

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

О. В. Курбацька, аспірант,
О. Л. Оробченко, д-р вет. наук, с. н. с.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної
ветеринарної медицини»,
вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023, Україна.
toxy-lab@ukr.net

*Метою роботи була розробка експрес-методики визначення загальної токсичності кормів з використанням біолоюмінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum*. У статті наведено етапи розробки та алгоритм виконання експрес-методики. Розробка експрес-методу біотестування кормів з використанням фотобактерій у якості біосенсора полягала у визначенні можливості *Ph. phosphoreum* надавати адекватну оцінку у разі дії токсикантів, відпрацюванні пробопідготовки кормів до дослідження та встановленні оптимальної експозиції для визначення токсичності корму: оптимальна наважка корму складала 10,0 г; екстрагент етанол об'ємом 20,0 см³; спосіб екстракції – енергійне струшування (15-20) хв або екстрагування з періодичним перемішуванням протягом 24 год, а експозиція перед дослідженням – (20-25) хв.*

*Алгоритм експрес-методики визначення загальної токсичності кормів з використанням біолоюмінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum* полягає у наступному: 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 або залишають на 24 години, 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° етанол. 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).*

Ключові слова: БІОЛЮМІНЕСЦЕНЦІЯ, ЕКСПРЕС-МЕТОДИКА, ТОКСИЧНІСТЬ, ФОТОБАКТЕРІЇ, *PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM*.

EXPRESS METHOD FOR DETERMINATION OF GENERAL FEED TOXICITY USING BIOLUMINESCENT MICROORGANISMS *PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM*

O. V. Kurbatska, O. L. Orobchenko

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine" NAAS,
83, Pushkinskaya str., Kharkiv, 61023, Ukraine
toxy-lab@ukr.net

The aim of the work was to develop an express method for determining the general toxicity of feed using bioluminescent microorganisms *Photobacterium phosphoreum*. The article describes the stages of development and the algorithm for the implementation of the express method. The development of an express method for biotesting feeds using photobacteria as a biosensor was to determine the possibility of *Ph. phosphoreum* to provide an adequate assessment in the event of the action of toxicants, to test the preparation of feed samples for research and to establish the optimal exposure to determine the toxicity of the feed: the optimal feed weight was 10.0 g of extractant ethanol with a volume of 20.0 cm³; the method of extraction (vigorous shaking (15-20) min or extraction with periodic stirring for 24 hours, and the exposure before the study – (20-25) min.

The algorithm of the express method for determining the total toxicity of feed using bioluminescent microorganisms *Photobacterium phosphoreum* is as follows: a sample of feed weighing 10.0 g is crushed, transferred to a glass bottle, filled with 96° ethanol with a volume of 20 cm³ (this volume can be brought up to 50 cm³, so that alcohol completely covered the sample) and extracted with vigorous shaking (15-20) min. or left for 24 hours, then centrifuged at (1.5-2.0) thous. / min 10 min, after which the supernatant liquid is taken and examined on an EMILITE-1003 A luminometer. During testing, 0.02 cm³ of extract is added to the culture liquid in a volume of 1.0 cm³, the exposure time is noted and changes in the luminescence intensity are recorded on the device through (20-25) min. Under the same conditions, 96° ethanol was added as a control. Measurements are carried out sequentially or in pairs of control-experience, or at once all replicates of control samples, and then research ones. To obtain more reliable values, we recommend examining at least 4 replicates of samples (the number of replicates can be increased to 10).

Keywords: BIOLUMINESCENCE, RAPID TECHNIQUE, TOXICITY, PHOTOBACTERIA, *PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM*.

Оцінка токсичності забруднюючих речовин є невід'ємною частиною контролю якості та безпеки кормів тварин (Abraskova et al., 2013; Sidashova & Halak, 2015). На сьогодні при визначенні токсичності тієї чи іншої речовини все частіше звертаються до альтернативних методів, що передбачає використання в токсикологічному експерименті культур клітин, найпростіших та фотобактерій. Ефект біолюмінесценції бактерій дозволяє використовувати їх як заміну лабораторним тваринам або як додатковий тест для визначення впливу токсикантів (Girotti et al., 2008; Kasev et al., 2009; Cybul'skij & Sazykina, 2010; Woutersen et al., 2011; Ismailov & Alekserova, 2015).

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 (Menz et al., 2013; Fernández-Piñas et al., 2014; Ma et al., 2014; Sorokina & Zarubina, 2017).

Токсикологічне дослідження кормів і продукції тваринного походження, а також кормових добавок проводять з метою оцінки якості та подальшого безпечного їх використання. Одним із пріоритетних показників оцінки безпечності є токсичність, що обумовлена у кормах присутністю різноманітних хімічних сполук (мікотоксинів, пестицидів

та сполук невизначеної природи тощо). Висока чутливість бактерій, що світяться, та швидкість їх реакції на дію різноманітних за своєю природою токсикантів або сукупності токсикантів, дозволяє використовувати фотобактерії у якості тест-об'єкта для дослідження кормів тварин на токсичність (García et al., 2012; Lopez-Roldan et al., 2012). Проте, не зважаючи на досить широкий спектр токсикантів та сполук, вплив яких досліджено на фотолюмінесценцію бактерій, ці мікроорганізми зазвичай не використовувались для визначення загальної токсичності кормів і продукції тваринного походження. Хоча з використанням фотобактерій термін дослідження проби можна скоротити до 1,0-1,5 год, проти 4,0 год – на інфузоріях та 10 діб – на білих мишах. Тому експрес-методика визначення загальної токсичності є актуальною і дозволить швидко і з високою вірогідністю відповісти на питання токсичні чи ні корми або харчові продукти.

Тому метою нашої роботи була розробка експрес-методики визначення загальної токсичності кормів з використанням біолоюмінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum*.

Матеріали і методи. У роботі використовували ліофілізовану культуру *Photobacterium phosphoreum* (штам ІМВ В-7071; Sq3), люб'язно надану для досліджень завідувачем Депозитарію Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України канд. біол. наук Т. М. Головач, за що автори роботи виражають їй щире подяку. Під час розробки методики використовували стандартні мікробіологічні методи (висів культур фотобактерій на поживні середовища, підрахунок кількості мікробних клітин тощо). Культивування фотобактерій під час досліду здійснювали у термостаті за температури (26-28) °С у пробірках на рідкому та щільному поживному середовищі, розробленому в ННЦ «ІЕКВМ» (Orobchenko et al., 2020). Тест-об'єктом була зерноsumіш (ячмінь-пшениця 50:50). Токсикантом – мікотоксин зеараленон.

Вимірювання інтенсивності світіння люмінесцентних бактерій проводили на люмінометрі ЕМІLITE – 1003 А. Для кількісної оцінки впливу на люмінесценцію бактерій використовували індекс токсичності (Т), щоб зробити висновок про ступінь токсичності зразка.

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 % ($p < 0,05$).

Результати й обговорення. 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 *Photobacterium phosphoreum*. Установлено, що інтенсивність світіння не змінювалася при дії 0,05 і 0,075 мкг/мл, тоді як застосування доз, починаючи з 0,125 мкг/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 екстрагента 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 максимально допустимого рівня (Perelik, 2012) 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 струшуванням протягом (15-20) хв з подальшим центрифугуванням за (1,5-2) тис. об./хв протягом 10 хв. У результаті досліджень встановлено (рис. 1), за об'єму етанолу 20,0-70,0 см³ не встановлено вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Photobacterium 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 *Photobacterium 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.

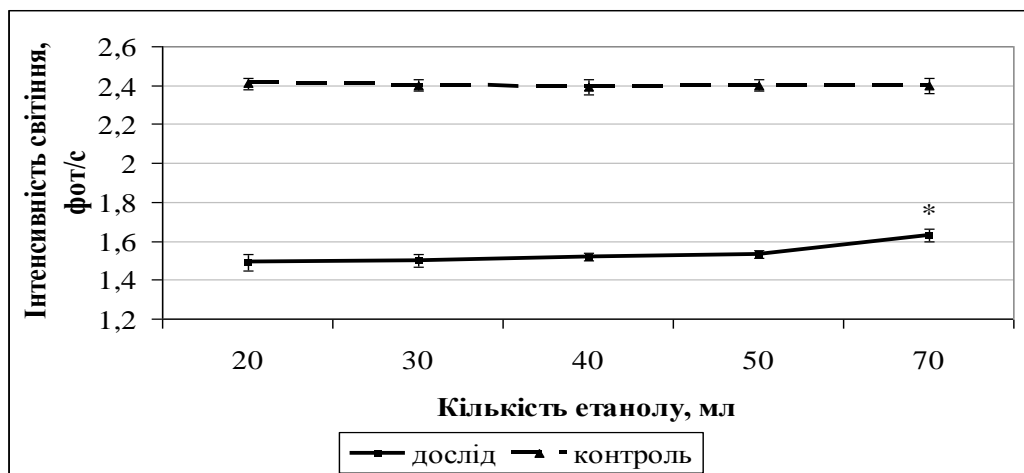


Рис. 1. Залежність інтенсивності світіння *Photobacterium phosphoreum* від об'єму екстрагенту (етанолу) ($M \pm m$, $n=10$), * – $p < 0,05$ – відносно 20,0 см³.

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 *Photobacterium phosphoreum*, яке стабілізувалося, починаючи з 20 хв експерименту і було стабільним до 30-ої хвилини досліді. Починаючи з 30 хв інтенсивність світіння *Photobacterium phosphoreum* поступово знижувалася до 60-ої 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. 2.

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.

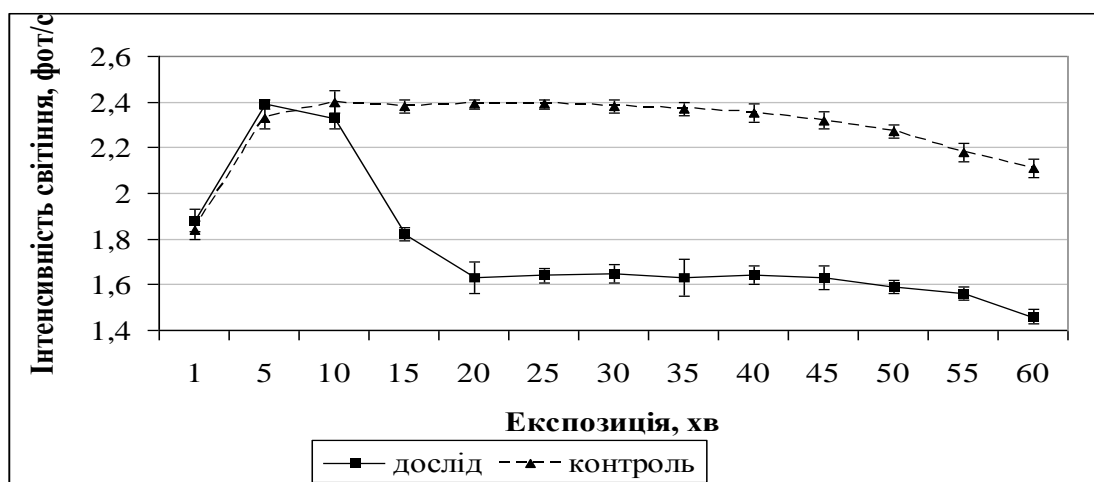


Рис. 2. Залежність інтенсивності світіння *Photobacterium phosphoreum* від експозиції після внесення екстракту досліджуваної проби в культуру ($M \pm m$, $n=10$).

Об'єм культуральної рідини обмежений об'ємом кювети люменометра (max 1,2 см³), тому для досліджень брали 1,0 см³ культуральної рідини та 0,02 см³ 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 пробєю. Зменшення інтенсивності світіння пропорційно токсичному ефекту.

Кількісна оцінка показників тест-реакції передається у вигляді безрозмірної величини – індексу токсичності „Т”, що дорівнює співвідношенню (формула 1):

$$T = \frac{I_0 - I}{I_0} \times 100, \quad (1)$$

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 2):

$$\gamma = \frac{I_0 - I}{I}, \quad (2)$$

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}).

EC₅₀ – ефективна концентрація (об'єм зразку), що викликає гасіння світіння фотобактерій на 50 %, у порівнянні з контролем, отже зразок сильно токсичний. EC₅₀ відповідає $\gamma = 1$. EC₂₀ – відповідно, ефективна концентрація (об'єм зразку), що викликає гасіння світіння біосенсору на 20 %, у порівнянні з контролем, отже зразок токсичний. Величини, менші EC₂₀, свідчать про те, що зразок безпечний.

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

Таблиця

Класифікація токсичності речовини за величиною T

Групи	Значення T	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 біоломінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum* виконується за таким алгоритмом: наважку корму, вагою 10,0 г подрібнюють, переносять до скляного флакона, 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. або залишають на 24 години, потім центрифугують при (1,5-2,0) тис. об./хв 10 хв, після чого відбирають надосадову рідину і досліджують на люмінометрі EMILITE – 1003 A. 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° етанол. 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).

Слід зазначити, що в літературі нами не знайдено даних з визначення токсичності з використанням фотобактерій саме кормів для тварин та використання етанолу в якості екстрагенту.

Люмінесцентний бактеріальний тест було комерціалізовано як тест Microtox® компанією Beckman Instruments, Inc., США у 1978 р. Після цього багато країн встановили офіційний стандарт аналізу пригнічення світіння фотобактерій, наприклад, французький стандарт (DIN 38412-1990), американський стандарт (ASTM D5660-1995), китайський стандарт (GB/T 15441-1995) та європейський стандарт (EN ISO 11348).

Вищевказані стандарти дозволяють визначати токсичність водного середовища, питних та стічних вод та виявити лише ті токсиканти, що розчинні у воді, тоді як ряд токсикантів таких, як деякі пестициди, мікотоксини ними не виявляються. Застосування у якості екстрагенту води є основним недоліком існуючих способів визначення токсичності з використанням фотобактерій, оскільки обмежує коло наявних токсикантів, зокрема актуальних для кормів та кормової сировини.

Заявлений нами спосіб запатентовано у відповідному порядку (Kurbatska & Orobchenko, 2021a) та враховує недоліки подібних методик і дозволяє визначати токсичність кормів за наявності більш широкого спектру токсикантів, які не екстрагуються водою, за рахунок використання іншого екстрагенту – етанолу, який має як ліпофільні, так і гідрофільні властивості. Слід також зазначити, що розроблену методику оформлено у вигляді науково-методичних рекомендацій та схвалено Науково-методичною радою Держпродспоживслужби (Kurbatska & Orobchenko, 2021b).

ВИСНОВКИ

1. Розробка експрес-методу біотестування кормів з використанням фотобактерій у якості біосенсора полягала у визначенні можливості *Ph. phosphoreum* надавати адекватну оцінку у разі дії токсикантів, відпрацюванні пробопідготовки кормів до дослідження та встановленні оптимальної експозиції для визначення токсичності корму: оптимальна наважка корму складала 10,0 г; екстрагент етанол об'ємом 20,0 см³; спосіб екстракції енергійне струшування (15-20) хв або екстрагування з періодичним перемішуванням протягом 24 год, а експозиція перед дослідженням – (20-25) хв.

2. Алгоритм експрес-методики визначення загальної токсичності кормів з використанням біolumінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum* полягає у наступному: 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. або залишають на 24 години, 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° етанол. 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. Розроблена методика біотестування може застосовуватися для експрес-оцінки та моніторингу токсичності кормів та кормової сировини.

Перспективи досліджень. Полягають у апробації та удосконаленні експрес-методики визначення токсичності з використанням біolumінесцентних мікроорганізмів *Ph. phosphoreum* відносно продукції тваринного походження.

References

Abraskova, S.V., Shashko, Yu.K., Shashko, M.N. (2013). *Biologicheskaya bezopasnost' kormov*. Minsk: Belaruskaya navuka, 257 p. [in Russian].

Cybul'skij, I.E. & Sazykina, M.A. (2010). *Novye biosensory dlya monitoringa toksichnosti sredy na osnove morskikh lyuminescentnyh bakterij*. *Priklad. biohim. i mikrobiol.* 46 (5).552-557. [in Russian].

Fernández-Piñas, F., Rodea-Palomares, I., Leganés, F., González-Pleiter, M., Angeles Muñoz-Martín, M. (2014). Evaluation of the ecotoxicity of pollutants with bioluminescent microorganisms. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 145. 65-135. doi: 10.1007/978-3-662-43619-6_3.

Garcia, A., Recillas. S., Sánchez, A., Font, X. (2012). The luminescent bacteria test to determine the acute toxicity of nanoparticle suspensions. *Methods Mol Biol.* 926. 255-9. doi: 10.1007/978-1-62703-002-1_18.

Girrotti, S., Maiolini, E., Bolelli, L., Ghini, S., Ferri, E., Barile, N., Medvedeva, S. (2008). Analytical techniques and bioindicators in environmental control: honeybees, mussels, bioluminescent bacteria. Rapid immunoassays for pesticide detection / In: *Soil Chemical Pollution, Risk Assessment, Remediation and Security*, L. Simeonov and V. Sargsyan (eds.), Springer Science + Business Media B.V., p. 327-347. doi:10.1007/978-1-4020-8257-3_29.

Ismailov, A.D. & Alekserova, L.E. (2015). *Fotobiosensory na osnove svetyashchihsya bakterij*. *Biohimiya.* 80. 6. 867-881. [in Russian].

Kacev, A.M., Abduramanova, E.R., Starodub, N.F. (2009). Immobilizaciya biolyuminescentnykh bakterij na neorganicheskikh nositelyah i ochenka ih primenimosti dlya biotestirovaniya. *Biotechnologia Acta*. 2. 3. 74-79. [in Russian].

Kurbatska, O.V., Orobchenko, O.L. (2021a). Deklaratsiinyi patent Ukrainy na korysnu model № 147856 MPK (51) G01N 33/02, S12Q 1/02. Sposib vyznachennia zahalnoi toksychnosti kormiv za dopomohoiu fotobakterii *Photobacterium Phosphoreum* /; zaiavnyk i vlasnyk patentu Natsionalnyi naukovyi tsentr «Instytut eksperymentalnoi i klinichnoi veterynarnoi medytsyny»; zaiavl. 14.01.2021 – u 2021 00129; opubl. 17.06.2021, biul. 24. 2. [in Ukrainian].

Kurbatska, O.V. & Orobchenko, O.L. (2021b). Naukovo-metodychni rekomendatsii «Ekspres-metodyka vyznachennia zahalnoi toksychnosti kormiv z vykorystanniam fotoluminescentnykh mikroorhanizmiv *Ph. rhosphoreum*» rozghlianuto ta zatverdzheno na zasidanni Metodychnoi komisii Natsionalno-naukovoho tsentru «Instytut eksperymentalnoi i klinichnoi veterynarnoi medytsyny»: protokol № 4 vid 29 zhovtnia 2020 r. i skhvaleno Naukovo-metodychnoiu radoiu Derzhprodsposhyvsluzhby: protokol № 1 vid 12 travnia 2021. 24. [in Ukrainian].

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. *Sci Total Environ*. 440. 307-13. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.05.043.

Ma, X.Y., Wang, X.C., Ngo, H.H., Guo, W., Wu, M.N., Wang, N. (2014). Bioassay based luminescent bacteria: interferences, improvements, and applications. *Sci Total Environ*. 468-469. 1-11. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.08.028.

Menz, J., Schneider, M., Kümmerer, K. (2013). Toxicity testing with luminescent bacteria--characterization of an automated method for the combined assessment of acute and chronic effects. *Chemosphere*. 93(6). 990-6. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.05.067

Orobchenko, O.L., Kurbatska, O.V., Kutsan, O.T., Kalashnyk, N.V. (2020). Deklaratsiinyi patent Ukrainy na korysnu model № 143070 MPK (51) S12N 1/20. Pozhyvne seredovyshe dlia kultyvuvannia fotoluminescentnykh mikroorhanizmiv *Photobacterium Phosphoreum*. / zaiavnyk i vlasnyk patentu Natsionalnyi naukovyi tsentr «Instytut eksperymentalnoi i klinichnoi veterynarnoi medytsyny»; zaiavl. 21.01.2020 – u 2020 00341; opubl. 10.07.2020, biul. 13/2020. 4. [in Ukrainian].

Perelik maksimalno dopustymykh rivniv nebazhanykh rehovyn u kormakh ta kormovii syrovyni dlia tvaryn, zatverdzhenyi Ministerstvom aharnoi polityky ta prodovolstva Ukrainy (2012). 19.03.2012, Nakaz № 131, zareiestrovano v Ministerstvi yustyttsii Ukrainy 5 kvitnia 2012 r., № 503/20816 [Elektronnyi resurs] – 2012. – Rezhym dostupu: <http://zakon1.rada.gov.ua/laws/show/z0503-12>.

Sidashova, S.A. & Halak, V.I. (2015). Ekspres-biotestirovanie – prakticheskij instrument optimizacii kormleniya svinej. Sbornik nauchnykh statej po materialam Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoi konferencii, posvyashchennoj 85-letnemu yubileyu so dnya osnovaniya fakul'teta tekhnologicheskogo menedzhmenta (zooinzhenernogo). Perspektivy i dostizheniya v proizvodstve i pererabotke sel'skohozyajstvennoj produkcii. Stavropol', 16-17 aprelya. Stavropol'skij gosudarstvennyj agrarnyj universitet. 2. 93-99. [in Russian].

Sorokina, E.V. & Zarubina, A.P. (2017). Biotestirovanie s ispolzovaniem bakterial'nogo lyuminescentnogo testa : dostoinstva i usovershenstvovanie metoda. *Uspekhi sovremennoj biologii*. M. : NAUKA, №6. C. 613-621. [in Russian].

Woutersen, M., Belkin, S., Brouwer, B., van Wezel, A.P., Heringa, M.B. (2011). Are luminescent bacteria suitable for online detection and monitoring of toxic compounds in drinking water and its sources. *Anal Bioanal Chem*. 400(4). 915-929. doi: 10.1007/s00216-010-4372-6.