

**ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ОБЩ БРОЙ СОМАТИЧНИ КЛЕТКИ И БАКТЕРИИ В СУРОВО  
МЛЯКО ЧРЕЗ АВТОМАТИЧЕН ФЛЮОРЕСЦЕНТЕН ОБРАЗЕН ЦИТОМЕТЪР  
LACTOSCAN SCC**

**Явор Иванов**

*Университет "Проф. д-р Асен Златаров", катедра Биотехнология, ул. проф. Якомов 1,  
8010 Бургас, e-mail: [qvor\\_burgas@abv.bg](mailto:qvor_burgas@abv.bg)*

**DETERMINATION OF TOTAL NUMBER OF SOMATIC CELLS AND BACTERIES IN  
RAW MILK BY AUTOMATIC FLUORESCENT IMAGING CYTOMETR LACTOSCAN  
SCC**

**Yavor Ivanov**

*University "Prof. Dr. Assen Zlatarov", Biotechnology Department, Prof.Yakimov str.1,  
8010 Burgas, e-mail: [qvor\\_burgas@abv.bg](mailto:qvor_burgas@abv.bg)*

**ABSTRACT**

The total number of somatic cells (SCC) is a recognized indicator of cow health and milk quality. SCC is an indicator of the presence of infection and inflammation of the milk of the dairy cows, called mastitis. The total number of bacteria in milk is also an important indicator of milk quality. Individual methods for the express and objective diagnosis of somatic cells and bacteria in milk have been developed. Methods were performed using Lactoscan SCC fluorescence imaging cytometer. The Lactoscan SCC is portable, using LED optics and CCD capture technologies. To stain the somatic cells and bacteria, a new fluorescent DNA dye Sofia Green, which has a high emission intensity and a very low background, is used. A comparison of the new fluorescent dye with the commercial dye propidium iodide was made. Optimal conditions for determining the total number of somatic cells and bacteria - concentrations of lysis buffer and fluorescent dye were determined. An important factor in determining the number of bacteria is the clarification of the milk sample. Different methods are used to clarify the milk - chemical, enzymatic, physical methods. The purpose of this treatment is to lysate somatic cells, to dissolve fat globules and proteins and to prepare bacterial cells to penetrate the dye to bacterial cell DNA. The degree of clarification of the milk sample is monitored by measuring its optical density. The coefficient of variation of all results has been calculated. It moves in the range of 2-6%. The data obtained convincingly shows the good technical capabilities of the new apparatus for determining the total number of somatic cells and the total number of bacteria.

**Key words:** *total number of somatic cells, total number of bacteria, milk, fluorescence image cytometer.*

**ВЪВЕДЕНИЕ**

Общият брой на соматичните клетки и общия брой на бактериалните клетки в суровото мляко са важни индикатори за качеството му. Млякото е сложна, непрозрачна смес съдържаща много компоненти и трудно се анализира се чрез оптични методи. За да се определи директно броя на соматичните и бактериални клетки чрез оптични методи е необходимо да се избистри млечната проба. За целта трябва селективно да се разградят неклетъчната частици, съдържащи се в млякото, без да се засягат микроорганизмите и соматични клетки. Освен това трябва да се разградят и разтворят казеиновите мицели присъщи на млякото. Казеинът има тенденция да води до утаяване на протеините и образуване на протеинови филми по стените на кюветата или микрочипа. Предложени са много методи за избистряне на млякото [2,3], но никой от тях не дава задоволителни резултати. В патент [5] предлагат смес от различни реагенти (йон-хелиращо средство, протеолитичен ензим, детергент и бактериологично специфичен хромофор) способни да лизират соматичните клетки, да разграждат и разтварят протеиновите частици и клетъчни остатъци от соматичните клетки и оцветяват по същество всички бактерии в първоначалната проба от мляко. Стойността на рН се поддържа в интервала от 9.3 до 9.5. Пробата с избистрящия разтвор се разбърква при температура 50<sup>0</sup>С за 5 мин. В друг патент [6] предлагат смес от реагенти, при която избистрянето се осъществява при стайна температура

за кратко време. Реагентът съдържа изодецилалкохол-1-полигликолов етер (Walloxen ID 110/80), Triton® X-114, амониев формат и бактериологично специфичен хромофор. И в двата случая оцветените бактериални клетки се преброяват чрез поточен цитометър. Недостатъкът на тези методи е използването на скъпо струващ апарат, необходимостта от квалифициран персонал, невъзможност да се наблюдава морфологията на клетките.

Целта на настоящото изследване е да се определят оптималните условия за съвместно броене на бактериални и соматични клетки в мляко чрез използването на автоматичен флуоресцентен оптичен микроскоп Lactoscan SCC-10 (Милкотроник ООД). Предимството на този апарат са: прост, лесно обслужван, преносим, показващ едновременно не само броя на бактериите и соматичните клетки, но и тяхната морфология чрез микроскопски изображения.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### Материали

Основната част от реагентите за приготвяне на избистрящите разтвори са закупени от фирма Sigma Aldrich, Germany -  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_4\text{EDTA}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , протеаза (100 U), липаза (120 U), Tween 80, Triton 114, амониев формат. Реагентът Walloxen ID 110/80 е доставен от Wall Chemie GmbH, Kempen, Germany. Флуоресцентното багрило Sofia Green е новосинтезирано багрило, произведено от фирма Милкотроник ООД.

### Определяне на броя на соматичните клетки в мляко

Пробата от мляко се разбърква внимателно. Температурата на пробата може да бъде в диапазона от 10 до 40 °C. От разбърканото мляко се отпипетират 100  $\mu\text{L}$  и се поставят в епендорфка съдържаща лиофилизирана смес от 100  $\mu\text{L}$  лизисен реагент и 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  флуоресцентно багрило Sofia Green. Лизисният разтвор е 0.5 % Triton x 100. Следва внимателно разбъркване само за няколко секунди чрез неколккратно пипетиране с автоматична микропипета или използване на Vortex. След престой от около 1 min, съдържимото в епендорфката се разбърква отново и 9  $\mu\text{L}$  от оцветеното мляко се отпипетира и се поставя в микрофлуидната камера (Lactochip), която се вмъква в каретката на апарата Lactoscan SCC-4 и се провежда измерването.

### Разтвори за избистряне на млечната проба

Използват се два избистрящи разтвора. Избистрящ разтвор 1 съдържа детергент, буферен разтвор (карбонатен буфер и ЕДТА) и ензим. Буферът се приготвя от 7.60 g/l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 8.84 g/l  $\text{NaHCO}_3$ , 2.43 g/l  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}\cdot\text{H}_2\text{O}$  и 2.71 g/l  $\text{Na}_4\text{EDTA}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Разтворът на протеазата и на липазата са с концентрации 1mg/ml. Детергентът е Tween 80 с концентрация 1%.

Избистрящ разтвор 2 се състои от следните компоненти - 1,6 g амониев формат се разтваря в 10 ml дейонизирана вода, добавят се 2 g Walloxen ID 110/80 и 1 g Triton 114.

### Едновременно определяне броя на бактериите и соматичните клетки в мляко

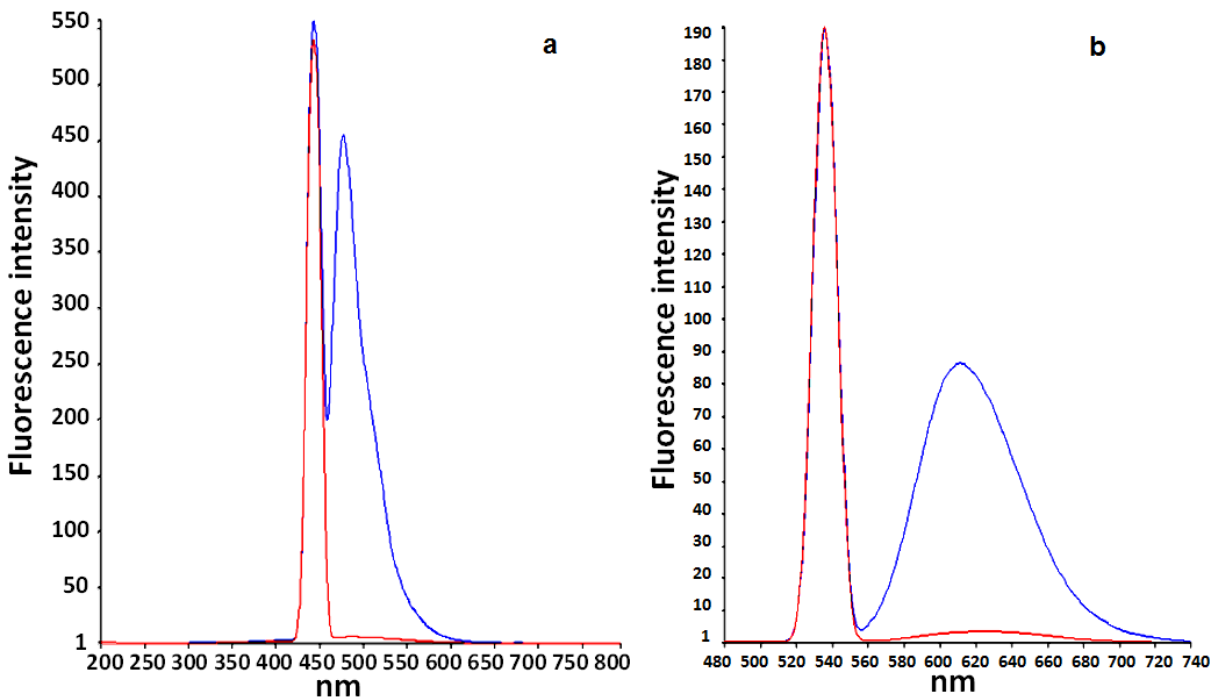
При използването на избистрящ разтвор 1, 0,5 ml мляко се смесват с 2 ml буферен разтвор. Сместа се хомогенизира. Добавят се 20  $\mu\text{l}$  ензима протеаза (100U) с концентрация 1mg/ml. След това се добавят 20  $\mu\text{l}$  разтвор на липаза (120U) с концентрация 1mg/ml. Сместа се инкубира 15 min. Прибавят се 250  $\mu\text{l}$  1% Tween 80 и се инкубира още 5 min. След това се прибавят 14  $\mu\text{l}$  разтвор на флуоресцентното багрило Sofia Green с концентрация 1mg/ml и сместа се инкубира за 3 min. 9  $\mu\text{L}$  от оцветеното мляко се отпипетира и се поставя в микрофлуидната камера за да се осъществи броенето на соматичните и бактериални клетки чрез Lactoscan SCC-10.

При използването на избистрящ разтвор 2 съотношението мляко към избистрящ разтвор се варира по следния начин: 1:1, 1:2, 1:3.

И в двата случая се проследява влиянието на температурата 20, 30, 40, 50 °C и сонификацията на пробата.

**РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ**

Регламент номер 1662/2006 на Европейската комисия на ЕС относно определянето на специфични хигиенни правила за храните от животински произход изисква за млякото общ брой бактерии по-малко от 100 000 cells/ml и общ брой соматични клетки по-малко от 400 000 cells/ml. За разработването на флуоресцентния микроскопски метод за определяне броя на соматични и бактериални клетки в мляко е използвано новото ДНК флуоресцентно багрило Sofia Green, производство на Милкотроник ООД. Това багрило има висок флуоресцентен интензитет след свързването с ДНК и много нисък фон [1]. Направено е сравнение на емисионните спектри на новото багрило със спектрите на комерсиалното багрило пропидиев йодид преди и след свързване на багрилото с ДНК (фиг. 1 и таблица 1).



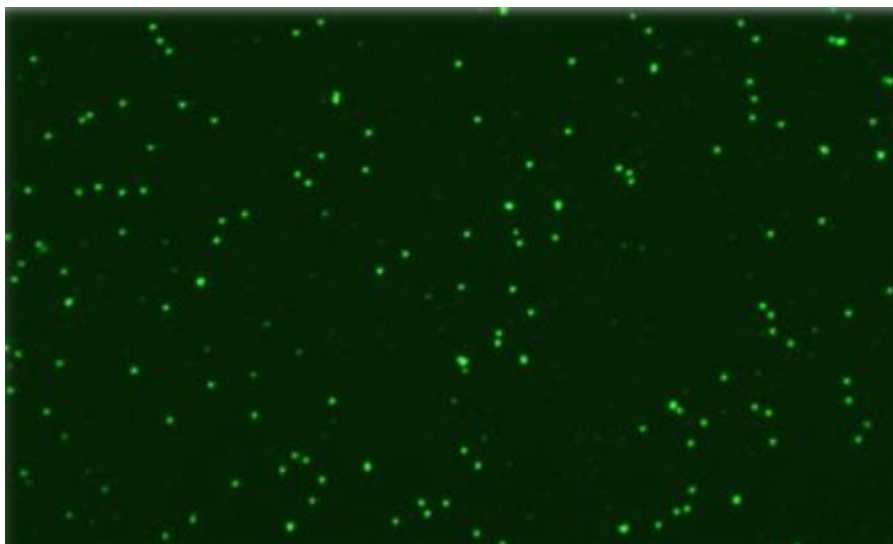
**Фиг.1. Флуоресцентни спектри на Sofia Green (а) и пропидиев йодид (б) преди (червено) и след свързване с ДНК (синьо). Отношението на Sofia Green (50 µg / ml): ДНК (50 µg / ml) = 1: 12.5. Отношението на пропидиев йодид (50 µg / ml) : ДНК (500 µg / ml) = 1: 1.**

**Таблица 1. Флуоресцентни оптични характеристики на багрилата Sofia Green и Пропидиев йодид**

Багрило	$\lambda_{ex}$ , nm	$\lambda_{em}$ , nm	Флуоресцентен интензитет на свободното багрило ( $I_0$ )	Флуоресцентен интензитет на свързаното багрило с ДНК ( $I_f$ )	$I_f/I_0$
Пропидиев йодид	535	617	6.5	85	13
Sofia Green	476	514	5.7	455	80

Соматичните клетки имат по-голям размер от размера на бактериите – 9-10 µm. Те се лизират благодарение на лизиращ агент намиращ се в епендорфката, при което клетъчните им стени стават проницаеми. Това позволява на намиращото се ДНК багрило в епендорфката, да

се свърже с ДНК на ядрото на клетките и те започват да флуоресцират. Тъй като размерът на соматичните клетки е голям, флуоресциращите клетки се визуализират лесно и не се налага да се избистря предварително млякото. Измерването се осъществява на апарата Lactoscan SCC-4, производство на фирма Милкотроник ООД, който е с увеличение (x10). Полученото изображение е представено на Фиг. 2.



**Фиг.2. Флуоресцентно микроскопско изображение на соматични клетки в мляко с използването на автоматичен флуоресцентен микроскоп Lactoscan SCC- 4**

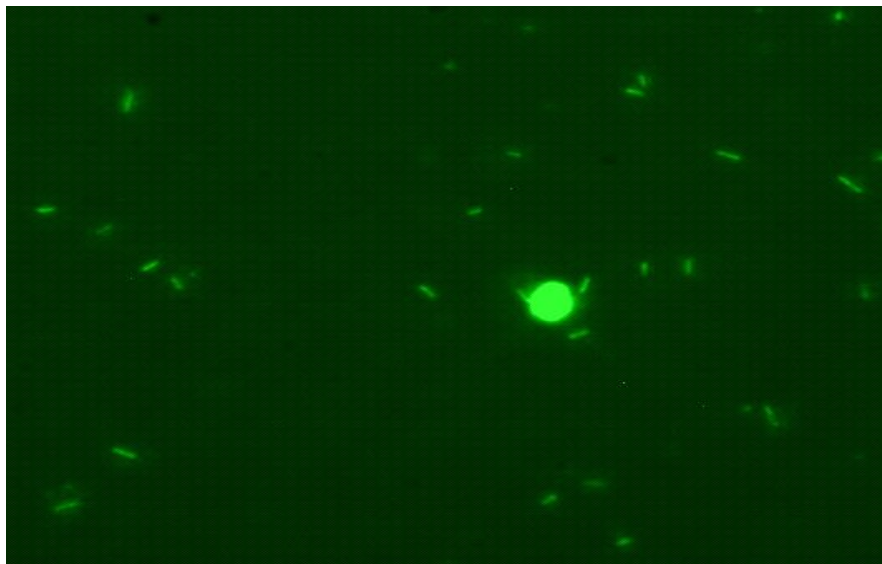
Анализирани са 10 проби. Всяка проба е измерена по 5 пъти. Броят на соматичните клетки в различните проби се движи от 300 000 до 500 000 cells/ml. Изчислени са коефициентите на вариация на отделните проби. Резултатите показват, че анализът е много точен – коефициентите на вариация се движат от 2-6%.

Бактериите са с малък размер 2-5 $\mu$ m и не се визуализират добре с апарата Lactoscan SCC- 4. За да се определи броя на бактериалните клетки в млякото е необходимо да се избистри предварително пробата мляко. Освен това, за да се наблюдават по-добре бактериалните клетки се използва апарат с по-голямо увеличение Lactoscan SCC-10 (x40). Избистрянето се провежда чрез прилагане на различни химични и физични методи. Целта на тези обработки е да се разтворят масните глобули и протеини и да се пермеализират бактериите и соматични клетки, за да проникне багрилото до ядрото на клетките и да се свърже с ДНК. Проследена е степента на избистряне на млечната проба при прилагането на различните методи чрез измерване на нейната оптична плътност. Използвани са двата избистрящи раствора описани по-горе: Разтвор 1: карбонатен буфер, ЕДТА, Tween 80, ензими; Разтвор 2: амониев формат, Walloxen ID 110/80, Triton 114.

Нов елемент е добавянето на втори ензим липаза в разтвор 1, който хидролизира и мазнините в млякото. Така се постига по-пълно избистряне на млякото. Освен това проследено е влиянието на температурата върху процеса на избистряне и при използването на двата раствора. За целта избистрянето е проведено при четири температури 20, 30, 40 и 50 °C. Установено е, че температурата не оказва съществено влияние върху взаимодействието на избистрящ разтвор 2 с млечната проба. При избистрящ разтвор 1 обаче се установи, че най-подходяща температура е в интервала 30 - 40°C. Причината за това е, че в този температурен интервал се намира температурния оптимум на протеиназата и липазата и ензимното действие е най-ефективно за да се хидролизират протеините и мазнините. Проследено е влиянието и на сонификацията на пробата (ултразвукова обработка на млечната проба смесена с

избистрящите разтвори). За целта са приложени три различни времена на сонификация с уреда Brenson Sonifier 150 – 5, 10 и 20 min. Установено е, че ултразвукова обработка не оказва съществено влияние върху избистрянето на разтвора.

При сравняването на действието на двата избистрящи разтвора се доказва, че разтвор 2 избистря много по-добре млякото, отколкото разтвор 1. С този разтвор се постига по-висока прозрачност на млечната проба. На фиг. 3 е представено флуоресцентното изображение на клетките в мляко, измерено с Lactoscan SCC-10.



**Фиг.3. Флуоресцентно микроскопско изображение на бактериални и соматични клетки в мляко с използването на автоматичен флуоресцентен микроскоп Lactoscan SCC-10.**

Бактериалните и соматични клетки се изброяват на една и съща платформа, което е голямо предимство за този метод. От фиг.3 се вижда, че бактериалните клетки са много по-малки от соматичните клетки (на снимката се вижда само една соматична клетка).

Направено е сравнение на резултатите за брой бактериални клетки в 7 проби от мляко получени с разработения метод и с поточния цитометър (Guava easyCyte 8HT), Таблица 2. Получените резултати показват много добра корелация между двата метода.

**Таблица 2. Сравнение на броя на бактериалните клетки измерени с помощта на Lactoscan SCC-10 и поточен цитометър**

Номер на пробата	Флуоресцентен образен микроскоп (Lactoscan SCC-10)	Поточен цитометър (Guava easyCyte 8HT)
1	199	192
2	195	190
3	550	556
4	525	523
5	835	840
6	1025	1022
7	1217	1219

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определени са оптималните условия за съвместно броене на бактериални и соматични клетки в мляко чрез използването на автоматичен флуоресцентен оптичен микроскоп

Lactoscan SCC–10 (Милкотроник ООД). Предимството на този апарат са: прост, лесно обслужван, преносим, показващ едновременно броя на бактериите клетки и броя на соматичните клетки, както и тяхната морфология чрез микроскопски изображения.

### ЛИТЕРАТУРА:

1. Atanasova, M., Ivanov, Y., “Studing of characteristic of fluorescent dye YO-Dam-1”. Proceedings of University of Ruse, Biotechnology and food biotechnology, 54, 10.2: 70-74, 2015
2. Elemer Faltusz, Method and medium for the determination of the bacteriological and cytological texture of raw milk, DE4017398A1, 1991
3. Elemér Faltusz, Method for solubilising milk for purposes of analysis, EP0573054B1, 1993.
4. Norbert Pautz, Riehen, Pierre Broutin, Lille, Reagent for clarifying emulsions and method of clarification, USA Patent 0056625 A1, 2015.
5. Poul Erik Aegidius, Method for the conditioning of liquid samples, USA Patent 5,798,221, 1998.