



УКРАЇНА

(19) UA (11) 60712 (13) U  
(51) МПК  
G01N 33/12 (2006.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ БАКТЕРІОСКОПІЧНОГО ОЦІНЮВАННЯ СТУПЕНЯ ОБСІМЕНІННЯ ЯЛОВИЧИНИ ТА СВИНИНИ МІКРООРГАНІЗМАМИ

1

2

(21) u201014857

(22) 13.12.2010

(24) 25.06.2011

(46) 25.06.2011, Бюл.№ 12, 2011 р.

(72) БОГАТКО НАДІЯ МИХАЙЛІВНА, БУКАЛОВА НАТАЛІЯ ВОЛОДИМИРІВНА, ПАЗЮК ОЛЬГА ВАСИЛІВНА, ГОЛУБ ОЛЬГА ЮРІЇВНА, ВЛАСЕНКО ВІКТОР ВОЛОДИМИРОВИЧ, БОГАТКО ЛЕОНІД МЕЧИСЛАВОВИЧ

(73) БОГАТКО НАДІЯ МИХАЙЛІВНА, БУКАЛОВА НАТАЛІЯ ВОЛОДИМИРІВНА, ПАЗЮК ОЛЬГА ВАСИЛІВНА, ГОЛУБ ОЛЬГА ЮРІЇВНА, ВЛАСЕНКО ВІКТОР ВОЛОДИМИРОВИЧ, БОГАТКО ЛЕОНІД МЕЧИСЛАВОВИЧ

(57) Спосіб бактеріоскопічного оцінювання ступеня обсіменіння яловичини та свинини мікроорганізмами, що включає використання вирізаного із глибини 1,0-1,5 см шматочка м'яса площею 2,0-2,5 см<sup>2</sup> та в подальшому фарбування препарату за Грамом у модифікації Хукера та мікроскопуванні за допомогою імерсійного масла зі збільшенням 90<sup>x</sup> і окуляра - зі збільшенням 10<sup>x</sup>, який **відрізняється** тим, що роблять на предметному скельці із шматочка м'яса 2 мазки-відбитки і підрахунок кількості мікроорганізмів проводять не менше ніж у 15-20 полях зору і виводять середнє значення, враховуючи форму, споруутворення та фарбування мікроорганізмів та оцінюючи ступінь обсіменіння м'яса.

Корисна модель належить до сільського господарства, зокрема до ветеринарної медицини, і може бути використана для визначення ступеня обсіменіння яловичини та свинини при визначенні їх безпеки у виробничих лабораторіях на потужностях по переробці м'яса, забійних підприємствах та підприємствах по реалізації та зберіганні яловичини та свинини, у державних лабораторіях ветеринарної медицини та у лабораторіях ветеринарно-санітарної експертизи на агропродовольчому ринку. За результатами цього методу можна отримати кількісні показники при оцінці ступеня обсіменіння яловичини та свинини мікроорганізмами.

Аналогом корисної моделі є спосіб визначення ступеня свіжості м'яса яловичини та свинини мікроскопічним методом [1, 2], який базується на визначенні кількості мікроорганізмів і ступені розпаду м'язової тканини шляхом фарбування за Грамом та подальшому мікроскопування в 25 полях зору у трьох мазках-відбитках на двох предметних скельцях. Недоліком даного методу є те, що він громіздкий та дає похибку від 10 до 25 %.

Прототипом корисної моделі є метод бактеріоскопічного оцінювання ступеня обсіменіння риби, рибних продуктів мікроорганізмами [3], в якому визначають їхні

морфологічні ознаки шляхом фарбування мазка-відбитка м'язової тканини риби на предметному скельці за Грамом у модифікації Хукера та подальшим мікроскопуванням та підрахуванням мікроорганізмів.

Недоліком даного методу є те, готується тільки один мазок-відбиток та використовується даний метод тільки для бактеріоскопічного оцінювання риби та рибопродуктів. Крім того, даний метод дає похибку у 15 % під час підрахування кількості мікроорганізмів лише тільки у 10 полях зору.

В основу даної корисної моделі поставлено задачу - розробити спосіб бактеріоскопічного оцінювання ступеня обсіменіння яловичини та свинини мікроорганізмами шляхом зміни кількості мазків-відбитків м'яса, фарбування їх за Грамом у модифікації Хукера, а також зміни кількості полів зору під час підрахування мікроорганізмів.

Задача вирішується тим, що припікають поверхню яловичини та свинини розжареним над полум'ям спиртівки шпателем, стерильними ножицями зрізують припечену поверхню м'яса і на глибині від 1,0-1,5 см стерильним скальпелем або ножицями вирізають шматочок м'яса площею 2,0-2,5 см<sup>2</sup>. Вирізаний шматочок м'яса беруть стерильним пінцетом і різними поверхнями зрізу при-

(19) UA (11) 60712 (13) U

кладають до поверхні стерильного предметного скельця для отримання 2-х мазків-відбитків. Предметне скельце висушують на повітрі за температури навколишнього середовища, потім фіксують над полум'ям спиртівки шляхом триразового проведенням крізь полум'я упродовж не більше ніж 2-3 секунд. У подальшому проводять фарбування мазків-відбитків за Грамом у модифікації Хукера:

- накладають смужку фільтрувального паперу, потім наносять на папір декілька крапель основного фарбувального розчину за Хукером на 0,5-1,0 хв, щоб фільтрувальний папір був повністю змоченим;

- предметне скельце з пофарбованими мазками-відбитками промивають струменем дистильованої води;

- на мазки-відбитки наносять піпеткою йодний розчин за Бурке на 0,5-1,0 хв;

- промивають мазки-відбитки етиловим спиртом із масовою часткою 96 %, потім занурюють предметні скельця у хімічну склянку ємністю 100 см<sup>3</sup> з етиловим спиртом із масовою часткою 96 % на 0,5-1 хв;

- промивають мазки-відбитки дистильованою водою;

- на промиті мазки-відбитки наносять спиртовий розчин фуксину із масовою часткою 0,5 % на 2-3 хв і потім промивають дистильованою водою та просушують фільтрувальним папером.

Пофарбовані препарати розглядають за допомогою імерсійного масла зі збільшенням 90<sup>x</sup> і окуляра - зі збільшенням 10<sup>x</sup>. Під час мікроскопування двох препаратів під мікроскопом переглядають мікроорганізми не менше ніж у 15-20 полях зору. У кожному полі зору на двох мазках-відбитках підраховують кількість мікроорганізмів і виводять середнє значення, а також визначають форму клітин (коки, мікрококи, паличкоподібні бактерії), споруутворення та відношення до фарбування за Грамом (Гр<sup>+</sup> мікроорганізми - набувають фіолетового забарвлення; Гр<sup>-</sup> - червоного забарвлення). І в подальшому проводять бактеріоскопічне оцінювання ступеня обсіменіння м'яса.

Етапи вирішення даної задачі наведено у нижчезазначених прикладах.

Приклад 1. Для розробки методу використовують шматочок м'яса яловичини та свинини площею 2,0-2,5 см<sup>2</sup>, що вирізаний на глибині від 1,0-1,5 см стерильним скальпелем або ножицями, прикладають його різними поверхнями зрізу до поверхні стерильного предметного скельця для отримання 1 мазка-відбитка. Предметне скельце висушують на повітрі за температури навколишнього середовища, потім фіксують над полум'ям спиртівки шляхом триразового проведенням крізь полум'я упродовж не більше ніж 2-3 секунд. У подальшому проводять фарбування мазків-відбитків за Грамом у модифікації Хукера. Пофарбовані препарати розглядають за допомогою імерсійного масла зі збільшенням 90<sup>x</sup> і окуляра - зі збільшенням 10<sup>x</sup>. Під час мікроскопування одного мазка-відбитка препаратів під мікроскопом переглядають мікроорганізми не менше ніж у 10-15

полях зору. У кожному полі зору у мазку-відбитку підраховують кількість мікроорганізмів і виводять середнє значення, а також визначають форму клітин (коки, мікрококи, паличкоподібні бактерії), споруутворення та відношення до фарбування за Грамом (Гр<sup>+</sup> мікроорганізми - набувають фіолетового забарвлення; Гр<sup>-</sup> - червоного забарвлення). І в подальшому проводять бактеріоскопічне оцінювання ступеня обсіменіння м'яса.

Приклад 2. Для розробки методу використовують шматочок м'яса яловичини та свинини площею 2,0-2,5 см<sup>2</sup>, що вирізаний на глибині від 1,0-1,5 см стерильним скальпелем або ножицями, прикладають його різними поверхнями зрізу до поверхні стерильного предметного скельця для отримання 3-х мазків-відбитків. Предметне скельце висушують на повітрі за температури навколишнього середовища, потім фіксують над полум'ям спиртівки шляхом триразового проведенням крізь полум'я упродовж не більше ніж 2-3 секунд. У подальшому проводять фарбування мазків-відбитків за Грамом у модифікації Хукера. Пофарбовані препарати розглядають за допомогою імерсійного масла зі збільшенням 90<sup>x</sup> і окуляра - зі збільшенням 10<sup>x</sup>. Під час мікроскопування трьох мазків-відбитків під мікроскопом переглядають мікроорганізми не менше ніж у 20-25 полях зору. У кожному полі зору у 3-х мазках-відбитках підраховують кількість мікроорганізмів і виводять середнє значення, а також визначають форму клітин (коки, мікрококи, паличкоподібні бактерії), споруутворення та відношення до фарбування за Грамом (Гр<sup>+</sup> мікроорганізми - набувають фіолетового забарвлення; Гр<sup>-</sup> - червоного забарвлення). І в подальшому проводять бактеріоскопічне оцінювання ступеня обсіменіння м'яса.

Приклад 3. Для розробки методу використовують шматочок м'яса яловичини та свинини площею 2,0-2,5 см<sup>2</sup>, що вирізаний на глибині від 1,0-1,5 см стерильним скальпелем або ножицями, прикладають його різними поверхнями зрізу до поверхні стерильного предметного скельця для отримання 2-х мазків-відбитків. Предметне скельце висушують на повітрі за температури навколишнього середовища, потім фіксують над полум'ям спиртівки шляхом триразового проведенням крізь полум'я упродовж не більше ніж 2-3 секунд. У подальшому проводять фарбування мазків-відбитків за Грамом у модифікації Хукера. Пофарбовані препарати розглядають за допомогою імерсійного масла зі збільшенням 90<sup>x</sup> і окуляра - зі збільшенням 10<sup>x</sup>. Під час мікроскопування двох мазків-відбитків під мікроскопом переглядають мікроорганізми не менше ніж у 15-20 полях зору. У кожному полі зору у двох мазках-відбитках підраховують кількість мікроорганізмів і виводять середнє значення, а також визначають форму клітин (коки, мікрококи, паличкоподібні бактерії), споруутворення та відношення до фарбування за Грамом (Гр<sup>+</sup> мікроорганізми - набувають фіолетового забарвлення; Гр<sup>-</sup> - червоного забарвлення). І в подальшому проводять

бактеріоскопічне оцінювання ступеня обсіменіння м'яса.

Порівняльна оцінка результатів випробування вищезазначених способів бактеріоскопічного

оцінювання ступеня обсіменіння яловичини та свинини до прототипу наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Порівняння способів бактеріоскопічного оцінювання ступеня обсіменіння яловичини та свинини до прототипу.

№ п/п	Показники, що порівнюються	Прототип	Приклади		
			1	2	3
1.	Складові методу: Глибина розрізу м'яса, см: Площа шматка м'яса, см <sup>2</sup> Кількість мазків відбитків	1,0-1,5 2,0-2,51	1,0-1,5 2,0-2,51	1,0-1,5 2,0-2,53	1,0-1,5 2,0-2,52
2.	Час фіксування мазків-відбитків із м'яса, с	2-3	2-3	2-3	2-3
3	Метод фарбування мазків-відбитків м'яса	за Грамом у модифікації Хукера	за Грамом у модифікації Хукера	за Грамом у модифікації Хукера	за Грамом у модифікації Хукера
4.	Експозиція проведення фарбування, хв.	4,5-8,0	4,5-8,0	4,5-8,0	4,5-8,0
5.	Мікроскопія мазків-відбитків за допомогою імерсійного масла	збільшення 90 <sup>x</sup> ; окуляр зі збільшенням 10 <sup>x</sup>	збільшення 90 <sup>x</sup> ; окуляр зі збільшенням 10 <sup>x</sup>	збільшення 90 <sup>x</sup> ; окуляр зі збільшенням 10 <sup>x</sup>	збільшення 90 <sup>x</sup> ; окуляр зі збільшенням 10 <sup>x</sup>
6.	Кількість досліджуваних полів зору	не менше ніж 10	10-15	20-25	15-20
7.	Швидкість визначення досліду, хв	15-20	19-23	25-30	18-22
8.	Стабільність показників по кількості летких жирних кислот в м'ясі, %	91,2	81,0	83,5	93,5
9.	% співвідношення результатів досліджень до показників величини рН м'яса	84,0-85,5	83,0-83,5	86,3-87,0	88,7-90,0
10	% співвідношення результатів досліджень до кількісних показників аміно-аміачного азоту	84,5-86,0	83,7-85,0	89,5-90,5	92,0-94,0

Дані таблиці 1 свідчать, що більш достовірні дані в порівнянні до методу визначення величини рН м'яса - у 88,7-90 % та до результатів досліджень по кількісних показниках аміно-аміачного азоту в м'ясі - у 92,0-94,0 % були отримані при застосуванні методу за прикладом № 3 [1]. Також найвища стабільність показників по кількості летких жирних кислот до ступеня обсіменіння яловичини та свинини була за прикладом № 3 - 93,5 %.

Використовуючи метод за прикладом № 3, ми провели бактеріоскопічне оцінювання ступеня

обсіменіння мікроорганізмами яловичини на 36 пробах: м'ясо свіже - 14 проб, м'ясо сумнівної проби - 12 проб, м'ясо несвіже - 10 проб; та свинини на 34 пробах: м'ясо свіже - 14 проб, м'ясо сумнівної проби - 10 проб, м'ясо несвіже - 10 проб.

Попередньо проби яловичини та свинини були досліджені на встановлення ступеня свіжості загальноприйнятими методами (органолептичним [4], фізико-хімічними - величина рН, кількість летких жирних кислот та аміно-аміачного азоту [1, 5]).

Результати наведені в таблиці 2, 3.

Таблиця 2

Показники загальноприйнятих методів та бактеріоскопічного оцінювання ступеня обсіменіння яловичини мікроорганізмами за прикладом № 3

№/№	Показники	Ступінь свіжості яловичини		
		свіжа (n=14)	сумнівної свіжості (n=12)	Несвіжа (n=10)
1.	Величина рН м'яса	5,9±0,1	5,6±0,1	5,2±0,1
2.	Кількість ЛЖК, мг КОН	3,81±0,12	6,24±0,28	10,12±0,32
3.	Кількість аміно-аміачного азоту, мг	0,84±0,04	1,34±0,06	1,98±0,08
4.	Бактеріоскопічне оцінювання м'яса, (кількість мікроорганізмів)	6±2	14±2	64±6

Таблиця 3

Показники загальноприйнятих методів та бактеріоскопічного оцінювання ступеня обсіменіння свинини мікроорганізмами за прикладом № 3

№/№	Показники	Ступінь свіжості свинини		
		свіжа (n=14)	сумнівної свіжості (n=10)	Несвіжа (n=10)
1.	Величина рН м'яса	5,7±0,1	5,4±0,1	5,0±0,1
2.	Кількість ЛЖК, мг КОН	4,08±0,10	7,44±0,22	12,06±0,46
3.	Кількість аміно-аміачного азоту, мг	0,98±0,04	1,43±0,09	2,18±0,12
4.	Бактеріоскопічне оцінювання м'яса, (кількість мікроорганізмів)	4±1	16±2	72±8

Проведеними дослідженнями встановлено, що при підрахуванні мікроорганізмів у свіжій яловичині та свинині виявляли більшість коків, як  $G^+$  та  $G^-$  у яловичині та свинині сумнівної свіжості - виявляли коки, мікрококи та паличкоподібні мікроорганізми  $G^+$  та  $G^-$  у несвіжій яловичині та свинині - переважали паличкоподібні мікроорганізми  $G^+$  та  $G^-$ . Ці дані були стабільними та достовірними, отже ці показники можна використовувати при бактеріоскопічному оцінюванні ступеня обсіменіння яловичини та свинини мікроорганізмами.

Крім того, слід зазначити, що метод є простим у виконанні, а його результати дають конкретні кількісні показники по ступеню обсіменіння яловичини та свинини мікроорганізмами.

Метод за прикладом № 3 нами пропонується як кількісний спосіб бактеріоскопічного оцінювання ступеня обсіменіння яловичини та свинини поряд з іншими методами визначення свіжості м'яса. Метод має перевагу перед існуючими кількісними

методами визначення ступеня свіжості м'яса в тому, що результати мають конкретне, достовірне кількісне значення.

Джерела інформації:

- ГОСТ 23392-78 М'ясо. Методы химического и микроскопического анализа свежести мяса. - М.: Госстандарт, 1978. - 9 с.
- ГОСТ 21237-75 М'ясо. Методы бактериологического анализа. - М.: Госстандарт, 1975. - 26 с.
- ДСТУ 4895:2007 Риба та рибні продукти. Метод бактеріоскопічного оцінювання. - Київ: Держспоживстандарт України, 2008. - 7 с.
- ГОСТ 7269-79 М'ясо. Методы отбора проб образцов и органолептические методы определения свежести. - М.: Госстандарт, 1980. - 6 с.
- Правила передзабійного ветеринарного огляду тварин і ветеринарно-санітарної експертизи м'яса та м'ясопродуктів, затверджені наказом Голови Держдепартаменту ветеринарної медицини за №28 від 7. 06. 2002 р. та зареєстровані в Мінюсті України 21. 06. 2002 р. за №524/6812.

