

УДК 637.07

## ІОНОМЕТРИЧНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ СОМАТИЧНИХ КЛІТИН У МОЛОЦІ

Алієв Е.Б., аспірант

Савін В.В., д. фіз.-мат. н., проф.

Інститут механізації тваринництва НААН України

Тел./факс: (061)289 81 44

*Важливий показник якості молока – вміст соматичних клітин (SCC). Маючи можливість постійно контролювати вміст соматичних клітин, господарства можуть більш оперативно виявити маститних корів і в результаті цього покращити якість і сортність сирого молока. Відомо, що при виникненні запального процесу у вимені (мастит) змінюється не тільки якісний склад молока, але і його фізико-хімічні властивості, зокрема концентрація іонів натрію, калію, кальцію, хлору та електропровідність. Дослідженні залежності концентрацій іонів натрію [Na], калію [K], кальцію [Ca], хлору [Cl] та електропровідності ЕС від кількості соматичних клітин SCC. Розглянуті переваги і недоліки іонометричного методу серед інших методів визначення кількості соматичних клітин.*

**Ключові слова:** якість молока, мастит, соматичні клітини, лічильники соматичних клітин, іонометричний метод, іоноселективні електроди.

**Проблема.** Важливий показник якості молока – вміст соматичних клітин (SCC). Це клітини циліндричного, плоского і кубічного епітелію молочної залози, лейкоцити, еритроцити. У молоці навіть від здорової корови завжди знаходяться соматичні клітини, що відторгнулися від секреторної частини вимені. Проте при запальному процесі в молочній залозі (маститі) лейкоцити, згідно клітинної теорії запалення, створеної Мечниковим, починають процес фагоцитозу. В результаті посиленої міграції лейкоцитів в процесі запалення їх кількість, а отже, і загальне число соматичних клітин в молоці збільшується [1]. Окрім погіршення якісних показників молока спостерігається зниження продуктивності корів. У молоці значно зменшується загальна кількість сухих речовин, вміст молочного жиру, казеїну, лактози, солей кальцію, калію, фосфору, магнію, вітамінів. Разом з цим збільшується вміст водорозчинних фракцій білка (альбуміну, глобуліну), хлору, натрію, ферментів (каталази, редуктази, фосфатази), підвищується концентрація водневих іонів (рН зрушується в лужну сторону). По даним [2], міра захворювання маститом впливає на склад молока (табл. 1). Крім того, при клінічних маститах

змінюються органолептичні властивості молока: консистенція, колір, смак, а також фізичні і біохімічні властивості.

Таблиця 1 - Склад молока корів, що хворі на мастит

Компонент	Нормальне молоко	Маститне молоко	Маститне молоко в % до нормального
Лактоза, %	4,7	4,0	85
Жир, %	4,2	3,7	88
Куховарська сіль, %	0,091	0,147	161
Загальний білок %, у тому числі	3,6	3,6	100
казеїн	2,8	2,3	82
сироваткові білки	0,8	1,3	162
Суша речовина %	13,1	12,0	92
Число соматичних клітин тис./мл	100-300	200-1000	до 400

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** Новий технічний регламент на молоко та молочну продукцію змусив господарство більш ретельно контролювати якість сирого молока. Попит на лічильники соматичних клітин за декілька місяців збільшився удвічі. Маючи можливість постійно контролювати соматіку, господарства можуть більш оперативно виявляти маститних корів і в результаті цього покращити якість і сортність сирого молока. В Європі застосування подібних лічильників розповсюджено досить широко, ними оснащено багато ферм. В Україні лише в окремих господарствах налагоджена робота по щоденному використанню лічильників соматичних клітин. Через те, що практика використання таких приладів відсутня, між заводами-переробниками молока і виробниками виникає безліч конфліктних ситуацій, пов'язаних з визначенням ціни і якості молока [3].

Відомі наступні методи визначення кількості соматичних клітин [4]:

- мікроскопічний (оптофлуороелектричний);
- віскозиметричний;
- кондуктометричний;
- біоломінесцентний;
- іонометричний.

Кожен з цих методів має свої переваги та недоліки.

**Мета досліджень.** Мета досліджень спрямована на обґрунтування іонометричного методу для визначення кількості соматичних клітин, а також на отримання залежностей концентрацій іонів натрію [Na], калію [K], кальцію [Ca], хлору [Cl] та електропровідності ЕС від кількості соматичних клітин SCC.

**Матеріали і результати досліджень.** Одним з методів визначення кількості соматичних клітин є принцип різної електропровідності. Відомо, що при виникненні запального процесу у вимені (мастит) змінюється не тільки якісний склад молока, але і його фізико-хімічні властивості, зокрема електропровідність. [5] Але прилади, що використовують цей метод, служать скоріше індикаторами зміни кількості соматичних клітин в молоці, ніж точними лічильниками. Тому у даній статті пропонується новий метод визначення кількості соматичних клітин за допомогою іоноселективних електродів (іонометричний метод).

Питому електропровідність молока визначають по концентрації аніонів і катіонів. Найбільш важливими іонами у молоці є іони  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , і  $\text{Cl}^-$  [6,7]. Секреторні клітини у молочній залозі мають активну систему транспортування для накачування іонів  $\text{Na}^+$  до міжклітинної рідини, а іонів  $\text{K}^+$  – до клітини (натрово-калієвий насос). Іони  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$  потрапляють до молока разом з секреторними клітинами. Концентрації  $[\text{Na}]:[\text{K}]$  відносяться як 3:1 у міжклітинній рідині і крові, і 1:3 у внутрішньоклітинній рідині і молоці. Концентрація іонів  $\text{Cl}^-$  більше у крові і у міжклітинній рідині, ніж у молоці. Проток молочної залози є непроникним для іонів і лактози [8].

Концентрація в молоці лактози і іонів  $\text{K}^+$  знижується, а концентрація іонів  $\text{Na}^+$  і  $\text{Cl}^-$  підвищується [5, 9-11]. Концентрація іонів в маститному молоці змінюється тому, що підвищується проникливість капілярів, знищуються тугі сполуки, і руйнується система активного іонного насоса [11]. Після цього клітини ушкоджуються, іони  $\text{Na}^+$  і  $\text{Cl}^-$ , які мають високу концентрацію у міжклітинній рідині, потрапляють в просвіт альвеол. З урахуванням підтримання осмотичного тиску, концентрація  $\text{K}^+$  і лактози зменшується у молоці [5, 9].

Згідно з дослідженнями [12-16] концентрація іонів натрію  $[\text{Na}]$ , калію  $[\text{K}]$ , кальцію  $[\text{Ca}]$ , хлору  $[\text{Cl}]$  та електропровідність ЕС залежить від кількості соматичних клітин SCC (рис. 1-6).

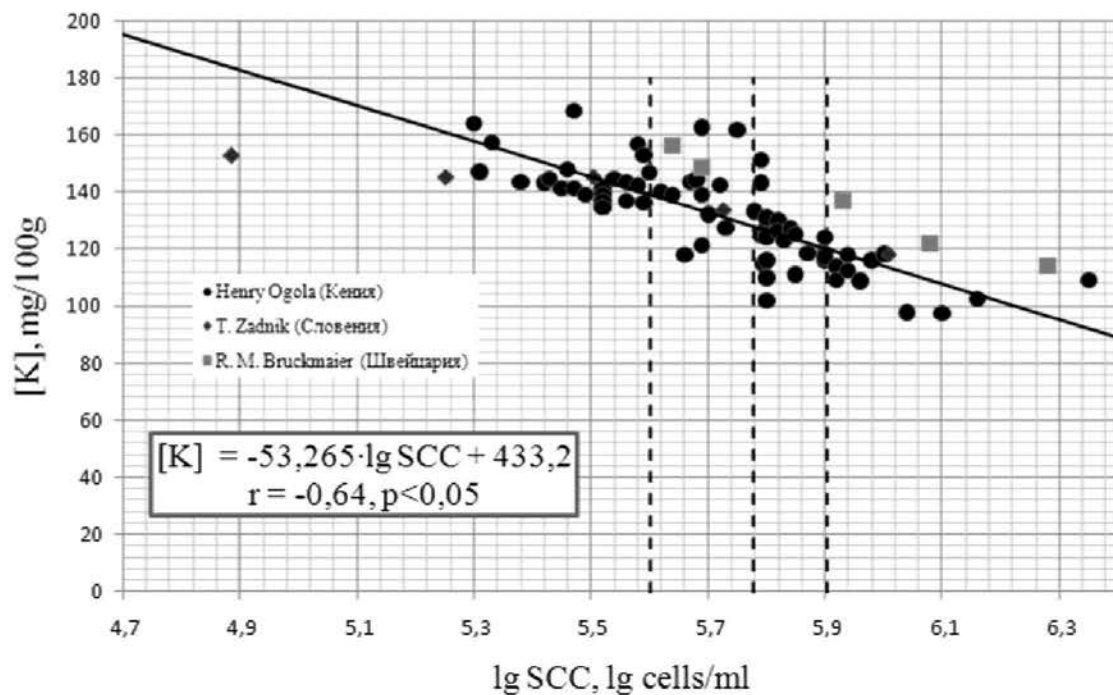


Рисунок 1 – Залежність концентрації іонів калію [K] від логарифма кількості соматичних клітин lg SCC

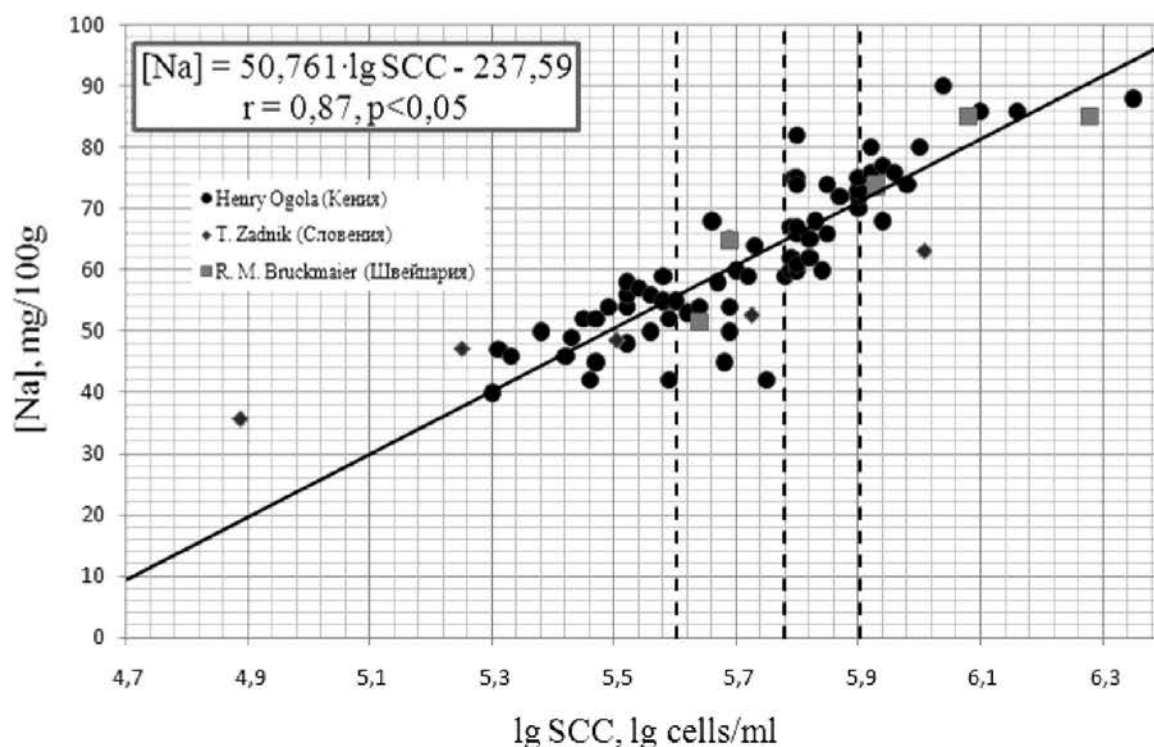


Рисунок 2 – Залежність концентрації іонів натрію [Na] від логарифма кількості соматичних клітин lg SCC

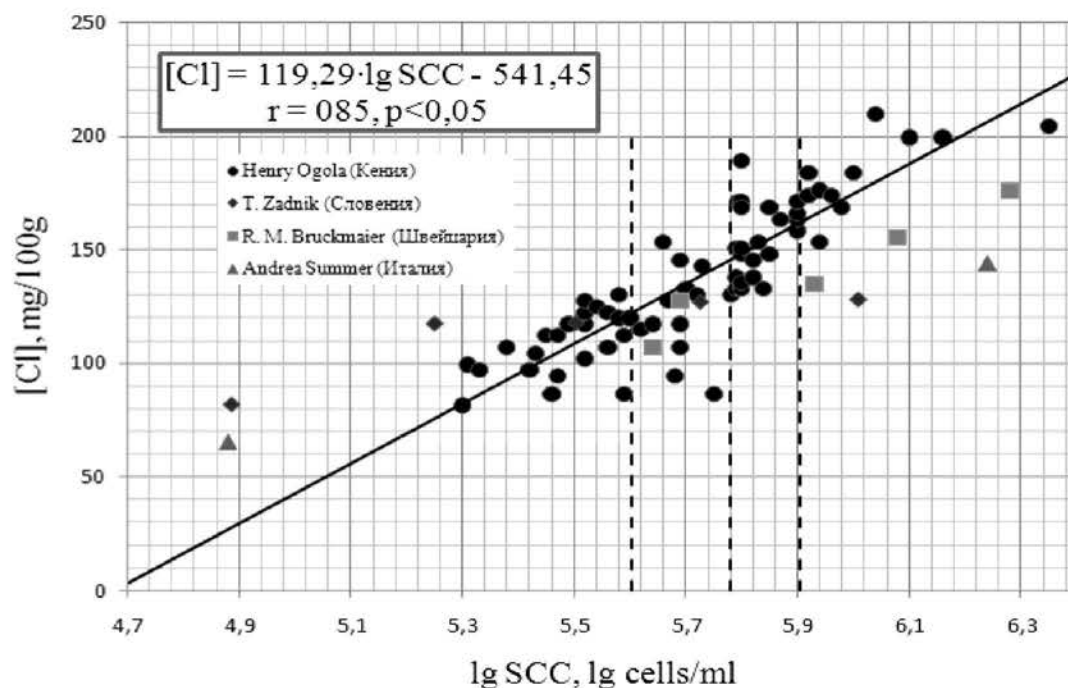


Рисунок 3 – Залежність концентрації іонів хлору [Cl] від логарифма кількості соматичних клітин lg SCC

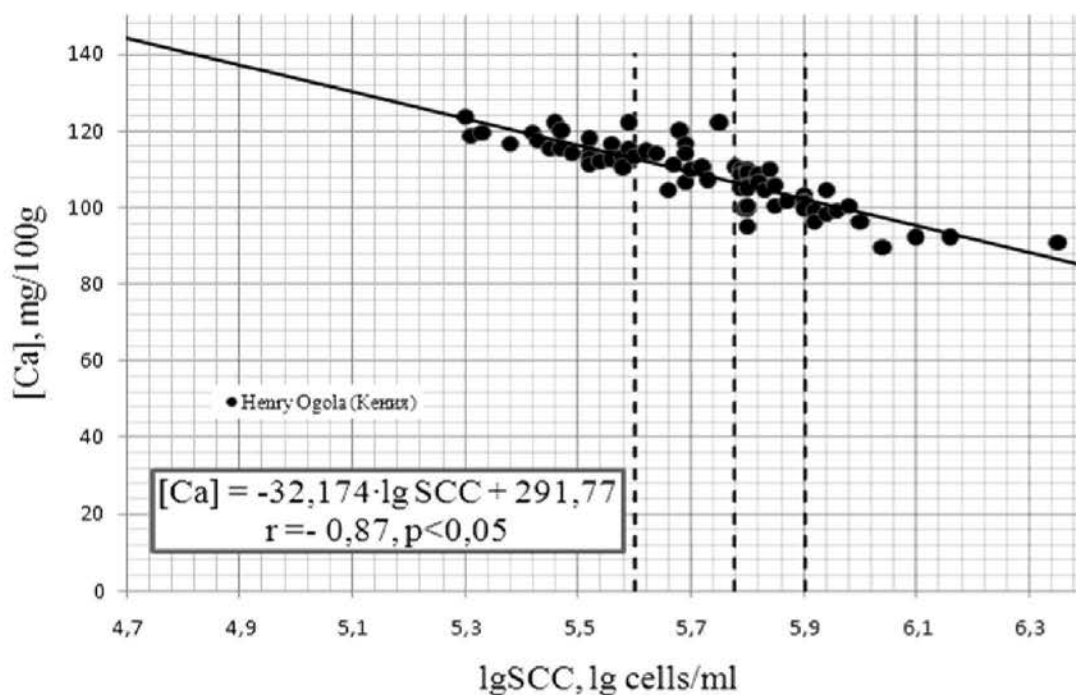


Рисунок 4 – Залежність концентрації іонів кальцію [Ca] від логарифма кількості соматичних клітин lg SCC

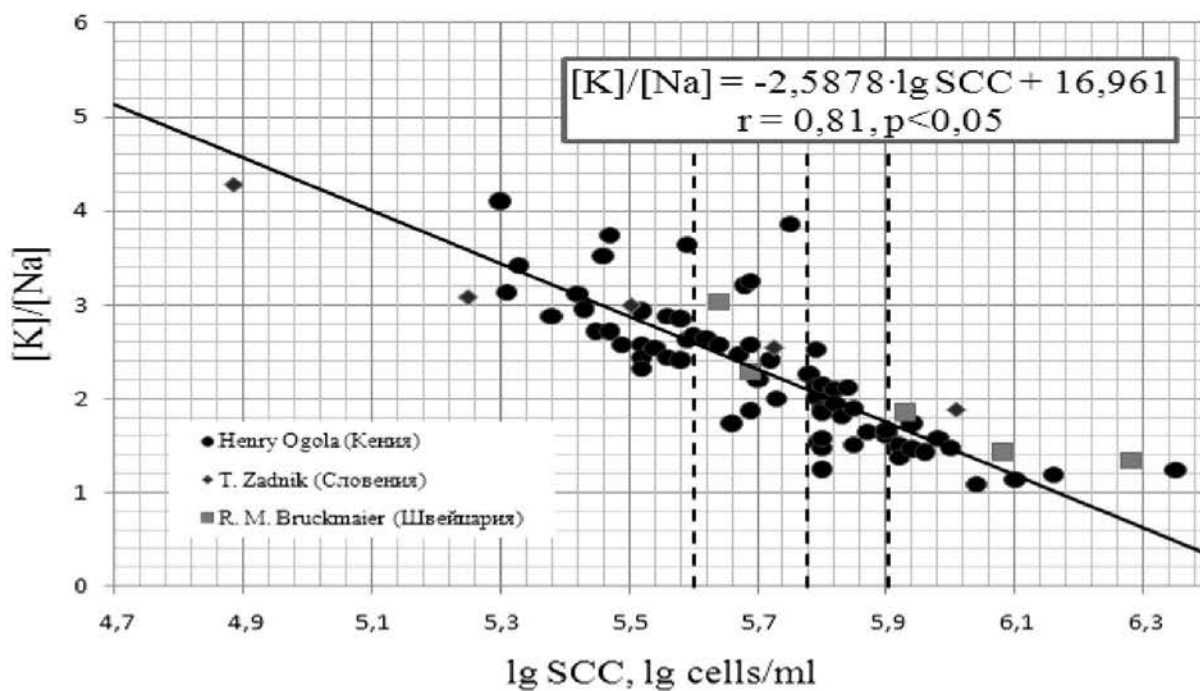


Рисунок 5 – Залежність відношення концентрації іонів калію до натрію  $[K]/[Na]$  від логарифма кількості соматичних клітин  $lg\ SCC$

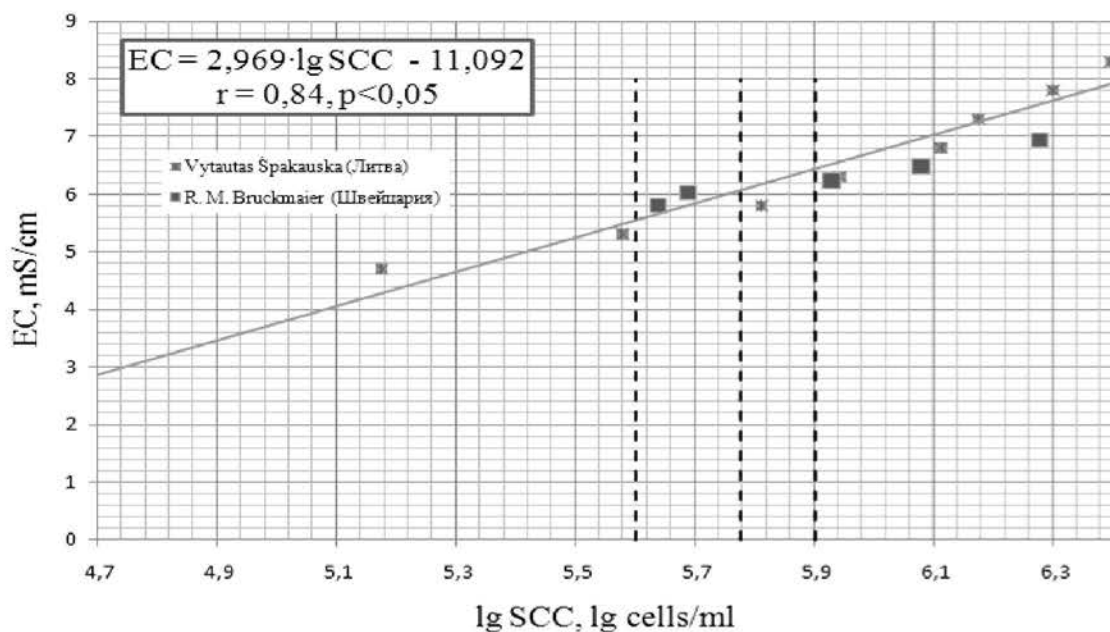


Рисунок 6 – Залежність електропровідності  $EC$  від логарифма кількості соматичних клітин  $lg\ SCC$

Коефіцієнт кореляції Пірсона розраховувався між lg SCC та концентрацією іонів (Na, K, Ca і Cl): додаткові коефіцієнти кореляції мають Na ( $r = 0,87$ ) і Cl ( $r = 0,85$ ), а від'ємні – K ( $r = -0,64$ ) и Ca ( $r = -0,87$ ) при  $p < 0,05$ .

Виходячи з вищесказаного можна зробити висновок: концентрація іонів  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^+$ ,  $\text{K}^+$ , і  $\text{Cl}^-$  залежить від кількості соматичних клітин у маститному молоці. Для визначення концентрації іонів можна використати іонометричний метод визначення іонів  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^+$ ,  $\text{K}^+$ , і  $\text{Cl}^-$ .

Цей сучасний фізико-хімічний метод заснований на вимірюванні міжелектродного потенціалу, що утворюється при контакті з досліджуваним розчином калій- (натрій-, хлору-, кальцій-) селективного електроду і електроду порівняння (рис.7). Метод дозволяє проводити одночасне визначення концентрації декількох іонів в одній пробі.

Якщо іоноселективний скляний електрод в парі з відповідним електродом порівняння (вимірювальний ланцюг з перенесенням або без переносу) занурити у розчин, що містить відповідний вимірюваний іон, то ЕРС ланцюга описується рівнянням [17]

$$E = E' + \frac{RT}{nF} \ln(a_M + \sum_S K_{M-S} a_S^{1/z} S),$$

де  $E$  - стандартне значення ЕРС вимірювального ланцюга;  $E'$  залежить від ряду умов, у тому числі від активності внутрішнього розчину і від виду застосованого внутрішнього електроду порівняння;  $a_M$  - активність іонів, що досліджуються;  $a_S$  - активність іонів, що заважають;  $z$  - заряд іонів, що заважають;  $K_{M-S}$  - коефіцієнт селективності (що визначає іон-заважаючі іони).

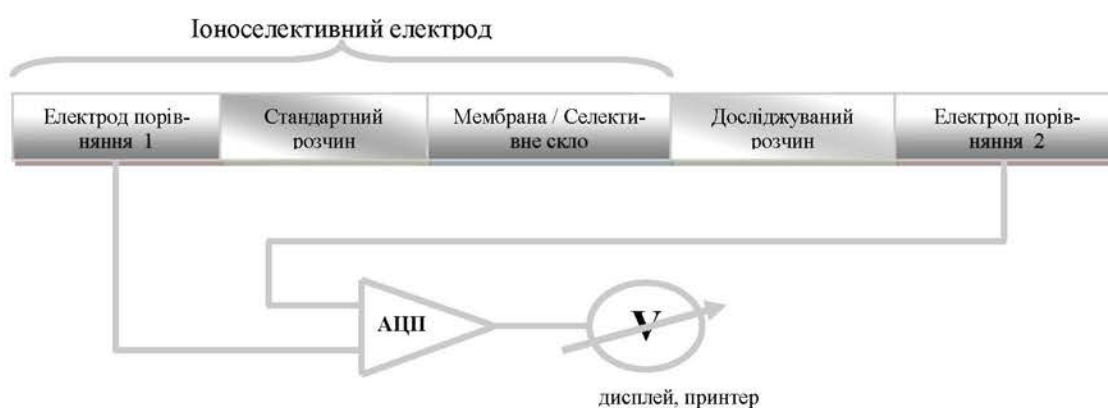


Рисунок 7 – Схема іоноселективного електроду

Натрій-селективні електроди виготовляються із спеціального проникного для іонів  $\text{Na}^+$  скла; всередину заливається електроліт з відомою активністю іонів натрію і поміщається хлорсрібний електрод порівняння. Термін роботи такого електроду вимірюється місяцями - роками. Специфічність натрієвого скляного електроду досить висока, що і забезпечує його широке застосування в медико-біологічних дослідженнях. Для виготовлення  $\text{Na}^+$ -електродів використовують натрієве алюмосилікатне скло. Електроди з нього мають високу селективність до іонів  $\text{Na}^+$  у присутності двозарядних іонів ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ). Іони  $\text{K}^+$  не впливають на  $\text{Na}^+$ -функцію цих електродів до співвідношення концентрацій  $C_{\text{K}}:C_{\text{Na}} = 250:1$ . Так як в молоці вміст іона  $\text{Na}^+$  значно перевершує вміст всіх інших іонів ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), то ці електроди цілком придатні для визначення концентрації  $\text{Na}^+$  у молоці. Зіставлення концентрацій іонів  $\text{Na}^+$ , що визначаються методом ЕРС за допомогою натрієвого скляного електроду й полум'яної фотометрії, показало добрий збіг результатів: розбіжність не перевищує 2,5% [17-18].

Вміст іонів  $\text{K}^+$  у молоці – також одна з найважливіших характеристик. Перші спроби потенціометричного контролю вмісту іонів  $\text{K}^+$  в біологічних середовищах пов'язані з використанням іонометричного датчика калієвого скляного електроду. Однак застосування останнього ускладнено низькою селективністю іонів  $\text{K}^+$  у присутності іонів  $\text{Na}^+$ . Тому при дослідженні біологічних середовищ доводиться незалежно визначати вміст іонів  $\text{Na}^+$  і при розрахунку концентрації іонів  $\text{K}^+$  вводити відповідні поправки. Метод виявляється трудомістким, а точність його невисока. Проблему потенціометричного визначення іонів  $\text{K}^+$  у молоці вдалося вирішити з появою  $\text{K}^+$ -електродів на основі МАК. Електроди з  $\text{K}^+$ -функцією успішно застосовували деякі автори при аналізі іонного складу біологічних середовищ, зокрема молока [17-18]. У калій-селективних електродах з рідкою мембраною використовується діафрагма, пори якої заповнені розчином проникної тільки для іонів  $\text{K}^+$  активної речовини (іонофори) в органічному розчиннику. На жаль, пористі мембрани неміцні і з часом руйнуються (термін служби - до 1-3 місяців). Ці недоліки частково усунені в плівкових електродах, в яких активна речовина і розчинник впроваджені в полімерну матрицю. Термін служби в цьому випадку збільшується до 8-12 місяців.

У молоці збільшення кількості соматичних клітин призводить до збільшення концентрації іонів хлору. Застосування електродів, оборотних до іонів  $\text{Cl}^-$  і стійких в цих середовищах, дозволило б вимірювати активності іонів  $\text{Cl}^-$ . Для визначення вмісту іонів  $\text{Cl}^-$  в біологічних середовищах в ряді робіт застосовували хлорсрібний електрод другого роду; це дозволило знаходити концентрацію іонів  $\text{Cl}^-$  в потоці. Проте наголошується, що в деяких середовищах цей електрод не дає стійких в часі значень потенціалів.

Іонометрія володіє принциповими перевагами серед інших методів:



- визначається "активність іона" (іонізована фракція) на тлі загальної концентрації елемента. Виміряні значення [Na] і [K] в пробі відрізняються від показників полум'яної фотометрії приблизно на 2,5%, тому в деяких приладах вводиться спеціальна корекція показань.

- час встановлення потенціалу іоноселективних електродів складає секунди, що дозволяє прискорити проведення аналізу;

- широкий діапазон вимірювань (від 1 моль/л до  $10^{-6}$  моль/л), похибка близько 2%;

- малий обсяг проби (0,2-0,3 мл), простота і дешевизна аналізу (не потрібно додаткових реагентів);

- вимірювання можна проводити в непрозорих, митних і забарвлених середовищах.

До недоліків слід віднести:

- неабсолютну селективність електродів (можлива інтерференція з іншими іонами);

- для всіх електродів характерний деякий дрейф потенціалу, що вимагає періодичного градування приладу. Ресурс електродів - від кількох місяців до 3 років.

Подальший прогрес у іонетрії пов'язаний з розробкою нових іоноселективних електродів з твердим внутрішнім контактом між мембраною і металевим струмовідводом (електроди другого покоління). Електродами третього покоління є іоноселективні мембранні польові транзистори, які знаходять застосування в портативних приладах.

**Висновки.** Досліджені залежності концентрацій іонів натрію [Na], калію [K], кальцію [Ca], хлору [Cl] та електропровідності ЕС від кількості соматичних клітин SCC в молоці. Обґрунтоване використання іонетричного методу для визначення кількості соматичних клітин. Розглянуті переваги і недоліки іонетричного методу серед інших методів визначення кількості соматичних клітин.

#### **Перелік посилань.**

1. *Дмитрів О. Я.* Субклінічний мастит у корів (етіологія, патогенез, методи діагностики і профілактики) : автореф. дис. к. вет. наук: 16.00.07 / Дмитрів Оксана Ярославівна; Львівська державна академія ветеринарної медицини імені С.З.Гжицького. — К., 2003. — 16 с.

2. *Коган Г.Ф.* Маститы и санитарное качество молока / Г.Ф. Коган, Л.П. Горина. — Минск.: Ураджай, 1990. — 133 с.

3. *Гаврилов Г.Б.* Анализ методов определения соматических клеток / Гаврилов Г.Б. // Молочная промышленность. — 2006. — №7.

4. *Крусъ Г.Н.* Методы исследования молока и молочных продуктов / Крусъ Г.Н. – М.: Колос, 2000. – 370 с.
5. *E. Norberg, H. Hogeveen, I. R. Korsgaard, N. C. Friggens, K. H. M. N. Sloth, and P. Luvendahl.* Electrical Conductivity of Milk: Ability to Predict Mastitis Status.
6. *Kitchen, B. J.* 1981. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *J. Dairy Res.* 48:167.
7. *Wong, N. P.* 1988. Physical properties of milk. Page 409 in *Fundamentals of dairy chemistry*. 3rd ed. N. P. Wong, ed. Van Nostrand Reinhold Co., New York, NY.
8. *Linzell, J. L., and M. Peaker.* 1971. The permeability of mammary ducts. *J. Physiol.* 216:701.
9. *Mielke, H.* 1975. Das Verhalten der osmotisch-aktiven Substanzen in der Milch gesunder und kranker Euterviertel als biologische Grundlage automatisierbarer Eutergesundheits- und Milchqualitätskontrollsysteme bei der industriemässigen Milchproduktion. *Monatsh. Veterinaermed.* 30:334.
10. *Oshima, M.* 1978. Empirical formula for correcting electrical conductivity values of milk in relation to temperature. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 49:180.
11. *Kitchen, B. J., G. Middleton, I. G. Durward, R. J. Andrews, and M. C. Salmon.* 1980. Mastitis diagnostic tests to estimate mammary gland epithelial cell damage. *J. Dairy Sci.* 63:978.
12. *Henry Ogola, Anakalo Shitandi, Jackin Namua.* Effect of mastitis on raw milk compositional quality. *J. Vet. Sci.* (2007), 8(3), 237–242.
13. *T. Zadnik, M. Klinkon, M. Nemeč and M. Mesarič.* The analysis of weekly milk bulk tank components as a routine indicator of herd health status. *Israel journal of veterinary medicine.* Vol. 56 (2) 2001.
14. *R.M. Bruckmaier, C.E. Ontsouka, J.W. Blum.* Fractionized milk composition in dairy cows with subclinical mastitis. *Vet. Med. – Czech*, 49, 2004 (8): 283-290.
15. *Vytautas Špakauskas, Irena Klimienė, and Algimantas Matusevičius.* A comparison of indirect methods for diagnosis of subclinical mastitis in lactating dairy cows. *Veterinarski arhiv* 76 (2), 101-109, 2006.
16. *Andrea Summer, Piero Franceschi, Massimo Malacarne, Paolo Formaggioni, Flavio Tosi, Gianfranco Tedeschi, Primo Mariani.* Influence of somatic cell count on mineral content and salt equilibria of milk. *Ital.J.Anim.Sci.* vol. 8 (Suppl. 2), 435-437, 2009
17. *Камман К.* Работа с ионоселективными электродами / Камман К. – М.: Мир, 1980. – 286 с.
18. *Никольский Б.П.* Ионоселективные электроды / Никольский Б.П., Матерова Е.А. – Л.: Химия, 1980. – 240 с.

19. *Брусиловский Л.П.* Автоматический контроль кислотности молока и молочных продуктов. Общая информация / Брусиловский Л.П., Вайнберг А.Я. – М.: Пищевая промышленность, 1971. – 84 с.

20. *Корыта И.* Ионоселективные электроды / Корыта И., Штулик К. – М.: Мир, 1989. – 268 с.

21. *Власов Ю. Г.* Электронный язык — системы химических сенсоров для анализа водных сред/ Власов Ю. Г., Легин А. В., Рудницкая А. М. // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева), 2008 – т. LII – №2

## **IONOMETRIC METHOD FOR DETERMINING THE NUMBER OF SOMATIC CELLS IN MILK**

**Summary.** An important indicator of the quality of milk is contents of somatic cells (CSC). Being able to constantly monitor the contents of somatic cells, the farms can more efficiently and quickly identify cows with mastitis and consequently improve the quality of milk. It is known that in event of inflammation (mastitis) in the udder is changing not only the qualitative composition of milk, but also its physical and chemical properties in particular the concentration of ions of sodium, potassium, calcium chlorine and electrical conductivity. The dependence of the ion concentration of ions of sodium [Na], ions of potassium [K], ions of calcium [Ca], chlorine [Cl] and electrical conductivity on the number of somatic cells was investigated. The advantages and disadvantages of the ionometric method for determining the number of cells were considered.