УДК 577.2:575:57.08:658.562

МОНІТОРИНГ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ, КОРМІВ ТА СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ СИРОВИНИ В УКРАЇНІ НА ВМІСТ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ ІНГРЕДІЄНТІВ

Р. В. ОБЛАП, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник лабораторії молекулярно-генетичних досліджень

ДП Укрметртестстандарт

E-mail: roblap@hotmail.com

Н. Б. НОВАК, кандидат сільськогосподарських наук, науковий співробітник лабораторії молекулярно-генетичних досліджень

ДП Укрметртестстандарт

Т. М. ДИМАНЬ, доктор сільськогосподарських наук,
професор кафедри харчових технологій

Білоцерківський національний аграрний університет

<https://doi.org/10.31548/bio2018.03.006>

Відпрацьовано методику та розроблено низку тест-систем для визначення генетично модифікованих (ГМ) рослин методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (ПЛР-РЧ, Real-Time PCR). За допомогою розроблених тест-систем проведено моніторинг розповсюдження ГМ рослин в Україні. Отримані результати свідчать про необхідність контролю харчової продукції та сільськогосподарської сировини щодо присутності ГМ інгредієнтів, зокрема продуктів переробки сої, кукурудзи та ріпаку.

Ключові слова: генетично модифіковані організми, полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу, харчова продукція

Актуальність. В умовах стрімкого росту населення і виснаження біоресурсів ідея застосування генетично модифікованих організмів (ГМО) у харчовій промисловості «працює» на користь стратегії виживання людства. Значні посівні площі під ГМ культурами у світі є переконливим доказом ефективності, економічної і екологічної переваги та доцільності вирощування біотехнологічних культур, за розумного поєднання з системами відстеження харчової та екологічної безпеки. Так, за даними ISAAA станом на 2016 рік, в 26 країнах світу

біотехнологічні культури вирощували на 185,1 млн га, що відповідає більш ніж 10 % придатної орної землі. Найбільші площі зайнято під трансгенними рослинами сої (50 %), кукурудзи (33 %), бавовни (12 %) та ріпаку (5 %) [1]. Однак, як і будь-який витвір людського розуму, використання ГМО несе певні ризики. До таких ризиків можна віднести неконтрольоване поширення трансгенних матеріалів та негативний вплив на традиційні сільгоспкультури і дикі рослини; можливу небезпечність ГМ продуктів для здоров'я людини; економіч-

ні збитки як для окремих фермерів, так і цілих країн за умов масштабного використання нових видів продукції великими транснаціональними корпораціями [2].

Тому в багатьох країнах світу, зокрема в Україні, розроблено нормативну базу, яка регламентує контроль над поширенням ГМО. Вона включає оцінювання безпеки розроблених ГМО, їх реєстрацію та пост-реєстраційний моніторинг харчової продукції, виготовленої за їх участі [3].

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Оскільки велика частка врожаю сільськогосподарських культур реалізується на зовнішніх ринках, українські експортери зацікавлені в його контролі на наявність ГМО [4]. Стосовно України, офіційні дані щодо вирощування біотехнологічних культур відсутні. Однак дослідження зразків насіння сої, кукурудзи та ріпаку, а також харчової продукції вітчизняного виробництва на вміст ГМО впродовж 2007–2016 років, проведені в лабораторії молекулярно-генетичних досліджень ДП «Укрметртестстандарт», засвідчили наявність генетично модифікованої складової [5]. Дані, опубліковані на сайті Державної санітарно-епідеміологічної служби України, також підтверджують присутність ГМО в країні [6]. Результати проведених досліджень інститутом свинарства і агропромислового виробництва НААН показали присутність біотехнологічної сої, кукурудзи та ріпаку у потенційній комбікормовій сировині [7].

Для здійснення контролю за обігом ГМО надзвичайно важливим є наявність відповідної матеріально-технічної бази, високоефективних методик визначення ГМО, сучасних, високочутливих та доступних діагностикумів.

Тому метою даної роботи було відпрацювання методики визначення ГМ рослин та розроблення вітчизняних тест-систем для здійснення моніторингу харчових продуктів, кормів та сільськогоспо-

дарської сировини в Україні на вміст генетично модифікованих інгредієнтів.

Матеріали і методи. Дослідження проводили у лабораторії молекулярно-генетичних досліджень ДП «Укрметртестстандарт». Матеріалом для виділення ДНК слугували стандартні референтні зразки традиційних та ГМ культур, дослідні зразки харчової продукції, кормів та сільськогосподарської сировини. ДНК виділяли методом СТАБ-преципітації із власними модифікаціями. Концентрацію виділеної нуклеїнової кислоти та її чистоту за співвідношеннями A260/A280 та A260/A230 визначали на спектрофотометрі «BioPhotometer AG 22331» (Eppendorf, Німеччина).

ПЛР-ампліфікацію проводили за допомогою приладів iQCyler (BioRad, Франція) та CFX96 (BioRad, США). Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила 2 мкл ДНК, 10 мМ Tris-HCl (pH 8,3), 50 мМ KCl, 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ дНТФ суміші, 10 пкМ кожного з праймерів, 5 пкМ зонду та 1 од. Taq-полімерази (ThermoScientific™, Литва). Олігонуклеотидні зонди було мічено флуоресцентними барвниками FAM, HEX, ROX, Cy5 та гасниками флуоресценції BHQ1 і BHQ2. Температурний режим складався з початкової денатурації упродовж 3 хв за 95 °C та наступних 45 циклів: денатурації – 15 с за 95 °C, гібридизації праймерів та синтезу – 40 с за 60 °C. Флуоресцентний сигнал вимірювали по завершенню стадії відпалу праймерів та синтезу у кожному циклі ампліфікації.

Результати та їх обговорення. Зазвичай скринінговий аналіз щодо присутності ГМО проводять за найбільш поширеними регуляторними елементами генно-інженерних конструктів, такими як промотор 35s вірусу мозаїки цвітної капусти (cauliflower mosaic virus, CaMV) та термінатор NOS з *Agrobacterium tumefaciens*. Але на сьогодні у зв'язку із розробкою ГМО другого та третього покоління, ця стратегія вже не спрацьовує [2]. До того ж, детекція лише одного Р35s

ще не свідчить про присутність генно-інженерного конструкту, а може мати природне походження, як у випадку ріпаку, інфікованого вірусом CaMV. Одним із підходів, що широко використовується при визначенні ГМО, є аналіз за структурними генами. Водночас додатковим способом направити специфічність реакції в потрібному напрямку є підбір праймерів, специфічних до ДНК послідовності, локалізованої в різних генетичних елементах, наприклад, промоторі – структурному гені або структурному гені – термінаторі. Такий тип аналізу дозволяє виявляти значно меншу кількість відомих ГМО порівняно з визначенням за регуляторними елементами, але є більш специфічним [8]. Проведений нами порівняльний аналіз генно-інженерних конструктів, що використовувались для створення трансгенних ліній рослин, дозволив виявити ряд унікальних послідовностей, що надаються до використання в якості мішеней при проведенні ПЛР аналізу. Всього було відібрано три таких послідовності: ген 5-енолпірувілшкімат-3-фосфат синтази (CP4 *epsps*) із *Agrobacterium tumefaciens* штам CP4; гени фосфінотрицини N-ацетилтрасферази із *Streptomyces viridochromogenes* (Pat) та фосфінотрицини N-ацетилтрасферази із *Streptomyces hygrosopicus* (Bar).

Для проведення моніторингу обігу ГМО використовували тест-системи власного виробництва [9]. Тест-системи розробляти на основі *TaqMan* - технології методу ПЛР у режимі реального часу [8]. Частину праймерів для проведення ПЛР-РЧ було підібрано самостійно за допомогою комп'ютерної програми Primer Express 3.0 (Applied Biosystems), деякі послідовності взято з електронної бази даних JRC [10]. Зонди, специфічні до послідовностей CP4 *epsps* та tNOS, було мічено флуоресційним барвником ROX, зонди до гену Pat та P35s було мічено барвником FAM, до гену Bar – барвником Cy5 та ендогенного контролю – HEX. В

якості ендогенного видоспецифічного контролю перебігу ПЛР використовували гени лектину (*leI*) сої, алкогольдегідрогенази (*adhI*) кукурудзи та круцеферину (*cruA*) ріпаку.

Оптимізацію умов ампліфікації проводили за такими параметрами як температура гібридизації праймерів, концентрація $MgCl_2$, концентрація та співвідношення праймерів і зондів. Оцінювання ефективності роботи тест-систем, а саме специфічності, чутливості, межі детектування, повторюваності та відтворюваності результатів аналізу проводили відповідно до вимог Об'єднаного Центру досліджень ГМО (JRC, ЕС) з використанням сертифікованих референтних зразків Бельгійського інституту контрольних матеріалів і методів (IRMM, ЕС) та Американської асоціації хіміків нафтохімічної та масложирової промисловості (AOCS, США). ДНК кожного стандартного та випробувального зразків екстрагувалася та аналізувалася у двох повторях. Експериментальне визначення специфічності не виявило перехресних реакцій. Межа чутливості системи становила близько 20 копій ДНК-мішені, що відповідає вимогам ДСТУ ISO 21570 : 2008 [10].

Таким чином, було розроблено низку тест-систем, які дозволяють виявляти більшість зареєстрованих ліній ГМ сої, кукурудзи та ріпаку без їх детальної ідентифікації за регуляторними елементами та генами «нової» ознаки. Системи є мультиплексними, оскільки уможливають проведення трьох-чотирьох незалежних реакцій в одній пробірці.

Моніторинг харчової продукції, кормів та сільськогосподарської сировини, проведений впродовж 2007 – 2017 рр., виявив присутність в Україні біотехнологічних рослин (табл. 1). Всього за цей період лабораторією було досліджено 17 636 зразків, дві третини з яких становила харчова продукція. Сільськогосподарська сировина

здебільшого була представлена такими культурами як соя, кукурудза, ріпак, пшениця, рис та продукти їхньої переробки.

У 2007 році лабораторією було здійснено 413 аналізів продуктів харчування, кормів для тварин та сільськогосподарської сировини, представлених на внутрішньому ринку України щодо вмісту ГМ інгредієнтів. Результати випробувань були вражаючими. В 22 % випадків зразки містили у своєму складі ГМО. Причому, у 36 зразках продуктів харчування (9 % від загальної кількості випробуваних зразків) та 42 зразках кормів і сировини (10 %) вміст ГМО виявився більшим за 0,9 %. Найчастіше ГМО виявляли у ковбасних виробках та м'ясних напівфабрикатах, до складу яких входив соєвий білок. Також ГМ інгредієнти зустрічались у кондитерській та іншій харчовій продукції, яку було виготовлено з використанням соєвих бобів та кукурудзи. Таким чином, відсутність законодавчих актів та контролю за обігом ГМО в країні призвела до несанкціонованого завезення та вирощування в Україні посівного матеріалу трансгенних культур, а також їхнього використання у харчовій промисловості.

У 2008 зріс обсяг випробувань та спектр продукції. Значну частку склали продовольча сировина. З 1177 зразків 1080

(92 %) виявились такими, що не містять ГМО. ГМО було виявлено у 21 зразку харчових продуктів, з яких у 13 вміст виявився більшим за 0,9%. Гіршою ситуація була у сировині, де ГМО було виявлено у 70 зразках. Причому 21 з них містили ГМО у кількості вищій за 0,9 %. Що стосується кормів, то ГМО було виявлено в 6 зразках, в 1 зразку кількість перевищувала 0,9%.

У зв'язку з прийняттям постанови Кабінету Міністрів України № 468 від 13.05.2009 "Про затвердження Порядку етикетування харчових продуктів, які містять генетично модифіковані організми або вироблені з їх використанням та вводяться в обіг", у 2009 зріс обсяг аналізів. Загальна кількість перевірених зразків складала 2126. ГМО було виявлено у 107 зразках, що становило 5 %. В продуктах харчування ГМО було виявлено у 17 зразках, в 13 з них концентрація перевищувала 0,9 %. В той же час в сировині ГМО було виявлено у 77 зразках, в 36 вміст перевищував 0,9 %. Також ГМО було виявлено в 13 зразків кормів для тварин, що містили в своєму складі сою або кукурудзу.

У 2010 році кількість перевірених зразків ще збільшилась та досягла 2570. ГМО було виявлено у 204 випадках, що складало 7 %. Серед продуктів харчування ГМО

1. Моніторинг обігу ГМО в Україні за 2007 – 2017 рр.

Рік	Кількість зразків	Виявлено ГМО	Харчові продукти		Корми		Сировина	
			< 0.9%	> 0.9%	< 0.9%	> 0.9%	< 0.9%	> 0.9%
2007	413	90 (22%)	28	36	8	3	40	39
2008	1177	97 (8%)	8	13	5	1	49	21
2009	2126	107 (5%)	4	13	7	6	41	36
2010	2570	204 (8%)	62	9	3	2	99	29
2011	1866	59 (3%)	0	3	8	3	21	24
2012	2001	67 (3%)	5	3	1	1	24	33
2013	1769	66 (4%)	0	4	2	0	29	15
2014	1609	77 (5%)	1	6	0	1	19	21
2015	1545	126 (8%)	6	2	4	2	36	29
2016	1360	66 (5%)	4	3	5	2	22	11
2017	1200	95 (8%)	7	4	8	6	47	23

було виявлено у 71 зразку, з яких лише у 9 вміст перевищував 0,9 %. ГМО було виявлено в 5 зразках кормів, в 2 вміст перевищував 0,9 %. Покращився стан і з сировиною. Зі 128 зразків у 29 вміст ГМО перевищував 0,9 %, тобто співвідношення близьке до 1 : 3. В той же час у попередні роки воно наближалось до 1 : 1.

У 2011 році кількість зразків, що надішли до лабораторії, значно зменшилась. З 1866 зразків, які було проаналізовано, ГМО виявлено у 59, що склало 3 %. Водночас серед досліджених продуктів харчування ГМ інгредієнти містилися лише у 3 зразках, в кількостях понад 0,9 %. Що стосується кормів та сировини, то кількість зразків з ГМО становила 56, з них 27 - в кількості більшій 0,9 %.

Протягом 2012 року було перевірено вже 2001 зразок продуктів харчування та сільськогосподарської сировини. ГМ складову було виявлено у 67 зразках, 8 з яких становила готова продукція, 2 - корми та 57 - сировина. У 3 зразках харчової продукції, 1 - кормів та у 33 зразках сировини, кількість ГМО перевищувала 0,9 %. У цілому загальна картина за 2011 та 2012 роки дуже подібна. Кількість виявлених ГМО склала 3 %, значно зменшилась кількість готової продукції, в якій було виявлено ГМО (відповідно 0,2 та 0,4 %) та сировини з вмістом ГМО більше 0,9 % (відповідно 1,4 та 1,7 %).

Впродовж 2013 – 2014 рр. було проаналізовано 6040 зразків харчової продукції, кормів та сільськогосподарської сировини. Приблизно половину з них становила рослинна сировина, зокрема соя, кукурудза, ріпак, пшениця, ячмінь та рис, а також продукти їх переробки. Як у харчових продуктах, так і в сировині було виявлено присутність біотехнологічних культур. У харчовій продукції та кормах виявляли переважно ГМ сою та кукурудзу, у ГМ сировині – ГМ сою, кукурудзу та ріпак. У 2013 та 2014 рр. було виявлено 66 (4 %) та 77 (5 %) зразків відповідно, що містили

у своєму складі ГМ рослини. З них у 47 зразках ГМО були присутні у кількостях, що перевищували 0,9 %.

У 2015 році кількість виявлених зразків з ГМО зросла до 8 %. Між тим, переважна більшість зразків, що містили у своєму складі ГМО, була представлена сільськогосподарською сировиною. Протягом 2016 року у лабораторії було виявлено 5 % зразків з ГМ інгредієнтами. Переважна більшість виявлених зразків була представлена соєвими бобами та зерном кукурудзи. Що стосується 2017 року, то відсоток виявлених ГМО знов збільшився до восьми. Всього було виявлено 95 зразків, що містили в своєму складі ГМО, з них 11 серед харчової продукції, 14 у кормах та 70 у сировині.

Такими чином, виявлені біотехнологічні культури були представлені соєю, кукурудзою та ріпаком. На жаль, цілісну картину розповсюдження ГМ рослин у масштабах всієї країни відстежити неможливо, оскільки в більшості лабораторій України доступ до цієї інформації є обмеженим.

Висновки. Було відпрацьовано методичний підхід та розроблено ряд діагностичних тест-систем на основі методу ПЛР-РЧ для визначення ГМО. Тест-системи дозволяють виявляти більшість трансгенних культур без їх детальної ідентифікації. Розроблені тест-системи за своїми характеристиками відповідають міжнародним стандартам щодо проведення ПЛР-аналізу для визначення якісного та кількісного вмісту ГМО в харчових продуктах та продовольчій сировині. Розроблені тест-системи було успішно використано під час проведення моніторингу розповсюдження ГМ культур в Україні. Дані, отримані протягом останніх десяти років, свідчать про присутність трансгенної сої, кукурудзи та ріпаку, в кількостях, перевищуючих 0,9 %, не дивлячись на фактичну заборону вирощування біотехнологічних культур в країні.

Література

1. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016 / ISAAA Brief №52. – ISAAA: Ithaca, NY. – 2016. URL: <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/52/download/isaaa-brief-52-2016.pdf> (дата звернення: 22.05.2018).
2. Димань Т.М. [та ін.] Генетично модифіковані с/г культури: прогрес, проблеми, перспективи : монографія / передмова та ред. Т.М. Димань, Л.Г. Шморгун. –К.: Проблеми інноваційно-інвестиційного розвитку, 2013. –158 с.
3. Волков О. Державне регулювання обігу ГМО в Україні: поточний стан та концепція / Проект USAID «АгроІнвест», 2014. URL: <https://www.facebook.com/USAIDAgroInvest/> (дата звернення: 18.04.2018).
4. Сільське господарство України. Статистичний збірник 2015. К. : Державна служба статистики України, 2016. 360 с.
5. Моніторинг продуктів харчування та сільськогосподарської сировини в Україні на вміст генетично модифікованих інгредієнтів / Р.В. Облап // Вісник аграрної науки. 2014. № 1. С. 59-63.
6. Офіційний сайт державної санітарно-епідеміологічної служби України. URL: <http://dsesu.gov.ua> (дата звернення: 18.04.2018).
7. Моніторинг наявності генетичних модифікацій та зоотехнічний склад зернової сировини Полтавського регіону / С. О. Семенов [та ін.] // Свилярство. 2014. Вип. 65. С. 216-224.
8. Ребриков Д.В. [и др.] ПЦР в реальном времени / под редакцией Д.В. Ребрикова. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 223 с.
9. ТУ У 24.6-02568182-001:2011. Тест-системи для визначення якісного та кількісного вмісту генетично модифікованих організмів (ГМО) рослинного походження в харчових продуктах. Технічні умови. Київ: ДП «Укрметртестстандарт», 2012. 52 с.
10. JRC GMO-Matrix URL: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/jrcgmomatrix/matrices/full> (дата звернення: 07.06.2017).
11. ДСТУ ISO 21570:2008. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Кількісні методи на основі аналізування нуклеїнової кислоти. Київ : Держспоживстандарт України, 2009. 70 с.

References

1. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016 / ISAAA Brief №52. Available at: <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/52/download/isaaa-brief-52-2016>.
2. Dyman, T.M., Kozlovska, M.V., Oblap, R.V., Dubin, O.V., Kravchenko, O.I. (2013). Biotchnological agricultural crops: progress, problems, perspectives: monograph / front and edited by Dyman T.M., Shmorgun L.G. Kyiv, Ukraine: Problems of innovative-investment complex, 158.
3. Volkov, O. (2014). Governmental regulation of GMO circulation in Ukraine: Current status and conception. Project USAID «AgroInvest». Available at: http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PA00KRK3.pdf.
4. Agriculture in Ukraine. Statistical collection 2015. (2016). Kyiv, Ukraine: Governmental statistic service of Ukraine, 360.
5. Oblap, R.V. (2014). Gm-monitoring of food products and agricultural raw material in Ukraine. Visnyk ahrarnoi nauky, 1, 59–63.
6. Governmental sanitary-and-epidemiological service of Ukraine. Available at: <http://dsesu.gov.ua>.
7. Semenov, S. O. (2014). Monitoring of presence of genetic modifications and zootechnic composition grain raw material in Poltava region. Pig breeding, 65, 216-224.
8. Rebrikov, D.V., Samatov, G.A., Trofimov, D.Yu., Semenov, P.A., Savilova, A.M., Kofiadi, I.A., Abramov, D.D. (2009). Real-Time PCR / edited by D.V. Rebrikov. Moscow, Russia: BINOM. Laboratory of knowledge, 223.
9. TU U 24.6-02568182-001:2011. (2012). Kits for quantitative and qualitative detection of plant origin GMO content in food products. Technical conditions. Kyiv, Ukraine: SE «Ukrmetrtteststandart», 52.
10. JRC GMO-Matrix URL: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/jrcgmomatrix/matrices/full> (дата звернення: 07.06.2017).
11. DSTU ISO 21570:2008. (2009). Methods of GMO detection and products with GM-contents. Quantitative methods on the basis of DNA analysis. Kyiv, Ukraine: Derzhspozhivstandart Ukraine, 70.

SUMMARY

R. Oblap, N. Novak, T. Dyman. *Monitoring of food, feed, agricultural raw material for genetically modified ingredients in Ukraine* // *Biological Resources and Nature Managment.* – 2018. – **10**, №3–4. – P.49–55. <https://doi.org/10.31548/bio2018.03.006>

Methodology and test-systems for GM-plant detection by Real-Time PCR were designed. Monitoring of GM-plant distribution in Ukraine was performed. Obtained results showed an urgency of GM-ingredients control in food products and agricultural raw material, particularly soybean, maize and rape-processed products.

Keywords: *genetically modified organisms, Real-Time polymerase chain reaction, food products*

АННОТАЦІЯ

Р. В. Облап, Н. Б. Новак, Т. Н. Димань. *Мониторинг пищевых продуктов, кормов и сельскохозяйственного сырья в Украине на содержание генетически модифицированных ингредиентов* // *Биоресурсы и природопользование.* – 2018. – **10**, №3–4. – С.49–55. <https://doi.org/10.31548/bio2018.03.006>

Отработано методику и разработано ряд тест-систем для определения генетически модифицированных (ГМ) растений методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ, Real-Time PCR). С помощью разработанных тест-систем осуществлен мониторинг распространения ГМ растений в Украине. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости осуществления контроля пищевой продукции, кормов и сельскохозяйственного сырья, на наличия ГМ ингредиентов, особенно продуктов переработки сои, кукурузы и рапса.

Ключевые слова: *генетически модифицированные организмы, полимеразная цепная реакция в реальном времени, пищевая продукция*