



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110534** (13) **U**  
(51) МПК (2016.01)

**G01N 33/12** (2006.01)

**G01N 1/28** (2006.01)

**G01N 1/30** (2006.01)

**G01N 21/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2016 04414</b>	(72) Винахідник(и): <b>Ігнатовська Маріанна Володимирівна (UA), Якубчак Ольга Миколаївна (UA), Хомутенко Вікторія Ігорівна (UA), Карпуленко Максим Сергійович (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>21.04.2016</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>10.10.2016</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.10.2016, Бюл.№ 19</b>	(73) Власник(и): <b>НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ-41, 03041 (UA), УКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО- ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ "РЕСУРС", вул. Казимира Малевича, 84, м. Київ-150, 03150 (UA)</b>

## (54) СПОСІБ ОЦІНКИ ТОКСИЧНОСТІ М'ЯСНИХ КОНСЕРВІВ

### (57) Реферат:

Спосіб оцінки токсичності м'ясних консервів включає гомогенізацію, відбір гомогенізату, його стерилізацію 30 хв., охолодження до кімнатної температури та внесення *Tetrahymena pyriformis*, витримку 60 хв. При цьому в стерильних умовах вносять 1 см<sup>3</sup> культури *Tetrahymena pyriformis* з визначеною в камері Горяєва кількістю клітин в 1 см<sup>3</sup>, переносять в стерильних умовах 0,1 см<sup>3</sup> досліджуваного зразка в чисту пробірку, потім вносять 0,2 см<sup>3</sup> 5 %-го водного розчину еозину, перемішують і витримують 5 с, додають 0,3 см<sup>3</sup> 10 %-го водного розчину нігрозину, перемішують і витримують 6 с, готують тонкий мазок та за підрахунком пофарбованих у рожевий відтінок мертвих інфузорій визначають токсичність.

UA 110534 U



Корисна модель належить до галузі ветеринарної медицини, зокрема до ветеринарної санітарії, і може бути використана для визначення токсичності м'ясних консервів.

Найбільш близьким за суттю є аналог (ДСТУ 3570-97 "Зерно фуражне, продукти його переробки, комбікорми. Методи визначення токсичності" та Методические рекомендации для использования экспресс-метода биологической оценки продуктов и кормов под редакцией Беленького Н.Г.), який передбачає підрахунок кількості живих мікроорганізмів тетрагімени піриформіс у краплі.

Згідно з чинними методиками дослідження здійснюються наступним чином:

Приготування поживних середовищ:

Вуглеводно-сольове дріжджове середовище (ВСД). До 100 см дистильованої води додають (г) глюкози - 1,5, дріжджового екстракту - 0,1, морської солі - 0,1. Розчином натрію гідроксиду рН середовища доводять до 7-7,5.

Пептонне середовище. До 100 см<sup>3</sup> дистильованої води додають (г): пептон бактеріологічний - 2,0, глюкози - 0,5, дріжджового екстракту - 0,1, морської солі - 0,1. Розчином натрію гідроксиду рН середовища доводять до 7-7,5. Пептонне середовище використовують для пересіву культури інфузорії через кожні 4-5 діб стерильною піпеткою. Середовище розливають в бактеріологічні пробірки по 2 см<sup>3</sup> і стерилізують в автоклаві протягом 30 хв. при 1 атм або в киплячій воді протягом 1 години. Після того, як середовище охолоне, здійснюють пересів, вносять 0,2 см<sup>3</sup> інфузорії. Пробірки з культурою інфузорії зберігають за температури 22-24 °С.

Пробопідготовку здійснюють наступним чином: відбирають наважку досліджуваного продукту в кількості 2,4 мг за азотом, поміщають в ступку і розтирають товкачем протягом 1-2 хв. Потім туди ж додають 8 мл середовища ВСД, гомогенізують 1-2 секунди товкачем і зливають в окрему пробірку. Після перемішування отриманого субстрату з пробірки відбирають піпеткою 2 мл суспензії і розливають в кожен з трьох флаконів з-під антибіотиків, додають 0,1 см<sup>3</sup> 3-5 добової культури інфузорії тетрагімени піриформіс і залишають за кімнатної температури. Через 30 і 60 хв. обчислюють ефект біопроби в краплі, взятій пастерівською піпеткою, на предметному склі під мікроскопом (збільшення 7×10), проглядають місткість краплі і всіх її шарів. У досліджуваних пробах обчислюють кількість живих і загиблених інфузорій, яка залежить від ступеня токсичності проби: нетоксична проба - загибелі та будь-яких морфологічних змін у інфузорій не відбувається впродовж 60 хв. спостережень; слабкотоксична проба - морфологічні зміни та часткова (від 25 % до 30 %) загибель інфузорій впродовж 60 хв. спостережень; токсична проба - загибель усіх інфузорій впродовж 60 хв. спостережень.

Недоліком відомого аналога є те, що під час використання даного способу визначення токсичності відбувається шляхом підрахунку інфузорій у краплі є незручним, адже в процесі роботи відбувається підсихання краплі і підрахунок потрібно здійснювати у всіх шарах краплі.

Тому задачею запропонованої корисної моделі є удосконалення способу визначення токсичності м'ясних консервів, шляхом підрахунку фарбованих інфузорій.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі оцінки токсичності м'ясних консервів, який включає гомогенізацію, відбір гомогенізату, його стерилізацію 30 хв., охолодження до кімнатної температури та внесення *Tetrahymena pyriformis*, витримку 60 хв., згідно з корисною моделлю, в стерильних умовах вносять 1 см<sup>3</sup> культури *Tetrahymena pyriformis* з визначеною в камері Горяєва кількістю клітин в 1 см<sup>3</sup>, переносять в стерильних умовах 0,1 см<sup>3</sup> досліджуваного зразка в чисту пробірку, потім вносять 0,2 см<sup>3</sup> 5%-го водного розчину еозину, перемішують і витримують 5 с, додають 0,3 см<sup>3</sup> 10 %-го водного розчину нігрозину, перемішують і витримують 6 с, готують тонкий мазок та за підрахунком пофарбованих у рожевий відтінок мертвих інфузорій визначають токсичність.

Суть способу, що пропонується, пояснюють проведені дослідження.

Приготування поживних середовищ та культивування *Tetrahymena pyriformis*: вуглеводно-сольове дріжджове середовище (ВСД). До 100 см<sup>3</sup> дистильованої води додають (г) глюкози - 1,5, дріжджового екстракту - 0,1, морської солі - 0,1. Розчином натрію гідроксиду рН середовища доводять до 7-7,5.

Пептонне середовище. До 100 см<sup>3</sup> дистильованої води додають (г): пептон бактеріологічний - 2,0, глюкози - 0,5, дріжджового екстракту 0,1, морської солі - 0,1. Розчином натрію гідроксиду рН середовища доводять до 7-7,5. Пептонне середовище використовують для пересіву культури інфузорії через кожні 4-5 діб стерильною піпеткою. Середовище розливають в бактеріологічні пробірки по 2 см<sup>3</sup> і стерилізують в автоклаві протягом 30 хв. при 1 атм або в киплячій воді протягом 1 години. Після того як середовище остигне здійснюють пересів, вносять 0,2 см<sup>3</sup> інфузорії. Пробірки з культурою інфузорії зберігають за температури 22-24 °С.

Приклад конкретного виконання

Спосіб оцінки токсичності м'ясних консервів з використанням підрахунку фарбованих інфузорій тетрагімени піриформіс здійснюється наступним чином. Було відібрано один контрольний та два дослідних зразка.

Підготовка зразка для випробування.

- 5 При дослідженні м'ясних консервів з яловичини зразок піддають гомогенізації. Відбирають наважку в кількості 0,1 г гомогенату, поміщають в пробірку з притертим корком, об'ємом 20 см<sup>3</sup>, додають 8 см<sup>3</sup> середовища ВСД, злегка струшують і залишають в штативі на 5 хв. Після відстоювання повторно струшують протягом 2 хв. і відстоюють 20 хв. Отриманий розчин фільтрують через фільтрувальний папір. Рідина являє собою розчин водорозчинних компонентів досліджуваного продукту. Фільтрат досліджуваних зразків в кількості по 1 см<sup>3</sup> переносять в пеніцилінові флакончики і піддають стерилізації протягом 30 хв. Після охолодження флакона до кімнатної температури в стерильних умовах вносять 1 см<sup>3</sup> культури *Tetrahymena pyriformis* із заздалегідь визначеною в камері Горєва кількістю клітин в 1 см, а саме: культуру, розбавлену водою 1:1, фіксують 1 краплею 5 %-ного спиртового розчину йоду.
- 10 Підраховують кількість інфузорій у всіх 225 великих квадратах. Кожну пробу досліджують не менше ніж в 3-х повторностях, після чого виводять середнє арифметичне значення. Останнє множать на 2222 та отримують кількість інфузорій в 1 см<sup>3</sup>.

- Через 1 годину обережно струшують флакончик і переносять в стерильних умовах 0,1 см<sup>3</sup> досліджуваного зразка в чисту пробірку. Дослідження проводять в п'яти повторностях, готуючи на кожний дослідний зразок п'ять пробірок. Вносять 0,2 см<sup>3</sup> 5 %-го водного розчину еозину, перемішують з дослідним зразком і витримують 5 с. Наступним кроком додають 0,3 см<sup>3</sup> 10 %-го водного розчину нігрозину, перемішують і витримують 6 с. Після закінчення фарбування наносять краплю на предметне скельце та шліфованим склом готують тонкий мазок. Добре приготований мазок повинен бути рівним, по ширині такий мазок не повинен доходити 1,5-2 мм до країв скельця і займати 2/3-3/4 його довжини. Приготовані мазки необхідно висушити при кімнатній температурі чи в термостаті.
- 20 Мазок переглядають під малим збільшенням мікроскопа (окуляр ×7, об'єктив ×40). Оскільки живі клітини не фарбуються, а мертві фарбуються в рожевий відтінок, то досить просто їх відрізнити одну від одної. Підраховують загальну кількість клітин в мазку. Відсотковий вміст мертвих клітин визначається за формулою:

$$\text{Кл.мертві} = \frac{\text{Кл.рожеві}}{\text{Кл.загальні}} \times 100$$

Ступінь токсичності досліджуваного продукту визначають за таблицею 1.

Таблиця 1

Ступінь токсичності продукту

Ступінь токсичності продукту	Кількість живих інфузорій, %
Нетоксичний	100-80
Слаботоксичний	80-50
Токсичний	0-50

- 35 Результати підрахунку пофарбованих інфузорій наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

Результати підрахунку пофарбованих інфузорій, %

№ зразка	Мазок №									
	1		2		3		4		5	
	Ж	М	Ж	М	ж	М	Ж	М	Ж	М
Контроль	95	5	90	10	96	4	92	6	91	9
Дослід 1	85	15	84	16	88	12	84	16	86	14
Дослід 2	81	19	84	16	80	20	82	18	83	17

- 40 Наведені дані в табл. 2 свідчать про те, що за рахунок застосування методу фарбування інфузорій 5 %-м водним розчином еозину та 10 %-м водним розчином нігрозину відбувається точний підрахунок відсотка живих та мертвих інфузорій, що дає змогу конкретно встановити відсоток токсичності продукту.

Корисна модель дозволяє здійснювати визначення токсичності м'ясних консервів шляхом точного підрахунку живих та мертвих інфузорій *Tetrahymena pyriformis* внаслідок їх фарбування та визначати відсоток токсичності продукту, для попередження виникнення харчових отруєнь.

5

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

10

Спосіб оцінки токсичності м'ясних консервів, який включає гомогенізацію, відбір гомогенізату, його стерилізацію 30 хв., охолодження до кімнатної температури та внесення *Tetrahymena pyriformis*, витримку 60 хв., який **відрізняється** тим, що в стерильних умовах вносять  $1 \text{ см}^3$  культури *Tetrahymena pyriformis* з визначеною в камері Горяєва кількістю клітин в  $1 \text{ см}^3$ , переносять в стерильних умовах  $0,1 \text{ см}^3$  досліджуваного зразка в чисту пробірку, потім вносять  $0,2 \text{ см}^3$  5 %-го водного розчину еозину, перемішують і витримують 5 с, додають  $0,3 \text{ см}^3$  10 %-го водного розчину нігрозину, перемішують і витримують 6 с, готують тонкий мазок та за підрахунком пофарбованих у рожевий відтінок мертвих інфузорій визначають токсичність.

15

---

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601