



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **115759** (13) **U**
(51) МПК (2017.01)
G01N 33/04 (2006.01)
A23C 7/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 11542	(72) Винахідник(и): Богатко Надія Михайлівна (UA), Букалова Наталія Володимирівна (UA), Приліпко Тетяна Миколаївна (UA), Неборачок Микола Васильович (UA)
(22) Дата подання заявки: 15.11.2016	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.04.2017	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2017, Бюл.№ 8	(73) Власник(и): Богатко Надія Михайлівна, вул. Академіка Вула, 6, кв. 97, м. Біла Церква, Київська обл., 09100 (UA), Букалова Наталія Володимирівна, вул. Героїв Чорнобиля, 5, кв. 78, м. Біла Церква, Київська обл., 09100 (UA), Приліпко Тетяна Миколаївна, вул. Князів Коріатовичів, 21/10, кв. 29, м. Кам'янець-Подільський, Хмельницька обл., 03245 (UA), Неборачок Микола Васильович, вул. Героїв Чорнобиля, 6, кв. 48, м. Біла Церква, Київська обл., 09100 (UA)

(54) ГОРИЗОНТАЛЬНИЙ СПОСІБ ВІЯВЛЕННЯ SALMONELLA У МОЛОЦІ ТА МОЛОКОПРОДУКТАХ

(57) Реферат:

Горизонтальний спосіб виявлення Salmonella у молоці та молокопродуктах, при якому використовують дослідну суспензію, яка готується у співвідношенні 1:5. Виконують інкубування отриманої суспензії упродовж 16 ± 2 годин за температури 35 ± 1 °C та селективне концентрування. Отриману культуру у кількості 0,06-0,07 см переносять у пробірку, в якій міститься 5-6 см³ середовища RV та витримують у термостаті за температури 41 ± 1 °C упродовж 23 ± 2 годин. Далі переносять отриману культуру у кількості 5,0-5,1 см³ у колбу, що містить 50-51 см³ середовища селеніту цистину та витримують у термостаті за температури 35 ± 1 °C упродовж 23 ± 2 годин. Здійснюють посів отриманої культури із двох середовищ шляхом селективного концентрування за допомогою електронного контуру на поверхню чашки Петрі у кількості 2,0-2,5 см³, що містить тверде селективне середовище - феноловий червоний - брильянтовий зелений агар-агар та витримують за температури 35 ± 1 °C упродовж 23 ± 2 годин, щоб отримати ізольовані типові колонії Salmonella червоного кольору при зміні середовища з рожевого на червоний колір.

UA 115759 U

Корисна модель належить до сільського господарства, зокрема до ветеринарної медицини, і може бути використана для удосконалення горизонтального методу виявлення *Salmonella* у молоці та молокопродуктах при встановленні їх безпечності у виробничих лабораторіях на потужностях з переробки, виробництва, реалізації і зберігання молока та молокопродуктів, у бактеріологічних відділах державних лабораторіях ветеринарної медицини. За результатами цього методу можна отримати якісні показники при удосконаленні горизонтального методу виявлення *Salmonella* у молоці та молокопродуктах.

Аналогом корисної моделі є спосіб визначення загальної кількості мікроорганізмів у молоці та молокопродуктах згідно з ДСТУ 7357:2013 [1], який базується на особливості аеробів та факультативних анаеробів рости на живильному агарі за температури $37 \pm 0,5$ °C з утворенням колоній та послідовним їх підрахунком. Недоліком даного методу є те, що він довготривалий, громіздкий і значні грошові затрати на живильний агар. Крім цього даний метод дає похибку від 25 до 45 %.

Прототипом корисної моделі є горизонтальний метод виявлення *Salmonella* у молоці та молокопродуктах [2], у якому застосовують великий об'єм середовища попереднього концентрування (буферизованої лептонної води) і для дослідження береться вихідна суспензія, що готується у співвідношенні 1:10 (маса проби молока, молокопродуктів до об'єму середовища попереднього концентрування). Недоліком даного методу є те, що він громіздкий, з підвищеною вартістю середовищ, довго тривалістю інкубування у селективних середовищах. Крім цього даний метод дає похибку у 15-20 %.

В основу даної корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб удосконалення горизонтального методу виявлення *Salmonella* у молоці та молокопродуктах шляхом зміни кількості використовуваної дослідної суспензії, яка готується у співвідношенні 1:5 (проби молока та молокопродуктів у кількості 10-11 см³ (г) та 50-55 см³ середовища попереднього концентрування (буферизованої пептонної води), послідовним інкубуванням отриманої суспензії упродовж 16 ± 2 годин за температури 35 ± 1 °C та наступним селективним концентруванням: отриману культуру у кількості 0,06-0,07 см³ переносять у пробірку, в якій міститься 5,0-5,1 см³ середовища RV (середовище хлориду малахітового зеленого Раппапорта-Васіліадіса) та 5-6 см³ цієї отриманої культури також переносять у колбу, що містить 50-51 см³ середовища селеніту цистину. Витримують ці два засіяних середовища відповідно у термостаті за температури 41 ± 1 °C упродовж 23 ± 1 годин та за температури 35 ± 1 °C упродовж 23 ± 1 годин, потім здійснюють посів отриманої культури із двох середовищ за допомогою електронного контуру на поверхню чашки Петрі у кількості 2,0-2,5 см³, що містить тверде селективне середовище - феноловий червоний - брильянтовий зелений агар-агар та витримують за температури 35 ± 1 °C упродовж 23 ± 2 годин, щоб отримати ізолювані типові колонії *Salmonella* червоного кольору при зміні середовища з рожевого на червоний колір.

Поставлена задача вирішується тим, що використовують дослідну суспензію, яка готується у співвідношенні 1:5 (проби молока та молокопродуктів у кількості 10-11 см³ (г) та 50-55 см³ середовища попереднього концентрування (буферизованої пептонної води), послідовним інкубуванням отриманої суспензії упродовж 16 ± 2 годин за температури 35 ± 1 °C та наступним селективним концентруванням: отриману культуру у кількості 0,06-0,07 см³ переносять у пробірку, в якій міститься 5-6 см³ середовища RV (середовище хлориду малахітового зеленого Раппапорта-Васіліадіса) та витримують у термостаті за температури 41 ± 1 °C упродовж 23 ± 2 годин. Також 5,0-5,1 см³ отриманої цієї культури переносять у колбу, що містить 50-51 см³ середовища селеніту цистину та витримують у термостаті за температури 35 ± 1 °C упродовж 23 ± 2 годин. Потім здійснюють посіви отриманої культури із двох середовищ шляхом селективного концентрування за допомогою електронного контуру на поверхню чашки Петрі у кількості 2,0-2,5 см³, що містить тверде селективне середовище - феноловий червоний - брильянтовий зелений агар-агар та витримують за температури 35 ± 1 °C упродовж 23 ± 2 годин, щоб отримати ізолювані типові колонії *Salmonella* червоного кольору при зміні середовища з рожевого на червоний колір.

Етапи вирішення поставленої задачі наведено у нижчезазначених прикладах.

Приклад 1. Для розробки методу використовують дослідну суспензію, яка готується у співвідношенні 1:9 (проби молока та молокопродуктів у кількості 15-16 см³ (г) та 135-144 см³ середовища попереднього концентрування (буферизованої лептонної води), послідовним інкубуванням отриманої суспензії упродовж 20 ± 2 годин за температури 28 ± 1 °C та наступним селективним концентруванням: отриману культуру у кількості 0,2-0,4 см³ переносять у пробірку, в якій міститься 20-22 см³ середовища RV (середовище хлориду малахітового зеленого Раппапорта-Васіліадіса) та інкубують у термостаті за температури 35 ± 1 °C упродовж 48 ± 2 годин. Також 8,0-8,1 см³ отриманої цієї культури переносять у колбу, що містить 80-81 см

середовища селеніту цистину та інкубують у термостаті за температури 28 ± 1 °C упродовж 20 ± 2 годин. Потім здійснюють посіви отриманої культури із двох середовищ шляхом селективного концентрування за допомогою електронного контуру на поверхню чашки Петрі у кількості 2,5-3,0 см, що містить тверде селективне середовище - феноловий червоний-брильянтовий зелений агар-агар та витримують за температури 34 ± 1 °C упродовж 25 ± 2 годин, щоб отримати ізольовані типові колонії *Salmonella* червоного кольору при зміні середовища з рожевого на червоний колір.

Приклад 2. Для розробки методу використовують дослідну суспензію, яка готується у співвідношенні 1:7 (проби молока та молокопродуктів у кількості $20-21$ см³ (г) та $140-147$ см³ середовища попереднього концентрування (буферизованої пептонної води), послідовним інкубуванням отриманої суспензії упродовж 24 ± 2 годин за температури 29 ± 1 °C та наступним селективним концентруванням: отриману культуру у кількості $0,1-0,2$ см³ переносять у пробірку, в якій міститься $10-12$ см³ середовища RV (середовище хлориду малахітового зеленого Раппапорта-Васіліадіса) та інкубують у термостаті за температури 38 ± 1 °C упродовж 46 ± 2 годин. Також $6,0-6,1$ см³ отриманої цієї культури переносять у колбу, що містить $60-61$ см³ середовища селеніту цистину та інкубують у термостаті за температури 29 ± 1 °C упродовж 24 ± 2 годин. Потім здійснюють посіви отриманої культури із двох середовищ шляхом селективного концентрування за допомогою електронного контуру на поверхню чашки Петрі у кількості 3,5-4,0 см, що містить тверде селективне середовище - феноловий червоний - брильянтовий зелений агар-агар та витримують за температури 39 ± 1 °C упродовж 23 ± 2 годин, щоб отримати не типові колонії для *Salmonella* блідо-рожевого кольору при не зміні середовища з рожевого на червоний колір.

Приклад 3. Для розробки методу використовують дослідну суспензію, яка готується у співвідношенні 1:5 (проби молока та молокопродуктів у кількості $10-11$ см³ (г) та $50-55$ см³ середовища попереднього концентрування (буферизованої пептонної води), послідовним інкубуванням отриманої суспензії упродовж 16 ± 2 годин за температури 35 ± 1 °C та наступним селективним концентруванням: отриману культуру у кількості $0,06-0,07$ см³ переносять у пробірку, в якій міститься 5-6 см середовища RV (середовище хлориду малахітового зеленого Раппапорта-Васіліадіса) та інкубують у термостаті за температури 41 ± 1 °C упродовж 23 ± 2 годин. Також $5,0-5,1$ см³ отриманої цієї культури переносять у колбу, що містить $50-51$ см³ середовища селеніту цистину та інкубують у термостаті за температури 35 ± 1 °C упродовж 23 ± 2 годин. Потім здійснюють посіви отриманої культури із двох середовищ шляхом селективного концентрування за допомогою електронного контуру на поверхню чашки Петрі у кількості $2,0-2,5$ см³, що містить тверде селективне середовище - феноловий червоний - брильянтовий зелений агар-агар та витримують за температури 35 ± 1 °C упродовж 23 ± 2 годин, щоб отримати ізольовані типові колонії *Salmonella* червоного кольору при зміні середовища з рожевого на червоний колір.

Порівняльна оцінка результатів випробування вищезазначених способів удосконалення горизонтального методу виявлення *Salmonella* у молоці та молокопродуктів до прототипу наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Порівняння способів удосконаленого горизонтального методу виявлення
Salmonella у молоці та молокопродуктів до прототипу

№ п/п	Показники, що порівнюються	Прототип	Приклади		
			1	2	3
1.	Приготування дослідної суспензії: Кількість молока, молокопродуктів, см ³ або г Кількість буферизованої пептонної води, см ³ Співвідношення	25,0 250 1:10	15-16 135-144 1:9	20-21 140-147 1:7	10-11 50-55 1:5
2.	Витримування вихідної суспензії в термостаті: За температури Експозиція, год.	35 або 37 °C 16-20	28±1 °C 20±2	29±1 °C 24±2	35±1 °C 16±2
3.	Селективне концентрування 1: Кількість культури, см ³ Кількість RV середовища, см ³	0,1 10	0,2-0,4 20-22	0,1-0,2 10-12	0,06-0,07 5-6
4.	Інкубування середовища RV із посівом за температури Експозиція, год.	42 °C 24, і якщо необхідно 48	35 °C 48±2	38 °C 46±2	41±1 °C 23±2
5.	Селективне концентрування 2: Кількість культури, см ³ Кількість середовища селеніту цистину, см ³	10 100	8,0-8,2 80-82	6,0-6,2 60-62	5,0-5,1 50-51
6.	Інкубування середовища селеніту цистину із посівом за температури Експозиція, год.	35 або 37 °C 24 і більше до 42	28±1 °C 20±2	29±1 °C 24±2	35±1 °C 23±2
7.	Посів на чашки Петрі отриманої культури після селективного концентрування 1: Кількість культури, см ³ Середовище тверде селективне Інкубування за температури Експозиція, год.	3,0 Феноловий червоний - брильянтовий зелений агар- агар 35 або 37 °C 24 і більше до 48	2,5-3,0 Феноловий червоний- брильянтовий зелений агар- агар 34±1 °C 25±2	3,5-4,0 Феноловий червоний- брильянтовий зелений агар- агар 39±1 °C 23±2	2,0-2,5 Феноловий червоний - брильянтовий зелений агар- агар 35±1 °C 23±2
8.	Ідентифікація колоній Salmonella: Забарвлення колоній через 24 год.	ізольовані типові колонії червоного кольору	ізольовані типові колонії червоного кольору	ізольовані типові колонії червоною кольору	ізольовані типові колонії червоного кольору

Продовження таблиці 1

9.	Посів на чашки Петрі отримано культури після селективного концентрування 2: Кількість культури, см ³ Середовище Інкубування за температури Експозиція, год.	3 Феноловий червоний - брильянтовий і зелений агар-агар 35 або 37 °C 24 і більше до 48	2,5-3,0 Феноловий червоний - брильянтовий і зелений агар-агар 34±1 °C 25±2	3,5-4,0 Феноловий червоний - брильянтовий і зелений агар-агар 39±1 °C 23±2	2,0-2,5 Феноловий червоний - брильянтовий і зелений агар-агар 35±1 °C 23±2
10.	Ідентифікація колоній Salmonella: Забарвлення колоній через 24 год.	ізольовані типові колонії червоного кольору	ізольовані типові колонії червоного кольору	не типові колонії блідо-рожевого кольору	ізольовані типові колонії червоного кольору
11.	Швидкість визначення дослідів, год.	110-120 год.	104±2	95±2	85±2
12.	Стабільність показників по удосконаленому горизонтальному методу виявлення Salmonella у молоці, молокопродуктах, %	88,5	81,3	67,4	99,8
13.	Співвідношення результатів досліджень щодо визначення наявності лістерій у молоці, молокопродуктах, у %	89,0-91,9	86,1-88,3	71,5-75,0	98,9-99,3
14.	Співвідношення результатів досліджень щодо визначення наявності стафілококів у молоці, молокопродуктах, у %	87,1-89,2	83,7-87,5	66,1-69,7	98,4-99,2

Дані таблиці 1 свідчать, що більш достовірні дані у порівнянні з результатами досліджень щодо визначення наявності лістерій у молоці, молокопродуктах - у 98,9-99,3 % [3] та до результатів досліджень щодо визначення наявності стафілококів у молоці, молокопродуктах - у 98,4-99,2 % [4] були отримані при застосуванні методу за прикладом № 3. Також найвища стабільність показників по удосконаленому горизонтальному методу виявлення Salmonella у молоці та молокопродуктах була за прикладом № 3-99,8 %.

Використовуючи метод за прикладом № 3, ми провели виявлення Salmonella у молоці та молокопродуктах удосконаленим горизонтальним методом на 67 пробах: молоко сире (уміст жиру 3,7 %) - 10 проб; молоко пастеризоване (уміст жиру 2,8 %) - 10 проб; вершки - 6 проб; вершки пастеризовані - 5 проб; сир кисломолочний - 6 проб; сир твердий - 7 проб; сир плавлений - 8 проб; масло вершкове - 9 проб; спред - 6 проб.

Результати наведені у таблиці 2.

Таблиця 2

Показники виявлення удосконаленого горизонтального методу виявлення *Salmonella* у молоці та молокопродуктах за прикладом № 3

№ п/п	Перелік видів проб досліджуваного молока і молокопродуктів	Виявлення <i>Salmonella</i> за забарвленням та розміром колоній за прикладом № 3			
		Кількість проб	Наявність колоній <i>Salmonella</i>	Кількість проб	Відсутність колоній <i>Listeria monocytogenes</i>
1.	Молоко сире (уміст жиру 3,7 %), n=10	n=7		n=3	
2.	Молоко пастеризоване (уміст жиру 2,8 %), n=10	n=1	Ізольовані типові колонії червоного кольору <i>Salmonella</i> виявлено	n=9	Характерних ізольованих типових колоній червоного кольору <i>Salmonella</i> не виявлено
3.	Вершки, n=6	n=4		n=2	
4.	Вершки пастеризовані, n=5	n=0		n=5	
5.	Сир кисломолочний, n=6	n=2		n=4	
6.	Сир твердий, n=7	n=2		n=5	
7.	Сир плавлений, n=8	n=3		n=5	
8.	Масло вершкове, n=9	n=4		n=5	
9.	Спред, n=6	n=3		n=3	

Проведеними дослідженнями встановлено, що були виявлені ізольовані типові колонії червоного кольору *Salmonella* через 23 ± 2 години за температури 35 ± 1 °C у наступних пробах молока та молокопродуктах: у 7 пробах молока сирого; у 4-х пробах вершків та масла вершкового; у 3-х пробах сиру плавленого та середях; у 2-х пробах сиру кисломолочного та сиру твердого і у 1 пробі молока пастеризованого. У вершках пастеризованих характерних колоній червоного кольору *Salmonella* не було виявлено.

Ці дані були стабільними та достовірними, отже, ці показники можна використовувати при оцінюванні безпечності молока та молокопродуктів. Крім цього слід зазначити, що метод є економним, простим у виконанні, а його результати дають конкретні якісні показники по червоному забарвленню ізольованих типових колоній *Salmonella*.

Метод за прикладом № 3 нами пропонується як якісний спосіб удосконалення горизонтального методу виявлення *Salmonella* у молоці та молокопродуктах поряд з іншими методами визначення їх безпечності (визначення загальної кількості мікроорганізмів (КМАФАМ), визначення бактерій групи кишкової палички, лістерій, стафілококів) [5].

Метод має перевагу перед існуючими якісними методами визначення безпечності молока та молокопродуктів тому, що результати мають достовірні показники за червоним забарвленням ізольованих типових колоній *Salmonella*.

Джерела інформації:

1. Молоко та молочні продукти. Методи мікробіологічного контролювання: ДСТУ 7357:2013. - К.: Мінекономрозвитку України 2014. - 35 с. (Національний стандарт України).

2. Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення *Salmonella*: ДСТУ EN 12824:2004. - К.: Держспоживстандарт України, 2005. - 20 с. (Національний стандарт України).

3. Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення та підрахування *Listeria monocytogenes*. Частина 1. Метод виявлення (ISO 11290-1:1996, ITD): ДСТУ ISO J 1290-1:2003. - К.: Держспоживстандарт України, 2005. - 18 с. (Національний стандарт України).

4. Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод підрахування коагулазопозитивних стафілококів. Частина 1. Метод з використанням агарового середовища Беард-Паркера (ISO 6888-1:1999, ITD): ДСТУ ISO 6888-1:2003. - К.: Держспоживстандарт України, 2005. - 10 с. (Національний стандарт України).

5. Івченко В.М. Довідник мікробіологічних методів дослідження харчових продуктів і кормів для тварин згідно з міжнародними стандартами / [В.М. Івченко, В.В. Шарандак, О.І. Горбатюк та ін.] - Біла Церква, 2006. - 264 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- Горизонтальний спосіб виявлення *Salmonella* у молоці та молокопродуктах, який **відрізняється**
- 5 тим, що використовують дослідну суспензію, яка готується у співвідношенні 1:5 (проби молока та молокопродуктів у кількості 10-11 см³ (г) та 50-55 см³ середовища попереднього концентрування (буферизованої пептонної води), з послідуочим інкубуванням отриманої суспензії упродовж 16±2 годин за температури 35±1 °С та наступним селективним концентруванням, отриману культуру у кількості 0,06-0,07 см переносять у пробірку, в якій
- 10 міститься 5-6 см³ середовища RV (середовище хлориду малахітового зеленого Раппапорта-Васіліадіса) та витримують у термостаті за температури 41±1 °С упродовж 23±2 годин, далі переносять отриману культуру у кількості 5,0-5,1 см³ у колбу, що містить 50-51 см³ середовища селеніту цистину та витримують у термостаті за температури 35±1 °С упродовж 23±2 годин, у послідуочому здійснюють посів отриманої культури із двох середовищ шляхом селективного концентрування за допомогою електронного контуру на поверхню чашки Петрі у кількості 2,0-2,5
- 15 см³, що містить тверде селективне середовище - феноловий червоний - брильянтовий зелений агар-агар та витримують за температури 35±1 °С упродовж 23±2 годин, щоб отримати ізольовані типові колонії *Salmonella* червоного кольору при зміні середовища з рожевого на червоний колір.
- 20

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

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
