

Науковий вісник Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.

Серія: Ветеринарні науки

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies.

Series: Veterinary sciences

ISSN 2518–7554 print

ISSN 2518–1327 online

doi: 10.32718/nvlvet10624

<https://nvlvet.com.ua/index.php/journal>

UDC 619:615.9:636.085.34:579.843.4.083.13:546.19:546.47/.48:546.56:546.815

Toxicological evaluation of feeds with different levels of heavy metals using luminescent microorganisms *Photobacterium phosphoreum*

O. V. Kurbatska, O. L. Orobchenko✉

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

Article info

Received 28.04.2022

Received in revised form

30.05.2022

Accepted 31.05.2022

National Scientific Center
Institute of Experimental and
Clinical Veterinary Medicine,
Pushkinska Str., 83, Kharkiv,
61023, Ukraine.
Tel.: +38-097-379-72-13
E-mail: toxi-lab@ukr.net

Kurbatska, O. V., & Orobchenko, O. L. (2022). Toxicological evaluation of feeds with different levels of heavy metals using luminescent microorganisms *Photobacterium phosphoreum*. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences, 24(106), 158–167. doi: 10.32718/nvlvet10624

Assessment of the toxicity of pollutants is an integral part of the quality and safety control of the animal feed. Today, when determining the toxicity of a particular substance, alternative methods are increasingly being used, which involve using cell cultures, protozoa, and photobacteria in a toxicological experiment. The bioluminescence effect of bacteria makes it possible to use them as a substitute for laboratory animals or as an additional test to determine the effect of toxicants, which significantly reduces the cost of work due to the simplicity and speed of research, high sensitivity, and reproducibility. This work aimed to conduct a toxicological assessment of feeds with different levels of heavy metals using the luminescent microorganisms *Photobacterium phosphoreum*. Under the study of heavy metals, corn grits, which did not possess toxic properties, were used as a “matrix.” Heavy metals were used in the form of State standard samples: Arsenic, Cadmium, Lead, Mercury, Copper, and Zinc. Before adding heavy metals to the feed, the “matrix” was previously examined for their content (background). Toxicants were added to the “matrix” in different concentrations, taking into account the “background” indicators (5 series each), which were prepared by diluting in distilled water, depending on the maximum residue limits (MRL). As a result of the work, the possibility of using luminescent microorganisms *Photobacterium phosphoreum* (strain IMV B-7071; Sq3) was established for rapid toxicological evaluation of feeds with different levels of heavy metals based on the decrease in the intensity of the glow. However, if for Cd, Hg, Zn, Cu under the conditions of the study of feed with the content of heavy metals at the MRL (0.4; 0.1; 25.0 and 120.0 mg/kg, respectively), the feed was characterized as “non-toxic,” then for Pb and As according to the MRL (5.0 and 0.5 mg/kg, respectively), the feed was characterized as “toxic,” which indicates the need for further studies on the toxicological characteristics of heavy metals in the body of laboratory and productive animals, possibly with a further revision (downward) of the MRL of the relevant pollutants in feed in Ukraine.

Key words: bioluminescence, feed, heavy metals, toxicity, *Photobacterium phosphoreum*.

Токсикологічна оцінка кормів із різними рівнями важких металів з використанням люмінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum*

O. V. Курбацька, O. Л. Оробченко✉

Національний науковий центр “Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини”, м. Харків, Україна

Оцінка токсичності забруднюючих речовин є невід’ємною частиною контролю якості та безпеки кормів тварин. На сьогодні у разі визначення токсичності тієї чи іншої речовини все частіше звертаються до альтернативних методів, що передбачає використання в токсикологічному експерименті культур клітин, найпростіших та фотобактерій. Ефект біоломінесценції бактерій дозволяє використовувати їх як заміну лабораторних тварин або як додатковий тест для визначення впливу токсикантів, що значно знижує вартість виконання робіт завдяки простоті та швидкості дослідження, високій чутливості та відтворюваності. Метою даної роботи стало провести токсикологічну оцінку кормів із різними рівнями важких металів з використанням люмінес-

центних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum*. За умов дослідження важких металів як “матриці” було використано кукурудзяну крупу, що не володіла токсичними властивостями. Важкі метали використовували у формі Державних стандартних зразків, а саме: Арсен, Кадмій, Плюмбум, Меркурій, Купрум і Цинк. Перед внесенням важких металів у корм попередньо досліджували “матрицю” на їх вміст (фон). Токсиканти вносили в “матрицю” у різних концентраціях з урахуванням “фонових” показників (по 5 серій), що готували шляхом розведення в дистильованій воді, залежно від максимально допустимого рівня. В результаті виконання роботи встановлено можливість використання люмінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum* (штам ІМВ В-7071; Sq3) для експресної токсикологічної оцінки кормів з різними рівнями важких металів, що базується на зниженні інтенсивності світіння. Проте, якщо для Cd, Hg, Zn, Cu за умов дослідження корму з вмістом важких металів на рівні МДР (0,4; 0,1; 25,0 і 120,0 мг/кг відповідно) корм характеризувався як нетоксичний, то для Pb і As за МДР (5,0 і 0,5 мг/кг відповідно) корм характеризувався як токсичний, що свідчить про необхідність подальших досліджень з вивчення токсикологічної характеристики важких металів в організмі лабораторних і продуктивних тварин, можливо з подальшим переглядом (у бік зниження) максимальних допустимих рівнів відповідних забруднювачів у кормах в Україні.

Ключові слова: біоломінесценція, комбікорми, важкі метали, токсичність, *Photobacterium phosphoreum*.

Вступ

У зв'язку з інтенсивним зростанням і розвитком промисловості, транспорту, індустріалізацією і хімізацією сільського господарства, прискоренням науково-технічного прогресу за останні роки значно збільшилось і продовжує наростати надходження в навколишнє середовище важких металів техногенного походження (Hrynova & Kryshchop, 2021).

У наукових роботах, які присвячені проблемам забруднення природного довкілля і екологічного моніторингу, нині до важких металів зараховують більше ніж 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. (Pouret et al., 2021). Проте, відповідно до міжнародних вимог, розроблених об'єднаною комісією ФАО/ВООЗ (CF/14 INF/1, 2021), необхідний насамперед 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 (Bashchenko et al., 2020; Lavryshyn & Guttyj, 2020; Dmukhalska & Korda 2021; Slobodian et al., 2021).

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 (Zhang et al., 2012; Eskandari & Pakfetrat, 2014; Hejna et al., 2019; Kabeer et al., 2021). 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.

Оцінка токсичності забруднюючих речовин є невід'ємною частиною контролю якості та безпеки кормів тварин. На сьогодні у разі визначення токсичності тієї чи іншої речовини все частіше звертаються до

альтернативних методів, що передбачає використання в токсикологічному експерименті культур клітин, найпростіших та фотобактерій. Ефект біоломінесценції бактерій дозволяє використовувати їх як заміну лабораторних тварин або як додатковий тест для визначення впливу токсикантів, що значно знижує вартість виконання робіт завдяки простоті та швидкості дослідження, високій чутливості та відтворюваності (Menz et al., 2013; Fernández-Piñas et al., 2014; Ma et al., 2014; Kurbatska & Orobchenko, 2021a).

Нашими попередніми дослідженнями така методика була розроблена, проте перед впровадженням у практику ветеринарної медицини необхідно було переконаватися в можливості її застосування щодо кормів з різними рівнями токсикантів (в тому числі й важких металів), тому метою даної роботи стало провести токсикологічну оцінку кормів із різними рівнями важких металів з використанням люмінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum*.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили у лабораторії токсикологічного моніторингу Національного наукового центру “Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини” (м. Харків).

Для виконання даного завдання як забруднювачі кормів були використані важкі метали, які регламентовані Переліком максимально допустимих рівнів небажаних речовин у кормах та кормовій сировині для тварин (Наказ №131 від 19.03.12 р.) зі змінами від 11.10.2017 Наказ № 550 (On approval of the List of maximum permissible levels..., 2017).

За умов дослідження важких металів як “матриці” було використано кукурудзяну крупу, що не володіла токсичними властивостями. Важкі метали використовували у формі Державних стандартних зразків (ДСЗ), а саме: Арсен, Кадмій, Плюмбум, Меркурій, Купрум і Цинк. Перед внесенням важких металів у корм попередньо досліджували “матрицю” на їх вміст (фон). Токсиканти вносили в “матрицю” у різних концентраціях з урахуванням “фонових” показників (по 5 серій), що готували шляхом розведення в дистильованій воді, залежно від максимально допустимого рівня (МДР) (таблиця 1).

Наважку контрольної і дослідних “матриць” масою 10,0 г вносили до скляних флаконів, у дослідні проби вносили відповідну кількість ДСЗ важких металів і додавали 96° етанол об'ємом 20,0 см³ та ект-

рагували, залишаючи на 24 години, потім центрифугували при (1,5–2,0) тис. об./хв 10 хв, після чого відбирали надосадову рідину, яку в об'ємі 0,02 см³ додавали до (попередньо підготовленої і внесеної у кювету люмінометра) культуральної рідини в об'ємі 1,0 см³.

Як тест-культуру використовували ліофілізовану культуру *Photobacterium phosphoreum* (штам ІМВ В-7071; Sq3) (*Ph. phosphoreum*), отриману із Депозита-

рію мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного Національної академії наук України (м. Київ). Культивування фотобактерій під час досліду здійснювали у термостаті за температури (27 ± 1) °С у пробірках на рідкому та щільному поживному середовищі, розробленому на основі наших попередніх досліджень (Orobchenko et al., 2020), протягом (22 ± 2) год.

Таблиця 1

Важкі метали, які підлягали дослідженню щодо інтенсивності світіння люмінесцентних бактерій

| Назва забруднювача | Досліджувані рівні (доза), мг/кг корму | МДР, мг/кг корму* |
|--------------------|----------------------------------------|-------------------|
| 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 |
| Купрум | 2,5; 5,0; 25,0; 125,0; 250,0 | 25,0 |
| Цинк | 12,0; 24,0; 120,0; 600,0; 1200,0 | 120,0 |

* – відповідно до (On approval of the List of maximum permissible levels..., 2017)

Інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* досліджували на люмінометрі ЕМІЛІТЕ – 1003 А (Біохіммек, російська федерація), спектральний діапазон люмінометра становив 350–950 нм. Під час тестування фіксували час експозиції та реєстрували зміни інтенсивності люмінесценції на приладі (через 20–25 хв). Вимірювання проводили парами контроль–дослід. Для отримання вірогідних значень досліджувати по 6 повторностей контрольних і дослідних проб.

Для кількісної оцінки ступеня токсичності зразка щодо впливу різних рівнів важких металів на люміне-

сценцію бактерій *Ph. phosphoreum* використовували індекс токсичності (Т) – безрозмірну величину, що дорівнює співвідношенню (формула 1):

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

де, I₀ та I – відповідно інтенсивність світіння контролю й досліду,

100 – коефіцієнт перерахунку.

Інтерпретували дані за трьома граничними рівнями індексу токсичності (таблиця 2).

Таблиця 2

Класифікація токсичності речовини за величиною Т

| Рівень індексу токсичності | Значення Т | Висновок про ступінь токсичності |
|----------------------------|---------------|----------------------------------|
| 1 | менше ніж 20 | зразок нетоксичний |
| 2 | від 20 до 50 | зразок токсичний |
| 3 | більше ніж 50 | зразок сильно токсичний |

Індекс токсичності “Т” відображає концентрацію важкого металу, яка викликає пригнічення світіння біосенсора (бактерії *Ph. phosphoreum*) за фіксованого часу експозиції досліджуваного зразка. Як верхній граничний показник визначено зниження інтенсивності світіння бактерій на 50 % порівняно з контролем, що відображається індексом токсичності 50 і дозволяє зарахувати зразки з індексом токсичності 50 і вище до категорії “високотоксичні”. Нижня межа індексу токсичності становить 20, що означає зниження світіння бактерій на 20 % порівняно з контролем і дозволяє зарахувати зразки з індексом токсичності 20 і нижче до “нетоксичних”. Усі значення “Т” від 20 до 50 дозволяють класифікувати зразки як “токсичні”, у яких, якщо правильно виконати розбавлення з нетоксичним аналогом, токсичність може бути зменшена.

Для отримання більш вірогідних даних дослідження були проведені у 6-ти повторностях. Результати даних досліджень дозволили розробити науково-методичні рекомендації (Kurbatska & Orobchenko, 2021b).

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 досліджень

Вплив Арсену на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* залежно від концентрації відображено на [рисунок 1](#).

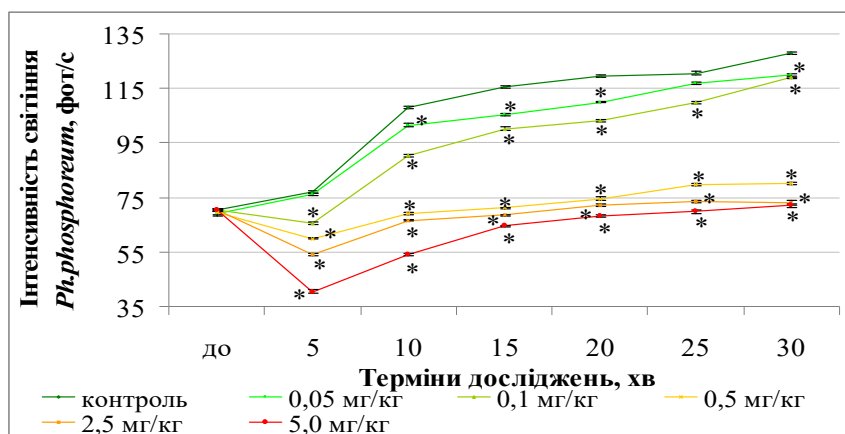


Рис. 1. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз Арсену ($M \pm m$, $n = 6$, * – $P < 0,05$ – щодо контролю)

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*, тимчасом 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 % (рис. 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 0,05; 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 невірогідно (2,9 %), тимчасом 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. 1).

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 склав 35,8; 39,3 і 42,6. Отримані дані дозволяють стверджувати, що корми з вмістом Арсену менше ніж 0,05 до 0,1 мг/кг включно є нетоксичними (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 на [рисунку 2](#). За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями Кадмію до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення спостерігали зниження інтенсивності світіння щодо 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 %.

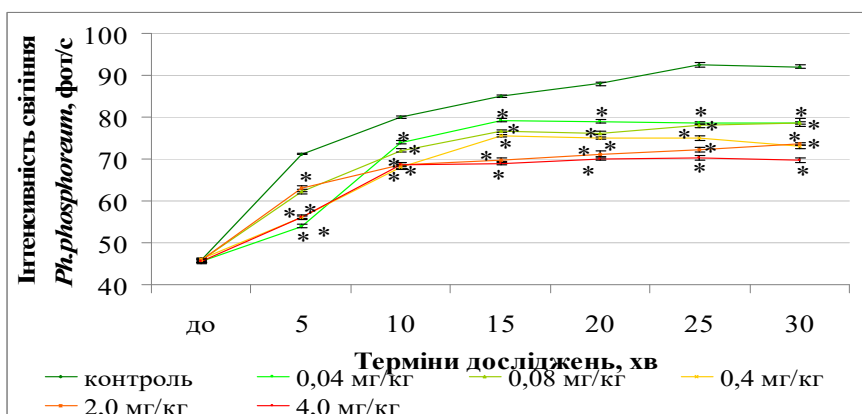


Рис. 2. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз Кадмію ($M \pm m$, $n = 6$, * – $P < 0,05$ – щодо контролю)

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 % (рис. 2).

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. 2).

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 ніж 0,04 до 0,4 мг/кг включно є нетоксичними (індекс токсичності менше ніж 20), за вмісту від 2,0 до 4,0 мг/кг – токсичними (індекс токсичності від 20 до 50).

сичності від 20 до 50).

Вплив Плюмбуму на люмінесценцію *Ph. phosphoreum* залежно від концентрації відображено на рисунку 3. За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями Плюмбуму 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 %, тимчасом як за рівня мікроелементу 5,0 мг/кг корму інтенсивність світіння була нижчою за контроль (невірогідно 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).

На 10 хв експерименту за рівня Плюмбуму 0,5 мг/кг в кормі спостерігали посилення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* (проте воно було невірогідним), а за рівня 1,0 мг/кг – зниження, яке також було невірогідним, тимчасом 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 ($P < 0,05$) (рис. 3).

На 15 хв досліді на всіх рівнях реєстрували зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* (невірогідне 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 щодо контролю (рис. 3).

На 20 хв досліді за рівня Плюмбуму в кормі 0,5 мг/кг не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, тимчасом 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 ($P < 0,05$) (рис. 3).

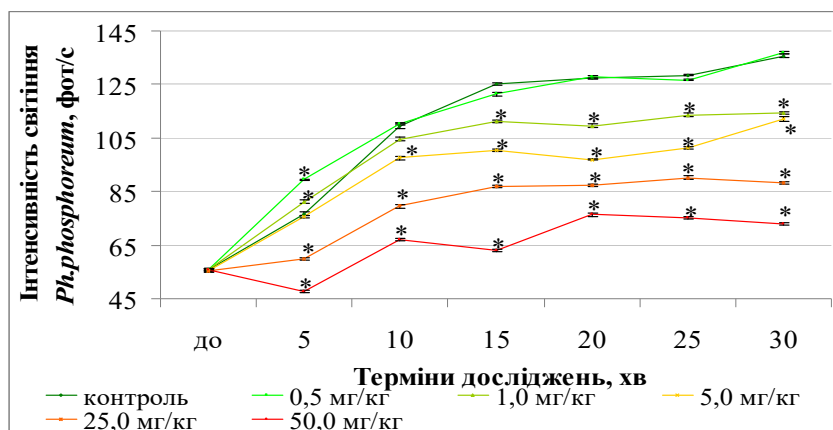


Рис. 3. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз Плюмбуму ($M \pm m, n = 6, * - P < 0,05$ – щодо контролю)

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 щодо контролю (рис. 3).

На 30 хв досліді за рівня Плюмбуму в кормі 0,5 мг/кг не спостерігали вірогідних відхилень інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum*, тимчасом 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 щодо контролю ($P < 0,05$) (рис. 3).

Відсоток зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* відповідав індексу токсичності (Т), що дозволило провести токсикологічну оцінку корму з різними рівнями Плюмбуму. 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 Плюмбуму менше ніж 0,5 до 1,0 мг/кг включно є нетоксичними (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 4. За умов внесення екстрактів кормів з різними рівнями Меркурію до тест-культури *Ph. phosphoreum* на 5 хв після внесення спостерігали зниження інтенсивності світіння щодо 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 %.

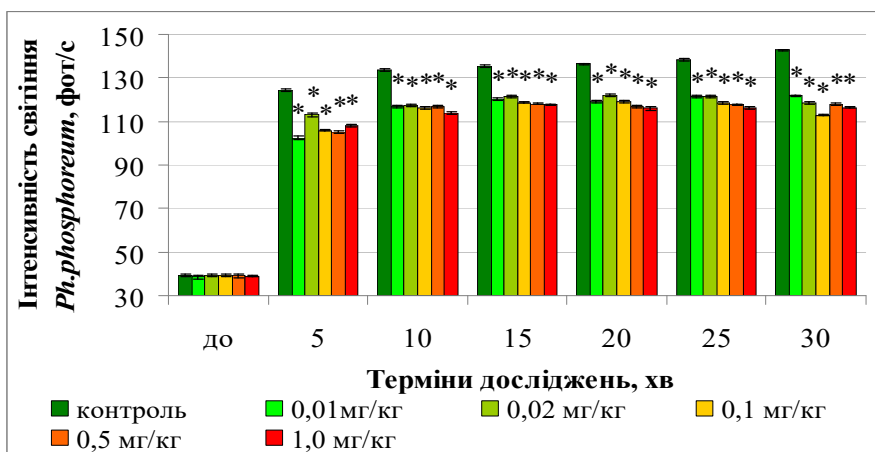


Рис. 4. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз Меркурію ($M \pm m$, $n = 6$, * – $P < 0,05$ – щодо контролю)

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 (рис. 4).

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. 4).

На 25 хв після внесення спостерігали зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* щодо 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 % (рис. 4).

І на останньому терміні досліджень спостерігали зниження інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* щодо 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. 4).

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 серед-

ньому 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 ніж 0,01 до 0,1 мг/кг включно є нетоксичними (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* залежно від концентрації відображено на рисунку 5. 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 виявляли 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. 5).

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 % (рис. 5).

На 20 хв експерименту за рівня Купруму в кормі 2,5 мг/кг не виявляли 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 % ($P < 0,05$) (рис. 5).

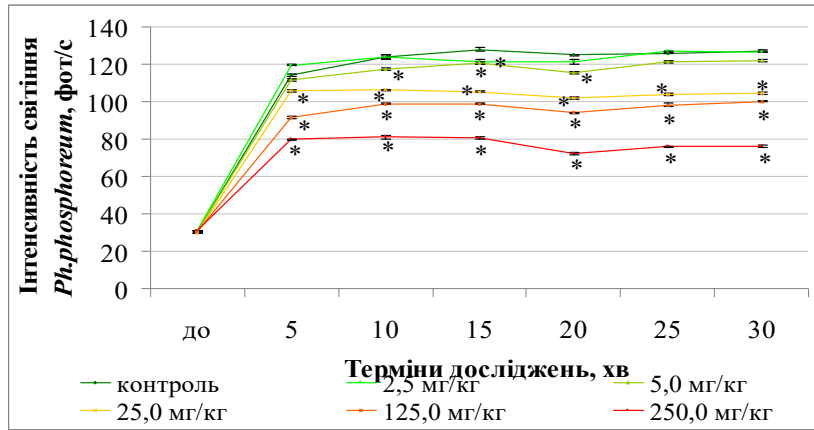


Рис. 5. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз Купруму ($M \pm m$, $n = 6$, * – $P < 0,05$ – щодо контролю)

На 25 хв досліджу за рівнів Купруму в кормі 2,5 і 5,0 мг/кг не виявляли 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 виявляли 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. 5).

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 ніж 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* залежно від концентрації відображено на рисунку 6. 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 % ($P < 0,05$), тимчасом як за рівня Цинку в кормі 1200,0 мг/кг світіння *Ph. phosphoreum* не виявляли взагалі. Варто зазначити, що світіння *Ph. phosphoreum* за рівня Цинку в кормі 1200,0 мг/кг не спостерігали до кінця досліджу (рис. 6).

На 10 хв досліджу 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 % ($P < 0,05$), тимчасом як за рівня Цинку в кормі 600,0 мг/кг світіння *Ph. phosphoreum* не виявляли взагалі. Варто зазначити, що світіння *Ph. phosphoreum* за рівня Цинку в кормі 600,0 мг/кг не спостерігали до кінця досліджу (рис. 6).

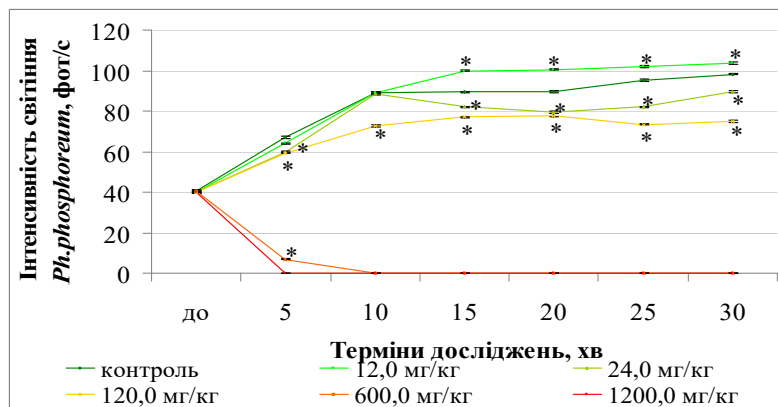


Рис. 6. Динаміка інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* за умов унесення в корм різних доз Цинку ($M \pm m$, $n = 6$, * – $P < 0,05$ – щодо контролю)

На 15 хв експерименту за рівня Цинку 12,0 мг/кг корму спостерігали вірогідне підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* (на 11,7 %) щодо контро-

лю, 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. 6).

На 20 хв експерименту за рівня Цинку 12,0 мг/кг корму спостерігали вірогідне підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* (на 12,0 %) щодо контролю, а за рівнів 24,0 і 120,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 11,7 і 13,1 % ($P < 0,05$) (рис. 6).

На 25 хв досліду за рівня Цинку 12,0 мг/кг корму спостерігали вірогідне підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* (на 7,1 %) щодо контролю, а за рівнів 24,0 і 120,0 мг/кг інтенсивність світіння була нижчою за контроль на 13,9 і 22,8 % ($P < 0,05$) (рис. 6).

На 30 хв експерименту за рівня Цинку 12,0 мг/кг корму спостерігали вірогідне підвищення інтенсивності світіння *Ph. phosphoreum* (на 5,6 %) щодо 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. 6).

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 ніж 12,0 до 120,0 мг/кг включно є нетоксичними (індекс токсичності менше 20), а за вмісту Цинку від 600,0 до 1200,0 мг/кг – сильно токсичними (індекс токсичності більше 50).

Обговорення

Варто зазначити, що біоломінесценція вже використовується у світовій практиці оцінки впливу важких металів на об'єкти природного середовища (це в основному водні екосистеми) (Ranjan et al., 2012; Zeb et al., 2017; Adnan et al., 2021; Yang et al., 2022).

Окрім цього, дослідниками встановлено різну чутливість штамів фотобактерій щодо важких металів. Так, через 30 хв 50 % зниження інтенсивності світіння штаму *Vibrio qinghaiensis* Q67 в досліджуваній воді відбувалося за концентрації Арсену на рівні $4,674 \pm 0,013$ мг/л, *Photobacterium phosphoreum* Т3 і *Photobacterium 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 (Yang et al., 2022). У інших дослідженнях (He et al., 2015) 50 % зниження інтенсивності світіння штам *Photobacterium phosphoreum* Т3 набував через 15 хв за концентрацій Арсену залежно від рН від 0,895 до 4,396 мг/л. Якщо порівняти отримані нами дані щодо впливу Арсену протягом 30 хв на інтенсивність світіння *Photobacterium phosphoreum* (штам ІМВ В-7071; Sq3), то отримаємо таке: 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 (Yang et al., 2022) 50 % зниження інтенсивності світіння штаму *Vibrio qinghaiensis* Q67 в досліджуваній воді відбувалося за концентрації Кадмію на рівні $11,137 \pm 0,162$ мг/л, *Photobacterium phosphoreum* Т3 і *Photobacterium phosphoreum* 502 на рівні $4,162 \pm 0,082$ і $5,634 \pm 0,168$ мг/л відповідно та штам *Vibrio fischeri* – на рівні $46,827 \pm 1,529$ мг/л. Поряд з цим Qu et al. (2013) встановили 50 % зниження інтенсивності світіння штам *Photobacterium phosphoreum* Т3 набував через 15 хв за концентрацій Кадмію залежно 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 (Yang et al., 2022) 50 % зниження інтенсивності світіння штаму *Vibrio qinghaiensis* Q67 в досліджуваній воді відбувалося за концентрації Плюмбуму на рівні $5,921 \pm 0,043$ мг/л, *Photobacterium phosphoreum* Т3 і *Photobacterium 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 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), проте узгоджуються з даними Lopez-Roldan et al. (2012).

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) 50 % зниження інтенсивності світіння штаму *Vibrio qinghaiensis* Q67 в досліджуваній воді відбувалося за концентрації Меркурію на рівні $0,911 \pm 0,005$ мг/л, *Photobacterium phosphoreum* Т3 і *Photobacterium phosphoreum* 502 на рівні $0,696 \pm 0,008$ і $1,358 \pm 0,043$ мг/л відповідно та штам *Vibrio fischeri* – на рівні $0,771 \pm 0,009$ мг/л. Тоді як Wang et al. (2014) отримали на порядок нижчі результати концентрацій Меркурію щодо 50 % зниження інтенсивності світіння фотобак-

терій – 0,0661–0,0831 мг/л. Тобто отримані нами дані узгоджуються з даними (Yang et al., 2022), проте є вищими за показники (Wang et al., 2014).

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 складала 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) 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) за рівня Купруму 90,0 мг/л зниження інтенсивності світіння фотобактерій становило 62,6 % за 30 хв досліду. За даними (Lopez-Roldan et al., 2012), 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 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 300,0 і 600,0 мг/л. Відповідно до даних (Elder, 1990), 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) 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.

Варто 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.

Висновки

Досліджено вплив різних рівнів важких металів на інтенсивність світіння *Ph. phosphoreum* (штам ІМВ В-7071; Sq3) та надана токсикологічна оцінка кормам за відсотком зниження інтенсивності світіння, що дозволяє використовувати даний тест під час токсикологічної оцінки кормів забруднених важкими металами. Корми з вмістом Арсену менше ніж 0,05 до 0,1 мг/кг, Кадмію менше ніж 0,04 до 0,4 мг/кг включно, Плюмбуму менше ніж 0,5 до 1,0 мг/кг включно, Меркурію менше ніж 0,01 до 0,1 мг/кг включно, Купруму менше ніж 2,5 до 25,0 мг/кг включно та Цинку менше ніж 12,0 до 120,0 мг/кг включно характеризувалися як нетоксичні. Корми з вмістом Арсену від 0,5 до 5,0 мг/кг, Кадмію від 2,0 до 4,0 мг/кг, Плюмбуму від 5,0 до 50,0 мг/кг, Меркурію від 0,5 до 1,0 мг/кг, Купруму від 125,0 до 250,0 мг/кг характеризувалися як токсичні, тимчасом як

корми з вмістом Цинку від 600,0 до 1200,0 мг/кг характеризувалися як сильно токсичні.

Перспективи подальших досліджень. Провести токсикологічну оцінку кормів із різними рівнями мікроелементів з використанням люмінесцентних мікроорганізмів *Photobacterium phosphoreum*.

Подяка. Автори висловлюють щире подяку Головач Тетяні Миколаївні, кандидату біологічних наук, завідувачу Депозитарію мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного Національної академії наук України за люб'язно наданий для дослідження штам *Photobacterium phosphoreum* (ІМВ В-7071; Sq3).

Відомості про конфлікт інтересів

Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів.

References

- 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. DOI: 10.3390/ijerph18126644.
- 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. DOI: 10.15421/2020_276.
- 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. URL: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspac e.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FC X-735-14%252FINFO-DOC%252FCF14_INF01x.pdf.
- 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. DOI: 10.11603/mcch.2410-681X.2021.i4.12729.
- Elder, J. F. (1990). Applicability of ambient toxicity testing to national or regional water-quality assessment. (U.S. Geological Survey circular, 1049, 60. DOI: 10.3133/cir1049.
- Eskandari, M. H., & Pakfetrat, S. (2014). Aflatoxins and heavy metals in animal feed in Iran. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 7(3), 202–207. DOI: 10.1080/19393210.2013.876675.
- 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.

- 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. DOI: 10.1002/clen.201400124.
- 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. DOI: 10.1080/1828051X.2019.1642806.
- Hrynova, Y. G., & Kryshchok, Y. A. (2021). Heavy metals pollution problems and ways to overcome them. *Engineering of nature management*, 1(19), 111–119. DOI: 10.37700/enm.2021.1(19).111-119 (in Ukrainian).
- 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. DOI: 10.1080/19338244.2020.1799182.
- Kurbatska, O. V., & Orobchenko, O. L. (2021a). Express method for determination of general feed toxicity using bioluminescent microorganisms *Photobacterium phosphoreum*. *Scientific and Technical Bulletin of State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medical Products and Fodder Additives and Institute of Animal Biology*, 22(2), 217–224. DOI: 10.36359/scivp.2021-22-2.24.
- Kurbatska, O. V., & Orobchenko, O. L. (2021b). Scientific and methodological recommendations “Express methodology for determining the general toxicity of feed using photoluminescent microorganisms *Ph. Phosphoreum*” was reviewed and approved at a meeting of the Methodological Commission of the National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”: protocol No. 4 dated October 29, 2020 and approved by the Scientific and Methodological Council of the State Food and Consumer Service: protocol No. 1 dated May 12, 2021. Kharkiv: Style-Izdat. 24.
- 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. DOI: 10.31210/visnyk2020.02.31.
- 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. 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), 990–996. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.05.067.
- On approval of the List of maximum permissible levels of undesirable substances in feed and feed raw materials for animals of the Ministry of Agrarian Policy of Ukraine; Order, List dated March 19, 2012 No. 131 as amended on October 11, 2017 Order No. 550). URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0503-12#Text> (in Ukrainian).
- Orobchenko, O. L., Kurbatska, O. V., Kutsan O. T., & Kalashnik N. V. (2020). Nutrient medium for the cultivation of photoluminescent microorganisms *Photobacterium Phosphoreum*. Declaratory patent of Ukraine for a utility model № 143070 IPC (51) C12N 1/20; applicant and patent holder National Research Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”; stated 21.01.2020 (u 2020 00341); publ. 10.07.2020, 13/2020. 4 (in Ukrainian).
- 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. DOI: 10.1139/f93-250.
- Pourret, O., Bollinger, J. C., & Hursthouse, A. (2021). Heavy Metal: a misused term?. *Acta Geochimica*, Springer, 40, 466–471. DOI: 10.1007/s11631-021-00468-0.
- 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. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.05.020.
- Ranjan, R., Rastogi, N. K., & Thakur, M. S. (2012). Development of immobilized biophotonic beads consisting of *Photobacterium leiognathi* for the detection of heavy metals and pesticide. *J Hazard Mater*, 225–226, 114–123. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2012.04.076.
- Slobodian, S. O., Gutyj, B. V., Darmohray, L. M., & Povochnikov, M. G. (2021). Antioxidant status of the organisms of young bulls in the conditions of lead-cadmium load and effect of correcting factors. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 12(2), 315–320. DOI: 10.15421/022142.
- 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. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.03.029.
- 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. DOI: 10.1002/fsn3.2800.
- Zeb, B., Ping, Z., Mahmood, Q., Lin, Q., Pervez, A., Irshad, M., Bilal, M., Bhatti, Z. A., & Shaheen, S. (2017). Assessment of combined toxicity of heavy metals from industrial wastewaters on *Photobacterium phosphoreum T3S*. *Appl. Water Sci*, 7, 2043–2050. DOI: 10.1007/s13201-016-0385-4.
- 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. DOI: 10.3390/ijerph9082658.