

УДК 619:616.98:578

**Власенко В.В., Власенко І.Г., Крижак Л.М., Новгородська Н.В.,
Фаріонік Т.В., Шаваран В.М., Штенська О.Б. ©***Вінницький національний аграрний університет***НОВІ ПІДХОДИ ДО УДОСКОНАЛЕННЯ ОЦІНКИ ЯКОСТІ ТА
БЕЗПЕКИ МОЛОКА З ВИКОРИСТАННЯМ БАКТЕРІОЛОГІЧНИХ
КОМП'ЮТЕРНИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

У роботі досліджується сучасний стан та перспективи покращення якості і безпеки молока в Україні. Запропоновані нові підходи до удосконалення оцінки якості та безпеки молока з використанням комп'ютерних технологій та нових поживних середовищ.

В Україні законодавча база нормативно-правових актів щодо якості та безпеки молока врегульована недостатньо, а введений ДСТУ 3662—97 розрахований в основному на молоко, яке заготовлялося у колективних сільськогосподарських підприємствах. Тому фахівцями ветеринарної медицини України розроблені й введені в дію «Ветеринарні та санітарні вимоги до особистих підсобних господарств населення — виробників сирого товарного молока» і «Ветеринарні та санітарні вимоги до пунктів закупівлі молока від тварин, які утримуються в особистих господарствах населення», оскільки значна частка молока надходить на молокопереробні підприємства з приватного сектора. Для більш великих господарств на сьогодні відсутня будь-яка нормативна база, і вони керуються вимогами колишнього СРСР, але попередні нормативні документи не відповідають сучасним вимогам.

Відповідно до сучасних міжнародних вимог щодо якості продукції лише якісний контроль є вже недостатнім тому, що він не може гарантувати повну безпеку.

Окремі аспекти контролю якості продукції розглядалися у багатьох працях вітчизняних та зарубіжних авторів [1-8].

Метою нашої роботи було розробка експрес-методу виявлення патогенних мікобактерій з використанням комп'ютерної системи для оцінки безпеки молока.

Матеріали та методи. Для аналізу використовувались матеріали Комісії Codex Alimentarius (CA), положення Санітарної і фітосанітарної угоди Світової організації торгівлі (СОТ), законодавство з продуктів харчування ЄС.

Основними складовими частинами комп'ютерної системи для оцінки безпеки молока є мікроскоп типу МБР-1, відеокамера типу Quik Cam Home фірми Logitech або Philips, персональний комп'ютер типу Pentium з мінімальною конфігурацією. Для визначення ефективності комп'ютерної системи використовували культури мікобактерій: *M. tuberculosis* H37 Rv (з колекції ГИСК ім. Л.А.Тарасевича), *M. bovis* 8, *M. bovis* BCG, які висівали з

© Власенко В.В., Власенко І.Г., Крижак Л.М., Новгородська Н.В., Фаріонік Т.В., Шаваран В.М., Штенська О.Б., 2012

ліофілізованого стану спочатку на середовище Левенштейна-Йенсена, потім - на середовище Павловського.

Гомогенізовані культури суспензували в стимуляторі росту до концентрації 1 мг/мл., потім готували розведення (1:10) і ставили в термостат при температурі 37-38°C на 48 год. і висівали на середовище «Влакон».

Проводили відбір молока від корів, що реагували позитивно на туберкулін за загальноприйнятою методикою. В проби молока на 10 мл. додавали 2-3 краплі 5% розчину фенолу з метою інгібування росту супутньої мікрофлори додавали стимулятор росту і висівали на поживні середовища.

Результати досліджень. Європейським Парламентом та Радою 28 січня 2002 року було прийнято Постанову (ЄС) №178/2002, якою визначені загальні принципи і вимоги закону про продукти харчування, а також прийнято рішення про створення європейського органу контролю безпеки продуктів харчування і встановлення методів забезпечення безпеки продуктів (АВІ. №ЄС 31, с. 1). Дія постанови розповсюджується на всі країни ЄС. Мета постанови (ЄС) № 178/2002: «Створення основ для високого рівня захисту здоров'я людини та споживчих інтересів в галузі продуктів харчування, беручи до уваги різноманіття асортименту харчових продуктів». Це стало передумовою для створення міцної наукової основи для розпізнавання в сирому молоці стадійного розвитку збудника туберкульозу.

Для діагностування ми використовували мазки молока приготувані за загальноприйнятою методикою. При дослідженні молока використовували збагачення препаратом ВКВ.

Запропонований метод збагачення препаратом ВКВ (Власенко В., Крижак Л., Власенко І., 2012) дає можливість концентрувати збудника туберкульозу. Метод полягає в тому, що до молока в кількості 10 мл додають таку ж кількість препарату ВКВ (1:1) і кип'ятять 5 хвилин. Після охолодження вміст виливають у центрифужні пробірки, центрифугують при 1500 об/хв протягом 25-30 хвилин, надсадну рідину зливають, а з осаду роблять посів на поживні середовища та тонкі мазки, які висушують, фіксують та фарбують за методом Ціль-Нільсена. Мікроскопію проводили за загальноприйнятою методикою імерсійної системи з використанням комп'ютерних технологій мікроскопування.

Основними складовими частинами даної системи є мікроскоп типу МБР-1, відеокамера типу QuikCam Home фірми Logitech або Philips, персональний комп'ютер типу Pentium з мінімальною конфігурацією: частота роботи 166 MHz, ОЗП 16 MB, монітор, що підтримує 16-бітний режим і операційна система Windows 98. Вибір камери типу QuikCam Home обумовлений високими технічними характеристиками, низькою ціною та можливістю безпосередньої передачі зображень через Internet.

Відеокамера під'єднана до комп'ютера за допомогою стандартного порту USB.

Відеосенсор забезпечує розподільну здатність 300 тис. пікселів, формат зображення від 1604120 до 60480 точок на дюйм. При цьому кількість кольорів, що передаються, становить 256. Крім цього передбачений 8-бітний чорно-білий режим роботи.

Для функціонування даної системи розроблений спеціальний інтерфейс, який дозволяє фіксувати і виділяти необхідні ділянки мазка, проводити обробку зображення, створювати бібліотеку.

Інтерфейс має декілька діалогових вікон, а на принтері можна віддрукувати необхідні дані, у тому числі і фото зображення стадій розвитку збудника туберкульозу.

Обстеження необхідно проводити у певній послідовності, щоб не допустити повторення. Наприклад, якщо обстеження почато у центрі лівого краю мазка (біля номера), то поворотом гвинта обертаючого столик мікроскопа дуже повільно послідовно обстежити весь мазок, закінчивши обстеження у центрі правого краю. Кількість полів по одній довжині мазка відповідає, як мінімум 100. Потім треба посунути мазок вліво, щоб можливо було обстежити наступне поле.

Якщо агенти стадій розвитку мікобактерій туберкульозу (МБТ) виявляються раніше ніж буде обстежено 100 полів зору мікроскопа, але не менше 20-50, то обстеження можна закінчити і результат дослідження вважати позитивним. Результати наших досліджень наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Результати досліджень

Назва дослідного матеріалу	Кількість проб	Результати мікроскопії				Бактеріологічні дослідження (ріст)			
		Світлова мікроскопія		Комп'ютерна		Середовище Левенштейна – Йенсена		Середовище «Влакон»	
		Факт	%	Факт	%	Факт	%	Факт	%
M. tuberculosis H37	5	5	100	5	100	5	100	5	100
M. bovis 8	10	10	100	10	100	10	100	10	100
M. bovis BCG	10	10	100	10	100	10	100	10	100
Молоко інфікованих корів збудником туберкульозу	10	1	10	10	100	-	-	100	100

Як видно з табл. 1, результати мікроскопічних і бактеріологічних досліджень тест-культур з середовища Павловського різниці не мали, а при дослідженні мазків молока світловим мікроскопом виявилось позитивних мазків лише 10%, тоді як комп'ютерна мікроскопія-100%.

Після посіву досліджуваних проб через 2-4 доби на досліджуваному середовищі з'являлися круглі напівпрозорі дрібні колонії сіро-білих кольорів, іноді - з жовтуватим відтінком, що легко знімаються із середовища при приготуванні мазків.

У процесі перегляду мазків з отриманих колоній, що виростили на 2-4 добу на досліджуваному середовищі, виявлені поліморфні форми: дрібні коки палички різної величини, прямі й вигнуті, із зернистістю (при фарбуванні за Ціль - Нільсеном - від рожевого до червоно-фіолетових кольорів), тобто ріст культур з молока інфікованих корів збудником туберкульозу на середовищі

«Влакон» був в 100% досліджуваних проб, а на середовищі Левенштейна – Йенсена – відсутній. Отже, можна думати, що в середовище Левенштейна – Йенсена входить малахітовий зелений, який ігібує ріст не лише супутньої мікрофлори, але і збудника туберкульозу, який має понижену ферментативну активність.

При перегляді мазків культур, вирощених на досліджуваному середовищі протягом 1,5 міс. і пофарбованих за Ціль - Нільсеном, виявлені розсипи коків, ди - і тетракоків, у великій кількості - палички різної величини із зернистістю, а також інші форми червоних кольорів.

Таким чином, при культивуванні мікобактерій на досліджуваному середовищі підтверджена їхня здатність трансформуватися в класичні палички.

При комп'ютерній мікроскопії мазків з молока корів, що реагували позитивно на туберкулін, спостерігали клітини рожево-червоного кольорів: коки дрібні й великі палички короткі й довгі із зернами, прямі й вигнуті, палички.

Для запобігання хибних результатів при проведенні бактеріоскопії виникає необхідність оцінити наявність живих мікобактерій в мазку, оскільки вони не фарбуються за методом Ціля-Нільсена, а тому дуже важливо визначити життєздатність мікобактерій. З цією метою приготовлений мазок молока від вищезгаданих корів фіксували над полум'ям, фарбували 1,0% розчином малахітового зеленого (рН 4,1) протягом 10 хвилин, підігріваючи мазок до появи парів. Після цього фарбу зливали, мазок промивали водою і забарвлювали карболовим фуксином (в розведенні 1:5) протягом 5 хвилин. Живі мікобактерії фарбуються в зелений колір, а нежиттєздатні — в червоний.

В результаті проведених досліджень встановлено, що всі досліджувані мазки молока від корів, які реагували на введений туберкулін позитивно, в 100 полях зору мікроскопа мали від 7 до 43 клітин збудника туберкульозу. Можна думати, що при фіксації над полум'ям спиртівки мазків молока не вбиваються до кінця мікобактерії, а тому вони погано фарбуються за методом Ціль-Нільсена .

Запропонований метод збагачення мікобактерій в молоці препаратом ВКВ дає можливість концентрувати збудника туберкульозу за допомогою препарату ВКВ і при фіксації мазка клітини мікобактерій приходять до неживого стану. В результаті цього та комп'ютерних технологій (значне збільшення) покращується дослідження з виявлення збудника туберкульозу.

Висновки:

1. Основою гарантування безпеки молочної продукції в Україні є система моніторингу залишкових кількостей санітарно небезпечних збудників і токсичних речовин у молочних продуктах харчування.

2. Запропонована комп'ютерна система може бути з успіхом використана при оцінці біологічної безпеки молока-сировини, що посилить контроль за показниками якості та безпеки.

3. Запропоновано поживне середовище «Влакон», за допомогою якого можна мінімізувати бактеріальне обсіменіння молока в процесі його отримання.

4. Кількісна оцінка ризику повинна здійснюватись на базі нових систем контролю санітарної безпеки харчових продуктів і стає особливо важливою для проведення міжнародної торгівлі харчовими продуктами.

Література

1. Барбара Якобз. Безопасность продуктов питания в ЕС. // Продукты и ингредиенты .Київ - 2005. №7(16) С.64-66

2. Мельничук С.Д., Хмельницький Г.О., Якубчак О.М. Якість і безпека продукції тваринництва: сучасний стан і перспективи. // Сучасна ветеринарна медицина Київ - 2005. - №4.С. 6-7

3. Матеріали міжнародного інституту природничих наук (ILSI). Оценка безопасного для здоровья содержания химических соединений в продуктах питания. // Пищевые ингредиенты сырье и добавки. - 2005. Москва -№1С.68-69

4. Гойчук О.І. Продовольча безпека та її забезпечення в Україні. Вісник аграрної науки Причорномор'я. - Вип.,4. - Миколаїв, 2001, -6с. 205-211.

5. Пароля О.Б. Качество пищевой продукции как элемент государственной политики в сфере повышения уровня здоровья нации. Международный научно-теоретический журнал Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария .№ 3, 2004, - С.68-70

6. Власенко В.В. Туберкулез в фокусе проблем современности. Винница: Наука. 1998. 35 с.

7. Власенко В.В., Багрий П.И. Стимулятор роста возбудителя туберкулеза «Ридын», питательная среда для выделения возбудителя туберкулеза, способ получения питательной среды, способ выделения возбудителя туберкулеза на питательной среде. Патент Украины № 43467. Бюллетень № 11.17.12.2001.

8. Власенко В.В., Лысенко А.П., Дзюмак М.А. и др. Экологический мониторинг при туберкулинодиагностике крупного рогатого скота. Агроэкологічний журнал. 2003. № 1. С. 76-79.

9. Лысенко А.П. Власенко В.В., Агеева Т.Н. и др. Стимулятор роста и среда ВКГ для ускоренного выделения микобактерий, культуральные, патогенные и антигенные свойства изолируемых культур // Ветеринарная медицина.

Summary

In work the modern state and prospects of improvement of quality and safety of milk in Ukraine is explored. Offered new approaches to the improvement of quality and safety of milk from the use of computer technologies and new nourishing environments.

Рецензент – д.с.-г.н., професор Цісарик О.Й.