



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2014136524/15, 08.09.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
08.09.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 08.09.2014

(45) Опубликовано: 10.12.2015 Бюл. № 34

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO9428163 A1, 08.12.1994. CN101748215 A, 23.06.2010. JP 2007215525 A, 30.08.2007. СОКОЛОВ Д.М. и др., Ускоренные методы выявления бактерий рода Salmonella в пищевых продуктах и сырье, Вопросы питания. 2013, 82, стр. 33-40, найдено 10.09.2015 в Интернете на сайте [http://mibio.ru/docs/55/statya\\_po\\_salmonelam\\_-\\_uskorennie\\_metodi\\_\(obzor\).pdf](http://mibio.ru/docs/55/statya_po_salmonelam_-_uskorennie_metodi_(obzor).pdf). ГОСТ (см. прод.)

Адрес для переписки:

625003, г. Тюмень, ул. Республики, 7, ФГБОУ ВПО ГАУ Северного Зауралья

(72) Автор(ы):

Сидорова Клавдия Александровна (RU),  
Татарникова Наталья Александровна (RU),  
Чугунова Елена Олеговна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Государственный аграрный университет Северного Зауралья" (ФГБОУ ВПО ГАУ Северного Зауралья) (RU),  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Пермская государственная сельскохозяйственная академия" (ФГБОУ ВПО ПГСХА) (RU)

**(54) СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ БАКТЕРИЙ РОДА SALMONELLA В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии и микробиологии, а именно к выявлению бактерий рода Salmonella. Для этого проводят обогащение сальмонелл в неселективной питательной среде, содержащей забуференную пептонную воду и компонент для продуцирования кислоты сальмонеллами. Закисление pH среды реакции указывает на наличие сальмонелл. В

качестве компонента для продуцирования кислоты сальмонеллами используют пропиленгликоль, 0,6 г которого вводят во флаконы с 225 мл готовой забуференной пептонной воды. Изобретение позволяет сократить срок выявления бактерий рода Salmonella в пищевых продуктах с 48 до 24 часов. 3 пр.

(56) (продолжение):

31659-2012 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Salmonella, найдено 10.09.2015 в Интернете на сайте [http://standartgost.ru/g/%D0%93%D0%9E%D0%A1%D0%A2\\_31659-2012](http://standartgost.ru/g/%D0%93%D0%9E%D0%A1%D0%A2_31659-2012).



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2014136524/15, 08.09.2014**  
 (24) Effective date for property rights:  
**08.09.2014**  
 Priority:  
 (22) Date of filing: **08.09.2014**  
 (45) Date of publication: **10.12.2015 Bull. № 34**  
 Mail address:  
**625003, g. Tjumen', ul. Respubliki, 7, FGBOU VPO  
 GAU Severnogo Zaural'ja**

(72) Inventor(s):  
**Sidorova Klavdija Aleksandrovna (RU),  
 Tatarnikova Natal'ja Aleksandrovna (RU),  
 Chugunova Elena Olegovna (RU)**  
 (73) Proprietor(s):  
**Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe  
 obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego  
 professional'nogo obrazovanija  
 "Gosudarstvennyj agrarnyj universitet  
 Severnogo Zaural'ja" (FGBOU VPO GAU  
 Severnogo Zaural'ja) (RU),  
 Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe  
 obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego  
 professional'nogo obrazovanija "Permskaja  
 gosudarstvennaja sel'skokhoz'jajstvennaja  
 akademija" (FGBOU VPO PGSKhA) (RU)**

(54) **METHOD OF IDENTIFICATION OF BACTERIA SALMONELLA IN FOODSTUFF**

(57) Abstract:  
 FIELD: biotechnologies.  
 SUBSTANCE: salmonellas are enriched in non-selective nutrient medium containing buffering peptone water and the component for producing of acid by salmonellas. Acidulation of pH reaction medium indicates the existence of salmonellas. The component for producing of acid by salmonellas is propylene

glycol, 0.6 g of which is added to the bottles with 225 ml of ready buffering peptone water.  
 EFFECT: invention allows to reduce the time of identification of bacteria Salmonella in foodstuff within 48-24 hours.  
 3 ex

RU 2 570 386 C1

RU 2 570 386 C1

Изобретение относится к области биохимии и микробиологии, касается выявления бактерий рода *Salmonella*.

Бактерии рода *Salmonella* могут присутствовать в патологическом материале в небольшом количестве вместе с большим числом других бактерий. Поэтому  
5 предварительное обогащение просто необходимо.

Известен стандартный способ выявления бактерий рода *Salmonella* в пищевых продуктах, состоящий из двух этапов обогащения: на первом этапе - этапе  
10 неселективного обогащения - часть пробы массой 25 г помещают в 225 мл забуференной пептонной воды (ЗПВ) и инкубируют при температуре 37°C 24±3 часа. Далее 1 см<sup>3</sup> культуры пересевают в среды для селективного обогащения, благоприятные для накопления сальмонелл: среду Раппапорта-Вассилиадиса с соей (RVS-бульон) и одну из двух сред: Мюллер-Кауфман тетрационатный бульон (МКТ-бульон) или селенитовую среду. После посева RVS-бульон инкубируют при температуре (41,5±1,0)°C в течение (24±3) ч, а МКТ-бульон и селенитовую среду - при температуре (37±1)°C в течение  
15 (24±3) ч, т.е. выполняют второй этап обогащения. Для идентификации сальмонелл полученные культуры пересевают на две селективные агаризованные среды: ксилоза-лизин-дезоксихолатный агар (XLD-агар) и на одну из следующих агаризованных сред: висмут-сульфит агар, среду Плоскирева, среду Эндо, среду Левина или бриллиантовый зеленый агар. Посевы на агаризованных средах инкубируют при температуре (37±1)°C  
20 в течение (24±3) ч. [1]. Недостатком данного способа является наличие двух обязательных этапов бактериологического анализа, что увеличивает сроки проведения диагностики.

Сальмонеллы образуют кислоту при ферментации пропиленгликоля [2-4].

Пропиленгликоль входит в состав хромогенной дифференциально-диагностической  
25 среды для идентификации сальмонелл в пищевых продуктах, сырье и клиническом материале Рамбах-агар (RAMBACH® agar for the identification of *Salmonella*, Мерк, Германия). Дезоксихолат натрия ингибирует сопутствующую грамположительную микрофлору. Сальмонеллы продуцируют кислоту из пропиленгликоля, в результате  
30 чего происходит изменение рН среды и колонии сальмонелл окрашиваются в красный цвет. Для дифференциации сальмонелл от колиформных бактерий в состав среды включена хромогенная смесь, которая выявляет наличие фермента β-галактозидазы - характерного фермента колиформных бактерий. Колиформные бактерии растут в виде  
35 сине-зеленых или сине-фиолетовых колоний. Остальные энтеробактерии и грамотрицательные бактерии, такие как *Proteus*, *Pseudomonas*, *Shigella*, вырастают в виде бесцветных желтоватых колоний. РАМБАХ-агар обеспечивает однозначную дифференциацию сальмонелл от других бактерий.

Состав среды (г/л): пептон 8.0; хлорид натрия 5.0; дезоксихолат натрия 1.0; хромогенная смесь 1.5; пропиленгликоль 10.5; агар-агар 15.0.

Приготовление среды. Добавить 1 флакон жидкой хромогенной смеси среды к 250  
40 мл дистиллированной воды и перемешать до полного растворения. Добавить 1 флакон порошка среды (питательная основа), дать среде набухнуть в течение 20-30 минут, перемешать до полного растворения. Колбу со средой нагревать на кипящей водяной бане с периодическим помешиванием. Среда полностью растворяется. Стандартное  
45 время до полного растворения для 250 мл - 20-25 мин. Охладить среду как можно быстрее на водяной бане 45-50°C. Во время этой процедуры (максимум 30 минут) следует помешивать среду время от времени. Разлить по чашкам. Для предотвращения образования осадка следует разместить чашки Петри на охлажденной поверхности стола (максимум 25°C). Готовые чашки со средой опалесцируют и слегка розовые.

Перед посевом чашки следует подсушить. рН:  $7.3 \pm 0.2$  при  $25^\circ\text{C}$ .

Ход исследования. После этапа селективного обогащения посеять на  $\frac{1}{4}$  поверхности агара петлей. Для того чтобы получить изолированные колонии - той же петлей посеять на оставшуюся поверхность чашки. Инкубировать в аэробных условиях 24-48 часов при  $35-37^\circ\text{C}$ .

Недостатком указанной питательной среды является невозможность ее использования на первом этапе селективного обогащения.

Целью заявляемого изобретения является ускорение выявления бактерий рода *Salmonella* в пищевых продуктах.

Поставленная цель достигается тем, что при выявлении бактерий рода *Salmonella* в пищевых продуктах на этапе обогащения сальмонелл в неселективной жидкой среде во флаконы с 225 мл с готовой забуференной пептонной водой вводят 0,6 г пропиленгликоля для продуцирования кислоты сальмонеллами.

Заявляемый способ выявления бактерий рода *Salmonella* в пищевых продуктах позволяет через 24 часа исследования получить ответ о присутствии бактерий рода *Salmonella* в образце продукта на основании изменения рН питательной среды в кислую сторону в результате продуцирования кислоты сальмонеллами, что сокращает срок микробиологического анализа на 24 часа.

Забуференная пептонная вода служит средой первичного обогащения, которую используют для повышения высеваемости поврежденных сальмонелл из пищевых продуктов (перед селективным обогащением и выделением). Она рекомендована также международным комитетом (ISO 6579: 1993). Состав: протеозопептон - 10,0 г/л; натрия хлорид - 5,0 г/л; натрия гидрофосфат - 3,5 г/л; калия дигидрофосфат - 1,5 г/л. Выпускается в виде гомогенного светло-желтого порошка.

Пропиленгликоль - бесцветная вязкая жидкость со слабым характерным запахом, сладковатым вкусом, обладающая гигроскопическими свойствами. Синонимы: 1,2-пропиленгликоль, пропандиол, монопропиленгликоль. Выпускается промышленностью. Изменяет рН питательной среды в кислую сторону в результате продуцирования кислоты сальмонеллами.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Приготовление питательной среды.

Для приготовления питательной среды размешивали 20,0 г порошка в 1000 мл дистиллированной воды. Разливали в стерильные флаконы и стерилизовали автоклавированием при 1,1 атм ( $121^\circ\text{C}$ ) в течение 15 мин пропиленгликолем. К 225 мл стерильной забуференной пептонной воды добавляли 0,6 г пропиленгликоля.

Пример 2. Неселективное обогащение сальмонелл.

В работе использовали 4 штамма сальмонелл: *S. choleraesuis* №1348, *S. typhimurium* №79, *S. enteritidis* №5765, *S. dublin* №780. Во флаконы серии №1 (n=40) с питательной средой, согласно прим. 1, инокулировали по 0,5 мл микробной взвеси  $10^5$  млрд/мл.

В качестве контроля во флаконы серии №2 (n=20) с забуференной пептонной водой инокулировали по 0,5 мл микробной взвеси  $10^5$  млрд/мл.

Для сравнительного анализа во флаконы серии №3 (n=20) инокулировали по 0,1 мл микробной взвеси  $10^5$  млрд/мл из штаммов *E. coli* 675 №240417 и *Shigella flexor* 1a 851b №232412.

Все посеы во флаконах серий №1, №2, №3 имели нейтральный уровень рН. Все посеы во флаконах серий №1, №2, №3 инкубировали при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 24 часов.

На вторые сутки исследований определяли водородный показатель, который составил: во флаконах серии №1 (согласно предлагаемому изобретению) -  $6,35 \pm 0,18$  (сдвиг рН в кислую среду), во флаконах №2 (контроль) -  $6,94 \pm 0,2$  (сохранялся нейтральный уровень рН); во флаконах №3 -  $6,93 \pm 0,2$  (сохранялся нейтральный уровень рН).

Таким образом, после первого этапа исследований во флаконах серии №1 сдвиг реакции среды в кислую сторону указывает на наличие сальмонелл в исследуемой пробе продукта.

Пример 3. Идентификация сальмонелл.

Микробиологической петлей распределяли материал из питательной среды флаконов серии 1, согласно прим.2, на поверхность висмут-сульфит агара в чашках Петри (n=40). Через 24 часа в 35 чашках наблюдали рост единичных культур, через 48 часов - более 100 культур во всех чашках. По результатам биохимической и серологической

идентификации выращенные нами сальмонеллы соответствуют заявленным серотипам. В патентной и научно-технической литературе не обнаружены технические решения, аналогичные заявляемому с использованием пропиленгликоля на первом этапе неселективного обогащения сальмонелл, что свидетельствует о новизне предлагаемого решения.

Литература

1. ГОСТ Р 52814 - 2007. Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*.

2. Rambach A. // Environ. Microbiol. - 1990. - Vol. 56. - P. 301.

3. Greenberg A.E., Trussel R.R., Clesceri L.S. (Eds.). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 16th ed., APHA, Washington, D.C. - 1985.

4. Greenwald R., Henderson R.W. and Yappaw S. // J. Clin. Microbiol. - 1991. - Vol. 29. - P. 2354.

#### Формула изобретения

Способ выявления бактерий рода *Salmonella* в пищевых продуктах, заключающийся в обогащении сальмонелл в неселективной питательной среде, содержащей забуференную пептонную воду и компонент для продуцирования кислоты сальмонеллами, отличающийся тем, в качестве компонента для продуцирования кислоты сальмонеллами используют пропиленгликоль, который вводят во флаконы с 225 мл готовой забуференной пептонной воды в дозе 0,6 г.