



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120725** (13) **C2**

(51) МПК

G01N 33/02 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

A23L 3/3463 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2018 02936</p> <p>(22) Дата подання заявки: 23.03.2018</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 27.01.2020</p> <p>(41) Публікація відомостей про заяву: 12.11.2018, Бюл.№ 21</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.01.2020, Бюл.№ 2</p>	<p>(72) Винахідник(и): Лісогурська Ольга Вікторівна (UA), Лісогурська Діна Володимирівна (UA), Фурман Світлана Володимирівна (UA), Кривий Михайло Миколайович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ЖИТОМИРСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРОЕКОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, бульвар Старий, 7, м. Житомир, 10008 (UA)</p> <p>(74) Представник: Стукало Олександр Павлович, реєстр. №218</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Младенов С. Мед и медолечение: пер. с болг. / С.Младенов. - София: Земиздат, 1969, С. 72-79 UA 60475 A, 15.10.2002 UA 104389 U, 25.01.2016 AU 2013100967 A4, 19.09.2013 Badawy OF, Shafii SS, Tharwat EE, Kamal AM. Antibacterial activity of bee honey and its therapeutic usefulness against Escherichia coli O157:H7 and Salmonella typhimurium infection. Rev Sci Tech. 12.2004; 23(3), P.1011-22 Shyamaapada M. et al. "Antibacterial activity of honey against clinical isolates of Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Salmonella enterica serovar Typhi", Asian Pacific Journal of Tropical Medicine Volume 3, Issue 12, 12.2010, P. 961-964 Ahmadi-Motamayel, Fatemeh et al. "Antibacterial activity of honey on cariogenic bacteria." Journal of dentistry (Tehran, Iran) vol. 10,1 (2013), P.10-15 Almasaudi, Saad B et al. "Antimicrobial effect of different types of honey on Staphylococcus aureus." Saudi journal of biological sciences vol. 24, 6, 2017, P.1255-1261 Mohapatra DP, Thakur V, Brar SK. Antibacterial efficacy of raw and processed honey. Biotechnol Res Int. 2011 P. 1-6 Антимикробная активность рапсового мёда / О. В. Лисогурская, М. Н. Кривой, Д. В. Лисогурская и др. // Аграрная наука – сельскому хозяйству : сб. ст. X Междунар. науч.-практ. конф., 4–5 февр. 2015 г. – Барнаул : АГАУ, 2015. – Кн. 3. – С. 148–150</p>
---	--

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ МЕДУ ВІДНОСНО KLEBSIELLA PNEUMONIAE

(57) Реферат:

Винахід стосується способу визначення антибактеріальної активності меду відносно *Klebsiella pneumoniae*

UA 120725 C2

Винахід стосується мікробіології і призначений для визначення ступеня антибактеріальної активності меду різного ботанічного походження. Може бути використаний у технології ведення бджільництва, ветеринарно-санітарній експертизі, харчовій та фармацевтичній промисловості, медицині.

5 Клебсіела пневмонії (*Klebsiella pneumoniae*) належить до санітарно-показової мікрофлори. Цей умовно-патогенний мікроорганізм кишкової групи потенційно може бути збудником пневмонії, гнійних абсцесів печінки та селезінки, викликати плеврити, перикардити, гайморити, ендофтальміти у людей і тварин. Не формує спори, але деякі штами мають полірезистентність до багатьох антибіотиків. Застосування останніх загрожує загальним порушенням нормальної

10 мікрофлори кишечника. У результаті розвиваються стафілококи, протей, дріжджові гриби, ентерококи
У таких станах має позитивну перспективу лікувально-профілактичне застосування меду як природного імуностимулятора, детоксиканту і речовини з антибактеріальною активністю, оцінка ступеня якої відносно *Klebsiella pneumoniae* вимагає розробки нового, окремого способу її

15 визначення.
Антибактеріальну активність речовин оцінюють за наявністю видимого росту тестового мікроорганізму на середовищі, що є найбільш придатним для його вирощування і подальшої ідентифікації.

Відомий спосіб визначення антимікробної активності антибіотиків, що включає засів 20 живильного середовища суспензією тест-штаму мікроорганізму, інкубацію та облік результатів за ознаками росту - помутнінь в чарунках планшета. При цьому стандартизовану в ізотонічному розчині натрію хлориду суспензію тест-штаму мікроорганізму з концентрацією $1,5 \times 10^8$ колонієутворюючих одиниць (КУО) у см³ вносять у лунки планшета, додають приготовлені методом серійних мікророзведень розчини антибіотиків та після інкубації визначають його

25 антимікробну активність за ознаками росту тест-штаму мікроорганізму в лунках планшета (див. патент України на корисну модель 104386, МПК А61К 35/00, С12Q 1/04, А61Р 31/04, 2016 р.).
Однак, використання даної методики для визначення антибактеріальних властивостей меду є непридатною з причини природної мутності розчинів меду.

Відомий спосіб визначення антимікробної активності ефірних олій шляхом їх дифузії в 30 живильне середовище і затримки росту мікроорганізмів. При цьому ефірні олії розчиняють у димексиді, потім у визначеній концентрації з нейтральним барвником вносять у лунки живильного середовища і після добової інкубації по співвідношенню зон дифузії барвника і затримки росту мікроорганізмів оцінюють чутливість збудників інфекційного процесу (див. деклараційний патент України на корисну модель № 60475, МПК G09В 23/00, А61К 36/00, 2003

35 р.).
Але, правомірність використання при визначенні антимікробної активності ефірних олій димексиду викликає сумніви, підставою чого є його власні антибактеріальні властивості.

Відомий спосіб визначення антибактеріальних властивостей меду, при якому готують стерильний розчин меду в рідкому живильному середовищі - звичайному м'ясопептонному 40 бульйоні (МПБ) шляхом розбавлення однієї частини меду 5, 10, 20, 40, 80, 160 частинами цього бульйону. У пробірки з двома частинами розбавлення засівають одну краплю 18-годинної культури тест-штаму *Klebsiella pneumoniae*. Після витримки в термостаті протягом 24-48 годин при 37 °С, враховують результати за ростом бактерій відповідно до помутніння бульйону. З пробірок, у яких не виявляється росту, роблять переносів на тверде живильне середовище.

45 Пробірки з виявленим ростом бактерій вважають розбавленням без антибактеріальної дії. Пробірки без виявленого росту, але який появився після перепосіву на тверде живильне середовище, вважають розбавленням, яке призупиняє розвиток і розмноження бактерій (бактеріостатична дія). Розбавлення, в якому не було росту ні в пробірках, ні в перепосівах, вважають розбавленням з бактерицидним ефектом (посіяні бактерії знищені розчином меду)

50 (див. Младенов С. Мед и медолечение: пер. с болг. / С Младенов. - София: Земиздат, 1969, сс. 72-79).
Однак, для визначення антибактеріальної активності меду відносно штаму *Klebsiella pneumoniae* використовують його розчини у живильному середовищі 1:5 і більше, не враховуючи важливість дослідження розчинів менших значень (від 1:1 до 1:4), що виключає

55 можливість дослідження меду ботанічного походження, що має низьку антимікробну активність. Крім того, в прототипі мед стерилізують, що відбувається при температурі понад 38 °С, коли починаються незворотні зміни у хімічній будові речовин у складі меду. Це може вплинути на рівень його антибактеріальної активності. Також, візуальний контроль ступеня мутності рідини після витримки суміші розчину меду з культурою тест-штаму *Klebsiella pneumoniae* у термостаті

60 протягом 24 годин при 37 °С перед наступним перепосівом на тверде живильне середовище не

має доцільності, оскільки помутніння цієї суміші через розвиток мікроорганізмів об'єктивно неможливо виявити шляхом візуального спостереження, бо сам розчин меду має певний рівень мутності.

5 В основу винаходу поставлено задачу з розробки способу визначення антибактеріальної активності меду з підвищеною достовірністю результатів, що охоплює весь ряд меду різного ботанічного походження, у тому числі - з низькою антибактеріальною активністю відносно *Klebsiella pneumoniae*.

10 Поставлена задача вирішується за рахунок того, що при реалізації способу визначення антибактеріальної активності меду відносно *Klebsiella pneumoniae*, при якому готують однакові за об'ємом розчини меду в м'ясопептонному бульйоні 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, засівають культурою тест-штаму *Klebsiella pneumoniae*, інкубують протягом 24-48 годин при 37 °С і далі здійснюють перепосів засіяних розчинів меду на тверде живильне середовище, інкубують перепосіви протягом 24-48 годин при 37 °С, і визначають антибактеріальну активність меду відносно *Klebsiella pneumoniae* за критеріями: перепосіви, в яких не виявили ріст колоній, вважають пригніченими розчином меду із бактерицидними властивостями, перепосіви з виявленим ростом колоній мікроорганізмів, вважають пригніченими розчином меду із бактериостатичними властивостями, а перепосіви з виявленим інтенсивним ростом колоній мікроорганізмів вважають утвореними розчином меду без антибактеріальної дії, відповідно до винаходу додатково готують аналогічні за об'ємом розчини меду в м'ясопептонному бульйоні 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 та контрольний зразок м'ясопептонного бульйону, які засівають культурою тест-штаму *Klebsiella pneumoniae*, при цьому як тверде живильне середовище використовують живильне середовище Левіна, а перепосів засіяних та інкубованих розчинів меду і контрольного зразка м'ясопептонного бульйону на тверде живильне середовище Левіна та їх наступну інкубацію проводять для кожного розчину меду і контрольного зразка м'ясопептонного бульйону, при цьому використовують мед, що зберігався в умовах, які виключають зміни хімічного складу меду та його фізичних і антибактеріальних властивостей, причому кінцеве визначення антибактеріальної активності меду відносно *Klebsiella pneumoniae* здійснюють, виходячи з концентрацій меду, що виявляють бактериостатичну дію за критеріями: перепосіви з виявленим слабким ростом колоній мікроорганізмів, вважають пригніченими розчином меду із помірними бактериостатичними властивостями, а перепосіви з виявленим помірним ростом колоній мікроорганізмів, вважають пригніченими розчином меду із слабкими бактериостатичними властивостями.

35 Поставлена задача вирішується також за рахунок того, що кожен розчин меду в м'ясопептонному бульйоні та контрольний зразок м'ясопептонного бульйону можуть готувати в кількості 2 мл, а їх засів можуть проводити 1-ю краплею 18-годинної культури тест-штаму мікроорганізму *Klebsiella pneumoniae* з розведенням м'ясопептонним бульйоном до 10^5 - 10^6 м.т./мл, причому як меду, антибактеріальну активність якого визначають, можуть використовувати мед, що не піддавався температурному впливу вище 37 °С, та дії хімічних сполук, крім того, можуть визначати слабкий ріст колоній мікроорганізмів - при кількості колоній від 1 до 10, помірний ріст колоній мікроорганізмів - при кількості колоній від 11 до 100, а інтенсивний ріст колоній мікроорганізмів - при кількості колоній більше 100.

45 Додаткове готування однакових за об'ємом розчинів меду в м'ясопептонному бульйоні 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 та контрольного зразка м'ясопептонного бульйону, які засівають культурою тест-штаму *Klebsiella pneumoniae*, при цьому використання як твердого живильного середовища живильного середовища Левіна, і перепосів засіяних та інкубованих розчинів меду і контрольного зразка м'ясопептонного бульйону на тверде живильне середовище Левіна та проведення їх наступної інкубації для кожного розчину меду і контрольного зразка м'ясопептонного бульйону, при цьому використання меду, що зберігався в умовах, які виключають зміни хімічного складу меду та його фізичних і антибактеріальних властивостей, причому здійснення кінцевого визначення антибактеріальної активності меду відносно *Klebsiella pneumoniae* виходячи з концентрацій меду, що виявляють бактериостатичну дію за критеріями: перепосіви з виявленим слабким ростом колоній мікроорганізмів, вважають пригніченими розчином меду із помірними бактериостатичними властивостями, а перепосіви з виявленим помірним ростом колоній мікроорганізмів, вважають пригніченими розчином меду із слабкими бактериостатичними властивостями, дозволяє проводити дослідження антибактеріальної активності меду з підвищеною достовірністю результатів відносно *Klebsiella pneumoniae*, що охоплює весь ряд меду різного ботанічного походження, у тому числі - з низькою антибактеріальною активністю, що забезпечує підвищення об'єктивності, інформативності, точності при дослідженні меду і додатково позитивно впливає на зменшення енергетичних і трудових витрат.

Застосування пропонованого способу визначення антибактеріальної активності меду відносно *Klebsiella pneumoniae* дозволяє забезпечити наступний технічний результат:

- підвищується достовірність результатів дослідження антибактеріальної активності меду відносно *Klebsiella pneumoniae* за рахунок відміни стерилізації меду, що сприяє збереженню усіх його властивостей;

з'являється можливість дослідження сортів меду з низькою антимікробною активністю;

- з'являється можливість охоплення всього ряду сортів меду, у тому числі - з низькою антибактеріальною активністю, що забезпечує підвищення об'єктивності, інформативності, точності висновків при дослідженні меду;

- спрощується і уточнюється встановлення результатів дослідження за рахунок оцінки результатів шляхом підрахунку кількості колоній на твердому живильному середовищі для всього ряду сортів меду;

- з'являється можливість зменшення енергетичних і трудових витрат при визначенні антибактеріальної активності меду.

Крім того:

- підвищується ефективність роботи персоналу.

Спосіб визначення антибактеріальної активності меду відносно *Klebsiella pneumoniae* здійснюють наступним чином:

На першому етапі готують м'ясопептоний бульйон (МПБ) за стандартною методикою.

На другому етапі готують розчини меду різного ступеня (1:1, 1:2, 1:3, 1:4 і далі - 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160) у м'ясопептонному бульйоні з наважками по 1,0 г досліджуваного меду (при приготуванні розведення 1:1, загальний об'єм суміші доводиться м'ясопептонним бульйоном до 2 мл). Готують також контрольну пробірку. Як меду, антибактеріальну активність якого визначають, використовують мед, що зберігався при температурі, яка не перевищувала 37 °С, та не піддавався дії хімічних сполук.

Отримані розчини розливають у стерильні пробірки по 2 мл в послідовності зростання їх концентрацій. Далі вміст кожної пробірки засівають однією краплею суспензії 18-годинної культури тест-штаму *Klebsiella pneumoniae*. У контрольну пробірку вливають 2 мл бульйону і 1 краплю 18-годинної культури тест-штаму мікроорганізму *Klebsiella pneumoniae* з розведенням м'ясопептонним бульйоном до 10^5 - 10^6 м.т./мл. Усі пробірки інкубують при 37 °С протягом 24 годин.

Наступний етап - перепосів вмісту кожної окремої пробірки газоном на тверде живильне середовище Левіна (еозин-метиленблау агар) завтовшки 4-5 мм у чашках Петрі та інкубація протягом 24 годин у термостаті при 37 °С.

Оцінку результатів проводять відповідно росту колоній тест-штаму *Klebsiella pneumoniae* на поверхнях середовища Левіна, при цьому:

- перепосіви, в яких не виявляється ріст колоній, вважають пригніченими розчином меду із бактерицидними властивостями;

- перепосіви з виявленим слабким ростом бактерій (при кількості колоній від 1 до 10) вважають пригніченими розчином меду із помірними бактериостатичними властивостями;

- перепосіви з виявленим помірним ростом бактерій (при кількості колоній від 11 до 100) вважають пригніченими розчином меду із слабкими бактериостатичними властивостями;

- перепосіви з виявленим інтенсивним ростом бактерій (при кількості колоній більше 100) вважають утвореними розчином меду без антибактеріальної дії.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб визначення антибактеріальної активності меду відносно *Klebsiella pneumoniae*, при якому готують однакові за об'ємом розчини меду в м'ясопептонному бульйоні 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, засівають культурою тест-штаму *Klebsiella pneumoniae*, інкубують протягом 24-48 годин при 37 °С і далі здійснюють перепосів засіяних розчинів меду на тверде живильне середовище, інкубують перепосіви протягом 24-48 годин при 37 °С, і визначають антибактеріальну активність меду відносно *Klebsiella pneumoniae* за критеріями: перепосіви, в яких не виявили ріст колоній, вважають пригніченими розчином меду із бактерицидними властивостями, перепосіви з виявленим ростом колоній мікроорганізмів, вважають пригніченими розчином меду із бактериостатичними властивостями, а перепосіви з виявленим інтенсивним ростом колоній мікроорганізмів вважають утвореними розчином меду без антибактеріальної дії, який **відрізняється** тим, що додатково готують аналогічні за об'ємом розчини меду в м'ясопептонному бульйоні 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 та контрольний зразок м'ясопептонного бульйону, які засівають культурою тест-штаму *Klebsiella pneumoniae*, при

- цьому як тверде живильне середовище використовують живильне середовище Левіна, а перепосів засіяних та інкубованих розчинів меду і контрольного зразка м'ясопептонного бульйону на тверде живильне середовище Левіна та їх наступну інкубацію проводять для кожного розчину меду і контрольного зразка м'ясопептонного бульйону, при цьому використовують мед, що зберігався в умовах, які виключають зміни хімічного складу меду та його фізичних і антибактеріальних властивостей, причому кінцеве визначення антибактеріальної активності меду відносно *Klebsiella pneumoniae* здійснюють, виходячи з концентрацій меду, що виявляють бактеріостатичну дію за критеріями: перепосіви з виявленим слабким ростом колоній мікроорганізмів, вважають пригніченими розчином меду із помірними бактеріостатичними властивостями, а перепосіви з виявленим помірним ростом колоній мікроорганізмів, вважають пригніченими розчином меду із слабкими бактеріостатичними властивостями.
2. Спосіб визначення антибактеріальної активності меду відносно *Klebsiella pneumoniae* за п. 1, який **відрізняється** тим, що кожен розчин меду в м'ясопептонному бульйоні та контрольний зразок м'ясопептонного бульйону готують в кількості 2 мл, а їх засів проводять 1-ю краплею 18-годинної культури тест-штаму мікроорганізму *Klebsiella pneumoniae* з розведенням м'ясопептонним бульйоном до 10^5 - 10^6 м. т./мл.
3. Спосіб визначення антибактеріальної активності меду відносно *Klebsiella pneumoniae* за п. 1, який **відрізняється** тим, що як мед, антибактеріальну активність якого визначають, використовують мед, що не піддавався температурному впливу вище 37 °С, та дії хімічних сполук.
4. Спосіб визначення антибактеріальної активності меду відносно *Klebsiella pneumoniae* за п. 1, який **відрізняється** тим, що слабкий ріст колоній мікроорганізмів визначають при кількості колоній від 1 до 10, помірний ріст колоній мікроорганізмів визначають при кількості колоній від 11 до 100, а інтенсивний ріст колоній мікроорганізмів визначають при кількості колоній більше 100.

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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