



УКРАЇНА

(19) UA (11) 64510 (13) U
(51) МПК (2011.01)
G01N 33/00
G01N 33/18 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ БІОЛОГІЧНОГО ТЕСТУВАННЯ ХАРЧОВОЇ СИРОВИНИ І ПРОДУКТІВ

1

(21) u201104484
(22) 12.04.2011
(24) 10.11.2011
(46) 10.11.2011, Бюл.№ 21, 2011 р.
(72) ПИЛИПЕНКО ЛЮДМИЛА МИКОЛАЇВНА, ГАЙ-
ДУКЕВИЧ ДІАНА КАЗИМИРІВНА, ДАНИЛОВА
ОЛЕНА ІВАНІВНА
(73) ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАР-
ЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ
(57) Спосіб біологічного тестування харчової сир-
овини і продуктів, що передбачає інкубацію тест-
організмів інфузорій, введення їх в розчин дослі-
джуваної речовини і підрахунок кількості тест-

2

організмів у фіксованому об'ємі суміші, який **відрі-
зняється** тим, що добову культуру інфузорії
Stylonicchia mytilus або Daphnia magna вносять в
мікроакваріум і додають розчин досліджуваної
речовини, після адаптації тест-організмів підрахо-
вують початкову чисельність інфузорій, доводять
об'єм суміші розчином досліджуваної речовини до
половини мікроакваріума і витримують 45-90 хви-
лин, після чого вдруге підраховують чисельність
інфузорій і по кількості тест-організмів, що вижили,
оцінюють ступінь токсичності досліджуваної речо-
вини.

Корисна модель належить до області аналізу
гігієнічної безпеки харчових продуктів і продоволь-
чої сировини, а саме до визначення токсичності
пестицидів у харчових продуктах методом біотес-
тування.

Відомий спосіб біотестування токсичності при-
родних, стічних вод і водних розчинів із викорис-
танням таких тест-організмів, як нижчі ракоподібні
(дафнії, цереодафнії, моїни) (див. патент РФ
№2377560, МПК G01N33/18), що включає визна-
чення показника летальності рачків в пробах, що
тестуються у відсутності корму в кліматостаті про-
тягом 48 год., причому ємності з водою і тест-
організмами устанавлюють у нахиленому поло-
женні в касеті, яку обертають зі швидкістю 5-10
обертів за хвилину. До недоліків відомого способу
біотестування можна віднести високі експлуата-
ційні витрати за рахунок підтримання певних умов
в кліматостаті, а застосування ракоподібних вима-
гає наявності постійного обслуговуючого персона-
лу, оскільки необхідно підтримувати життєдіяль-
ність біологічного матеріалу.

Найбільш близьким по технічній суті до пропо-
нованого способу є спосіб біологічного моніторин-
гу екологічних систем і об'єктів (див. патент РФ №
2125261 МПК G01N33/00, G01N33/18, C12Q1/04), в
якому як тест-організми використовують інфузорії,
а моніторинг проводять послідовно в три етапи. На
першому етапі оцінюють біологічну активність реч-
овини об'єкта, що перевіряється. Порівнюють дію

даної речовини й контрольного стандартного се-
редовища на тест-організми через 0,5-24,0 год
інкубування. На другому етапі використовують
інкубовану протягом 24 год суміш стандартного
середовища з тест-організмами з речовиною об'є-
кта, що перевіряється, і контрольне стандартне
середовище з тест-організмами. Піддають функці-
ональним навантаженням до повної загибелі тест-
організмів, реєструють послідовність їхнього життя
з моменту початку впливу функціональних наван-
тажень і за отриманими даними оцінюють стиму-
люючу або інгібуючу активність речовини об'єкта,
що перевіряється, у порівнянні зі стандартним
середовищем. На третьому етапі використовують
суміш стандартного середовища з тест-
організмами у віці 3-4 днів з речовиною об'єкта, що
перевіряється, що проявляє біологічну активність
на 1-му етапі. Інкують протягом 3-4 днів, після
чого підраховують кількість тест-організмів у фік-
сованому об'ємі суміші й по отриманому результа-
ту оцінюють вплив речовини об'єкта, що перевіря-
ється, на швидкість розмноження тест-організмів.
При цьому для першого й другого етапів викорис-
товують як тест-організми інфузорії Paramecium
coudatum у віці 2-3 тижнів. Випробувану речовину
вводять у середовище в концентраціях від $1 \cdot 10^{-2}$
до $1 \cdot 10^{-6}$ на 1 см^3 середовища. Інкують цю суміш
і контрольне стандартне середовище з тест-
організмами при 18 – 27 °С. Запропонований спо-
сіб дозволяє швидко виявити потенційно небезпе-

(19) UA (11) 64510 (13) U

чні об'єкти, створити банки даних біологічного моніторингу екологічних систем.

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

- як тест-організми використовують культуру інфузорій;
- інкубація тест-організмів інфузорій;
- введення інкубованих тест-організмів в розчин досліджуваної речовини;
- біологічну активність об'єкта оцінюють шляхом підрахунку кількості інфузорій.

Але спосіб за прототипом має наступні недоліки:

- використовують три етапи для визначення дії речовини, що подовжує термін виконання дослідження;

- наявність етапу з функціональним навантаженням, що призводить до повної загибелі тест-організмів вимагає додаткового часу, витрат реактивів, але не є достатньо показовим;

- використовується контрольне стандартне середовище для мікроорганізмів, яке має специфічну токсикогенну дію, що з одного боку, передбачає використання додаткових умов безпеки для працюючих, а з іншого - воно достатньо специфічно діє на тест-організми і його дія може не збігатися з механізмом дії речовин, що досліджуються, що може призвести до похибки в результатах.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб біологічного тестування харчової сировини і продуктів, в якому за рахунок використання добової культури інфузорій *Stylonichia mytilus* або *Daphnia magna* забезпечується отримання однозначного результату щодо ступеня токсичності речовин, що досліджуються, прискорюється проведення тестування, воно також спрощується за рахунок того, що спосіб не вимагає використання спеціального складного обладнання.

Поставлена задача вирішена в способі біологічного тестування харчової сировини і продуктів, що передбачає інкубацію тест-організмів інфузорій, введення їх в розчин досліджуваної речовини і підрахунок кількості тест-організмів у фіксованому об'ємі суміші, тим, що добову культуру інфузорії *Stylonichia mytilus* або *Daphnia magna* вносять в мікроакваріум і додають розчин досліджуваної речовини, після адаптації тест-організмів підраховують початкову чисельність інфузорій, доводять об'єм суміші розчином досліджуваної речовини до половини мікроакваріума і витримують 45-90 хвилин, після чого вдруге підраховують чисельність інфузорій і по кількості тест-організмів, що вижили, оцінюють ступінь токсичності досліджуваної речовини.

У способі, що заявляється, використовується добова культура інфузорій *Stylonichia mytilus* або *Daphnia magna*, термін проведення біотестування значно скорочений. Вживаність інфузорій вираховують по формулі:

$$N = \left(\frac{N^2}{N_1} \right) \cdot 100, \text{ де:}$$

N - вживаність, %

N_1 - середня арифметична кількість інфузорій на початку дослідження (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

100 - коефіцієнт перерахунку у відсотки.

Приклад 1. Добову культуру інфузорій *Stylonichia mytilus* у кількості 0,02 см³, в якій міститься від 10 до 20 особин вносили в мікроакваріум, додавали 0,2 см³ розчину досліджуваної речовини - соку зі слив. Через 5 хв, після адаптації тест-організмів у розчині, здійснювали підрахунок початкової кількості інфузорій, яка склала 18 особин. Через 60 хв експозиції вдруге проводили підрахунок чисельності інфузорій. Так, при наявності у розчині, що досліджується, севину у кількості 1-10⁻⁵ мг/кг і більше - залишилося інфузорій 14 особин, фозалону у кількості 5-10⁻³ мг/кг і більше - залишилося 11 особин інфузорій. Чутливість *Stylonichia mytilus* відносно солей важких металів, таких, як кадмій, ртуть, свинець, складає від 0,05 до 0,2 ГДК.

Результати впливу різних токсикантів на *Stylonichia mytilus* наведені у таблиці 1.

Приклад 2. Добову культуру інфузорій *Daphnia magna* у кількості 0,02 см³, в якій міститься від 10 до 20 особин вносили в мікроакваріум, додавали 0,2 см³ розчину досліджуваної речовини - екстракту з кабачків. Через 5 хв, після адаптації тест-організмів у розчині, здійснювали підрахунок початкової кількості інфузорій, яка склала 11 особин. Через 60 хв експозиції вдруге проводили підрахунок чисельності інфузорій. Так, при наявності у розчині, що досліджується, фозалону у кількості 5-10⁻³ мг/кг і більше - інфузорій залишилося 8 особин. Чутливість *Daphnia magna* у відношенні солей важких металів, таких, як кадмій, ртуть, свинець, складає від 0,06 до 0,4 ГДК.

Результати впливу різних токсикантів на *Daphnia magna* наведені у таблиці 2.

Приклад 3. Добову культуру інфузорій *Stylonichia mytilus* у кількості 0,01 см³, розводили культуральною рідиною у кількості 0,01 см³, так, щоб в ній містилося не менше 10 особин, вносили в мікроакваріум, додавали 0,2 см³ розчину досліджуваної речовини - витяжки із зерна пшениці. Через 3 хв, після адаптації тест-організмів у розчині, здійснювали підрахунок початкової кількості інфузорій, яка склала 9 особин. Через 90 хв експозиції вдруге проводили підрахунок чисельності інфузорій (табл. 3). При наявності у розчині, що досліджується, севину у кількості 1-10⁻⁵ мг/кг і більше - залишилося інфузорій *Stylonichia mytilus* 7 особин, фозалону у кількості 5-10⁻³ мг/кг і більше - *Stylonichia mytilus* залишилося 6 особин. При наявності солей важких металів, таких, як кадмій - інфузорій залишилося 6 особин, ртуть - 5 особин, свинець - 7 особин, дихромату калію - 6 особин.

Таблиця 1

Результати дослідження впливу токсикантів на *Stylonichia mytilus*

№	Вид токсиканту	Допустимі рівні, не більше, мг/кг	Мінімальна доза, мг/кг	Виживаність
1	Пестициди:			
	севин	Не допускається	0,00001	78 %
		0,6		
	фозалон	Не допускається	0,005	61 %
		0,2		
2	Солі важких металів:			
	Cd ²⁺	≤0,03	0,005	71 %
	Hg ²⁺	≤0,02	0,001	55 %
	Pb ²⁺	≤0,4	0,060	76 %
3	Класичний мутаген K ₂ Cr ₂ O ₇	≤0,2	0,001	75 %

Таблиця 2

Результати дослідження впливу токсикантів на *Daphnia magna*

№	Вид токсиканту	Допустимі рівні, не більше, мг/кг	Мінімальна доза, мг/кг	Виживаність
1	Пестицид фозалон	Не допускається	0,09	73 %
		0,2		
	Солі важких металів			
1	Cd ²⁺	≤0,03	0,01	64 %
2	Hg ²⁺	≤0,04	0,003	58 %

Таблиця 3

Результати дослідження впливу токсикантів на *Stylonichia mytilus*

№	Вид токсиканту	Допустимі рівні, не більше, мг/кг	Мінімальна доза, мг/кг	Виживаність
1	Пестициди:			
	севин	Не допускається	0,00001	78%
		0,6		
	фозалон	Не допускається	0,005	67%
		0,2		
2	Солі важких металів:			
	Cd ²⁺	<0,03	0,005	67%
	Hg ²⁺	<0,02	0,001	56 %
	Pb ²⁺	<0,4	0,060	78%
3	Класичний мутаген K ₂ Cr ₂ O ₇	<0,2	0,001	67%