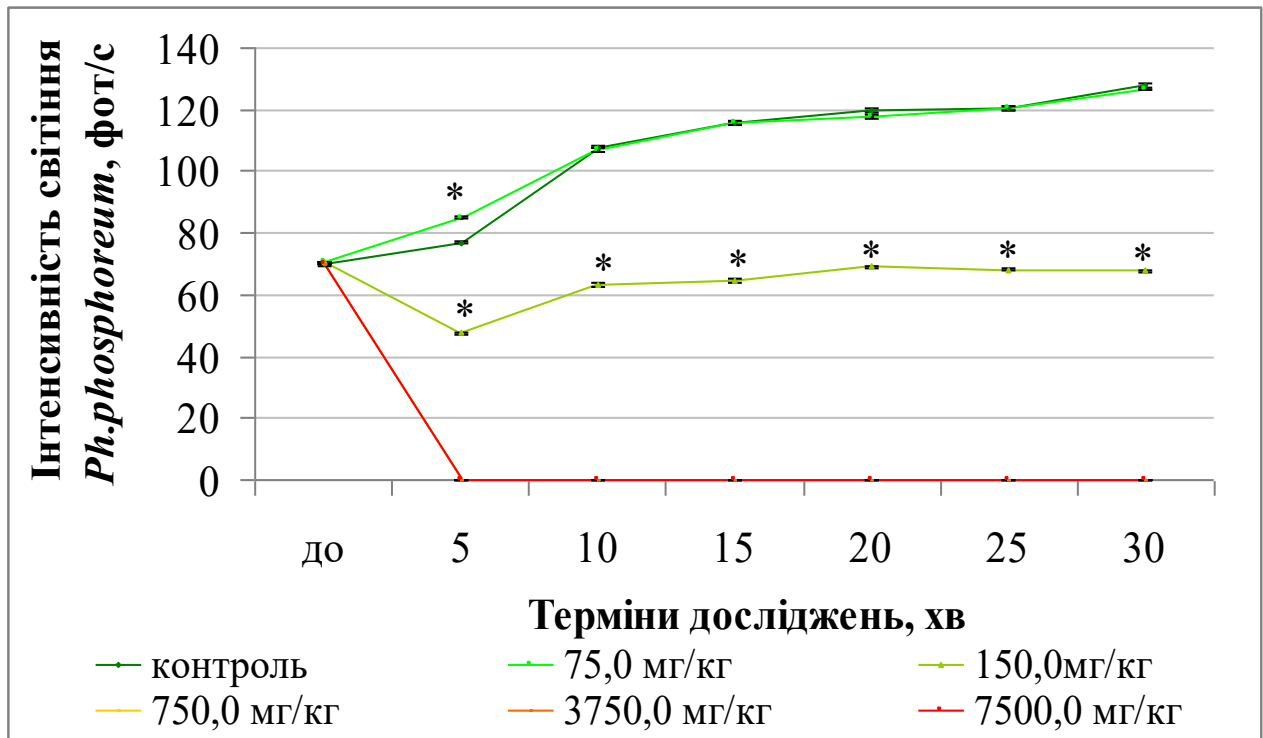


Рис. 3.36. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз феруму ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

На 10 хв експерименту за рівня мікроелементу 75,0 мг/кг корму не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* від контролю, за рівня 150,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 41,4 % ($p < 0,05$), тоді як на рівнях 750,0-7500,0 мг/кг корму світіння *Ph. phosphoreum* не виявляли взагалі. На 15, 20, 25 і 30 хв досліджу за рівня мікроелементу 75,0 мг/кг корму не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* від контролю. За рівня феруму 150,0 мг/кг корму інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 15, 20, 25 і 30 хв досліджу на 44,2; 42,3; 43,4 і 47,0 % ($p < 0,05$). На рівнях феруму 750,0-7500,0 мг/кг корму світіння *Ph. phosphoreum* не виявляли взагалі, починаючи з 5 хв експерименту (рис. 3.36).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями феруму. Так, за вмісту мікроелементу 75,0 і 150,0 мг/кг корму

індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) у середньому становив 0,84 і 42,9; а за вмісту 750,0 (показник МДР), 3750,0 і 7500,0 мг/кг корму індекс токсичності складав 100,0 %. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом Феруму менше 75,0 мг/кг включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), за вмісту 150,0 мг/кг – токсичними (індекс токсичності від 20 до 50) і за 750,0 і вище – корми сильно токсичні (індекс токсичності більше 50).

Вплив кобальту на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.37.

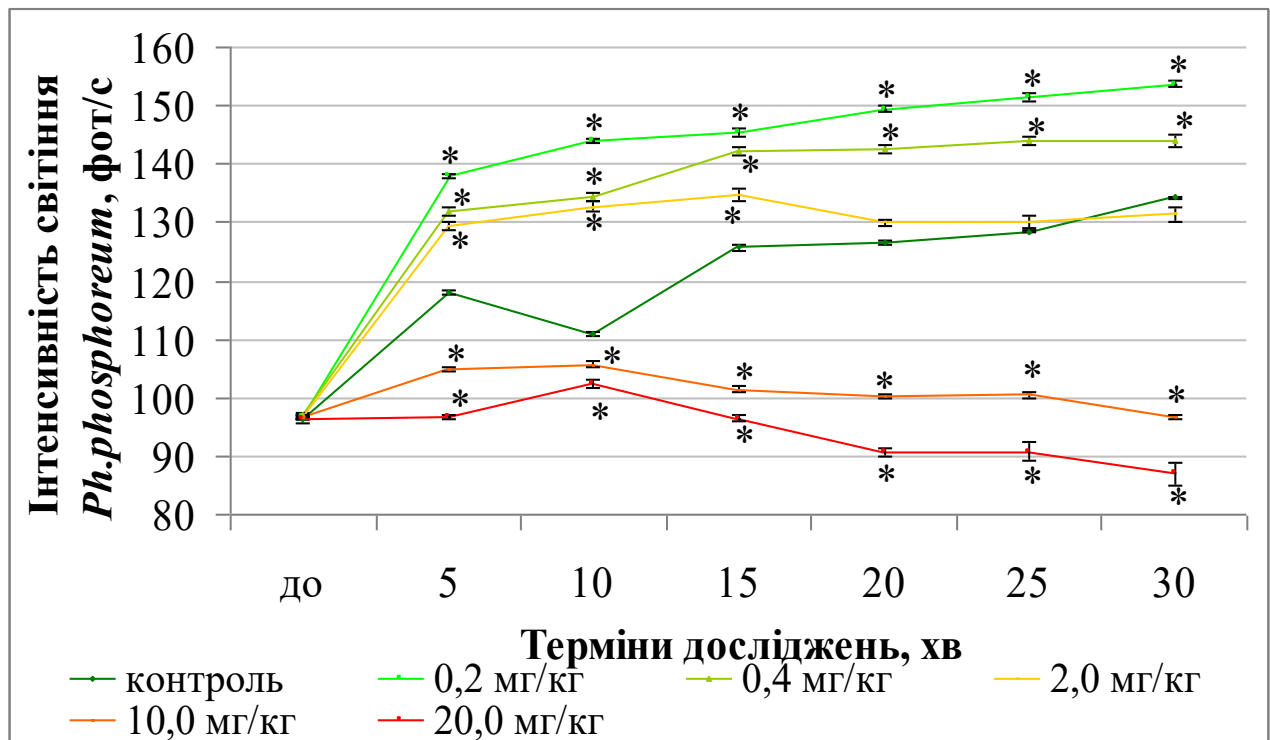


Рис. 3.37. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз кобальту ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями кобальту до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення за 0,2; 0,4 і 2,0 мг/кг корму спостерігали посилення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* ($p < 0,05$) на 16,9; 11,9 і 9,7 %, а за рівнів 10,0 і 20,0 мг/кг інтенсивність світіння була

нижчою за контроль на 11,0 і 18,0 % ($p < 0,05$). На 10 хв експерименту за вмісту кобальту 0,2; 0,4 і 2,0 мг/кг корму спостерігали посилення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* ($p < 0,05$) на 29,7; 21,2 і 19,6 %, а за рівнів 10,0 і 20,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 4,7 і 7,7 % ($p < 0,05$). На 15 хв досліду за вмісту кобальту 0,2; 0,4 і 2,0 мг/кг корму спостерігали посилення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* ($p < 0,05$) на 15,7; 13,1 і 7,2 %, а за рівнів 10,0 і 20,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 19,3 і 23,3 % ($p < 0,05$). На 20 хв досліду за вмісту кобальту 0,2 і 0,4 мг/кг корму спостерігали посилення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* ($p < 0,05$) на 18,2 і 12,6 %, а за рівня 2,0 мг/кг корму посилення інтенсивності світіння було не вірогідним (2,8 %), тоді як за рівнів 10,0 і 20,0 мг/кг інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* була нижчою за контроль на 20,8 і 28,3 % ($p < 0,05$). На 25 хв досліду за вмісту кобальту 0,2 і 0,4 мг/кг корму спостерігали посилення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* ($p < 0,05$) на 17,9 і 12,1 %, а за рівня 2,0 мг/кг корму посилення інтенсивності світіння було не вірогідним (1,4 %), тоді як за рівнів 10,0 і 20,0 мг/кг інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* була нижчою за контроль на 21,8 і 29,4 % ($p < 0,05$). І на останньому терміні досліджень за вмісту кобальту 0,2 і 0,4 мг/кг корму реєстрували посилення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* ($p < 0,05$) на 14,5 і 7,3 %, а за рівнів 2,0; 10,0 і 20,0 мг/кг корму інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* була нижчою за контроль на 2,0 % (не вірогідно); 27,9 і 35,2 % ($p < 0,05$) відповідно (рис. 3.37).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями кобальту. Так, за вмісту мікроелементу 0,2; 0,4 і 2,0 (показник МДР) мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) був від'ємний і у середньому становив мінус 18,0; 12,4 і 2,1; а за вмісту 10,0 і 20,0 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 21,3 і 28,9. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом Кобальту менше 0,2 до 2,0 мг/кг включно є не токсичними

(індекс токсичності менше 20), за вмісту від 10,0 до 20,0 мг/кг – токсичними (індекс токсичності від 20 до 50).

Вплив мангану на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.38.

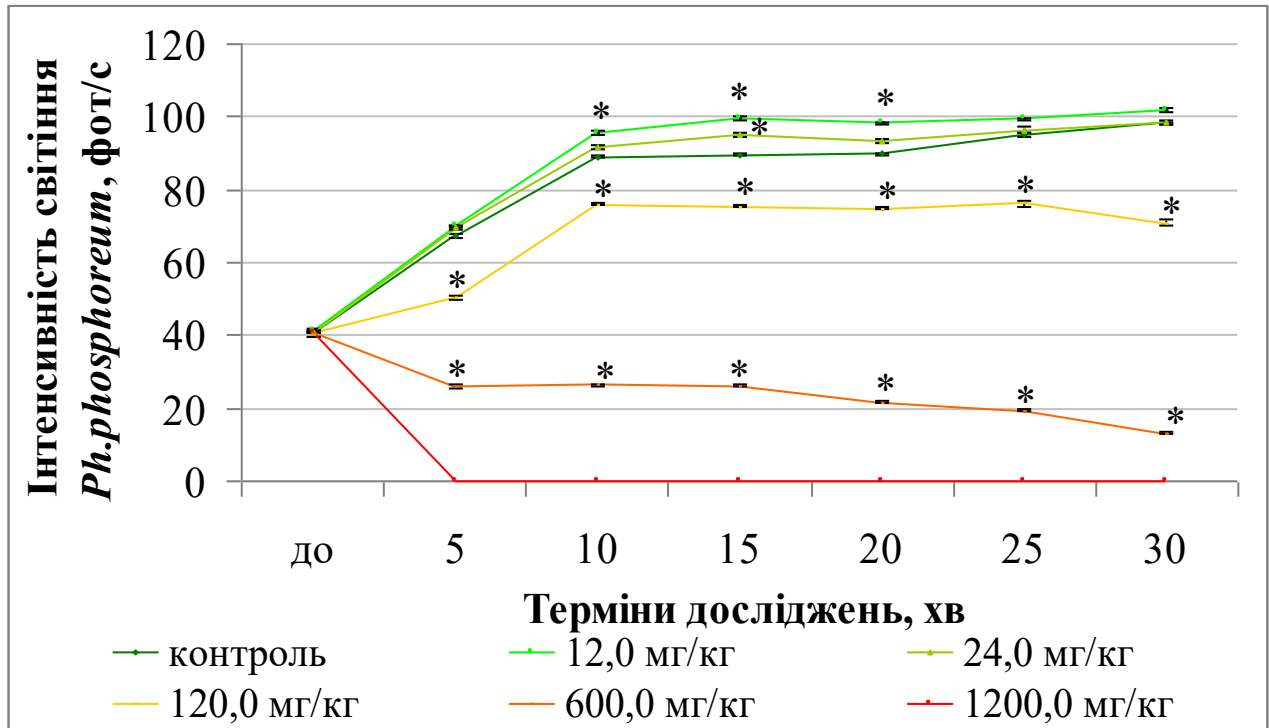


Рис. 3.38. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз мангану ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

Так, за умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями мангану до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення за 12,0 і 24,0 мг/кг корму не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 120,0 і 600,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 24,9 і 61,3 % ($p < 0,05$), тоді як за рівня мангану в кормі 1200,0 мг/кг світіння *Ph. phosphoreum* не виявляли взагалі. Слід зазначити, що світіння *Ph. phosphoreum* за рівня мангану в кормі 1200,0 мг/кг не спостерігали до кінця дослідження.

На 10 хв експерименту за рівня мангану 12,0 мг/кг корму спостерігали вірогідне підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* (на 7,6 %) відносно контролю, за рівня 24,0 мг/кг не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння, а за рівнів 120,0 і 600,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 14,6 і 70,2 % ($p < 0,05$).

На 15 хв експерименту за рівнів мангану 12,0 і 24,0 мг/кг корму спостерігали підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* (на 11,2 і 6,4 %) відносно контролю ($p < 0,05$), а за рівнів 120,0 і 600,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 15,6 і 70,7 % ($p < 0,05$). На 20 хв експерименту за рівня мангану 12,0 мг/кг корму спостерігали вірогідне підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* (на 9,4 %) відносно контролю, за рівня 24,0 мг/кг не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння, а за рівнів 120,0 і 600,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 16,4 і 75,8 % ($p < 0,05$). На 25 хв дослідю за рівнів мангану 12,0 і 24,0 мг/кг корму не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 120,0 і 600,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 19,9 і 79,5 % ($p < 0,05$). Аналогічну картину спостерігали і на останньому терміні досліджень: за рівнів мангану 12,0 і 24,0 мг/кг корму не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 120,0 і 600,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 27,7 і 86,5 % ($p < 0,05$) (рис. 3.38).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями мангану. Так, за вмісту мікроелементу 12,0 і 24,0 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) був від'ємний і у середньому становив мінус 7,0; і 2,6 відповідно; а за вмісту 120,0 мг/кг (показник МДР), 600,0 і 1200,0 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 18,2; 77,6 і 100,0. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом мангану менше 12,0 до

120,0 мг/кг включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), а за вмісту від 600,0 до 1200,0 мг/кг – сильно токсичними (індекс токсичності більше 50).

Вплив селену на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.39.

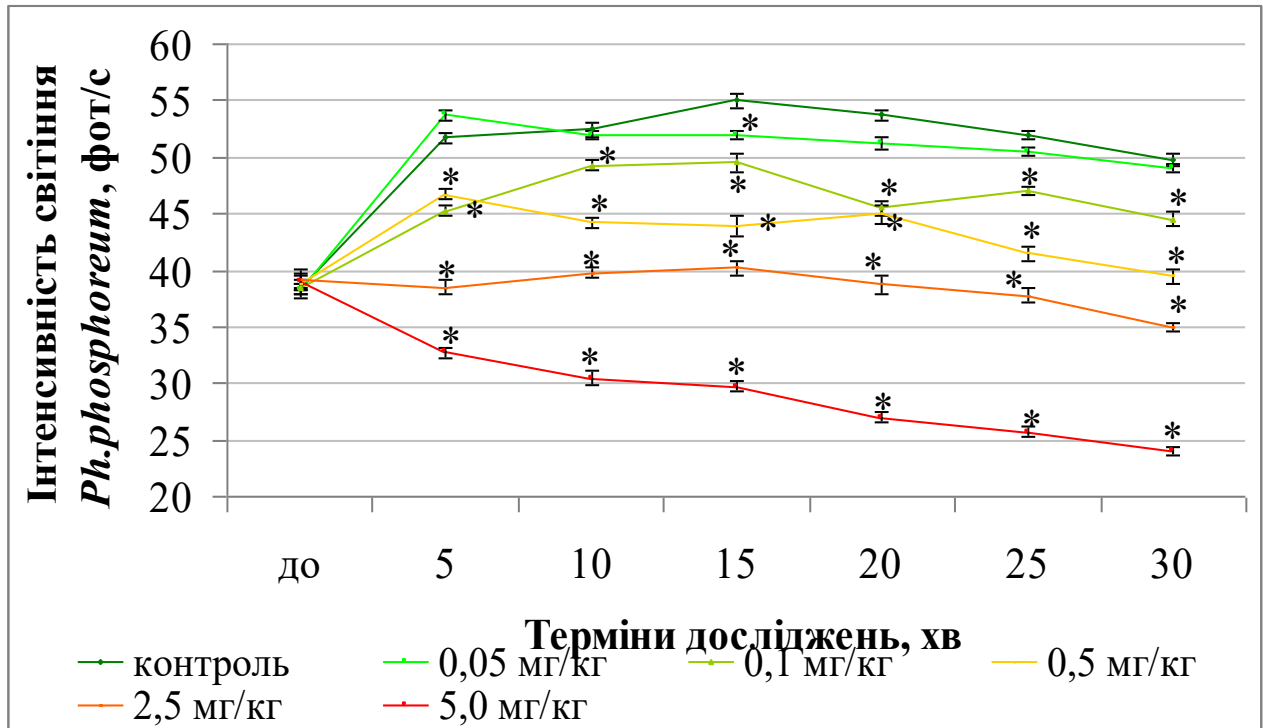


Рис. 3.39. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз селену ($M \pm m$, $n=4$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями селену до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення за 0,05 мг/кг корму не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 0,1; 0,5; 2,5 і 5,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 12,6; 9,7; 25,6 і 36,7 % ($p < 0,05$). На 10 хв експерименту за 0,05 мг/кг корму не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 0,1; 0,5; 2,5 і 5,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 6,2; 15,7; 24,3 і 41,9 % ($p < 0,05$). На 15 хв експерименту за рівнів селену 0,05; 0,1; 0,5; 2,5 і 5,0 мг/кг інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* була нижчою за

контроль на 5,5; 10,0; 20,0; 26,8 і 45,9 % ($p < 0,05$). На 20 хв експерименту за 0,05 мг/кг корму не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 0,1; 0,5; 2,5 і 5,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 15,3; 16,3; 27,9 і 49,8 % ($p < 0,05$). На 25 хв досліду за 0,05 мг/кг корму не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 0,1; 0,5; 2,5 і 5,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 9,6; 20,2; 27,4 і 50,5 % ($p < 0,05$). І на останньому терміні досліджень за рівня селену 0,05 мг/кг корму не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 0,1; 0,5; 2,5 і 5,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 10,6; 20,6; 29,6 і 51,8 % ($p < 0,05$) (рис. 3.39).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями селену. Так, за вмісту мікроелементу 0,05; 0,1; 0,5 (показник МДР); 2,5 і 5,0 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) у середньому становив 3,8; 12,5; 18,2 (показник МДР); 27,7 і 50,1 відповідно. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом селену менше 0,05 до 0,5 мг/кг включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), за вмісту селену 2,5 мг/кг – токсичні (індекс токсичності від 20 до 50) і за 5,0 мг/кг сильно токсичні (індекс токсичності більше 50).

Вплив нікелю на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.40. За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями нікелю до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення за 0,3 мг/кг корму не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 0,6; 3,0; 15,0 і 30,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 5,5; 12,3; 17,4 і 14,9 % ($p < 0,05$).

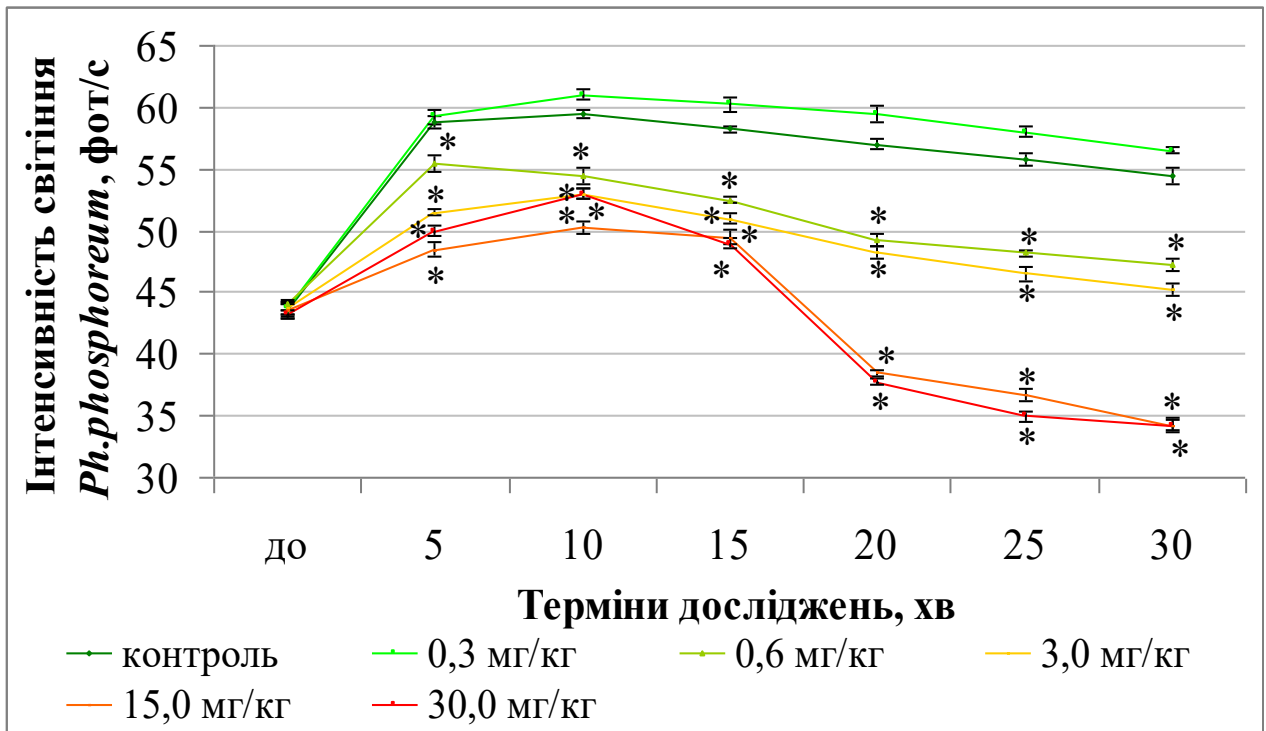


Рис. 3.40. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз нікелю ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

На 10 хв експерименту за рівня нікелю 0,3 мг/кг корму не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 0,6; 3,0; 15,0 і 30,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 8,4; 10,9; 15,5 і 10,9 % ($p < 0,05$). На 15 хв експерименту за рівня нікелю 0,3 мг/кг корму не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 0,6; 3,0; 15,0 і 30,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 9,9; 12,4; 15,0 і 15,9 % ($p < 0,05$). На 20 хв експерименту за рівня нікелю 0,3 мг/кг корму не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 0,6; 3,0; 15,0 і 30,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 13,6; 15,4; 32,4 і 33,8 % ($p < 0,05$). На 25 хв експерименту за рівня нікелю 0,3 мг/кг корму не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 0,6; 3,0; 15,0 і 30,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 13,5; 16,6; 34,1 і 37,2 % ($p < 0,05$). На 30 хв експерименту за рівня нікелю 0,3 мг/кг

корму не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 0,6; 3,0; 15,0 і 30,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 13,3; 17,0; 37,2 і 37,2 % ($p < 0,05$) (рис. 3.40).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями Нікелю. Так, за вмісту мікроелементу 0,3 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) був від'ємний і у середньому становив мінус 4,2; а за вмісту мікроелементу 0,6; 3,0 (показник МДР); 15,0 і 30,0 мг/кг корму індекс токсичності у середньому становив 13,5; 16,0 (показник МДР); 33,3 і 35,5 відповідно. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом нікелю менше 0,3 до 3,0 мг/кг включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), а за вмісту від 15,0 до 30,0 мг/кг – токсичними (індекс токсичності від 20 до 50).

Вплив хрому на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.41. За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями хрому до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення спостерігали зниження інтенсивності світіння відносно контролю ($p < 0,05$) за рівнів мікроелементу 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 і 10,0 мг/кг на 11,1; 14,5; 15,5; 16,9 і 19,87 %. На 10 хв експерименту інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* була також нижчою за контроль ($p < 0,05$) на всіх рівнях мікроелементу: за 0,1 мг/кг корму – на 11,0 %, за 0,5 мг/кг корму – на 15,2 %, за 1,0 мг/кг корму – на 17,1 %, за 5,0 мг/кг корму – на 17,6 % і за 10,0 мг/кг корму – на 21,4 %. Аналогічну картину спостерігали до кінця дослідження. Так, на 15 хв експерименту інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* була також нижчою за контроль ($p < 0,05$) на всіх рівнях хрому: за 0,1 мг/кг корму – на 13,2 %, за 0,5 мг/кг корму – на 19,1 %, за 1,0 мг/кг корму – на 19,5 %, за 5,0 мг/кг корму – на 21,8 % і за 10,0 мг/кг корму – на 23,6 %.

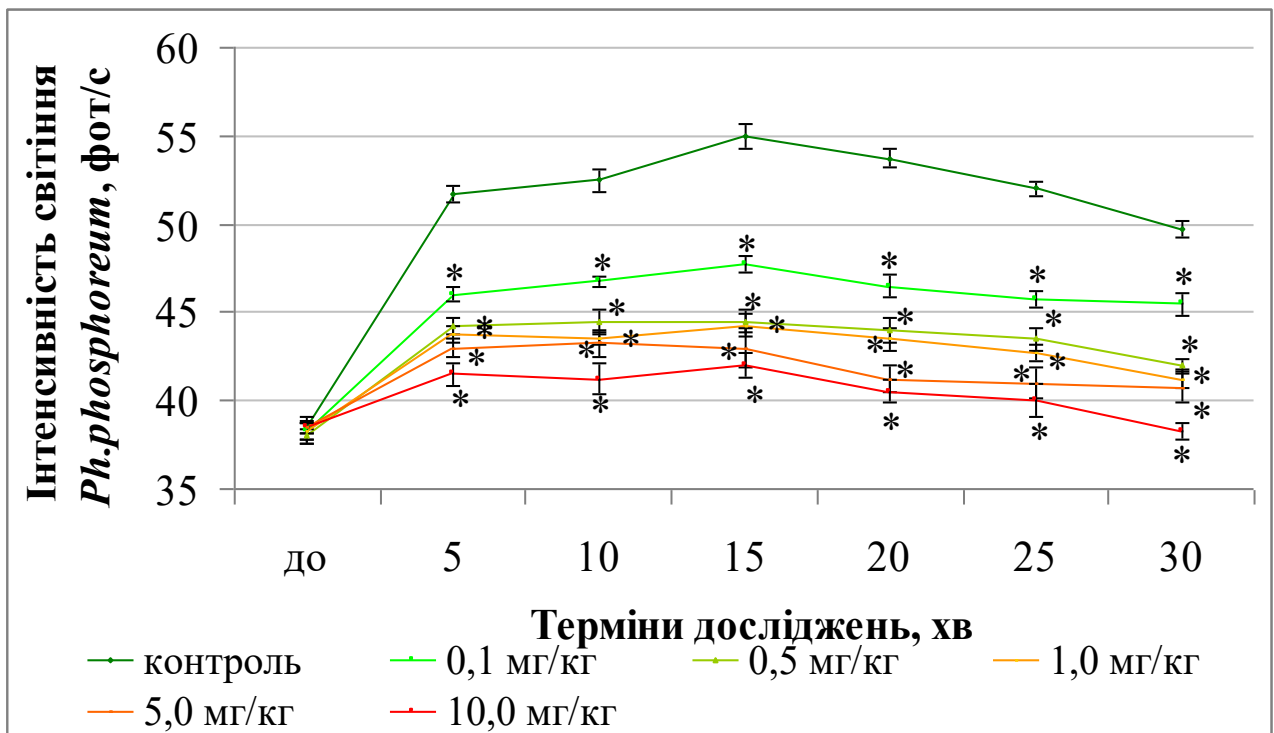


Рис. 3.41. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз хрому ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

На 20 хв після внесення спостерігали зниження інтенсивності світіння відносно контролю ($p < 0,05$) за рівнів мікроелементу 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 і 10,0 мг/кг на 13,5; 18,1; 19,1; 23,3 і 24,7 %. На 25 хв після внесення екстрактів кормів спостерігали зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відносно контролю ($p < 0,05$) за рівнів мікроелементу 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 і 10,0 мг/кг на 12,0; 16,3; 17,8; 21,2 і 23,1 %. І на останньому терміні досліджень спостерігали зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відносно контролю ($p < 0,05$) за рівнів хрому 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 і 10,0 мг/кг на 8,5; 15,6; 17,1; 18,1 і 23,1 % (рис. 3.41).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями хрому. Так, за вмісту мікроелементу 0,1; 0,5; 1,0 (показник МДР) мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) у середньому становив 12,8; 17,2 і 18,4; а за вмісту 5,0 і 10,0 мг/кг корму середній індекс токсичності складав 22,2 і 23,9. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом Хрому менше 0,1

до 1,0 мг/кг включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), за вмісту від 5,0 до 10,0 мг/кг – токсичними (індекс токсичності від 20 до 50).

Вплив бромиду на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* в залежності від концентрації, відображено у рисунку 3.42.

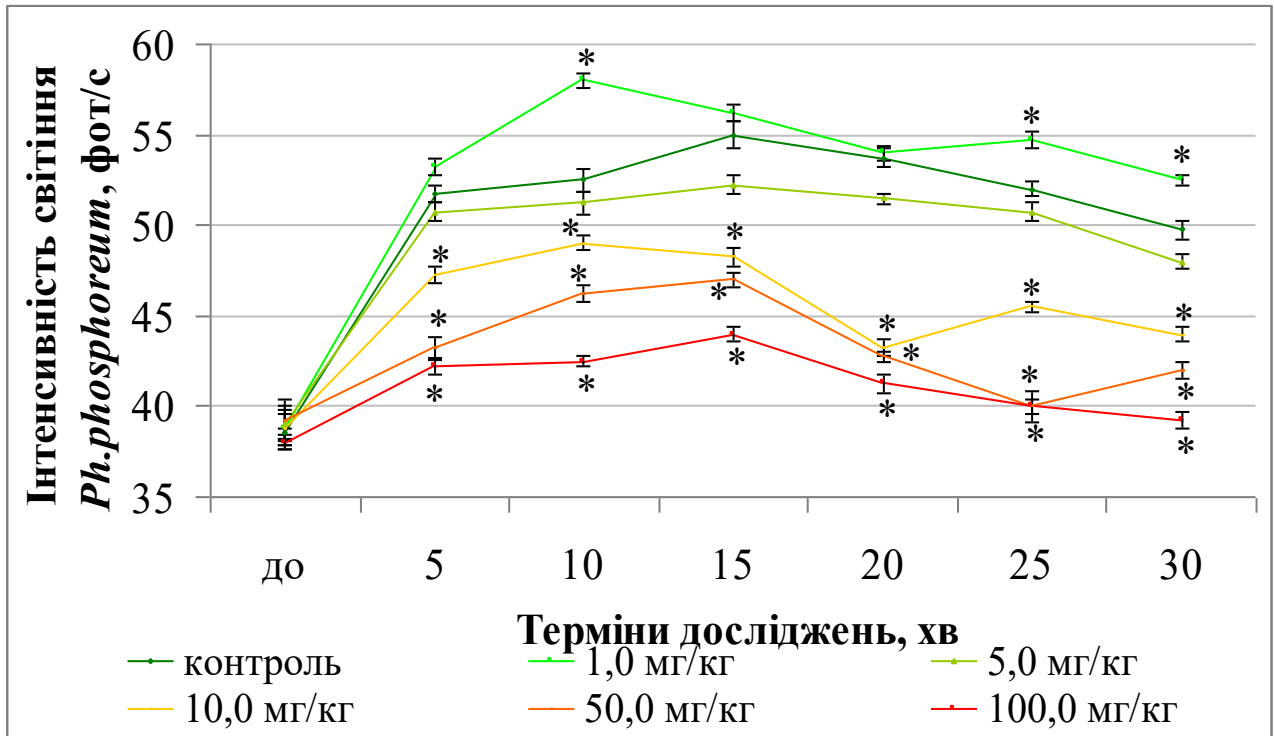


Рис. 3.42. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз бромиду ($M \pm m$, $n=6$, * – $p < 0,05$ – відносно контролю).

За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями бромиду до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення за 1,0 і 5,0 мг/кг корму не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 10,0; 50,0 і 100,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 8,7; 16,4 і 18,4 % ($p < 0,05$). На 10 хв експерименту за рівня бромиду 1,0 мг/кг корму спостерігали вірогідне підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* (на 10,4 %) відносно контролю, за рівня мікроелементу 5,0 мг/кг корму не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 10,0; 50,0 і 100,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 6,7; 11,9 і 19,0 % ($p < 0,05$). На 15 хв досліджу за рівнів бромиду 1,0 і 5,0 мг/кг корму

не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 10,0; 50,0 і 100,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 12,2; 14,5 і 20,0 % ($p < 0,05$).

На 20 хв досліду за рівнів бромю 1,0 і 5,0 мг/кг корму не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 10,0; 50,0 і 100,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 19,5; 20,5 і 23,3 % ($p < 0,05$). На 25 хв експерименту за рівня бромю 1,0 мг/кг корму спостерігали вірогідне підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* (на 5,3 %) відносно контролю, за рівня мікроелементу 5,0 мг/кг корму не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 10,0; 50,0 і 100,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 12,5; 23,1 і 23,1 % ($p < 0,05$). Аналогічну картину спостерігали і на останньому терміні досліджень: за рівня бромю 1,0 мг/кг корму спостерігали вірогідне підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* (на 5,3 %) відносно контролю, за рівня мікроелементу 5,0 мг/кг корму не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, а за рівнів 10,0; 50,0 і 100,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 11,6; 15,6 і 21,1 % ($p < 0,05$) (рис. 3.42).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями бромю. Так, за вмісту мікроелементу 1,0 мг/кг корму індекс токсичності на (20-25) хв (рекомендований термін реєстрації показників флуоресценції) був від'ємний і у середньому становив мінус 2,9; а за вмісту мікроелементу 5,0; 10,0 (показник МДР); 50,0 і 100,0 мг/кг корму індекс токсичності у середньому становив 3,3; 16,0 (показник МДР); 21,8 і 23,2 відповідно. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом Бромю менше 1,0 до 10,0 мг/кг включно є не токсичними (індекс токсичності менше 20), а за вмісту від 50,0 до 100,0 мг/кг – токсичними (індекс токсичності від 20 до 50).

Результати підрозділу опубліковані в роботах [203-205].

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проблема контролю якості та безпеки кормів для тварин завжди являла і являє один із напрямків роботи ветеринарної медицини країни. Тому проведення досліджень в цьому напрямку актуальне в сучасних умовах, коли Україна вступила до Світової організації торгівлі та стала кандидатом до входу в Європейський Союз.

Методи фізико-хімічного та аналітичного контролю, що використовуються в аналітичних лабораторіях не завжди можуть дати адекватну картину впливу тієї чи іншої речовини на живий організм. Значна кількість речовин як природного, так і синтетичного походження, є багатокомпонентні, що затрудняє їх фізико-хімічну стандартизацію. У зв'язку з цим в системі контролю за станом природних середовищ та екосистем (в тому числі і кормів та продукції тваринного походження) важливу роль відіграє біотестування з використанням про- та еукаріотичних організмів у якості тест-моделей. Перевагою біотестування, у відповідності з сучасними вимогами – є зменшення експериментів з високоорганізованими тваринами та скорочення термінів дослідження. У якості біотестів використовують різні групи організмів: мікроорганізми, гідробіонти, рослини, безхребетні тварини. Впровадження альтернативних методів відбувається під контролем міжнародних організацій, у тому числі Інтернаціонального комітету центру по затвердженню альтернативних методів.

Токсичні ефекти, виявлені під час біотестування, включають комплексний синергічний, антагоністичний і додаткові впливи усіх хімічних, фізичних та біологічних компонентів досліджуваного об'єкту, що негативно впливають на фізіологічні, біохімічні та генетичні функції тест-організмів.

Доказом того, що тест-об'єкт підходить для токсикологічних випробувань, є наявність кореляції результатів дослідів, що проводяться з використанням цього тест-об'єкту та результатів дослідів з використанням

теплокровних тварин класичними токсикологічними методами. За останні 20 – 25 років було запропоновано безліч різних біологічних об'єктів від проростків вищих рослин, бактерій та найпростіших до риб та клітин ссавців. При цьому дуже багато тест-об'єктів і методик з їх використанням були запозичені з екології та водної токсикології, де вони застосовувалися для оцінки окремих ланок екологічного ланцюгу. Тому у більшості досліджень інтерпретацію результатів науковці проводять відносно концентрації того чи іншого металу у кінцевому досліджуваному розчині та набування за певний час 50 % інгібування світіння фотобактерій (EC_{50}).

Відносно пестицидів, то не всі вони були досліджені відносно впливу на люмінесценцію фотобактерій: з доступної літератури не виявлено даних відносно впливу ГХ, α - і β -ізомерів ГХЦГ, флорасуламу, хізалофоп-п-етилу, хізалофоп-п-тефурілу та ципроконазолу, що ймовірно пов'язано з одного боку з великою їх кількістю, а з другого новизною їх виробництва.

У нашому досліді концентрації ДДТ в кінцевому досліджуваному екстракті складали 0,005; 0,025; 0,05 і 0,50 мг/л (відповідно рівням у кормі – 0,01; 0,05; 0,1 і 1,0 мг/кг), при цьому максимальний відсоток пригнічення інтенсивності світіння був на рівні 61,2 %, а 50,5 % зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* установлено на рівні 0,1 мг/кг корму (0,05 мг/л у кінцевому екстракті). Отримані нами дані були дуже близькими до даних Нууен Т. Т., 2017 відносно *Vibrio fischeri*, де EC_{50} становила 0,05 мг/л [206].

Вплив на люмінесценцію фотобактерій γ -ізомеру ГХЦГ (ліндану) наведено в роботі [207]: EC_{50} відповідно становила 0,8 мг/л, що було близьким до результатів наших досліджень, оскільки максимальне зниження інтенсивності світіння (54,1 %) *Ph. phosphoreum* спостерігали за вмісті його в кормі 2,0 мг/кг або 1,0 мг/л у кінцевому екстракті.

У нашому експерименті концентрації гербіциду Сотейра (за ДР імазамоксом) в кінцевому досліджуваному екстракті складали 0,005; 0,0125; 0,025; 0,05 і 0,125 мг/л (відповідно рівням у кормі – 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 і 0,25 мг/кг), при цьому протягом 15 хв спостерігали повне пригнічення світіння

на всіх досліджуваних рівнях. Olkova A., 2022 на люмінесцентних бактеріях встановлено високий ступінь токсичності вод з концентраціями імазамоксу 0,01-3,0 мг/л [208]. Також високий ступінь токсичності даного гербіциду можна пояснити наявністю в ньому другого компоненту (імазапіру), що ймовірно потенціює ефект основної ДР.

Vurm R., Tajnaiová L., Kofroňová J., 2021 встановили вплив гліфосату на люмінесценцію *Aliivibrio fischeri*: EC_{50} складала 0,811 мкг/мл [209]. У наших дослідженнях EC_{50} гербіциду Агрошит супер (ДР калійна сіль гліфосату) орієнтовно була на рівні між 1,0 і 2,5 мг/кг корму (відсоток пригнічення 40,8 і 61,2 % відповідно), що в перерахунку на кінцеву концентрацію в екстракті становило в середньому 0,875 мкг/мл, тобто наші дані узгоджуються з даними літератури.

Концентрації гербіциду Грінфорт екстра (за ДР метолахлором) в кінцевому досліджуваному екстракті складали 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 і 0,25 мг/л (відповідно рівням у кормі – 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 і 0,5 мг/кг), при цьому EC_{50} орієнтовно була на рівні між 0,1 і 0,2 мг/кг корму (відсоток пригнічення 34,4 і 63,5 % відповідно), що в перерахунку на кінцеву концентрацію в екстракті становило в середньому 0,075 мг/л, що узгоджувалося з даними Osano O., et. al., 2002, де наведені EC_{50} відносно *Vibrio fischeri* на рівні гербіциду 0,006-4,9 мг/л [210].

Гербіцид Астанес (ДР ацетохлор) за рівнів у кормі 0,006; 0,015; 0,03; 0,06 і 0,15 мг/кг у кінцевих екстрактах мав концентрації 0,003; 0,0075; 0,015; 0,03 і 0,075 мкг/мл відповідно при цьому відсоток пригнічення перевищував позначку в 50 % вже за концентрації 0,015 мкг/мл, що суперечило даним отриманим Souissi, Y., et. al., 2013 (EC_{50} була більшою 0,2 мкг/мл) [211].

Концентрації гербіциду Астралід (за ДР клопіралід) в кінцевому досліджуваному екстракті складали 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 і 5,0 мг/л (відповідно рівням у кормі – 0,4; 1,0; 2,0; 4,0 і 10,0 мг/кг), при цьому відсоток пригнічення перевищував позначку в 50 % за концентрації 2,0 мкг/мл, що було дещо нижче,

ніж дані отримані Vurm R., Tajnaiová L., Kofroňová J., 2021 (EC_{50} 5,07 мг/л) [209].

Гербицид Грінфорт НК 40 (ДР нікосульфурон) за рівнів у кормі 0,04; 0,1; 0,2; 0,4 і 1,0 мг/кг у кінцевих екстрактах мав концентрації 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 і 0,5 мкг/мл відповідно при цьому відсоток пригнічення на досліджуваних рівнях не перевищував позначку в 50 % (максимальний відсоток пригнічення світіння *Ph. phosphoreum* 45,3 спостерігали за концентрації в кінцевому екстракті 0,5 мкг/мл), що було дещо вищим за отримані Joly, P., et. al., 2013 результати (EC_{50} була на рівні $0,1678 \pm 0,0218$ мкг/мл) [212].

Вплив на люмінесценцію фотобактерій ДР інсектицидів Велес та Вирій тіаклоприду досить різниться в доступній літературі, так Nafradi M. et. al., 2021 приводять EC_{50} фотобактерій на рівні 0,23 мкг/мл [213], Berberidou, C. et. al., 2019 – 20,0 мкг/мл [214] і Farré, M., et. al., 2002 – 100,84 мкг/мл [215]. У наших експериментах EC_{50} *Ph. phosphoreum* не було досягнуто для обох інсектицидів на всіх досліджуваних рівнях максимальна концентрація в кінцевих екстрактах при цьому становила 0,05 мкг/мл, а коефіцієнти пригнічення 27,7 та 31,2 відповідно.

Слід зазначити, що в науковій літературі відносно мало даних про вплив мікотоксинів, виділених безпосередньо з корму, на люмінесценцію *Ph. phosphoreum*.

Одними з перших дослідників, що виявили можливість використання бактеріальної біолюмінесценції *Ph. phosphoreum* для токсикологічного аналізу на мікотоксини, були Yates I.E and J.K. Porter. Вони провели дослідження з рубратоксином В, зеараленоном, пеніциловою кислотою, цитриніном, охратоксином А, РR-токсином, афлатоксином В₁ та патуліном. Вплив вищезазначених мікотоксинів на біолюмінесценцію визначали через 5, 10, 15 і 20 хв інкубації з бактеріальними суспензіями. Концентрація рубратоксину В, необхідного для отримання зниження інтенсивності світіння на 50 % (напівмаксимальна інгібуюча концентрація (IC_{50}), з часом збільшувалася, тоді як концентрація цитриніну, пеніцилової кислоти, патуліну та РR-токсину з часом

зменшувалася. Концентрації зеараленону, афлатоксину В₁ та охратоксину А, необхідних для отримання ІС₅₀ з часом, були дуже незначними [216]. На основі даних досліджень було розроблено першу біоломінесцентну сенсорну систему для аналізу забруднення екосистем – Microtox[®], проте її не було адаптовано для токсикологічної оцінки кормів для тварин.

Вплив Т₂ мікотоксину на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* встановили (Katsev, Goïster and Starodub, 1999) [217], а саме: пригнічення світіння *Ph. phosphoreum* після 10 хв інкубації бактерій на рівні 50 % при концентрації токсину 12 мг/мл дослідного матеріалу, а вплив мікотоксинів афлатоксину В₁ у кількості 10 мкг/мл та дезоксиніваленолу 20 мкг/мл на люмінесценцію фотобактерій був досліджений Sarter, Metayer and Zakhia, 2008 [218] (проте в якості тест-культури використовували *Vibrio fischeri*): встановлено інгібування світіння афлатоксином В₁ і посилення ДОНом, що частково узгоджуються з отриманими нами результатами.

Інгібуючий ефект різних мікотоксинів (афлатоксин В₁, дезоксиніваленол, зеараленон, Т₂-токсин і охратоксин) на люмінесценцію ще однієї тест-культури фотобактерій – *Aliivibrio fischeri* – виявляли в межах концентрації токсинів 1–20 мкг/мл. Випробувана бактерія виявилася найбільш чутливою до афлатоксину В₁, в меншій мірі (але з вираженою інгібіцією світіння) – відносно зеараленону, тоді як інші мікотоксини не впливали на інтенсивність флуоресценції *A. fischeri* (Krifaton, et al., 2010) [219], що узгоджується з отриманими нами даними відносно афлатоксину В₁ і зеараленону та суперечить результатам наших досліджень відносно ДОНу, Т₂-токсину і охратоксину А, оскільки вони проявили виражене пригнічення світіння *Ph. phosphoreum* за присутності в кормах їх високого вмісту.

Токсичність фузаринової кислоти – мікотоксину, що продукує *Fusarium proliferatum* у бананових плодах, була оцінена з використанням штаму *Vibrio qinghaiensis* sp. Q67 за інгібуванням світіння. Доведено, що біооцінка за допомогою люмінесцентної бактерії була ефективною для моніторингу фузаринової кислоти *F. proliferatum* (Li et al., 2012) [220].

Сильні кореляційні зв'язки ($R^2 > 0,98$) встановлено між концентраціями мікотоксинів (фумонізін В₁, дезоксиніваленол, зеараленон, охратоксин А, патулін і цитринін) та інтенсивністю світіння *V. qinghaiensis* sp. Q67. Крім того, *Fusarium proliferatum* (IC₅₀ = 17,49%) демонстрував більше пригнічення люмінесценції, ніж *Fusarium semitectum* (IC₅₀ = 92,56%) або *Fusarium oxysporum* (IC₅₀ = 28,61%), що відповідало визначеному вищому вмісту фумонізіну В₁, фумонізіну В₂ і дезоксиніваленолу, які були виміряні за допомогою високоефективної рідинної хроматографії-тандемної мас-спектрометрії (Jian, et al., 2017) [221], що свідчить про можливість застосування фотобактерій для токсикологічної оцінки кормів, забруднених мікотоксинами.

Нові стратегії виявлення присутності мікотоксинів у природному середовищі представили Efremenco et al., 2021 та описані в огляді García, 2021 [222, 223]. Автори роботи порівняли характеристики швидкого кількісного аналізу різних мікотоксинів (дезоксиніваленол, охратоксин А, патулін, стеригматоцистин і зеараленон) за допомогою ацетил-, бутирилхолінестераз і фотобактеріальних штамів люмінесцентних клітин. Найкращими біоіндикаторами за чутливістю та робочим діапазоном (мкг/мл) були: штам *Photobacterium* sp. 17 для аналізу на дезоксиніваленол (0,8–89) і патулін (0,2–32); *Photobacterium* sp. 9,2 для аналізу на охратоксин А (0,4–72) та зеараленон (0,2–32).

Слід зазначити, що робочі концентрації мікотоксинів у вищевказаних джерелах літератури відпрацьовані в основному на екологічних об'єктах (грунт, вода тощо) та харчових продуктах і є значно вищими, ніж вміст мікотоксинів у кормах. Так, якщо розрахувати орієнтовну концентрацію мікотоксинів у кінцевому екстракті з проб кормів у наших дослідженнях, то отримаємо наступне: для Т₂ токсину діапазон становив 0,005-0,5 мкг/мл, AFB1 – 0,0005-0,05 мкг/мл, DON – 0,025-1,0 мкг/мл, ZON – 0,05-5,0 мкг/мл, FBs – 0,25-7,5 мкг/мл and OTA – 0,0025-0,25 мкг/мл.

Токсичність кормів при цьому підтверджувалася для Т₂ токсину від 0,05 мкг/мл, AFB1 – 0,005 мкг/мл, DON – 0,25 мкг/мл, ZON – 0,1 мкг/мл, FBs – 2,5

мкг/мл and OTA – від 0,025 мкг/мл. Тобто концентрації мікотоксинів, що викликають пригнічення світіння є зовсім не значними, що підтверджує результати отримані Yates and Porter, 1982 [216]. Порівнюючи отримані нами результати з даними [217 і 218] встановлено, що пригнічення світіння *Ph. phosphoreum* відбувається і за значно нижчих концентрацій мікотоксинів. Найбільш близькими до результатів, отриманих в нашому досліді є дані [219] (пригнічення світіння за концентрацій 1-20 мкг/мл), [222 та 223] (в залежності від мікотоксину пригнічуючи концентрація становила 0,2-89 мкг/мл).

Дослідниками встановлено різну чутливість штамів фотобактерій відносно важких металів. Так, через 30 хв 50 % зниження інтенсивності світіння штаму *V. qinghaiensis* Q67 в досліджуваній воді відбувалося за концентрації Арсену на рівні $4,674 \pm 0,013$ мг/л, *Ph. phosphoreum* T3 і *Ph. phosphoreum* 502 на рівні $0,229 \pm 0,008$ і $0,252 \pm 0,002$ мг/л відповідно та штам *Vibrio fischeri* – на рівні $3,851 \pm 0,017$ мг/л [224]. У інших дослідженнях (He et al., 2015) [225] 50 % зниження інтенсивності світіння штаму *Ph. phosphoreum* T3 набував через 15 хв за концентрацій арсену в залежності від рН від 0,895 до 4,396 мг/л. Якщо порівняти отримані нами дані відносно впливу Арсену протягом 30 хв на інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* (штам ІМВ В-7071; Sq3), то отримаємо наступне: в перерахунку рівнів арсену у кормах (0,05; 0,1; 0,5; 2,5 і 5,0 мг/кг корму) маємо кінцеві концентрації важкого металу в досліджуваному екстракті (0,025; 0,05; 0,25; 1,25 і 2,5 мг/л відповідно). За концентрації арсену 0,25-2,5 мг/л інтенсивність світіння пригнічувалася на 35,8-42,6 %, тобто 50 % зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* на обраних для експерименту рівнях не було досягнуто, проте встановлено близькість наших результатів з вищеописаними літературними даними.

У нашому експерименті концентрації кадмію в кінцевому досліджуваному екстракті складали 0,02; 0,04; 0,20; 1,00 і 2,0 мг/л (відповідно рівням у кормі – 0,04; 0,08; 0,4; 2,0 і 4,0 мг/кг), при цьому максимальний відсоток пригнічення інтенсивності світіння був на рівні 22,3 %, тобто 50 % зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* на обраних для експерименту

рівнях не було досягнуто як і у випадку з арсеном. За даними [224] 50 % зниження інтенсивності світіння штаму *V. qinghaiensis* Q67 в досліджуваній воді відбувалося за концентрації кадмію на рівні $11,137 \pm 0,162$ мг/л, *Ph. phosphoreum* T3 і *Photobacterium phosphoreum* 502 на рівні $4,162 \pm 0,082$ і $5,634 \pm 0,168$ мг/л відповідно та штам *V. fischeri* – на рівні $46,827 \pm 1,529$ мг/л. Поряд з цим Qu et al., 2013 [226] встановили 50 % зниження інтенсивності світіння штам *Ph. phosphoreum* T3 набував через 15 хв за концентрацій кадмію в залежності від рН від 1,03 до 19,3 мг/л. Тобто можна констатувати певну узгодженість отриманих нами даних з даними літератури.

У нашому досліді концентрації плюмбуму в кінцевому досліджуваному екстракті складали 0,25; 0,50; 2,50; 12,50 і 25,0 мг/л (відповідно рівням у кормі – 0,50; 1,00; 5,0; 25,0 і 50,0 мг/кг), при цьому максимальний відсоток пригнічення інтенсивності світіння був на рівні 40,8 %, тобто 50 % зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* на обраних для експерименту рівнях не було досягнуто як і у випадку з двома вищевказаними важкими металами. За даними [224] 50 % зниження інтенсивності світіння штаму *V. qinghaiensis* Q67 в досліджуваній воді відбувалося за концентрації плюмбуму на рівні $5,921 \pm 0,043$ мг/л, *Ph. phosphoreum* T3 і *Ph. phosphoreum* 502 на рівні $3,488 \pm 0,107$ і $3,937 \pm 0,005$ мг/л відповідно. У роботі Lopez-Roldan et al., 2012 [227] вказано, що 50 % зниження інтенсивності світіння люмінесцентних бактерій за 15 хв експозиції може відбуватись за концентрації плюмбуму в досліджуваному об'єкті 33,1 – 237,0 мг/л. Тобто отримані нами дані є вищими за показники, встановлені Yang et al., 2022 [224], проте узгоджуються з даними Lopez-Roldan et al., 2012 [227].

За умов внесення в корм Меркурію 0,01; 0,02; 0,1; 0,5 і 1,0 мг/кг корму концентрації його в кінцевому досліджуваному екстракті складали 0,005; 0,01; 0,05; 0,25 і 0,50 мг/л відповідно. При цьому максимальний відсоток пригнічення інтенсивності світіння був на рівні 21,2 %, тобто 50 % зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* на обраних для експерименту рівнях не було досягнуто. За даними Yang et al., 2022 [224] 50 % зниження інтенсивності

світіння штаму *V. qinghaiensis* Q67 в досліджуваній воді відбувалося за концентрації меркурію на рівні $0,911 \pm 0,005$ мг/л, *Photobacterium phosphoreum* T3 і *Ph. phosphoreum* 502 на рівні $0,696 \pm 0,008$ і $1,358 \pm 0,043$ мг/л відповідно та штаму *V. fischeri* – на рівні $0,771 \pm 0,009$ мг/л. Тоді як Wang et al., 2014 [228] отримали на порядок нижчі результати концентрацій меркурію відносно 50 % зниження інтенсивності світіння фотобактерій – $0,0661-0,0831$ мг/л. Тобто отримані нами дані узгоджуються з даними Yang et al., 2022 [224], проте є вищими за показники Wang et al., 2014 [228].

За умов внесення в корм купруму 2,5; 5,0; 25,0; 125,0 і 250,0 мг/кг корму концентрації його в кінцевому досліджуваному екстракті складали 1,25; 2,5; 12,5; 62,5 і 125,0 мг/л відповідно. При цьому максимальний відсоток пригнічення інтенсивності світіння був на рівні 40,8 %, тобто 50 % зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* на обраних для експерименту рівнях не було досягнуто. Відповідно до даних Elder, 1990 [229] 50 % зниження інтенсивності світіння люмінесцентних бактерій за 15 хв експозиції може відбуватись за концентрації купруму в досліджуваному об'єкті у межах 3,8 – 25,0 мг/л. У дослідженнях Parrott & Sprague, 1993 [230] за рівня Купруму 90,0 мг/л зниження інтенсивності світіння фотобактерій становило 62,6 % за 30 хв дослідження. За даними Lopez-Roldan et al., 2012 [227] 50 % зниження інтенсивності світіння люмінесцентних бактерій залежно від часу становило на 5 хв – 0,72 – 6,35 мг/л, на 15 хв – 0,102 – 580,0 мг/л і на 30 хв – 0,16 – 36,0 мг/л. Тобто можна констатувати певну узгодженість отриманих нами даних з даними літератури.

У нашому досліді концентрації цинку в кінцевому досліджуваному екстракті складали 6,0; 12,0; 60,0; 300,0 і 600,0 мг/л (відповідно рівням у кормі – 12,0; 24,0; 120,0; 600,0 і 1200,0 мг/кг), при цьому протягом 30 хв спостерігали повне пригнічення інтенсивності світіння за 300,0 і 600,0 мг/л. Відповідно до даних Elder, 1990 [229] 50 % зниження інтенсивності світіння люмінесцентних бактерій за 15 хв експозиції може відбуватись за концентрації цинку в досліджуваному об'єкті у досить широких межах 3,5 – 477,0 мг/л. У дослідженнях Adnan et al., 2021 [231] за рівня цинку 80,57 мг/л зниження

інтенсивності світіння фотобактерій становило 50,0 % за 30 хв експерименту. Тобто можна констатувати певну узгодженість отриманих нами даних з даними літератури.

Слід зазначити, що під час дослідження більшості важких металів не вдалося досягти 50 % інгібування світіння *Ph. phosphoreum*, що обумовлено наявними (виробничими) рівнями їх у кормах та недоцільністю використання вищих доз важких металів у кормах в експерименті.

Пригнічення люмінесценції фотобактерій під дією феруму встановлено ще у 1982 році Makemson & Hastings, 1982 [232] на прикладі *V. harveyi*. У роботі Sorokina et al., 2013 [233] наведено, що додавання феруму у концентраціях від 0,56 до 56,0 мг/л до культури *Ph. phosphoreum*, вирощеної в синтетичному середовищі, не впливало на ріст культури, проте за концентрації 56,0 мг/л спричиняло незначне зменшення світіння, тоді як у дослідах з *V. fischeri* за концентрації феруму 7,0 мг/л через 15 хв спостерігали 50 % пригнічення світіння. Якщо порівняти отримані нами дані відносно впливу феруму протягом 30 хв на інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* (штам ІМВ В-7071; Sq3), то отримуємо наступне: в перерахунку рівнів феруму у кормах (75,0; 150,0; 750,0; 3750,0 і 7500,0 мг/кг корму) маємо кінцеві концентрації мікроелементу в досліджуваному екстракті (37,5; 75,0; 375,0; 1875,0 і 3750,0 мг/л відповідно). За концентрації феруму 37,5 мг/л інтенсивність світіння пригнічувалася не значно, а за 75,0 мг/л – не набувала 50 % зниження інтенсивності, тобто, отримані дані є близькими до даних Sorokina et al., 2013 [233], тоді як за концентрацій 375,0-3750,0 мг/л світіння бактерій було взагалі відсутнє, що вказує на високу токсичність зразків.

У нашому досліді концентрації кобальту в кінцевому досліджуваному екстракті складали 0,1; 0,2; 1,0; 5,0 і 10,0 мг/л (відповідно рівням у кормі – 0,20; 0,40; 2,0; 10,0 і 20,0 мг/кг), при цьому максимальний відсоток пригнічення інтенсивності світіння був на рівні 28,9 %, тобто 50 % зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* на обраних для експерименту рівнях не було. За даними Kahru, 1993 [234] 50 % зниження інтенсивності світіння за дії кобальту

фотобактерії досягають за концентрації 135-177 мг/л, а в дослідженнях Mohseni et al., 2018 [235] – за концентрації 16-45,9 мг/л. Тобто отримані нами дані близькі до результатів Mohseni et al., 2018 [234], проте є нижчими за показники Kahru, 1993 [234].

Концентрації мангану у кінцевому досліджуваному екстракті в нашому експерименті складала 6,0; 12,0; 60,0; 300,0 і 600,0 мг/л (відповідно рівням у кормі – 12,0; 24,0; 120,0; 600,0 і 1200,0 мг/кг), при цьому протягом 30 хв спостерігали повне пригнічення інтенсивності світіння за 600,0 мг/л. Згідно з результатами Teodorovic et al., 2009 [236], значення EC_{50} мангану для *V. fischeri* за експозиції 30 хв становить в середньому 351,0 мг/л, а у дослідженнях Reimer, 1999 [237] для даної культури EC_{50} мікроелементу становила 73,1-124,3 мг/л. Тобто отримані нами дані близькі до даних літератури.

У нашому досліді концентрації селену в кінцевому досліджуваному екстракті складала 0,025; 0,05; 0,25; 1,25 і 2,50 мг/л (відповідно рівням у кормі – 0,05; 0,10; 0,5; 2,5 і 5,0 мг/кг), при цьому максимальний відсоток пригнічення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* був на рівні 50,1 % за концентрації 2,5 мг/л. Agias-Barreiro et al., 2010 [238] встановили EC_{50} селену відносно фотобактерії *E. coli-roGFP2* на рівні 3,1 мг/л, що узгоджується з результатами наших досліджень. Attar & Afshar, 2010 [239] дослідили вплив концентрацій Селену (100, 20, 10, 1, 0,1, 0,001 мг/л) на світіння *V. fischeri* DSM 7744, встановили тенденцію до зменшення інтенсивності люмінесценції за дії селену від 0,001 до 100 мг/л (дані відносно EC_{50} Селену в даній роботі не наведені).

Концентрації нікелю у кінцевому досліджуваному екстракті в нашому експерименті складала 0,15; 0,30; 1,5; 7,50 і 15,0 мг/л (відповідно рівням у кормі – 0,3; 0,6; 3,0; 15,0 і 30,0 мг/кг), при цьому максимальний відсоток пригнічення інтенсивності світіння був на рівні 35,5 %, тобто 50 % зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* на обраних для експерименту рівнях не було. За даними Yang et al., 2022 [224] 50 % зниження інтенсивності світіння штаму *V. qinghaiensis* Q67 в досліджуваній воді відбувалося за концентрації нікелю на рівні $5,941 \pm 0,044$ мг/л, що є нижчим за отримані нами дані. А в роботі Lopez-

Roldan et al., 2012 [227] 50 % зниження інтенсивності світіння люмінесцентних бактерій залежно від часу становило на 15 хв – 0,13 – 256,0 мг/л і на 30 хв – 42,2 мг/л, тобто можна констатувати певну узгодженість з отриманими нами даними.

Концентрації хрому у кінцевому досліджуваному екстракті в нашому експерименті складали 0,05; 0,25; 0,5; 2,50 і 5,0 мг/л (відповідно рівням у кормі – 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 і 10,0 мг/кг), при цьому максимальний відсоток пригнічення інтенсивності світіння був на рівні 23,9 %, тобто 50 % зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* на обраних для експерименту рівнях не було. За даними Yang et al., 2022 [224] 50 % зниження інтенсивності світіння штаму *V. qinghaiensis* Q67 в досліджуваній воді відбувалося за концентрації нікелю на рівні $1,313 \pm 0,008$ мг/л, а *Ph. phosphoreum* T3 і *Ph. phosphoreum* 502 на рівні – $8,608 \pm 0,146$ та $20,936 \pm 0,154$ мг/л, що частково узгоджується з отриманими нами даними. А в роботі Lopez-Roldan et al., 2012 [227] 50 % зниження інтенсивності світіння люмінесцентних бактерій залежно від часу становило на 15 хв – 15,3 мг/л і на 30 хв – 16,0 мг/л, тобто можна констатувати певну узгодженість з отриманими нами даними.

У нашому досліді концентрації бромю в кінцевому досліджуваному екстракті складали 0,5; 2,5; 5,0; 25,0 і 50,0 мг/л (відповідно рівням у кормі – 1,0; 5,0; 10,0; 50,0 і 100,0 мг/кг), при цьому максимальний відсоток пригнічення інтенсивності світіння був на рівні 23,2 %, тобто 50 % зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* на обраних для експерименту рівнях не було. За даними Garcia, Gathergood & Scammells, 2005 [240] 50 % зниження інтенсивності світіння *Photobacterium phosphoreum* в досліджуваному екстракті відбувалося за концентрації бромю на рівні 93,9 мг/л, що частково узгоджується з отриманими нами даними.

Слід зазначити, що під час дослідження більшості мікроелементів не вдалося досягти 50 % інгібування світіння *Ph. phosphoreum*, що обумовлено наявними (виробничими) рівнями їх у кормах та недоцільністю використання вищих доз МЕ у кормах в експериментах.

Поряд з цим деякі забруднювачі кормів у малих дозах стимулювали світіння *Ph. phosphoreum*, зокрема, гербіциди Скат (хізалофоп-п-тефуріл) за вмісту препарату 0,008 мг/кг корму в середньому на 3,0 %, Астанес за 0,006 мг/кг – на 12,8 % і Астралід (клопіралід) за вмісту препарату 0,4 мг/кг корму – на 10,4 %; мікотоксини Т₂ токсин за вмісту мікотоксину 0,01 і 0,05 мг/кг в середньому на на 38,0 і 20,8 %, дезоксиніваленол за вмісту мікотоксину 0,05 мг/кг – на 7,9 %, охратоксин А за вмісту мікотоксину 0,005; 0,01 і 0,05 (показник МДР) мг/кг – на 26,0; 20,7 і 16,0 %, фумонізін за вмісту мікотоксину 0,5 мг/кг – на 12,1 % і афлатоксин В₁ за вмісту мікотоксину 0,001-0,005 мг/кг – в середньому на 69,8 % і неорганічні елементи цинк – за вмісту мікроелементу 12,0 мг/кг корму стимулював інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* на 9,5 %, кобальт за вмісту мікроелементу 0,2-2,0 мг/кг – на 18,0-2,1 %, манган за вмісту мікроелементу 12,0-24,0 мг/кг – на 7,0-2,6 %, нікель за вмісту мікроелементу 0,3 мг/кг – на 4,2 % і бром за вмісту мікроелементу 1,0 мг/кг – на 2,9 %. Отримані дані можна пояснити явищем гормезису (стимуляція будь-якої системи організму зовнішніми впливами, що мають силу, недостатню для прояву шкідливих факторів) [241, 242].

Таким чином, в результаті виконання роботи встановлено можливість використання люмінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum* (штам ІМВ В-7071; Sq3) для експресної токсикологічної оцінки кормів з різними рівнями забруднювачів, що базується на зниженні інтенсивності світіння, а результати досліджень було оформлено у вигляді науково-методичних рекомендацій [243, 244]. Проте, більшість токсикантів на максимально допустимих рівнях у кормах характеризували їх як токсичні або сильно токсичні, а саме: ДДТ, α- і β-ізомерів ГХЦГ, діючі речовини гербіцидів (імазамокс+імазапір), (2,4-Д 2-етилгексилловий ефір+флорасулам), хізалофоп-п-тефуріл, калійна сіль гліфосату, (метолахлор+тербутилазін), ацетохлор, нікосульфурон, фунгіциду (карбендазін+ципроконазол), інсектициду (тіаклопрід), Т₂ токсину, дезоксиніваленолу, фумонізіну, афлатоксину В₁, зеараленону, феруму, плумбуму та арсену, що свідчить про необхідність подальших досліджень з

вивчення токсикологічної характеристики вищевказаних речовин в організмі лабораторних і продуктивних тварин, можливо з подальшим переглядом (у бік зниження) МДР відповідного забруднювачів у кормах в Україні.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вирішено науково-прикладне завдання в рамках проблеми безпечності кормів для тварин, а саме розроблено альтернативну експрес-методику визначення загальної токсичності кормів з використанням фотолюмінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum*. У ході досліджень було удосконалено систему культивування та розроблено поживне середовище для біолюмінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum*; проведено валідацію розробленої методики; досліджено вплив різних рівнів пестицидів, мікотоксинів та неорганічних елементів у кормах на люмінесценцію біолюмінесцентних мікроорганізмів та надано їм токсикологічну характеристику.

1. Розроблено поживне середовище для культивування фотолюмінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum*, що містить натрій хлористий, гліцерин, пептон, амоній фосфорнокислий двозаміщений, магній сірчаноокислий семиводний, калій фосфорнокислий двозаміщений, крейду та воду дистильовану (патент України на корисну модель № 143070), та забезпечує кращі умови для накопичення біомаси та світіння бактеріальних клітин *Ph. phosphoreum*.

2. Оптимальні умови та термін зберігання для *Photobacterium phosphoreum*: у пробірках на щільному поживному середовищі за температури $(4,0 \pm 0,3)^\circ\text{C}$ зі щомісячним пересівом протягом 7-ми місяців, а оптимальні умови та термін культивування перед дослідженням: у пробірках на рідкому поживному середовищі за температури $(26,0 \pm 0,8)^\circ\text{C}$ через 24 години після висіву.

3. Визначено оптимальні складові середовищ для передліофілізаційної підготовки та параметри відновлення культури *Ph. phosphoreum*: використання у якості захисного середовища для ліофілізації 3 % розчину натрію хлориду і 5 % розчину сахарози у співвідношенні 1:1 забезпечує відновлення світіння на 2-

4 год після розчинення ліофілізату; оптимальне відновлення культури після ліофілізації відбувається у разі використання охолоджених до $(4,0 \pm 0,3)^\circ\text{C}$ розчинів 3 % натрію хлориду і солей за складом наближених до морської води з рН 6,4-6,9 та послідуною витримкою 30 хв у холодильнику і 60 хв за температури $(15,0-20,0 \pm 0,8)^\circ\text{C}$.

4. Розроблено експрес-методику визначення загальної токсичності кормів з використанням біоломінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum* (патент України на корисну модель № 147856) та визначено валідаційні характеристики методики: вона є специфічною, точною, лінійною, відтворюваною, межа детектування методики (за мікотоксином зеараленоном) становить $0,125 \text{ мкг/см}^3$, а межа визначення $0,25 \text{ мг/кг}$ корму. Експрес-методика визначення загальної токсичності дозволяє швидко (1-1,5) год і з високою вірогідністю надавати токсикологічну оцінку кормам.

5. Досліджено вплив різних рівнів гербіцидів на інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* та надана токсикологічна оцінка кормам за відсотком зниження інтенсивності світіння: препарат Сотейра (імазамокс+імазапір) повністю пригнічував світіння *Ph. phosphoreum* на усіх досліджуваних рівнях гербіциду в кормах, Грінфорт преміум (2,4-Д 2-етилгексилловий ефір+флорасулам) в середньому – на 18,9-74,2 %, Грінфорт хорс (хізалофоп-п-етил) – на 13,9-54,2 %, Скат (хізалофоп-п-тефурил) – на 12,6-67,3 %, Агроцит супер (калійна сіль гліфосату) – на 16,5-71,0 %, Грінфорт екстра (метолахлор+тербутилазин) – 7,6-84,2 %, Астанес (ацетохлор) – на 25,3-67,9 %, Астралід (клопіралід) – 8,5-71,0 %, Грінфорт НК 40 (нікосульфурон) – на 10,8-45,3 %, що дозволило оцінити корми з вмістом гербіцидів Грінфорт преміум менше $0,01 \text{ мг/кг}$, Грінфорт хорс менше $0,008-0,04 \text{ мг/кг}$, Скат менше $0,008-0,02 \text{ мг/кг}$, Агроцит супер менше $0,1-0,5 \text{ мг/кг}$, Грінфорт екстра менше $0,02-0,05 \text{ мг/кг}$, Астанес менше $0,006 \text{ мг/кг}$, Астралід менше $0,4-2,0 \text{ мг/кг}$, Грінфорт НК 40 менше $0,04-0,1 \text{ мг/кг}$ як не токсичні; за вмісту Грінфорт преміум $0,025 \text{ мг/кг}$, Скат $0,04-0,08 \text{ мг/кг}$, Агроцит супер від $1,0 \text{ мг/кг}$, Грінфорт екстра від $0,1 \text{ мг/кг}$, Астанес $0,015 \text{ мг/кг}$, Грінфорт НК 40 від $0,2 \text{ мг/кг}$ як токсичні і за вмісту препаратів

Сотейра 0,01-0,25 мг/кг, Грінфорт преміум 0,05-0,25 мг/кг, Грінфорт хорс 0,08-0,2 мг/кг, Скат від 0,2 мг/кг, Агрошит супер від 2,5 мг/кг, Грінфорт екстра від 0,2 мг/кг, Астанес від 0,03 мг/кг, Астралід 4,0 мг/кг і вище як корми сильно токсичні.

6. Досліджено вплив різних рівнів фунгіциду Карбендазол (карбендазим+ципроконазол) на інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* та надана токсикологічна оцінка кормам за відсотком зниження інтенсивності світіння: за вмісту препарату від 0,01 до 0,25 мг/кг корму спостерігали повне пригнічення світіння *Ph. phosphoreum*, що дозволило оцінити корми з вмістом фунгіциду Карбендазол від 0,01 мг/кг включно як сильно токсичні.

7. Досліджено вплив різних рівнів інсектицидів на інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* та надана токсикологічна оцінка кормам за відсотком зниження інтенсивності світіння: інсектицид Велес (тіаклоприд+дельтаметрин) пригнічував світіння *Ph. phosphoreum* в середньому на 7,8-27,7 %, а інсектицид Вирій (тіаклоприд) – на 8,6-31,2 %, що дозволило оцінити корми з вмістом інсектициду Велес менше 0,004-0,02 мг/кг та Вирій менше 0,004-0,01 мг/кг корму як нетоксичні, а за вмісту 0,04-0,1 мг/кг та 0,02-0,1 мг/кг відповідно як токсичні.

8. Досліджено вплив різних рівнів мікотоксинів на інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* та надана токсикологічна оцінка кормам за відсотком зниження інтенсивності світіння: Т₂ токсин пригнічував інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* на 22,1-49,6 %, зеараленон – на 1,4-89,8 %, дезоксиніваленол – на 15,3-62,8 %, охратоксин А – на 10,4 і 41,8 %, фумонізін – на 17,7-55,6 %, афлатоксин В₁ – на 42,0-70,9 %, що дозволило оцінити корми з вмістом мікотоксину Т₂ менше 0,01-0,05 мг/кг, зеараленону менше 0,1 мг/кг, дезоксиніваленолу менше 0,05-0,1 мг/кг, охратоксину А менше 0,005-0,1 мг/кг, фумонізіну менше 0,5-1,0 мг/кг, афлатоксину В₁ менше 0,001-0,005 мг/кг корму як не токсичні; за вмісту Т₂ токсину 0,01-1,0 мг/кг, зеараленону 0,2 мг/кг, дезоксиніваленолу 0,5-1,0 мг/кг, охратоксину А 0,5 мг/кг, фумонізіну 5,0-10,0 мг/кг, афлатоксину В₁ 0,01 мг/кг – як токсичні і за вмісту зеараленону 1,0-

10,0 мг/кг, дезоксиніваленолу від 2,0 мг/кг, фумонізину від 15,0 мг/кг, афлатоксину В₁ 0,05 мг/кг – як сильно токсичні корми;

9. Досліджено вплив різних рівнів неорганічних елементів на інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* та надана токсикологічна оцінка кормам за відсотком зниження інтенсивності світіння: арсен пригнічував інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* на 5,4-42,6 %, кадмій – на 12,7-22,3 %, плюмбум – на 0,48-40,8 %, меркурій – на 18,4-21,2 %, купрум – на 1,1-40,8 %, цинк – на 12,8-100,0 %, ферум – на 0,84-100,0%, кобальт – в середньому на 25,1 %, манган – на 18,2-100,0 %, селен – на 3,8-50,1 %, нікель – на 13,5-35,5 %, хром – на 12,8-23,9 %, бром – на 3,3-23,2 %, що дозволило оцінити корми з вмістом арсену менше 0,05-0,1 мг/кг, кадмію менше 0,04-0,4 мг/кг, плюмбуму менше 0,5-1,0 мг/кг включно, меркурію менше 0,01-0,1 мг/кг, купруму менше 2,5-25,0 мг/кг та цинку менше 12,0-120,0 мг/кг, феруму менше 75,0 мг/кг, кобальту менше 0,2-2,0 мг/кг, мангану менше 12,0-120,0 мг/кг, селену менше 0,05-0,5 мг/кг, нікелю менше 0,3-3,0 мг/кг, хрому менше 0,1-1,0 мг/кг та бромю менше 1,0-10,0 мг/кг як не токсичні; за вмісту арсену від 0,5-5,0 мг/кг, кадмію від 2,0-4,0 мг/кг, плюмбуму від 5,0-50,0 мг/кг, меркурію від 0,5-1,0 мг/кг, купруму від 125,0-250,0 мг/кг, ф – 150,0 мг/кг, кобальту від 10,0-20,0 мг/кг, селену – 2,5 мг/кг, нікелю від 15,0-30,0 мг/кг та хрому від 5,0-10,0 мг/кг – як токсичні і за вмісту цинку і мангану від 600,0-1200,0 мг/кг, феруму від 750,0-7500,0 мг/кг, селену від 5,0 мг/кг та бромю від 50,0-100,0 мг/кг – як сильно токсичні корми.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Поживне середовище для культивування фотолюмінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum* містить натрій хлористий, гліцерин, пептон, амоній фосфорнокислий двозаміщений, магній сірчаноокислий семиводний, калій фосфорнокислий двозаміщений, крейду та воду дистильовану (Деклараційний патент України на корисну модель № 143070).

2. Курбацька О.В., Оробченко О.Л. Науково-методичні рекомендації «Експрес-методика визначення загальної токсичності кормів з використанням фотолюмінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum*» розглянуто та затверджено на засіданні Методичної комісії Національно-наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»: протокол № 4 від 29 жовтня 2020 р. і схвалено Науково-методичною радою Держпродспоживслужби: протокол № 1 від 12 травня 2021 р. Харків: Стиль-Издат, 2021, 24 с.

3. Одержані результати наукових досліджень рекомендується до використання при підготовці здобувачів вищої освіти за спеціальністю «Ветеринарна медицина» у закладах вищої освіти України.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Богатко, Н. М. Теоретичне та експериментальне обґрунтування застосування експресних методик виявлення хімічних небезпечних факторів м'яса забійних тварин : автореф. дис. ... д-ра вет. наук : 16.00.09 ; Нац. ун-т біоресурсів і природокористування України. Київ, 2021. 50 с.

2. Гойстер, О. С. Розробка експресних методів біотестування Т-2 токсину : автореф. дис. ... канд. біол. наук : 03.00.20 ; Нац. акад. наук України, Ін-т біохімії ім. О. В. Палладіна. Київ, 2014. 18 с.

3. Барабаш, О. В. Наукові основи застосування методів біотестування та біоіндикації в системах управління екологічною безпекою суб'єктів господарювання : автореф. дис. ... д-ра техн. наук : 21.06.01 ; Держ. екол. акад. післядиплом. освіти та упр. Київ, 2020. 38 с.

4. Methneni N., Morales-González J.A., Jaziri A., Mansour H.B., Fernandez-Serrano M. Persistent organic and inorganic pollutants in the effluents from the textile dyeing industries: Ecotoxicology appraisal via a battery of biotests. *Environ Res.* 2021. 196:110956. doi: 10.1016/j.envres.2021.110956

5. Jeong, S.-H., Cho J.-H., Park J.-M. and Denison M. S (2005): Rapid bioassay for the determination of dioxins and dioxin-like PCDFs and PCBs in meat and animal feeds. *Journal of Analytical Toxicology* 29(3), 156-162. <https://doi.org/10.1093/jat/29.3.156>

6. ДСТУ 3570-97 Зерно фуражне, продукти його переробки, комбікорми. Методи визначення токсичності (ГОСТ 13496.7-97, ІДТ). З Поправкою. 1999. 37.

7. Gerssen, A., Bovee T. H. F., van Ginkel L. A., van Iersel M. L. P. S. and Hoogenbooma R. L. A. P. (2019): Food and feed safety: Cases and approaches to identify the responsible toxins and toxicants. *Food Control* 98, 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.10.028>

8. Gorzalczany, S. B. and A. G. Rodriguez Basso (2021): Strategies to apply 3Rs in preclinical testing. *Pharmacology Research & Perspectives* 9(5), e00863. <https://doi.org/10.1002/prp2.863>
9. Efremenko, E. N., Maslova O. V., Kholstov A. V., Senko O.V. and Ismailov A.D. (2016): Biosensitive element in the form of immobilized luminescent photobacteria for detecting ecotoxicants in aqueous flow-through systems. *Luminescence* 31(6), 1283-9. <https://doi.org/10.1002/bio.3104>
10. Senko, O., Stepanov N., Maslova O., Akhundov R., Ismailov A. and Efremenko E. (2019): Immobilized Luminescent Bacteria for the Detection of Mycotoxins under Discrete and Flow-Through Conditions. *Biosensors (Basel)* 20. 9(2), 63. <https://doi.org/10.3390/bios9020063>
11. Li, L., Wu S., Yang P., Liu Q. and Tang S. (2020): Rapid detection and toxicity assessment of ochratoxin A by *Photobacterium leiognathi* in drinking water. *Special Issue: Recent Advances in Meat Products Quality & Safety* 55(3), 1359-1367. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14411>
12. Стегній Б., Куцан О., Оробченко О. (2020). Безпечність кормів і води. Аграрний тиждень. Україна. Розділ Тваринництво. 09 січня. Режим доступу : [Безпечність кормів і води » Портал "Аграрний тиждень. Україна" www.a7d.com.ua](http://www.a7d.com.ua) Агрополітика, новини, технології, техніка, агрохімія та все про агробізнес
13. Закон України. Про безпечність та гігієну кормів. Із змінами і доповненнями, внесеними Законом України від 6 грудня 2018 року № 2639-VIII. Режим доступу : [Про безпечність та гігієну... | від 21.12.2017 № 2264-VIII \(rada.gov.ua\)](http://rada.gov.ua)
14. Kuiper, H. A. and C. Paoletti (2015): Food and feed safety assessment: the importance of proper sampling. *J. AOAC Int.* 2015. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-007>
15. O Mara, F., K. G. Richards, L. Shalloo, T. Donnellan, J. A. Finn and G. Lanigan (2021): Sustainability of ruminant livestock production in Ireland. *Anim. Front.* 11, 32-43. <https://doi.org/10.1093/af/vfab037>

16. Дудник, С.В., Євтушенко, М.Ю. (2013). Водна токсикологія: основні теоретичні положення та їхнє практичне застосування [Монографія]. К.: Видво Українського фітосоціологічного центру. 297 с. ISBN 978-966-306-176-3

17. Запольський, А.К., Салюк, А.І. (2003). Основи екології: підручник. За ред. К.М.Ситника. К.:Вища школа, 2003. 358 с.

18. Наказ «Про затвердження Переліку максимально допустимих рівнів небажаних речовин у кормах та кормовій сировині для тварин» Міністерства аграрної політики та продовольства України; від 19.03.2012 №. 131 зі змінами 11.10.2017 № 550). Режим доступу : <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0503-12#Text>

19. Freire, F. D. C. O., & da Rocha, M. E. B. (2016). Impact of Mycotoxins on Human Health. Fungal Metabolites, 1–23. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19456-1_21-1

20. Goyal, S., Ramawat, K. G., & Mérillon, J.-M. (2017). Different Shades of Fungal Metabolites: An Overview. Fungal Metabolites, 1–29. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4_34

21. Bennett, J.W., Klich, M. (2003). Mycotoxins. Clin. Microbiol. Rev. 16(3). 497-516. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>

22. Pitt, J. I., & Miller, J. D. (2016). A Concise History of Mycotoxin Research. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65(33), 7021–7033. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04494>

23. Pleadin, J., N. Perši, A. Vulić and M. Zadavec (2012): Survey of mycotoxin feed contamination in Croatia. Biotechnol. Anim. Husb. 28, 167-177. <https://doi.org/10.2298/BAH1202167P>

24. Logrieco A., P. Battilani, M. C. Leggieri, Y. Jiang, G. Haesaert, A. Lanubile, G. Mahuku, A. Mesterházy, A. Ortega-beltran, M. Pasti, I. Smeu, A. Torres, J. Xu and G. Munkvold (2021): Perspectives on Global Mycotoxin Issues and Management From the MycoKey Maize Working Group. Plant Dis. 105, 525-537. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1322-FE>

25. Streit, E., G. Schatzmayr, P. Tassis, E. Tzika, D. Marin, I. Taranu, C. Tabuc, A. Nicolau, I. Aprodu, O. Puel and I. P. Oswald (2012): Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed-focus on Europe. *Toxins* 4(10), 788-809. <https://doi.org/10.3390/toxins4100788>
26. Kępińska-Pacelik, J. and W. Biel (2021): Alimentary Risk of Mycotoxins for Humans and Animals. *Toxins* 13, 822. <https://doi.org/10.3390/toxins13110822>
27. Abrunhosa, L., Paterson, R., & Venâncio, A. (2010). Biodegradation of Ochratoxin A for Food and Feed Decontamination. *Toxins*, 2(5), 1078–1099. <https://doi.org/10.3390/toxins2051078>
28. Sweeney, M. (1998). Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 43(3), 141–158. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(98\)00112-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(98)00112-3)
29. Guerre, P. (2016): Worldwide Mycotoxins Exposure in Pig and Poultry Feed Formulations. *Toxins* 8, 350. <https://doi.org/10.3390/toxins8120350>
30. Nazhand, A., Durazzo, A., Lucarini, M, Souto, E.B., Santini, A. (2020). Characteristics, occurrence, detection and detoxification of aflatoxins in foods and feeds. *Foods*. 9(5), 644. <https://doi.org/10.3390/foods9050644>
31. Negash, D. (2018). A review of aflatoxin: occurrence, prevention, and gaps in both food and feed safety. *J. Nutr. Health Food Eng.* 8(2), 190-197. <https://doi.org/10.15406/jnhfe.2018.08.00268>
32. Ropejko, K.; Twaruzek, M. (2021). Zearalenone and its metabolites-general overview, occurrence, and toxicity. *Toxins*. 13(1), 35. <https://doi.org/10.3390/toxins13010035>
33. Yang, R.; Wang, Y.M.; Zhang, L.; Zhao, Z.M.; Zhao, J.; Peng, S.Q. (2016). Prepubertal exposure to an oestrogenic mycotoxin zearalenone induces central precocious puberty in immature female rats through the mechanism of premature activation of hypothalamic kisspeptin-GPR54 signaling. *Mol. Cell Endocrinol.* 9, 62-74. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.08.012>
34. Edite Bezerra da Rocha, M., Freire, F. da C. O., Erlan Feitosa Maia, F., Izabel Florindo Guedes, M., & Rondina, D. (2014). Mycotoxins and their effects on

human and animal health. Food Control, 36(1), 159-165.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.02>

35. Kocasari, F. S., Mor, F., Oguz, M. N., & Oguz, F. K. (2012). Occurrence of mycotoxins in feed samples in Burdur Province, Turkey. Environmental Monitoring and Assessment, 185(6), 4943–4949. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2915-3>

36. Чернолата, Л.П., Погоріла Л.Г., Лихач С.М. (2021). Порівняльний аналіз вмісту мікотоксинів у зерні злакових культур. Корми і кормовиробництво. 92, 173-181.

<https://doi.org/10.31073/kormovyrobnytstvo202192-16>

37. Бойко, Ю. В. Комбінований охр- та дезоксиніваленолотоксикоз курчат-бройлерів і його профілактика : дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук. 16.00.04 - ветеринарна фармакологія та токсикологія. Львів : Львівський НУВМТБ ім С. З. Гжицького, 2018. 176.

38. Hrynova, Y. G., & Kryshchak, Y. A. (2021). Heavy metals pollution problems and ways to overcome them. Engineering of nature management, 1(19), 111–119. (in Ukrainian) [https://doi.org/10.37700/enm.2021.1\(19\).111-119](https://doi.org/10.37700/enm.2021.1(19).111-119)

39. Pourret, O., Bollinger, J. C., & Hursthouse, A. (2021). Heavy Metal: a misused term?. Acta Geochimica, Springer, 2021, 40, 466–471. <https://doi.org/10.1007/s11631-021-00468-0ff>

40. CF/14 INF/1. Joint FAO/WHO FOOD standards programme codex committee on contaminants in foods. 14 th Session (virtual) 3-7 and 13 May 2021 Working document for information and use in discussions related to contaminants and toxins in the GSCTFF. 190. Retrieved from: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-735-14%252FINFO-DOC%252FCF14_INF01x.pdf

41. Bashchenko, M. I., Boiko, O. V., Honchar, O. F., Gutyj, B. V., Lesyk, Y. V., Ostapyuk, A. Y., Kovalchuk, I. I., & Leskiv Kh. Ya. (2020). The effect of milk thistle, metiphen, and silimevit on the protein-synthesizing function of the liver of

laying hens in experimental chronic cadmium toxicosis. *Ukrainian Journal of Ecology*. 10(6), 164–168. https://doi.org/10.15421/2020_276

42. Lavryshyn, Y. Y., & Gutyj, B. V. (2020). Immune status of bull calves' organism in case of experimental chronic cadmium toxicosis. *Bulletin of Poltava State Agrarian Academy*. (2), 244–251. <https://doi.org/10.31210/visnyk2020.02.31>

43. Dmukhalska, Y. B., & Korda, M. M. (2021). Age features of changes of indicators in endogenous intoxication and membrane state under heavy metals and glyphosate action. *Medical and Clinical Chemistry*. (4), 22–29. (in Ukrainian) <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2021.i4.12729>

44. Zhang, F., Li, Y., Yang, M., & Li W. (2012). Content of Heavy Metals in Animal Feeds and Manures from Farms of Different Scales in Northeast China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 9(8), 2658–2668. <https://doi.org/10.3390/ijerph9082658>

45. Eskandari, M. H., & Pakfetrat, S. (2014). Aflatoxins and heavy metals in animal feed in Iran. *Food Additives & Contaminants: Part B*. 7(3), 202–207, <https://doi.org/10.1080/19393210.2013.876675>

46. Hejna, M., Moscatelli, A., Onelli, E., Baldi, A., Pilu, S., & Rossi, L. (2019). Evaluation of concentration of heavy metals in animal rearing system. *Italian Journal of Animal Science*. 18(1), 1372–1384. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2019.1642806>

47. Kabeer, M. S., Hameed, I., Kashif, S.-ur-R., Khan, M., Tahir, A., Anum, F., Khan, S., & Raza, S. (2021). Contamination of heavy metals in poultry eggs: a study presenting relation between heavy metals in feed intake and eggs, *Archives of Environmental & Occupational Health*. 76(4), 220–232. <https://doi.org/10.1080/19338244.2020.1799182>

48. Pohorielov, M. V. (2010). Makro- ta mikroelementy (obmin, patolohiia ta metody vyznachennia): monohrafiia [Macro- and microelements (exchange, pathology and methods of determination): monograph]. SumDU, Sumy, Ukraine, 147 (in Ukrainian).

49. Prashanth, L, Kattapagari, K. K., Chitturi, R. T., Baddam, V. R., & Prasad, L. K. (2015). A review on role of essential trace elements in health and disease. *J. NTR Univ. Health Sci.* 4(2), 75-85. <https://doi.org/10.4103/2277-8632.158577>

50. Vincent, J. B. (2019). Effects of chromium supplementation on body composition, human and animal health, and insulin and glucose metabolism. *Curr. Opin. Clin Nutr. Metab. Care.* 22(6), 483-489. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000604>

51. Calderón Guzmán, D., Juárez Olguín, H., Osnaya Brizuela, N., Hernández Garcia, E., & Lindoro Silva, M. (2019). The Use of Trace and Essential Elements in Common Clinical Disorders: Roles in Assessment of Health and Oxidative Stress Status. *Nutr. Cancer.* 71(1), 13-20. <https://doi.org/10.1080/01635581.2018.1557214>

52. Dias, R. S., Montanholi, Y. R., Lopez, S., Smith, B., Miller, S. P., & France, J. (2016). Utilization of macrominerals and trace elements in pregnant heifers with distinct feed efficiencies. *J. Dairy Sci.* 99(7), 5413-5421. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10796>

53. Younus, N., Zuberi, A., Rashidpour, A., & Metón, I. (2020). Dietary cobalt supplementation improves growth and body composition and induces the expression of growth and stress response genes in *Tor putitora*. *Fish Physiol Biochem.* 46(1), 371-381. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00723-5>

54. Vogt, A. S., Arsiwala, T., Mohsen, M., Vogel, M., Manolova, V., & Bachmann, M. F. (2021). On Iron Metabolism and Its Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 22(9), 4591. <https://doi.org/10.3390/ijms22094591>

55. Gać, P., Czerwińska, K., Macek, P., Jaremków, A., Mazur, G., Pawlas, K., & Poręba, R. (2021). The importance of selenium and zinc deficiency in cardiovascular disorders. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 82, 103553. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103553>

56. Orobchenko, O., Koreneva, Y., Paliy, A., Rodionova, K., Korenev, M., Kravchenko, N., Pavlichenko, O., Tkachuk, S., Nechyporenko, O., & Nazarenko, S. (2022). Bromine in chicken eggs, feed, and water from different regions of Ukraine.

<https://doi.org/10.5219/1710>

57. Balachandran, R. C., Mukhopadhyay, S., McBride, D., Veevers, J., Harrison, F.E., Aschner, M., Haynes, E. N., & Bowman, A. B. (2020). Brain manganese and the balance between essential roles and neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* 295(19), 6312-6329. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.009453>

58. Wu, J., Yang, J. J., Cao, Y., Li, H., Zhao, H., Yang, S., & Li, K. (2020). Iron overload contributes to general anaesthesia-induced neurotoxicity and cognitive deficits. *J. Neuroinflammation.* 17(1), 110. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01777-6>

59. Raisbeck, M. F. (2020). Selenosis in Ruminants. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 36(3), 775-789. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.08.013>

60. Magrone, T. (2020). Nickel-Induced Damage: Pathogenesis and Therapeutical Approaches. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets.* 20(7), 967. <https://doi.org/10.2174/1871530320666200707151502>

61. Zafalon, R. V. A., Pedreira, R. S., Vendramini, T. H. A., Rentas, M. F., Pedrinelli, V., Rodrigues, R. B. A., Risolia, L. W., Perini, M. P., Amaral, A. R., de Carvalho Balieiro, J. C., Pontieri, C. F. F., & Brunetto, M. A. (2021). Toxic element levels in ingredients and commercial pet foods. *Sci. Rep.* 11(1), 21007. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00467-4>

62. Kozhanova, N., Sarsembayeva, N., Lozowicka, B., & Kozhanov, Z. (2021). Seasonal content of heavy metals in the "soil-feed-milk-manure" system in horse husbandry in Kazakhstan. *Vet. World.* 14(11), 2947-2956. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.2947-2956>

63. Koch, F., Kowalczyk, J., Wagner, B., Klevenhusen, F., Schenkel, H., Lahrssen-Wiederholt, M., Pieper, R. (2021). Chemical analysis of materials used in pig housing with respect to the safety of products of animal origin. *Animal.* 15(9), 100319. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100319>

64. Chowdhury, R., Ramond, A., O'Keeffe, L. M., Shahzad, S., Kunutsor, S. K., Muka, T., Gregson, J., Willeit, P., Warnakula, S., Khan, H., Chowdhury, S.,

Gobin, R., Franco, O. H., & Di Angelantonio, E. (2018). Environmental toxic metal contaminants and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 362, k3310. <https://doi.org/10.1136/bmj.k3310>

65. Кернасюк, Ю. В. Пестициди: обсяги використання та тенденції на ринку. Економічний гектар. 03 серпня 2021. Режим доступу : [Пестициди: обсяги використання та тенденції на ринку — Агробізнес сьогодні \(agro-business.com.ua\)](https://agro-business.com.ua)

66. Державний реєстр пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні. Режим доступу : <https://mepr.gov.ua/content/derzhavniy-reestr-pesticidiv-i-agrohimikativ-dozvolenih-do-vikoristannya-v-ukraini-dopovnennya-z-01012017-zgidno-vimog-postanovi-kabinetu-ministriv-ukraini-vid-21112007--1328.html>

67. Доценко, Р. В. (2013). Динаміка виділення біфентрину з організму птиці з яйцями за умов гострого отруєння талстаром 10 % КЕ. Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок. 14(3-4). 162-165.

68. Доценко, Р. В. (2016). Гостра токсичність гліфосату для перепелів. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. Серія: : Ветеринарні науки. 18(2). 65-69.

69. Доценко, Р. В. (2017). Вивчення гострої токсичності тебуконазолу для перепелів самців. Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. 18(2). 293-298.

70. Kobysh, A. I., Chechet, O. M., Shulyak, S. V., Omelchun, Y. A., Myagka, K. S., Marchenko, T. V., & Liniychuk, N. V. (2021). The problem of the distribution of toxicants in livestock and the environment. *Bulletin of Sumy National Agrarian University. The Series: Veterinary Medicine*, 3 (54), 17-25. <https://doi.org/10.32845/bsnau.vet.2021.3.3>

71. Zhu, J., Wang, J., Ding, Y., Liu, B., & Xiao, W. (2018). A systems-level approach for investigating organophosphorus pesticide toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 149, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.066>

72. El-Nahhal, Y. (2020, November 1). Pesticide residues in honey and their potential reproductive toxicity. *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139953>

73. Mayer, D. (2006). General Toxicity. *Drug Discovery and Evaluation*. In: Vogel, H.G., Hock, F.J., Maas, J., Mayer, D. (eds) *Drug Discovery and Evaluation*. Springer, Berlin, Heidelberg 779–800. https://doi.org/10.1007/3-540-29804-5_42

74. Гігієнічна оцінка кормів: Методичні вказівки для проведення лабораторно-практичних і практичних занять зі студентами біолого-технологічного факультету та факультету ветеринарної медицини (повторне видання) / В.П. Лясота, В.В.Малина, В.А. Гришко та ін. Біла Церква, 2015. 47 с.

75. Обов'язковий мінімальний перелік досліджень сировини, продукції тваринного та рослинного походження, комбікормової сировини, комбікормів, вітамінних препаратів та ін., які слід проводити в державних лабораторіях ветмедицини і за результатами яких видається свідоцтво (Ф-2), затверджений Державним департаментом ветмедицини Мінагрополітики України № 549/9148 від 28 квітня 2004 р.

76. Кравченко, О. О. (2017). Зберігання та контроль якості кормів. Методичні рекомендації. Видавничий відділ Миколаївського національного аграрного університету. Миколаїв. 96.

77. Методичні рекомендації щодо контролювання безпечності кормів для птиці за різних технологій їх виробництва : методичні рекомендації. / О.Т. Куцан, Г.М. Шевцова, М.О. Ярошенко, О.Л. Оробченко, М.Є. Романько, Р.В. Доценко, С.С. Ярошенко // Метод. рек-ції: Затв. Науково-методичною радою Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України протокол № 4 від 21 грудня 2011 року. Харків: Стиль-Издат, 2012. 28 с.

78. Контролювання кормів і води за основними показниками безпеки для забезпечення здоров'я великої рогатої худоби : Методичні рекомендації / О.Т. Куцан, Г.М. Шевцова, М.О. Ярошенко, М.Є. Романько, О.Л. Оробченко, Р.В. Доценко, І.О. Герілович, О.І. Філатова // Затв. Науково-методичною радою Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України протокол № 1 від 25 грудня 2014 року. Харків: Стиль-Издат, 2012. 56 с.

79. Коцюмбас І.Я. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів. Львів : Тріада плюс, 2005. 356 с..

80. Москалик, Г.Г. (2016). Факторна екологія : навч. посібник. Чернівці : ЧНУ. 155.

81. Dybas, C. L. (2019). Illuminating New Biomedical Discoveries: Bioluminescent, biofluorescent species glow with promise. *BioScience*, 69(7). 487-495. <https://doi.org/10.1093/biosci/biz052>

82. Widder, E. A. (2010). Bioluminescence in the Ocean: Origins of Biological, Chemical, and Ecological Diversity. *Science*. 328(5979). 704-708.

83. Lee, J. (2008). Bioluminescence: the First 3000 Years (Review). *Journal of Siberian Federal University. Biology*. 3(2008 1). 194-205.

84. Srivastava, A., & Katiyar, K. (2021). The Ecology of Bioluminescence. In H. Suzuki, & K. Ogoh (Eds.), *Bioluminescence - Technology and Biology*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.96636>

85. Haddock, S. H. D., Moline, M. A., & Case, J. F. (2010). Bioluminescence in the Sea. *Annual Review of Marine Science*, 2(1), 443–493. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120308-081028>

86. Бєлих, І.А., Клещев М.Ф. (2011). Біологічні та хімічні сенсорні системи : навч. посіб. Харків. НТУ «ХПІ». 144.

87. McElroy W. D., Seliger H. H., Mechanisms of bioluminescent reactions, in *Light and Life*, W. D. McElroy, B. Glass, Eds. (The Johns Hopkins Press, 1961), pp. 210-257.

88. Hastings, J.W. (1966). The Chemistry of Bioluminescence. *Current Topics in Bioenergetics*. 1, 113-152. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4831-9969-6.50010-X>

89. Johnson F. H. (1967). Chapter III – Bioluminescence. *Comprehensive Biochemistry*. 27, 79-136. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4831-9716-6.50011-2>
90. Lee, J. (2016). Perspectives on Bioluminescence Mechanisms. *Photochemistry and Photobiology*, 93(2), 389-404. <https://doi.org/10.1111/php.12650>
91. Delroisse, J., Duchatelet, L., Flammang, P. and Mallefet, J. (2021). Leaving the Dark Side? Insights Into the Evolution of Luciferases. *Front. Mar. Sci. Sec. Marine Biology*. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.673620>
91. Adams, S. T. Jr., and Miller, S. C. (2020). Enzymatic promiscuity and the evolution of bioluminescence. *FEBS J.* 287, 1369-1380. <https://doi.org/10.1111/febs.15176>
92. Fleiss, A., & Sarkisyan, K. S. (2019). A brief review of bioluminescent systems (2019). *Current Genetics*. 65(4). 877-882. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-00951-5>
93. Martini, S., Kuhnz, L., Mallefet, J., & Haddock, S. H. D. (2019). Distribution and quantification of bioluminescence as an ecological trait in the deep sea benthos. *Scientific Reports*, 9(1). 14654. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50961-z>
94. Lau, E. S., & Oakley, T. H. (2021). Multi-level convergence of complex traits and the evolution of bioluminescence. *Biological Reviews*. 96(2). 673-691. <https://doi.org/10.1111/brv.12672>
95. Brodl, E., Winkler, A., & Macheroux, P. (2018). Molecular mechanisms of Bacterial Bioluminescence. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 16:551-564. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.11.003>
96. Lorenz, W.W., McCann, R.O., Longiaru, M., Cormier, M.J. (1991). Isolation and Expression of a cDNA Encoding *Renilla Reniformis* Luciferase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88(10). 4438-4442.
97. Markova, S.V., Vysotski E.S. (2015). Coelenterazine-dependent luciferases. *Biochem Biokhimiia*. 80(6), 714-732.
98. Hamdan, F.F., Audet, M., Garneau, P., Pelletier, J., Bouvier, M. (2005). High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a

bioluminescence resonance energy transfer 1-based β -arrestin2 recruitment assay. *J Biomol Screen*. 10(5), 463-475.

99. Prinz, A., Diskar, M., Herberg, F.W. (2006). Application of bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for biomolecular interaction studies. *Chembiochem Eur J Chem Biol*. 7(7), 1007-1012.

100. Tannous, B.A., Kim, D.E., Fernandez, J.L., Weissleder, R., Breakefield, X.O. (2005). Codon-optimized *Gaussia luciferase* cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo. *Mol Therapy J Am Soc Gene Therapy*. 11(3), 435-443.

101. Chung, E., Yamashita, H., Au, P., Tannous, B.A., Fukumura, D., Jain, R.K. (2009). Secreted *Gaussia luciferase* as a biomarker for monitoring tumor progression and treatment response of systemic metastases. *PloS One*. 4(12), e8316.

102. Wu, C., Irie, S., Yamamoto, S., Ohmiya, Y. A (2009). Bioluminescent enzyme immunoassay for prostaglandin E(2) using cypridina luciferase. *Lumin J Biol Chem Lumin*. 24(2), 131-133.

103. Abe, K., Kumagai, T., Takahashi, C., Kezuka, A., Murakami, Y., Osawa, Y., Motoki, H, et al. (2012). Detection of pathogenic bacteria by using zinc finger protein fused with firefly luciferase. *Anal Chem*. 84(18), 8028-8032.

104. Nakamura, M., Mie, M., Kobatake, E. (2011). Construction of a functional IgG-Binding luciferase fusion protein for the rapid detection of specific bacterial strains. *Analyst*. 136(1), 71-72.

105. Minekawa, T., Takehara, S., Takahashi, M., Okamoto, H. (2013). Development of a highly sensitive bioluminescent enzyme immunoassay for hepatitis B virus surface antigen capable of detecting divergent mutants. *Clin Vaccine Immunol CVI*. 20(8), 1255-1265).

106. Amodio, E., Dino, C. (2014). Use of ATP bioluminescence for assessing the cleanliness of hospital surfaces: a review of the published literature (1990-2012). *J Infect Public Health*. 7(2), 92-8. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2013.09.005>

107. Citation:Dostálek P., Brányik T. (2005): Prospects for rapid bioluminescent detection methods in the food industry – a review. *Czech J. Food Sci.*, 23: 85-92. <https://doi.org/10.17221/3376-CJFS>
108. Rodriguez, J. A., & Hooper, G. (2019). Adenosine Triphosphate-Bioluminescence Technology as an Adjunct Tool to Validate Cleanliness of Surgical Instruments. *AORN Journal*, 110(6), 596–604. <https://doi.org/10.1002/aorn.12864>.
109. Baba, Y., Sato, Y., Owada, G. and Minakuchi, S. (2018). Effectiveness of a combination denture-cleaning method versus a mechanical method: comparison of denture cleanliness, patient satisfaction, and oral health-related quality of life. *J. Prosthodont. Res.* 62, 353-358. <https://doi.org/10.1016/j.jpor.2018.01.005>
110. Morrissey R., Hill C. and Begley M. (2013). Shining light on food microbiology; applications of Lux-tagged microorganisms in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 32, 4-15. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.05.001>
111. Howgate, P. (2006). A review of the kinetics of degradation of inosine monophosphate in some species of fish during chilled storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(4), 341–353. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.01077.x>
112. Law, J.W., Ab Mutalib, N.S., Chan, K.G., Lee, L.H. (2015). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Front Microbiol.* 12(5), 770. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00770>
113. Ramsaran, H., Chen, J., Brunke, B., Hill, A., Griffiths, M.W. (1998). Survival of bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in soft cheeses. *J Dairy Sci.* 81(7), 1810-7. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(98\)75750-9](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(98)75750-9)
114. Allen, K. J., & Griffiths, M. W. (2001). Use of Luminescent *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 To Assess Eggshell Colonization and Penetration in Fresh and Retail Eggs. *Journal of Food Protection*, 64(12), 2058-2062. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.12.2058>

115. Xu, X., Miller, S. A., Baysal-Gurel, F., Gartemann, K. H., Eichenlaub, R. and Rajashekara G., (2010). Bioluminescence Imaging of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Infection of Tomato Seeds and Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3978-3988. <https://doi.org/10.1128/AEM.00493-10>
116. Hardy, J. (2004). Extracellular Replication of *Listeria monocytogenes* in the Murine Gall Bladder. *Science*, 303(5659), 851–853. <https://doi.org/10.1126/science.1092712>
117. Loessner, H., Leschner, S., Endmann, A., Westphal, K., Wolf, K., Kochruebe, K., ... Weiss, S. (2009). Drug-inducible remote control of gene expression by probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in intestine, tumor and gall bladder of mice. *Microbes and Infection*, 11(14-15), 1097–1105. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.08.002>
118. Cronin, M., Sleator, R. D., Hill, C., Fitzgerald, G. F., & van Sinderen, D. (2008). Development of a luciferase-based reporter system to monitor *Bifidobacterium breve* UCC2003 persistence in mice. *BMC Microbiology*, 8(1), 161. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-161>
119. Fernandes, P. (2006). Applied microbiology and biotechnology in the conservation of stone cultural heritage materials. *Appl Microbiol Biotechnol.* 73, 291-296. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0599-8>
120. Unković, N., Ljaljević Grbić, M., Stupar, M., Vukojević, J., Subakov-Simić, G., Jelikić, A., & Stanojević, D. (2015). ATP bioluminescence method: tool for rapid screening of organic and microbial contaminants on deteriorated mural paintings. *Natural Product Research*, 1–9. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1108975>
121. Nomura, N., Nishihara, R., Nakajima, T., Kim, S. B., Iwasawa, N., Hiruta, Y., ... Suzuki, K. (2019). Biothiol-activatable bioluminescent coelenterazine derivative for molecular imaging in vitro and in vivo. *Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00694>
122. Yuan, M., Ma, X., Jiang, T., Zhang, C., Chen, H., Gao, Y., ... Li, M. (2016). A novel coelenterate luciferin-based luminescent probe for selective and

sensitive detection of thiophenols. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 14(43), 10267–10274. <https://doi.org/10.1039/c6ob02038k>

123. Felder, G. P., Bevilaqua, V. R., & Viviani, V. (2019). A highly efficient, thermostable and cadmium selective firefly luciferase suitable for ratiometric metal and pH-biosensing and for sensitive ATP assays. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 18, 2061–2070. <https://doi.org/10.1039/c9pp00174c>

124. Love, A. C., & Prescher, J. A. (2020). Seeing (and Using) the Light: Recent Developments in Bioluminescence Technology. *Cell Chemical Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.07.02>

125. Fuchter, M. J. (2020). On the Promise of Photopharmacology Using Photoswitches: A Medicinal Chemist's Perspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(20), 11436–11447. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00629>

126. Burtseva, O., Kublanovskaya, A., Baulina, O., Fedorenko, T., Lobakova, E. & Chekanova, K. (2020). The strains of bioluminescent bacteria isolated from the White Sea finfishes: genera *Photobacterium*, *Aliivibrio*, *Vibrio*, *Shewanella*, and first luminous *Kosakonia*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 208, 111895. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111895>

127. Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., & Thompson, F. (Eds.). (2013). *The Prokaryotes*. 1107. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4>

128. Makemson, J. C., Fulayfil N. R., Landry W., Van Ert L. M., Wimpee C. F, Widder E. A., and Case J. F. (1997). *Shewanella woodyi* sp. nov., an exclusively respiratory luminous bacterium isolated from the Alboran Sea. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 1034–1039.

129. Fischer-Le Saux, Viillard M., V., Brunel B., Normand P. And Boemare E. N.. (1999). Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. Luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. Luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *Laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. Temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1645–1656.

130. Fidopiastis, P. M., H. Sorum, and E. G. Ruby. 1999. Cryptic luminescence in the cold-water fish pathogen *Vibrio salmonicida*. *Arch. Microbiol.* 171, 205–209.

131. Kita-Tsukamoto, K., Yao, K., Kamiya, A., Yoshizawa, S., Uchiyama, N., Kogure, K., & Wada, M. (2006). Rapid identification of marine bioluminescent bacteria by amplified 16S ribosomal RNA gene restriction analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 256(2), 298–303. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00129.x>

132. Грецький, І. О., Громозова О. М., Воцелко С. К. (2017). Використання композицій полісахаридів мікробного походження для культивування люмінесцентних бактерій *Photobacterium phosphoreum* ІМВ В-7071. Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія : Біологія. 2. 46-51.

133. Pooley, D. T., Larsson, J., Jones, G., Rayner-Brandes, M. H., Lloyd, D., Gibson, C., & Stewart, W. R. (2004). Continuous culture of photobacterium. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(11), 1457–1463. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2003.09.003>

134. Sardo, A., Accornero, A., & Giovinazzi, F. (2008). Luminescent bacteria as indicators of marine water quality: Preliminary results from the Campania coastal waters. *Chemistry and Ecology*, 24(sup1), 19–26. <https://doi.org/10.1080/02757540801970191>

135. Strotmann, U., Pastor Flores, D., Konrad, O., & Gendig, C. (2020). Bacterial Toxicity Testing: Modification and Evaluation of the Luminescent Bacteria Test and the Respiration Inhibition Test. *Processes*, 8(11), 1349. <https://doi.org/10.3390/pr8111349>

136. Hongda, F., Yanhong, D., Zhanzhou, X., Yin, Y., Xiuqin, Li, Bin, Y. (2008). Cultural and luminescent Conditions of a Marine luminous Bacterium. *Marine Science Bulletin*. 10 (1), 45-53.

137. Deeva, A. A., Temlyakova, E. A., Sorokin, A. A., Nemtseva, E. V., Kratasyuk, V. A. (2016). Structural distinctions of fast and slow bacterial luciferases

revealed by phylogenetic analysis. *Bioinformatics*. 32(20), 3053-3057, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw386>

138. Ramesh, C.H., Mohanraju, R., Kada, N. M., Karthick P., Sumantha, N. (2014). Impact of light, temperature, salinity and glycerol on the intensity of luminescence and growth of marine bioluminescent bacteria *Vibrio campbelli* (strain STF1). *Current Science*, 106(4), 511.

139. Iglesias, R.M.V., García, M.L., Ortiz, G.E., Álvarez, V.C.M., Lugioyo, G.G.M., Núñez, M.R.R. (2020). Influence of pH and NaCl concentration on growth and light emission by two strains of *Vibrio harveyi*. *Biotecnol Apl.* 37(4), 4211-4217.

140. Kannahi, M., Sivasankari, S. (2014). Isolation and Identification of Bioluminescent Bacteria from Marine Water at Nagapattinam Sea Shore Area. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 26(2), 346-351.

141. Кацев, А. М., Макемсон, Дж. (2006). Идентификация светящихся бактерий, выделенных из Черного и Азовского морей. Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия Биология, химия». 19(58), 4. 111-116.

142. Малыгина, И. Ю., Кацев, А. М. (2003). Светящиеся бактерии Черного и Азовского морей. *Экология морей*. 64. 23-31.

143. Medvedeva, S. E., Mogil'naya, O. A., Popova, L. Yu. (2006). Heterogeneity of the populations of marine luminescent bacteria *Photobacterium leiognathi* under different conditions of cultivation. *Microbiology*. 75(3), 292-299.

144. Кацев, А. М. (2002). Некоторые характеристики Черноморских светящихся бактерий и их прикладное значение. *Прикл. биохимия и микробиология*. 2. 189-192.

145. Dunlap, P. V. (1985). Osmotic control of luminescence and growth in *Photobacterium leiognathi* from ponyfish light organs. *Arch. Microbiol.* 141, 44-50.

146. Hastings, J. W. (1983). Biological diversity, chemical mechanisms, and the evolutionary origins of bioluminescent systems. *J. Mol. Evol.* 19, 309-321.

147. Lee, B., Lee, J., Shin, D., Kim, E. (2001). Statistical optimization of bioluminescence *Photobacterium phosphoreum* KCTC 2852. *J. Biosci. Bioeng.* 92(1), 72-76. <http://dx.doi.org/10.1263/jbb.92.72>

148. Salmon, K. J. Budsberg, C. F. Wimpee, and J. F. Braddock1 (2003). Isolation and Identification of *Photobacterium phosphoreum* from an Unexpected Niche. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(11), 6938-6942. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.11.6938-6942.2003>

149. Kuts, V.V., Ismailov, A.D. (2009). Physiological and emission characteristics of the luminescent bacterium *Photobacterium Phosphoreum* from the White Sea. *Microbiology.* 78, 554. <https://doi.org/10.1134/S002626170905004X>

150. Деревин, Д. Г., Алешина, Е. С. (2008) Влияние солей на свечение биосенсора на основе природного и рекомбинантного штамма люминесцирующих бактерий. *Прикл. биохим. и микробиол.* 44(3). 324–329.

151. Грецкий, И. А. (2014) Исследования физиологических особенностей светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum* ИМВ В-7071 ISSN 0201-8462. *Мікробіол. журн.*, 76(3), 42-47.

152. Bergey, D. H. and Holt, J.G. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 9-th Edition, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland. 787.

153. Воробьева, Т.И., Высоцкий, Е.С., Заворуев, В.В. (1980). Регуляция синтеза люциферазы у *Photobacterium mandaramensis*. *Микробиология.* 49(4), 517-520.

154. Кузнецов, А.М., Родичева, Э.К., Рожаева, Л.П. (1978). Полусинтетическая среда для светящихся бактерий рода *Photobacterium*. *Известия СО АН СССР (серия биологическая).* 1. 37-39.

155. Егоров Н.С., Данилов В.С., Шибилкина О.К., Баранова Н.А. (1984) Питательная среда для культивирования *Photobacterium fisheri* - продуцентов люциферазы. SU1089976.

156. Деклараційний патент України на корисну модель № 69001 А МПК С12N 1/20 (2006.01) / Живильне середовище для бактерій *Vibrio fischeri* та *Ph. phosphoreum* / Семерніна О.Є. ; заявник і власник патенту Національний

науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»; заявл. 25.11.2003 – 20031110643; опубл. 16.08.2004, бюл. № 8/2004. – 2 с.

157. Деклараційний патент України на корисну модель № 114282 МПК С12N 1/20 (2006.01), С12P 19/06 (2006.01), С08F 20/56 (2006.01) / Середовище для підтримання тривалої біоломінесценції бактерій *Photobacterium phosphoreum* ІМВ В-7071, що використовуються в біосенсорних пристроях для оцінки екологічних ризиків / Грецький І.О., Громозова О.М., Воцелко С.К. заявник і власник патенту Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України; заявл. 08.07.2016 – u201607484; опубл. 10.03.2017, бюл. № 5/2017. – 4 с.

158. K. Christopher and E. Bruno, “Identification of Bacterial Species in Tested Studies for Laboratory Teaching” in Proceedings of the 24th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education 2003, edited by M. A. O’Donnell. 14. N. A. Yaser, M. F. F. Abdullah, A. M. Aris, I. I

159. Yaser, N. A., Abdullah, M. F. F., Aris, A. M., Zainudin, I. I. (2014). Isolation And Identification Of Bioluminescent Bacteria In Squid And Water Of Malaysia. Int'l Journal of Advances in Agricultural & Environmental Engg. (IJAAEE). 1(2), 225-228. <http://dx.doi.org/10.15242/IJAAEE.C0215136>

160. Ramesh, C.H. and Mohanraju, R. (2017). A Case Report on the Survivability of Marine Luminous Bacteria *Vibrio campbellii* STF1 under Starvation Conditions. Oceanogr Fish Open Access J 5(5): OFOAJ.MS.ID.555671 (2018). <http://dx.doi.org/10.19080/OFOAJ.2018.05.555671>

161. Meighen, E. A. (1999). Autoinduction of light emission in different species of bioluminescent bacteria. Luminescence, 14(1), 3–9. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1522-7243\(199901/02\)14:1<3::aid-bio507>3.0.co;2-4](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1522-7243(199901/02)14:1<3::aid-bio507>3.0.co;2-4)

162. DeLisa, M. P., & Bentley, W. E. (2002). Microbial Cell Factories, 1(1), 5. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-1-5>

163. Janda, I., & Opekarová, M. (1989). Long-term preservation of active luminous bacteria by lyophilization. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 3(1), 27–29. <http://dx.doi.org/10.1002/bio.1170030106>

164. Choi, S. H., & Gu, M. B. (2000). Enhancement in the viability and biosensing activity of freeze-dried recombinant bioluminescent bacteria. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 5(3), 202–206. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02936595>

165. Jezowska-Trzebiatowska, B., Kochel, B., Slawinski, J., Strek, W. (1989) *Biological luminescence*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 647. ISBN 9789814539807

166. Ahn, H. T., Jang, I. S., Dang, T. V., Kim, Y. H., Lee, D. H., Choi, H. S., ... Kim, M. I. (2021). Effective Cryopreservation of a Bioluminescent Auxotrophic *Escherichia coli*-Based Amino Acid Array to Enable Long-Term Ready-to-Use Applications. *Biosensors*, 11(8), 252. <http://dx.doi.org/10.3390/bios11080252>

167. Похиленко, В.Д., Баранов, А.М., Детушев К.В. (2009). Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития. *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки*. 4(12). 99-121.

168. Su, L., Jia, W., Hou, C., & Lei, Y. (2011). Microbial biosensors: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5), 1788–1799. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.09.005>

169. Hillson, N. J., Hu, P., Andersen, G. L., & Shapiro, L. (2007). *Caulobacter crescentus* as a Whole-Cell Uranium Biosensor. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(23), 7615–7621. <https://doi.org/10.1128/aem.01566-07>

170. Casavant, N. C., Thompson, D., Beattie, G. A., Phillips, G. J., & Halverson, L. J. (2003). Use of a site-specific recombination-based biosensor for detecting bioavailable toluene and related compounds on roots. *Environmental Microbiology*, 5(4), 238–249. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00420.x>

171. Date, A., Pasini, P., & Daunert, S. (2007). Construction of Spores for Portable Bacterial Whole-Cell Biosensing Systems. *Analytical Chemistry*, 79(24), 9391–9397. <https://doi.org/10.1021/ac701606g>

172. Jonkers, T. J. H., Steenhuis, M., Schalkwijk, L., Luirink, J., Bald, D., Houtman, C. J., Kool, J., Lamoree, M. H., & Hamers, T. (2020). Development of a high-throughput bioassay for screening of antibiotics in aquatic environmental samples. *Science of the Total Environment*, 729, 1-9. [139028]. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139028>

173. Kassim, A., Halmi, M. I. E., Gani, S. S. A., Zaidan, U. H., Othman, R., Mahmud, K., & Shukor, M. Y. A. (2020). Bioluminescent method for the rapid screening of toxic heavy metals in environmental samples using *Photobacterium leiognathi* strain AK-MIE. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 15. 196:110527. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110527>

174. Bhuvaneshwari, M., Eltzov, E., Veltman, B., Shapiro, O., Sadhasivam, G., & Borisover, M. (2019). Toxicity of chlorinated and ozonated wastewater effluents probed by genetically modified bioluminescent bacteria and cyanobacteria *Spirulina* sp. *Water Research*, 164, 114910. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.114910>

175. Vermeirssen E., Campiche S., Dietschweiler C., Werner I., Burkhardt M. (2018). Ecotoxicological assessment of immersion samples from façade render containing free or encapsulated biocides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37, 2246–2256. <https://doi.org/10.1002/etc.4176>

176. Dieudonne, A., Preveral, S., & Pignol, D. (2020). A sensitive magnetic arsenite-specific biosensor hosted in magnetotactic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 86(14):e00803-20. <https://doi.org/10.1128/aem.00803-20>

177. De Zwart, D., & Slooff, W. (1983). The Microtox as an alternative assay in the acute toxicity assessment of water pollutants. *Aquatic Toxicology*, 4(2), 129–138. [https://doi.org/10.1016/0166-445x\(83\)90050-4](https://doi.org/10.1016/0166-445x(83)90050-4)

178. Johnson, B. T. (2005). Microtox® Acute Toxicity Test. Small-Scale Freshwater Toxicity Investigations, 1. 69-105. https://doi.org/10.1007/1-4020-3120-3_2
179. Castillo, M., Alonso, M. C., Riu, J., Reinke, M., Kloter, G., Dizer, H., Fischer, B., Hansen, P. D. & Barcelo, D. (2001). Identification of cytotoxic compounds in European wastewaters during a field experiment. *Anal. Chim. Acta* 426. 265-277.
180. Kováts, N., Füle, L., Magyar, I., Szalay, T. and Kiss, I. (2006). Sensitivity of Ecotoxicological Tests in Analysis of Superfund Sites. *Acta Biologica Hungarica*. 57(2), 211-220.
181. Lange, B. Operating manual LUMISTox, Diisseldorf, Germany; 1991
182. Nohava, M., Vogel, W. R., & Gaugitsch, H. (1995). Evaluation of the luminescent bacteria bioassay for the estimation of the toxicological potential of effluent water samples—Comparison with data from chemical analyses. *Environment International*, 21(1), 33–37. [https://doi.org/10.1016/0160-4120\(94\)00020-8](https://doi.org/10.1016/0160-4120(94)00020-8)
183. Jennings, V. L. K., Rayner-Brandes, M. H., & Bird, D. J. (2001). Assessing chemical toxicity with the bioluminescent photobacterium (*vibrio fischeri*): a comparison of three commercial systems. *Water Research*, 35(14), 3448–3456. [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(01\)00067-7](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(01)00067-7)
184. Sun, T.S., and Stahr, H.M. (1993). Evaluation and application of a bioluminescent bacterial genotoxicity test, *J. AOAC Int.*, 76, 893–898.
185. Verschaeve, L., Van Gompel, J., Thilemans, L., Regniers, L., Vanparrys, P., and van der Lelie, D. (1999). VITOTOX bacterial genotoxicity and toxicity test for the rapid screening of chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, 33, 240–248.
186. Kokkali V., Delft W. (2014). Overview of commercially available bioassays for assessing chemical toxicity in aqueous samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 61. 133–155. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.001>
187. EN ISO 16140-2: 2016. Microbiology of the food chain - Method validation - Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods

against a reference method. International Organization for standardization, Geneva, Switzerland. 74.

188. Kutsan, O. T., Orobchenko, O. L., & Kochergin, Yu. A. (2014). Toksiko-biohimichna charakteristika neorganichnih elementiv ta zastosuvannya rentgenofluorestsentnogo analizu u veterinarniy meditsini (navchalnii posybnik), [Toxic-biochemical characteristic of inorganic elements and application of X-ray fluorescence analysis in veterinary medicine (methodical manual)]. Planet Print, Kharkiv, Ukraine, 300. ISBN 978-966-2046-43-4 (In Ukrainian)

189. Допустимі дози, концентрації, кількості на рівні вмісту пестицидів у сільськогосподарській сировині, харчових продуктах, повітрі робочої зони, атмосферному повітрі, воді водойм, ґрунті: ДСанПіН 8.8.1.2.3.4–000–2001, затв. МОЗ України 20.09.01 №137. Київ, 2001. 244 с.

190. сайт <https://eur-lex.europa.eu/>

191. Stehni, V. T., Orobchenko, O. L., & Koreneva, Yu. M. (2021). Diahnostyka ta profilaktyka otruiennia Bromom silskohospodarskoї ptytsi : Methodychni rekomendatsii [Diagnosis and prevention of Bromine poisoning of poultry: Methodical recommendations]. Styl-Yzdat, Kharkiv, Ukraine, 20. (In Ukrainian)

192. Деклараційний патент України на корисну модель № 143070 МПК (51) С12N 1/20 / Поживне середовище для культивування фотолюмінісцентних мікроорганізмів *Photobacterium Phosphoreum* / Оробченко О.Л.; Курбацька О.В.; Куцан О.Т.; Калашник Н.В. ; заявник і власник патенту Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» ; заявл. 21.01.2020 – и 2020 00341; опубл. 10.07.2020, бюл. № 13/2020. – 4 с.

193. Курбацька О.В., Оробченко О.Л. Перспектива застосування фотолюмінісцентних мікроорганізмів для визначення загальної токсичності кормів. «Актуальні проблеми підвищення якості та безпека виробництва й переробки продукції тваринництва» : матеріали Міжнародної науково-практичної конференції. (14 лютого 2020 року). Дніпро. 2020. С. 331-333.

194. Курбацька О.В., Оробченко О.Л. Біоломінесценція у системі лабораторної діагностики отруєнь тварин. / «Сучасні досягнення та перспективи клінічної лабораторної медицини у діагностиці хвороб людини та тварин». Матеріали науково-практичної міжнародної дистанційної конференції (17 березня 2021 року). Т. 2. Х. : НФаУ, 2021. С. 63-64.

195. Курбацька О.В., Оробченко О.Л. (2022). Визначення оптимальних параметрів передліофілізаційної підготовки та відновлення культури *Photobacterium Phosphoreum* для еко-токсикологічних досліджень. «ЄДИНЕ ЗДОРОВ'Я - 2022»: матеріали Міжнародної наукової конференції присвяченої 100-річчю кафедр факультету ветеринарної медицини (22-24 вересня 2022 року). Київ. 2022. С. 134-135.

196. Курбацька О., Оробченко О. Вивчення впливу зеараленону на люмінесцентні властивості *Photobacterium phosphoreum* : матеріали Четвертого щорічного регіонального наукового симпозиуму в рамках концепції «Єдине здоров'я» за підтримки ПЗБЗ в Україні (20-24 травня). Київ. 2019. С. 444.

197. Курбацька, О. В., & Оробченко, О. Л. (2021). Валідація експрес-методики визначення загальної токсичності кормів з використанням біоломінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum*. «Ветеринарна медицина» міжвідомчий тематичний науковий збірник, 107, 56-61. <https://doi.org/10.36016/VM-2021-107-9>

198. Курбацька, О. В., & Оробченко, О. Л. (2021). Експрес-методика визначення загальної токсичності кормів з використанням біоломінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum*. Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин, 22(2), 217-224. <https://doi.org/10.36359/scivp.2021-22-2.24>

199. Деклараційний патент України на корисну модель № 147856 МПК (51) G 01N 33/02, C12Q 1/02 / Спосіб визначення загальної токсичності кормів за допомогою фотобактерій *Photobacterium phosphoreum* / Курбацька О.В.; Оробченко О.Л. ; заявник і власник патенту Національний науковий центр

«Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» ; заявл. 14.01.2021 – и 2021 00129; опубл. 16.06.2021, бюл. № 24/2021. – 2 с.

200. Курбацька О.В.; Оробченко О.Л. Науково-методичні рекомендації «Експрес-методика визначення загальної токсичності кормів з використанням фотолюмінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum*» розглянуто та затверджено на засіданні Методичної комісії Національно-наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»: протокол № 4 від 29 жовтня 2020 р. і схвалено Науково-методичною радою Держпродспоживслужби: протокол № 1 від 12 травня 2021 р. Харків: Стиль-Издат, 2021, 24 с.

201. Курбацька О.В. (2022). Вплив залишкових кількостей пестицидів різних груп у кормах на люмінесценцію *Ph. phosphoreum*. Collection of theses of scientific and methodical reports of international scientific-practical conference «Science as a basis for the development of modern countries». January 27-28, Bratislava, Slovakia. 89-94.

202. Orobchenko O., Kurbatska O., Paliy A. and Palii A. (2023). Toxicological evaluation of feed contaminated with mycotoxins using luminescent microorganisms *Photobacterium phosphoreum*. Veterinarska stanica, 54 (2), 147-163. <https://doi.org/10.46419/vs.54.2.7>

203. Курбацька, О. В., Оробченко, О. Л. (2022). Токсикологічна оцінка кормів із різними рівнями мікроелементів з використанням люмінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium Phosphoreum*. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина, 2(57), 26-37. <https://doi.org/10.32845/bsnau.vet.2022.2.4>

204. Курбацька, О. В., Оробченко, О. Л. (2022). Токсикологічна оцінка кормів із різними рівнями важких металів з використанням люмінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum*. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки, 24(106), 158–167. <https://doi.org/10.32718/nvlvet10624>

205. Курбацька О.В., Оробченко О.Л. Токсикологічна оцінка кормів із різними рівнями неорганічних елементів з використанням біоломінесценції. «Сучасний стан розвитку ветеринарної медицини, науки і освіти»: матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченій 35-річчю заснування факультету ветеринарної медицини (12-13 жовтня 2022 року). Житомир: Поліський національний університет. 2022. С. 360-366.

206. Huyen T. T. (2017). Study the Inhibition of some Toxicants on the Luminescent Ability of *Vibrio fischeri*. VNU Journal of Science: Earth and Environmental Sciences, 33(1S). <https://doi.org/10.25073/2588-1094/vnuees.4162>

207. Ecological Relevance of Pesticide Residues in Alberta Surface Waters: An Evaluation Based on Toxicity Testing 2001. Alberta Environment Water Management Division and HydroQual Laboratories Ltd. 35. ISBN: 07785-2446-9 (On-line Edition)

208. Olkova, A. (2022). Targeted Selecting of Bioassay Methods as an Alternative to the “Battery of Bioassays” Ecological Engineering & Environmental Technology, 23(2), 153-161. <https://doi.org/10.12912/27197050/145751>

209. Vurm, R., Tajnaiová, L., Kofroňová, J. (2021). The Influence of Herbicides to Marine Organisms *Aliivibrio fischeri* and *Artemia salina*. Toxins. 9, 275. <https://doi.org/10.3390/toxins9110275>

210. Osano, O., Admiraal, W., Klamer, H. J. C., Pastor, D., & Bleeker, E. A. J. (2002). Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*. Environmental Pollution, 119(2), 195-202. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(01\)00334-7](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(01)00334-7)

211. Souissi, Y., Bouchonnet, S., Bourcier, S., Kusk, K. O., Sablier, M., & Andersen, H. R. (2013). Identification and ecotoxicity of degradation products of chloroacetamide herbicides from UV-treatment of water. Science of The Total Environment, 458-460, 527–534. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.064>

212. Joly, P., Bonnemoy, F., Charvy, J.-C., Bohatier, J., & Mallet, C. (2013). Toxicity assessment of the maize herbicides S-metolachlor, benoxacor, mesotrione

and nicosulfuron, and their corresponding commercial formulations, alone and in mixtures, using the Microtox® test. *Chemosphere*, 93(10), 2444–2450. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.08>

213. Nafradi, M., Hlogyik, T., Farkas, L., Alapi T. (2021). Comparison of the heterogeneous photocatalysis of imidacloprid and thiacloprid – reaction mechanism, ecotoxicity, and the effect of matrices. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 9, 106684. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106684>

214. Berberidou, C., Kitsiou, V., Lambropoulou, D. A., Michailidou, D., Kouras, A., & Poullos, I. (2019). Decomposition and detoxification of the insecticide thiacloprid by TiO₂ mediated photocatalysis: kinetics, intermediate products and transformation pathways. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. <https://doi.org/doi:10.1002/jctb.6034>

215. Farré, M., Gonçalves, C., Lacorte, S., Barceló, D., & Alpendurada, M. (2002). Pesticide toxicity assessment using an electrochemical biosensor with *Pseudomonas putida* and a bioluminescence inhibition assay with *Vibrio fischeri*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373(8), 696–703. <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1313-z>

216. Yates, I. E. and J. K. Porter (1982). Bacterial bioluminescence as a bioassay for mycotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 1072-1075. <https://doi.org/10.1128/AEM.44.5.1072-1075.1982>

217. Katsev, A. M., O. S. Goïster and N. F. Starodub (1999): Effect of mycotoxin T-2 on bioluminescent intensity of bacteria. *Ukr. Biochem. J.* 75, 99-103.

218. Sarter, S., I. Metayer and N. Zakhia (2008): Effects of mycotoxins, aflatoxin B1 and deoxynivalenol, on the bioluminescence of *Vibrio fischeri*. *World Mycotoxin J.* 1, 189-193. <https://doi.org/10.3920/WMJ2008.1011>

219. Krifaton, C., J. Kukolya, S. Szoboszlay, M. Cserhádi, Á. Szűcs and B. Kriszt (2010): Adaptation of bacterial biotests for monitoring mycotoxins. *WIT Trans. Ecol. Environ.* 132, 143-153. <https://doi.org/10.2495/ETOX100141>

220. Li, J., G. X. Jiang, B. Yang, X. H. Dong, L. Y. Feng, S. Lin, F. Chen, M. Ashraf and Y. M. Jiang (2012): A luminescent bacterium assay of fusaric acid

produced by *Fusarium proliferatum* from banana. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 1347-1354. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5546-6>

221. Jian, Q., L. Gong, T. Li, Y. Wang, Y. Wu, F. Chen, H. Qu, X. Duan and Y. Jiang (2017): Rapid assessment of the toxicity of fungal compounds using luminescent *Vibrio qinghaiensis* sp. Q67. *Toxins* 9, 335. <https://doi.org/10.3390/toxins9100335>

222. Efremenko, E., O. Maslova, N. Stepanov and A. Ismailov (2021): Using cholinesterases and immobilized luminescent Photobacteria for the express-analysis of mycotoxins and estimating the efficiency of their enzymatic hydrolysis. *Toxins* 13, 34. <https://doi.org/10.3390/toxins13010034>

223. García, J. C. (2021): Mycotoxins: Toxicology, Identification and Control. *Toxins* 13, 242. <https://doi.org/10.3390/toxins13040242>

224. Yang, J., Hu, S., Liao, A., Weng, Y., Liang, S., & Lin, Y. (2022). Preparation of freeze-dried bioluminescent bacteria and their application in the detection of acute toxicity of bisphenol A and heavy metals. *Food Sci Nutr.* 10(6), 1841–1853. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2800>

225. He, Q., Qu, R., Wang, X., Wei, Z., Sun, P., & Wang, Z. (2015). Toxicity of Arsenic to *Photobacterium phosphoreum*, *Daphnia magna*, and *Danio rerio* at Different pH Levels. *CLEAN - Soil, Air, Water*, 44(1), 72–77. <https://doi.org/10.1002/clen.201400124>

226. Qu, R.-J., Wang, X.-H., Feng, M.-B., Li, Y., Liu, H.-X., Wang, L.-S., & Wang, Z.-Y. (2013). The toxicity of cadmium to three aquatic organisms (*Photobacterium phosphoreum*, *Daphnia magna* and *Carassius auratus*) under different pH levels. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 95, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.05.020>

227. Lopez-Roldan, R., Kazlauskaitė, L., Ribo, J., Riva, M. C., González, S., & Cortina, J. L. (2012). Evaluation of an automated luminescent bacteria assay for in situ aquatic toxicity determination. *Science of The Total Environment*, 440, 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.043>

228. Wang, X., Qu, R., Wei, Z., Yang, X., & Wang, Z. (2014). Effect of water quality on mercury toxicity to *Photobacterium phosphoreum*: Model development and its application in natural waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104, 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.029>

229. Elder, J. F. (1990). Applicability of ambient toxicity testing to national or regional water-quality assessment. (U.S. Geological Survey circular : 1049). 60. <https://doi.org/10.3133/cir1049>

230. Parrott, J. L., & Sprague, J. B. (1993). Patterns in Toxicity of Sublethal Mixtures of Metals and Organic Chemicals Determined by Microtox® and by DNA, RNA, and Protein Content of Fathead Minnows (*Pimephales promelas*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50(10), 2245–2253. <https://doi.org/10.1139/f93-250>

231. Adnan, N. A., Halmi, M. I. E., Abd Gani, S. S., Zaidan, U. H., & Abd Shukor, M. Y. (2021). Comparison of Joint Effect of Acute and Chronic Toxicity for Combined Assessment of Heavy Metals on *Photobacterium* sp. NAA-MIE. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 18, 6644. <https://doi.org/10.3390/ijerph18126644>

232. Makemson, J. C., & Hastings, J. W. (1982). Iron represses bioluminescence and affects catabolite repression of luminescence in *Vibrio harveyi*. *Current Microbiology*. 7, 181–186. <https://doi.org/10.1007/BF01568972>

233. Sorokina, E. V., Yudina, T. P., Bubnov, I. A., & Danilov, V. S. (2013). Assessment of iron toxicity using a luminescent bacterial test with an *Escherichia coli* recombinant strain. *Microbiology*. 82(4), 439–444. <https://doi.org/10.1134/s0026261713040115>

234. Kahru, A. (1993). In Vitro Toxicity Testing Using Marine Luminescent Bacteria (*Photobacterium phosphoreum*): the Biotox™ test. *Alternatives to Laboratory Animals*. 21(2), 210–215. <https://doi.org/10.1177/026119299302100216>

235. Mohseni, M., Abbaszadeh, J., Maghool, S.-S., & Chaichi, M.-J. (2018). Heavy metals detection using biosensor cells of a novel marine luminescent bacterium *Vibrio* sp. MM1 isolated from the Caspian Sea. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 148, 555–560. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.002>

236. Teodorovic, I., Planojevic, I., Knezevic, P., Radak, S., & Nemet, I. (2009). Sensitivity of bacterial vs. acute *Daphnia magna* toxicity tests to metals. *Open Life Sciences*. 4(4), 482–492. <https://doi.org/10.2478/s11535-009-0048-7>
237. Reimer, P. S. (1999) Environmental effects of manganese and proposed freshwater guidelines to protect aquatic life in British Columbia [MSc thesis]. Vancouver, B.C., University of British Columbia. 56. <https://www2.gov.bc.ca/assets/gov/environment/air-land-water/water/waterquality/water-quality-guidelines/approved-wqgs/manganese-tech.pdf>
238. Arias-Barreiro, C. R., Okazaki, K., Koutsaftis, A., Inayat-Hussain, S. H., Tani, A., Katsuhara, M., Kimbara, K., & Mori, I. C. (2010). A Bacterial Biosensor for Oxidative Stress Using the Constitutively Expressed Redox-Sensitive Protein roGFP2. *Sensors*. 10(7), 6290–6306. <https://doi.org/10.3390/s100706290>
239. Attar, H., & Afshar, S. (2010). Design of Sensible Biosensor for Rapid Detection of Biocides in Potable Water. *Asian Journal of Biotechnology*. 2, 120-126. <https://doi.org/10.3923/ajbkr.2010.120.126>
240. Garcia, M. T., Gathergood, N., & Scammells, P. J. (2005). Biodegradable ionic liquids : Part II. Effect of the anion and toxicology. *Green Chemistry*. 7(1), 9. <https://doi.org/10.1039/b411922c>
241. Belz, R. G., & Cedergreen, N. (2010). Parthenin hormesis in plants depends on growth conditions. *Environmental and Experimental Botany*. 69(3), 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.04.010>
242. Baran, A., Tarnawski, M., Koniarz, T., & Szara, M. (2019). Content of nutrients, trace elements, and ecotoxicity of sediment cores from Rożnów reservoir (Southern Poland). *Environmental Geochemistry and Health*. 41, 2929–2948 <https://doi.org/10.1007/s10653-019-00363-x>
243. Оробченко О.Л., Романько М.Є., Палій Анат. П., Палій Андр. П., Павліченко О.В., Коваленко Л.В., Ярошенко М.О., Коренева Ю.М., Курбацька О.В., Маслюк А.В. Основи токсикологічної безпеки кормів у

сільському господарстві. Харків: ФОП Бровін О.В., 2023. 698 с. ISBN 978-617-8238-25-4

244. Курбацька О.В. (2023). Сучасні методи біотестування для визначення безпечності кормів в Україні. «Актуальні аспекти розвитку ветеринарної медицини в умовах євроінтеграції»: матеріали Міжнародної науково-практичної конференції науково-педагогічних працівників та молодих науковців (14-15 вересня 2023 року). Одеса: Одеський державний аграрний університет. С. 379-382 (*Дисертантка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку*)

ДОДАТОК А
(довідковий)
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА
ТА ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ
Монографії

1 Оробченко О.Л., Романько М.Є., Палій Анат. П., Палій Андр. П., Павліченко О.В., Коваленко Л.В., Ярошенко М.О., Коренєва Ю.М., Курбацька О.В., Маслюк А.В. Основи токсикологічної безпеки кормів у сільському господарстві. Харків: ФОП Бровін О.В., 2023. 698 с. ISBN 978-617-8238-25-4 (*На основі власних досліджень дисертантка підготувала підрозділ монографії «лабораторна діагностика отруєнь»*).

Статті в зарубіжних періодичних наукових виданнях країн Організації економічного співробітництва та розвитку та/або Європейського Союзу

2 Orobchenko O., **Kurbatska O.**, Paliy A. and Paliy A. (2023). Toxicological evaluation of feed contaminated with mycotoxins using luminescent microorganisms *Photobacterium phosphoreum*. *Veterinarska stanica*, 54 (2), 147-163. <https://doi.org/10.46419/vs.54.2.7> (*Дисертантка провела експериментальні дослідження, проаналізувала отримані результати та підготувала статтю до друку*).

Наукові статті у фахових виданнях України категорії «Б»

3 **Курбацька, О. В.**, Оробченко, О. Л. (2021). Валідація експрес-методики визначення загальної токсичності кормів з використанням біолоюмінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum*. «Ветеринарна медицина» міжвідомчий тематичний науковий збірник, 107, 56-61. <https://doi.org/10.36016/VM-2021-107-9> (*Дисертантка провела експериментальні дослідження, проаналізувала отримані результати та підготувала статтю до друку*).

4 **Курбацька, О. В.**, Оробченко, О. Л. (2021). Експрес-методика визначення загальної токсичності кормів з використанням біолоюмінесцентних

мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum*. Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин, 22(2), 217-224. <https://doi.org/10.36359/scivp.2021-22-2.24> (Дисертантка провела експериментальні дослідження, проаналізувала отримані результати та підготувала статтю до друку).

5 Курбацька, О. В., Оробченко, О. Л. (2022). Токсикологічна оцінка кормів із різними рівнями мікроелементів з використанням люмінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium Phosphoreum*. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина, 2(57), 26-37. <https://doi.org/10.32845/bsnau.vet.2022.2.4> (Дисертантка провела експериментальні дослідження, проаналізувала отримані результати та підготувала статтю до друку).

6 Курбацька, О. В., Оробченко, О. Л. (2022). Токсикологічна оцінка кормів із різними рівнями важких металів з використанням люмінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum*. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Ґжицького. Серія: Ветеринарні науки, 24(106), 158–167. <https://doi.org/10.32718/nvlvet10624> (Дисертантка провела експериментальні дослідження, проаналізувала отримані результати та підготувала статтю до друку).

Патенти України на корисну модель

7 Деклараційний патент України на корисну модель № 143070 МПК (51) C12N 1/20 / Поживне середовище для культивування фотолюмінісцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum* / Оробченко О.Л.; Курбацька О.В.; Куцан О.Т.; Калашник Н.В. ; заявник і власник патенту Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» ; заявл. 21.01.2020 – и 2020 00341; опубл. 10.07.2020, бюл. № 13/2020. – 4 с. (Дисертантка провела дослідження, отримала нові дані та брала участь в оформленні документів на патент)

8 Деклараційний патент України на корисну модель № 147856 МПК (51) G 01N 33/02, C12Q 1/02 / Спосіб визначення загальної токсичності кормів за допомогою фотобактерій *Photobacterium phosphoreum* / **Курбацька О.В.**; Оробченко О.Л. ; заявник і власник патенту Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» ; заявл. 14.01.2021 – и 2021 00129; опубл. 16.06.2021, бюл. № 24/2021. – 2 с. (*Дисертантка провела дослідження, отримала нові дані та брала участь в оформленні документів на патент*)

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

Науково-практичні рекомендації

9 **Курбацька О.В.**; Оробченко О.Л. Науково-методичні рекомендації «Експрес-методика визначення загальної токсичності кормів з використанням фотолюмінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum*» розглянуто та затверджено на засіданні Методичної комісії Національно-наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»: протокол № 4 від 29 жовтня 2020 р. і схвалено Науково-методичною радою Держпродспоживслужби: протокол № 1 від 12 травня 2021 р. Харків: Стиль-Издат, 2021, 24 с. (*Дисертантка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та оформленні методичних рекомендацій*)

Тези та матеріали конференцій

10 **Курбацька О.**, Оробченко О. (2019). Вивчення впливу зеараленону на люмінесцентні властивості *Photobacterium phosphoreum* : матеріали Четвертого щорічного регіонального наукового симпозіуму в рамках концепції «Єдине здоров'я» за підтримки ПЗБЗ в Україні (20-24 травня 2019). Київ. С. 444. (*Дисертантка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку*)

11 **Курбацька О.В.**, Оробченко О.Л. (2020). Перспектива застосування фотолюмінесцентних мікроорганізмів для визначення загальної токсичності кормів. «Актуальні проблеми підвищення якості та безпека виробництва й переробки продукції тваринництва» : матеріали Міжнародної науково-

практичної конференції. (14 лютого 2020 року). Дніпро. С. 331-333. *(Дисертантка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку)*

12 **Курбацька О.В.**, Оробченко О.Л. (2021). Біоломінесценція у системі лабораторної діагностики отруєнь тварин. / «Сучасні досягнення та перспективи клінічної лабораторної медицини у діагностиці хвороб людини та тварин». Матеріали науково-практичної міжнародної дистанційної конференції (17 березня 2021 року). Т. 2. Х. : НФаУ. С. 63-64. *(Дисертантка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку)*

13 **Курбацька О.В.** (2022). Вплив залишкових кількостей пестицидів різних груп у кормах на люмінесценцію *Ph. phosphoreum*. Collection of theses of scientific and methodical reports of international scientific-practical conference «Science as a basis for the development of modern countries». January 27-28, Bratislava, Slovakia. 89-94.

14 **Курбацька О.В.**, Оробченко О.Л. (2022). Визначення оптимальних параметрів передліофілізаційної підготовки та відновлення культури *Photobacterium Phosphoreum* для еко-токсикологічних досліджень. «ЄДИНЕ ЗДОРОВ'Я - 2022»: матеріали Міжнародної наукової конференції присвяченої 100-річчю кафедр факультету ветеринарної медицини (22-24 вересня 2022 року). Київ. С. 134-135. *(Дисертантка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку)*

15 **Курбацька О.В.**, Оробченко О.Л. (2022). Токсикологічна оцінка кормів із різними рівнями неорганічних елементів з використанням біоломінесценції. «Сучасний стан розвитку ветеринарної медицини, науки і освіти»: матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченій 35-річчю заснування факультету ветеринарної медицини (12-13 жовтня 2022 року). Житомир: Поліський національний університет. С. 360-366. *(Дисертантка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку)*

16 Курбацька О.В. (2023). Сучасні методи біотестування для визначення безпечності кормів в Україні. «Актуальні аспекти розвитку ветеринарної медицини в умовах євроінтеграції»: матеріали Міжнародної науково-практичної конференції науково-педагогічних працівників та молодих науковців (14-15 вересня 2023 року). Одеса: Одеський державний аграрний університет. С. 379-382 (*Дисертантка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку*)

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації були обговорені та схвалені на звітних сесіях вченої ради ННЦ «ІЕКВМ» у 2020–2022 рр.. Основні результати експериментальної частини дисертації доповідалися та обговорювалися на 10-ми конференціях різного рівня, а саме: Четвертому щорічному регіональному науковому симпозиумі в рамках концепції «Єдине здоров'я» за підтримки ПЗБЗ в Україні (Київ, 20-24 травня 2019 року); Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми підвищення якості та безпека виробництва й переробки продукції тваринництва» : матеріали (Дніпро, 14 лютого 2020 року); Міжнародній науково-практичній конференції «Інноваційне, технічне та технологічне забезпечення галузі тваринництва» (Харків, 25-26 травня 2020 року); Науково-практичній міжнародній дистанційній конференції «Сучасні досягнення та перспективи клінічної лабораторної медицини у діагностиці хвороб людини та тварин» (Харків, 17 березня 2021 року); International scientific-practical conference «Science as a basis for the development of modern countries» (Bratislava, January 27-28, 2022); Міжнародній науковій конференції «Єдине здоров'я – 2022» (Київ, 22-24 вересня 2022 року); Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасний стан розвитку ветеринарної медицини, науки і освіти» (Житомир, 12-13 жовтня 2022 року); Міжнародній науково-практичній конференції науково-педагогічних працівників та молодих науковців «Актуальні аспекти розвитку ветеринарної медицини в умовах євроінтеграції»: матеріали (Одеса, 14–15 вересня 2023 року); XVI Всеукраїнській науково-

практичній онлайн конференції молодих вчених «Науковий прогрес у тваринництві і птахівництві», присвяченій 120-річчю від дня народження доктора сільськогосподарських наук, професора, академіка Даниленка Йосипа Абрамовича (Харків, 27 жовтня 2023 року); Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні аспекти біологічної безпеки за емерджентних інфекційних хвороб тварин у контексті стратегії ООН «Єдине здоров'я»», присвяченій 100-річчю заснування Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» (Харків, 16-17 листопада 2023 року).

ДОДАТОК Б**(довідковий)**

**Курбацька О.В.; Оробченко О.Л. Науково-методичні рекомендації
«Експрес-методика визначення загальної токсичності кормів з
використанням фотолюмінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum*»
розглянуто та затверджено на засіданні Методичної комісії Національно-
наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної
медицини»: протокол № 4 від 29 жовтня 2020 р. і схвалено Науково-
методичною радою Держпродспоживслужби: протокол № 1 від 12 травня
2021 р. Харків: Стиль-Издат, 2021, 24 с.**

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР «ІНСТИТУТ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ
МЕДИЦИНИ»

НАУКОВО-МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Експрес-методика визначення загальної токсичності кормів з
використанням фотолюмінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum*

ХАРКІВ - 2021

УДК 619:579.843.4.083.13.043:615.9:637.07:636.085.34

ЗМІСТ

Науково-методичні рекомендації «Експрес-методика визначення загальної токсичності кормів з використанням флуоромінесцентних мікроорганізмів <i>Rh. rhodoptegium</i> » розглянуто та затверджено на засіданні Методичної комісії Національно-наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»: протокол № 4 від 29 жовтня 2020 р., схвалено Науково-методичною Радою Держпродспоживслужби: протокол № 1 від 12 травня 2021 року			
Розробники: Курбашка О.В., аспірант лабораторії токсикологічного моніторингу ННЦ «ДЕКВМ»;			
Оробченко О.Л., доктор ветеринарних наук, старший науковий співробітник; завідувач лабораторії токсикологічного моніторингу ННЦ «ДЕКВМ».			
Внутрішній рецензент: Палій А.П., доктор ветеринарних наук, професор, завідувач лабораторії ветеринарної санітарії та паразитології ННЦ «ДЕКВМ».			
Зовнішній рецензент: Жукова І.О., доктор ветеринарних наук, професор, завідувач кафедри нормальної і патологічної фізіології ХНУВА.			
Курбашка О.В., Оробченко О.Л. Експрес-методика визначення загальної токсичності кормів з використанням флуоромінесцентних мікроорганізмів <i>Rh. rhodoptegium</i> : Методичні рекомендації / Харків, 2021.			
Науково-методичні рекомендації встановлюють вимоги та порядок визначення загальної токсичності кормів експрес-методикою з використанням культури <i>Rhodobacterium rhodoptegium</i> . Рекомендації призначені для спеціалістів лабораторій Держпродспоживслужби України, слухачів факультетів післядипломного навчання, науковців, викладачів та студентів вищих навчальних закладів III-IV рівнів акредитації за спеціальністю 8.130501 – «Ветеринарна медицина»			

Вступ	4
1 Принцип методу	4
2 Позначи та скорочення	5
3 Вимоги до кваліфікації спеціалістів	5
4 Умови виконання вимірювань	5
5 Засоби вимірювальної техніки, допоміжне обладнання, пристрой, реактиви і матеріали	6
6 Порядок відбору проб	7
7 Підготовка культури <i>Rhodobacterium rhodoptegium</i> до проведення біотестування	7
8 Хід дослідження	7
8.1 Екстрагування проби	7
8.2 Очищення проби	8
8.3 Проведення біотестування	8
9 Обчислення і інтерпретація результатів вимірювань	8
9.1 Обчислення індексу токсичності	8
9.2 Обчислення коефіцієнту пригнічення	9
9.3 Оцінка токсичності проби за величиною індексу токсичності	9
10 Вимоги безпеки	10
11 Список літератури	11
Додаток А (довідковий) Валідація експрес-методики визначення загальної токсичності кормів з використанням біоломінесцентних мікроорганізмів <i>Rhodobacterium rhodoptegium</i>	12

Формат 60x84/16, Ум, друк, арк. 1/40, Тір. 100 прим. Зам. № 501-21.
Підписано до друку 21.09.2021. Папір офсетний.

Надруковано з макету замовника у ФІП Європін ОВ.
61022 м. Львів, вул. Пилипівка, 2, корпус 1, к.п. 1. (068) 622-71-30
Служба друку «ІЗДАТ»
видавця та виготовника видавничої продукції серія ДК 3687 від 23.09.09 р.



ДОДАТОК В**(довідковий)**

**Деклараційний патент України на корисну модель № 143070 МПК (51)
С12N 1/20 / Поживне середовище для культивування фотолюмінісцентних
мікроорганізмів *Photobacterium Phosphoreum* / Орбченко О.Л.; Курбацька
О.В.; Куцан О.Т.; Калашник Н.В. ; заявник і власник патенту
Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної
ветеринарної медицини» ; заявл. 21.01.2020 – и 2020 00341; опубл.
10.07.2020, бюл. № 13/2020. – 4 с.**





УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **143070** (13) **U**
 (51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
 ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
 СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
 УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2020 00341	(72) Винахідник(и): Оробченко Олександр Леонідович (UA), Курбацька Ольга Володимирівна (UA), Куцан Олександр Тихонович (UA), Калашник Наталія Василівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 21.01.2020	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.07.2020	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ", вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.07.2020, Бюл.№ 13	

(54) ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ФОТОЛЮМІНІСЦЕНТНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM

(57) Реферат:

Поживне середовище для культивування фотолюмінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum* містить натрій хлористий, гліцерин, пептон, амоній фосфорнокислий двозаміщений, магній сірчаноокислий семиводний, калій фосфорнокислий двозаміщений, крейду та воду дистильовану.

UA 143070 U

UA 143070 U

Корисна модель належить до мікробіології та може бути використана для виготовлення поживного середовища для вирощування і накопичення бактеріальної маси бактерій, що світяться, а саме бактерій *Photobacterium phosphoreum*.

Відомі поживні середовища для вирощування бактерій роду *Photobacterium*, які містять наступні компоненти: NaCl (натрій хлористий), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (натрій фосфорнокислий двозаміщений дванадцятиводний), KH_2PO_4 (калій фосфорнокислий однозаміщений), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (амоній фосфорнокислий), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (магній сірчаноокислий семиводний), гліцерин, бактопептон [Т.И. Воробьева, Е.С. Высоцкий, В.В. Заворуев и др. Регуляция синтеза люциферазы у *Photobacterium mandapamensis*. - Микробиология, 1980. - Т. 49, № 4. - С. 517-520] та NaCl, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, гліцерин, пептон, Na цитрат [А.М. Кузнецов, Э.К. Родичева, Л.П. Рожаева - Полусинтетическая среда для светящихся бактерий рода *Photobacterium*. - Известия СО АН СССР (серия биологическая), 1978. - В. 1. - С. 37-39].

Однак, ці середовища не забезпечують достатню швидкість накопичення бактеріальної маси та високий рівень світіння фотобактерій цього виду.

Найбільш близьким аналогом до запропонованого поживного середовища є середовище для бактерій *Vibrio fischeri* та *Photobacterium phosphoreum*, яке забезпечує достатню високу швидкість росту та світіння, [Патент України № 69001 Живильне середовище для бактерій *Vibrio fischeri* та *Photobacterium phosphoreum*], що містить NaCl (хлористий натрій), KH_2PO_4 (калій фосфорнокислий однозаміщений), Na_2HPO_4 (натрій фосфорнокислий двозаміщений), екстракт дріжджів, гліцерин та панкреатичний гідролізат кільки, при наступному співвідношенні компонентів, мас. %:

натрій хлористий	2,9-3,1
калій фосфорнокислий однозаміщений	0,1-0,2
натрій фосфорнокислий двозаміщений	0,4-0,6
екстракт дріжджів -	4,0-6,0
гліцерин	0,2-0,4
панкреатичний гідролізат кільки	92,4-89,7.

Недоліком такого поживного середовища є складність його виготовлення і висока вартість компонентів, зокрема панкреатичного гідролізату кільки.

Аналіз відомих поживних середовищ для культивування фотобактерій *Photobacterium phosphoreum* показав, що солі натрію фосфорнокислого двозаміщеного, калію фосфорнокислого однозаміщеного, амонію фосфорнокислого двозаміщеного, магнію сірчаноокислого семиводного використовують і в інших відомих середовищах, однак використання їх в цих середовищах разом з іншими компонентами не забезпечувало тих властивостей, які вони виявляють в запропонованій корисній моделі, а саме поліпшення ростових властивостей поживного середовища при виключенні із середовища компонента натрію фосфорнокислого двозаміщеного.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити поживне середовище для культивування фотолюмінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum*, завдяки введенню до його складу нових компонентів забезпечується більше накопичення бактеріальної маси, належні ростові якості бактерій та їх світіння.

Поставлена задача вирішується тим, що поживне середовище для культивування фотолюмінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum*, що містить натрій хлористий, калій фосфорнокислий, гліцерин, згідно з корисною моделлю, додатково містить пептон, амоній фосфорнокислий двозаміщений, магній сірчаноокислий семиводний, як калій фосфорнокислий двозаміщений, крейду та воду дистильовану, при наступному співвідношенні компонентів, мас. %:

натрій хлористий (NaCl)	2,5-2,7
калій фосфорнокислий двозаміщений (K_2HPO_4)	1,4-1,6
амоній фосфорнокислий двозаміщений ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$)	0,04-0,06
магній сірчаноокислий семиводний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,01-0,02
пептон	0,4-0,6
екстракт дріжджів	0,4-0,6
гліцерин	0,2-0,4

UA 143070 U

крейда (CaCO₃) 0,01-0,03
 вода дистильована рН 6,8- решта (до
 7,2 1 дм³).

Порівняльний аналіз запропонованого поживного середовища і найближчого аналога показує відмінність від відомого введенням нових компонентів, а саме: калію фосфорнокислого двозаміщеного, амонію фосфорнокислого двозаміщеного, магнію сірчаноокислого семиводного, пептону, крейди, води дистильованої, які забезпечують достатньо високий рівень світіння бактерій та швидкість їх росту та більш економічно вигідніше.

- 5 Поживне середовище готують наступним чином: в колбу ємкістю 1 дм³ наливають 500 см³ дистильованої води, відміряють пептон, гліцерин та екстракт дріжджів, розчиняють наважки солей у вказаній послідовності. Додають воду дистильовану до 1 дм³. Встановлюють рН 6,8-7,2 додаючи 10 % розчин їдкого натру, фільтрують крізь паперовий фільтр. Стерилізують при 0,5 атм. протягом 30 хвилин. Для виготовлення щільного поживного середовища до рідкого середовища під час приготування додають 2 % агар-агару мікробіологічного.

10 Приклад 1. Поживне середовище готують як вказано вище, при наступному співвідношенні компонентів, мас. %:

натрій хлористий (NaCl)	2,5
калій фосфорнокислий двозаміщений (K ₂ HPO ₄)	1,4
амоній фосфорнокислий двозаміщений (NH ₄) ₂ HPO ₄)	0,04
магній сірчаноокислий семиводний (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0,01
пептон	0,4
екстракт дріжджів	0,4
гліцерин	0,2
крейда (CaCO ₃)	0,01
вода дистильована рН 6,8	решта (до 1 дм ³).

- 15 Приклад 2. Поживне середовище готують як вказано вище, при наступному співвідношенні компонентів, мас. %:

натрій хлористий (NaCl)	2,5
калій фосфорнокислий двозаміщений (K ₂ HPO ₄)	1,5
амоній фосфорнокислий двозаміщений (NH ₄) ₂ HPO ₄)	0,05
магній сірчаноокислий семиводний (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0,01
пептон	0,05
екстракт дріжджів	0,5
гліцерин	0,3
крейда (CaCO ₃)	0,02
Вода дистильована рН 7,0	решта (до 1 дм ³).

- 20 Приклад 3. Поживне середовище готують як вказано вище, при наступному співвідношенні компонентів, мас. %:

натрій хлористий (NaCl)	2,7
калій фосфорнокислий двозаміщений (K ₂ HPO ₄)	1,6
амоній фосфорнокислий двозаміщений (NH ₄) ₂ HPO ₄)	0,06
магній сірчаноокислий семиводний (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0,02
пептон	0,6
екстракт дріжджів	0,6

UA 143070 U

гліцерин	0,4
крейда (CaCO ₃)	0,03
вода дистильована pH 7,2	решта (до 1 дм ³).

Для випробування використовували культуру *Photobacterium phosphoreum* IMB B-7071, що вирощувалась протягом 24 годин у пробірках, закритих ватно-марлевими пробками, на рідкому поживному середовищі у термостаті за температури 27 °С. Об'єм, який використовували для засіву, становив 0,1 см³. В пробірці із стерильним живильним середовищем роздільно висівали піпеткою завись культури *Photobacterium phosphoreum* і розміщували у термостаті при температурі (26,5-27)°С. За посівами вели спостереження протягом 48 годин.

Ефективність середовищ, які досліджували, оцінювали за показниками росту та інтенсивністю світіння через 22 години культивування. Інтенсивність світіння визначали на люмінометрі EMILITE 1003 A. Тест-штами знаходилися в типовій для них формі.

Результати досліджень наведені у таблиці.

З матеріалів таблиці видно, що при культивуванні *Photobacterium phosphoreum* на запропонованому поживному середовищі за умов мінімального, оптимального та максимального співвідношення компонентів (приклад 1, 2, 3) накопичення бактеріальної маси становило від 2,4 до 2,7 млрд/см³, а світіння фіксували на рівні від 27,6 до 34,2 відн.од.

Тоді як, при вирощуванні цієї культури фотобактерій на середовищі для бактерій *Vibrio fischeri* та *Photobacterium phosphoreum* (прототип) кількість бактеріальної маси у млрд./см³ становила 1,1, а інтенсивність світіння - 16,7 відн.од.

Аналіз отриманих даних засвідчив, що середовище, яке пропонується, при оптимальному вмісті компонентів, забезпечує кращі умови для росту та світіння бактерій *Photobacterium phosphoreum* у порівнянні з найближчим аналогом (середовище для бактерій *Vibrio fischeri* та *Photobacterium phosphoreum*).

Розроблений склад компонентів надає поживному середовищу високі ростові властивості та забезпечує більше накопичення бактеріальної маси і високий рівень світіння. Поживне середовище може використовуватись в лабораторіях науково-дослідних установ, лабораторіях ветеринарної медицини при тестуванні кормів на загальну токсичність.

Таблиця

Культура	Середовище № 1		Середовище, що пропонується	
	Накопичення біомаси, млрд/см ³	Світіння, відн.од.	Накопичення біомаси, млрд/см ³	Світіння, відн.од.
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	1,1	16,7	2,4-2,7	27,6-34,2

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Поживне середовище для культивування фотолюмінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum*, що містить натрій хлористий, калій фосфорнокислий, гліцерин, яке відрізняється тим, що додатково містить пептон, амоній фосфорнокислий двозаміщений, магній сірчаноокислий семиводний, як калій фосфорнокислий введено калій фосфорнокислий двозаміщений, крейду та воду дистильовану, при наступному співвідношенні компонентів, мас. %:

натрій хлористий (NaCl)	2,5-2,7
калій фосфорнокислий двозаміщений (K ₂ HPO ₄)	1,4-1,6
амоній фосфорнокислий двозаміщений (NH ₄) ₂ HPO ₄	0,04-0,06
магній сірчаноокислий семиводний (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0,01-0,02
пептон	0,4-0,6
екстракт дріжджів	0,4-0,6
гліцерин	0,2-0,4
крейда (CaCO ₃)	0,01-0,03
вода дистильована pH 6,8-7,2	решта (до 1 дм ³).

UA 143070 U

Комп'ютерна верстка І. Сиворцова

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601

ДОДАТОК Г
(довідковий)

Деклараційний патент України на корисну модель № 147856 МПК (51) G 01N 33/02, C12Q 1/02 / Спосіб визначення загальної токсичності кормів за допомогою фотобактерій *Photobacterium Phosphoreum* / Курбацька О.В.; Оробченко О.Л. ; заявник і власник патенту Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» ; заявл. 14.01.2021 – и 2021 00129; опубл. 16.06.2021, бюл. № 24/2021. – 2 с.





УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **147856** (13) **U**

(51) МПК

G01N 33/02 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2021 00129	(72) Винахідник(и): Курбацька Олена Володимирівна (UA), Оробченко Олександр Леонідович (UA)
(22) Дата подання заявки: 14.01.2021	(73) Володілець (володільці): НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ", вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 17.06.2021	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 16.06.2021, Бюл.№ 24	

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОЇ ТОКСИЧНОСТІ КОРМІВ ЗА ДОПОМОГОЮ ФОТОБАКТЕРІЙ PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM**(57) Реферат:**

Спосіб визначення загальної токсичності кормів з використанням фотобактерій *Photobacterium phosphoreum* включає екстрагування проби, фільтрування відібраного екстракту, внесення фільтрату в тест-культуру та визначення токсичності досліджуваного продукту. При цьому використовують як екстрагент етанол, а як тест-культуру - фотобактерії *Photobacterium phosphoreum*.

UA 147856 U

UA 147856 U

Корисна модель належить до ветеринарної токсикології, а саме до способів визначення токсичності кормів.

Токсикологічне дослідження кормів і продукції тваринного походження, а також кормових добавок, проводять для оцінки якості та подальшого безпечного їх використання. Одним із пріоритетних показників оцінки якості є токсичність, що обумовлена у кормах присутністю різноманітних хімічних сполук (мікотоксинів, пестицидів та сполук невизначеної природи, тощо).

На сьогодні існує спосіб визначення токсичності комбікормів, який увійшов до Міждержавного стандарту (ГОСТ 13496.7-97 "Зерно фуражне, продукти його переробки, комбікорми. Методи визначення токсичності, (п. 7)", Видавництво стандартів, 1999 р.) У відомому способі визначення токсичності комбікормів підготовлюють тест-культуру інфузорій *Colpoda steinii*, відбирають пробу масою 20 г, проводять екстракцію проби дистильованою водою у кількості 100 см³, екстракт фільтрують та вносять 2 см³ фільтрату в підготовлену тест-культуру інфузорій, визначають токсичність досліджуваної проби під час термостатування при температурі +26...+28 °С протягом 3-х годин, спостерігаючи за життєдіяльністю інфузорій.

Недоліком є те, що відомим способом можна виявити тільки ті токсиканти, що розчиняються у воді.

Найбільш близьким за технічною суттю до способу, що заявляється, є "Спосіб визначення токсичності кормів для непродуктивних тварин" (Україна патент № 32482). Даний спосіб включає підготовку тест-культури інфузорій *Colpoda steinii*, відбір проб досліджуваного продукту, екстрагування проби, фільтрування відібраного екстракту, внесення фільтрату в тест-культуру інфузорій, термостатування одержаної суміші при температурі +26...+28 °С і визначення токсичності досліджуваного продукту спостереженням за життєдіяльністю інфузорій під час термостатування, у якому екстрагування проби проводять хімічно чистим ацетоном, який беруть у кількості 15-20 см³, а перед внесенням в тест-культуру інфузорій фільтрат розбавляють розчином Лозина-Лозинського, який беруть у кількості 10 на 0,5 см³ фільтрату.

Основними недоліками даного способу є використання прекурсорів, таких як ацетон, та фіксування результатів досліджень за допомогою мікроскопа, що подовжує час дослідження.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб, позбавлений цих недоліків.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі визначення загальної токсичності кормів, який включає екстрагування проби, фільтрування відібраного екстракту, внесення фільтрату в тест-культуру та визначення токсичності досліджуваного продукту, згідно з корисною моделлю, використовують як екстрагент етанол, а як тест-культуру - фотобактерії *Photobacterium phosphoreum*.

Спосіб виконується таким чином.

Наважку корму вагою 10,0 г (за необхідністю подрібнюють) у флаконі заливають етанолом 96° об'ємом 20,0-50,0 см³ та екстрагують при енергійному струшуванні на лабораторному струшувачі 15-20 хв, або залишають екстрагуватися з періодичним перемішуванням на 24 год.

Надосадову рідину зливають через лійку з паперовим фільтром, потім центрифугують при 1,5-2,0 тис. об/хв. 10 хв (або дають відстоятися 15-20 хв). Після чого знову відбирають надосадову рідину у чистий скляний флакон і досліджують.

Для визначення токсичності проводять паралельне вимірювання контрольних і досліджуваних зразків. Під час тестування до культуральної рідини фотобактерій *Photobacterium phosphoreum* в об'ємі 1,0 см³ у кювети люменометра вносять 0,02 см³ екстракту (надосадової рідини), відмічають експозицію та реєструють зміни інтенсивності люмінесценції на приладі через (20-25) хв. За тих же умов як контроль додають 96° етанол. Вимірювання проводять послідовно контроль, дослід. Вимірювання змін інтенсивності світіння проводять за допомогою приладу EMILITE-1003 А згідно з його інструкцією з експлуатації.

Приклад. Визначення загальної токсичності корму - зерна пшениці.

Наважку проби пшениці вагою 10,0 г подрібнювали, у флаконі заливали етанолом 96° об'ємом 20,0 см³ та екстрагували з періодичним перемішуванням протягом 24 год. Надосадову рідину зливали через лійку з паперовим фільтром, потім центрифугували при (1,5-2,0) тис. об/хв 10 хв. Після цього знову відбирали надосадову рідину у чистий скляний флакон і досліджували. Для визначення токсичності проводили паралельне вимірювання контрольних і досліджуваних зразків. Під час тестування до культуральної рідини фотобактерій *Photobacterium phosphoreum* в об'ємі 1,0 см³ у кювети люменометра вносили 0,02 см³ екстракту (надосадової рідини), відмічали експозицію та реєстрували зміни інтенсивності люмінесценції на приладі через 20-25 хв. За тих же умов як контроль додавали 96° етанол. Вимірювання проводили послідовно: контроль, дослід. Зміни інтенсивності світіння реєстрували за допомогою приладу EMILITE-1003 А згідно з його інструкцією з експлуатації.

UA 147856 U

Кількісна оцінка показників тест-реакції передається у вигляді безрозмірної величини - індексу токсичності "Т", що дорівнює співвідношенню:

$$T = \frac{I_0}{I} \times 100$$

де

- 5 I_0 та I - відповідно інтенсивність світіння контролю й досліджуваного зразка при фіксованому часі експозиції зразка, що досліджується з тест-об'єктом.

Спосіб допускає три граничних рівні індексу токсичності: корми, індекс токсичності яких менше 20, - нетоксичні, а корми з індексом 20 і вище - токсичні, що унеможлиблює їх подальше застосування в годівлі.

- 10 Спосіб визначення загальної токсичності кормів з використанням фотобактерій *Photobacterium phosphoreum* може використовуватися у лабораторіях ветеринарної медицини та господарствах різних форм власності. Він дасть змогу точно і вчасно встановлювати наявність токсичних компонентів у кормі і попереджуватиме їх згодовування тваринам.

- 15 **ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ**

- 20 Спосіб визначення загальної токсичності кормів з використанням фотобактерій *Photobacterium phosphoreum*, що включає екстрагування проби, фільтрування відібраного екстракту, внесення фільтрату в тест-культуру та визначення токсичності досліджуваного продукту, який **відрізняється** тим, що використовують як екстрагент етанол, а як тест-культуру - фотобактерії *Photobacterium phosphoreum*.

ДОДАТОК Д
(довідковий)

**Валідація експрес-методики визначення загальної токсичності кормів з
використанням біолюмінесцентних мікроорганізмів**
Photobacterium phosphoreum

КОНТРОЛЬ ВІДНОСНОЇ СПЕЦИФІЧНОСТІ

Дата заповнення

Оператор: Курбацька О.В.

Способи визначення

Метод виконання вимірювань

Стандартний метод
світлова мікроскопія

Альтернативний метод
люмінометрія

Зразок 1

нетоксичний корм

нетоксичний корм

Зразок 2

токсичний корм

токсичний корм

Компонент

зеараленон

зеараленон

Прилад

Бінокулярний світловий мікроскоп
(ЛОМО марки МБІ-3)

люмінометр (EMILITE – 1003 A)

Детектування

збільшення $\times 100$

спеціалізований твердотільний
фотодіод

Показник		Результати									
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀
Стандартний метод	Зразок 1 (не токсичний корм)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Зразок 2 (токсичний корм)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Альтернативний метод	Зразок 1 (не токсичний корм)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Зразок 2 (токсичний корм)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примітки: «-» – проба нетоксична; «+» – проба токсична.

КОНТРОЛЬ ВІДНОСНОЇ ТОЧНОСТІ

Дата заповнення

Оператор: Курбацька О.В.

Способи визначення

Метод виконання вимірювань

Стандартний метод
світлова мікроскопія

Альтернативний метод
люмінометрія

Зразок 1

нетоксичний корм

нетоксичний корм

Зразок 2

токсичний корм

токсичний корм

Компонент

зеараленон

зеараленон

Прилад

Бінокулярний світловий мікроскоп
(ЛОМО марки МБІ-3)

люмінометр (EMILITE – 1003 A)

Детектування

збільшення $\times 100$

спеціалізований твердотільний
фотодіод

Показник		Результати									
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀
Стандарт- ний метод	Зразок 1 (живих інфузорій в полі зору)	6	7	6	7	6	6	8	6	7	6
	Зразок 2 (живих інфузорій в полі зору)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Альтернати- вний метод	Зразок 1 (інтенсивність світіння, фот/с)	2,42	2,41	2,40	2,37	2,35	2,39	2,41	2,43	2,36	2,41
	Зразок 2 (інтенсивність світіння, фот/с)	0,16	0,18	0,12	0,13	0,17	0,11	0,15	0,13	0,15	0,17

Показник		Результати										X _{сер}	SD
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀		
Стандарт- ний метод	Зразок 1 Індекс токсичності	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0±0,00	0
	Зразок 2 Індекс токсичності	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100,0±0,00	0
Альтернати- вний метод	Зразок 1 Індекс токсичності	0,82	0,83	0,83	0,42	0,43	0,84	-0,41	0,41	0,85	0,41	0,54±0,12	0,37
	Зразок 2 Індекс токсичності	93,4	92,5	95,0	94,5	92,8	95,4	93,8	94,7	93,6	92,9	93,9±0,31	0,99

Показники	Зразок 1	Зразок 2
$\alpha = X_{сер1} - X_{сер2}$	0,54	- 6,10
$SD = \sqrt{SD_1^2 + SD_2^2}$	0,5069	1,9701
Довірчий інтервал для різниці між методами при $\alpha=5\%$, $n=10$		
Верхня контрольна межа – ($\alpha + 2,23 SD$)	1,6704	- 1,7067
Нижня контрольна межа – ($\alpha - 2,23 SD$)	- 0,5904	- 10,4933
Правильність при порівнянні нового методу з референтним вважається задовільною, якщо довірчий інтервал містить 0.	Результат задовільний	Результат задовільний

СТАБІЛЬНІСТЬ ЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ

Дата заповнення

Метод виконання вимірювань : люмінометрія

Прилад: люмінометр (EMILITE – 1003 A)

Оператор: Курбацька О.В..

Зразок: культура *Ph. phosphoreum*

Детектування: спеціалізований
твердотільний фотодіод

Загальна кількість	Умови зберігання: у пробірках на щільному поживному середовищі	
	температура зберігання +4°C (серія А) з щомісячним пересівом	температура зберігання +26 °С (серія В) з щотижневим пересівом
20	10	10

Показник	Термін зберігання							
	1 місяць		2 місяці		3 місяці		4 місяці	
	А	В	А	В	А	В	А	В
Інтенсивність світіння, фот/с	2,42±0,01	2,42±0,01	2,40±0,01	2,40±0,01	2,41±0,01	2,42±0,01	2,40±0,01	2,37±0,01*
Інтенсивність світіння, фот/с	5 місяців		6 місяців		7 місяців		8 місяців	
	А	В	А	В	А	В	А	В
	2,40±0,01	2,35±0,01*	2,40±0,01	2,36±0,01*	2,39±0,01	2,23±0,02**	1,90±0,03**	1,44±0,02**

Примітка: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,001$ – відносно початку дослідження

Загальна кількість	Умови культивування: у пробірках на рідкому поживному середовищі		
	температура культивування +18°C (серія А)	температура культивування +26°C (серія В)	температура культивування +30°C (серія С)
30	10	10	10

Показник	Термін культивування											
	12 годин			24 години			36 годин			48 годин		
	А	В	С	А	В	С	А	В	С	А	В	С
Інтенсивність світіння, фот/с	1,49±0,01	1,94±0,03**	0,18±0,02**	1,95±0,03	2,42±0,02**	0,27±0,02**	1,27±0,02	1,66±0,02**	0,12±0,01**	0,26±0,02	0,31±0,02	0,02±0,01*

Примітка: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,001$ – відносно початку дослідження

Висновки:

1. Оптимальні умови та термін зберігання: у пробірках на щільному поживному середовищі за температури +4°C зі щомісячним пересівом протягом 7-ми місяців.
2. Оптимальні умови та термін культивування: у пробірках на рідкому поживному середовищі за температури +26°C через 24 години після висіву.

КОНТРОЛЬ ВНУТРІШНЬОЛАБОРАТОРНОЇ ВІДТВОРЮВАНОСТІ

Дата заповнення

Метод виконання вимірювань :люмінометрія

Прилад: люмінометр (EMILITE – 1003 A)

Компонент: зеараленон

Оператори: Курбацька О.В.
Оробченко О.Л.

Зразок: корм

Детектування: спеціалізований
твердотільний фотодіод

№ групи умов	Умови, що змінювались	Опис умов	Позначення умов	Кількість досліджених зразків
1	Оператор	Курбацька О.В.	A	4
		Оробченко О.Л.	a	4
2	Умови екстрагування проби	струшування	B	4
		екстракція протягом 24 год	b	4
3	Температура термостата	+25	C	4
		+27	c	4

№ групи умов	Позначення умов	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X _{сеп}	SD
1	A	1,72	1,68	1,7	1,61	1,6775	0,047871
	a	1,6	1,62	1,68	1,69	1,6475	0,044253
2	B	1,66	1,71	1,64	1,67	1,67	0,029439
	b	1,69	1,7	1,62	1,61	1,655	0,046547
3	C	1,72	1,73	1,65	1,69	1,6975	0,03594
	c	1,68	1,65	1,62	1,73	1,67	0,046904

№	Показник	Значення
1	Кількість серій (груп умов), n	3
2	Різниця між впливом умов першої групи $D_a = X_A - X_a$	0,03
3	Різниця між впливом умов другої групи $D_b = X_B - X_b$	0,015
4	Різниця між впливом умов третьої групи $D_c = X_C - X_c$	0,0275
5	Стандартне відхилення різниць між серіями, $SD_{D_i} = \sqrt{2 \cdot \frac{\sum D_i^2}{n}}$, де $\sum D_i^2$ – сума квадратів різниць для кожної серії; n – кількість серій.	0,035

ЛІНІЙНІСТЬ

Дата заповнення

Метод виконання вимірювань: люмінометрія

Прилад: люмінометр (EMILITE – 1003 A)

Компонент: зеараленон

Оператор: Курбацька О.В.

Зразок: корм

Детектування: спеціалізований
твердотільний фотодіод

Показник	Рівні						X сер	SD	RSD, %
	1	2	3	4	5	6			
Концентрація (C), мкг/мл	0,05	0,075	0,125	0,175	0,25	0,5	-	-	-
Сигнал (інтенсивність світіння), фот/с	2,43	2,41	2,18	1,96	1,8	1,52	2,05	0,358441	17,48

№ п/п	Показник	Значення
1.	Кількість рівнів (n)	6
2.	Стандартне відхилення, SD, фот/с	0,358
3.	Відносне стандартне відхилення, RSD, %	17,48
4.	Критерій оцінки RSD (не більше 20 %)	Менше 20
5.	Рішення	лінійне

ЗБІЖНІСТЬ ПРИ ВИКОРИСТАННІ ОДНИХ І ТИХ САМИХ УМОВ АНАЛІЗУ

Дата заповнення

Оператор: Курбацька О.В.

Метод виконання вимірювань

люмінометрія

Зразок 1

нетоксичний корм

Зразок 2

токсичний корм

Компонент

зеараленон

Прилад

люмінометр (EMILITE – 1003 A)

Детектування

спеціалізований твердотільний фотодіод

Показник		Результати												
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X _{ср}	SD	RSD
Зразок 1	Інтенсивність світіння, фот/с	2,48	2,46	2,39	2,47	2,35	2,46	2,4	2,37	2,4	2,35	2,413	0,050	2,09
	Кількість зеараленону, мкг/мл	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Зразок 2	Інтенсивність світіння, фот/с	2,18	2,21	2,19	2,25	2,17	2,19	2,14	2,21	2,13	2,22	2,189	0,036	1,66
	Кількість зеараленону, мкг/мл	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-	-	-

№ п/п	Показник	Зразок 1	Зразок 2
1	Кількість вимірювань (n)	10	10
2	Середнє значення концентрації аналіту в розчині (X _{ср}), мкг/мл	0	1,0
3	Стандартне відхилення (SD), мкг/мл	0,050	0,036
4	Відносне стандартне відхилення (RSD), %	2,09	1,66
5	Критерій оцінки RSD (не більше 5 %)	Менше 5 %	Менше 5 %
6	Рішення	Результат задовільний	Результат задовільний

МЕЖА ДЕТЕКТУВАННЯ ТА МЕЖА ВИЗНАЧЕННЯ МЕТОДУ

Дата заповнення

Оператор: Курбацька О.В.

Метод виконання вимірювань

люмінометрія

Зразок

корм

Компонент

зеараленон

Прилад

люмінометр (EMILITE – 1003 A)

Детектування

спеціалізований твердотільний фотодіод

Показник	Рівні					
	1	2	3	4	5	6
Концентрація (С), мкг/мл	0	0,05	0,075	0,125	0,175	0,25
Сигнал (інтенсивність світіння), фот/с	2,41±0,02	2,40±0,02	2,39±0,01	2,20±0,01*	1,95±0,01*	1,82±0,01*
Наважка, г	10	10	10	10	10	10
Об'єм екстрагенту, мл	20	20	20	20	20	20
Мг/кг корму	0	0,10	0,15	0,25	0,35	0,50
Межа детектування	0,125 мкг/мл					
Межа визначення	0,25 мг/кг корму					

Примітка: * – $p < 0,001$ – відносно 3 рівня.

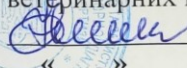
ДОДАТОК Е

(довідковий)

Акт виробничого випробування

ЗАТВЕРДЖУЮ:

Директор Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, кандидат ветеринарних наук

 Чечет О.М.

« » 2022 р.



А К Т

про впровадження результатів науково-дослідної роботи (НДР)

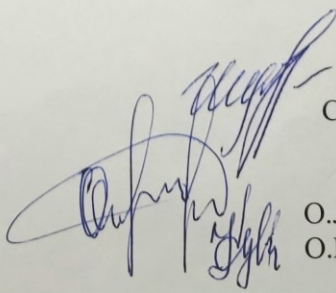
Ми, що нижче підписалися, завідувач науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу ДНДІЛВСЕ канд. вет. наук, старший дослідник Шуляк С.В., з одного боку і представники Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»: зав. лабораторії токсикологічного моніторингу відділу токсикології безпеки та якості сільськогосподарської продукції доктор. вет. наук Оробченко О.Л.; аспірант Курбацька О.В., з іншого боку, склали цей акт про те, що результати науково-дослідної роботи «Розробити нові методики визначення основних абіотичних токсикантів (пестициди, неорганічні елементи тощо) для отримання якісної і безпечної продукції тваринництва» (номер державної реєстрації 0119U100990) впроваджені на вказаному підприємстві.

За науково-методичними рекомендаціями «Експрес-методика визначення загальної токсичності кормів з використанням фотолюмінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum*» (схвалено Науково-методичною радою Держпродспоживслужби: протокол № 1 від 12 травня 2021 р.) протягом 2021-2022 років були проведені скринінгові дослідження кормів на токсичність. Використання експрес-методики визначення загальної токсичності дозволило швидко (1-1,5) год і з високою вірогідністю надавати токсикологічну оцінку кормам, а розроблене поживне середовище для культивування фотолюмінісцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum* забезпечувало високий рівень світіння бактерій, пришвидшувало їх ріст і накопичення бактеріальної маси.

Впровадження запропонованих науково-методичними рекомендацій дозволило пришвидшити та підвищити ефективність токсикологічної оцінки кормів на 10 %.

Відповідальні виконавці:

Завідувач науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу ДНДІЛВСЕ канд. вет. наук, старший дослідник
Зав. лабораторії токсикологічного моніторингу ННЦ «ІЕКВМ», д. вет. наук, с.н.с.
Аспірант

 С.В. Шуляк

О.Л. Оробченко

О.В. Курбацька

ДОДАТОК Ж

(довідковий)

Картки зворотнього зв'язку про використання матеріалів дисертації при підготовці фахівців напряму «Ветеринарна медицина»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з науково-педагогічної,
наукової роботи Полтавського
державного аграрного університету
Олег ГОРБ


«09» жовтня 2023 р.

А К Т
про впровадження/використання результатів
дисертаційної роботи у навчальний процес


Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи **Курбацької Олени Володимирівни** на тему «Токсикологічна оцінка кормів з використанням біолоюмінесцентних мікроорганізмів» (галузь 21 Ветеринарія), які висвітлюються у Методичних рекомендаціях «**Експрес-методика визначення загальної токсичності кормів з використанням фотолюмінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum***», впроваджено у навчальну програму при викладанні навчальних дисциплін «Ветеринарна токсикологія» та «Внутрішні хвороби тварин» для здобувачів вищої освіти другого (магістерського) рівня вищої освіти галузі знань 21 Ветеринарія, факультету ветеринарної медицини (кафедра терапії ім. професора П.І. Локеса) Полтавського державного аграрного університету.

Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри терапії імені професора П.І. Локеса (протокол №3 від «09» жовтня 2023 р.).

Завідувач кафедри терапії
ім. професора П.І. Локеса,
кандидат ветеринарних наук, доцент

 Надія ДМИТРЕНКО

Декан факультету ветеринарної медицини,
доктор ветеринарних наук, професор

 Сергій КУЛИНИЧ

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з науково-педагогічної,
наукової роботи Полтавського
державного аграрного університету

Олег ГОРБ

«09» жовтня

2023 р.

А К Т

про впровадження/використання результатів
дисертаційної роботи у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи **Курбацької Олени Володимирівни** на тему «Токсикологічна оцінка кормів з використанням біолоюмінесцентних мікроорганізмів» (галузь 21 Ветеринарія), які висвітлюються у Методичних рекомендаціях «Експрес-методика визначення загальної токсичності кормів з використанням фотолоюмінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum*», впроваджено у навчальну програму при викладанні навчальних дисциплін «Ветеринарна токсикологія» та «Внутрішні хвороби тварин» для здобувачів вищої освіти другого (магістерського) рівня вищої освіти галузі знань 21 Ветеринарія, факультету ветеринарної медицини (кафедра терапії ім. професора П.І. Локеса) Полтавського державного аграрного університету.

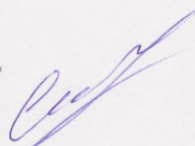
Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри терапії імені професора П.І. Локеса (протокол №3 від «09» жовтня 2023 р.).

Завідувач кафедри терапії
ім. професора П.І. Локеса,
кандидат ветеринарних наук, доцент



Надія ДМИТРЕНКО

Декан факультету ветеринарної медицини,
доктор ветеринарних наук, професор



Сергій КУЛИНИЧ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор Львівського
національного університету
ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С. З. Гжицького
І. Б. Турко
2023 р.



**Акт про впровадження/використання результатів дисертації на здобуття
наукового ступеня доктора філософії в освітній процес**

Даним документом підтверджується, що результати дисертаційної роботи Курбацької Олени Володимирівни на тему «Токсикологічна оцінка кормів з використанням біолоюмінесцентних мікроорганізмів» на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 – Ветеринарна медицина впроваджено у навчальну програму «Гігієна тварин», що викладається на кафедрі гігієни, санітарії та загальної ветеринарної профілактики імені М. В. Демчука Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького для здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти спеціальності 211 «Ветеринарна медицина».

Доктор ветеринарних наук, професор,
завідувач кафедри гігієни, санітарії та
загальної ветеринарної профілактики імені М. В. Демчука
Львівського національного університету
ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С. З. Гжицького

Богдан ГУТИЙ