

**УКРАЇНА****(19) UA (11) 109044 (13) C2****(51) МПК (2015.01)****G01N 33/00****G01N 33/02 (2006.01)****G01N 33/18 (2006.01)**

**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2013 09902	(72) Винахідник(и): Пилипенко Людмила Миколаївна (UA), Пилипенко Інна Василівна (UA), Гайдукевич Діана Казимирівна (UA), Данилова Олена Іванівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 09.08.2013	(73) Власник(и): ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.07.2015	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: RU 2049994 C1, 10.12.1995 RU 2266015 C2, 10.12.2005 ГОСТ 13496.7-97 Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения токсичности.
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.02.2015, Бюл.№ 3	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.07.2015, Бюл.№ 13	

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ТОКСИЧНИХ РЕЧОВИН В ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ БІОЛОГІЧНИМ МЕТОДОМ**(57) Реферат:**

Винахід належить до галузі гігієнічної безпеки харчових продуктів і продовольчої сировини та екологічної безпеки, а саме до визначення токсичних органічних та неорганічних речовин у харчових продуктах методом біотестування. Заявлено спосіб, в якому досліджуваний зразок подрібнюють, після чого здійснюють екстракцію токсичних речовин ацетоно-водним розчином при заданих параметрах вмісту ацетону і певному співвідношенні досліджуваний зразок:розчинник. Далі екстракт концентрують і до концентрату додають ацетон. Після цього добову культуру інфузорій *Stylonicchia mytilus* вносять в 5 мікроакваріумів в кількості 10-20 особин у водному розчині об'ємом 0,01-0,02 см³, додають 0,2 см³ дослідної проби і витримують протягом 1-5 хв., а після адаптації інфузорій *Stylonicchia mytilus* підраховують початкову їх кількість, витримують 40-60 хв. і вдруге підраховують їх кількість, а ступінь токсичності оцінюють по кількості інфузорій *Stylonicchia mytilus*, що вижили.

UA 109044 C2

Винахід належить до галузі гігієнічної безпеки харчових продуктів і продовольчої сировини та екологічної безпеки, а саме до визначення токсичних органічних та неорганічних речовин у харчових продуктах методом біотестування.

Відомий спосіб біотестування води і ґрунту на забруднення поллютантами (важкими металами, пестицидами) за ступенем пригнічення фототаксису, який дозволяє провести аналіз протягом однієї-двох діб. Як біоіндикатори використовуються представники родини ряскових (*Lemna minor* L.), причому ступінь токсичності визначають за кількістю клітин, які загинули, та за інтенсивністю забарвлення листків барвником сафраніном, який дозволяє підвищити точність біотестування. На основі результатів складають шкалу забруднень (див. патент РФ № 2135994, МПК⁶ G01 N33/18). Спосіб включає поміщення біотестерів в аналізовану воду, витримку їх у воді із додаванням токсиканта 18-24 години. По кількості і інтенсивності забарвлених сафраніном біотестерів (мертвих клітин або частини листа) складають бонітувальну шкалу ушкодження біотестера. При аналізі одного зразка на важкі метали в еталоні виявилися забарвленими до 10 % клітин від усієї площі вегетативного листочка, при великій концентрації металу старі листочки забарвлювалися повністю, зі зменшенням концентрації живими, тобто незабарвленими, залишалися тільки точки росту. При деяких концентраціях зеленими були лише частини листочка. Пестициди викликали інгібування фототаксису хлоропластів і їх кількість після 10 хвилин дії сильним світлом зменшувалася. При вітальному фарбуванні усіх листочків реакція біотестера на препарати була різною. Антіо - листочки повністю забарвлені, децис і дерозал (карбендазим) - молоді листочки не забарвлені, старі - забарвлені на 90 %, суми-L - молоді не забарвлені тільки в точках росту, старі - 90 % забарвлення.

Недоліком способу є необхідність тривалого витримування ряски малої в розчині токсиканта, використання барвника для визначення ушкоджених ділянок або всієї листової пластинки, а також необхідність попереднього складання шкали для біотестування.

Відомий спосіб визначення наявності і концентрації інсектициду метафосу і продукту гідролізу фосфорорганічного нітроароматичного інсектициду пара-нітрофенолу у водному середовищі (див. патент РФ № 2175352, МПК⁷ C12Q1/02, A01N57/14, A01N33/18, G01N33/18, C12Q1/02, C12R1/40), що передбачає підготовку біоіндикатора шляхом культивування бактерій *Pseudomonas putida* на твердому поживному середовищі, яке не містить досліджувані речовини. Змивають отриману біомасу фосфатним буфером з рН 7,45 (при використанні штаму *Pseudomonas putida* 3-11), з рН 8,1 (при використанні штаму *Pseudomonas putida* БА-11). Інкують біомасу в тому ж буфері. В отриманому біоіндикаторі реєструють концентрацію кисню за допомогою кисневого електрода при 35 °С. Додають до біоіндикатора досліджувану речовину, реєструють в отриманій суміші концентрацію кисню. По різниці швидкостей споживання кисню бактеріями визначають концентрацію досліджуваної речовини.

Недоліком цього способу є необхідність попереднього вирощування біомаси, що викликає втрату часу, необхідно використовувати буфери з певним рН, що звужує спектр речовин, які можливо визначити запропонованим способом, використовують спеціальне обладнання для реєстрації вмісту кисню за допомогою електрода при фіксованій температурі, що також звужує коло контамінантів, які визначають цим способом.

Найбільш близьким за технічною суттю до запропонованого способу є спосіб визначення токсичності ("ГОСТ 13496.7-97 Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения токсичности"), згідно з яким токсичність біопроби визначають за допомогою інфузорій послідовно в два етапи. Попередньо готують середовища для проведення досліджень. На першому етапі здійснюють екстракцію токсичних речовин із подрібненої зернової маси чи комбікорму за допомогою ацетону. Наважку 10 г поміщають в ємність на 25 см³ і здійснюють екстракцію ацетоном при співвідношенні 1:(1-1,5), залежно від виду досліджуваного продукту можливо додати на 2 см³ ацетону більше. Відділяють твердий залишок фільтруванням і екстракцію повторюють при енергійному струшуванні. На другому етапі із об'єднаних екстрактів відбирають 0,5 см³ в стакан із підготовленою водою при співвідношенні 1:(80-100) згідно із таблицею. Після цього в 5 мікроакваріумів вносять добову культуру інфузорій *Stylonychia mytilus* або *Colpoda steinii* або *Tetrachimena pyriformis* і в залежності від виду використаних інфузорій через 30, 60 хв., 3-24 годин визначають ефект біопроби в краплині або мікроакваріумі у 0,2 см³ дослідної проби під мікроскопом шляхом підрахунку живих і загинувших інфузорій у відсотках, який залежить від ступеня токсичності проби зерна або корму.

Цей спосіб вибрано прототипом.

Прототип і корисна модель, що заявляється, мають такі спільні ознаки:

- як тест-організми використовують культуру інфузорій;
- здійснюють попередню підготовку харчової сировини шляхом подрібнення;

- екстракцію токсичних речовин;
- при необхідності регулюють рН досліджуваного екстракту;
- введення інкубованих тест-організмів в розчин досліджуваної речовини;
- біологічну активність об'єкта оцінюють шляхом підрахунку кількості інфузорій.

5 Але спосіб за прототипом має наступні недоліки:

- наявність етапу з функціональним навантаженням, що призводить до повної загибелі тест-організмів, вимагає додаткового часу, витрат реактивів, але не є достатньо показовим;
- використання способу передбачає лише аналіз твердої маси, із якої здійснюється екстракція і не може бути використаний для рідких харчових або нехарчових субстанцій;
- 10 - спосіб визначення не дає змоги отримати достовірні значення при невисоких концентраціях токсикантів внаслідок розведення підготованих екстрактів у 160-350 разів.

В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб визначення токсичних речовин в харчових продуктах біологічним методом, в якому за рахунок проведення екстракції токсичних речовин ацетоно-водним розчином та умов екстракції: співвідношення ацетону і води, масовому співвідношенню розчинника і досліджуваного зразка, а також витримки добової культури інфузорій *Stylonichia mytilus* в отриманому таким чином концентраті, забезпечити отримання однозначного результату щодо ступеня токсичності неорганічних і органічних речовин та/або їх сумішей, підвищити чутливість методу і достовірність результатів, а також спрощення за рахунок того, що спосіб не вимагає використання спеціального складного обладнання.

20 Поставлена задача вирішена в способі визначення токсичних речовин в харчових продуктах біологічним методом, що передбачає подрібнення досліджуваного зразка, екстракцію токсичних речовин, інкубацію тест-організмів, введення їх в розчин досліджуваного зразка і підрахунок кількості тест-організмів у фіксованому об'ємі суміші, тим, що на відміну від прототипу екстракцію токсичних речовин здійснюють ацетоно-водним розчином з вмістом 30-70 % ацетону при масовому співвідношенні досліджуваного зразка і розчинника, рівному 1:(0,1-20,0), і рН=4,8-7,0, отриманий екстракт концентрують шляхом випарювання до зникнення запаху ацетону, до сконцентрованого екстракту додають ацетон при співвідношенні ацетон:концентрат, рівному (0,1-0,3):(9,7-9,9), після цього добову культуру інфузорій *Stylonichia mytilus* вносять по 0,01-0,02 см³ в 5 мікроакваріумів в кількості 10-20 особин у кожний мікроакваріум, додають 0,2 см³ дослідної проби і витримують протягом 1-5 хв., а після адаптації інфузорій *Stylonichia mytilus* підраховують початкову їх кількість, витримують 40-60 хв. і вдруге підраховують їх кількість, а ступінь токсичності оцінюють по кількості інфузорій *Stylonichia mytilus*, що вижили.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю заявлених ознак можна пояснити наступним.

Технічним результатом даного способу є:

- спрощення процесу;
- підвищення чутливості визначення токсичних речовин в харчових продуктах;
- підвищення достовірності отриманих результатів.

Спрощення досягається за рахунок:

- використання одного виду мікроорганізмів - інфузорій *Stylonichia mytilus*;
- 40 - використання ацетоно-водної суміші для екстракції токсичних речовин, тобто немає необхідності у підборі системи розчинників для різних видів продуктів і токсикантів.

Підвищення чутливості і достовірності досягається за рахунок зменшення ступеня розведення проб, як під час екстракції, так і при проведенні дослідження. Так, у прототипі загальне розведення проби, із якої екстрагують токсикант, досягає 1:(160-350), у способі, що заявляється, максимальне розведення сягає 1:200, при цьому враховується вологість досліджуваної проби. Крім того, використання ацетоно-водної суміші дозволяє досягти більш повного вилучення токсичних речовин різної фізико-хімічної природи, що підтверджено проведеними дослідженнями (табл. 1). Так, використання тільки ацетону для екстракції навіть при мінімальному розведенні за пропонованим способом не дозволяє достовірно визначити токсичність зразку - ступінь виживання *Stylonichia mytilus* склала 84,7 %, тобто, він є нетоксичним, а використання ацетоно-водної суміші для аналогічного зразку дозволило з'ясувати, що він є слаботоксичним - ступінь виживання склала 65,2 %, тобто значною мірою підвищується чутливість методу і достовірність отриманих результатів.

У способі, що заявляється, використовується добова культура інфузорій *Stylonichia mytilus*, токсичність визначається при низькому вмісті у зразку токсичних речовин. Вживаність інфузорій вираховують по формулі:

$$N = \left(\frac{N_2}{N_1} \right) \cdot 100, \text{ де:}$$

N - виживаність, %

N_1 - середня арифметична кількість інфузорій на початку дослідів (за результатами не менше 5-ти досліджень), шт.;

N_2 - середня арифметична кількість інфузорій через 1 год. експозиції (за результатами не менше 5-ти досліджень), шт.;

5 100 - коефіцієнт перерахунку у відсотки.

Ступінь токсичності неорганічних та органічних речовин, що можуть бути визначені запропонованим способом, залежить від їх сумарного вмісту, хімічної природи і належності до різних видів токсикантів: важкі метали, органічні речовини, у тому числі, різні групи пестицидів (інсектициди, фунгіциди, гербіциди), глікозиди, речовини білкового походження тощо.

10 Запропонований спосіб дозволяє швидко виявити потенційно небезпечні об'єкти, які містять контамінанти неорганічного та органічного походження, що важливо для визначення безпеки харчових продуктів і продовольчої сировини та екологічної безпеки, а також моніторингу якості харчових систем.

Здійснення заявлюваного способу ілюструється наступними прикладами.

15 Приклад 1. Об'єкт дослідження - зерно пшениці. Спочатку приготували контрольне дослідження.

В п'ять мікроакваріумів внесли добову культуру інфузорій *Stylonichia mytilus* у кількості $0,02 \text{ см}^3$ в такій послідовності: в перший мікроакваріум 14 особин, в другий - 13, в третій - 12, четвертий - 13, п'ятий - 13, додавали $0,2 \text{ см}^3$ ацетоно-водного розчину у співвідношенні 20 $0,5:9,5$. Через годину експозиції підраховували кількість живих інфузорій: $13+12+13+14+13=65$.

$$N = \left(\frac{65}{65} \right) \cdot 100 = \left(\frac{13}{13} \right) \cdot 100 = 100,00$$

Далі взяли наважку 10 г подрібненого зерна пшениці, додали інсектицид "Бульдог" (бета-цифлурин) і нітрат свинцю (сіль важкого металу) у кількості по 1 гранично допустимій концентрації (ГДК) кожного компонента - інсектициду і Pb^{2+} і екстрагували ацетоно-водним розчином при співвідношенні ацетон:вода $1:1$, наважка: екстрагент $1:3$, брали по $0,2 \text{ см}$ суміші у 25 5 мікроакваріумів, додавали добову культуру інфузорій, залишали на 3 хв. для адаптації, підраховували початкову кількість інфузорій, через 60 хв. здійснювали повторний підрахунок і визначали ступінь токсичності.

Сумарна кількість інфузорій *Stylonichia mytilus* на початку експозиції 69 особин, через 60 хв. - 30 45 особин. Виживаність склала $65,2 \%$. Ступінь токсичності - слаботоксичний.

Приклад 2. Об'єкт дослідження - сливи. Контрольний зразок - вода.

Наважку слив 10 г подрібнювали, вичавлювали сік (6 см^3), із якого здійснювали екстракцію ацетоно-водним розчином при співвідношенні ацетон:вода ($1:1$). Екстракт випарювали до відсутності запаху ацетону до об'єму $4,94 \text{ см}^3$, отримували концентрат, до якого додавали $0,06 \text{ см}^3$ ацетону і отримували дослідну пробу. Брали добову культуру інфузорій у 5 мікроакваріумів, 35 щоб у кожній пробі містилося від 10 до 20 особин *Stylonichia mytilus*, додавали по $0,2 \text{ см}^3$ дослідної проби, залишали на 2 хв. для адаптації, підраховували початкову кількість інфузорій, через 60 хв. здійснювали повторний підрахунок і визначали ступінь токсичності.

Приклади 3-6 ілюструють визначення токсичності на модельних зразках соку сливи із 40 додаванням різної кількості солей важких металів (Pb^{2+} і Cd^{2+}) у вигляді нітрату свинцю і хлориду кадмію.

Результати впливу важких металів на *Stylonichia mytilus* наведені у таблиці 2.

Як видно із наведених даних, вже додавання $1 \text{ ГДК } \text{Pb}^{2+}$ дозволяє визначити зразок як 45 слаботоксичний, оскільки на початку експозиції було 68 особин *Stylonichia mytilus*, а після експозиції залишилося 47 особин, виживаність склала $69,1 \%$, те саме можливо сказати і про зразок 5 із $1 \text{ ГДК } \text{Cd}^{2+}$ - виживаність $65,7 \%$, а от наявність по 1 ГДК кожного важкого металу (зразок 6) призводить до виживаності $55,7 \%$, в той же час, $2 \text{ ГДК } \text{Pb}^{2+}$ (зразок 4) дає виживаність $60,6 \%$.

Приклад 7. Об'єкт дослідження - яблука.

50 Наважку яблук 1 г подрібнювали, отримували пюре, із якого здійснювали екстракцію 10 см^3 ацетоно-водним розчином із урахуванням вмісту вологи в продукті таким чином, щоб співвідношення ацетон:вода було $1:3$, екстракт випарювали до відсутності запаху ацетону, додавали $0,3 \text{ см}^3$ ацетону для утримання ліпорозчинних речовин у екстракті, додавали для нейтралізації $0,2 \text{ см}^3$ розчину NaHCO_3 до $\text{pH } 5,1$, доводили об'єм до 10 см^3 водою, далі 55 використовували цей розчин для дослідження. Добову культуру інфузорій *Stylonichia mytilus* у кількості $0,01 \text{ см}^3$, в якій міститься від 10 до 20 особин вносили в мікроакваріуми, додавали $0,2 \text{ см}^3$ екстракту, отриманого із пюре яблук або модельної системи, що включала екстракт зразка

яблучного пюре та інсектицид "Бульдог" (бета-цифлурин) в ацетоново-водній суміші. Через 5 хв., після адаптації тест-організмів у розчині, здійснювали підрахунок початкової кількості інфузорій, через 60 хв. експозиції вдруге проводили підрахунок чисельності інфузорій. Зразки контролю та яблук виявилися нетоксичними.

Приклади 8-14 ілюструють визначення токсичності на модельних зразках - екстрактах із яблучного пюре із додаванням різної кількості інсектициду "Бульдог". Дані наведені в таблиці 3. Як видно із наведених даних, при наявності у модельній системі інсектициду "Бульдог" у кількості $1 \cdot 10^{-4}$ мг/см³ із 68 залишилося інфузорій 66 особин, у кількості $2 \cdot 10^{-4}$ мг/см³ із 66 залишилося 57 особини інфузорій, при кількості інсектициду $4 \cdot 10^{-4}$ мг/см³ із 69 залишилося 53 особини; при кількості інсектициду $6 \cdot 10^{-4}$ мг/см³ в п'яти мікроакваріумах із 67 залишається із 37 особин - слаботоксичний ефект, а при збільшенні кількості інсектициду із 68 залишається 25 особин і менше - виявляється токсичний ефект.

Приклади 15-17 ілюструють вивчення токсичності соку картоплі свіжої із додаванням о-хлорфенолу (приклад 16); суміші о-хлорфенолу і інсектициду "Бульдог" (приклад 17); при наявності у картоплі соланіну (приклад 19-22) та суміші соланіну і інсектициду "Бульдог" (приклад 23). Дані наведені в табл. 4.

Як видно із даних, наведених у таблиці 4, картопля свіжа подрібнена (зразок 18) нетоксична, в модельних зразках із вмістом соланіну 0,05 мг/г, 0,2 мг/г, 0,25 мг/г токсичний ефект виявлений при наявності від 0,25 мг/г соланіну або при наявності у суміші 1 мг/г соланіну та пестициду "Бульдог" у кількості від $1 \cdot 10^{-4}$ мг/см³ - в мікроакваріумах залишається 27 і 25 особин відповідно.

Приклади 24-25 ілюструють вивчення токсичності пюре кабачків (приклад 24) і на модельних зразках пюре кабачків із додаванням суміші о-хлорфенолу і інсектициду "Бульдог" (приклад 25), а також із додаванням суміші о-хлорфенолу і нітрату свинцю (іонів важкого металу Pb²⁺ - приклад 26).

Дані наведені в таблиці 5.

Як видно із даних, наведених у таблиці 5, пюре із кабачків нетоксичне, додавання суміші о-хлорфенолу і інсектициду "Бульдог" по $1 \cdot 10^{-4}$ мг/г призводить до наявності токсичного ефекту - із 64 інфузорій *Stylonichia mytilus* залишається 23, наявність суміші $1 \cdot 10^{-4}$ мг/г о-хлорфенолу і $2,5 \cdot 10^{-4}$ мг/г Pb²⁺, який додавали у вигляді солі нітрату свинцю також призводить до виживання 25 особин із 63.

Окрім цього, були проведені дослідження впливу суміші фунгіциду "Тілт" (пропіконазолу) та інсектициду "Децис" (альфа-циперметрина) в модельній системі, які показали, що наявність двох видів токсикантів призводить до підвищення порогу чутливості інфузорій *Stylonichia mytilus*. Дані наведені у таблиці 6.

Доведено, що інфузорій *Stylonichia mytilus* можливо використовувати для визначення токсичності речовин різної хімічної природи. Вплив токсичного білка рицину виявлений при наявності від $1 \cdot 10^{-4}$ мг/г та більше або при наявності рицину у кількості $5 \cdot 10^{-5}$ мг/г та пестициду "Бульдог" у кількості від $1 \cdot 10^{-4}$ мг/см³ - в мікроакваріумах залишається 27 і 23 особини відповідно. Дані наведені в таблиці 7.

При додаванні у модельну систему алкалоїду стрихніну токсичний ефект виявлений при наявності алкалоїду в кількості від 0,5 мг/дм³ та при наявності суміші його із пестицидом "Бульдог" у кількості від $1 \cdot 10^{-4}$ мг/см³ або суміші із пестицидом "Бульдог" у кількості від $5 \cdot 10^{-5}$ мг/см³ та нітрату свинцю у кількості 0,25 мг/дм³ - в мікроакваріумах залишається 26 і 23 особини відповідно.

Результати впливу алкалоїду і пестициду на *Stylonichia mytilus* наведені у таблиці 8. Вплив різних токсикантів та модельних сумішей наведені в таблицях 9-12.

Таблиця 1

Результати дослідження впливу екстрагенту контамінантів шляхом визначення виживаності *Stylonichia mytilus*

Досліджувані зразки	Склад екстрагенту	Сумарна кількість <i>Stylonichia mytilus</i> im початку експозиції, особин	Сумарна кількість <i>Stylonichia mytilus</i> через 60 хв. експозиції, особин	Вживаність <i>Stylonichia mytilus</i> , %	Ступінь токсичності
Подрібнене зерно пшениці + 1 ГДК інсектициду "Бульдог" + 1 ГДК Pb ²⁺	ацетон	72	61	84,7	Нетоксичний

Продовження таблиці 1

**Результати дослідження впливу екстрагенту контамінантів шляхом
визначення виживаності *Stylonichia mytilus***

Досліджувані зразки	Склад екстрагенту	Сумарна кількість <i>Stylonichia mytilus</i> на початку експозиції, особин	Сумарна кількість <i>Stylonichia mytilus</i> через 60 хв. експозиції, особин	Вживаність <i>Stylonichia mytilus</i> , %	Ступінь токсичності
Подрібнене зерно пшениці + 1 ГДК інсектициду "Бульдог" + 1 ГДК Pb ²⁺	ацетон:вода 1:1	69	45	65,2	Слаботоксичний
Подрібнена сушена морква + 1 ГДК інсектициду "Севін" + 1 ГДК Cd ²⁺	ацетон	73	58	79,5	Слаботоксичний
Подрібнена сушена морква + 1 ГДК інсектициду "Севін" + 1 ГДК Cd ²⁺	ацетон:вода 1:1	67	35	52,2	Слаботоксичний
Подрібнені огірки + 1 ГДК інсектициду "Севін" + 1 ГДК Pb ²⁺	ацетон	68	51	75,0	Слаботоксичний
Подрібнені огірки + 1 ГДК інсектициду "Севін" + 1 ГДК Pb ²⁺	вода	70	57	81,4	Нетоксичний
Подрібнені огірки + 1 ГДК інсектициду "Севін" + 1 ГДК Pb ²⁺	ацетон:вода 1:1	65	38	58,5	Слаботоксичний

Примітка:

ГДК інсектициду "Бульдог"=0,0002 мг/см³;ГДК інсектициду "Севін"=0,0001 мг/см³;ГДК Pb²⁺=0,0005 мг/см³;ГДК Cd²⁺=0,00003 мг/см³

Таблиця 2

Вплив важких металів на виживаність *Stylonichia mytilus*

№ прикладів	Досліджувані зразки	Сумарна кількість <i>Stylonichia mytilus</i> на початку експозиції, особин	Сумарна кількість <i>Stylonichia mytilus</i> через 1 год. експозиції, особин	Вживаність <i>Stylonichia mytilus</i> , %	Ступінь токсичності
	Вода-контроль	65	65	100,0	Нетоксичний
2	Сік із слив	69	68	98,6	Нетоксичний
3	Моделльний зразок соку слив із додаванням 1 ГДК Pb ²⁺	68	47	69,1	Слаботоксичний
4	Моделльний зразок соку слив із додаванням 2 ГДК Pb ²⁺	71	43	60,6	Слаботоксичний
5	Моделльний зразок соку слив із додаванням 1 ГДК Cd ²⁺	67	44	65,7	Слаботоксичний
6	Моделльний зразок соку слив із додаванням 1 ГДК Pb ²⁺ + 1 ГДК Cd ²⁺	70	39	55,7	Слаботоксичний

ГДК Pb²⁺=0,5 мг/дм³;ГДК Cd²⁺=0,03 мг/дм³

Таблиця 3

Вплив фунгіциду "Бульдог" (бета-цифлурина) на виживаність
Styloichia mytilus у зразка яблук

№ прикладів	Досліджувані зразки	Сумарна кількість <i>Styloichia mytilus</i> на початку експозиції, особин	Сумарна кількість <i>Styloichia mytilus</i> через 1 год. експозиції, особин	Виживаність <i>Styloichia mytilus</i> , %	Ступінь токсичності
7	Екстракт із яблучного пюре	70	69	98,6	Нетоксичний
8	Модельний зразок екстракту із яблучного пюре з додаванням 0,5 ПДК препарату "Бульдог"	68	66	97,1	Нетоксичний
9	Модельний зразок екстракту із яблучного пюре з додаванням 1,0 ПДК препарату "Бульдог"	66	57	86,4	Нетоксичний
10	Модельний зразок екстракту із яблучного пюре з додаванням 2,0 ПДК препарату "Бульдог"	69	53	76,8	Слаботоксичний
11	Модельний зразок екстракту із яблучного пюре з додаванням 3,0 ПДК препарату Бульдог	67	37	55,2	Слаботоксичний
12	Модельний зразок екстракту із яблучного пюре з додаванням 4,0 ПДК препарату "Бульдог"	68	25	36,8	Токсичний
13	Модельний зразок екстракту із яблучного пюре з додаванням 5,0 ПДК препарату "Бульдог"	70	12	17,1	Токсичний
14	Модельний зразок екстракту із яблучного пюре з додаванням 6,0 ПДК препарату "Бульдог"	69	3	4,3	Токсичний

Примітка:

ГДК інсектициду "Бульдог" = 0,0002 мг/см³

Таблиця 4

Результати дослідження впливу органічних контамінантів на виживаність *Stylonichia mytilus*

№ прикладів	Досліджувані зразки	Сумарна кількість <i>Stylonichia mytilus</i> на початку експозиції, особин	Сумарна кількість <i>Stylonichia mytilus</i> через 45 хв. експозиції, особин	Вживаність <i>Stylonichia mytilus</i> , %	Ступінь токсичності
15	Сік картоплі свіжої	71	69	97,2	Нетоксичний
16	Модельний зразок соку картоплі свіжої з додаванням 0,5 ГДК о-хлорфенолу	62	42	67,7	Слаботоксичний
17	Модельний зразок соку картоплі свіжої з додаванням 0,5 ГДК о-хлорфенолу + 1,0 ГДК інсектициду "Бульдог"	66	24	36,4	Токсичний
18	Картопля свіжа подрібнена	71	68	95,8	Нетоксична
19	Модельний зразок екстракту із вмістом соланіну $1 \cdot 10^{-2}$ мг/г соланіну	68	64	94,1	Нетоксичний
20	Модельний зразок екстракту із вмістом соланіну $5 \cdot 10^{-2}$ мг/г соланіну	69	57	82,6	Нетоксичний
21	Модельний зразок екстракту із вмістом соланіну 0,2 мг/г соланіну	67	34	50,7	Слаботоксичний
22	Модельний зразок екстракту із вмістом соланіну 0,25 мг/г соланіну	70	27	38,6	Токсичний
23	Модельний зразок екстракту із вмістом соланіну 0,15 мг/г соланіну + 0,5 ГДК інсектициду "Бульдог"	66	25	37,9	Токсичний

Примітка:

ГДК о-хлорфенолу=0,1 мг/дм³;ГДК інсектициду "Бульдог"=0,2 мг/дм³;ГДК Рb²⁺=0,5 мг/дм³;

Соланін у кількості 1-5 мг/100 г - безпечно, 23-27 мг/100 г - токсична доза

Таблиця 5

Результати дослідження впливу органічних контамінантів на виживаність *Styloichia mytilus*

№ прикладів	Досліджувані зразки	Сумарна кількість <i>Styloichia mytilus</i> на початку експозиції, особин	Сумарна кількість <i>Styloichia mytilus</i> через 45 хв. експозиції, особин	Вживаність <i>Styloichia mytilus</i> , %	Ступінь токсичності
24	Пюре кабачків	69	68	98,6	Нетоксичне
25	Модельний зразок із пюре кабачків з додаванням 1 ГДК о-хлорфенолу + 0,5 ГДК інсектициду "Бульдог"	64	23	35,9	Токсичний
26	Модельний зразок із пюре кабачків з додаванням 1 ГДК о-хлорфенолу + 0,5 ГДК Pb ²⁺	63	25	39,7	Токсичний

Примітка:

ГДК о-хлорфенолу=0,1 мг/дм³;ГДК інсектициду "Бульдог"=0,2 мг/дм³;ГДК Pb²⁺=0,5 мг/дм³.

Таблиця 6

Вплив суміші фунгіциду "Тілт" (пропіконазолу) та інсектициду "Децис" (альфа-циперметрину) на виживаність *Styloichia mytilus*

Досліджувані зразки	Сумарна кількість <i>Styloichia mytilus</i> на початку експозиції, особин	Сумарна кількість <i>Styloichia mytilus</i> через 1 год. експозиції, особин	Вживаність <i>Styloichia mytilus</i> , %	Ступінь токсичності
1	2	3	4	5
Модельний зразок по 0,25 ГДК	65	53	81,5	Нетоксичний
Модельний зразок по 0,3 ГДК	62	50	80,6	Нетоксичний
Модельний зразок по 0,4 ГДК	63	41	65,0	Слаботоксичний
Модельний зразок по 0,3 ГДК "Децис" та 0,5 ГДК "Тілт"	65	27	41,5	Токсичний
Модельний зразок по 0,5 ГДК	64	25	39	Токсичний
Модельний зразок по 1 ГДК	62	22	35,5	Токсичний
Модельний зразок по 1,5 ГДК	66	21	31,8	Токсичний
Модельний зразок по 2 ГДК	63	19	30,2	Токсичний

Примітка:

ГДК фунгіциду "Тілт"=0,0001 мг/см³;

ГДК інсектициду "Децис" $=0,0001 \text{ мг/см}^3$.

Таблиця 7

Результати дослідження впливу контамінантів на виживаність *Stylonichia mytilus*

Досліджувані зразки	Сумарна кількість <i>Stylonichia mytilus</i> на початку експозиції, особин	Сумарна кількість <i>Stylonichia mytilus</i> через 60 хв. експозиції, особин	Вживаність <i>Stylonichia mytilus</i> , %	Ступінь токсичності
Моделльний зразок з додаванням $1 \cdot 10^{-5} \text{ мг/см}^3$ рицину	70	57	81,4	Нетоксичний
Моделльний зразок з додаванням $5 \cdot 10^{-5} \text{ мг/см}^3$ рицину	66	41	62,1	Слаботоксичний
Моделльний зразок з додаванням $1 \cdot 10^{-4} \text{ мг/см}^3$ рицину	67	27	40,3	Токсичний
Моделльний зразок з додаванням $1 \cdot 10^{-4} \text{ мг/см}^3$ рицину + 1 ГДК інсектициду "Бульдог"	65	23	35,4	Токсичний

Примітка:

летальна доза рицину для мишей $3 \cdot 10^{-4} \text{ мг/г}$;ГДК інсектициду "Бульдог" $=0,0002 \text{ мг/см}^3$

Таблиця 8

Результати дослідження впливу різних токсикантів на виживаність *Stylonichia mytilus*

Досліджувані зразки	Сумарна кількість <i>Stylonichia mytilus</i> на початку експозиції, особин	Сумарна кількість <i>Stylonichia mytilus</i> через 60 хв. експозиції, особин	Вживаність <i>Stylonichia mytilus</i> , %	Ступінь токсичності
Пюре полуниці	69	69	100	Нетоксичне
Моделльний зразок пюре полуниці з додаванням $0,3 \text{ мг/дм}^3$ стрихніну	68	49	72,1	Слаботоксичний
Моделльний зразок пюре полуниці з додаванням $0,5 \text{ мг/дм}^3$ стрихніну	67	35	52,2	Слаботоксичний
Моделльний зразок пюре полуниці з додаванням $0,7 \text{ мг/дм}^3$ стрихніну	71	28	39,4	Токсичний
Моделльний зразок пюре полуниці з додаванням $0,3 \text{ мг/дм}^3$ стрихніну та 1 ГДК інсектициду "Бульдог"	69	26	37,7	Токсичний
Моделльний зразок пюре полуниці з додаванням $0,3 \text{ мг/дм}^3$ стрихніну + $0,5 \text{ ГДК}$ інсектициду "Бульдог" + $0,5 \text{ ГДК Pb(NO}_3)_2$	66	25	37,9	Токсичний

5

Примітка:

летальна доза стрихніну для мишей $0,5 \text{ мкг/г}$;

ГДК інсектициду "Бульдог"=0,0002 мг/см³;
ГДК Pb²⁺=0,5 мг/дм³

Таблиця 9

Результати дослідження впливу токсикантів на *Styloichia mytilus* у соку слив

№ з/п	Вид токсиканту	Допустимі рівні, не більше, мг/кг	Мінімальна доза, мг/кг	Вживаність
1	Пестициди:			
	"Севин"	0,1	0,01	62,4 %
	"Фозалон"	0,2	0,005	51,1 %
	"Бульдог"	0,2	0,2	79,2 %
2	Солі важких металів:			
	Cd ²⁺	0,03	0,005	66,1 %
		модельний зразок, 0,09 мг/кг		39,5 %
	Hg ²⁺	0,02	0,005	55 %
	Pb ²⁺	0,5	0,060	76 %
		модельний зразок, 1,5 мг/кг		39,4 %
3	Класичний мутаген K ₂ Cr ₂ O ₇	0,2	0,01	75 %

Таблиця 10

Вплив інсектициду "Бульдог" (бета-цифлурину) на виживаність *Styloichia mytilus*

Досліджувані зразки	Сумарна кількість <i>Styloichia mytilus</i> на початку експозиції, особин	Сумарна кількість <i>Styloichia mytilus</i> через 1 год. експозиції, особин	Вживаність <i>Styloichia mytilus</i> , %	Ступінь токсичності
Вода-контроль	65	65	100,0	Нетоксичний
Модельний зразок 0,5 ГДК	65	64	98,5	Нетоксичний
Модельний зразок 1 ГДК	60	52	86,7	Нетоксичний
Модельний зразок 1,5 ГДК	72	57	79,2	Слаботоксичний
Модельний зразок 2 ГДК	66	51	77,3	Слаботоксичний
Модельний зразок 3 ГДК	61	36	58,1	Слаботоксичний
Модельний зразок 4 ГДК	65	25	38,5	Токсичний

Примітка:
ГДК інсектициду "Бульдог"=0,0002 мг/см³

Таблиця 11

Результати дослідження впливу інсектициду "Децис" (альфа-циперметрину) + CdCl_2 на виживаність *Styloichia mytilus*

Досліджувані зразки	Сумарна кількість <i>Styloichia mytilus</i> im початку експозиції, особин	Сумарна кількість <i>Styloichia mytilus</i> через 60 хв. експозиції, особин	Вживаність <i>Styloichia mytilus</i> , %	Ступінь токсичності
0,5 ГДК "Децис" + 0,5 ГДК Cd^{2+}	63	44	69,8	Слаботоксичний
Сік слив+0,5 ГДК "Децис" + 0,5 ГДК Cd^{2+}	64	41	64,0	Слаботоксичний
1 ГДК "Децис" + 1 ГДК Cd^{2+}	63	32	50,8	Слаботоксичний
Сік слив + 1 ГДК "Децис" + 1 ГДК Cd^{2+}	66	33	50,0	Слаботоксичний
2,0 ГДК "Децис" + 1 ГДК Cd^{2+}	63	27	42,9	Слаботоксичний
Сік слив+2 ГДК "Децис" + 1 ГДК Cd^{2+}	62	25	40,3	Токсичний
2,0 ГДК "Децис" + 2 ГДК Cd^{2+}	64	25	39,1	Токсичний

Примітка:

ГДК інсектициду "Децис"=0,0001 мг/см³,

ГДК Cd^{2+} =0,00003 мг/см³

Таблиця 12

Результати дослідження впливу пестициду "Севін" (альфа-нафтил-N-метилкарбамату) + CdCl_2 на виживаність *Styloichia mytilus*

Досліджувані зразки	Сумарна кількість <i>Styloichia mytilus</i> im початку експозиції, особин	Сумарна кількість <i>Styloichia mytilus</i> через 45 хв. експозиції, особин	Вживаність <i>Styloichia mytilus</i> , %	Ступінь токсичності
Сік слив + 0,25 ГДК "Севін" + 0,25 ГДК Cd^{2+}	63	54	85,7	Нетоксичний
Сік слив + 0,5 ГДК "Севін" + 0,5 ГДК Cd^{2+}	64	44	68,8	Слаботоксичний
Сік слив + 1,0 ГДК "Севін" + 1 ГДК Cd^{2+}	66	37	56,1	Слаботоксичний
Сік слив + 2,0 ГДК "Севін" + 1 ГДК Cd^{2+}	62	24	38,7	Токсичний

Примітка:

ГДК пестициду "Севін"=0,0001 мг/см³;

ГДК Cd^{2+} =0,00003 мг/см³

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

5

Спосіб визначення токсичних речовин в харчових продуктах біологічним методом, який включає подрібнення досліджуваного зразка, екстракцію токсичних речовин, інкубацію тест-організмів, введення їх в розчин досліджуваного зразка і підрахунок кількості тест-організмів у фіксованому об'ємі суміші, який **відрізняється** тим, що екстракцію токсичних речовин здійснюють ацетон-водним розчином з вмістом 30-70 % ацетону при масовому співвідношенні досліджуваного зразка і розчинника, рівному 1:(0,1-20,0), і рН=4,8-7,0, отриманий екстракт концентрують

10

- 5 шляхом випарювання до зникнення запаху ацетону, до сконцентрованого екстракту додають ацетон при співвідношенні ацетон:концентрат, рівному $(0,1-0,3):(9,7-9,9)$, після цього добову культуру інфузорій *Stylonichia mytilus* вносять по $0,01-0,02 \text{ см}^3$ в 5 мікроакваріумів в кількості 10-20 особин у кожний мікроакваріум, додають $0,2 \text{ см}^3$ дослідної проби і витримують протягом 1-5 хв., а після адаптації інфузорій *Stylonichia mytilus* підраховують початкову їх кількість, витримують 40-60 хв. і вдруге підраховують їх кількість, а ступінь токсичності оцінюють по кількості інфузорій *Stylonichia mytilus*, що вижили.

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601