

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**  
**Факультет біології, географії та екології**  
**Кафедра географії та екології**

**ВИЯВЛЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ЕФЕКТІВ**  
**НАТУРАЛЬНИХ І СИНТЕТИЧНИХ ХАРЧОВИХ**  
**БАРВНИКІВ ЗАСОБАМИ ФІТОТЕСТУВАННЯ**

Кваліфікаційна робота (проект)  
на здобуття ступеня вищої освіти «бакалавр»

Виконала: здобувачка 4 курсу 05-415 групи

Спеціальності 101 Екологія

Освітньо-професійної програми «Екологія»

Яковлєва Валерія Миколаївна

Керівник к.геогр.н., доц. Охременко І.В.

Рецензент к.б.н., заступниця директора НПП

“Кам’янська Січ” з наукової роботи,

начальниця науково-дослідного відділу

Ходосовцева Ю.А.

## ЗМІСТ

ВСТУП	3
РОЗДІЛ 1. Використання синтетичних і натуральних барвників в харчовій промисловості, їх переваги та недоліки	6
1.1. Переваги і недоліки натуральних харчових барвників	6
1.2. Переваги і недоліки синтетичних харчових барвників	7
1.3. Нормативні документи, які регулюють використання харчових барвників	9
РОЗДІЛ 2. Біотестування харчових домішок на токсичність та мутагенність	13
2.1. Тваринні тестові моделі	13
2.2. Рослинні тестові моделі	15
2.3. Тестові моделі на основі мутантних штамів бактерій (тест Ейеса)	17
РОЗДІЛ 1.3. Експериментальне дослідження біологічних ефектів синтетичних та натуральних харчових барвників засобами ростового фітотесту	21
3.1. Матеріали та методи дослідження	21
3.2. Результати дослідження	23
3.3. Обговорення отриманих результатів	27
ВИСНОВКИ	31
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	33

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Харчові барвники існують багато століть. Вперше вони були розроблені близько 1500 до н.е. з використанням шафрану чи вина. Ранні римляни використовували ці натуральні інгредієнти, а також шовковицю, квіти, моркву, буряки та гранати для підфарбовування їжі. Перший штучний харчовий барвник був виготовлений із кам'яновугільної смоли у 1856 році.

Використання синтетичних, натуральних, мінеральних харчових барвників в фармацевтичній, косметичній, харчовій промисловості в наш час триває та збільшується через постійний попит, внаслідок певної техніко-економічної переваги. Барвники додаються в їжу для кількох цілей, для посилення вже наявного кольору, для мінімізації варіацій від партії до партії і для фарбування незабарвлених харчових продуктів з метою підвищення їх привабливості для споживача.

Однак споживання багатьох харчових домішок, зокрема барвників сприяло появі клінічних проявів, що спричинило недовіру до них у пересічного споживача, а деякі з харчових домішок навіть визнані як « сумнівні» та « небезпечні».

Багато барвників були заборонені через їх несприятливий вплив на лабораторних тварин або неадекватне, некоректне тестування. Безпека харчових барвників є темою, що давно обговорюється, через побоювання з приводу негативних наслідків для здоров'я[10]. З сотні розроблених харчових барвників лише деякі вважаються безпечними для вживання, оскільки вони були протестовані на токсичність на тваринних тестових моделях, серед них куркумін або турмерік (E100), госсипол, кармін (E120), хлорофіли (E140), аннато (E160в), енобарвники, бета каротин (E160а), червоний буряковий барвник бетанін (E162) є найбільш поширеними.

Безпека харчових барвників може збивати з пантелику, тому що в різних країнах діють різні закони про один і той самий харчовий барвник. Наприклад, Управління з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів (FDA) у США та Європейське управління з безпеки харчових продуктів (EFSA) можуть бути згодні з тим, що визначений харчовий барвник не завдає шкоди. Однак є харчові барвники, схвалені FDA, але заборонені EFSA і навпаки[10].

Синтетичні харчові барвники були пов'язані з побічними реакціями у деяких людей, із заявами про зв'язок з гіперактивністю, астмою та іншими алергічними реакціями. Ці твердження викликали багато суперечок, а також наукових досліджень та призвели до негативного сприйняття синтетичних барвників споживачами. В даний час споживачі сприймають синтетичні харчові інгредієнти та харчові барвники, зокрема так, що вони мають негативні наслідки для здоров'я і що продукти, що містять натуральний інгредієнт, безпечніші, корисніші і, отже, сприймають їх кращим вибором.

Що стосується тенденцій індустрії харчових барвників, використання натуральних барвників у продуктах харчування та напоях збільшилося і стало заміником їх синтетичних аналогів. Це в основному пов'язане з усвідомленням небезпеки для навколишнього середовища і потенційних побічних ефектів хімічних речовин, що використовуються в синтезі харчових барвників.

Важливо дослідити чи дійсно натуральні харчові барвники мають менш виражену біологічну дію ніж синтетичні та порівняти біологічну дію натурального (YERO Помаранчевий E160b) та синтетичного (діамантовий блакитний) харчового барвника.

**Мета дослідження:** оцінити експериментальним шляхом можливість адаптації класичного ростового фітотесту проростаюче насіння модельних рослин, а саме насіння ячменю (*Hordeum vulgare* L.)

для оцінки токсичності натуральних та синтетичних харчових барвників, для порівняння їх біологічної дії.

У зв'язку з поставленою метою необхідно вирішити наступні **завдання:**

- проаналізувати діючі методики оцінки токсичності і мутагенності харчових домішок різних типів;
- дослідити експериментальним шляхом можливість використання ростового фітотесту проростаюче насіння для оцінки токсичності натуральних та синтетичних харчових барвників.

**Об'єкт дослідження:** біотестування харчових домішок на токсичність і мутагенність.

**Предмет дослідження:** використання ростових фітотестів для оцінки токсичності і мутагенності харчових домішок, а саме натуральних харчових барвників.

**Методи дослідження:** метод аналізу літературних джерел, метод експериментального дослідження токсичності харчових барвників з використанням модельних рослин, метод статистичного аналізу отриманих результатів, метод наукового опису отриманих результатів.

**Структура роботи.** Дипломна робота викладена на 33 сторінках, складається зі вступу, трьох розділів, висновків, містить 2 таблиці, 1 рисунок і список використаних джерел, що включає 27 посилань.

## РОЗДІЛ 1

### ВИКОРИСТАННЯ НАТУРАЛЬНИХ БАРВНИКІВ В ХАРЧОВІЙ ПРОМИСЛОВОСТІ, ЇХ ПЕРЕВАГИ ТА НЕДОЛІКИ

#### 1.1. Переваги і недоліки натуральних харчових барвників

Натуральні барвники є альтернативою синтетичним харчовим барвникам. У гонитві за продуктами з натуральними пігментами люди очікують не тільки на гарний колір, та привабливість продукту харчування, а й на оздоровчі властивості самих продуктів.

Більшість природних пігментів складають антоціани, флавоноїди, вони не тільки нетоксичні та нешкідливі, а й містять необхідні для організму людини поживні речовини, деякі з яких є вітамінами або речовинами з вітамінними властивостями. Крім надання їжі привабливості, такі барвники також підвищують поживну цінність продуктів харчування. Існують також деякі природні пігменти, які мають певні фармакологічні функції і надають профілактичну та лікувальну дію при певних захворюваннях. Антоціани є чудовим прикладом. Ці з'єднання забезпечують ряд кольорів, включаючи червоний, фіолетовий та синій. Крім своєї основної ролі у наданні продуктам яскравих кольорів, ці сполуки мають антиоксидантні властивості. Однак дослідження показали, що деякі природні барвники можуть мати помітну мутагенну дію, наприклад барвник кармін можуть викликати астму при постійному вживанні в їжу або вдиханні, деякі харчові барвники можуть викликати алергічні реакції[4].

Оскільки натуральні барвники виробляються з природних джерел, вони не завдають шкоди навколишньому середовищу, що робить їх такими привабливими для споживача.[4] Натуральні барвники біорозкладаються, і їхня утилізація не викликає забруднення. Натуральні

барвники одержують із відновлюваних джерел таких як рослини, комахи, водорості, гриби, бактерії і т.д., які можна використовувати без завдання шкоди навколишньому середовищу[12, с 23].

Натуральні пігменти можуть краще імітувати колір рослини і виглядати м'якше і природніше. При правильному використанні можуть давати м'які, яскраві відтінки. Деякі натуральні пігменти мають неповторний оригінальний аромат, який може приносити задоволення при додаванні в їжу[12, с 23].

Проте натуральні харчові барвники менш стійкі до світла, кисню, температури рН середовища, більш дорогі, виробництво натуральних харчових барвників потребує більшої площі землі для вирощування рослин з яких ці барвники роблять.

Деякі натуральні барвники вступають у реакцію з інгредієнтами оброблених харчових продуктів та змінюють колір, роблячи їх менш яскравими ніж синтетичні пігменти. Деякі натуральні пігменти мають запах через співіснуючі компоненти. Для стабілізації природних пігментів і підвищення стійкості натуральних харчових барвників до умов навколишнього середовища розробляють нові методи, такі як: гідроколоїдне комплексоутворення, мікрокапсуляція, міжмолекулярна та внутрішньомолекулярна копігментація, вони в свою чергу нівелюють корисні властивості натуральних харчових барвників. [12, с 23].

## **1.2. Переваги і недоліки синтетичних харчових барвників**

Харчові барвники використовуються в різних галузях промисловості для покращення та збереження образотворчих та естетичних властивостей продуктів харчування, які є дуже важливою частиною прийняття рішень споживачем.

Однак необхідно вміти розрізняти і розпізнавати різні варіанти кольорів на ринку. З одного боку, існують натуральні барвники рослинного або тваринного походження, які не мають серйозного впливу на здоров'я і навіть у багатьох випадках можуть бути корисними. З іншого боку, існують синтетичні барвники, вони більш стійкі до умов середовища та обробки таких як температура, світло рН і тд, дешевші, більш яскраві, мають більш широкий спектр кольорів не змінюють запах продукту. Однак синтетичні харчові барвники які складаються зі штучних матеріалів можуть викликати проблеми зі здоров'ям у дорослих та різні поведінкові зміни у дітей[25].

Барвники, такі як Red 40 (allura), тартразин, бензоат натрію, кармуазин або амарант, є одними з найвідоміших синтетичних речовин, що використовуються як барвники в харчовій промисловості. Навіть сьогодні багато компаній вважають за краще використовувати їх через їх низьку ціну в порівнянні з натуральними барвниками. Оскільки вони проходять меншу хімічну обробку, вони дорожчі, але й корисніші [4].

CSPI (Науковий центр на користь суспільства) опублікував звіт під назвою «Харчові барвники: веселка ризиків», в якому вони пояснюють різні недоліки та алергічні реакції, які вони можуть мати в нашому організмі. Багато результатів показали, що існує тісний зв'язок між споживанням цих барвників та проблемами раку цих споживачів. Так само інші дослідження, проведені в Принстонському університеті, показали, що ці синтетичні добавки значно змінюють поведінку дітей, від гіперактивності та гіпертонії до поганої концентрації уваги та поганої успішності [20].

Широко розповсюджений харчовий барвник хіноліновий жовтий який використовується в продуктах харчування, ліках, засобах для волосся, одеколоне, безалкогольних напоях та косметиці. Дослідження довели, що хіноліновий жовтий генотоксичний, та його генотоксичність



була підтверджена з використанням клітинних модельних систем, лімфоцитів людини *in vitro*. Безпека хінолінового жовтого була переглянута Європейським агентством з безпеки харчових продуктів та було рекомендовано знизити його добову дозу з 10 мг/кг до 0,5 мг/кг відповідно до його висновку від 23 вересня 2009 р. [20].

Також відомо, що синтетичні харчові барвники негативно впливають на роботу печінки та інших життєво важливих органів. Заважають травним ферментам, які виробляє наш організм, щоб допомогти правильно розщепити їжу, яку ми їмо. Їх вживання пов'язане з респіраторними захворюваннями, такими як астма та бронхіт. Вживання продуктів, що містять штучні барвники, може викликати запальну реакцію в організмі, що призводить до активації імунної системи (збільшується кількість лейкоцитів, що надходять у кровотік). [25] Також вживання синтетичних харчових барвників негативно впливає на розвиток нервових клітин[25].

Зрозуміло, що штучні харчові барвники не є необхідними складовими нашого раціону. Крім того, вони, як правило, містяться в оброблених харчових продуктах, призначених для дітей, льодяники, напої, пюре і т.д. Також вони не мають ніякої поживної цінності і часто містять в собі забагато жиру та цукру.

### **1.3. Нормативні документи, які регулюють використання харчових барвників**

Значна кількість хімічних і біологічних речовин потрапляє в наш організм через споживання харчових продуктів. Ці речовини накопичуються в їжі як під час біологічних процесів, так і процесів харчового ланцюга. Харчовий ланцюг охоплює всі етапи сільськогосподарського та промислового виробництва харчових

продуктів, включаючи зберігання, пакування та маркування харчових продуктів. Таким чином, забезпечення безпеки та якості харчових продуктів є надзвичайно важливою відповідальністю сучасного суспільства, оскільки це безпосередньо впливає на здоров'я та добробут населення, а також збереження його генетичного різноманіття. В українському та європейському законодавстві існують різні точки зору щодо значення «якості» та «безпеки продукції». У країнах ЄС «якість харчових продуктів» є нерегульованою комерційною категорією. Проте в Україні якість та безпечність харчових продуктів розглядаються як єдині поняття.

З метою регулювання виробництва харчових продуктів, їх якості, асортименту, регламентів, заходів щодо попередження харчових отруєнь, запобігання фальсифікації, органи державної влади видають закони, положення, стандарти та інструкції, всі вони називаються продовольчим (харчовим) законодавством.

У Європейському союзі безпека харчових барвників та інших харчових добавок в даний час оцінюється Науковим комітетом з харчових продуктів (SCF), консультативним експертним комітетом Європейської Комісії яка розташована у Брюсселі (Бельгія) [9, с.21].

Закони, прийняті Європейською комісією, є обов'язковими для всіх країн-членів ЄС і мають бути впроваджені в їхнє національне законодавство протягом певного періоду часу. У країнах, що не входять до ЄС, харчові добавки регулюються національною владою, яка зазвичай, але не у всіх випадках, намагається привести їх у відповідність до законів, прийнятих у Брюсселі [1, с.23]. Ще одним важливим комітетом експертів, що працює на глобальній основі, є JECFA (Об'єднаний комітет експертів ВООЗ/ФАО з харчових добавок), консультативний комітет Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) та Продовольчої та сільськогосподарської організації (FAD). Згідно з токсикологічною оцінкою SCE і JEFF A, добавці надається

значення ADI (допустима добова доза), виражена в мг/кг маси тіла на день, або її використання не рекомендується [10].

Рада ЄС розробила Рамкову «Директиву про харчові добавки, призначені для використання в харчових продуктах» (89/107/ЕЕС)7, прийняту в 1989 р. Директива визначає 24 категорії харчових добавок, у тому числі барвників, підсолоджувачів, емульгаторів та ін [12, с.3].

У Європі оцінюваним харчовим добавкам (незалежно від того, призначені вони для використання чи ні) було присвоєно номер Е, яким вони характеризуються та специфікуються. Номери Е для барвників варіюються від Е 100 (куркумін) до Е 180 (літорубін ВК). Оскільки пігмент, отриманий в результаті екстракції, може мати інше позначення, ніж такий самий пігмент, отриманий в результаті хімічного синтезу, він може характеризуватись диференційованим числом Е: екстракти бета-каротину, наприклад, перераховані під Е 160ai (змішані каротини), а синтетичний бета -каротин під номером Е 160aii (суміш каротинів) [19, с. 63].

У Національному плані дій на 2013 рік, спрямованому на реалізацію Програми економічних реформ на 2010-2014 роки, підкреслюється пріоритет безпеки та якості харчових продуктів в Україні. З метою приведення у відповідність з нормами Європейського Союзу українське законодавство щодо харчових добавок переглядається. Зокрема, наказ МОЗ України від 20.03.2013 № 218, яким визначено порядок державної реєстрації харчових добавок, ароматизаторів та ферментів з урахуванням Регламенту ЄС № 1331/2008. Санітарні правила та норми їх вживання, включаючи затверджений перелік харчових продуктів, також деталізовано відповідно до Регламенту ЄС № 1333/2008.

В Україні діє також кілька нормативних документів щодо якості продуктів харчування. Це Закон України «Про безпечність та якість

харчових продуктів», Закон України «Про Державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів про безпечність та якість харчових продуктів» від 31.05.2007, Постанова Кабінету міністрів України № 468 «Порядок етикетування харчових продуктів, які містять генетично модифіковані організми або вироблені з їх використанням та вводяться в обіг», Закон України «Про захист прав споживачів», Декрети Кабінету Міністрів України «Про стандартизацію і сертифікацію», «Про порядок заняття торгівельною діяльністю і правила торгівельного обслуговування населення», Міжнародні стандарти серії ISO 9000) [19, с. 63].

## РОЗДІЛ 2

### БІОТЕСТУВАННЯ ХАРЧОВИХ ДОМІШОК НА ТОКСИЧНІСТЬ ТА МУТАГЕННІСТЬ

#### 2.1. Тваринні тестові моделі

Харчові барвники – це харчові добавки, які додають до їжі в основному з таких причин: компенсувати втрату кольору внаслідок впливу світла, повітря, вологості або температури; посилення природних кольорів; додати колір до продуктів, які інакше не мали б кольору або мали б інший, менш привабливий, колір.

Харчові барвники присутні в багатьох харчових продуктах, включаючи закуски, маргарин, сири, джеми та желе, десерти, напої тощо. Безпека всіх харчових барвників, дозволених у Європейському Союзі (ЄС), підлягає суворій науковій оцінці.

На тваринних тестових моделях оцінюють передбачуваний вплив штучних і натуральних харчових барвників на окислювально-відновний стан різних видів [3, с.9]. Найкращим підходом до оцінки потенційної небезпеки поширення харчових барвників у навколишньому середовищі є одночасний аналіз модельних організмів, що належать до різних видів, які можуть виявляти різну чутливість. Наприклад, певна концентрація певних харчових барвників може бути шкідливою для одного виду, але не шкідливою для інших [6, с.23]. Як тест-організми в екології зазвичай використовують нижчі організми, в тому числі і одноклітинні, оскільки проводити дослід з ними набагато зручніше, ніж з вищими тваринами. Найкраще підходять інфузорії. Їх легко вирощувати, і оцінити результат нескладно – достатньо порахувати їх до початку дослідження та наприкінці [7, с.17].

Поширення харчових барвників у водоймах та обводнених ґрунтах викликає особливу тривогу, оскільки як штучні барвники, так і біобарвники тваринного походження мають доведену пряму токсичність для водних чи водозалежних організмів [1, с.27; 8;26]. З цієї причини токсичність чотирьох різних комерційно доступних та найросповсюдженіших харчових барвників (червоний E120, червоний понсо E124, тартразиновий жовтий E102 і синій діамантовий E131) була оцінена на трьох різних модельних організмах, а саме *Cucumis sativus*, *Artemia salina* і *Danio rerio*, які займають різні позиції в трофічній піраміді. Зібрані докази вказують на те, що харчові барвники можуть впливати на органи і функції залежно від виду. Передбачуваним основним джерелом шкідливої дії харчових барвників на живі організми є зміна їх окислювально-відновного стану [6, с.31].

Сублетальні концентрації синтетичних і природних барвників можуть стимулювати вироблення активних форм кисню (АФК) у водних організмах, викликаючи окислювальний стрес, стан, який може викликати широкий спектр функціональних змін, починаючи від молекулярних (наприклад, пошкоджені білки, ліпіди та ДНК) тканинах (наприклад, активність ферментів та доступність субстрату) та у всьому організмі (наприклад, швидкість метаболізму, рухливість тощо) [2, с.17, 23].

Відомо, що харчові добавки викликають хромосомні аномалії зі збільшенням концентрації дози та тривалості їх споживання [27]. Було виявлено, що багато видів азобарвників мають канцерогенну дію і викликають генетичні порушення у людини [21]. Експериментально встановлено, що після введення деяких барвників у щурів індукували багато видів метаболічних порушень [11], а також збільшення інвазійності до деяких паразитарних захворювань[5]. У деяких короткострокових тестах на генотоксичність багато азохімічних речовин були визнані канцерогенними для тварин . Деякі з барвників також

здатні викликати різні типи хромосомних аберацій. Відомо, що тваринна модель дрозофіли містить понад 75% гомологічних генів людських захворювань [15], пов'язаних із різними дегенеративними захворюваннями людини, такими як хвороби Паркінсона та Альцгеймера, а також алергічних захворювань. З цієї причини це надійна система для перевірки токсичності або антитоксичності харчових домішок на здоров'я людини.

## 2.2. Рослинні тестові моделі

Рослини є найважливішими наземними первинними продуцентами, що є основою всіх екосистем. Вони постійно обмінюються речовинами з навколишнім середовищем, а також накопичують речовини (як корисні так і токсичні) виступаючи як такі собі природні, пасивні пробовідбірники. Тому рослини є невід'ємною частиною будь-якого набору тестів для оцінки токсичного впливу харчових барвників на живі організми.

Рослини тісно взаємодіють з навколишнім середовищем, вони отримують з довкілля воду, CO<sub>2</sub>, макро-і мікроелементи, навіть якщо ці життєво важливі елементи присутні у незначних концентраціях. Процеси екстракції також поглинають забруднюючі речовини з навколишнього середовища води, повітря та ґрунту. Таке поглинання забруднюючих речовин виявилось корисним у рекультивації та фітоіндикації [6, с. 115].

Фітотести для оцінки фітотоксичності полягають у аналізі реакції розвитку насіння рослин на небезпечні речовини у навколишньому середовищі. Ефективність фітотестів під час тестування різних забруднюючих речовин була підтверджена та зареєстрована.

Біоаналізи з рослинами вважаються досить чутливими та простими в моніторингу цитотоксичної дії хімічних сполук. Оцінка генотоксичності з використанням рослинних тестових моделей має деякі переваги перед над тваринними тестовими моделями. Зазвичай він має велике та низьке число хромосом, високу швидкість проліферації меристематичних клітин, недорогий аналіз та не потребує складного лабораторного обладнання. Рослини є важливим матеріалом для тестування генетичних змін, викликаних хімічними речовинами навколишнього середовища [18]. Використовуючи біотести на рослинах, досліджується широкий спектр різних токсикантів, а також оцінюється їхня комбінована дія [3, с 45].

Ростові фітотести можна об'єднати в три групи методів: лабораторні, вегетаційні та мікроділянкові. Особливу актуальність в екологічному контролі мають лабораторні методи фітотестування як найбільш швидкі та економічні. Крім того, саме лабораторні методи мають найбільшу точність. Це пов'язано з тим, що метод ростового лабораторного фітотестування застосовується в контрольованих умовах лабораторії. Фітотестування засноване на чутливості рослин до хімічного впливу харчових домішок, що відображається на ростових та морфологічних характеристиках рослини [6, с. 76].

Через генетичну неоднорідність рослин, їх різні види та різновиди по-різному реагують на вплив забруднюючих речовин. Деякі види можуть реагувати лише на один тип забруднювачів, тоді як інші можуть реагувати на дві або більше речовин, деякі взагалі не реагують, або їх реакція дуже слабка або чітка. Тому, вибираючи рослину для використання її як об'єкт біологічного моніторингу, слід враховувати певні вимоги – чітка реакція на забруднюючі речовини, видимі ознаки пошкодження, зміни швидкості росту, морфологічні зміни, порушення цвітіння, зміни продуктивності або врожайності. Рекомендується



визбирати рослини, які не потребують умов вирощування та догляду, а також рослини, які рідко піддаються впливу шкідників та хвороб [6].

Для оцінки токсичного впливу харчової домішки зазвичай розглядають такі показники: висота рослини, кількість паростків, довжина і ширина листя, довжина черешка, кількість і довжина гілок. Крім того, фізіологічні, біохімічні та цитогенетичні параметри ростових тест-систем також придатні для кількісної оцінки впливу харчових домішок на організм [12, с. 23].

Сьогодні фітотести використовуються для виявлення токсичності і мутагенності харчових барвників, зокрема, таких, як бордо-червоний (E-123), жовтий захід сонця (E-110), жовтий тартразин (E-102), діамантовий блакитний (або блискучий синій) (E-133) та інших [16, с 1120 – 1130; 24, 449 - 463; 24, с. 361 – 366].

### **2.3. Тестові моделі на основі мутантних штамів бактерій (тест Ейеса)**

Генетична токсикологія є відносно новою дисципліною, метою якої є оцінка можливої потенційної генетичної небезпеки для людини фізичного агента або хімічного продукту через вплив на модельну систему. У 1970-х роках єдиною доступною системою був тривалий тест на канцерогенез тварин. Ця система була довгою для впровадження, дорогою та іноді важкою для інтерпретації. На щастя, ідея про паралелізм між канцерогенною та мутагенною силою почала утверджуватися. Важливий крок зробив професор В.Н.Еймс, коли він зміг розробити тест, заснований на використанні штамів бактерій, гіперчутливих до мутагенів і, отже, до канцерогенів [22, с 315].

Тест Еймса (аналіз зворотної мутації *Salmonella typhimurium*) являє собою бактеріальний короткостроковий тест для ідентифікації

канцерогенів, що використовує мутагенність бактерій як кінцеву точку. Він включає метаболізм ссавців для активації промутагенів. Виявлено високу, але не повну кореляцію між канцерогенністю у тварин і мутагенністю в тесті Еймса. Останній виявляє мутації в гені гістидин-вимагаючого бактеріального штаму, який виробляє гістидин-незалежний штам. Тест Еймса — один із найчастіше вживаних тестів у токсикології. Майже нові фармацевтичні речовини і хімічні речовини, що використовуються в промисловості, тестуються за допомогою цього аналізу. [22, с 318].

Аналіз Еймса так широко використовується, тому що ті хімічні речовини, які виявилися позитивними в аналізі Еймса, також виявилися позитивними в біологічному аналізі на гризунах *in vivo* (узгодженість ~ 65%), що використовується для вимірювання канцерогенного потенціалу хімічної речовини, що тестується; органи регулювання охорони здоров'я у всьому світі вважають його золотим стандартом для прогнозування канцерогенного потенціалу хімічної речовини для людини. [2, с.20].

Тест Еймса є правильним тестом на мутагенез. Він складається з перевірки того, чи здатна хімічна речовина або фізичний агент викликати специфічні мутації в різних штаммах *Salmonella typhimurium*. Штами, використані в тесті, є штамми, що несуть мутацію в одному з генів, що регулюють синтез амінокислоти гістидину. Ця мутація *His* робить штами нездатними рости на середовищі без гістидину. З дуже низькою частотою ці мутації *His* спонтанно змінюються на *His+*, і тому клітини відновлюють свою здатність рости на середовищі, позбавленому гістидину. Цю частоту реверсії можна збільшити шляхом впливу мутагенів на бактерії *His*. Таким чином, тест Еймса дає змогу кількісно визначити індукцію цих зворотних мутацій *His+*. [22, с 325].

Оригінальний тест Еймса був точковим тестом, проведеним шляхом нанесення невеликої кількості досліджуваної хімічної речовини на центр чашки з агаром, засіяної *Salmonella*. Хімічна пляма створює градієнт концентрації в круглій чашці з агаром. Якщо хімічна речовина є мутагенною, навколо центральної точки утворюється кільце колоній *Salmonella*, які повернулися до синтезу гістидину дикого типу. Якщо хімічна речовина токсична, буде зона нульового зростання. [22, с 322].

Згодом Еймс розробив більш точний тест на включення з більшою чутливістю та точністю, ніж точковий тест. Під час аналізу включення в чашку буфер, бактерії та досліджувану речовину додають до агару, що містить біотин і сліди гістидину. Суміш розливають на чашки з агаром без гістидину, і чашки інкубують догори дном. Лише ті бактерії, які повернулися до дикого типу, будуть рости на чашках з агаром. Сліди гістидину включені до вихідної суміші, щоб дозволити декілька поділів клітин, які зазвичай необхідні для мутагенезу. Певна кількість колоній повертається спонтанно, навіть за відсутності мутагенної хімічної речовини. Додавання мутагену збільшить кількість ревертантних колоній залежно від дози. [22, с 317].

Тест на включення не дозволяє кількісно визначити кількість клітин, що вижили. Таку інформацію може надати інший тип тесту Еймса, процедура «обробка та пластина». У обробці та чашці бактерії промиваються та ресуспендуються в непоживному середовищі, а потім обробляються досліджуваною хімічною речовиною. Потім їх поміщають на селективне середовище для визначення мутантів і на повне середовище для визначення виживання. Частоту мутацій можна розрахувати за кількістю мутантів на фракцію бактерій, що вижила. [22, с 319].

Успіх тесту Еймса пояснюється його простотою виконання та низькою вартістю. Крім того, цей тест швидкий (48 годин) і чутливий. Він дає кількісну відповідь, що дозволяє проводити порівняльні дослідження. Його гнучкість у різних протоколах дозволяє йому адаптуватися до різних зразків. Згідно з дослідженнями, його передбачувана сила (мутагени, які є канцерогенними) становить 70-90%. Завдяки своїй простоті та низькій вартості тест Еймса є найбільш широко використовуваним генетичним токсикологічним тестом. З усіх доступних тестів його база даних, безумовно, найбільша. Нарешті, він був підтверджений у багатьох країнах.

Однак тест Еймса є бактеріальним тестом. Він являє собою приблизну симуляцію того, що може статися в організмі людини (метаболізм, система відновлення ДНК, системи токсикації, умови впливу та дифузії продуктів в цільовому організмі). Наявність гістидину в біологічних зразках може викликати хибнопозитивні відповіді, а деякі бактерицидні продукти (антибіотики) можуть викликати хибнонегативні відповіді. Чутливість (канцерогени, мутагени) становить 40-50%. Штами бактерій генетично нестабільні. Цей тест потребує лабораторного обладнання, яке є унікальним для бактеріологічної лабораторії. Це може бути значним початковим капіталовкладенням для необладнаної лабораторії.

### РОЗДІЛ 3

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ЕФЕКТІВ СИНТЕТИЧНИХ ТА НАТУРАЛЬНИХ ХАРЧОВИХ БАРВНИКІВ ЗАСОБАМИ РОСТОВОГО ФІТОТЕСТУ

### 3.1. Матеріали та методи дослідження

Для проведення дослідження біологічних ефектів натуральних та синтетичних харчових барвників ми обрали такі барвники: натуральний YERO Помаранчевий E160b та синтетичний Діамантовий блакитний. Дослідження означених харчових барвників відбулося за допомогою ростового фітотесту, в якому в якості тест-об'єкту був обраний ячмінь звичайний (*Hordeum vulgare* L.).

Під час проведення експерименту насіння ячменю (*Hordeum vulgare* L.) пророщували протягом 4-х днів в ч. Петрі на водопровідній кип'яченій воді (м. Херсон) в контрольних умовах або з додаванням харчових барвників при різних режимах освітлення: а) 24 год темрява (синтетичний харчовий барвник Діамантовий блакитний); б) 12 год темрява / 12 годин освітлення. (синтетичний харчовий барвник Діамантовий блакитний); в) 24 год темрява (натуральний харчовий барвник YERO Помаранчевий E160b); г) 12 год темрява / 12 годин освітлення. (натуральний харчовий барвник YERO Помаранчевий E160b). Температура пророщування +22° С.

На 4-у добу пророщування вимірювали довжину коренів (найдовшого кореня в мочкуватій кореневій системі) і епикотилів проростків. На підставі отриманих даних розраховували середню довжину коренів і середню довжину епикотилів. Всі дані статистично оброблялися.

Статистичний аналіз. Середню арифметичну довжину епікотилів та коренів визначали за формулою:

$$S_{cp} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + x_n}{n} \quad (3.1).$$

Де:  $S_{cp}$  - середнє арифметичне значення довжини епікотилів або коренів, а  $n$  – об'єм вибірки (кількість проростків та коренів, довжина яких вимірювалась).

Стандартну похибку середніх арифметичних значень довжини епікотилів та коренів визначали за формулою:

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum (S_{cp} - S_i)^2}{n^2(n-1)}} \quad (3.2).$$

Де:  $S_{cp}$  - середнє арифметичне значення довжини епікотилів та коренів;  $n$  – об'єм вибірки (кількість проростків та коренів, довжина яких вимірювалась);  $S_i$  – довжина  $i$ -епікотилію/кореня.

Похибку середньо арифметичних значень визначали за формулою:

$$S_{cp} \pm S_x \cdot t_s \quad (3.3).$$

Де:  $S_{cp}$  - середнє арифметичне значення довжини епікотилів або коренів;  $n$  – об'єм вибірки (кількість епікотилів та коренів, довжина яких вимірювалась);  $t_s$  - критерій Стьюдента, який визначається за таблицею.

Достовірність відмінностей між даними для нормальних розподілень розраховували за наступною формулою:

$$\frac{S_{cp1} - S_{cp2}}{\sqrt{S_{x1}^2 + S_{x2}^2}} = t \quad (3.4).$$

При  $t > t_{st}$ , відмінності достовірні. Де:  $Scp_1, Scp_2$  – середні значення показника для нормального розподілення в варіантах 1 і 2;  $Sx_1, Sx_2$  – похибки середніх значень для варіантів 1 і 2;  $t_{st}$  – критерій Стьюдента [13].

### 3.2. Результати досліджень

Результати проведених досліджень наведені в таблицях 3.1-3.2 і на рисунку 3.1.

Таблиця 3.1

Вплив харчового барвника YERO Помаранчевий E160b (натурального) та харчового барвника харчового барвника діамантового блакитного FCF (синтетичного) на довжину коренів і епикотилів проростків ячменю в умовах світлового режиму 12 год день / 12 год ніч.

Варіант експеримента:	Довжина коренів, мм:	Довжина епикотилів, мм:
Контроль (без барвника)	52,86 ± 5,15	46,41 ± 4,04
Харчовий барвник (YERO Помаранчевий E160b)	46,02±5,82●◆	36,57±0,85*▲
Харчовий барвник (FCF)	57,16 ± 4,68	46,70 ± 6,19

● – результати достовірно відрізняються від пророщування в умовах присутності світла 12 год / 12 год темряви без додаванням харчового барвника.

◆ – результати достовірно відрізняються від пророщування в умовах присутності світла 12 год / 12 год темряви з додаванням харчового барвника діамантового блакитного. (FCF) ( $t = 4,89, t_{st} = 2,03$ )

\* – результати достовірно відрізняються від пророщування в умовах присутності світла 12 год / 12 год темряви без додавання харчового барвника(контроль);

▲ – результати достовірно відрізняються від пророщування з додаванням синтетичного харчового барвника в умовах присутності світла 12 год / 12 год темряви)(  $t = 2,82$   $tst = 2,03$ )

Було встановлено, що в умовах присутності світла (12 год на добу) без додавання харчового барвника (контроль) середня довжина коренів проростків ячменю склала  $52,86 \pm 5,15$  мм. Додавання харчового барвника діамантового блакитного (FCF) в умовах присутності світла 12 год на добу не мало достовірного впливу на ріст коренів, їх середня довжина склала  $57,16 \pm 4,68$  мм ( $t = 1,09$ ,  $tst = 2,03$ ). Тоді як додавання натурального харчового барвника (YERO Помаранчевий E160b) в умовах присутності світла 12 годин на добу мало достовірний вплив на ріст коренів та загальмувала його, їх середня довжина склала  $46,02 \pm 5,82$  ( $t = 2,38$ ,  $tst = 2,03$ ).

В умовах присутності світла (12 год на добу) без додавання харчового барвника (контроль) середня довжина епикотилів склала  $46,41 \pm 4,04$  мм, тоді як додавання харчового барвника FCF(синтетичного) та присутність світла 12 год на добу, не мало достовірного впливу на ріст епикотилів, їх середня довжина склала  $46,70 \pm 6,19$  мм ( $t = 0,081$ ;  $tst = 2,03$ ). Тоді як додавання натурального харчового барвнику YERO Помаранчевий E160b мало достовірний вплив на ріст епикотилів, та загальмувала його, їх середня довжина склала  $36,57 \pm 0,85$  ( $t = 3,15$ ;  $tst = 2,03$ ).





Рисунок 3.1 – Пророщування насіння модельної рослини ячменю звичайного на питній воді і на розчині харчового барвника діамантового блакитного.

Таблиця 3.2

Вплив харчового барвника YERO Помаранчевий E160b (натурального) та харчового барвника харчового барвника діамантового блакитного FCF (синтетичного) на довжину коренів і епикотилів проростків ячменю в умовах світлового режиму 24 години ніч.

Варіант експеримента:	Довжина коренів, мм:	Довжина епикотилів, мм:
Контроль (без барвника)	80,45 ± 6,44 <sup>◇</sup>	42,50 ± 3,79
Харчовий барвник (YERO Помаранчевий E160b)	57,86±2,21 <sup>°</sup>	45,11±0,90
Харчовий барвник (FCF)	70,58 ± 5,83 <sup>■</sup>	40,74 ± 3,14

■ – результати достовірно відрізняються від пророщування в умовах темряви 24 години без додавання харчового барвника (контроль)

° – результати достовірно відрізняються від пророщування в умовах темряви 24 години без додавання харчового барвника ( контроль)

' – результати достовірно відрізняються від пророщування в умовах темряви 24 години з додаванням синтетичного харчового барвника діамантового блакитного (FCF) ( $t = 3,84$ ;  $tst = 2,03$ ).

◇ – результати достовірно відрізняються від пророщування в умовах присутності світла 12 год /12 год темряви, без додавання харчового барвника (контроль).

В умовах цілодобової темряви пророщування (24 год. темрява) без додавання харчового барвника FCF, середня довжина коренів становила  $80,45 \pm 6,44$  мм, тоді як присутність синтетичного харчового барвника діамантового блакитного (FCF) в умовах цілодобової темряви, достовірно загальмувала ріст коренів і їх середня довжина склала  $70,58 \pm 5,83$  мм ( $tst = 2,02$ ;  $t = 2,29$ ), присутність натурального харчового барвника (YEEO Помаранчевий E160b) в умовах цілодобової темряви також достовірно загальмувала ріст коренів і їх середня довжина склала  $57,86 \pm 2,21$  мм ( $tst = 2,042$ ;  $t = 8,23$ ).

В умовах цілодобової темряви пророщування (24 год. темрява) без додавання харчового барвника (контроль) середня довжина епикотилів склала  $42,50 \pm 3,79$  мм, тоді як присутність синтетичного харчового барвника діамантового блакитного в умовах цілодобової темряви ніякого достовірного впливу на ріст епикотилів не мала, їх середня довжина склала  $40,74 \pm 3,14$  мм ( $tst = 2,018$ ;  $t = 0,72$ ). Також в умовах цілодобової темряви не мала достовірного впливу на ріст епикотилів і присутність натурального харчового барвника (YEEO Помаранчевий E160b), їх середня довжина склала  $45,11 \pm 0,9$  мм ( $tst = 2,042$ ;  $t = 0,42$ ).

Розглянемо як на пророщування насіння тестованої моделі рослини ячмінь звичайний (*Hordeum vulgare* L.) вплинув світловий режим пророщування.

В умовах повної цілодобової темряви (24 год. темрява), без додавання харчового барвника (контроль) середня довжина коренів склала  $80,45 \pm 6,44$  мм, тоді як присутність світла 12 год. на добу, без

додавання харчового барвника достовірно загальмувала ріст коренів і їх середня довжина склала  $52,86 \pm 5,15$  мм ( $t_{st} = 2,028$ ;  $t = 6,76$ ).

Відсутність харчового барвника (контроль) в умовах цілодобової темряви та в умовах освітлення 12 год. на добу, ніяк достовірно не вплинула на ріст епикотилів. Їх середня довжина в умовах цілодобової темряви склала  $42,50 \pm 3,79$  мм, тоді як середня довжина епикотилів в умовах присутності світла склала  $46,41 \pm 4,04$  мм ( $t_{st} = 2,0$ ;  $t = 0,88$ ).

### 3.3. Обговорення отриманих результатів

Аннато (E160b, біксин, норбіксин) – це природний барвник прокаратиноїдної групи з більш ніж 200-річною історією використання в кулінарії, косметології (губні помади, розмальовування тіла), в народній медицині (захист тіла від сонячних опіків, відлякування комах, протизапальний, бактерицидний, антигрибковий засіб). Це речовина з історично відомою і сьогодні експериментально підтвердженою нетоксичністю і немутагенністю в традиційно використовуваних концентраціях. Усі ці фактори протягом останніх років зумовили значну популярність натуральних барвників, які містяться в плодах дерева аннато (*Bixa orellana* L.), і значне зростання світового виробництва і споживання означеного продукту, яке становить на сьогоднішній день 14500 тонн сухої ваги в рік і є прибутковим бізнесом для країн, що розвиваються, і які є експортерами аннато. Сьогодні за рівнем виробництва і використання в світі біксин займає друге місце серед натуральних барвників. Слід відзначити, що токсичність і мутагенність харчового барвника аннато залежать не тільки від дотримання рекомендованих нормативів використання даної добавки в харчовій і косметологічній промисловості, але, також значною мірою від способу екстракції барвника з насіння і від рівня очистки кінцевого

продукту. Таким чином, причиною негативного впливу харчової добавки E160b на організм людини може бути як не доброчесність виробників готової харчової продукції, яка містить компоненти аннато, так і виробників самого харчового барвника.

Єдині офіційні висловлювання щодо можливої небезпеки харчового використання барвника аннато стосуються його алергенних властивостей: за результатами експериментів на групі добровольців у біля 30% піддослідних ця харчова добавка викликала сильну алергічну реакцію, що значно вище алергенності інших харчових добавок, які використовуються. Однак, подальші дослідження показали, що причиною алергенності є домішки білку, які потрапляють в продукт з насіння дерева аннато внаслідок недостатньої очистки, а не сам барвник.

В нашому дослідженні вибір барвника аннато (E160b) був зумовлений наступними факторами: 1) встановленою нетоксичністю препарату для людини; 2) наявністю регуляторного впливу аннато на організм людини і тварин, що дозволило використовувати даний барвник в якості еталону не токсичності і регуляторного впливу харчового барвника при роботі з тест-системою «проростаюче насіння», виходячи з результатів експериментальних робіт, які підтверджують коректність взаємної екстраполяції даних, отриманих на різних модельних об'єктах: рослинних, тваринних, на клітинах людини і т.н

Синтетичний барвник блакитного кольору, який використовувався в нашому дослідженні, Blue Chefmaster liqua-gel food color (E133) в різних країнах отримав різні назви, зокрема синій блискучий FCF та діамантовий блакитний. Барвник FCF – один з найбільш уживаних синтетичних барвників в харчовій, косметологічній, медичній та інших галузях.

Таке багаторічне і широке застосування діамантового блакитного пов'язане зі стабільністю барвника і його нетоксичністю, підтвердженою в багатьох дослідженнях [14, с. 615–627; 26;]. Проте, одночасно

з'являється все більше робіт, які свідчать про небезпеку вживання продукції, яка містить означений барвник навіть в концентраціях, затверджених законодавчо [17, с.221 – 234; 24]. Наслідком таких робіт стало впровадження нормативних актів, в яких було переглянуто допустимі нормативи споживання діамантового блакитного, а також введення заборони на використання даного харчового барвника в ряді країн, а саме: Норвегія, Швеція, Данія, Німеччина.

Аналіз літературних даних свідчить про те, що діамантовий блакитний в низьких концентраціях, які є нетоксичними і немутагенними, володіє регуляторними ефектами, які спроможні суттєво впливати на функціонування клітин і організмів. Зокрема, означений барвник збільшує тривалість життя мушок дрозофіл, сприяє росту злоякісних клітин без пошкодження їх ДНК [23, с. 176]. Діамантовий блакитний має певні протизапальні та антидепресивні ефекти, в наслідок того, що цей барвник є інгібітором пуринергічних рецепторів - рецепторів, які відповідають за запальні реакції та інші клітинні процеси. Отримані нами експериментальні дані підтверджують наявність регуляторних, а не токсичних ефектів низьких концентрацій діамантового блакитного. При вирощуванні в умовах 12 год світло / 12 год темрява барвник не вплинув на довжину коренів порівняно з контролем, що свідчить про відсутність токсичності у тестованій концентрації препарату. Тоді як пророщування в умовах 24 год темряви в присутності барвника супроводжувалося достовірним гальмуванням росту коренів порівняно з контролем: середня довжина коренів становила  $80,45 \pm 6,44$  мм в контролі і  $70,58 \pm 5,83$  мм в досліді, відповідно. Відомо, що гальмування ростових процесів може бути спричинене або токсичністю умов середовища, або його регуляторним впливом. Зазвичай, токсичність будь-яких тестованих речовин або факторів збільшується в умовах освітлення, порівняно з умовами повної темряви. Таким чином, відсутність ріст-гальмуючого ефекта в умовах

освітлення і наявність гальмування росту коренів в темряві опосередковано свідчать на користь регуляторної, а не токсичної дії діамантового блакитного.

## ВИСНОВКИ

Колір є ключовим компонентом для підвищення візуальної цінності та сприйняття харчових продуктів і напоїв споживачами. Виробники харчових продуктів все частіше використовують синтетичні харчові барвники, ніж натуральні харчові барвники, для досягнення певних властивостей, таких як низька вартість, покращений зовнішній вигляд, висока інтенсивність кольору, більша стабільність кольору та однорідність. Різноманітні продукти харчування та напої, доступні на ринку, можуть містити деякі недозволені синтетичні барвники та надмірне використання дозволених синтетичних барвників. Це може призвести до серйозних проблем зі здоров'ям, таких як мутації, рак, зниження концентрації гемоглобіну та алергічні реакції.

В нашому дослідженні ми порівняли біологічні ефекти натурального (YEEO Помаранчевий E160b) та синтетичного (діамантовий блакитний FCF) харчового барвника.

Проведене нами дослідження показало, що в концентрації, яка тестувалася і яка знаходиться в межах, рекомендованих для виробників харчової і косметологічної продукції, натуральний барвник E160b (аннато) інгібує подовження коренів проростків ячменю при вирощуванні в умовах 24-год темрява, але не в умовах 12 год світло/12 год темрява.

Теж саме стосується і синтетичного харчового барвника діамантового блакитного (FCF), цей харчовий барвник також інгібує подовження коренів проростків ячменю при вирощуванні в умовах 24-год ( $70,58 \pm 5,83\text{мм}$ ) темрява, але не в умовах 12 год світло/12 год темрява ( $57,16 \pm 4,68\text{мм}$ ).

Виявлене інгібування росту може бути як наслідком токсичності даних речовини, так і результатом регуляторного впливу харчових барвників на рослинну модельну систему.

На користь регуляторної, а не токсичної природи виявленого феномену, говорять наступні факти: а) інгібування росту модельних рослин відбувається тільки в одній експериментальній системі (24-год темрява); б) інгібування росту має місце в темряві, а не за наявності світла; при цьому відомо, що зазвичай токсичність дії факторів навколишнього середовища на організм посилюється в присутності світла, але не в темряві. Точне розмежування токсичної або регуляторної природи інгібування росту модельних рослин харчовим барвником аннато може бути зроблене тільки в результаті проведення подальших цитологічних і молекулярно-біологічних досліджень. Однак, незалежно від відповіді на це питання, сам по собі виявлений факт наявності біологічних ефектів невисоких концентрацій харчового барвника при його тривалому надходженні в організм може мати наслідки, характер впливу яких на функціонування організму людини складно передбачити, що потребує проведення додаткових більш тривалих хронічних і трансгенеративних досліджень на модельних тваринах.

В цілому, отримані нами результати підтверджують можливість використання ростового фітотесту для виявлення біологічних ефектів харчових барвників, які широко використовуються в кулінарії і косметології.



## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Білявський Г. О., Бутченко Л. І. Основи екології: теорія та практикум. Навч. посібник. К.: Либідь, 2004. 368 с.
2. Віннічук М. М. Загальна екологія : навч. посіб. Житомир : ДУЖП, 2021. 112 с.
3. Єфремова О.О. Біотестування : навч. посіб. Кременчук : КДПУ, 2008. 45 с.
4. Запитання та відповіді щодо барвників для споживачів». Управління з харчових продуктів і медикаментів США, FDA, 2018. URL: [www.fda.gov/food/food-additives-petitions/color-additives-questions-and-answers-consumers](http://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/color-additives-questions-and-answers-consumers)
5. Кундельчук О. П., Орлова-Гудім К. С., Іосипчук А. М. Екологічна паразитологія : матер. для підготовки до практичних та семінарських занять : навч.-метод. посіб. для здобувачів ступеня вищої освіти бакалавр спеціальностей 091 Біологія і 014.05 Середня освіта (Біологія) денної та заочної форм навчання. Херсон : ПП Вишемирський В.С., 2021. – 244 с.
6. Лисиця А.В. Біоіндикація і біотестування забруднених територій : навч. посіб. Рівне : РДГУ, 2018. С. 76-77.
7. Новосад Н. Лабораторні тварини і техніка біологічного експерименту : навч. посіб. Запоріжжя : ЗНУ, 2011. Т. 146. С. 19-22.
8. Орлова-Гудім, К. С., Шевченко, І. В. Досвід використання гідробіологічних методів для моніторингових досліджень об'єктів природно-заповідного фонду. *Моніторинг та охорона біорізноманіття в Україні: Тваринний світ. Серія: «Conservation Biology in Ukraine»*. 2020. Т. 16(2). С. 158-162.
9. Регламент Європейського Парламенту і Ради ЕС про смако-ароматичні добавки. С.6.

URL: [https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994\\_a20#Text](https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994_a20#Text) (дата звернення: 18.11.2022).

10. Список дозволених, заборонених та небезпечних харчових добавок. Електронний ресурс URL: [http://www.chaskor.ru/article/polnyj\\_spisok\\_razreshennyh\\_zapreshchennyh\\_i\\_opasnyh\\_pishchevyh\\_dobavok\\_10995](http://www.chaskor.ru/article/polnyj_spisok_razreshennyh_zapreshchennyh_i_opasnyh_pishchevyh_dobavok_10995)
11. Танака Т. Вивчення репродуктивної та нейроповедінкової токсичності тартразину, що вводиться мишам з їжею. Харчова хімія. Токсикол. 2006; 44: 179-187.
12. Упатова О.А. Харчові добавки : короткі конспекти лекцій. Харків : ХДУ, 2013. С.23.
13. Червінський Л. С., Книжка Т. С., Романенко О. І., Луцак Я. М. Теоретичне обґрунтування механізму керування впливом оптичного випромінювання на біологічні системи на основі фотореактивації. *Науковий вісник НУБіП України*. 2016. Вип. 242. С. 106–116.
14. Aboel-Zahab H., El-Khyat Z., Sidhom G., Awadallah R., Abdel-Al W., Mahdy K. Physiological effects of some synthetic food colouring additives on rats. *Boll. Chim. Farm.* 1997. Vol. 136. P. 615 – 627.
15. Benitez L. Somatic Mutation and Recombination Test in Drosophila Used for Biomonitoring of Environmental Pollutants. *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change 2: A Handbook*. 2001. Vol. 56. P. 221.
16. Bhattacharjee M. Evaluation of mitodepressive effect of sunset yellow using *Allium sativum* assay. *International Journal of Science, Environment and Technology*. 2014. Vol. 3(3). P. 1120–1130.
17. Borzelleca J., Depukat K., Hallagan J. Lifetime toxicity/carcinogenicity studies of fd & c blue no. 1 (brilliant blue fcf) in rats and mice. *Food Chem. Toxicol.* 1990. Vol. 28. P. 221–234.
18. Davydova A. O., Orlova-Hudim K. S., Shevchenko I. V., Davydov D. A., Dzerkal V. M. The first record of *Elodea nuttallii* (Hydrocharitaceae) in the

- Lower Dnipro River. *Ukrainian Botanical Journal*. 2021. Vol. 78. P. 303–307. <https://doi.org/10.15407/ukrbotj78.04.303>
19. Kim H. M., Lee E. H., Cho H. H., & Moon Y. H. Inhibitory effect of mast cell-mediated immediate-type allergic reactions in rats by Spirulina. *Biochemical Pharmacology*. 1998. Vol. 55(7). P. 1071-1076.
20. Kobylewski S., Jacobson M.F. Food Dyes, a Rainbow of Risks. *Washington, DC, Center for Science in the Public Interest*, 2010. <https://cspinet.org/new/pdf/food-dyes-rainbow-of-risks.pdf>
21. Lau K., McLean W. G., Williams D. P., & Howard C. V. Synergistic interactions between commonly used food additives in a developmental neurotoxicity test. *Toxicological Sciences*. 2006. Vol. 90. P. 178-187.
22. Levin D. E., Yamasaki E. and Ames B. N.(1982). A new *Salmonella* tester strain, TA97, for the detection of frameshift mutagens. A run of cytosines as a mutational hot-spot. *Mutat Res* 94(2): 315-330.
23. Martyniuk V., Khoma V., Matskiv T., Baranovsky V., Orlova-Hudim K., Gylytė B., Symchak R., Matciuk O., Gnatyshyna L., Manusadžianas L., & Stoliar O. Indication of the impact of environmental stress on the responses of the bivalve mollusk *Unio tumidus* to ibuprofen and microplastics based on biomarkers of reductive stress and apoptosis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2022. Vol. 261. P. 109425. doi:10.1016/j.cbpc.2022.109425
24. Merinas-Amo R., Martinez-Jurado M., Jurado-Güeto S., Alonso-Moraga A., Merinas-Amo T. Biological Effects of Food Coloring in *In Vivo* and *In Vitro* Model Systems. *Foods*. 2019. Vol. 8(5). P. 176.
25. Sasaki Y.F., Kawaguchi S., Kamaya A., Ohshita M., Kabasawa K., Iwama K., Taniguchi K., Tsuda S. The comet assay with 8 mouse organs: Results with 39 currently used food additives // *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagenesis* – 2002. – Vol. 519. – P. 103 – 119.

26. Stoliar O., Martinyuk V., Gylyté B., Matskiv T., Khoma V., Tulaidan H., Gnatyshyna L., Orlova-Hudim K., and Manusadzianas L. Population-dependent stress response of bivalve mollusc *Unio tumidus* to ibuprofen, microplastic and their mixture. *Research square*. 2022. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1570340/v1>
27. Türkoğlu, Ş. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. Mutation Research. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2007. Vol. 626(1-2). P. 4-14.