

4. ЯКІСТЬ І БЕЗПЕЧНІСТЬ ПРОДУКЦІЇ ТВАРИННИЦТВА. ВЕТЕРИНАРНО-САНІТАРНА ЕКСПЕРТИЗА. ВЕТЕРИНАРНА ФАРМАКОЛОГІЯ ТА ТОКСИКОЛОГІЯ

УДК 619:615.9:636.085.34:579.843.4.083.13

DOI 10.36016/VM-2021-107-9

ВАЛІДАЦІЯ ЕКСПРЕС-МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОЇ ТОКСИЧНОСТІ КОРМІВ З ВИКОРИСТАННЯМ БІОЛЮМІНЕСЦЕНТНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ *PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM*

Курбацька О. В., Оробченко О. Л.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: olimp988429@ukr.net

У статті наведені результати вивчення валідаційних характеристик експрес-методики визначення загальної токсичності кормів з використанням біолоюмінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum*. У роботі використовували ліофілізовану культуру *Ph. phosphoreum* (штам IMB B-7071; Sq3) та 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). Вимірювання інтенсивності світіння люмінесцентних бактерій проводили на люмінометрі EMILITE-1003A. Для кількісної оцінки впливу на люмінесценцію бактерій використовували індекс токсичності, щоб зробити висновок про ступінь токсичності зразка. Критерієм оцінки токсичності досліджуваних зразків кормів під час тестування *Colpoda steinii* була рухливість інфузорій. Валідаційні параметри експрес-методики визначення загальної токсичності з використанням фотолюмінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum* встановлювали згідно з ISO 16140:2003 «Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods (IDT)». При цьому проводили порівняльне дослідження альтернативного (визначення загальної токсичності кормів з використанням *Ph. phosphoreum*) і стандартного методу (визначення токсичності з використанням інфузорій *Colpoda steinii* згідно з ДСТУ 3570-97 «Зерно фуражне, продукти його переробки, комбікорми. Методи визначення токсичності»). Тест-об'єктом була зерносуміш (ячмінь–пшениця 50:50), токсикантом — мікотоксин зеараленон. 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. Установлено, що методика є специфічною, точною, лінійною, відтворюваною. Оптимальні умови та термін зберігання для *Ph. phosphoreum*: у пробірках на щільному поживному середовищі за температури 4 °С зі щомісячним пересівом протягом 7 місяців; а оптимальні умови та термін культивування перед дослідженням: у пробірках на рідкому поживному середовищі за температури 26 °С через 24 год після висіву. Межа детектування методики (за зеараленоном) становить 0,125 мкг/см³, а межа визначення — 0,25 мг/кг корму

Ключові слова: експрес-метод, зеараленон, *Colpoda steinii*

Оцінка токсичності забруднюючих речовин є невід'ємною частиною контролю якості та безпечності кормів для тварин. На сьогодні під час визначення токсичності тієї чи іншої речовини все частіше звертаються до альтернативних методів, що передбачає використання в токсикологічному експерименті культур клітин, найпростіших і фотобактерій. Ефект біолоюмінесценції бактерій дозволяє використовувати їх як заміну лабораторним тваринам або як додатковий тест для визначення впливу токсикантів [1–3].

Використання фотобактерій у токсикологічному експерименті значно знижує вартість виконання робіт; дозволяє скоротити використання тварин в експерименті та має ряд переваг

перед іншими альтернативними методами: простота та швидкість постановки, висока чутливість та відтворюваність [4–6].

Висока чутливість бактерій, що світяться, та швидкість їхньої реакції на дію різноманітних за своєю природою токсикантів або сукупності токсикантів дозволяють використовувати фотобактерії як тест-об'єкти для дослідження кормів для тварин на токсичність.

Метою наших досліджень було встановити валідаційні параметри розробленої експрес-методики визначення загальної токсичності кормів з використанням біolumінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum*.

Матеріали та методи. У роботі використовували ліофілізовану культуру *Photobacterium phosphoreum* (штам IMB B-7071; Sq3) та культуру *Colpoda steinii* суху для еколого-токсикологічних досліджень об'єктів зовнішнього середовища, продуктів тваринництва та птахівництва (РП № АВ-02438-01-11, виробництва ТОВ «Відродження», м. Одеса).

Під час розробки методики використовували стандартні мікробіологічні методи (висів культур фотобактерій на поживні середовища, підрахунок кількості мікробних клітин тощо), фізико-хімічні, статистичні. Культуру *Colpoda steinii* використовували згідно листівки-вкладки.

Культивування фотобактерій під час досліду здійснювали у термостаті за температури 26–28 °С у пробірках на рідкому та щільному поживному середовищах, розроблених у лабораторії токсикологічного моніторингу ННЦ «ІЕКВМ»; *Colpoda steinii* — за температури 28 °С.

Вимірювання інтенсивності світіння люмінесцентних бактерій проводили на люмінометрі EMILITE-1003A. Для кількісної оцінки впливу на люмінесценцію бактерій використовували індекс токсичності (Т), щоб зробити висновок про ступінь токсичності зразка. Критерієм оцінки токсичності досліджуваних зразків кормів за тестування *Colpoda steinii* була рухливість інфузорій.

Валідаційні параметри експрес-методики визначення загальної токсичності з використанням фотолюмінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum* встановлювали згідно з ISO 16140:2003 «Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods (IDT)». 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 «Зерно фуражне, продукти його переробки, комбікорми. Методи визначення токсичності»). Тест-об'єктом була зерносуміш (ячмінь–пшениця 50:50), токсикантом — мікотоксин зеараленон.

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.

Кількісна оцінка показників тест-реакції передається у вигляді безрозмірної величини — індексу токсичності (Т), що дорівнює співвідношенню за формулою:

$$T = \frac{I_0 - I}{I_0} \times 100$$

де: I_0 та I відповідно інтенсивність світіння контролю й досліду за фіксованого часу експозиції зразка, що досліджується, з тест-об'єктом.

Методика допускає три граничних рівня індексу токсичності (табл. 1).

Таблиця 1 — Класифікація токсичності речовини за величиною Т

Групи	Значення Т	Висновок про ступінь токсичності
1	< 20	граничний ступінь токсичності
2	20–50	зразок токсичний
3	≥ 50	зразок сильно токсичний

Результати досліджень. З метою вирішення поставленої задачі вивчено валідаційний параметр **відносна специфічність**, який характеризує відповідну методику за однозначним визначенням токсичності кормів, як альтернативним, так і стандартним методом, шляхом

дослідження у 10 повтореннях зразків токсичного й нетоксичного кормів відповідно з використанням фотобактерій та інфузорій. Установлено, що тестування нетоксичних і токсичних зразків корму в 10 повтореннях як за стандартною, так і розробленою (альтернативною) методиками давали негативний результат під час визначення токсичності корму без внесення токсиканта і позитивний — за тестування токсичного (з внесенням токсиканта) корму, тобто розроблена методика є специфічною.

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 -0,5904; для токсичного — від -1,7067 до -10,4933, що свідчить про точність розробленої методики.

Визначення **стабільності люмінесценції** під час зберігання/культивування визначали шляхом вимірювання інтенсивності світіння в залежності від умов і термінів зберігання, часу початку культивування 12–48 год та температури 18–30 °С. Установлено, що під час зберігання *Ph. phosphoreum* за температури 4 °С зі щомісячним пересівом інтенсивність світіння була стабільною протягом 7 місяців (про що свідчить вірогідне зниження інтенсивності люмінесценції на 8-й місяць досліджень у 1,3 раза відносно початку експерименту). Тоді як за температури зберігання 26 °С зі 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. 1).

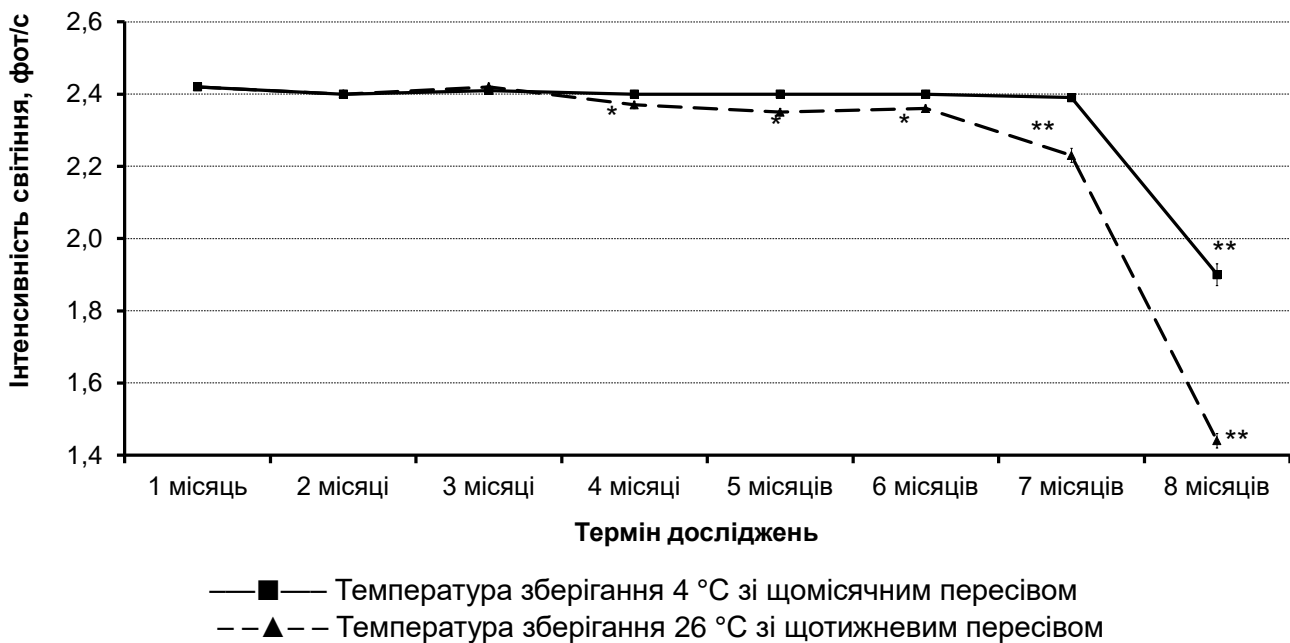
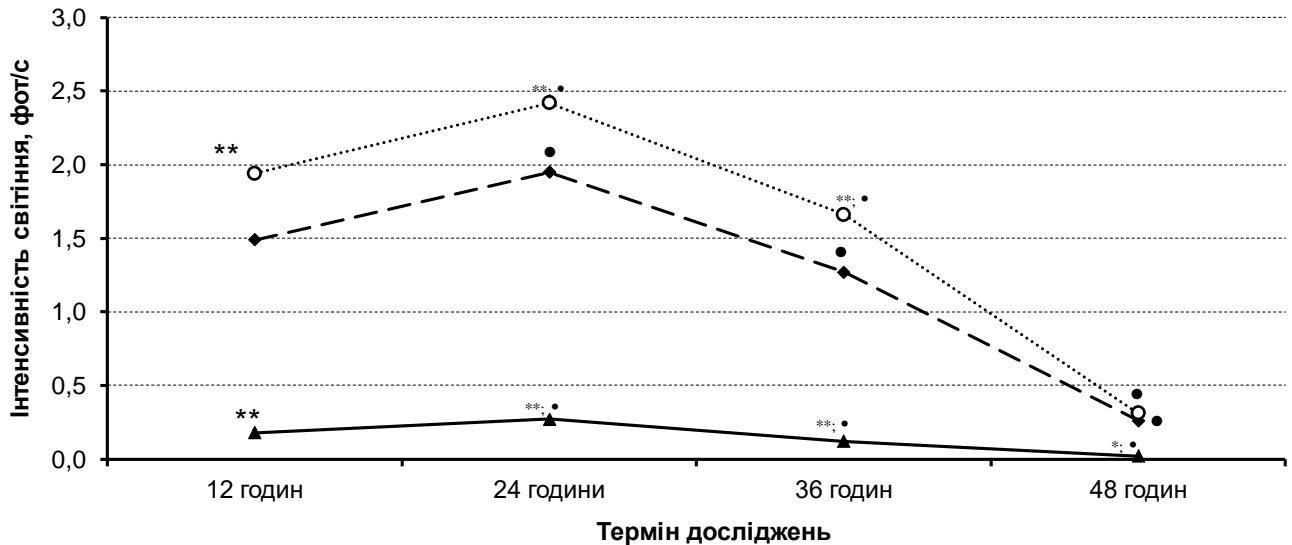


Рис. 1. Залежність інтенсивності світіння *Photobacterium phosphoreum* від умов зберігання ($M \pm m$, $n = 10$): * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$ відносно початку експерименту.

Під час культивування *Ph. phosphoreum* за температури 18 °С максимальну інтенсивність світіння встановлено на 24-ту годину, що у 1,3 раза вірогідно перевищувало показник 12-годинного культивування, на 36-ту та 48-му годину культивування інтенсивність світіння знижувалася в 1,2 і 5,7 раза відповідно ($p < 0,001$) (рис. 2).

За температури культивування 26 °С спостерігали аналогічну динаміку інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*: вірогідне перевищення показника 12-годинного культивування становило 1,2 раза через 24 год культивування, а потім знижувалося в 1,2 і 6,3 раза відповідно на 36-ту і 48-му години. Проте інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* у цій серії була вищою ($p < 0,001$) відносно серії культивування за температури 18 °С, про що свідчить підвищення показника в 1,3, 1,2 і 1,3 раза відповідно на 12-ту, 24-ту і 36-ту години культивування, а на 48-му годину перевищення було невірогідним (рис. 2).



—▲— t культивування 18 °C ···○··· t культивування 26 °C ---◆--- t культивування 30 °C

Рис. 2. Залежність інтенсивності світіння *Photobacterium phosphoreum* від умов культивування ($M \pm m$, $n = 10$): * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,001$ відносно температури культивування 18 °C; • — $p < 0,001$ відносно 12 год.

За температури культивування 30 °C інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* була дуже низькою, про що свідчило вірогідне зниження показників відносно серії культивування за температури 18 °C відносно початку дослідження на всіх термінах досліджень у 8,3, 7,2, 10,6 і 13,0 раза. Хоча динаміка світіння не відрізнялася від досліджуваних серій за 18 і 26 °C: вірогідне перевищення на 24-ту годину (1,5 раза), а потім зниження в 1,5 раза на 36-ту і в 9 разів на 48-му години (рис. 2).

Отже, оптимальні умови та термін зберігання для *Ph. phosphoreum*: у пробірках на щільному поживному середовищі за температури 4 °C зі щомісячним пересівом протягом 7 місяців, а оптимальні умови та термін культивування перед дослідженням: у пробірках на рідкому поживному середовищі за температури 26 °C через 24 год після висіву.

Контроль внутрішньолaborаторної відтворюваності здійснювали шляхом повторних досліджень впливу слаботоксичних кормів на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* за різних умов: різні оператори, режими екстракції проб і температура культивування. Під час досліджень не встановлено вірогідних відхилень між показниками світіння усіх трьох серій досліджень, а стандартне відхилення різниць між серіями становить 0,035.

Для вивчення параметру **лінійність** досліджували вплив на люмінесценцію проб кормів з різним рівнем токсиканта за однакових умов. Оскільки, під час 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 досліджуваній пробі. Установлено, що концентрації мікотоксину 0,05 і 0,075 мкг/см³ не призводили до пригнічення люмінесценції, що свідчить про відсутність токсичної дії, тоді як концентрації зеараленону 0,125, 0,175, 0,25 і 0,5 мкг/см³ спричиняли вірогідне зниження інтенсивності світіння на 10,3, 19,3, 25,9 і 37,4 % відповідно відносно концентрації 0,05 мкг/см³ (рис. 3). 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 %).

Параметр **збіжність** з одного боку характеризує точність методики за її виконання в однакових умовах, а з іншого — відображає здатність аналітика в тих самих умовах надавати повторювані результати з незначним статистичним відхиленням. Для її визначення досліджували у 10 повтореннях вплив на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* проб кормів з однаковим умістом токсиканта та без нього. У результаті чого встановлено показник RSD: для нетоксичного корму — 2,09 %, а для токсичного — 1,66 %, що входить у межі норми (не більше 5 %).

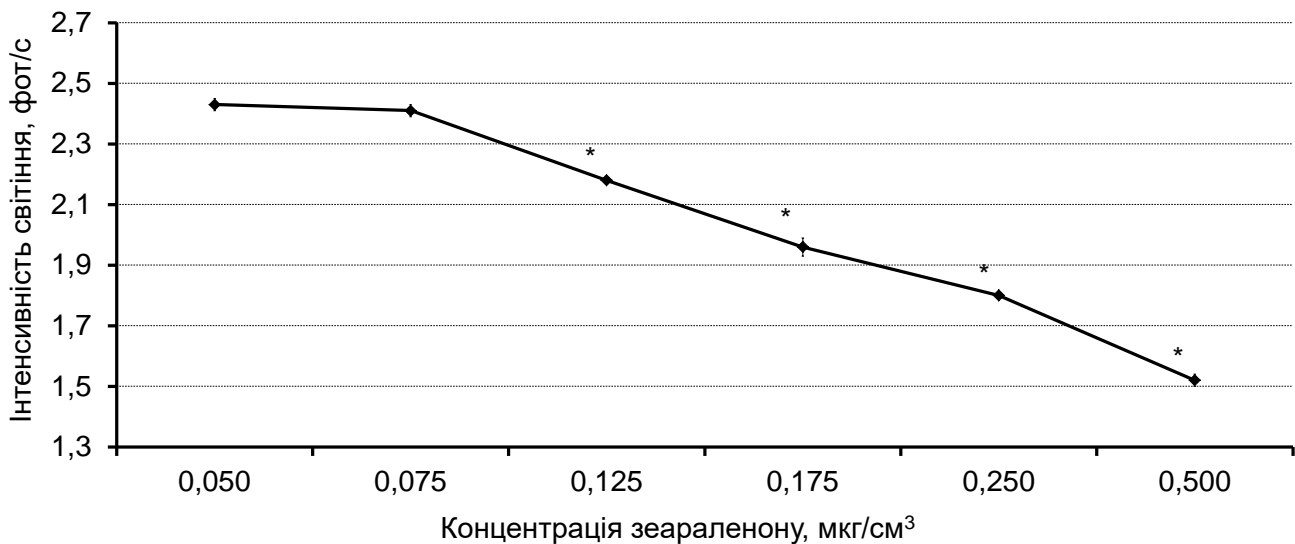


Рис. 3. Залежність інтенсивності світіння *Photobacterium phosphoreum* від концентрації зearаленону в пробі (лінійність методики) ($M \pm m$, $n = 6$): * — $p < 0,001$ відносно концентрації $0,05 \text{ мкг/см}^3$.

З метою встановлення **межі детектування** та **межі визначення** методу визначили найменшу кількість токсиканта 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.

Висновки. 1. Визначено валідаційні характеристики методики: вона є специфічною, точною, лінійною, відтворюваною.

2. Оптимальні умови та термін зберігання для *Ph. phosphoreum*: у пробірках на щільному поживному середовищі за температури 4°C зі щомісячним пересівом протягом 7 місяців, а оптимальні умови та термін культивування перед дослідженням: у пробірках на рідкому поживному середовищі за температури 26°C через 24 год після висіву.

3. Межа детектування методики за зearаленоном становить $0,125 \text{ мкг/см}^3$, а межа визначення — $0,25 \text{ мг/кг}$ корму.

Подяка. Автори виражають щире подяку кандидату біологічних наук, завідувачу Депозитарію мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАНУ Тетяні Миколаївні Головач за люб'язно наданий для дослідження штам *Photobacterium phosphoreum* (IMB B-7071; Sq3).

Список літератури

1. Сидашова С. А., Халак В. И. Экспресс-биотестирование — практический инструмент оптимизации кормления свиней. *Перспективы и достижения в производстве и переработке сельскохозяйственной продукции*: сб. науч. статей по материалам междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 85-летию юбилею со дня основания ф-та технологич. менеджмента (зооинженерного) (Ставрополь, 16–17 апр. 2015 г.). Ставрополь : Ставропольский гос. аграр. ун-т, 2015. Т. 2. С. 93–99.
2. Исмаилов А. Д., Алексерова Л. Э. Фотобиосенсоры на основе светящихся бактерий (обзор). *Биохимия*. 2015. Т. 80, № 6. С. 867–881. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=23764299>.
3. Кацев А. М., Абдураманова Э. Р., Стародуб Н. Ф. Иммуобилизация биолюминесцентных бактерий на неорганических носителях и оценка их применимости для биотестирования. *Biotechnology*. 2009. Т. 2, № 3. С. 74–79. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/biot_2009_2_3_9.
4. Woutersen M., Belkin S., Brouwer B., van Wezel A. P., Heringa M. B. Are luminescent bacteria suitable for online detection and monitoring of toxic compounds in drinking water and its sources? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011. Vol. 400, iss. 4. P. 915–929. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4372-6>.
5. Xu W., Jiang Z., Zhao Q., Zhang Z., Su H., Gao X., Ye Z. Acute toxicity assessment of explosive-contaminated soil extracting solution by luminescent bacteria assays. *Environmental Science and Pollution Research International*. 2016. Vol. 23, iss. 22. P. 22803–22809. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7492-5>.
6. Yin J., Li X., Zhou C., Zhang Y. Luminescent bacterial sensors made from immobilized films of *Photobacterium phosphoreum*. *Chemical Research in Chinese Universities*. 2005. Vol. 21, iss. 1. P. 44–47. URL: <https://crcu.jlu.edu.cn/EN/Y2005/V21/I1/44>.

**VALIDATION OF RAPID METHOD FOR DETERMINING THE OVERALL TOXICITY OF FEED
USING BIOLUMINESCENT MICROORGANISMS *PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM***

Kurbatska O. V., Orobchenko O. L.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

*The article presents the results of studying the validation characteristics of the express method for determining the general toxicity of feed using bioluminescent microorganisms *Photobacterium phosphoreum*. The work used lyophilized culture *Ph. phosphoreum* (strain IMV B-7071; Sq3) and *Colpoda steinii* dry culture for ecological and toxicological studies of environmental objects, livestock and poultry products (RC № AB-02438-01-11, produced by "Vidrodzhennia" LLC, Odesa). Measurement of the luminescence intensity of luminescent bacteria was performed on a luminometer EMILITE-1003A. To quantify the effect on luminescence of bacteria we used toxicity index to conclude on the degree of toxicity of the sample. When testing *Colpoda steinii* the mobility of ciliates was the criterion for assessing the toxicity of the studied feed samples. Validation parameters of the express method for determining the general toxicity using photoluminescent microorganisms *Ph. phosphoreum* were established according to ISO 16140:2003 "Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods (IDT)". There was conducted a comparative study of alternative method (determination of total feed toxicity using *Ph. phosphoreum*) and standard method (determination of toxicity using infusoria *Colpoda steinii* in accordance with DSTU 3570-97 "Feed grain, products of its processing, feed. Determination of toxicity". The test object was a grain mixture (barley–wheat 50:50), toxicant — mycotoxin zearalenone. During the validation of the method, the following parameters were determined: relative specificity, relative accuracy, control of intralaboratory reproducibility, luminescence stability, linearity, convergence, detection limit and method determination limit. It has been established that the technique is specific, accurate, linear, reproducible. Optimal conditions and shelf life for *Ph. phosphoreum*: in tubes on a dense nutrient medium at a temperature of 4°C with monthly reseeded for 7 months, and optimal conditions and time of cultivation before the study: in tubes on a liquid nutrient medium at a temperature of 26°C 24 h after seeding. The limit of detection of the method (for zearalenone) is 0.125 µg/cm³, and the limit of determination is 0.25 mg/kg of feed*

Keywords: *express method, zearalenone, Colpoda steinii*

УДК 619:577.2.08:604.6:633.953.494/.52:636.085.3(477)

DOI [10.36016/VM-2021-107-10](https://doi.org/10.36016/VM-2021-107-10)

**МОНІТОРИНГ ГМО У СОЇ, РІПАКУ ТА КОРМАХ ДЛЯ
СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН В УКРАЇНІ ЗА 2018–2020 РОКИ**

Гайдей О. С., Олексієнко І. С., Шуляк С. В., Меженський А. О., Київська Г. В.

*Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та
ветеринарно-санітарної експертизи, Київ, Україна, e-mail: olga.gaidei@gmail.com*

Крушельницька О. В.

*Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій ім. С. З. Гжицького, Львів, Україна*

Метою роботи було провести моніторинг та проаналізувати результати досліджень сої, ріпаку та кормів для сільськогосподарських тварин за період 2018–2020 рр. щодо наявності ГМО. Дослідження проводились протягом 2018–2020 рр. методом полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу у науково-дослідному відділі біохімічних і молекулярних досліджень харчових продуктів, кормів та води Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи та регіональних державних лабораторіях Держпродспоживслужби України. Для проведення досліджень були використані діагностичні набори (R-Biorham): для скринінгу, ідентифікації, кількісного визначення ГМ-ліній сої та ріпаку. Як позитивний контроль використовували референс матеріал ГМ-сої, ГМ-ріпаку (ERM, Бельгія). За період 2018 р. було досліджено 3 494 зразків рослинної сировини та кормів, з яких у 505 зразках (14,5 %) було виявлено ГМ-лінії сої та ріпаку. У 2019 р. було досліджено 4 235 зразків, з яких 775 (18,2 %) зразків були