



УКРАЇНА

(19) UA (11) 47469 (13) U
(51) МПК (2009)
G01N 33/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ФУНГІЦИДНОЇ ДІЇ ДЕЗІНФЕКТАНТІВ НА ТЕСТ-КУЛЬТУРАХ ASPERGILLUS FUMIGATUS, ASPERGILLUS FLAVUS, ASPERGILLUS NIGER

1

2

(21) u200906520

(22) 22.06.2009

(24) 10.02.2010

(46) 10.02.2010, Бюл.№ 3, 2010 р.

(72) КУЦАН ОЛЕКСАНДР ТИХОНОВИЧ,
ЯРОШЕНКО МАРГАРИТА ОЛЕГІВНА

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР
"ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ
ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ"

(57) Спосіб визначення фунгіцидної дії
дезінфектантів на тест-культурах Aspergillus
fumigatus, Aspergillus flavus, Aspergillus niger, що

включає вирощування тест-культур, висів у
поживне середовище, змивання, стандартизацію,
інкубування, який **відрізняється** тим, що
використовують як тест-культури плісняві гриби
роду Aspergillus, поживні середовища агару сусло і
агару Чапека, вирощують тест-культури впродовж
7 діб, проводять змивання 0,5 % розчином Твіну-
80, інкубацію за температури 25-27°C,
стандартизацію за допомогою підрахунку кількості
спор мікроміцетів у камері Горяєва, додатково
готують позитивний і негативний контролі.

Корисна модель відноситься до ветеринарної
санітарії, а саме до визначення фунгіцидних
властивостей та оптимальних режимів
застосування дезінфікуючих засобів на тест-
культурах роду Aspergillus.

Наявність на ринку великої кількості
дезінфікуючих засобів, які часто не мають
необхідного знезаражуючого ефекту, викликало
необхідність визначення фактичних фунгіцидних
концентрацій дезінфектантів на моделі широко
розповсюджених пліснявих грибів роду Aspergillus.

Існують методи оцінки вірусоцидної активності
дезінфектантів відносно вірусів ньюкаслської
хвороби птиці (Методичні рекомендації щодо
визначення вірусоцидної активності
дезінфектантів відносно вірусів ньюкаслської
хвороби птиці. Державний департамент
ветеринарної медицини Міністерства аграрної
політики України. Затв. протокол №3 від 23 грудня
2005 року). За цими методичними рекомендаціями
визначають лише вірусоцидні властивості
дезінфектантів на моделі вірусів ньюкаслської
хвороби птиці.

Існує спосіб визначення бактерицидної дії
дезінфектантів на тест-культури бактерій -
«Методические указания о порядке испытания
новых дезинфицирующих средств для
ветеринарной практики». Москва, утв. ГУВ
Госагропрома СССР 07.01.1987г.». За цим
способом визначають бактерицидні концентрації

дезінфектантів на штаммах тест-мікробів
Escherichia coli, Staphylococcus aureus.
Streptococcus faecalis, Micobacterium phlei, Oospora
lactis, Pseudomonas aeruginosa.

Для цього проводять вирощування тест-
культур, висіви у рідкі та щільні поживні
середовища, змивання фізіологічним розчином,
стандартизацію за стандартами каламутності
(кількість клітин у 1см³) та інкубування. Це рішення
може бути прототипом. Недоліком способу є те,
що визначають лише бактерицидну дію
дезінфікуючих препаратів.

В основу корисної моделі поставлено задачу
розробити спосіб визначення фунгіцидної дії
дезінфектантів на тест-культурах - плісняві гриби
Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus та
Aspergillus niger, що включає вирощування тест-
культур, висів у поживні середовища, змивання,
стандартизацію та інкубування, шляхом
використання у якості тест-культур - плісняві гриби
роду Aspergillus, поживних середовищ агару сусло
і агару Чапека, вирощування тест-культур
впродовж 7 діб, змивання 0,5% розчином Твіну-80,
інкубацію за температури 25-27°C, проведення
стандартизації за допомогою підрахунку кількості
спор мікроміцетів у камері Горяєва, додаткового
приготування позитивного і негативного контролів,
щоб забезпечити ефективність способу.

UA (19) 47469 (13) U

Порівняльний аналіз із прототипом дозволяє зробити висновок, що запропоноване рішення відповідає критерію «новизна».

Спосіб виконують таким чином.

Вирощування тест-культур мікроміцетів роду *Aspergillus* проводили на універсальних щільних поживних середовищах, що застосовуються для виділення і культивування грибів - агарі сусло і Чапека.

Для приготування агару сусло не хмільне пивне сусло, яке містить за звичай 12-14% цукру, фільтрують через тонкий шар вати і розводять дистильованою водою (у співвідношенні 1:2 або 1:3) до 3-7°C за ареометром Баллінга та додають 2% агар-агар. Готовий агар розливають у пробірки і стерилізують в автоклаві за температури 110 - 112°C, тиском - 0,5 кгс/см², впродовж 20 хвилин.

Штами тест-культур вирощують на щільному поживному середовищі і зберігають у холодильнику за температури 4-8°C. Перед висівом пробірки з культурами витримують за кімнатної температури не менше години, висівають на скошений агар сусло, по 4 пробірки на кожний штам і витримують в термостаті впродовж 7 діб.

Спори кожної 7-добової тест-культури музейного штаму (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* або *Aspergillus niger*) змивають 5см³ 0,5% розчином Твіну-80 і об'єднують в окремому стерильному флаконі. Суспензію тест-культури, яка використовувалася у досліді стандартизують за кількістю спор в 1см³.

Підрахунок кількості спор тест-культури проводять в камері Горяєва. З кожного розведення зависі спор, окремими пастерівськими піпетками відбирають по 1 краплі кожного розведення і під мікроскопом (при збільшенні об'єктиву 90× та окуляру 10×) підраховують кількість спор. Враховують усі спори в 10 великих квадратах кожної краплі зависі з п'ятикратною повторюваністю, тобто в 50 великих квадратах. За робоче розведення суспензії спор вважають те, яке містить 120 спор у 1/5мм³, тобто 600000 у 1см³.

У дослідях, за різних умов часу і температури з тест-культур, що досліджувалися, готують позитивний і негативний контроль. За позитивний контроль приймають робоче розведення зависі спор тестових культур музейних штамів (120 спор у 1/5мм³) не оброблених дезінфектантом.

Негативний контроль готують з внесенням в живильне середовище відомого фунгіциду, наприклад ністатину (на 100см³ живильного середовища - 30мг ністатину) та робочого розведення зависі спор тестових культур не оброблених дезінфектантом.

Визначають концентрації дослідного дезінфектанту, які рекомендовані в умовах застосування. Якщо рекомендовані розведення не виявляли фунгіцидних (фунгістатичних) властивостей, то з матричного розчину готують водні розчини з більшими концентраціями і експериментально встановлюють оптимальні

концентрації, які сприяють повній або частковій затримці росту тест-культур мікроміцетів.

Інкубування висівів проводять за температури 25-27°C і у терміни 3, 5, 7; 10, 14 і 21 добу проводять підрахунок кількості колоній, що вирости.

Обробка результатів аналізу.

Для визначення середнього результату кількості росту колоній грибів дослід з використанням ефективних параметрів дезінфектанту (концентрацією, температурою і експозицією) повторюють не менше п'яти разів з підрахуванням колоній, що вирости. За результатами, що отримали в різні терміни, розраховують показник середньої кількості колоній, виписують варіаційний ряд і визначають медіану. Середній результат числа колоній грибів, що вирости для кожного терміну за використання оптимальних параметрів дезінфектанту, визначають шляхом поділу суми всіх колоній на кількість чашок Петрі всіх повторюваностей:

$$X = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + X_n}{N},$$

де X - середня кількість колоній, що вирости в чашках Петрі;

X₁, X₂, X₃, X_n - число колоній в першій, другій, третій чашках і т. д.

N - кількість дослідів (повторюваностей).

Якщо досліджували декілька концентрацій, то до застосування пропонується та мінімальна концентрація, яка при оптимальній температурі і експозиції максимально вплинула на затримку росту тест-культури.

Приклад 1

Проводили визначення фунгіцидної дії дезінфектанту на тест-культурі *Asp. fumigatus*. Було встановлено, що за умов кімнатної температури (18-20°C) та експозиції упродовж 60 хвилин фунгіцидні властивості септаміну відносно *Asp. fumigatus* виявилися у концентрації 0,22%; при підігріванні розчинів дезінфектанту до 50°C протягом 60 хвилин на повну затримку росту тест-культури вплинув 0,07% розчин.

Приклад 2

Проводили визначення фунгіцидної дії дезінфектанту на тест-культурі *Asp. flavus*. Було встановлено, що за умов кімнатної температури (18-20°C) та експозиції упродовж 60 хвилин фунгіцидні властивості септаміну відносно *Asp. flavus* виявилися у концентрації 0,1%; при підігріванні розчинів дезінфектанту до 50°C протягом 60 хвилин на повну затримку росту тест-культури вплинув 0,05% розчин.

Спосіб визначення фунгіцидних властивостей дезінфектантів на тест-культурах *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* та *Aspergillus niger* є ефективним. Його використання є швидким, економічно вигідним, недорогим та визначає фактичні фунгіцидні концентрації дезінфікуючих засобів. Спосіб можна використовувати в лабораторіях усіх форм власності.

