



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ**



дипл. инж. Љубиша Шарић

**Антибактеријска активност млека магарице
балканске расе**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Нови Сад, 2015.

Универзитет у Новом Саду

Технолошки факултет

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број: РБР	
Идентификациони број: ИБР	
Тип документације: ТД	Монографска документација
Тип записа: ТЗ	Текстуални штампани материјал
Врста рада (дипл., маг., докт.): ВР	Докторска дисертација
Име и презиме аутора: АУ	Љубиша Шарић, дипл. инж.
Ментор (титула, име, презиме, звање): МН	Др Драгољуб Цветковић, ванредни професор
Наслов рада: НР	Антибактеријска активност млека магарице балканске расе
Језик публикације: ЈП	Српски, ћирилица
Језик извода: ЈИ	Српски / енглески
Земља публикација: ЗП	Република Србија
Уже географско подручје: УГП	Војводина
Година: ГО	2015.
Издавач: ИЗ	Ауторски репринт
Место и адреса: МА	Булевар цара Лазара 1, 21000 Нови Сад, Србија
Физички опис рада: ФО	6 поглавља, 199 страница, 43 слике, 75 табела, 208 референци
Научна област: НО	Биотехничке науке

Научна дисциплина: НД	Прехрамбено инжењерство
Предметна одредница, кључне речи: ПО УДК	Антибактеријска активност, млеко магарице, патогене бактерије
Чува се: ЧУ	У библиотеци Технолошког факултета у Новом Саду, Бул. цара Лазара 1, 21000 Нови Сад
Важна напомена: ВН	Нема
Извод:	
ИЗ	

Млеко магарице је тек последњих година доспело у фокус научних истраживања, иако су његова благотворна терапеутска и козметичка својства позната још од античких времена. Упркос томе што знање о функционалности млека магарице константно расте, његов антимикуробни потенцијал остаје најмање истражен. Литературни подаци о микробиологији и евентуалној антимикуробној активности млека магарице балканске расе која егзистира на подручју Србије и околних балканских земаља су јако лимитирани. Ово млеко се традиционално конзумира без претходне топлотне обраде, што покреће низ питања која се односе на здравствену безбедност конзумирања млека у сировом стању. Предмети истраживања ове докторске дисертације били су утврђивање микробиолошког квалитета сировог млека магарице балканске расе, као и испитивање његове антибактеријске активности према одабраним сојевима *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* и *Klebsiella pneumoniae*. У циљу утврђивања главних носилаца антибактеријског дејства, као и самог модела антибактеријског деловања, у одабраним узорцима овог млека намењеним извођењу антибактеријских испитивања, извршено је одређивање садржаја антимикуробних протеина - лизозима и лактоферина, као и садржаја калцијума. У узорцима млека магарице предвиђеним за испитивање антибактеријске активности према *S. aureus* и *L. monocytogenes*, одређен је садржај масних киселина са документованом антибактеријском активношћу према Грам позитивним бактеријама. Присуство *L. monocytogenes* и *Salmonella* spp. није утврђено ни у једном од 137 испитаних узорака сировог млека магарице, док је број *E. coli*, колиформних бактерија, Enterobacteriaceae, квасаца и плесни и суспектног *B. cereus* био испод границе детекције методе. Према резултатима добијеним у овој докторској дисертацији сви испитани узорци сировог млека магарице балканске расе су задовољавали захтеве европских регулатива 92/46/ЕЕС и ЕС 853/2004 и са микробиолошког аспекта су у потпуности били безбедни за директно конзумирање без претходне топлотне обраде. Сирово млеко магарице балканске расе је показало различиту антибактеријску активност према Грам позитивним и Грам негативним бактеријским сојевима тестираним у оквиру ове докторске дисертације, чији интензитет је зависио од нивоа контаминације узорака млека тестираним патогеном и температуре инкубирања. Температура инкубирања од +15 °C је у односу на +9 °C била генерално повољнија за активност антибактеријских супстанци у млеку магарице према свим

тестираним патогенима, али је антибактеријски потенцијал узорака млека магарице на +15 °C био лимитиран бржим умножавањем испитаних бактерија на овој температури. То је посебно важно за узорке са већим нивоима контаминације (10^3 и 10^4 cfu/ml). Антибактеријска активност сировог млека магарице према *L. monocytogenes* и *S. aureus* се на свим радним температурама састојала од продужења лаг фазе и инхибирања бактеријског раста, док се у случају *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* ATCC 10536 и *K. pneumoniae* она огледала у редукцији њиховог почетног броја и/или продужењу лаг фазе. Резултати ове докторске дисертације су указали на калцијум зависну природу антибактеријске активности сировог млека магарице према *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* и оба тестирана соја *E. coli*. Најснажнију антибактеријску активност према *K. pneumoniae* показали су узорци млека магарице, који су поред великог садржаја лизозима имали и велики садржај лактоферина, па би у овом случају основни механизам антибактеријског деловања млека магарице могао бити синергизам лизозима и лактоферина. Лизозим је највероватније главни носилац антибактеријске активности млека магарице балканске расе, обзиром да је у односу на други антимикуробни агенс – лактоферин у тестираним узорцима млека магарице детектован у вишеструко већој концентрацији. Известан допринос антибактеријској активности млека магарице балканске расе према *L. monocytogenes* и *S. aureus* могле би да дају и масне киселине са документованим антибактеријским дејством према Грам позитивним бактеријама (линолна, лауринска и олеинска киселина), које су у анализираним узорцима млека магарице у збиру чиниле од 40,3 до 54,7% од укупних масних киселина.

Датум прихватања теме од стране НН 15.11.2013.
већа:

ДП

Датум одбране:

ДО

Чланови комисије:

(име и презиме / титула / звање /
назив организације / статус)

КО

др Спасенија Милановић, редовни професор,
Технолошки факултет у Новом Саду, председник

др Драгољуб Цветковић, ванредни професор,
Технолошки факултет у Новом Саду, ментор

др Мирјана Антов, редовни професор,
Технолошки факултет у Новом Саду, члан

др Анамарија Мандић, научни саветник, Научни
институт за прехранбене технологије у Новом
Саду, члан

др Драгиша Савић, редовни професор,
Технолошки факултет у Лесковцу, члан

University of Novi Sad

Faculty of Technology

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monographic publication
Type of record: TR	Textual material, printed
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Ljubiša Šarić
Mentor: MN	Dr Dragoljub Cvetković, assoc. professor
Title: TI	Antibacterial activity of Domestic Balkan donkey's milk
Language of text: LT	Serbian, cyrillic
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2015.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Serbia, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Physical description: PD	6 chapters, 199 pages, 43 figures, 75 tables, 208 references
Scientific field SF	Biotechnical sciences
Scientific discipline SD	Food engineering

Subject, Key words
SKW Antibacterial activity, donkey milk, pathogenic bacteria

UC

Holding data:
HD Library of Faculty of Technology, Novi Sad

Note:
N None

Abstract:
AB

Donkey's milk has recently become a very popular topic among scientific community although it has been used for therapeutic and cosmetic purposes since ancient times. Even though the number of investigations concerning donkey's milk functionality has increased, the studies on its antimicrobial potential are limited. Especially, there is a lack in literature data on microbiological quality and antibacterial activity of donkey's milk obtained from Domestic Balkan breed originated in Serbia and other countries in Balkan region. The fact that this milk is traditionally consumed without heat treatment launches a series of issues concerning its safety.

The aim of this thesis was to determine microbiological quality of Domestic Balkan donkey's milk, as well as to investigate its antibacterial activity against the selected strains of *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Klebsiella pneumonia*. In order to determine the major antibacterial substances, as well as the model of antibacterial activity, the content of antimicrobial proteins (lysozyme and lactoferrin) and calcium was determined. The amount of fatty acids which are known to be effective against Gram-positive bacteria was determined in milk samples tested for antibacterial activity against *S. aureus* и *L. monocytogenes*. The presence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. was not detected in any of the 137 raw donkey's milk samples, while the levels of *E. coli*, coliform bacteria, Enterobacteriaceae, yeast and molds and suspect *Bacillus cereus* were below the limit of detection of the assays.

According to obtained results, all examined Domestic Balkan donkeys' raw milk samples were in accordance with the EU regulations 92/46/EEC and EC 853/2004 in terms of their microbiological quality, thus being completely safe for direct consumptions, without thermal treatment. Raw Domestic Balkan donkey's milk has expressed different antibacterial activities against Gram-positive and Gram-negative bacteria strains tested in this thesis, with the intensities which depended on contamination level and incubation temperature. In comparison to temperature of +9 °C, the incubation temperature of +15 °C was more favourable for activity of antibacterial substances in donkey's milk against all tested pathogens. However, the antibacterial potential of donkey's milk samples at +15 °C was limited with rapid multiplication of bacteria at this temperature. This was especially pronounced in samples characterized with higher contamination levels (10^3 and 10^4 cfu/ml). Antibacterial activity of raw donkey's milk against *L. monocytogenes* and *S. aureus* at all tested temperatures reflected in prolonged lag phase and inhibition of bacterial growth, while the activity against *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* ATCC 10536 and *K. pneumonia* comprised reduction of initial bacterial numbers and/or prolongation of lag phase.

Results obtained in this thesis have indicated on calcium dependent antibacterial activity of raw donkey's milk against *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* and both *E. coli* strains. The most pronounced antibacterial activity against *K. pneumonia* was found in donkey's milk samples which besides high content of lysozyme had high content of lactoferrin, thus indicating that the basic antibacterial mechanism of donkey's milk might be the synergism between

lysozyme and lactoferrin. Lysozyme was probably the substance with the highest antimicrobial activity in Domestic Balkan donkey's milk, since it was detected in significantly higher concentrations than lactoferrin. The fatty acids which are known to be effective against Gram-positive bacteria (linoleic, lauric and oleic) and which comprised from 40.3 to 54.7% of total fatty acids in tested samples, may also contribute to antimicrobial activity of Domestic Balkan donkey's milk against *L. monocytogenes* and *S. aureus*.

Accepted on Scientific Board on: 15.11.2013.

AS

Defended:

DE

Thesis Defend Board:

dr Spasenija Milanović, full professor, Faculty of Technology, Novi Sad, chairman

DB

dr Dragoljub Cvetković, assoc. professor, Faculty of Technology, Novi Sad, mentor

dr Mirjana Antov, full professor, Faculty of Technology, Novi Sad, member

dr Anamarija Mandić, principal research fellow, Institute of Food Technology, Novi Sad, member

dr Dragiša Savić, full professor, Faculty of Technology, Leskovac, member

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

ATCC	енг. „ <i>American Type Culture Collection</i> “
ALOA	енг. „ <i>Agar Listeria according to Ottaviani & Agosti</i> “
АСБ	Аеробне спорогене бактерије
БМК	Бактерије млечне киселине
<i>cfu</i>	енг. „ <i>colony forming unit</i> “
CLA	енг. „ <i>Conjugated Linoleic Acid</i> “
ЕС	енг. „ <i>European Commission</i> “
ЕЕС	енг. „ <i>European Economic Community</i> “
EFSA	енг. „ <i>European Food Safety Authority</i> “
ЕНТ	Enterobacteriaceae
FAO	енг. „ <i>Food and Agriculture Organization</i> “
ХБ	Хранљиви бујон
IDF	енг. „ <i>International Dairy Federation</i> “
КОЛ	Колиформне бактерије
КПС	Коагулаза позитивне стафилококе
LF	енг. „ <i>Lactoferrin</i> “
LPS	енг. „ <i>Lipopolysaccharide</i> “
LYZ	енг. „ <i>Lysozyme</i> “
ММ	Млеко магарике
SDS-PAGE	енг. „ <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> “
TBX	енг. „ <i>Tryptone Bile X-glucuronide</i> “
УБМ	Укупан број микроорганизама
VRBG	енг. „ <i>Violet Red Bile Glucose</i> “
XLD	енг. „ <i>Xylose-Lysine Deoxycholate</i> “

Ова докторска дисертација урађена је на Научном институту за прехранбене технологије у Новом Саду, у оквиру пројекта TR31029 Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије, у сарадњи са специјалним резерватом природе „Засавица“.

На овом месту желео бих да се захвалим:

- свом ментору, проф. др Драгољубу Цветковићу, на стручним саветима, помоћи и подршци коју ми је пружио током израде докторске дисертације*
- др Анамарији Мандић, која ми је указала велико поверење, учествујући од првог дана у развоју и реализацији идеја, препознајући потенцијал теме којом се бави ова докторска дисертација*
- члановима комисије проф. др Спасенији Милановић, проф. др Мирјани Антов и проф. др Драгиши Савићу, на показаном интересовању за овај рад, корисним сугестијама и саветима*
- др Ђорђу Окановићу, на идеји и вери у њену реализацију*
- управнику специјалног резервата природе „Засавица“, Слободану Симићу, на оптимизму, енергији и великој помоћи од првих корака у раду*
- особљу резервата, посебно Николи Нилићу, за огромно стрпљење и несебичну помоћ у прикупљању бројних узорака током свих година рада*
- др Александри Торбици, Јелени Томић, Ивану Миловановићу, др Снежани Кравић и др Жарку Кеврешану, за велику помоћ око аналитике протеина, масних киселина и минерала*
- својим колегицама на одељењу за микробиолошка испитивања, за добру атмосферу у нашем малом тиму*
- својим пријатељима Пеђи, Бојани, Тањи, Наташи, Павлу, Јаци, Јовани, Тамари и Микију, на позитивној енергији и дружењу, које ми свакодневни рад чини лепшим*
- мојим родитељима и брату, за пружену љубав и подршку током свих ових година*

На крају бих желео да изразим посебну захвалност Бојани, мојој највећој љубави и најбољем пријатељу, на великом стрпљењу и огромној подршци коју ми је пружала свих ових година, као и нашој Јани, која свему овоме даје посебан смисао.

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	5
2.1. Доместикација и историјат магараца	5
2.2. Карактеристике магараца	7
2.3. Млеко магарице - употреба кроз векове	10
2.4. Хемијски састав млека магарице	11
2.4.1. Протеини	13
2.4.2. Млечна маст	14
2.4.3. Угљени хидрати.....	17
2.4.4. Минерали	17
2.4.5. Витамини.....	18
2.5. Микробиологија сировог млека	19
2.5.1. Извори контаминације	19
2.5.2. Иницијална микробиота сировог млека	22
2.5.3. Конзумирање сировог млека и законска регулатива	27
2.6. Антимикробна једињења млека	37
2.6.1. Имуноглобулини	38
2.6.2. Лактопероксидаза.....	39
2.6.3. Лизозим	40
2.6.4. Лактоферин	42
2.6.5. β -лактоглобулин	43
2.6.6. α -лакталбумин	44
3. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОД РАДА	45
3.1. Узорковање	45
3.2. Испитивање микробиолошког квалитета сировог млека магарице	46
3.2.1. Методе за испитивање микробиолошке слике сировог млека магарице	46
3.3. Испитивање антибактеријске активности млека магарице	47
3.3.1. Тест микроорганизми.....	47
3.3.2. Вештачка контаминација узорака млека магарице	48
3.3.3. Антибактеријски тест.....	49
3.3.4. Утицај концентрације калцијума на антибактеријску активност млека магарице	49
3.4. Одређивање рН вредности млека	50

3.5. Одређивање садржаја протеинских антимикуробних компонената млека.....	50
3.6. Одређивање садржаја калцијума методом атомске апсорпционе спектрофотометрије	52
3.7. Одређивање садржаја масних киселина.....	52
3.8. Статистичка обрада резултата	54
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	55
4.1. Микробиолошка слика сировог млека магарице.....	55
4.1.1. Мониторинг микробиолошког квалитета сировог млека магарице	55
4.1.2. Микробиолошки квалитет сировог млека магарице током 6 дана складиштења на +4 °C	77
4.2. Антибактеријска активност млека магарице	79
4.2.1. Антибактеријска активност млека магарице према <i>L. monocytogenes</i>	80
4.2.1.1. Антибактеријски тест на +9 °C	80
4.2.1.2. Антибактеријски тест на +15 °C	83
4.2.1.3. Антибактеријски тест на +38 °C	86
4.2.1.4. Утицај температуре инкубирања и нивоа контаминације на антибактеријска својства млека магарице према <i>L. monocytogenes</i>	88
4.2.2. Антибактеријска активност млека магарице према <i>S. aureus</i>	91
4.2.2.1. Антибактеријски тест на +9 °C	91
4.2.2.2. Антибактеријски тест на +15 °C	93
4.2.2.3. Антибактеријски тест на +38 °C	95
4.2.2.4. Утицај температуре инкубирања и нивоа контаминације на антибактеријска својства млека магарице према <i>S. aureus</i>	97
4.2.3. Антибактеријска активност млека магарице према <i>Salmonella</i> spp.	99
4.2.3.1. Антибактеријски тест на +9 °C	99
4.2.3.2. Антибактеријски тест на +15 °C	104
4.2.3.3. Антибактеријски тест на +38 °C	110
4.2.3.4. Утицај температуре инкубирања и нивоа контаминације на антибактеријска својства млека магарице према тестираним <i>Salmonella</i> сојевима	118
4.2.4. Антибактеријска активност млека магарице према <i>E. coli</i>	126
4.2.4.1. Антибактеријски тест на +9 °C	126
4.2.4.2. Антибактеријски тест на +15 °C	131
4.2.4.3. Антибактеријски тест на +38 °C	136
4.2.4.4. Утицај температуре инкубирања и нивоа контаминације на антибактеријска својства млека магарице према тестираним сојевима <i>E. coli</i>	143
4.2.5. Антибактеријска активност млека магарице према <i>K. pneumoniae</i>	151

4.2.5.1. Антибактеријски тест на +9 °C	151
4.2.5.2. Антибактеријски тест на +15 °C	154
4.2.5.3. Антибактеријски тест на +38 °C	156
4.2.5.4. Утицај температуре инкубирања и нивоа контаминације на антибактеријска својства млека магарике према <i>K. pneumoniae</i>	158
4.3. Механизми антибактеријског деловања млека магарике.....	161
4.3.1. Механизми антибактеријског деловања млека магарике на Грам позитивне бактерије	161
4.3.2. Механизми антибактеријског деловања млека магарике на Грам негативне бактерије	166
4.3.2.1. Механизми антибактеријског деловања млека магарике на <i>E. coli</i> , <i>S. Enteritidis</i> и <i>S. Typhimurium</i>	166
5. ЗАКЉУЧАК	179
6. ЛИТЕРАТУРА	184

1. УВОД

Последњих година се у свету поклања велика пажња здрављу становништва и превенцији болести које настају као последица модерног начина живота и исхране. Савремена научна истраживања се између осталог, окрећу испитивању традиционалних, често неправедно заборављених производа. У том светлу је и млеко магарице тек од скора доспело у фокус научних истраживања, иако су његова благотворна терапеутска и козметичка својства позната још од античких времена.

Највећи удео и значај у производњи млека на глобалном нивоу има кравље млеко, али се све више конзумира и млеко других врста, чија производња током последњих 50 година константно расте. Према подацима *Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division*, из 2009. године, од укупно произведених 702,1 милијарди тона млека у свету, 84,1% је кравље млеко, док је 16,9% удео млека других врста. Тај удео је удвостручен у односу на 1961. годину, када је износио свега 8,9%. Изузимајући кравље млеко, највећи део светске производње чини млеко биволице (11%), након чега следе козије (2,3%), овчије (1,4%) и камиље млеко (0,2%). Иако не постоје поуздани статистички подаци, претпоставља се да млеко магарице и кобиље млеко учествују са мање од 0,1% у светској производњи млека.

У свету постоји неравномерна расподела производње млека других врста осим крављег: у Азији она износи 40,13%, у Африци 24,75%, у Европи 2,67% и САД 0,43% од укупне производње млека. У развијеним друштвима је у последњим декадама, уз повећање потрошње млека других врста, забележен тренд смањења конзумирања крављег млека, а један од главних узрока је нарастуће знање о негативном дејству појединих компонената крављег млека на здравље људи. То се пре свега односи на млечну маст која има висок садржај засићених масних киселина, које се доводе у везу са срчаним обољењима и гојазношћу. Док у Азији и Африци разлог за интензивно конзумирање других врста млека осим крављег треба тражити у локалној култури и економији, популаризација употребе млека других врста у исхрани одојчади, деце и одраслих у развијеним земљама, последица је сазревања свести о неопходности здраве исхране и њеног значаја за здравље целокупне популације.

Иако се млеко магарице углавном конзумира у Азији, Африци и источној Европи, где се магарци традиционално узгајају, ово млеко полако налази своје место и на тржиштима развијених земаља захваљујући порасту научних сазнања о његовом повољном утицају на здравље људи. До његове популаризације и прве специфициране комерцијалне намене (изузимајући његову примену у козметичкој индустрији) доводе резултати клиничких и педијатријских студија, који га апострофирају као одличну замену за мајчино млеко код одојчади и деце алергичне на протеине крављег млека. Наиме, у западној Европи између 0,3 и 7% деце млађе од 3 године испољава алергијску реакцију на протеине крављег млека, засновану на имунолошкој бази. Иако већина престаје да буде алергична након навршене треће године живота, у око 30% случајева симптоми се јављају и након четврте године, док у просеку код 10% такве деце долази до развијања мултипле интолеранције на храну. Осим што се захваљујући својој сличности са мајчиним млеком препоручује као његова алтернатива, млеко магарице делује превентивно на појаву атеросклерозе и појачава имунолошки одговор код здравих људи. Млеко магарице такође делује као антиупални, антивирални, антипролиферативни и антитуморни агенс.

Упркос томе што знање о функционалности млека магарице константно расте, његов антимикробни потенцијал остаје један од најмање познатих и најслабије истражених аспеката. Постоји свега пар научних извештаја о његовим снажним антибактеријским својствима која се приписују високој концентрацији лизозима, уз остављање простора и за индивидуално или синергистичко деловање других компонената млека, с обзиром на комплексност овог медијума. Механизам антимикробног дејства млека магарице није до краја разјашњен, али је раширено мишљење да лизозим из овог млека, као главни носилац антимикробне активности, има снажно дејство на Грам позитивне бактерије, а слабо на Грам негативне бактерије, иако резултати испитивања антимикробне активности млека магарице говоре сасвим супротно.

Далеко мање литературних података постоји о функционалности, а поготову о микробиологији и евентуалној антимикробној активности млека магарице балканске расе, која егзистира на подручју Србије и околних балканских земаља. Према подацима *Food and Agricultural Organization of the United Nations, Domestic Animal Diversity Information System*, из 2009. године, популација ових животиња у Србији је

бројала око 1000 јединки, мада је праве податке о бројности ове расе тешко утврдити, с обзиром на њену повезаност са руралним подручјима и сеоским домаћинствима. Ове животиње се у највећем броју (преко 100 магарица) узгајају у специјалном резервату природе „Засавица“ поред Сремске Митровице. Према подацима из јануара 2015. године, постоје два пољопривредна газдинства у Србији у којима се ове животиње интензивније узгајају. Једно се налази у Ковиљу, где крдо има више од 80 женки, а друго, у селу Каменица код Димитровграда са више од 15 магарица. Доступни су подаци о још неколико фарми са подручја Србије, где се ради о узгоју мањег обима (<10 магарица).

Осим што је млеко магарице у Србији већ нашло примену у производњи сира и козметичких препарата (креме, сапуни, итд.), забележен је и раст потражње за овим млеком у терапеутске сврхе. Наиме, у Србији је према подацима Светске здравствене организације број умрлих на 100 000 оболелих од респираторних болести већи од европског и светског просека, а с обзиром на то да се млеко магарице у нашој земљи традиционално користи за третман астме и бронхитиса, очигледан је разлог повећања потражње за овим млеком на српском тржишту. Иако су у Србији главни конзументи млека магарице особе са здравственим проблемима дисајних органа, користе га и потрошачи који желе да свој имуни систем подигну на виши ниво. Уобичајено је да се ово млеко конзумира без претходне топлотне обраде, како се под дејством топлоте не би деградирале нутритивно вредне, термолабилне супстанце. Међутим, та пракса покреће низ питања која се односе на здравствену безбедност конзумирања млека у сировом стању. Утврђивање одређене антибактеријске активности млека ове расе, била би потпора потенцијалним конзументима, да се млеко магарице, уз испуњење свих хигијенских стандарда током muže, манипулације и складиштења, може безбедно конзумирати без претходне топлотне обраде. Утврђивањем антибактеријског потенцијала млека магарице балканске расе отворила би се могућност и његове примене као функционалног састојка у разним врстама прехранбених производа. Такође, подаци о микробиолошком квалитету сировог млека магарице и његовом антибактеријском деловању, допринели би бољој процени ризика и анализи биолошких опасности приликом увођења *НАССР*-а, који би допринео унапређењу производње млека магарице високог квалитета и безбедности.

Предмети истраживања ове докторске дисертације су били утврђивање микробиолошког квалитета сировог млека магарице балканске расе, као и испитивање његове антибактеријске активности према одабраним сојевима *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* и *Klebsiella pneumoniae*. У циљу утврђивања главних носилаца антибактеријског дејства, као и самог модела антибактеријског деловања, у одабраним узорцима овог млека намењеним извођењу антибактеријских испитивања, извршено је одређивање садржаја антимикуробних протеина - лизозима и лактоферина, као и садржаја калцијума.

У узорцима млека магарице предвиђеним за испитивање антибактеријске активности према *S. aureus* и *L. monocytogenes*, одређен је садржај масних киселина са документованом антибактеријском активношћу према Грам позитивним бактеријама (линолна киселина (C_{18:2}), лауринска киселина (C_{12:0}) и олеинска киселина (C_{18:1})).

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Доместикација и историјат магараца

Магарац (*Equus asinus*) је доместиковани члан таксономског реда *Perissodactyla*, припада породици *Equidae* и роду *Equus* (Salimei и Fantuz, 2012). Доместикација магараца је почела у периоду од 7000 до 6000 године пре нове ере у региону данашње Либије на северу афричког континента. У старом Египту магарац је сматран веома значајном животињом, која се узгајала у крдима од по неколико хиљада јединки. Пронађене су слике ових животиња у гробницама египатских фараона, док се у Библији помињу на чак 82 места (Fernando и Starkey, 2000). Њихова доместикација у долини Нила је већ била завршена 4000. године пре нове ере. Све до почетка касног египатског периода (715–322. година пре нове ере), камиле нису биле у употреби, већ су се за трговачке караване од Египта да Нубије користили магарци. Осим номада који су изузетно ценили ове животиње, користили су их и први фармери за пренос терета током садње семена, за вршидбу и млевење житарица. У Месопотамији су магарци коришћени и за орање обрадивих површина. До момента доместикације коња, а потом и добијања мула, вршено је укрштање домаћих магараца са дивљим магарцима, како би се добиле крупније и снажније животиње погодне за вучу ратних машина. Око 2000. године пре нове ере, ове животиње се појављују у Европи, највероватније захваљујући Етрурцима који су насељавали античку Италију. Магарци су у Шпанију и Италију доспели преко Марока. На Иберијском и Апенинском полуострву пронађени су цртежи на стенама који датирају из 2000. године пре нове ере, на којима су представљени магарци као домаће животиње током извођења уобичајених радних активности. До њиховог ширења у Европи долази захваљујући римским освајањима. Магарци се заједно са римском војском појављују на подручјима данашње Немачке, Велике Британије и Мађарске. Међутим, у већини европских региона након пада римског царства долази до њиховог нестанка. То није био случај са Медитераном, где су се магарци задржали и где су масовно коришћени за рад у производњи маслина и вина. Магарци су у средњем веку у централној Европи поново почели да се масовније узгајају, захваљујући монасима који су их користили на фармама, у трговини, за снабдевање замкова и млевење житарица. На почетку нове ере ове животиње се шире на

подручје Индије, Малезијског архипелага, Кине и Монголије. У 16. веку шпански освајачи их доводе на подручје Јужне Америке (Kugler и сар., 2008).

Претпоставља се да је до великих миграција ових животиња најчешће долазило услед недостатка хране или погоршања климатских услова. За доместикацију ове врсте, неке од кључних особина биле су: велика снага и издржљивост, отпорност на болести, лак узгој, способност искоришћења хране слабијег квалитета, првенствено оскудних и маргиналних пашњачких површина, као и генерално мали захтеви за храном и водом (Ramljak, 2010; Vučićević и сар., 2011).

Према једној теорији, савремене расе магараца воде порекло од два изворна облика: нубијског магарца (*Equus asinus africanus*) са подручја Нила и сомалијског магарца (*Equus asinus somaliensis*). Према другој теорији, један дивљи предак био је нубијски магарец, а други *Equus asinus europeus* који је настањивао Балеарска острва и од ког потиче већина савремених европских раса (Trailović и сар., 2011).

Посматрано кроз векове, магарци су дали значајан допринос развоју људског друштва, првенствено преко своје основне функције – транспорта терета (Vučićević и сар., 2011), јер су у прошлости за рад коришћени много чешће у поређењу са воловима и коњима (Aganga и сар., 2003). У античкој Грчкој су магарци имали значајну улогу у транспорту људи и добара, у пољопривреди и војсци. Магарци су све до почетка 20. века били експлоатисани за потребе италијанских оружаних снага (Magiani, 2010). Они и данас играју важну улогу у транспорту људи и робе у сушним и полусушним планинским подручјима Африке, Централне Америке и Азије, где су путеви лоши или уопште не постоје (Aganga и сар., 2003). У античка времена магарци нису узгајани само због рада, већ и ради меса, млека и коже. Од њихове коже израђиван је пергамент, док се њихово месо конзумирало првенствено у Кини и Персији (Kugler и сар., 2008). Осим тога, коришћени су и као заштитници стада малих преживара (оваца, коза, лама) (Petrujkić и сар., 2011).

Захваљујући напретку механизације ови копитари су у развијеним земљама изгубили економски значај, тако да је њихов број вишеструко смањен током последњих 50 година прошлог века (Vučićević и сар., 2011). Тако је број магараца у Италији у периоду од 1939. до 1996. године редукован за 96%, односно смањено се са 790 000 на 27 000 јединки (Starkey и Starkey, 2000). Други разлог депопулације ове врсте лежи у чињеници да су људи масовно напустили рурална подручја током прошлог века у

развијеним земљама (Trailović и сар., 2011). Према подацима из 2000. године, број ових животиња у свету износио је око 44 милиона. Половина тог броја се налазила у Азији, нешто мало више од четвртине у Африци, а остатак углавном у Латинској Америци. Док њихов број расте у субсахарској Африци, на северу Индијског потконтинента и у планинским подручјима Латинске Америке, на глобалном нивоу број ових животиња константно опада (Starkey и Starkey, 2000). Популација магараца у свету је већ 2006. године имала око 41 милион, што је за три милиона мање у односу на 2000. годину (Passantino, 2011). До највећег смањења популације дошло је у САД и индустријски најразвијенијим земљама Европе. Насупрот томе, популација ових животиња није се рапидно смањивала у развијеним земљама Азије и Јужне Америке, као што су Кина, Индија, Пакистан, Бразил и Мексико. Разлог томе је што у тим земљама још постоји велика рурална популација која нема приступ модерним технологијама, па стога наставља да користи бенефите од експлоатације ових животиња (Fernando и Starkey, 2000). У подручјима где се ови копитари традиционално користе, узгој се врши на малим породичним фармама, док их на већим комерцијалним фармама готово и нема (Fernando и Starkey, 2000). Од европских земаља магараца највише има у Бугарској (око 291 000) (Starkey и Starkey, 2000), док их је у Италији према подацима из 2004. године било око 29 000, рачунајући муле и мазге (Passantino, 2011). Кина је земља са највећом популацијом магараца у свету, која броји 11 милиона јединки (Starkey и Starkey, 2000), након чега следи Етиопија са око 6,5 милиона (Tadesse, 2010).

2.2. Карактеристике магараца

Између данашњих магараца постоје многобројне физичке разлике, условљене варијацијама у узгоју, удаљеношћу региона које насељавају, као и утицајем различитих климатских услова. Домаћи магарац је тежак између 80 и 480 kg, а висина гребена варира од 80 до 160 cm. Животни век им је у просеку између 30 и 35 година, мада може бити и дужи. Магарци своје радне способности задржавају до позних година. Имају 62 хромозома, за разлику од коња и зебри, који имају 64, односно 46 хромозома. Мужјаци сексуалну зрелост постижу са три године, а женке са једном навршеном годином живота. Парење се одвија од априла до јула. Гестација

код магарица у просеку траје између 12 и 13 месеци, док период лактације износи око 7 месеци (Tidona и сар., 2011).

Изузетно ретко се дешава да магарица ождреби више од једног пулета (Kugler и сар., 2008). Према подацима *FAO* из 2006. године у свету постоји 185 раса магараца, што чини свега 3% од укупног броја регистрованих сточних раса. Једна од њих је и балканска раса која представља природни ресурс Балканског полуострва. То је аутохтони локално адаптирани копитар који је некада био распрострањен на територији целог Балкана, док је данас његова популација веома угрожена (Trailović и сар., 2011). Углавном насељава планинске регионе Србије, као и приобална подручја Црне Горе. Осим у Србији и Црној Гори, може се пронаћи и у брдско-планинским подручјима земаља региона. Познат је по свом лакој узгоју, скромним нутритивним захтевима и великом издржљивошћу за рад. Тежина одраслих мужјака је од 150-250 kg, а женки од 120-200 kg (Petrujkić и сар., 2011; Trailović и сар., 2011). Висина гребена мужјака износи око 100 cm, а женки око 95 cm. Боја крзна је сива, тамносива, смеђа и црвенкасто смеђа (Kugler и сар., 2008). Код већине грла се уочава јегуљаста пруга дуж леђа и крст на гробу (Trailović и сар., 2011).

За разлику од осталих домаћих животиња, код магараца постоје много мање разлике између раса, што довољно говори о томе колико се мали значај придавао оплемењивању ових животиња. Из тог разлога, током 7000 година, од тренутка доместикације, па све до данас, магарци нису доживели фундаменталну промену у својој примени или развоју (Kugler и сар., 2008). Ова чињеница се најбоље види у погледу производње млека. Наиме, у развијеним земљама око 30% протеина у исхрани становништва се подмирује конзумирањем млека и млечних производа. Да би ови захтеви били лакше задовољени, годинама уназад се вршило генетско усавршавање млечних животиња у смислу боље продукције млека. Човек је кроз узгој и селекцију значајно модификовао домаће млечне врсте у односу на њихове дивље претке. Доместикација млечних животиња је истовремено значила и стварање више различитих раса са оптимизованим својствима битним за продукцију млека, као што су дужина трајања лактације, принос млека, ниво масти и протеина у млеку итд. Генетска селекција раса коња и магараца у правцу повећања продукције млека се још увек није догодила. Као последица тога, данас постоје велике варијације у

погледу приноса млека ових врста, дужине трајања лактације, као и велике индивидуалне варијабилности (Uniaske-Lowe, 2011).

Производња млека магарице и кобиљег млека веома се разликује од производње млека конвенционалних млечних врста, првенствено у смислу приноса млека. Млечна жлезда магарица и кобила је малог капацитета (максимално 2,5 литара код великих раса коња), тако да мужа може да се обави 2 или 3 пута дневно, након одвајања ждребета (Salimei и Fantuz, 2012). Испитивања млечне продуктивности магарица су најчешће вршена у различитим експерименталним условима, па је и то један од узрока великих варијација у погледу добијених резултата. Према литературним изворима, у случају ручне муже принос млека магарице био је у интервалу од 466 ± 260 ml/мужи, а код машинске муже у опсегу 772 ± 148 ml/мужи (Salimei и Fantuz, 2012). Други извештаји говоре о дневном приносу млека магарице од 1250 до 1700 ml/дан (две муже дневно), где је до периода од 120. до 150. дана лактације бележен константан пад приноса, да би се након тога до краја лактације (211. до 240. дана) принос млека стабилизовао и остао релативно константан (600-800 ml/дан) (Salimei и Chiofalo, 2006). Велике варијације у приносу млека су резултат више различитих фактора, као што су поступање са магарицом и пулетом, индивидуалне карактеристике, начин муже, период лактације, телесна маса, кондиција, врста хране. Иако нема доступне научне литературе о млечности различитих раса ових животиња, претпоставља се да је продукција млека код магарица пропорционална њиховој телесној маси, као што је случај код кобила. Ручна мужа може бити једнако ефикасна као и машинска, међутим код машинске муже постоје значајно мање варијације у погледу приноса млека (Salimei, 2011). Осим о узајамној зависности приноса млека и начина муже, постоје извештаји и о великим сезонским варијацијама. Трајање интервала између две узастопне муже нема статистичког утицаја на продукцију млека, иако дужи временски интервали (нпр. 20 сати наспрам 4 сата) могу да повећају садржај млечне масти. Такође, код тренираних грла не постоји значајна разлика у приносу млека између јутарње и поподневне муже (Salimei и Fantuz, 2012). Магарица у просеку током трајања лактације даје око 1000 литара млека (Faue и Kopusrayeva, 2012). Студије новијег датума показале су да мужа магарица не треба да се практикује током првих месец дана након ждребљења, како би се пулету омогућио правилан развој током неонаталног периода (Salimei, 2011).

2.3. Млеко магарице - употреба кроз векове

Једна од последица индустријског напретка била је и смањење поверења у валидност традиционалног знања. Све што није било модерно сматрано је назадним и неразвијеним. У складу са тим, постоји веома мало информација из традиционалне културе везаних за магарице, употребу њиховог меса или млека, које су сматране вредним и које су као такве документоване. Много је било више оних које су неповратно изгубљене. Дакле, осим драстичног смањења популације магарца, индустријализација је имала као последицу и институционално занемаривање. Доступна стручна и научна литература везана за ове животиње и њихов узгој је дуго времена била јако лимитирана. У оквиру наставних планова на пољопривредним факултетима магарици нису били разматрани као животиње за узгој (Fernando и Starkey, 2000). Слична ситуација у том погледу била је и у науци, где су они и њихови производи све до скоро били занемарени.

Употреба млека магарице датира из римског доба (Salimei и Fantuz, 2012). Према предању, како би своју кожу одржале свежеом, сјајном и глатком, египатска краљица Клеопатра и супруга римског императора Нерона, Попеа, практиковале су купање у млеку магарице, што је био случај и са другим привилегованим женама античког времена (Lee и сар., 2013). Грчки лекар Хипократ (460 - 370. г. пре нове ере) је за лечење различитих обољења, укључујући проблеме са јетром, инфективне болести, грознице, тровања и едеме, прописивао својим пацијентима млеко магарице (Bidasolo и сар., 2012). Постоје подаци о употреби овог млека за исхрану одочајди вековима уназад (Baumslag, 1986). У Енглеској се млеко магарице током 17. и 18. века користило као замена за мајчино млеко. Будући да је у то време ово млеко било скоро два пута скупље од крављег млека, у Лондону је било уобичајено да се магарица доведе до кућног прага и помузе на лицу места, како би купац био сигуран да је млеко оригинално и свеже (Weinberg, 1993). У Француској и Русији је крајем 19. века велики број сирочади, као и одојчади из сиромашних породица, услед недостатка дојиља, у тамошњим болницама био је укључен у експериментални програм вештачке исхране, у којем је осим крављег и козијег млека било коришћено и млеко магарице, најчешће помешано са водом и јечмом (Слика 1) (Puntis, 2004).



Слика 1. Мужа магарица у болници *St. Vincent de Paul* у Паризу 1887 године.

У италијанској традицији млеко магарице се користи за исхрану беба и одојчади, у случајевима када мајчиног млека нема довољно (Mariani, 2010). Такође је забележено да су припадници племена Масаи у Африци, деца оболелој од пнеумоније или тешког кашља као лек давали тек помужено, топло млеко магарице. Због његове вредности, конзумирала су га само деца, између осталог и као превентиву од болести (Fernando и Starkey, 2000).

2.4. Хемијски састав млека магарице

Млеко као непромењен секрет млечне жлезде сисара садржи широк спектар различитих једињења есенцијалних за здравље и раст младунчета. Основни конституенти млека су вода, лактоза, масти и протеини, док су минерали, витамини, хормони, ензими и бројни секундарни метаболити у млеку присутни у значајно мањим количинама (многи од њих у траговима) (Hurley, 2003).

Млеко магарице одликује се специфичним хемијским саставом и у том погледу је најсличније кобиљем и хуманом млеку (Guo и сар., 2007). У Табели 1 је приказан

основни хемијски састав млека различитих млечних врста, укључујући и хумано млеко.

Млеко различитих врста сисара састоји се од истих основних компоненти, од којих највећи удео заузимају вода, протеини, масти, угљени хидрати, витамини и минерали. Уколико се пореди млеко преживара са млеком непреживара, садржај основних компоненти се јако разликује. Млеко преживара у односу на млеко магарице и кобиле има мањи садржај лактозе, већи садржај протеина (укључујући казеин), масти (са већим уделом холестерола, засићених и мононезасићених масних киселина), витамина (изузев витамина Це) и минерала. Међутим, састав млека може значајно да варира и између различитих врста преживара и непреживара, затим између различитих раса у оквиру исте врсте, а такође су забележене и варијације у саставу млека различитих јединки исте расе.

Табела 1. Хемијски састав млека различитих врста сисара* (Claeys и сар., 2014).

	Непреживари			Преживари			
	Млеко магарице	Кобиле млеко	Хумано млеко	Кравље млеко	Козије млеко	Овчије млеко	Камиље млеко
Укупна сува материја (g/l)	88-117	93-116	107-129	118-130	119-163	181-200	119-150
Протеини (g/l)	14-20	14-32	9-19	30-39	30-52	45-70	24-42
Однос казеин/сурутка	1,28	1,1	0,4-0,5	4,7	3,5	3,1	2,7-3,2
Млечна маст (g/l)	3-18	3-42	21-40	33-54	30-72	50-90	20-60
Лактоза (g/l)	58-74	56-72	63-70	44-56	32-50	41-59	35-51
Пепео (g/l)	3-5	3-5	2-3	7-8	7-9	8-10	6,9-9
Енергетска вредност (kJ/l)	1607-1803	1936-2050	2843	2709-2843	2802-2894	4038-4439	2410-3286

*Засновано на минималним и максималним вредностима пронађеним у литератури; у неким литературним наводима нису дати подаци о постпартум периоду, односно периоду лактације.

То се објашњава утицајем генетских, физиолошких (нпр. период лактације, интервал muže), нутритивних (нпр. састав хране и њена енергетска вредност) и узгојних фактора (нпр. локација, сезона) (Claeys и сар., 2014).

2.4.1. Протеини

Млеко магарице, слично млеку других непреживара, може да се класификује као „албумински“ тип млека с обзиром на пропорционално већи садржај протеина сурутке, што се огледа и у његовом малом односу казеин/сурутка (Табела 1). Насупрот томе, млеко преживара представља „казеински“ тип млека са уделом казеинске фракције већим од 80%. (Claeys и сар., 2014). Удео казеина у млеку магарице и кобиљем млеку у просеку износи око 50% (Guo и сар., 2007; Claeys и сар., 2014). Према подацима из Табеле 1, садржај протеина у млеку магарице је приближан садржају протеина у хуманом и кобиљем млеку, док је значајно нижи од оног у крављем млеку. Главна разлика у односу на кравље млеко огледа се у садржају протеина сурутке, који у млеку магарице чини од 35-50% азотне фракције, насупрот само 20% у крављем млеку (Herrouin и сар., 2000). Три главна протеина сурутке су α -лакталбумин, β -лактоглобулин и лизозим (Fantuz и сар., 2001). α -Лакталбумин је у млеку магарице присутан у два изомерна облика са различитом изоелектричном тачком (Giuffrida и сар., 1992). β -лактоглобулин је један од главних алергена код деце, а он је истовремено главни протеин сурутке у крављем млеку (Carroccio и сар., 1999). Овај протеин није детектован у хуманом млеку (De Wit, 1998; Chatterton и сар., 2004; Miranda и сар., 2004). У млеку магарице β -лактоглобулин чини око 40% од укупних протеина, што је ниже у односу на кравље млеко, а слично кобиљем млеку (Miranda и сар., 2004). Млеко магарице поседује три генетске варијације β -лактоглобулина. Једну од њих карактеришу три аминокиселинске супституције, док остале две имају две аминокиселинске измене (Fantuz и сар., 2001). β -лактоглобулин млека магарице је мономер, док је тај протеин у млеку преживара димер. Управо би нижи ниво овог алергена и његова другачија структура у млеку магарице могли бити разлог за хипоалергијски карактер овог млека (Businco и сар., 2000; Carroccio и сар., 2000). Казеинска фракција, која је такође чест алерген, мање је испитивана, али је њен садржај упоредив са оним у хуманом млеку.

Садржај β -лактоглобулина, лизозима и α -лактоглобулина у млеку магарице значајно варира током трајања лактације. Концентрација свих поменутих протеина константно опада, да би свој минимум достигла у периоду од 90-ог до 120-ог дана лактације (Guo и сар., 2007). Насупрот томе, током 150 дана лактације нису

забележене значајне промене садржаја лактоферина, албумина из серума и казеина. Промене садржаја укупних протеина сурутке су највероватније у вези са променама садржаја β -лактоглобулина, лизозима и α -лактоглобулина (Guo и сар., 2007). Лактоферин, албумин из серума, β -лактоглобулин, лизозим и α -лактоглобулин чине око 4,48%, 6,18%, 29,85%, 21,03% и 22,56% од укупних протеина сурутке у млеку магарице (Salimei и сар., 2004).

У поређењу са кобиљим и крављим млеком, млеко магарице има нижи садржај аминокиселина, највероватније из разлога што има и нижи садржај протеина. Међутим, када се садржај аминокиселина изрази у g/100 g протеина, разлике више нису тако очигледне. У том случају млеко магарице има већи садржај серина, глутамина, аргинина и валина. Осим тога, садржај 8 есенцијалних масних киселина у протеинима млека магарице је виши од оног у кобиљем и крављем млеку (Guo и сар., 2007).

2.4.2. Млечна маст

Млеко магарице упркос већем садржају лактозе има мању енергетску вредност у поређењу са млеком преживара и хуманим млеком (Табела 1). Према Claeys и сар., (2014) главни разлог томе је нижи садржај масти у млеку магарице. То је посебно очигледно у случају компарације са хуманим млеком, будући да обе врсте млека имају сличан садржај лактозе, а хумано млеко има већу енергетску вредност (Табела 1). Са друге стране, постоје извештаји који говоре о томе да млечна маст у укупној енергетској вредности кобиљег млека учествује са свега 10 до 20% (Mariani и сар., 2001), што би могао бити случај и код млека магарице с обзиром на блискост ове две врсте. Осим тога, наводи се да је ниска енергетска вредност кобиљег млека резултат великих количина млека које кобила излучи током лактације, а које су неопходне да би са нутритивног аспекта био омогућен интензиван раст ждребета (Ofstedal и Jenness, 1988). Садржај масти у млеку магарице према подацима из литературе варира од 3-18 g/l (Табела 1) и осим периода лактације, може да зависи од начина узгоја, расе, начина muže и дужине интервала између две узастопне muže (Guo и сар., 2007). Садржај млечне масти код магарица нелинеарно расте од партума до краја лактације (Salimei и сар., 2004; Guo и сар., 2007). Млечна маст магарице и кобиле се састоји од 80-85% триглицерида, око 9,5% слободних масних киселина и

5-10% фосфолипида (Claeys и сар., 2014). Садржај масних киселина у млеку различитих млечних врста представљен је у Табели 2.

Табела 2. Садржај масних киселина различитих млечних врста* (White и сар., 2001; Park и сар., 2007; Salimei и Fantuz, 2012).

Масне киселине	Млеко магарице	Кобиље млеко	Хумано млеко	Кравље млеко	Козије млеко	Овчије млеко
C4:0	0,32 - 0,36	0,3 - 0,9	-	1,05 - 1,09	1,97 - 2,44	3,07 - 3,93
C6:0	0,28 - 1,22	0,3 - 1,4	-	1,47 - 1,74	2,03 - 2,70	2,68 - 3,44
C8:0	8,52 - 12,8	0,8 - 6,1	-	0,92 - 1,23	2,28 - 3,04	2,10 - 3,27
C10:0	18,65 - 20,42	2,3 - 16,7	-	2,0 - 2,89	8,85 - 11,0	5,54 - 9,73
C12:0	10,67 - 15,9	3,8 - 14,6	-	2,34 - 3,48	3,87 - 6,18	3,48 - 4,92
C14:0	5,77 - 10,59	4,7 - 19,2	5,48	9,43 - 11,47	7,71 - 11,2	9,85 - 10,7
C14:1 n5	0,22 - 0,88	0,1 - 2,6	-	0,59 - 0,82	0,17 - 0,20	0,19 - 0,50
C15:0	0,32 - 0,57	0,2 - 0,9	-	-	0,46 - 0,85	0,89 - 1,11
C16:0	11,47 - 29,17	12,4 - 28,5	23,98	31,19 - 31,67	23,2 - 34,8	22,5 - 28,2
C16:1	2,37 - 3,93	2,2 - 9,7	2,32	1,0 - 1,25	1,0 - 2,7	0,74 - 1,27
C17:0	0,22 - 0,52	0,0 - 1,2	-	-	0,52 - 0,90	0,58 - 0,70
C17:1	0,27 - 0,73	0,0 - 1,1	-	-	0,24 - 0,48	0,17 - 0,22
C18:0	1,12 - 3,91	0,3 - 3,0	9,52	13,35 - 15,47	5,77 - 13,2	8,51 - 11,0
C18:1 n9	9,7 - 22,15	9,4 - 31,6	38,85	19,44 - 23,87	15,4 - 27,7	17,8 - 23,0
C18:2 n6	8,15 - 15,17	3,6 - 20,3	12,71	1,82 - 2,49	2,49 - 4,34	2,89 - 3,57
C18:3 n3	6,32 - 16,33	2,2 - 26,2	0,71	0,37 - 0,75	0,19 - 0,87	0,52 - 1,04
SFA (%)	46,7 - 67,7	43 - 49	39,41 - 42,24	62,66 - 70,29	56,66 - 86,31	59,2 - 77
MUFA (%)	15,3 - 35,0	26,8 - 36,2	44,3 - 45,11	21,03 - 25,94	16,81 - 31,08	18,9 - 24,99
PUFA (%)	15,2 - 30,5	19 - 20	15,48	2,19 - 3,24	2,68 - 5,21	3,41 - 4,61
PUFA n3 (%)	9,45 - 9,64	8,66 - 11,97	1,27 - 2,19	0,37 - 0,75	0,19 - 0,87	0,52 - 1,04
PUFA n6 (%)	11,57 - 13,09	7,06 - 11,77	11,17 - 14,21	1,82 - 2,49	2,49 - 4,34	2,89 - 3,57

*Вредности у Табели су изражене у g/100 g масних киселина; SFA - укупан % засићених масних киселина; MUFA - укупан % монозасићених масних киселина; PUFA - укупан % полинезасићених масних киселина.

Млечна маст крављег, овчијег, козијег и хуманог млека има у свом саставу више триглицерида (97-98%), али је сиромашна слободним масним киселинама (0,7-1,5%) и фосфолипидима (0,5-1,5%). У поређењу са преживарима, млечна маст магарице и кобиле садржи већи проценат полинезасићених масних киселина и мањи проценат засићених и монозасићених масних киселина. Изражено у апсолутним вредностима, млеко магарице садржи у просеку 1,69 g/l полинезасићених масних

киселина, 5,46 g/l засићених масних киселина и 1,96 g/l мононезасићених масних киселина, док је концентрација ових компонената 5,78, 15,2 и 16,9 g/l у хуманом, односно 1,31, 25,8 и 9,2 g/l у крављем млеку (Gastaldi и сар., 2010). Масне киселине млека магарице и кобиљег млека су углавном незасићене и у виду кратких ланаца (Claeys и сар., 2014), што може бити занимљиво са нутритивног аспекта.

Разлике у саставу млечне масти између различитих млечних врста могу у извесној мери бити последица различитог начина исхране, али исто тако и различитих механизма синтезе масних киселина. Код преживара, под дејством микрофлоре интестиналног тракта, масне киселине из хране пре апсорпције бивају хидрогенизоване у засићене масне киселине. Током овог процеса биохидрогенације долази до формирања транс масних киселина, укључујући изомере коњуговане линолне киселине (CLA). CLA није детектована у млеку магарице (Salimei и Chiofalo, 2006).

Дигестиране масти, растворљиви угљени хидрати, протеини и минерали из хране код магараца и коња се највећим делом апсорбују у танком цреву. Веома мала или непостојећа биодехидрогенација ових компонената хране пре апсорпције сугерише на директан утицај исхране на састав масних киселина млека магарице и кобиљег млека, што је такође претходно утврђено и за хумано млеко (Salimei и Fantuz, 2012). Осим фактора исхране, низак садржај стеаринске киселине (C_{18:0}) у млеку магарице и кобиле може да се објасни и активношћу ензима Δ⁹-десатуразе у млечној жлезди (Salimei и Fantuz, 2012). У млеку магарице је потврђен висок садржај линолеинске (C_{18:2 n6}) и линолинске киселине (C_{18:3 n3}).

Низак садржај млечне масти у млеку магарице (Табела 1) је узет у обзир код употребе овог млека за исхрану одојчади, па је уобичајена пракса да се оно обогаћује биљним уљем (4 ml/100 ml млека), како би његова енергетска вредност била приближна мајчином млеку (Iacono и сар., 1992). Упркос томе, млеко магарице са аспекта састава млечне масти представља функционалну храну, препоручљиву за конзумирање не само деци, већ и одраслим особама. Разлог томе је првенствено висок ниво полинезасићених масних киселина (Табела 2). Захваљујући томе ово млеко делује превентивно на појаву атеросклерозе, умањује ризик од коронарних срчаних обољења, хипертензије и тромбозе (Chiofalo и сар., 2001; Tafaro et al, 2007). Повољном дејству млека магарице на срчана обољења значајно доприноси и низак

ниво холестерола у њему, који је значајно нижи у поређењу са хуманим и млеком преживара, а сличан је садржају холестерола у кобиљем млеку (Claeys и сар., 2014).

2.4.3. Угљени хидрати

Највећи део угљених хидрата млека магарице чини лактоза, чија се концентрација према литературним наводима налази у интервалу између 58 и 74 g/l (Табела 1). Садржај лактозе у млеку магарице је сличан садржају овог шећера у кобиљем и хуманом млеку, а значајно је већи у поређењу са млеком преживара. Према извештајима из литературе садржај лактозе у млеку магарице није зависио од расе, времене муже и сезоне (Salimei и сар., 2004), док су његове промене током лактације биле мале (Guo и сар., 2007; Cosentino и сар., 2012). Константна вредност концентрације лактозе у овом млеку током првих 120 дана лактације објашњава се чињеницом да лактоза са око 50% доприноси осмотском притиску у млеку, који је еквивалентан осмотском притиску у крви, док је пад концентрације овог шећера у касном периоду лактације највероватније последица прилива NaCl из крви у млеко (Guo и сар., 2007). Различита динамика промена садржаја лактозе у млеку магарице је забележена у узорцима из пролећне и летње муже (Cosentino и сар., 2012). Висок садржај лактозе побољшава апсорпцију калцијума и фосфора у цревима и позитивно утиче на акумулацију минерала у структури костију, што је корисно у превенцији остеопорозе (Schaafsma, 2003).

2.4.4. Минерали

Литературни подаци о минералном саставу млека магарице су малобројни и сви постојећи су новијег датума. Са аспекта минералног састава млеко магарице је веома слично хуманом млеку, изузев што млеко магарице поседује виши ниво калцијума и фосфора. Међутим, упркос томе однос Ca/P у ова два млека се много не разликује (Salimei и сар., 2004). Минерални састав различитих врста млека дат је у Табели 3.

Садржај минерала у млеку магарице је условљен периодом лактације, расом и садржајем протеина, а литературни наводи о њиховом различитом садржају могу бити последица и примењене аналитичке методе (Fantuz и сар., 2012). Млеко магарице излучено у првом месецу лактације, када служи искључиво за исхрану

ждребета, садржи највиши ниво минерала. Узрок томе може бити интензиван раст ждробета у овој фази лактације. Након тога садржај минерала у млеку магарице опада (Mariani, 2010).

Табела 3. Минерални састав млека различитих млечних врста* (Park и сар., 2007; Raynal-Ljutovac и сар., 2008; Salimei и Fantuz, 2012).

Минерал	Млеко магарице	Кобиље млеко	Хумано млеко	Кравље млеко	Козије млеко	Овчије млеко
Са	330 - 1140	500 - 1300	278	122	1260	1950 - 2000
Р	320 - 650	200 - 1200	140	119	970	1240 - 1580
К	240 - 747	300 - 800	530	152	1900	1360 - 1400
Na	100 - 268	167 - 200	180	58	380	440 - 580
Mg	40 - 83	40 - 110	35	12	130	180 - 210
Са/Р	0,93 - 2,37	1,08 - 2,5	1,7	1,02	1,3	1,26 - 1,57
Fe	0,43 - 2,64	0,22 - 1,46	0,72	0,08	0,55	0,72 - 1,22
Zn	1,23 - 3,19	0,9 - 6,4	1 - 3	0,53	3,4	5,2 - 7,47
Cu	0,08 - 0,30	0,2 - 1,0	0,2 - 0,4	0,06	0,3	0,4 - 0,68
Mn	у траговима	0,01 - 0,05	0,003 - 0,006	0,02	0,08	0,05 - 0,09

*Вредности у Табели су дате у mg/l.

Тренд смањења садржаја калцијума, фосфора и магнезијума је конзистентан са смањењем садржаја пепела у млеку магарице током трајања лактације (Guo и сар., 2007; Fantuz и сар., 2012), чиме би се делимично могла објаснити велика варијабилност резултата која постоји у литератури везано за макро минерале у млеку магарице. Концентрација калијума и натријума се такође мења током лактације, али то смањење није континуално. Вредност коефицијента односа Са/Р такође се редукује током лактације, док однос Na/К остаје релативно константан (Fantuz и сар., 2012). Смањење садржаја калцијума, фосфора и магнезијума током лактације могло би да буде последица смањења концентрације казеина, с обзиром на то да су јони ових метала у млеку магарице углавном везани за казеинске мицеле (Fantuz и сар., 2012).

2.4.5. Витамини

Витамини имају значајну улогу за здравље људи. Витамин Ка учествује у формирању костију и згрушавању крви. Витамини А и Е су антиоксиданси, док витамин Де има антиканцерогена својства (Markiewicz-Keszuska и сар., 2014). Постоји веома мало података о садржају витамина у млеку магарице. Према

постојећим литературним наводима, млеко магарице, слично кобиљем млеку, има највећи садржај витамина Це, док се многи други витамини у овом млеку налазе у траговима. У Табели 4 дат је садржај витамина у млеку магарице, кобиљем млеку, хуманом млеку и крављем млеку.

Табела 4. Садржај витамина у млеку различитих млечних врста* (Beghelli и сар., 2011; Uniacke-Lowe, 2011; Salimei и Fantuz, 2012).

Витамин	Млеко магарице	Кобиље млеко	Хумано млеко	Кравље млеко
А	0,017	0,093 - 0,34	0,3 - 0,7	0,32 - 0,50
Бе ₁	0,41	0,3	0,003 - 0,015	0,37
Бе ₂	0,64	0,37	0,4 - 0,6	1,8
Бе ₃	0,74	1,4	1,7	0,9
Бе ₁₂	1,10	0,003	0,5	0,004
Це	35 - 50	17,2 - 147	50 - 100	0,94
Де	-	0,003	0,0004	-
Е	0,051	0,26 - 1,13	3 - 8	0,98 - 1,28
Ка	-	0,029	0,003 - 0,015	-

*Вредности у Табели су дате у mg/l.

Млеко магарице за разлику од крављег млека представља богат извор витамина Це, док у поређењу са хуманим млеком има већи садржај витамина Бе₁, Бе₂ и Бе₁₂.

2.5. Микробиологија сировог млека

2.5.1. Извори контаминације

У научној и стручној литератури највише података постоји о микробиологији сировог крављег млека, с обзиром на значај који ово млеко има на светском нивоу, док су микробиолошке карактеристике млека осталих млечних врста мање документоване. Међутим, извори контаминације сировог млека су исти без обзира на то о којој млечној врсти се ради.

Млеко, генерално, због својих повољних нутритивних својстава, неутралне рН и високе вредности активности воде (a_w), представља погодну средину за раст различитих врста микроорганизама, чије умножавање зависи првенствено од температуре млека, пропратне компетитивне микробиоте и њихових производа (Claeys и сар., 2013). Млеко представља лако кварљиву намирницу која се сакупља мужом млечних врста током трајања лактације, најмање два пута дневно, па је

захваљујући томе лако подложна контаминацији микроорганизмима (Chambers, 2002). Степен контаминације млека може да буде јако варијабилан, јер је пре свега условљен манипулацијом млеком током muže и непосредно након ње. У зависности од обима производње млека, у пракси се разликује ручна мужа неколико грла која се врши на малим породичним имањима, од muže више хиљада грла помоћу комплексних аутоматизованих система на добро опремљеним, великим, комерцијалним фармама. У земљама у развоју није неуобичајено пронаћи мале количине неохлађеног млека које доспевају у откупне центре, где се мешају са млеком других произвођача. Насупрот томе, у технолошки добро опремљеним фармама у развијеним земљама, млеко се охлади одмах након muže и складишти на прописан начин од самог момента транспорта до места прераде. Из наведених разлога, почетни број микроорганизама у млеку може веома да варира.

У сваком случају, основни извори контаминације млека су: површина вимена, површина опреме за мужу и складиштење млека, околни простор и микроорганизми из самог вимена млечне животиње (Chambers, 2002). Упркос томе што се опрема за производњу млека, укључујући опрему за мужу и складиштење млека, константно унапређује, појава маститиса код млечних животиња остаје широко распрострањена, захваљујући присуству микроорганизама који га изазивају (Chambers, 2002). Маститис је упална реакција ткива вимена узрокована микроорганизмима, хемијским, топлотним или механичким повредама. Маститис може бити неинфективан, али је најчешће микробне етиологије. Болест настаје када микроорганизми кроз канал вимена продру у млечну жлезду, где се размножавају и својим штетним метаболичким производима оштећују ткиво вимена. У већини случаја маститис узрокује неколико врста бактерија, где се разликују два типа маститиса (Anđelković, 2010):

- (1) Контагиозни маститиси узроковани бактеријским врстама *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* и *Mycoplasma bovis*. Узрочници се брзо шире са једног инфицираног дела вимена на друге делове, као и на остале, здраве животиње;
- (2) Маститиси узроковани убиквитарним бактеријама: *Echerichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Proteus spp.* који су присутни у средини (у измету, простирци, води и тлу) у којој животиње обитавају.

Током муже изводни канал вимена је отворен и флукуација млека омогућава везу спољашње средине са унутрашњошћу вимена. Када бактерије из вимена пређу у млеко, долази до контаминације опреме за мужу, руку радника, површине вимена и крпа за чишћење вимена, путем којих се болест даље шири на друга грла (Chambers, 2002). Патогене бактерије које на овај начин из канала вимена доспеју у млеко, представљају опасност по здравље људи. Поред контаминације млека микроорганизмима из канала вимена, постоји могућност контаминације млека и са његове површине. Адхезијом партикула простирке на површину вимена долази до његове контаминације, која може постати веома висока, уколико вимена нису детаљно опрана. Током лета када се краве изводе на свакодневну испашу, на површини вимена је присутан значајно нижи ниво микроорганизама. Овај сезонски ефекат је нарочито видљив на фармама на којима се опрема за мужу ефикасно пере и дезинфикује. Укупан број микроорганизама на површини вимена крава се током зимских месеци, када се животиње не изводе на испашу, креће у интервалу од 10^5 - 10^7 cfu/вимену (Chambers, 2002). Припрема вимена за мужу подразумева прање вимена одговарајућом комбинацијом дезинфицијенса и детерџента, након чега следи сушење површине вимена крпама за једнократну употребу. Одговарајућа санитација површине вимена, пре и након завршетка муже, редукује трансфер бактерија током муже и уништава патогене, који се након муже нађу на површини вимена. Прање (уз сушење) вимена крава смањује укупан број микроорганизама у сировом млеку за око 50-80%, док ефикасност дезинфекције зависи од врсте дезинфицијенса и начина његове употребе (Chambers, 2002).

Различите врсте микроорганизама у мањем или већем броју могу доспети у млеко са површине и из унутрашњости вимена и преко њега контаминирати површину опреме за мужу и складиштење млека (Chambers, 2002). Ту се у зависности од услова средине микроорганизми могу даље умножавати и представљати потенцијалне изворе контаминације, посебно на местима тешко доступним за прање и дезинфекцију. Из тога разлога су забележени случајеви лошијег хигијенско-санитарног квалитета сировог млека добијеног машинском мужом у поређењу са млеку произведеним ручном мужом (Delgado-Pertinez и сар., 2003), иако ручна мужа често доводи до повећања нивоа контаминације млека због трансфера нечистоћа са површине вимена у млеко рукама или услед контакта инфициране коже радника са млеку (Chambers, 2002). Адекватно прање и санитација опреме играју

есенцијалну улогу у микробиолошком квалитету сировог млека. Након прања и санитације опреме за мужу и складиштење млека, укупан број микроорганизама у сировог козијем млеку се редуковао за око 57% (Delgado-Pertinez и сар., 2003).

2.5.2. Иницијална микробиота сировог млека

Број и врста микроорганизама у сировом млеку директно одсликавају микробиолошку контаминацију насталу током производње млека. Микробиота млека у моменту отпремања са фарме је такође у директној зависности од температуре и времена складиштења. Млеко се производи на амбијенталној температури, која у зависности од годишњег доба и опремљености објекта, може да се налази у интервалу од температура испод нуле (када се млеко мора заштитити од замрзавања), па до преко 25 °C, када је млеко неопходно охладити на температуру фрижидера. Вредност амбијенталне температуре током муже, може да има велики утицај на број микроорганизама у сировом млеку у моменту његовог хлађења у сабирним танковима, јер је потребно извесно време да се млеко са температуре тела животиње охлади на температуру фрижидера. То је посебно од значаја на малим фармама. У сировом козијем млеку у Шпанији, у полукстензивним условима гајења, укупан број микроорганизама детектован непосредно након муже, износио је у просеку 65 000 cfu/ml, да би у моменту завршетка хлађења у резервоарима са ручно помуженим млекум тај број достигао 262 000 cfu/ml, односно 362 000 cfu/ml у случају машинске муже (Delgado-Pertinez и сар., 2003). Тиме се може објаснити и извештај о већем укупном броју аеробних и колиформних бактерија у сировом крављем млеку током летње сезоне (Elmoslemany и сар., 2009), упркос томе што је током летњег периода, када су животиње свакодневно на пашњаку, на вимену крава присутан значајно мањи број микроорганизама (Chambers, 2002). Уколико је млеко складиштено на температури мањој од 4 °C, размножавање микроорганизама ће бити одложено за најмање 24 сата. У том случају ће микробиота млека након 24 сата складиштења бити слична почетној (Chambers, 2002). Хлађење млека на фармама може да маскира постојање лоше хигијенске праксе, укључујући неадекватна средства и опрему за чишћење и санитацију музелица. Као резултат тога, често се добије млеко лошег микробиолошког квалитета, које може да садржи патогене микроорганизме, иако је наизглед комплетна процедура добијања и складиштења

млека била испоштована (Chambers, 2002). Време складиштења млека на фармама такође може да буде различито, па је и то један од разлога за варијабилност нивоа контаминације млека. Током пролонгираног складиштења охлађеног млека може доћи до умножавања психрофилних микроорганизама. Код сировог крављег млека, висока вредност почетног броја микроорганизама ($>100\ 000\ \text{cfu/ml}$) је показатељ озбиљних пропуста у хигијени, док број $<20\ 000\ \text{cfu/ml}$ указује на добру хигијенску праксу (Chambers, 2002). Међутим, важно је истаћи да чак и у случајевима када добра хигијенска пракса омогућава производњу млека са $<20\ 000\ \text{cfu/ml}$, то не представља гаранцију да млеко не садржи патогене микроорганизме. *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* су микроорганизми који генерално, због утврђене патогености и учесталости детекције имају највећи значај за сирово млеко (Spreer, 1998; Walstra и сар., 1999).

Salmonella spp. је један од главних патогених микроорганизама који могу да се јаве као контаминенти хране и једнако је присутна у развијеним и неразвијеним земљама света (Caron и сар., 2006). Присуство *Salmonella* spp. у сировом млеку је резултат фекалне контаминације, било да се ради о контаминацији из спољашње средине или са коже музне животиње. У ређем броју случајева присуство *Salmonella* spp. у млеку је последица маститиса, а познато је и да *Salmonella* Dublin може доспети директно из крви животиње у млеко у случају инфекције (Claeys и сар., 2013). Упркос томе што већина серотипова *Salmonella* нема способност размножавања на температури хлађења млека ($4\ ^\circ\text{C}$), они под овим условима преживљавају веома дуг временски период (Oscar, 2011), тако да их складиштење млека на прописан начин не може елиминисати.

Појава и степен развијања болести код људи изазване конзумирањем микробиолошки неисправне хране зависи од више фактора, међу којима су патогеност микроорганизама (или токсичност токсина), број ћелија микроорганизама (или количина токсина) унесених храном, инфективна доза и здравствено стање конзумента (D'Aoust, 1989; Lund и O'Brien, 2011). Ризичну групу чине деца, старије особе, труднице, као и особе са ослабљеним имунитетом, иако могу да оболе сви, укључујући младе и здраве особе (Kothary и Babu, 2001; Mølbak и сар., 2006). Инфекције са *Salmonella* spp. код људи се јављају у две форме: као тифусна грозница и као гастроинтестинална обољења – салмонелозе (Tellez и сар., 2011). Више од 95%

инфекција овим бактеријама чине салмонелозе изазване конзумирањем хране контаминирани са *Salmonella* spp. (Hohmann, 2001). У САД-у су од укупног броја смртних случајева насталих као последица тровања храном, салмонелозе чиниле 30% (Hohmann, 2001), док се у ЕУ сваке године у просеку региструје око 100 000 нових случајева салмонелоза (EFSA, 2015). Први симптоми салмонелозе се обично јављају 12 до 14 сати од тренутка конзумирања контаминираних хране, иако постоје извештаји и о краћим, односно дужим периодима инкубације болести (Јау и сар., 2005). Салмонелозе се код оболелих манифестују мучнином, повраћањем, абдоминалним боловима, главобољом, дрхтавицом и дијарејом. Ове симптоме обично прате клонулост, слабост мишића, умерена грозница и поспаност. Симптоми обично трају 2 до 3 дана, а средња стопа морталитета је 4,1% (Јау и сар., 2005). Иако *Salmonella* spp. релативно брзо нестаје из цревног тракта (Јау и сар., 2005), у организму до 5% оболелих након завршетка акутне фазе *Salmonella* spp. остаје дуже време присутна. Захваљујући томе, особе које су прележале салмонелозу могу још један изванредан период излучивати ове бактерије фецесом и бити преносиоци болести (Јау и сар., 2005). Инфективна доза зависи од соја микроорганизама, година и здравственог стања оболелог, па стога може бити веома различита. Такође, на вредност инфективне дозе може утицати и природа намирнице. Наиме, верује се да висок садржај протеина и масти у намирницама (као што су сир, сладолед и сл.) може да игра значајну улогу у заштити патогена од желучане киселине, па ће у случају конзумирања таквих намирница инфективна доза највероватније бити нижа. Према доступним литературним подацима, инфективна доза за различите сојеве *Salmonella* spp. је већа од 10^5 ћелија унетих храном (Kothary и Babu, 2001).

L. monocytogenes је један од најзначајнијих узрочника обољења људи изазваних конзумирањем микробиолошки контаминираних хране. Ради се о убиквитарном микроорганизму који је широко распрострањен у природи (Farber и Peterkin, 1991). Може се наћи у сировом млеку, које захваљујући свом нутритивном саставу представља погодну средину за његово размножавање. *L. monocytogenes* у сирово млеко најчешће доспева са површине опреме за млеку, складиштење и транспорт млека, с обзиром на велику отпорност ове бактерије и њено тешко уклањање са места на опреми неприступачних за чишћење и санитацију. Њено присуство такође може бити последица фекалне контаминације, маститиса, а постоји и вероватноћа њеног директног уласка у млеко из крви животиње у случају инфекције (Claeys и

сар., 2013). *L. monocytogenes* поседује више фактора вируленције од којих је најзначајнији хемолизин (листериолизин О). Када се *L. monocytogenes* у организам унесе оралним путем, прво долази до колонизације интестиналног тракта, након чега следи продирање ове бактерије у ткива (укључујући плаценту трудница) и крвоток домаћина (Јау и сар., 2005). Као интрацелуларни патоген, *L. monocytogenes* улази у ћелије домаћина у којима се потом умножава (Јау и сар., 2005). Листериолизин О изазива β -хемолизу еритроцита домаћина и деструкцију његових фагоцитних ћелија (Јау и сар., 2005). Листерииозе се код људи не манифестују јединственим симптомима из разлога што смер развијања болести првенствено зависи од здравственог статуса оболелих (Јау и сар., 2005). Здраве одрасле особе (не рачунајући труднице), са добрим имуним системом, изузетно су отпорне на инфекције изазване овом бактеријом. Осим деце, старих особа и трудница, ризичне групе чине ХИВ позитивне особе, алкохоличари, дијабетичари, кардиоваскуларни болесници, пацијенти под кортикостероидном терапијом, бубрежни болесници, као и генерално људи са ослабљеним имунитетом (Јау и сар., 2005). Код њих се листериоза најчешће манифестује менингитисом и сепсом. Уколико труднице оболе од листериозе, оне могу да немају никакве симптоме болести или ти симптоми личе на симптоме грипа (Јау и сар., 2005). Последице су побачај или превремени порођај. Уколико ипак дође до порођаја у редовном термину, новорођенче има симптоме менингитиса, који се углавном јављају од прве до четврте недеље живота. Код одраслих особа период инкубације болести најчешће износи од једне до неколико недеља.

S. aureus је широко распрострањен патоген чији су главни носиоци људи и животиње (The Food Safety File, 2008). Он у сирово млеко може доспети из канала вимена музне животиње (у случају клиничког и субклиничког стафилококног маститиса), односно директном или индиректном контаминацијом из спољашње средине (Scherrer и сар., 2004). Велики број сојева *S. aureus* има способност продукције ентеротоксина, који, уколико се у довољним количинама унесе у организам, изазива акутна гастроинтестинална обољења. Ради се о изузетно термостабилном ентеротоксину који преживљава температуру од 100 °C у трајању од 30 до чак 700 минута, у зависности од соја (The Food Safety File, 2008). На температури од 120 °C потребно је 9,4 минута да дође до потпуне деградације овог токсина (The Food Safety File, 2008). Симптоми тровања храном проузроковани стафилококама су абдоминални болови, мучнина и повраћање, који понекад могу

бити праћени дијарејом (никад само дијарејом). Симптоми се јављају веома брзо (од 30 минута до 8 сати након интоксикације) и обично се спонтано повлаче након 24 сата (Loir, 2003).

У сировом млеку се посебна пажња поклања колиформним бактеријама, јер њихово присуство може да буде знак фекалне контаминације. Међу колиформним бактеријама најзначајније место припада *E. coli* из разлога што је реч о хуманом патогену чији је примарни извор контаминације фецес животиње и њена простирка (Chambers, 2002). Извори контаминације сировог млека овом бактеријом такође могу да буду и радници на мучи (који млеко контаминирају преко руку), јер је човек уз мучне животиње главни носилац свих серотипова *E. coli* (Škrinjar и Теџановић, 2007). *E. coli* је члан фамилије Enterobacteriaceae. Позната су четири серолошка типа *E. coli* и то: ентеротоксигени, ентеропатогени, ентероинвазиони и ентерохеморагични. Ентеротоксигени сојеви синтетишу различита токсична једињења, од којих је за човека најзначајнији ентеротоксин. Под његовим дејством долази до повлачења воде из ткива органа у лумен црева, што има за последицу дехидратацију и деминерализацију организма праћену дијарејом и мучнином са или без повраћања. Ентеропатогени сојеви не синтетишу токсине, али код људи изазивају акутни гастроентеритис са абдоминалним грчевима. Ентероинвазиони сојеви *E. coli* су изазивачи дијарејалних обољења, док ентерохеморагични сојеви изазивају обољења, чији се симптоми понекад манифестују у облику кржаве дијареје, до оштећења бубрега и мозга (Škrinjar и Теџановић, 2007). Према литературним наводима, инфективна доза за различите сојеве *E. coli* је изнад 10^5 ћелија унетих храном (Kothary и Babu, 2001).

Присуство колиформних бактерија није сигуран доказ директне фекалне контаминације и пропуста у чишћењу вимена пре муче, јер оне могу брзо и лако да се размножавају на влажним млечним резидуама заосталим на опреми за мучу, тако да њихов главни извор могу бити и неадекватно дезинфиковане музилице. Исто тако, релативно мали број колиформних бактерија не мора обавезно да указује на ефикасно чишћење и дезинфекцију опреме. Сматра се да је број колиформних бактерија у сировом млеку већи од 100 cfu/ml индикатор незадовољавајуће хигијенске праксе (Chambers, 2002). Спорадично висок број колиформних бактерија може бити и у вези са појавом маститиса (Chambers, 2002).

Фекална контаминација аутоматски подразумева и присуство других (неколиформних) патогених микроорганизама фекалног порекла, који, осим што представљају опасност по здравље људи, могу да изазову кварење млека на амбијенталној температури (Chambers, 2002). Многе неколиформне бактерије фекалног порекла попут врста из родова *Shigella*, *Proteus* и *Yersinia*, припадају фамилији Enterobacteriaceae. То су Грам негативне, аспорогене, факултативно анаеробне, штапићасте бактерије, које ферментишу глукозу. Бактерије из фамилије Enterobacteriaceae могу да изазову велики број различитих обољења код људи, као што су септикемија, пнеумонија, менингитис и инфекције уринарног тракта. Enterobacteriaceae се у оквиру добре произвођачке праксе користе као индикатори ефикасности санитације погона (где не указују обавезно на фекалну контаминацију) и као индикатори ефикасности поступка топлотне обраде (Baylis и сар., 2011). Enterobacteriaceae су добри показатељи адекватности произвођачког поступка на завршетку процеса производње, али нису поуздани за процену исправности производа током рока употребе (Baylis и сар., 2011). Разлог томе лежи у чињеници да неке Enterobacteriaceae имају способност умножавања у храни у условима хлађења, па њихов утврђени број не мора да рефлектује почетну контаминацију, односно не указује обавезно на неадекватну температуру складиштења (Baylis и сар., 2011).

Осим горе поменутих патогених микроорганизама, за млеко и млечне производе је значајан и *B. cereus*, посебно његови психротрофни сојеви са способношћу герминације на 5 °C (Driehuis, 2013). Они представљају лимитирајуће факторе у погледу рока трајања пастеризованог млека, нарочито у периоду када су животиње на пашњацима, јер је реч о земљишним микроорганизмима (Christiansson и сар., 1999). *B. cereus* може да изазове два облика тровања храном. Један је дијарејалног типа, а изазива га ентеротоксин продукован током вегетативног раста *B. cereus* у танком цреву. Други тип је еметички и настаје као последица конзумирања хране контаминираним еметичким токсином овог патогена (Nempen и сар., 2004).

2.5.3. Конзумирање сировог млека и законска регулатива

На подручју Балканског полуострва сирово млеко магарице традиционално се користи као средство за јачање имуног система и као „народни лек“ за третман

различитих болести (Ivanković и сар., 2009). Поред праксе конзумирања топлотно необрађеног, сировог млека магарице, које је део фолклора не само балканских, већ и других народа света (Fernando и Starkey, 2000), популарност конзумирања сировог млека као „здраве“ хране данас у свету рапидно расте (Bucchini, 2012; Claeys и сар., 2014). Велику заслугу за популаризацију и промоцију сировог млека као бенефита у исхрани људи имају многобројне међународне организације које подржавају традиционалне и локалне кухиње и пољопривреду (Bucchini, 2012).

Најчешћи аргументи на које се заговорници конзумирања сировог млека позивају јесу: искључивање штетног дејства загревања на здравствено корисне ефекте млека, смањење осетљивости на алергије, већи нутритивни квалитет и бољи укус (Claeys и сар., 2014). Међутим, не постоје чврсти научни докази о негативном ефекту топлотне обраде млека на здравље потрошача, па сходно томе у ширим научним круговима преовладава мишљење да топлотна обрада млека негативно утиче само на његова сензорна својства (Claeys и сар., 2014). Без обзира на опречне ставове везано за здравствени бенефит од конзумирања топлотно необрађеног млека, потенцијални ризик по здравље конзумента овог млека постоји, јер су претходно забележени бројни случајеви тровања људи, за које је доказано да су били у вези са присуством патогена или њихових токсина у сировом млеку (Bucchini, 2012; Claeys и сар., 2013; Claeys и сар., 2014). Са друге стране, чак и највећи противници конзумирања сировог млека не могу да оповргну чињеницу да је уз испуњење адекватних хигијенских критеријума, могуће произвести сирово млеко безбедно за директно конзумирање (Bucchini, 2012).

Различити ставови који у јавности постоје поводом оправданости конзумирања сировог млека, одразили су се и на законске регулативе земаља широм света. У Србији није законски регулисана продаја сировог млека намењеног потрошачима за директно конзумирање. У 29 држава САД-а дозвољено је конзумирање сировог млека (Amagliani и сар., 2012), чија је продаја углавном ригорозно законски регулисана. У већини ових држава је дозвољена продаја сировог млека искључиво на фармама произвођача, док је у само 9 држава дозвољена и малопродаја. Услови за продају сировог млека се разликују између држава, па је тако на пример на Род Ајленду (*Rhode Island*) дозвољена само продаја сировог козијег млека и то искључиво према препоруци лекара. У Канади и Аустралији је законом забрањена

продаја сировог млека намењена директном конзумирању, док у Јапану за то има дозволу само једна компанија (*Raw milk across the world*, 2012).

Европска унија за разлику од Канаде и Аустралије не препознаје продају сировог млека као нелегалну, већ оставља земљама чланицама могућност да националним регулативама или уредбама регулишу, односно забране или дозволе његову продају на својој територији. У важећој европској регулативи ЕС 853/2004, дефинисани су општи здравствени и хигијенски захтеви у погледу производње млека и млечних производа, које морају да поштују све земље чланице.

Поменута Регулатива (Анекс I, тачка 4.1) дефинише „сирово млеко“ као производ секреције млечне жлезде домаћих животиња. Ова дефиниција дакле, не обухвата само млеко уобичајених млечних врста (крава, коза, оваца), већ и млеко осталих домаћих млечних животиња. У пракси, стављање у промет кобиљег млека, млека магарице, камиле или млека других домаћих животиња, могуће је под условом да се његова производња и прерада спроводе у складу са релевантним захтевима утврђеним у Регулативама ЕС 852/2004 и ЕС 853/2004.

Према ЕС 853/2004 сирово млеко је дефинисано као производ млечне жлезде фармских животиња које није било загревано на температуру већу од 40 °C или подвргнуто било којем другом третману, који има еквивалентан ефекат. Сирово млеко намењено јавној потрошњи мора да потиче од животиња:

- које немају симптоме инфективних болести преносивих на људе путем млека,
- које су доброг општег здравственог стања; без знакова болести које могу да изазову контаминацију млека, а посебно без симптома инфекције гениталног тракта, ентеритиса са дијарејом и грозницом, као и видљиве упале вимена,
- које немају никакве повреде вимена,
- којима нису давале недопуштене супстанце или производи,
- код којих су, уколико су им давани одобрени ветеринарско–медицински производи, поштоване прописане дозвољене концентрације.

Даље, према овој регулативи у погледу бруцелозе, сирово млеко мора да потиче од:

- крава или биволица из стада које је званично слободно од бруцелозе,
- коза или оваца из стада које је званично слободно од бруцелозе,

- других млечних врста подложних бруцелози, из стада које је званично слободно од бруцелозе на основу спроведене контроле према утврђеном плану, овереном од стране компетентних органа.

Што се тиче туберкулозе, сирово млеко мора да потиче од:

- крава или биволица из стада које је званично слободно од туберкулозе,
- других млечних врста подложних туберкулози, из стада које је званично слободно од туберкулозе на основу спроведене контроле према утврђеном плану, овереном од стране компетентних органа.

Уколико се козе држе заједно са кравама, те козе морају бити тестиране на туберкулозу.

Хигијена производног погона према ЕС 853/2004:

1) *Захтеви за просторије и опрему:*

- Опрема за мжу и просторије у којима се млеко складишти и хлади морају бити лоциране и конструисане на начин који ограничава ризик од контаминације млека,
- Просторије за складиштење млека морају бити заштићене од штеточина, адекватно одвојене од просторија у којима се животиње држе, снабдевене опремом за хлађење млека,
- Површина опреме која долази у контакт са млеком (посуђе, контејнери, танкови, итд., намењени за мжу, сакупљање и транспорт млека) мора бити лака за чишћење и дезинфекцију и одржавана у добром стању. То захтева коришћење глатких, перивих и нетоксичних материјала,
- Након коришћења, те површине морају бити очишћене и дезинфиковане. Контејнери и танкови који се користе за транспорт сировог млека морају бити на одговарајући начин очишћени и дезинфиковани, пре поновне употребе, односно након сваког транспорта млека или након серије транспорта млека, када је време између истовара и следећег утовара кратко; у сваком случају, најмање једном дневно.

2) *Хигијена током мжже, сабирања и транспорта млека*

а) Мужа мора бити извршена под адекватним хигијенским условима, где се посебно мора осигурати:

- Чистоћа вимена и околне регије вимена,
- Провера млека сваке појединачне животиње на органолептичке или физичко хемијске карактеристике, од стране радника или методом која даје сличне резултате, као и да се млеко које показује извесне абнормалности не користи за исхрану људи,
- Да се млеко животиња које показују знаке обољења вимена не користи за исхрану људи, односно да се поступи у складу са саветима ветеринара,
- Идентификација животиња које су биле лечене, због могућности преноса резидуа лекова у млеко, ради искључења тих животиња са муже до краја прописане каренце,
- Коришћење искључиво оних средстава за дезинфекцију вимена, која су потврђена и одобрена од компетентних органа, на начин који ће онемогућити појаву неприхватљивог нивоа њихових резидуа у млеку,
- Складиштење млека непосредно након муже на чистим местима, дизајнираним и опремљеним на начин да се избегне контаминација млека. Млеко одмах мора бити охлађено на температуру испод 8 °C у случају дневног сакупљања млека, односно на испод 6 °C, уколико се млеко не скупља на дневном нивоу,
- Одржавање хладног ланца током транспорта, где у моменту приспећа сировог млека на место прераде, температура млека не сме бити изнад 10 °C,
- Млеко не мора да задовољава горе наведене температурне захтеве, уколико се прерада млека врши у року од два сата од момента муже и уколико технолошки процес даље прераде млека захтева већу температуру сировог млека (што наравно мора бити потврђено од стране компетентног органа).

3) Хигијена радника

- Радници који врше мужу или манипулишу млеком морају да носе одговарајућу чисту одећу,
- Радници који раде непосредно на мужи морају да одржавају висок степен личне хигијене,

- Одговарајућа опрема за прање руку радника, мора да постоји близу места muže.

Критеријуми за сирово млеко према ЕС 853/2004:

а) Репрезентативан број узорака сировог млека сакупљених од произвођача, методом случајног избора, мора задовољавати следеће критеријуме:

- Сирово кравље млеко (укупан број микроорганизама (на 30 °C)* <100 000 cfu/ml; број соматских ћелија** <400 000/ml) *Рачуна се геометријски просек за период од два месеца са најмање 2 узорка месечно; **Рачуна се геометријски просек за период од три месеца са најмање 1 узорком месечно, осим уколико компетентни орган не дефинише другачију методологија узимајући у обзир сезонске варијације у производњи млека,
- Сирово млеко других врста (укупан број микроорганизама (на 30 °C) < 1 500 000 cfu/ml). Рачуна се геометријски просек за период од два месеца са најмање 2 узорка месечно,
- Уколико је сирово млеко других врста осим крављег намењено за производњу млечних производа од сировог млека, чији технолошки процес производње не укључује топлотну обраду, онда сирово млеко других врста мора да има укупан број микроорганизама (на 30 °C) <500 000 cfu/ml. Рачуна се геометријски просек за период од два месеца са најмање 2 узорка месечно.

б) Контролу сировог млека могу да спроводе субјекти у пословању млеком (произвођачи млека, прерађивачи млека, итд.), као и надлежни органи у оквиру националних или регионалних контролних планова.

ц) Без обзира на директиву 96/23/ЕС, субјекти у пословању са млеком могу иницирати контролу, како би се уверили да се на тржишту није нашло млеко за које је утврђено да:

- Садржи резидуе антибиотика (дефинисаних у регулативи ЕЕС 2377/90), чије концентрације прелазе утврђене лимите,
- Садржи резидуе антибиотика у укупној концентрацији већој од дозвољених лимита,
- У случају да сирово млеко не задовољава микробиолошке критеријуме, као и критеријуме који се односе на резидуе антибиотика, субјект у пословању са

млеком је дужан да то пријави надлежним органима и предузме активности у циљу отклањања проблема.

Комерцијално паковање сировог млека, уколико је намењено за директно конзумирање, мора да садржи ознаку „сирово млеко“ (ЕС 853/2004). Поред тога, у ЕУ сирово млеко намењено људској исхрани мора да задовољава захтеве законске регулативе ЕС 178/2002, према којој у њему не смеју да буду присутни патогени микроорганизми.

Дакле, захваљујући општој регулативи ЕС 853/2004, земљама чланицама Европске уније омогућен је правни основ да на својој територији уреде продају сировог млека различитих млечних врста. Неке од земаља Европске уније у којима је дозвољена продаја сировог млека јесу: Италија, Немачка, Француска, Аустрија, Чешка, Пољска, Словенија, Бугарска, Хрватска и Холандија. У Великој Британији једино Шкотска забрањује продају сировог млека на својој територији, док је у Велсу, Ирској и Енглеској његова продаја дозвољена само на фармама или директном испоруком млека са фарме потрошачу (*Raw milk across the world*, 2012).

Иако су у Италији још од 2004. године локалне власти на свом подручју дозвољавале продају сировог млека намењеног директном конзумирању, влада Италије је 2007. године званично дозволила продају сировог млека ове намене у целој земљи и то искључиво у аутоматима. Одлука је имала правно утемељење захваљујући уопштеној интерпретацији регулативе ЕС 853/2004, а донесена је након интензивног лобирања пољопривредника и локалних власти. Одлуком из 2007. године власници аутомата за директну продају сировог млека конзументима, били су дужни да се региструју код локалних власти, а дозвољено им је инсталирање аутомата не само на фарми већ и било где другде у истој провинцији. Сабирање млека са више различитих фарми није било дозвољено, тако да се у сваком аутомату продавало млеко са само једне фарме. Истом уредбом, директна продаја сировог млека потрошачима је била условљена контролама на фармама, које су морале да се спроводе најмање два пута месечно, на укупан број микроорганизама ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$) ($<100\ 000\ \text{cfu/ml}$) и број соматских ћелија ($<400\ 000/\text{ml}$). Захтев је био да резултати испитивања буду у складу са критеријумима постављеним у регулативи ЕС 853/2004.

Мањкавост ове уредбе огледала се у чињеници да је усаглашеност са микробиолошким границама постављеним у ЕС 853/2004, била тумачена као доказ исправности сировог млека, иако присуство и број патогених микроорганизама уопште нису били узети у обзир. У касније усвојеним анексима ове уредбе, био је прописан обавезан мониторинг патогена (*S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli* 0157, *Campylobacter* spp.) и микотоксина у млеку, иако тим анексима није била прописана минимална, обавезна фреквенција испитивања (Bucchini, 2012). Ни у једном од 5 испитаних узорака (25 ml) није смело да буде детектовано присуство *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli* 0157 и *Campylobacter* spp., док у случају *S. aureus* од 5 испитаних узорака 3 су могла да имају број *S. aureus* до 500 cfu/ml, а у 2 узорка број ових бактерија био је дозвољен у интервалу између 500 и 2 000 cfu/ml (Amagliani и сар., 2012).

Осим тога, овим анексима била је ограничена продаја сировог млека на дневни ниво, односно сирово млеко у аутоматима је могло да стоји само један дан. Уколико млеко није било продато, уклањано је из аутомата наредни дан, и више није могло да буде продавано као сирово млеко. Млеко је у овим уређајима аутоматски пуњено у боце са ознаком „непастеризовано сирово млеко“. Температура уређаја је морала бити одржавана у опсегу између 0 и 4 °C током свог времена продаје. Уређаји су морали бити снабдевени аутоматским механизмом за заустављање дистрибуције у случају изласка температуре из прописаних граница. Сваки уређај (Слике 2 и 3) је ради контроле температуре морао да има инсталиран температурни дата логер (Bucchini, 2012).



Слике 2 и 3. Аутомати за продају сировог млека намењеног за директно конзумирање у Италији и Француској.

(<http://modernfarmer.com/2014/03/americanc-envy-europec-raw-milk-vending-machine/>)

Ова одлука власти у Италији довела је до тога да раст тржишта сировог млека намењеног за директно конзумирање траје до данас, без обзира на полемике око потенцијалних опасности од конзумирања сировог млека. Иако су забележени спорадични случајеви тровања сировим млеком у различитим деловима Италије, није било тровања већих размера, а широм Италије је инсталирано више од 1400 аутомата (Vucchini, 2012).

У Хрватској је продаја сировог млека из аутомата (млекомата) регулисана чланом 11. *Pravilnika o pregledu sirovog mlijeka namijenjenog javnoj potrošnji (Narodne novine, broj 110/100)* из 2010. године. Овај хрватски правилник је у потпуности усклађен са европском регулативом ЕС 853/2004, а према члану 11. продају сировог млека на једном аутомату може обављати само један произвођач, а млеко мора бити од животиња из сопственог узгоја. Животиње морају потицати из крда званично слободног од бруцелозе и туберкулозе, а млеко мора да задовољава микробиолошке критеријуме за укупан број микроорганизама и број соматских ћелија прописан у ЕС 853/2004. У Хрватској дакле, није дефинисана контрола овог млека на присуство и број патогених микроорганизама.

И у Словенији је продаја млека из аутомата (млекомата) (Слика 4) законски регулисана и постоји већ извесно време. Уређаји који се користе у Словенији, у случају изласка температуре изван прописаних вредности, аутоматски заустављају продају, обавештавају власника о квару путем SMS поруке, а сам уређај аутоматски активира UV светло које стерилише млеко.



Слика 4. Аутомат за продају сировог млека намењеног за директно конзумирање у Словенији. (<http://modernfarmer.com/2014/03/americans-envy-europes-raw-milk-vending-machines/>)

У свакој од држава ЕУ продаја сировог млека у аутоматима је омогућена искључиво на самој фарми или у месту веома близу фарме, а разлог томе је кратак рок трајања непастеризованог млека, који онемогућава дужи транспорт и држање производа у малопродаји. Продаја сировог млека директно од произвођача има своје предности, у смислу да се овим начином продаје редукује број манипулација млеком, па самим тим и могућност његове контаминације, а одговорност за исправност млека се своди само на произвођача. Самим тим, директна одговорност за здравље потрошача стимулише произвођаче да на фарми одржавају висок ниво хигијене, а сам купац има увид у услове на фарми. Осим тога, овај вид продаје млека је још један начин подршке концепту локалне производње хране (Schutz и Ferree, 2012).

Иако неке земље Европске уније, попут Хрватске, немају дефинисане критеријуме за патогене микроорганизме у млеку, већина земаља чланица која дозвољава продају сировог млека намењеног за директно конзумирање, поседује много специфицираније микробиолошке критеријуме, у односу на оне за сирово млеко дефинисане регулативом ЕС 853/2004. Према енглеској регулативи *The Food Hygiene (England) Regulations* (2006) сирово млеко намењено директном конзумирању да би могло да се нађе у продаји мора да задовољи следеће микробиолошке критеријуме: укупан број бактерија $<20\ 000\ \text{cfu/ml}$ и број колиформних бактерија $<100\ \text{cfu/ml}$. Исти критеријуми важе и за Велс (*The Food Hygiene (Wales) Regulations*, 2006).

Генерално, у већини европских земаља сирово млеко намењено директном конзумирању мора да задовољи следеће критеријуме (Hillerton и Berry, 2004):

- Укупан број бактерија $<20\ 000\ \text{cfu/ml}$;
- *S. aureus* ($m=500\ \text{cfu/ml}$, $M=2000\ \text{cfu/ml}$; $c=5$, $n=2$);
- *Salmonella* spp. није дозвољено присуство у 25 ml ($c=5$, $n=0$);
- Број колиформних бактерија $<100\ \text{cfu/ml}$.

2.6. Антимикробна једињења млека

Млеко задовољава комплетне нутритивне потребе младунчади, а управо специфичности тих потреба условљавају разлике у саставу млека различитих врста сисара. Млеко мора да осигура преживљавање, раст и развој младунчета током првих месеци живота, па из тог разлога садржи различите противупалне факторе, имуномодулаторе и антимикробне агенсе.

Млеко, као и колострум, обезбеђује бројна антимикробна једињења која испољавају специфична и неспецифична бактериостатска или бактерицидна својства. Антимикробна једињења у млеку генерално се могу поделити на имуноглобулине и не-имуне протеине. Имуноглобулини су најзначајнији антимикробни агенси колострума, па стога они представљају прву линију заштите и својеврстан пасивни имунитет, који је замена за још неформирани имунитет младунчета. Неимуни протеини, међу којима су најважнији гвожђе везујући гликопротеин - лактоферин, као и ензими лизозим и лактопероксидазе, имају директнију улогу у инхибицији бактеријске инвазије.

2.6.1. Имуноглобулини

Имуноглобулини су добро познати биоактивни протеини млека који младунчету непосредно након рођења обезбеђују природни одбрамбени систем против бактеријских инфекција (Floris и сар., 2003). Они представљају главне антимикробне агенсе колострума, јер су у том периоду присутни у релативно високој концентрацији (Clare и сар., 2003; Floris и сар., 2003). Имуноглобулини се синтетишу у ћелијама крвне плазме, одакле се код свих сисара излучују у колострум и млеко, путем којих доспевају у цревни тракт младунчета или евентуално бивају апсорбовани у његов крвоток. Њихова улога се првенствено састоји у спречавању насељавања патогених бактерија на површини цревне мукозе младунчета, где бактеријска инхибиција започиње везивањем имуноглобулина за специфична места на површини бактеријских ћелија. (Clare и сар., 2003). Три класе имуноглобулина се уобичајено налазе у млеку: *G* (*IgG*), *A* (*IgA*) и *M* (*IgM*) (Clare и сар., 2003). *IgG* класа је подељена на две подкласе: *IgG₁* и *IgG₂* (Hurley, 2003; Madureira и сар., 2007). Сви мономерни имуноглобулини поседују сличну основну структуру, која се састоји од два дугачка и два кратка ланца полипептида, међусобно повезана дисулфидним везама, чије субјединице имају молекулску масу од 160 kDa. *IgG* се састоји од једне субјединице, док се *IgA* и *IgM* састоје од две, односно 5 субјединица, чије молекулске масе износе око 400 и 1000 kDa (Uniaske-Lowe и сар., 2010).

Релативни удео ових класа имуноглобулина у млеку различитих врста значајно варира: у крављем, козијем и овчијем млеку доминантна је подкласа *IgG*, а посебно *IgG₁* (Garper и сар., 2007). Код људи *IgG* је једини имуноглобулин који се транспортује у материцу, док је након рођења, у колостурму и млеку најзаступљенији *IgA*, где током првих неколико дана постпартум достиже концентрацију од чак 50 mg/ml (Clare и сар., 2003). *IgG* је доминантни имуноглобулин у кобиљем колоструму, док је у кобиљем млеку најзаступљенији *IgA* (Uniaske-Lowe и сар., 2010).

Концентрација имуноглобулина је највиша у колоструму, након чега се константно смањује током трајања лактације. Код кобиле транзиција колострума у млеко се одвија током два дана *post partum*. Концентрација протеина у кобиљем колоструму непосредно након порођаја веома је висока (>150 g/kg) првенствено захваљујући високом садржају имуноглобулина (*IgA*, *IgM* и *IgG*). Међутим, она се веома брзо

смањује и након 24 сата има вредност мању од 40 g/kg, да би након 4 недеље трајања лактације била мања од 20 g/kg (Uniacke-Lowe и сар., 2010). Имуноглобулини у крављем (0,80 g/kg), кобилем (1,63 g/kg) и хуманом млеку (0,96 g/kg) чине око 12,7%, 19,6% и 15,5% укупних протеина сурутке, док тај удео у млеку магарице износи око 11,5% (Salimei и Fantuz, 2012; Uniacke-Lowe и сар., 2010).

2.6.2. Лактопероксидаза

Лактопероксидаза је гликопротеин, члан фамилије пероксидаза, молекулске масе око 78 kDa. Природно се налази у млеку и другим излучевинама људи и животиња. Садржај лактопероксидазе у различитим врстама млека варира, па је тако кравље млеко (0,7-3,9 јединица/ml) богатије овим ензимом у поређењу са хуманим млеком (0,06-0,97 јединица/ml). Његова концентрација у крављем млеку на самом почетку колострума је ниска, да би након 4 до 5 дана *post partum* достигла своју максималну вредност. Према подацима из литературе концентрација лактопероксидазе у крављем млеку у колоструму се креће у интервалу од 11 до 45 mg/ml, док је у самом млеку присутна у нижој концентрацији (13-30 mg/ml) (Korhonen, 1977). Поред имуноглобулина представља најзначајнију антимикуробну компоненту колострума, током чијег трајања се његова примарна улога огледа у заштити интестиналног тракта младунчета од бактеријске инфекције. Осим исте улоге у млеку, његова функција се састоји и у спречавању бактеријске контаминације млечне жлезде током трајања лактације (Floris и сар., 2003).

Да би лактопероксидаза могла да испољи своју антимикуробну активност, неопходно је да у супстрату постоје довољне количине водоник-пероксида и тиоцијаната. Наиме, овај ензим користи водоник-пероксид за оксидацију SCN^- (или у ређим случајевима халогенида (J, Br⁻), захваљујући чему се у супстрату формирају крајњи производи са јаким антимикуробним својствима. Дакле, лактопероксидаза систем се састоји од три примарне компоненте: самог ензима, водоник-пероксида и тиоцијаната. Антимикуробним дејством овог система долази до нарушавања структуре цитоплазматске мембране бактеријских ћелија, што за последицу има повећање њене пропустљивости и губитак јона калијума, аминокиселина и ћелијских пептида кроз оштећења на мембрани (Clare и сар., 2003; Floris и сар., 2003). Водоник пероксид може у супстрату да буде формиран ендогено. Многи припадници рода

Lactobacillus, *Lactococcus* и *Streptococcus* под анаеробним условима имају способност продукције довољних количина овог једињења, неопходних за активацију лактопероксидаза система. Иако водоник-пероксид може бити додат директно у млеко, у пракси је утврђено да се у случају ендogene генерације водоник-пероксида (што се може постићи додавањем глукозне оксидазе и глукозе) добија много одрживији инхибиторни ефекат. Трећа компонента—тиоцијанатни јон (SCN^-) је широко распрострањена у животињском ткиву и излучевинама. Ниво овог јона такође зависи од исхране. Глукозинолати и цијаногени глукозиди представљају два главна извора овог јона. Лактопероксидаза систем делује против широке лепезе микроорганизама, укључујући и Грам позитивне и Грам негативне бактерије, али су генерално анаеробне бактерије осетљивије на његово антимикуробно дејство у поређењу са аеробним бактеријама. Према подацима из литературе овај антимикуробни систем је посебно ефикасан према *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, као и према неколико врста рода *Streptococcus* (Floris и сар., 2003).

2.6.3. Лизозим

Лизозим је добро познат, снажан антибактеријски протеин, широко распрострањен у различитим биолошким ткивима и флуидима, укључујући птичја јаја, биљке, бактерије и животињске секрете (сузе, пљувачка, млеко итд.). Беланце кокошијег јајета (1-3 g/l), хумано (0,4 g/l) и кобиље млеко (0,4-1 g/l) представљају посебно богате изворе овог протеина. Концентрација лизозима у крављем млеку (0,13 mg/l) је око 3000 пута мања у односу на хумано млеко (Floris и сар., 2003). Према литературним наводима садржај лизозима у млеку магарице се налази у интервалу од 1 до 4 g/l (Coppola и сар., 2002; Vincenzetti и сар., 2008). Лизозим је главна протеинска фракција сурутке хуманог млека, која значајно доприноси његовој антибактеријској активности. Због велике варијабилности у пореклу, структури, антигенским, хемијским и ензиматским својствима, лизозими се класификују у различите класе, односно типове. Најпознатији и највише испитиван је конвенционални или *c*-лизозим (*chicken type*) добијен из беланца јајета домаће кокошке (*Gallus gallus*). Иако се *c*-лизозим комерцијално добија из беланца кокошијег јајета, он је такође изолован из различитих ткива и секрета сисара

укључујући млеко, пљувачку, сузе, урин, респираторне и цервикалне излучевине. Осим овог, познати су и други типови лизозима: *g*-тип, први пут изолован из беланца јајета домаће гуске (*Anser anser*), затим *h*-тип из биљака, *i*-тип из бескичмењака, *b*-тип из бактерија (*Bacillus* sp.) и *v*-тип из вируса (Benkerroum, 2008). Лизозими из различитих извора поседују различите спектре антибактеријског деловања и различите специфичности у погледу везивања за различите типове мукополисахарида (Floris и сар., 2003).

Лизозим припада фамилији ензима који антимикуробно делују тако што раскидају β -1,4 гликозидне везе између N-ацетилмураминске киселине и N-ацетилглукозамина. у пептидогликану ћелијског зида бактерија (Clare и сар., 2003; Floris и сар., 2003). За разлику од других протеина сурутке хуманог млека (као што је лактоферин) чији се садржај смањује током лактације, садржај лизозима у хуманом млеку током лактације расте (Floris и сар., 2003). Највише изучаван и комерцијално присутан на тржишту је лизозим беланца кокошијег јајета, чија је антибактеријска активност усмерена првенствено према Грам позитивним бактеријама, док су Грам негативне бактерије мање осетљиве на његово дејство, захваљујући својој спољашњој мембрани (Floris и сар., 2003). Са друге стране лизозим млека, осим што је активан према широком спектру Грам позитивних бактерија, поседује антибактеријску активност и према неким Грам негативним бактеријама које су у потпуности отпорне на дејство лизозима из беланца јајета. Ове разлике у антибактеријском дејству би могле бити последица различите структуре лизозима из млека и беланца јајета. Наиме, иако је секвенца лизозима из хуманог млека великим делом хомологна са секвенцом лизозима из беланца јајета, њихове терцијарне структуре се значајно разликују, па је тако хидрофобност лизозима из хуманог млека много већа (Floris и сар., 2003). Постоје извештаји о антибактеријском дејству лизозима хуманог млека на *Pseudomonas fragi*, као и о његовом инхибиторном дејству, у смислу успоравања раста, на *S. aureus* и у мањој мери на непатогени сој *E. coli*. Лизозим беланца кокошијег јајета лизира неколико патогених бактерија и бактерија изазивача кварења намирница, као што су *L. monocytogenes*, затим поједини сојеви *Clostridium botulinum*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Clostridium tyrobutyricum* и *Bacillus stearothermophilus* (Floris и сар., 2003). Осим антибактеријске активности лизозими поседују многе друге функције, укључујући активацију имуних ћелија, инактивацију

неких врста вируса, побољшање антибиотског деловања, а такође испољавају противупалне, антихистаминске и антитуморне активности (Floris и сар., 2003).

2.6.4. Лактоферин

Лактоферин (раније познат под називом лактотрансферин) је гликопротеин, члан трансферин фамилије протеина, који поседује способност везивања и трансфера Fe^{3+} јона (Adlerova и сар., 2008). Због те своје особине у природи егзистира у виду мешавине две форме: једне слободне од гвожђа (апо-лактоферин) и друге која садржи један или два везана јона гвожђа (холо-лактоферин) (Barbioli и сар., 2012). Његово присуство је утврђено у већини егзокриних секрета сисара (млеку, сузама, назалном ексудату, сперми, плазми), као и у секундарним гранулама неутрофила (Clare и сар., 2003; Floris и сар., 2003). Данас се лактоферин сматра једним од најзначајнијих одбрамбених протеина млека. Хумано млеко (1-2 g/l) и колострум (5-10 g/l) су богати лактоферином, док у крављем млеку овај протеин егзистира у релативно малим концентрацијама (0,02-0,3 g/l). Крављи колострум, у поређењу са млеком, поседује значајно веће количине лактоферина (2-5 g/l). Лактоферин чини око 4,8% од укупних протеина сурутке у млеку магарице (Salimei и сар., 2004). Овај протеин има много структурних и функционалних сличности са трансфериним, гвожђе-транспортним гликопротеином крвне плазме, од којег има 300 пута већи афинитет ка везивању јона гвожђа (Uniaske-Lowe и сар., 2010). Лактоферин је отпоран на дигестију трипсином и хемотрипсином, па стога у парцијално деградираној форми преживљава пролазак кроз гастроинтестинални тракт. Осим антимикробне активности, овај протеин поседује и антивиралну, антифунгалну, антиупалну активност, као и имуномодулаторна својства (Floris и сар., 2003). Чињеница да је концентрација овог протеина у свим биолошким флуидима највећа за време упале или вирусне инфекције, говори у прилог томе да овај протеин генерално има важну улогу у заштити организма (Floris и сар., 2003; Adlerova и сар., 2008). Бактериостатска својства лактоферина према Грам позитивним и Грам негативним бактеријама, укључујући *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus stearothermophilus* и *Bacillus subtilis*, су међу првим потврђеним карактеристикама овог протеина (Floris и сар., 2003). Крављи и хумани лактоферин је такође показао и

значајну антибактеријску активност према *Helicobacter pylori* (Floris и сар., 2003). Иако се већина извештаја о антимикумној активности лактоферина односи на крављи и хумани лактоферин, постоји уврежено мишљење да су ти резултати примењиви и на лактоферин других врста. Међутим, неке прелиминарне студије су показале снажнију антибактеријску активност козијег лактоферина у поређењу са крављим. Утврђено је постојање више различитих механизма антимикумне активности лактоферина, али се она најчешће доводи у везу са његовом способношћу везивања јона гвожђа (Floris и сар., 2003). Везивањем два јона гвожђа по једном свом молекулу лактоферин га чини недоступним за бактерије, а управо је гвожђе један од есенцијалних фактора раста бактерија.

2.6.5. β -лактоглобулин

β -лактоглобулин је типичан глобуларни протеин молекулске масе од око 18 kDa. То је главни протеин сурутке већине преживара (2-3 g/l), који у хуманом и камиљем млеку није детектован (Uniacke-Lowe и сар., 2010; Chaneton и сар., 2011). Садржај β -лактоглобулина у млеку магарице износи око 3,75 g/l (Vincenzetti и сар., 2008). Овај протеин синтетишу секреторне епителијалне ћелије млечне жлезде, под контролом пролактина (Uniacke-Lowe и сар., 2010). На физиолошкој температури и рН вредности крављи β -лактоглобулин егзистира као димер, чији мономер се састоји од 162 аминокиселинска остатка (Chaneton и сар., 2011). Постоје различите генетске варијанте овог протеина, од којих су најзаступљеније А и Б, које се међусобно разликују само по врсти аминокиселинског остатка на позицијама 64 и 118 у аминокиселинском ланцу (Farrell и сар., 2004). Изоловане су две изоформе кобиљег β -лактоглобулина (I и II), које се састоје од 162 и 163 аминокиселинска остатка. Додатна аминокиселина у изоформи II је резидуа глицина уметнута након позиције 116 (Uniacke-Lowe и сар., 2010). Многе биолошке функције су приписане β -лактоглобулину, укључујући транспорт ретинола и масних киселина, побољшање дигестије липида и пренос пасивног имунитета (Chaneton и сар., 2011). β -Лактоглобулин кобиљег млека нема способност транспорта масних киселина (Uniacke-Lowe и сар., 2010). Протеолитичком дигестијом крављег β -лактоглобулина под дејством трипсина настају 4 пептида која садрже следеће фрагменте овог протеина: 15-20, 25-40, 78-83 и 92-100. Они су негативно наелектрисани, па је стога

њихово антибактеријско дејство ограничено на Грам позитивне бактерије (Pellegrini и сар., 2001). Поред антибактеријског дејства пептида насталих дигестијом β -лактоглобулина, постоје извештаји и о антибактеријском дејству интактног крављег β -лактоглобулина према *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus uberis*, главним изазивачима маститиса код крава (Chaneton и сар., 2011).

2.6.6. α -лакталбумин

α -лакталбумин (14 kDa) је мали глобуларни калцијум метало-протеин који се у хуманом, крављем, козијем, овчијем, кобиљем и камиљем млеку, као и у млеку магарике, састоји од 123 аминокиселинска остатка и у погледу структуре је хомолог *c*-лизозиму (Brew, 2003; Uniacke-Lowe и сар., 2010). Игра регулаторну улогу у синтези лактозе. α -лакталбумин у крављем млеку постоји у две, а могуће и у три генетске варијанте, док су из хуманог млека изолована два генетска облика овог протеина. α -лакталбумин кобиљег млека постоји у три генетске варијанте: А, Б и Ц, које се међусобно разликују само по неколико аминокиселина (Uniacke-Lowe и сар., 2010). Постоје извештаји о антимикуробном дејству пептида насталих протеолитичком дигестијом α -лакталбумина под дејством трипсина и химотрипсина. Ови фрагменти протеина су активни према Грам позитивним бактеријама, док слабо дејство имају према Грам негативним бактеријама (Pellegrini и сар., 1999; Lopez-Exposito, 2006).

3. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОД РАДА

Експериментални део ове докторске дисертације урађен је у Научном институту за прехранбене технологије у Новом Саду, Универзитета у Новом Саду.

3.1. Узорковање

Узорци млека магарице за испитивање микробиолошког квалитета сакупљани су од појединачних животиња које су биле на мужи у Специјалном резервату природе „Засавица“, у периоду од октобра 2011. до јуна 2013. године. Узорковање је вршено једном месечно, изузев у октобру, новембру и децембру 2012. године, када је узорковано два пута, почетком и крајем месеца. Током 21 месеца трајања експеримента, за испитивање микробиолошке слике млека магарице сакупљено је укупно 137 узорака млека од 33 различите магарице старости од 3 до 7 година. Животиње које су мужене биле су доброг физичког стања, без видљивих знакова болести или одступања у исхрани и понашању. Магарице су током истраживања биле у периоду од 75-ог до 210-ог дана лактације. Млеко је било ручно мужено од стране радника запосленог у специјалном резервату природе „Засавица“, након извршеног прања вимена водом, без употребе дезинфицијенса. Узорци су појединачно сакупљани у стерилне посуде, шифрирани и одмах одлагани у ручни фрижидер са хлађењем (Evermed, Италија), у којем су транспортовани до лабораторије. У микробиолошкој лабораторији Научног института за прехранбене технологије, од одабраних узорака млека су под асептичним условима одвајани аликвоти намењени испитивању антимикуробне активности, као и одређивању садржаја калцијума, лизозима, лактоферина и масних киселина, и замрзавани на -20 °С. Испитивање микробиолошке слике млека вршено је одмах по приспећу узорака у лабораторију, односно након одвајања поменутих аликвота. Узорци млека су на -20 °С чувани до момента испитивања. Време чувања узорака млека на -20 °С ни у једном случају није било дуже од 10 месеци.

3.2. Испитивање микробиолошког квалитета сировог млека магарице

3.2.1. Методе за испитивање микробиолошке слике сировог млека магарице

Микробиолошка слика 137 узорака сировог млека магарице сакупљених у периоду од октобра 2011. до јуна 2013. године, испитана је применом стандардних метода:

- Хоризонтална метода за одређивање броја микроорганизама - Техника бројања колонија на 30 °C (SRPS EN ISO 4833:2008);
- Хоризонтална метода за одређивање броја квасаца и плесни - Део 1: Техника бројања колонија у производима са активношћу воде већом од 0,95 (ISO 21527-1:2008);
- Хоризонтална метода за одређивање броја β -глукуронидаза позитивне *Escherichia coli* - Део 2: Техника бројања колонија на 44 °C помоћу 5-бромо-4-хлоро-3-индолил β -D-глукуронида (SRPS ISO 16649-2:2008);
- Хоризонтална метода за откривање и одређивање броја *Enterobacteriaceae* - Део 2: Метода бројања колонија (SRPS ISO 21528-2:2009);
- Хоризонтална метода за откривање *Salmonella* spp. (SRPS EN ISO 6579:2008);
- Хоризонтална метода за одређивање броја сулфиторедукујућих бактерија које расту под анаеробним условима (ISO 15213:2003);
- Број аеробних спорогених бактерија („Сл. лист СФРЈ“, бр. 25/80);
- Хоризонтална метода за одређивање броја коагулаза позитивних стафилокока (*Staphylococcus aureus* и друге врсте). - Део 1: Техника употребом агара по Берд-Паркеру (SRPS EN ISO 6888-1:2008);
- Хоризонтална метода за одређивање броја суспектног *Bacillus cereus* - Техника бројања колонија на 30 °C (SRPS EN ISO 7932:2008);
- Хоризонтална метода за одређивање броја мезофилних бактерија млечне киселине - Техника бројања колонија на 30 °C (BS ISO 15214:1998);
- Хоризонтална метода за откривање и одређивање броја *Listeria monocytogenes* - Део 1: Метода откривања (SRPS EN ISO 11290-1:2010);
- Хоризонтална метода за одређивање броја колиформа - Техника бројања колонија (ISO 4832:2006).

У 2011, 2012. и 2013. години су извршена по три одвојена експеримента са збирним млеком магарице, у оквиру којих су свакодневно праћене промене његовог микробиолошког квалитета током 6 дана складиштења на +4 °С. Применом горе наведених стандардних метода једном дневно је одређиван број микроорганизама, квасаца и плесни, β-глукуронидаза позитивне *Escherichia coli*, аеробних спорогених бактерија, коагулаза позитивних стафилокока и суспектног *Bacillus cereus*, уз утврђивање присуства *Salmonella* spp. и *Listeria monocytogenes*. Одређивање броја Enterobacteriaceae, колиформних бактерија и *Clostridium perfringens* у збирним узорцима млека магарице је током 6 дана складиштења на +4 °С извршено применом стандардних метода:

- АОАС. (2003). Одређивање броја Enterobacteriaceae у одабраним намирницама. Званична метода 2003.01. *Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemists.*
- АОАС. (2002). Број колиформа у млечним производима. Званична метода 996.02. *Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemists.*
- Хоризонтална метода за одређивање броја *Clostridium perfringens* - Техника бројања колонија (ISO 7937:2004).

3.3. Испитивање антибактеријске активности млека магарице

3.3.1. Тест микроорганизми

За испитивање антибактеријске активности млека магарице коришћени су следећи бактеријски сојеви:

- *E. coli* ATCC 10536,
- *E. coli* ATCC 8739,
- *S. Enteritidis* ATCC 13076,
- *S. Typhimurium* ATCC 14028,
- *S. aureus* ATCC 25923,
- *L. monocytogenes* ATCC 19111,
- *K. pneumoniae* – клинички изолат.

Одабрани сојеви *E. coli*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. aureus* и *L. monocytogenes* припадају америчкој колекцији бактеријских култура. Сојеви су комерцијално набављени у лиофилизованом стању и до момента активирања чувани у фрижидеру. Након отварања паковања, припремане су субкултуре у складу са упутствима произвођача и складиштене на косом хранљивом агару (*Himedia*, Индија) у фрижидеру на +4 °С. Једном недељно су културе освежаване пресејавањем на нови коси хранљиви агар (*Himedia*, Индија), да би након истека једног месеца оне биле безбедно уклањане. После тога, отворано је ново комерцијално паковање и претходно описани поступак је понављан. Радне културе су припремане од припадајућих субкултура засејавањем на хранљиви агар (*Himedia*, Индија) и инкубирањем на 37 °С, током 18-24 сата.

K. pneumoniae је клинички изолат набављен из бактеријске колекције Института за јавно здравље Војводине у Новом Саду. Антибактеријска испитивања млека према овом микроорганизму вршена су у периоду од једног месеца, за време којег је култура чувана на косом хранљивом агару (*Himedia*, Индија) у фрижидеру и освежавана једном недељно. Припрема радне културе је урађена на горе описани начин.

3.3.2. Вештачка контаминација узорак млека магарице

Део материјала са радне културе тест микроорганизма је под асептичним условима, помоћу микробиолошке езе, пренесен у епрувету са стерилним сланим раствором и суспендован интензивним мућкањем на вортексу. Густина суспензије је помоћу денситометра (*DEN-1*, *Biosan*, Летонија) подешена тако да одговара вредности 0,5 *McFarland* стандарда. Од основне суспензије тест микроорганизма припремљена је серија децималних разређења у сланом раствору. Одређена запремина инокулата из одговарајућег децималног разређења је засејана у 25 ml млека и хранљивог бујона (*Himedia*, Индија) као позитивне контроле, како би се добили нивои контаминације реда величине 10^2 , 10^3 и 10^4 cfu/ml. Вештачки контаминирани узорци млека су хомогенизовани у стомахер апарату. Сваки узорак млека је одвојено контаминирао појединачним тест микроорганизмом.

3.3.3. Антибактеријски тест

Контаминирани узорци млека магарице различитих нивоа контаминације инкубирани су 4 дана на температури од +9 и +15 °C. Одређивање броја *E. coli*, *S. aureus* и *L. monocytogenes* је вршено на дневном нивоу у складу са стандардним микробиолошким методама (види страну 46), док су промене броја *Salmonella* spp. и *K. pneumoniae* у узорцима млека магарице праћене свакодневним засејавањем узорка на *XLD* (*Himedia*, India) и *VRBG* (*Himedia*, India) агар (Šarić и сар., 2012).

Антибактеријска активност млека магарице на +38 °C је испитивана у узорцима са нивоом контаминације од 10² cfu/ml. Промене броја тест микроорганизама у млеку магарице су праћене сваких сат времена током осам сати инкубирања, применом методе посева. У ту сврху коришћене су следеће микробиолошке подлоге:

- Триптон жучни X-глукуронид (*TBX*) агар (*Himedia*, Индија) (*E. coli*);
- Ксилоза лизин дезоксихолат (*XLD*) агар (*Himedia*, Индија);
(*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*);
- Baird-Parker агар са жуманце телурит емулзијом (*Biokar diagnostics*, Француска) (*S. aureus*);
- Агар за *Listeria* по Ottaviani & Agosti (*ALOA*) (*Himedia*, Индија)
(*L. monocytogenes*);
- Љубичасто црвени жучни агар са глукозом (*VRBG*) (*Himedia*, Индија)
(*K. pneumoniae*).

Неинокулисано млеко магарице коришћено је као негативна, а хранљиви бујон као позитивна контрола.

3.3.4. Утицај концентрације калцијума на антибактеријску активност млека магарице

Испитивање утицаја концентрације калцијума на антибактеријску активност млека магарице према *E. coli* ATCC 10536, *E. coli* ATCC 8739, *S. Enteritidis* ATCC 13076 и *S. Typhimurium* ATCC 14028, извршено је додавањем калцијум-хлорида (CaCl₂) и етилен-диамин-тетра-сирћетне киселине (EDTA) у одабране узорке овог млека.

Одговарајуће концентрације (276,93 mg/l и 553,87 mg/l) CaCl₂ (Centrohem, Србија) додате су у одабране узорке млека магарице ради повећања укупне концентрације калцијума (Ca) у свим узорцима за 100 и 200 mg/l. Потребне количине CaCl₂ су израчунате на бази молекулских маса CaCl₂ и Ca. Позитивна контрола је био хранљиви бујон са додатим CaCl₂. EDTA (*Sigma-Aldrich*, САД) је додата у тестиране узорке у концентрацији од 1,39 g/l. рН млека магарице је подешена на претходну вредност помоћу 0,1 М NaOH (*Lach-Ner*, Чешка).

Испитивање антибактеријске активности узорака млека магарице са додатим CaCl₂ и EDTA је извршено на +38 °С. Узорци су били појединачно контаминирани горе наведеним тест микроорганизмима, са нивоом контаминације од 10² cfu/ml. Промене броја тест микроорганизма у млеку су праћене сваких сат времена током осам сати инкубирања, применом методе посева. У ту сврху коришћене су следеће микробиолошке подлоге:

- Триптон жучни X-глукуронид (TBX) агар (*Himedia*, Индија) (*E. coli*);
- Ксилоза лизин дезоксихолат (XLD) агар (*Himedia*, Индија) (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*).

Као негативна контрола је коришћено неинокулисано млеко магарице, а као позитивна контрола вештачки контаминиран хранљиви бујон у који су претходно додате одговарајуће концентрације CaCl₂.

3.4. Одређивање рН вредности млека

Одређивање рН вредности узорака млека магарице је извршено помоћу портабл рН метра Testo 205 (*Testo AG*, САД), опремљеног са комбинованом електродом са температурном сондом. Пре сваког мерења је извршена калибрација уређаја са стандардним пуферским растворима рН 4 и 7.

3.5. Одређивање садржаја протеинских антимикуробних компонената млека

У одабраним узорцима млека магарице намењеним испитивању антибактеријске активности, одређен је протеински профил, са акцентом на протеине са документованом антимикуробном активношћу (лизозим и лактоферин). Протеински

профил је детерминисан методом аутоматске капиларне електрофорезе (*Lab-on-a-Chip* метода). Узорци су уз извесне модификације припремљени у складу са документованом методом (Tidona и сар., 2011), тако што су растворени у пуферу (0,125 М Tris-HCl, 4% натријум додецил сулфат, 2% глицерол, 2% β-меркаптоетанол, рН 6,8), у односу 1:1,5 (v/v) и загревани на 100 °С, током 5 минута у циљу денатурације присутних протеина. Раздвајање на чипу је урађено помоћу уређаја *Agilent 2100 bioanalyzer* (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA, САД*), користећи *Protein 80 Plus LabChip* кит и одговарајући софтвер (*Protein 80 software assay on 2100 expert software*). Чипови су припремљени у складу са протоколом за *Protein 80 Plus LabChip* кит. Претходно денатурисани узорци млека (4 μl) су измешани са пуфером (2 μl) и са 84 μl дејонизоване воде. Пуфер садржи два унутрашња стандарда - маркера који омогућавају испитивање протеина у опсегу ниских молекулских маса (5-80 kDa). Симултано са претходно припремљеним узорцима млека магарице, на чип се апликује и анализира и смеша протеинских маркера референтних протеина (*ladder*) на основу чијих електрофоретских покретљивости је омогућена идентификација молекулских маса испитиваних подјединица протеина. Резултати електрофорезе на чипу су софтверски представљени на два различита начина: као квантитативни профили и као симулиране фотографије гела. Квалитативна анализа протеина подразумева одређивање молекулских маса раздвојених фракција протеина, а квантитативно одређивање концентрације сваке од дефинисаних протеинских фракција. Фракционисање је засновано на величини молекула, где се на симулираним фотографијама гела на дну прво приказују најмањи молекули, што је у складу са изгледом гела добијеног конвенционалном натријум додецил сулфат електрофорезом на полиакриламидном гелу (*SDS-PAGE*) (Torbica и сар., 2010). Како се овом техником поред квалитативне анализе има увид само у релативне концентрације анализираних протеина, за израду калибрационе криве, а у циљу добијања апсолутних концентрација употребљени су раствори познатих концентрација албумина говеђег серума. Сви узорци су анализирани у три понављања.

3.6. Одређивање садржаја калцијума методом атомске апсорпционе спектрофотометрије

Припрема узорка за одређивање садржаја калцијума у млеку магарице састојала се из разарања органске материје које је извршено у затвореним тефлонским посудама применом микроталаса (*Ethos 1, Milestone*, Италија). За потребе разарања узорка у тефлонску посуду је одмерен 1 ml млека, 7 ml 65% HNO_3 (*Baker*, Холандија) и 1 ml H_2O_2 (*Baker*, Холандија). За проверу чистоће коришћених реагенаса постављена је и слепа проба. Разарање узорка се одвијало у две фазе на 200 °C са 100% снагом микроталаса, где је прва фаза трајала 10, а друга 20 минута.

Након разарања, добијени раствор је квантитативно пренесен у одмерни суд од 25 ml. Овај раствор је потом разблажен 10 пута, при чему су у циљу спречавања јонизације калцијума у узорку, додати цезијум (Cs) и лантан (La).

Одређивање садржаја калцијума у припремљеним узорцима извршено је применом атомске апсорпционе спектрофотометрије (AAS) (*SpectrAA-10, Varian*, Аустралија). Одређивање је вршено на 422,6 nm уз величину отвора од 0,5 mm, у пламену добијеном сагоревањем смесе ацетилена и ваздуха. Раствори стандарда калцијума су били концентрације 0,5; 1; 2; 5; 7 $\mu\text{g/ml}$. Сваки стандард, као и слепа проба садржавали су исту количину Cs и La као и узорак.

Од концентрација калцијума у припремљеном узорку одузета је концентрација калцијума нађена у слепој проби, а концентрација калцијума у млеку је израчуната према једначини (1):

$$C \left(\frac{\text{mg}}{\text{l}} \right) = \frac{c \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) * 25 * 10}{V(\text{ml})} \quad (1)$$

3.7. Одређивање садржаја масних киселина

У узорцима млека магарице предвиђеним за испитивање антибактеријске активности према *S. aureus* и *L. monocytogenes* на 38 °C одређен је садржај масних киселина са акцентом на масне киселине са документованом антибактеријском активношћу

према Грам позитивним бактеријама (линолна киселина (C_{18:2}), лауринска киселина (C_{12:0}) и олеинска киселина (C_{18:1})).

Екстракција масти је уз мање модификације изведена у складу са документованом методом (Navemose и сар., 2004). Маст је из млека магарице (20 ml) екстрахована додатком 40 ml смесе растварача метанол:хлороформ (1:1, v/v). Смеса је снажно мућкана један минут и након тога центрифугирана 10 минута на 3000 о/min. Доња органска фаза која садржи липидну фракцију је одвојена и упарена до сува у струји азота.

Припрема метил естара је изведена уз незнатне модификације према документованој методи (Kravić и сар., 2010). Претходно екстрахована маст из млека магарице је растворена у 2,4 ml хексана. Додато је 0,6 ml раствора калијум хидроксида у метанолу концентрације 2 mol/l. Епрувета је затворена и интензивно мућкана 20 секунди, након чега је остављена један минут у воденом купатилу на 70 °C. После 20 секунди мућкања додато је 1,2 ml хлороводоничне киселине (1 mol/l). Након раздвајања фаза, горња фаза која садржи метил естре масних киселина је коришћена за даљу анализу.

За анализу метил естара масних киселина коришћен је гасни хроматограф HP 5890 (Hewlett-Packard Company, САД) са масено спектрометријским детектором HP 5971А. Раздвајање метил естара масних киселина изведено је применом капиларне колоне SP-2560 (Supelco/Sigma-Aldrich, Немачка) дужине 100 m, унутрашњег пречника 0,25 mm са слојем стационарне ликвидне фазе од 0,20 µm. Као гас носач коришћен је хелијум са константним протоком од 0,58 ml/min. Анализе су изведене применом следећег температурног програма: почетна температура колоне од 100 °C одржавана је 5 минута, након чега је следио пораст температуре брзином од 6 °C/min до коначне температуре од 240 °C која је одржавана наредних 10 минута. Температура ињектора износила је 230 °C, запремина узорка 2,0 µl, а однос раздјеливања 1:30. Применом масене спектрометрије снимљени су укупни јонски хроматограми (SCAN mode) у интервалу m/z 40–400 a.m.u. Квалитативно одређивање изведено је на основу масених спектра и ретенционих времена, а квантитативно у складу са стандардном методом (АОАС 963.22, 2000), при чему је за дефинисање корекционих фактора коришћен стандардни раствор смесе 37 метил естара масних киселина (37 component FAME Mix, 47885-U) (Supelco/Sigma-Aldrich, Немачка).

3.8. Статистичка обрада резултата

Резултати свих мерења су изражени као средње вредности три понављања са наведеним стандардним девијацијама. Подаци су статистички обрађени анализом варијансе помоћу Данкановог теста за поређење вишеструких средњих вредности, користећи програмски пакет STATISTICA 10 (*StatSoft Inc., Tulsa, САД*).

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

У првом делу овог поглавља докторске дисертације приказани су резултати мониторинга микробиолошког квалитета и безбедности сировог млека магарице балканске расе, у оквиру којег је извршено испитивање присуства *Salmonella* spp. и *Listeria monocytogenes*, као и одређивање укупног броја: микроорганизама, квасаца и плесни, β -Д-глукуронидаза позитивних *Escherichia coli*, Enterobacteriaceae, колиформних бактерија, сулфиторедукујућих клостридија, аеробних спорогених бактерија, коагулаза позитивних стафилокока, суспектног *Bacillus cereus* и мезофилних бактерија млечне киселине. Такође су представљени и резултати испитивања микробиолошког квалитета и безбедности овог млека током 6 дана складиштења на +4 °C.

У другом делу поглавља 4, представљени су резултати испитивања антибактеријске активности вештачки контаминираних узорача сировог млека магарице, у којима је претходно одређен садржај лизозима, лактоферина и калцијума применом метода електрофоретског раздвајања протеина на чипу (*Lab-on-a-Chip* метода) и атомске апсорпције. Антибактеријска активност овог млека према изабраним сојевима *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *E. coli* и *K. pneumoniae*, испитивана је у зависности од температуре инкубирања (+9, +15 и +38 °C), почетне контаминације (10^2 , 10^3 и 10^4 cfu/ml) и садржаја лизозима, лактоферина и калцијума. Поред тога, овде су дати и резултати испитивања утицаја концентрације калцијума на антибактеријску активност млека магарице према одабраним сојевима *E. coli*, *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* у вештачки контаминираним узорцима у које је претходно додат CaCl_2 и EDTA.

На крају поглавља 4, приказан је садржај масних киселина у узорцима сировог млека магарице намењеним испитивању антибактеријске активности према Грам позитивним *L. monocytogenes* и *S. aureus* на +38 °C, одређен применом гасне хроматографије уз масену спектрометрију (GC/MS).

4.1. Микробиолошка слика сировог млека магарице

4.1.1. Мониторинг микробиолошког квалитета сировог млека магарице

У истраживањима спроведеним у оквиру ове докторске дисертације, присуство *L. monocytogenes* није утврђено ни у једном од 137 испитаних узорака сировог млека магарице, што је највероватније резултат испуњења основних хигијенских стандарда током muže и поступања са млеком на фарми, као и доброг здравственог стања животиња. Резултати ове докторске дисертације били су у сагласности са извештајима других аутора (Conte и сар., 2006; Alberghini и сар., 2012; Sarno и сар., 2012; Cavallarin и сар., 2015), који у млеку магарице такође нису доказали присуство *L. monocytogenes*. Осим у млеку магарице, присуство овог патогена, према расположивим литературним подацима није доказано ни у кобиљем млеку (Salimei и Fantuz, 2012). Међутим, у потпуности је другачија ситуација у погледу присуства *L. monocytogenes* у сировом млеку конвенционалних млечних врста, где се ова бактерија много чешће детектује у поређењу са другим патогеним бактеријама (Claeys и сар., 2013). Литературни извори новијег датума говоре о томе да је од 2,2 до 10,2% испитаних узорака сировог крављег млека у ЕУ било позитивно на *L. monocytogenes* (Claeys и сар., 2013). Присуство овог патогена је потврђено у 5,8% узорака сировог крављег млека сакупљеног са 27 фарми из Нормандије (Desmaures и сар., 1997). Сличан тренд је забележен и у САД, где је од 861-ог узорка сировог крављег млека, прикупљеног са подручја двадесет једне државе, *L. monocytogenes* изолована из 5,6% (Van Kessel, 2004).

Без обзира на потврђену патогеност значај *L. monocytogenes* у погледу обољења људи изазваних конзумирањем сировог млека је релативно мали (Claeys и сар., 2013). Један од разлога за то је чињеница да је раст овог патогена у сировом млеку лимитиран компетитивном микробиотом, а други да до појава листериоза долази при релативно високим инфективним дозама (Claeys и сар., 2013). Инфективна доза за здраве индивидуе износи од 10^7 до 10^9 виабилних бактеријских ћелија, а за високоризичне групе од 10^5 до 10^7 ћелија унетих храном у организам (Farber и сар., 1996). Уколико би се дневно конзумирала једна шоља овог млека (200 ml), колико је субјектима током једног истраживања било дневно сервирано (Amati и сар., 2010), концентрација *L. monocytogenes* у овом млеку, потребна да дође до појаве листериозе, требало би да буде од 50 000 - 5 000 000 cfu/ml за здраве одрасле особе, односно 500 - 50 000 cfu/ml за ризичне групе. У складу са тим, Међународна комисија за микробиолошке спецификације за храну (ICMSF) толерише одређено присуство *L. monocytogenes* у храни, односно закључила је да се храна може

сматрати безбедном за конзументе који не спадају у ризичне групе уколико број *L. monocytogenes* у храни у моменту конзумирања не прелази 100 cfu/g (Јау и сар., 2005).

Неке земље су дефинисале законске лимите у погледу броја *L. monocytogenes* који је дозвољен у храни, посебно у производима спремним за конзумирање, док су друге у водичима или смерницама само сугерисале критеријуме прихватљивости који нису обавезујући (Јау и сар., 2005). У законским прописима САД-а постоји нулта толеранција на присуство овог патогена у храни (Јау и сар., 2005), за разлику од ЕУ која је присуство и број *L. monocytogenes* у намирницама дефинисала Регулативом ЕС 2073/2005. Према овој Регулативи присуство *L. monocytogenes* није дозвољено у храни за бебе и намирницама намењеним за медицинске сврхе, док у храни спремној за конзумирање која подржава раст *L. monocytogenes*, број *L. monocytogenes* за време рока трајања не сме да буде већи од 100 cfu/g.

Правилник о општим и посебним условима хигијене хране у било којој фази производње, прераде и промета („Службени гласник РС“, број 72/2010) у сагласности је са европском Регулативом ЕС 2073/2005, с обзиром на то да је према њему у намирницама које подржавају/не подржавају раст *L. monocytogenes*, за време рока трајања, дозвољено до 100 cfu/g овог патогена. Иако у српском Правилнику (као и у Регулативи ЕС 2073/2005) не постоје микробиолошки критеријуми за сирово млеко намењено директном конзумирању, оно би се у овом контексту могло подвести под групу намирница спремних за конзумирање. Према овом Правилнику храна спремна за конзумирање јесте храна коју је произвођач или прерађивач наменио за исхрану људи без потребе за топлотном или неком другом обрадом. У том случају, сви узорци млека магарице испитани у овој докторској дисертацији, задовољавају захтеве српског Правилника, као и европске Регулативе ЕС 2073/2005, односно могу да се сматрају безбедним за конзумирање без претходне топлотне обраде у погледу присуства и броја *L. monocytogenes*.

Осим *L. monocytogenes*, у испитаним узорцима млека магарице није утврђено присуство *Salmonella* spp., као ни *E. coli*. Такође, број Enterobacteriaceae и колиформних бактерија је у свим узорцима овог млека био испод границе детекције (<1 cfu/ml).

Одсуство *Salmonella* spp. у анализираним узорцима млека магарице могло би да упућује на то да је мужа спроведена под задовољавајућим хигијенским условима, као и да је млеко било сакупљано од здравих животиња. Упркос томе што млеко, генерално, представља погодну средину за раст и умножавање *Salmonella* spp. (Marco и Wells-Bennik, 2008), присуство ових патогена у млеку магарице није детектовано ни у једном испитивању спроведеном од стране других аутора (Conte и сар., 2006; Zhang и сар., 2008; Alberghini и сар., 2012; Sarno и сар., 2012; Cavallarin и сар., 2015). Међутим, налази у погледу присуства *Salmonella* spp. у млеку конвенционалних млечних врста су нешто другачији. Наиме, према литературним наводима присуство *Salmonella* spp. је било потврђено у 3 до 6% испитаних узорака сировог крављег млека (Porre, 2011). Број ових бактерија је износио у просеку око 2,3 log cfu/ml, мада су забележени и случајеви када је њихов број достигао и 5,0 log cfu/ml (Porre, 2011). Од 930 анализираних узорака сировог крављег млека у Малезији, *Salmonella* spp. је била детектована у 13 узорака (1,4%), док је у САД-у 2,6% од укупно 861-ог испитаног узорка сировог крављег млека било позитивно на *Salmonella* spp. (Chye и сар., 2004; Van Kessel, 2004). У истраживању спроведеном на 96 узорака сировог козијег и овчијег млека, 2,1% тестираних узорака је било позитивно на *Salmonella* spp. (Oliveira и сар., 2011).

У овој докторској дисертацији колиформне бактерије, укључујући и *E. coli* нису детектоване ни у једном испитаном узорку млека магарице (<1 cfu/ml). Извор ових индикатора фекалне контаминације сировог млека је најчешће простирка, а вектор преноса је површина вимена животиње или руке радника (Chambers, 2002). У расположивој литератури се не могу пронаћи подаци о броју колиформних бактерија на површини вимена магарица, али су они доступни за краве музаре. Наиме, број колиформних бактерија на вимену крава ретко прелази 100 ћелија, иако оне чине највећи део микропопулације простирке (Chambers, 2002). Разлог томе је највероватније немогућност њиховог дужег опстанка на кожи вимена (Chambers, 2002). Постоји велика вероватноћа да је сличан случај и са колиформним бактеријама на површини вимена магарица, чиме би се делимично могла објаснити добра микробиолошка слика овог млека у погледу присуства и броја колиформних бактерија. Међутим, број ових микроорганизама у простирци је лети вишеструко већи, па је у том периоду већа могућност контаминације млека током муже (Chambers, 2002). То је посебно значајно уколико се млеко сакупља од животиња

које се лети држе у штали и не изводе на испашу. Како је већ претходно поменуто, у специјалном резервату природе „Засавица“ пракса је да се магарице током зиме не пуштају на испашу, већ се без обзира на годишње доба, држе у штали. Будући да је млеко магарице узорковано и у летњем периоду 2012. и у јуну 2013. године, било је за очекивати да у узорцима сакупљеним током лета буду детектоване колиформне бактерије. Међутим, то није био случај, па се може претпоставити да одсуство колиформних бактерија у млеку магарице није само резултат добре хигијенске праксе, већ и неких специфичности овог млека.

E. coli је патоген који је често присутан у сировом млеку конвенционалних млечних врста, што генерално важи и за друге колиформне бактерије и фамилију Enterobacteriaceae. У 99% од 273 испитана узорка сировог крављег млека, утврђени број *E. coli* је био мањи од 2,0 log cfu/ml, док је у једном узорку број овог патогена био већи од 4,0 log cfu/ml (Hill и сар., 2012). У другом истраживању, 65% тестираних узорака сировог крављег млека било је позитивно на *E. coli* (Chye и сар., 2004). Средња вредност броја *E. coli* у тим узорцима је била између 3 и 4 log cfu/ml. У преко 100 обрађених узорака сировог крављег млека, сакупљеног са малих фарми у Турској, просечна вредност броја *E. coli* је износила 2 log cfu/ml, док је утврђен максимални број овог микроорганизма био око 5,7 log cfu/ml (Tasci, 2011). У истим узорцима млека забележена је средња вредност Enterobacteriaceae и колиформних бактерија од 4,48 и 4,3 log cfu/ml, док су максималне вредности броја ових група микроорганизма износиле 7,9 и 7,6 log cfu/ml. Колиформне бактерије су у 62,3% испитаних узорака сировог крављег млека са подручја САД-а биле присутне у броју од 0 до 4,7 log cfu/ml (Jayarao и Wang, 1999). Други извештаји говоре о томе да је чак 95% испитаних узорака сировог крављег млека из 21 америчке државе било контаминирано колиформним бактеријама (Van Kessel, 2004). У сировом крављем млеку са подручја Судана просечан број колиформних бактерија био је 5,89 log cfu/ml, односно 9,38 log cfu/ml, у зависности од тога да ли је млеко сакупљано у зимском или летњем периоду (El Zubeir и Ahmed, 2007). У истим узорцима забележен је сличан просечан број Enterobacteriaceae (5,92 и 9,38 log cfu/ml).

У студији спроведеној у Швајцарској, Enterobacteriaceae су биле детектоване у 61,6% од 344 испитана узорка сировог козијег млека и у 71,4% од укупно 63 анализирана узорка сировог овчијег млека (Muehlherr и сар., 2003). Њихова средња вредност у

козијем млеку је била 5,72 log cfu/ml, а у овчијем 3,93 log cfu/ml (Muehlherr и сар., 2003). У претходним истраживањима сировог овчијег млека из Шпаније, утврђен је просечан број Enterobacteriaceae у вредности од 2,64 log cfu/ml (Gaya и сар., 2008), где је *E. coli* чинила 47,5% од укупно изолованих бактеријских врста из фамилије Enterobacteriaceae. Број колиформних бактерија у сировом козијем млеку са подручја Грчке, Португала, Француске и Бразила, кретао се у интервалу од 2,14 до 6,4 log cfu/ml (Morgan и сар., 2002; Oliveira и сар., 2011).

За разлику од резултата добијених у овој дисертацији, други истраживачи су у малом проценту испитаних узорака сировог млека магарице констатовали присуство *E. coli*, али увек у ниском нивоу контаминације. Сходно томе, *E. coli* је била детектована у млеку 3 од укупно 30 испитаних животиња (Conte и сар., 2006), где се налазила у интервалу од 1,43 до 2 log cfu/ml, док је у микробиолошком испитивању млека, које је обухватило 86 различитих магарица, била детектована у само једном узорку (Alberghini и сар., 2012). Слично је и са малобројним извештајима других аутора, везаним за појаву и бројност Enterobacteriaceae и колиформних бактерија у млеку магарице. Према ретким литературним подацима, број Enterobacteriaceae у млеку магарице био је опсегу од 0,68 до 3,2 log cfu/ml (Coppola и сар., 2002; Chiavari и сар., 2005; Sarno и сар., 2012), док су колиформне бактерије биле или испод нивоа детекције (Chiavari и сар., 2005) или присутне у малом броју (од 1 до 2,85 log cfu/ml) (Coppola и сар., 2002; Chiavari и сар., 2005; Conte и сар., 2006; Zhang и сар., 2008).

Резултати испитивања укупног броја микроорганизама, броја бактерија млечне киселине и броја коагулаза позитивних стафилокока у узорцима сировог млека магарице, сакупљеним од октобра 2011. до јуна 2013. године, приказани су у Табелама 5-8.

Иако се УБМ у млеку магарице кретао у интервалу од $0,8 \pm 0,1$ до $4,6 \pm 0,02$ log cfu/ml, само је шест од 137 испитаних узорака млека (4,38%) имало број микроорганизама већи од 4 log cfu/ml, док је у пет узорака (3,65%) овај број је био мањи од 1,0 log cfu/ml. Од укупно испитаних узорака, 85,41% је имало УБМ мањи од 2,5 log cfu/ml.

Табела 5. Укупан број микроорганизама (УБМ), број бактерија млечне киселине (БМК) и број коагулаза позитивних стафилокока (КПС) у сировом млеку магарице (октобар - децембар 2011)

Период узорковања	Шифра узорка	УБМ	БМК	КПС
Октобар	1	1,30 (0,02)	0,67 (0,06)	н.д.
	2	1,42 (0,09)	0,90 (0,05)	н.д.
	3	4,28 (0,01)	2,54 (0,01)	н.д.
	4	1,80 (0,02)	1,26 (0,04)	1,09 (0,08)
	5	2,25 (0,01)	0,95 (0,05)	н.д.
	6	2,64 (0,04)	1,45 (0,02)	1,06 (0,10)
	7	4,60 (0,02)	2,52 (0,01)	н.д.
Новембар	8	4,40 (0,02)	2,45 (0,02)	н.д.
	9	2,48 (0,02)	1,72 (0,02)	1,00 (0,07)
	10	1,38 (0,08)	0,86 (0,03)	н.д.
	11	2,05 (0,02)	1,23 (0,17)	1,02 (0,12)
	12	4,22 (0,02)	2,27 (0,02)	н.д.
	13	0,90 (0,10)	1,04 (0,04)	н.д.
	14	1,22 (0,00)	0,59 (0,11)	н.д.
Децембар	15	1,18 (0,15)	0,82 (0,04)	н.д.
	16	3,42 (0,02)	2,16 (0,01)	1,50 (0,04)
	17	2,00 (0,01)	0,97 (0,07)	1,12 (0,03)
	18	1,49 (0,05)	0,88 (0,06)	н.д.
	19	2,21 (0,03)	1,46 (0,01)	1,56 (0,01)
	20	1,65 (0,04)	0,94 (0,12)	1,00 (0,04)

Резултати су изражени у \log cfu/ml и представљају средњу вредност три понављања. Стандардна девијација резултата је дата у заградама. н.д - није детектовано.

Број аеробних мезофилних бактерија у сировом млеку магарице у извештајима других аутора варира од 1,08 до 4,7 \log cfu/ml (Coppola и сар., 2002; Salimei и сар., 2004; Chiavari и сар., 2005; Zhang и сар., 2008; Alabico и сар., 2009; Ivanković и сар., 2009; Pilla и сар., 2010; Sorrentino и сар., 2010; Alberghini и сар., 2012; Sarno и сар., 2012), мада постоје и извештаји који говоре о броју ових микроорганизама већем од 5 \log cfu/ml (Conte и сар., 2006). Варирања броја аеробних мезофилних бактерија су највероватније последица различите хигијенске праксе током muže и даљег поступања са млеком на фарми.

Табела 6. Укупан број микроорганизама (УБМ), број бактерија млечне киселине (БМК) и број коагулаза позитивних стафилокока (КПС) у сировом млеку магарице (јануар - септембар 2012)

Период узорковања	Шифра узорка	УБМ	БМК	КПС
Јануар	21	1,17 (0,00)	0,90 (0,15)	н.д.
	22	1,84 (0,00)	1,70 (0,04)	н.д.
	23	2,28 (0,02)	1,65 (0,03)	1,36 (0,07)
	24	1,18 (0,15)	0,50 (0,17)	н.д.
	25	2,66 (0,02)	0,83 (0,13)	1,70 (0,02)
Фебруар	26	2,42 (0,03)	1,38 (0,02)	1,64 (0,03)
	27	2,98 (0,01)	1,25 (0,10)	1,73 (0,04)
	28	1,31 (0,05)	0,90 (0,00)	н.д.
	29	1,50 (0,04)	0,77 (0,07)	н.д.
	30	0,90 (0,20)	0,81 (0,13)	н.д.
Март	31	1,20 (0,10)	1,16 (0,08)	н.д.
	32	2,53 (0,04)	2,13 (0,01)	1,09 (0,05)
	33	1,54 (0,00)	0,97 (0,03)	н.д.
Април	34	2,08 (0,02)	0,92 (0,03)	1,23 (0,05)
	35	1,79 (0,05)	1,21 (0,14)	н.д.
	36	2,37 (0,00)	2,31 (0,03)	1,35 (0,04)
	37	1,47 (0,02)	1,40 (0,00)	н.д.
Мај	38	2,40 (0,01)	1,41 (0,04)	1,22 (0,05)
	39	2,11 (0,01)	1,24 (0,06)	1,06 (0,10)
	40	1,25 (0,07)	1,16 (0,05)	н.д.
	41	1,61 (0,04)	1,33 (0,01)	н.д.
Јун	42	2,05 (0,00)	1,37 (0,08)	1,12 (0,05)
	43	0,80 (0,10)	0,75 (0,00)	н.д.
	44	1,56 (0,05)	1,23 (0,05)	н.д.
	45	1,79 (0,05)	1,31 (0,01)	1,08 (0,11)
	46	3,34 (0,01)	2,22 (0,02)	2,49 (0,01)
	47	2,07 (0,02)	1,62 (0,03)	1,09 (0,09)
Јул	48	4,61 (0,02)	2,16 (0,01)	2,50 (0,00)
	49	2,48 (0,03)	1,57 (0,02)	1,37 (0,05)
	50	2,43 (0,04)	1,36 (0,07)	1,14 (0,09)
	51	1,17 (0,00)	0,93 (0,08)	н.д.
	52	1,44 (0,06)	1,38 (0,06)	н.д.
	53	1,47 (0,05)	1,16 (0,08)	н.д.
	54	1,74 (0,04)	0,92 (0,08)	н.д.
	55	1,63 (0,02)	0,84 (0,06)	н.д.
Август	56	1,52 (0,02)	0,50 (0,20)	н.д.
	57	1,39 (0,01)	1,24 (0,06)	н.д.
Септембар	58	1,40 (0,00)	0,32 (0,00)	н.д.
	59	1,01 (0,02)	1,20 (0,03)	н.д.
	60	1,45 (0,00)	1,37 (0,08)	н.д.
	61	1,30 (0,05)	0,75 (0,10)	н.д.
	62	1,66 (0,02)	0,85 (0,15)	н.д.

Резултати су изражени у $\log \text{cfu/ml}$ и представљају средњу вредност три понављања. Стандардна девијација резултата је дата у заградама. н.д - није детектовано.

Табела 7. Укупан број микроорганизама (УБМ), број бактерија млечне киселине (БМК) и број коагулаза позитивних стафилокока (КПС) у сировом млеку магарице (октобар - децембар 2012)

Период узорковања	Шифра узорка	УБМ	БМК	КПС
Октобар	63	1,68 (0,19)	1,10 (0,02)	н.д.
	64	1,41 (0,01)	0,95 (0,07)	н.д.
	65	1,69 (0,05)	1,63 (0,13)	н.д.
	66	0,95 (0,00)	0,30 (0,00)	н.д.
	67	0,88 (0,25)	0,30 (0,00)	н.д.
	68	1,33 (0,11)	0,94 (0,03)	1,00 (0,04)
	69	1,20 (0,30)	1,33 (0,05)	н.д.
	70	2,20 (0,04)	0,36 (0,10)	1,24 (0,24)
Новембар	71	2,22 (0,04)	1,14 (0,06)	1,37 (0,05)
	72	1,71 (0,03)	0,42 (0,10)	н.д.
	73	1,99 (0,10)	1,72 (0,17)	н.д.
	74	1,14 (0,13)	1,00 (0,00)	н.д.
	75	1,22 (0,04)	0,74 (0,13)	н.д.
	76	1,57 (0,05)	1,28 (0,07)	н.д.
	77	1,53 (0,04)	0,60 (0,00)	1,30 (0,00)
	78	2,16 (0,11)	0,30 (0,00)	1,69 (0,09)
	79	1,53 (0,06)	0,67 (0,06)	н.д.
	80	1,88 (0,02)	0,36 (0,10)	н.д.
	81	2,35 (0,15)	н.д.	н.д.
	82	1,23 (0,13)	0,84 (0,06)	1,00 (0,00)
	83	1,53 (0,03)	1,20 (0,03)	н.д.
	84	2,20 (0,00)	2,31 (0,08)	1,10 (0,17)
	85	2,12 (0,03)	1,41 (0,02)	1,53 (0,21)
	86	2,20 (0,07)	0,70 (0,00)	н.д.
Децембар	87	1,48 (0,00)	0,88 (0,03)	н.д.
	88	2,52 (0,08)	1,50 (0,02)	2,07 (0,11)
	89	1,60 (0,04)	н.д.	н.д.
	90	1,25 (0,11)	0,92 (0,21)	н.д.
	91	1,52 (0,00)	0,30 (0,15)	1,26 (0,24)
	92	1,83 (0,02)	0,65 (0,16)	1,72 (0,22)
	93	1,95 (0,06)	1,46 (0,01)	н.д.
	94	2,31 (0,25)	1,29 (0,03)	1,36 (0,32)
	95	2,46 (0,06)	1,25 (0,10)	1,30 (0,00)
	96	1,15 (0,03)	н.д.	н.д.
	97	2,20 (0,01)	0,35 (0,00)	2,06 (0,06)
	98	1,79 (0,03)	0,91 (0,00)	н.д.
	99	1,93 (0,00)	1,28 (0,05)	н.д.
	100	2,39 (0,09)	1,08 (0,15)	н.д.
	101	1,25 (0,05)	0,90 (0,16)	н.д.
	102	1,45 (0,05)	0,70 (0,05)	н.д.

Резултати су изражени у log cfu/ml и представљају средњу вредност три понављања. Стандардна девијација резултата је дата у заградама. н.д - није детектовано.

Табела 8. Укупан број микроорганизама (УБМ), број бактерија млечне киселине (БМК) и број коагулаза позитивних стафилокока (КПС) у сировом млеку магарице (јануар - јун 2013)

Период узорковања	Шифра узорка	УБМ	БМК	КПС
Јануар	103	1,22 (0,00)	0,86 (0,11)	н.д.
	104	1,52 (0,04)	0,67 (0,06)	н.д.
	105	1,76 (0,06)	0,80 (0,19)	н.д.
	106	1,40 (0,00)	0,42 (0,10)	н.д.
	107	1,10 (0,00)	н.д.	н.д.
	108	2,15 (0,03)	0,40 (0,00)	н.д.
Фебруар	109	1,20 (0,05)	0,70 (0,25)	н.д.
	110	1,43 (0,01)	0,50 (0,12)	н.д.
	111	1,74 (0,09)	0,66 (0,10)	1,16 (0,15)
Март	112	2,87 (0,16)	2,09 (0,06)	1,00 (0,00)
	113	2,70 (0,11)	2,55 (0,05)	2,38 (0,02)
	114	2,38 (0,05)	1,27 (0,12)	н.д.
	115	3,08 (0,07)	1,89 (0,05)	2,62 (0,02)
	116	1,27 (0,03)	0,56 (0,07)	н.д.
	117	2,68 (0,02)	1,46 (0,05)	1,29 (0,26)
	118	1,56 (0,04)	0,82 (0,04)	н.д.
	119	1,89 (0,03)	0,92 (0,06)	н.д.
	120	2,67 (0,12)	2,07 (0,05)	1,90 (0,05)
Април	121	2,48 (0,02)	1,97 (0,02)	1,46 (0,15)
	122	2,23 (0,02)	0,70 (0,00)	н.д.
	123	1,55 (0,09)	0,56 (0,07)	н.д.
	124	2,60 (0,00)	1,50 (0,00)	н.д.
	125	2,32 (0,02)	1,53 (0,18)	1,65 (0,02)
	126	2,13 (0,04)	1,10 (0,09)	1,09 (0,04)
Мај	127	1,20 (0,00)	1,13 (0,05)	н.д.
	128	1,64 (0,02)	1,28 (0,02)	н.д.
	129	2,77 (0,05)	1,42 (0,06)	2,02 (0,02)
	130	1,17 (0,06)	0,84 (0,12)	н.д.
	131	2,15 (0,03)	0,94 (0,04)	1,53 (0,01)
Јун	132	1,35 (0,03)	0,52 (0,24)	н.д.
	133	1,46 (0,04)	0,68 (0,17)	н.д.
	134	2,43 (0,01)	1,40 (0,11)	2,05 (0,01)
	135	1,56 (0,04)	0,90 (0,05)	н.д.
	136	4,33 (0,01)	2,41 (0,02)	2,17 (0,01)
	137	1,28 (0,00)	0,95 (0,09)	н.д.

Резултати су изражени у $\log \text{cfu/ml}$ и представљају средњу вредност три понављања. Стандардна девијација резултата је дата у заградама. н.д - није детектовано.

У студији спроведеној на 101-ом појединачном узорку сировог млека магарице, укупан број бактерија ни у једном испитаном узорку није прелазило $2,39 \log \text{cfu/ml}$ (Pilla и сар., 2010).

Много боља микробиолошка слика ових појединачних узорака млека магарице, у поређењу са резултатима истраживања спроведеним на збирним узорцима млека

магарице (Corroa и сар., 2002, Chiavari и сар., 2005; Zhang и сар., 2008), објашњена је лошијом хигијенском праксом током сакупљања, односно добијања збирног млека (Pilla и сар., 2010).

Начин muže је такође један од фактора који може имати велики утицај на микробиолошку слику млека магарице. Резултати испитивања утицаја начина muže на микробиолошки квалитет сировог млека магарице, доступни у научној литератури су прилично контрадикторни. Тако је једна група аутора дала предност машинској мужи, јер су показали да је у том случају укупан број бактерија ($3,5 \log \text{cfu/ml}$) био нижи у односу на млеко добијено ручном мужем ($4,7 \log \text{cfu/ml}$) (Sorrentino и сар., 2010), док су други известили о генерално лошијем микробиолошком статусу сировог млека магарице добијеног машинском мужем, у односу на ручно помужено млеко (Conte и сар., 2006; Salimei и Chiofalo, 2006).

Примена машинске muže захтева ефикасну санитацију опреме за мужу, јер у противном сама опрема може постати главни извор контаминације млека, поготову микроорганизмима отпорним на чишћење и дезинфекцију (Salimei и Fantuz, 2012). Salimei и Chiofalo (2006) су управо овим објаснили велики укупан број бактерија ($>5 \log \text{cfu/ml}$) одређен у сировом млеку магарице. Најбољи пример утицаја начина muže на микробиолошки квалитет млека дат је у студији спроведеној на сировом млеку магарице са пет фарми у северозападној Италији (Cavallarin и сар., 2015).

УБМ у млеку са фарми које су практиковале машинску мужу био је у интервалу од 4,05 до $5,77 \log \text{cfu/ml}$, док је у млеку са фарме где је мужа била ручна, зебележена вредност УБМ од $2,84 \log \text{cfu/ml}$.

Аутори су навели као неопходну едукацију фармера у смислу коришћења опреме за мужу, јер је очигледно неадекватна санитација музилица довела до контаминације млека, односно појаве повећаног броја микроорганизама несвојственог млеку магарице.

Број микроорганизама већи од $4 \log \text{cfu/ml}$ регистрован у шест узорка млека у овој дисертацији, највероватније је последица директне контаминације млека током muže и није повезан са просечном дневном температуром, јер су по два таква узорка детектована у октобру и новембру 2011. године, а по један у јулу 2012. и јуну 2013. године. Наиме, с обзиром на праксу у Специјалном резервату природе „Засавица“, да

се магарице током muže не изводе на пашњаке, теоретски због високих дневних температура током летњих месеци, постоји већа вероватноћа контаминације површине вимена микроорганизама из простирке, који током muže преко вимена и руку радника могу доспети у млеко. Доминантну микропопулацију простирке чине микроорганизми фекалног порекла, чији број у простирци зими варира између 10^8 и 10^{10} cfu/g (Chambers, 2002), а лети је вишеструко већи. Међутим, у овој докторској дисертацији млеко узорковано у летњем периоду није имало повећан укупан број микроорганизама. У Табели 9 је представљен удео (%) узорака млека са различитим нивоом микроорганизама, у укупном броју испитаних узорака од октобра 2011. до краја јуна 2013. године.

Табела 9. Удео узорака млека (%) са различитим укупним бројем микроорганизама (УБМ) у укупном броју испитаних узорака (октобар 2011 - јун 2013)

Година узорковања	2011.	2012.	2013.
Број животиња укључених у експеримент	7	23 (3)*	12 (6)*
Број испитаних узорака млека	20	82	35
УБМ у млеку (log cfu/ml)	Удео у укупном броју узорака млека (%)		
<1,00	5,00	4,88	0,00
1,00 - 1,50	30,00	30,48	31,44
1,51 - 2,00	10,00	31,71	22,85
2,01 - 2,50	25,00	25,61	22,85
2,51 - 3,00	5,00	4,88	17,14
3,01 - 4,00	5,00	1,22	2,86
4,01 - 4,60	20,00	1,22	2,86

Број у загради означава број музних животиња од којих су узорци узимани и у претходној години. Укупно 33 магарице су биле укључене у експеримент.

На основу података из Табеле 9, могло би се закључити да је сезона испитивања имала утицаја на микробиолошку слику млека магарице, с обзиром да је у 2011. години регистрован већи удео узорака са УБМ од 4,01 до 4,60 log cfu/ml, односно у 2013. знатно већи проценат узорака са УБМ од 2,51 до 3,00 log cfu/ml. Иако су зависност микробиолошке слике сировог млека магарице од сезоне претходно утврдили и други аутори (Conte и сар., 2006), овај закључак треба узети са извесном резервом, јер су у 2011. и 2013. години испитивања вршена само током три, односно 6 месеци. Осим тога, у 2012. години је обрађен много већи број узорака, а у експеримент је било укључено двоструко више животиња. У сваком случају, различита микробиолошка слика сировог млека магарице, утврђена у различитим сезонама је вероватно последица сумарног деловања многобројних различитих фактора чије појединачне доприносе је тешко одредити. У првом реду су то

температура и влажност ваздуха, ниво хигијене објеката за узгој, опреме и радника, степен контаминације ваздуха, воде и сточне хране.

Микробиолошки квалитет сировог млека конвенционалних млечних врста (крава, коза и оваца) веома варира, што се уз многобројне друге факторе, објашњава различитом хигијенском праксом током muže и манипулације млеком (Beckers и сар., 1987; Chambers, 2002; Morgan и сар., 2003; Muehlherr и сар., 2003; Chye и сар., 2004; Gaya и сар., 2008; Godič Torkar и Golc Teger, 2008; Hill и сар., 2012; Oliveira и сар., 2011; Poppe, 2011). Међутим, без обзира на те варијације, у поређењу са млеком магарице, укупан број микроорганизама у сировом млеку конвенционалних млечних врста је генерално већи, док се патогени микроорганизми много чешће јављају и то у значајно већем броју. Укупан број микроорганизама у сировом крављем млеку се према литературним наводима кретао у интервалу мањем од 3 log cfu/ml, па до преко 6 log cfu/ml (Chambers, 2002). У сировом крављем млеку у Словенији 23,6% испитаних узорака је имало укупан број аеробних мезофилних бактерија већи од 5 log cfu/ml (Godič Torkar и Golc Teger, 2008), док је у 903 анализирана узорка овог млека у Малезији, просечан број аеробних мезофилних бактерија био 7,08 log cfu/ml (Chye и сар., 2004). Број аеробних мезофилних бактерија у сировом крављем млеку са подручја Португала је био у интервалу од 6,1 до 8,6 log cfu/ml (Kongo и сар., 2008). Према извештајима за сирово козије и овчије млеко у Швајцарској (Muehlherr и сар., 2003), укупан број бактерија се кретао у опсегу од 2,00 до 8,64 log cfu/ml, са средњом вредношћу између 4,69 и 4,78 log cfu/ml. У северном Бразилу, у узорцима сировог козијег и овчијег млека, узоркованог са 96 фарми, укупан број бактерија био је у интервалу од 5,0 до 7,0 log cfu/ml (Oliveira и сар., 2011), док је овим врстама сировог млека, са подручја Француске, Грчке и Португала, тај број био од 5,03 до 7,6 log cfu/ml (Morgan и сар., 2003).

Број бактерија млечне киселине (БМК) био је у интервалу од $0,3 \pm 0,0$ до $2,54 \pm 0,01$ log cfu/ml, с тим што је број ових бактерија у 4 узорка млека био испод границе детекције (<1 cfu/ml). Од укупно испитаних узорака млека магарице, 82,48% узорака је имало садржај БМК мањи од 1,5 log cfu/ml. Број ових бактерија је у већини узорака био пропорционалан укупном броју микроорганизама, па је тако највећи број БМК био детектован у узорцима млека који су имали највећи укупан број микроорганизама (>4 log cfu/ml). Сходно томе, у узорцима млека у којима БМК нису

детектоване, ниво укупних микроорганизама је био мали. Овај тренд је забележен и у студијама других истраживача (Cavallarin и сар., 2015). У оквиру испитивања микробиолошког квалитета сировог млека магарице узоркованог са фарми у Пијемонту, највећи број БМК регистрован је у узорцима млека који су имали највећи УБМ, док су узорци са најбољом микробиолошком сликом уједно имали и најнижи ниво БМК (Cavallarin и сар., 2015). Према ауторима истраживања, већи ниво укупних микроорганизама и БМК био је последица неадекватне санитације опреме за машинску мужу (Cavallarin и сар., 2015). У Табели 10 је приказано учешће узорака млека магарице у укупном броју испитаних узорака, у односу на њихов ниво БМК.

Табела 10. Удео узорака млека (%) са различитим бројем бактерија млечне киселине (БМК) у укупном броју испитаних узорака (октобар 2011 - јун 2013)

Година узорковања	2011.	2012.	2013.
Број животиња укључених у експеримент	7	23 (3)*	12 (6)*
Број испитаних узорака млека	20	82	35
Укупан број БМК у млеку (log cfu/ml)	Удео у укупном броју узорака млека (%)		
<1,00	45,00	48,78	57,14
1,00 - 1,50	25,00	37,80	22,86
1,51 - 2,00	5,00	7,32	8,57
2,01 - 2,50	15,00	6,10	8,57
2,51 - 3,00	10,00	0,00	2,86
>3,00	0,00	0,00	0,00

Број у загради означава број музних животиња од којих су узорци узимани и у претходној години. Укупно су 33 магарице биле укључене у експеримент.

У узорцима млека магарице из 2011. године, у којима је детектован нешто већи укупан број микроорганизама (Табела 5), утврђен је и већи удео узорака са бројем БМК $>2,0 \log \text{cfu/ml}$, у односу на узорке из 2012. и 2013. године. Литературни наводи о БМК у млеку магарице су веома лимитирани и постоји свега неколико радова новијег датума, према којима број ових бактерија јако варира (Corpora и сар., 2002; Chiavari и сар., 2005; Salimei и Chiofalo, 2006; Zhang и сар., 2008). Резултати истраживања извршених у оквиру ове дисертације су генерално у складу са налазима аутора који су известили о малом броју БМК у млеку магарице: $<1 \log \text{cfu/ml}$ (Chiavari и сар., 2005) и $1,6 \log \text{cfu/ml}$ (Corpora и сар., 2002). Са друге стране, у млеку једне кинеске расе број БМК је био $4,24 \log \text{cfu/ml}$ (Zhang и сар., 2008). С обзиром на то да БМК представљају природну, индигену микрофлору сировог млека (Rodríguez и сар., 2000), варијације у њиховом броју наведене у литератури, могу бити последица специфичних одлика расе, различитости у садржају појединих компонената млека, као и различите манипулације током муже и складиштења млека (Lendenbach и Marchall, 2009).

Упркос томе што поједини аутори (Corrola и сар., 2002; Chiavari и сар., 2005) означавају млеко магарице као погодно за производњу ферментисаних млечних напитака применом комерцијалних стартер култура, мали садржај БМК у сировом млеку магарице, могао би да указује на њихову осетљивост на дејство антимикробних компонената овог млека. У прилог томе говори и чињеница да је број ових бактерија у сировом крављем млеку, које није познато по јаком антимикробном дејству, неупоредиво већи (3,4-6,8 log cfu/ml) (Franciosi и сар., 2009). Осим малог броја БМК, млеко магарице се одликује и слабим биодиверзитетом БМК (Carminati и сар., 2014), за разлику од млека других врста (Scintu и Pirreda, 2007; Franciosi и сар., 2009). Од укупно 129 изолата из сировог млека магарице, применом молекуларних техника детерминисано је свега 10 различитих сојева БМК (Carminati и сар., 2014).

Од 137 узорак млека магарице испитаних у овој докторској дисертацији, у 51-ном узорку (37,23%) је утврђено присуство коагулаза позитивних стафилокока. Број коагулаза позитивних стафилокока (КПС) у узорцима млека магарице је био у опсегу од $1,0 \pm 0,0$ до $2,62 \pm 0,02$ log cfu/ml. Садржај КПС у највећем броју позитивних узорак (82,35%) био је мањи од 2 log cfu/ml, а само један узорак је имао број КПС већи од 2,5 log cfu/ml ($2,62 \pm 0,02$ log cfu/ml). Број КПС је углавном био пропорционалан УБМ у узорцима млека магарице (Табеле 5-8). Међутим, у узорцима млека из октобра и новембра 2011. године, који су имали УБМ >4 log cfu/ml, КПС нису биле детектоване. До контаминације сировог млека коагулаза позитивним стафилококама је највероватније дошло током саме муже, с обзиром на то да су главни извори контаминације овим микроорганизмима музне животиње и радници. Наиме, коагулаза позитивне стафилококе (укључујући и *S. aureus*) редовно се налазе у назофарингалном секрету животиње, на њеној кожи и длакама. Подаци о броју КПС на површини вимена магарица се не могу пронаћи у доступној литератури. Насупрот томе, постоје подаци о микробиологији површине вимена крива, где преовлађују *Micrococci* (око 10^4 cfu/вимену), укључујући *Staphylococcus spp.* (Chambers, 2002). С обзиром на то да се радило о ручној мужи, контаминација млека са површине опреме за мужу била је у потпуности искључена, јер је млеко било појединачно сакупљано у стерилне посуде.

Колоније КПС израсле на *Baird Parker* агару су биле карактеристичне за сирово млеко, односно углавном су одговарале атипичној макроморфологији (сиве или црне без провидне зоне) описаној у стандарду SRPS EN ISO 6888-1:2008. У новембру и децембру 2012. године, осим атипичних колонија, у неким узорцима су на *Baird Parker* агару детектоване и типичне колоније КПС (црне, светлцаве, конвексне, окружене провидном зоном), па је могуће да је у том периоду током муче дошло и до контаминације млека са руку радника. Према неким проценама од 30 до 50% здраве људске популације су носиоци овог патогена у носној и усној дупљи, као и на кожи (Loir, 2003). У Табели 11 дат је удео узорака млека магарице са различитим садржајем КПС у укупном броју испитаних узорака.

Табела 11. Удео узорака млека (%) са различитим бројем коагулаза позитивних стафилокока (КПС) у укупном броју испитаних узорака (октобар 2011 - јун 2013)

Година узорковања	2011.	2012.	2013.
Број животиња укључених у експеримент	7	23 (3)*	12 (6)*
Број испитаних узорака млека	20	82	35
Удео позитивних узорака млека	40,00%	36,58%	37,14%
Укупан број КПС у млеку (log cfu/ml)	Удео у укупном броју узорака млека (%)		
<1,00	0,00	0,00	0,00
1,00 - 1,50	87,50	66,67	38,46
1,51 - 2,00	12,50	20,00	23,08
2,01 - 2,50	0,00	13,33	30,77
2,51 - 3,00	0,00	0,00	7,69
>3,00	0,00	0,00	0,00

Број у загради означава број музних животиња од којих су узорци узимани и у претходној години. Укупно су 33 магарице биле укључене у експеримент

У многим земљама се у различитим прехранбеним намирницама толерише присуство *S. aureus* у одређеном броју који се не сматра ризиком за јавно здравље. Један од примера је Француска, где је у сиревима произведеним од непастеризованог млека дозвољено до 1000 cfu/g *S. aureus* (Loir, 2003). Регулатива ЕС 2073/2005 је дефинисала још блаже критеријуме у погледу броја коагулаза позитивних стафилокока у сиревима произведеним од сировог млека.

Наиме, од 5 испитаних узорака, у 3 је дозвољен број ових микроорганизама до 10^4 cfu/g, док у преостала 2 узорка тај број може да буде до 10^5 cfu/g. Према европској регулативи 92/46/ЕЕС из 1992. године у сировом крављем млеку намењеном директном конзумирању, дозвољено је да од 5 испитаних узорака 3 имају број *S. aureus* до 500 cfu/ml (2,7 log cfu/ml), док у 2 узорка број ових бактерија може да буде у интервалу између 500 cfu/ml (2,7 log cfu/ml) и 2 000 cfu/ml (3,3 log cfu/ml). Дакле, европски прописи су много мање ригорозни у вези са присуством *S. aureus* у храни у

односу на друге патогене, као што су нпр. *Salmonella* spp. и *L. monocytogenes*. Постоји неколико разлога за то. Као прво, према подацима из литературе потребно је да се у организам унесе око 1 μg токсина да би дошло до појаве болести. Ова количина токсина се синтетише када број *S. aureus* у храни буде реда величине 10^5 cfu/g(ml). *S. aureus* уколико је присутан у храни у мањем броју, врло брзо може да достигне концентрацију потребну за синтезу токсина, уколико се храна неправилно складишти, с обзиром на то да овај микроорганизам може да се размножава на температури од 8 °C до 45 °C, са оптимумом између 35 и 37 °C (*The Food Safety File*, 2008). Међутим, најчешћи случајеви тровања храном изазвани са *S. aureus* су се догодили као последица конзумирања хране која је била правилно термички обрађена, тако да присуство *S. aureus* није било детектовано, али је претходно услед неадекватног поступања са сировином дошло до интензивног умножавања *S. aureus* и продукције токсина, који је преживео топлотну обраду. Најбољи пример за то је случај масовног тровања пастеризованим млеком у Јапану који се догодио 2000. године. Истрагом је утврђено да је узрок било присуство стафилококног ентеротоксина А у пастеризованом млеку. У почетку није било јасно како је дошло до синтезе токсина, с обзиром на да је пастеризација млека била адекватна и да се токсин продукује на температурама које су много више од температура складиштења сировог млека (8-10 °C). Даља истраживања су довела до сазнања да је до синтезе токсина дошло услед неадекватне хигијене погона, као и непрописног поступања са сировим млеком. Наиме, извори контаминације млека са *S. aureus* били су спојени цеви којима је сирово млеко транспортовано до одвојених резервоара, који нису могли да се хладе и који нису били укључени у систем аутоматског чишћења и дезинфекције. На повишеној температури дошло је до даљег умножавања *S. aureus* и продукције ентеротоксина А, који није могао бити уништен, без обзира на касније правилно спроведену пастеризацију (*The Food Safety File*, 2008). Узроци масовног тровања у Јапану су дакле били тешки пропусти у произвођачкој и хигијенској пракси. Уколико се приликом производње и прераде млека испуне захтеви добре произвођачке и хигијенске праксе, *S. aureus*, односно његови токсини, неће представљати реалну опасност по здравље конзумента.

Редовно и адекватно чишћење и прање опреме за мжу, вимена животиња и руку радника су предуслов за добијање сировог млека без присуства стафилококних

токсина и без (или са малим, прихватљивим нивоом) коагулаза позитивних стафилока (Loir, 2003). На тај начин се у млеку (непосредно након muže) избегава појава великог броја коагулаза позитивних стафилокока, а самим тим и стварање услова за продукцију токсина. Уколико коагулаза позитивне стафилококе у сировом млеку ипак буду присутне у неком малом, законски прихватљивом броју, њихово даље умножавање у млеку се спречава моменталним хлађењем млека на испод +7 °C, јер се на тим температурама ови микроорганизми не могу умножавати, нити продуковати токсине (*The Food Safety File*, 2008). Ако се контролом опреме за мужу и манипулацију млеком утврди број коагулаза позитивних стафилокока реда величине 10^5 cfu/ml или већи, онда је неопходно извршити контролу млека на присуство ентеротоксина (*The Food Safety File*, 2008). Осим тога, потребно је спроводити редовну контролу музних животиња на маститис, с обзиром на да је *S. aureus* један од његових главних узрочника. Животиње оболеле од маститиса морају бити искључене из muže, јер ће у противном без обзира на предузете хигијенске мере, млеко бити контаминирано великим бројем *S. aureus* (или неким другим изазивачем маститиса) (Anđelković, 2010). Када се све горе поменуто узме у обзир, јасно је зашто у регулативи 92/46/ЕЕС стоје релативно благи критеријуми за присуство *S. aureus* у сировом млеку намењеном директном конзумирању.

Упркос чињеници да је у 37,23% испитаних узорака млека магарице утврђено присуство коагулаза позитивних стафилокока, сви испитани узорци су у погледу садржаја ових микроорганизама били испод дозвољене доње границе утврђене регулативом 92/46/ЕЕС, односно сирово млеко магарице је са тог аспекта било у потпуности безбедно за директно конзумирање. Стафилококни токсини нису били одређивани у оквиру ове докторске дисертације, с обзиром на утврђен мали број коагулаза позитивних стафилокока у испитиваним узорцима млека.

Према литературним подацима, *S. aureus* је патоген који је најчешће изолован из сировог млека магарице италијанских и кинеских раса (Conte и сар., 2006; Zhang и сар., 2008; Pilla и сар., 2010). *Staphylococcus* spp. је био детектован у млеку три од седам магарица укључених у истраживање и њихов број се налазио у интервалу од 1,6 до 2,47 log cfu/ml, док је *S. aureus* био изолован из млека две животиње (Conte и сар., 2006). У другом делу истог истраживања испитивано је млеко 23 магарице са две различите фарме, где је у свим позитивним узорцима млека број *S. aureus* био мањи

од 1,48 log cfu/ml. Просечан број овог патогена у млеку једне кинеске расе износио је 1,45 log cfu/ml (Zhang и сар., 2008), док је у другом истраживању од 101 испитаног узорка млека, *S. aureus* био детектован у само 5 узорака, односно у млеку 3 од 10 музних животиња (Pilla и сар., 2010). Много више података у литератури постоји о присуству и броју коагулаза позитивних стафилокока у млеку конвенционалних млечних врста. У студији која је обухватила 297 узорака сировог крављег млека са подручја Новог Зеланда, у 60% узорака утврђено је присуство *S. aureus*, чији број је био мањи од 2 log cfu/ml (Hill и сар., 2012). Само у једном узорку ниво овог патогена био је већи од 4 log cfu/ml. У другој студији у којој је од 930 испитаних узорака сировог крављег млека *S. aureus* био изолован из више од 60% узорака (Chue и сар., 2004), забележен је већи просечан број ових бактерија (4,08 log cfu/ml). Коагулаза позитивне стафилококе у сировом козијем млеку са подручја Француске, Грчке и Португала налазиле су се у опсегу од 2,44 до 5,23 log cfu/ml (Muehlherr и сар., 2003). Просечан број *S. aureus* у 43% узорака сировог козијег млека, у којима је овај патоген детектован, био је 4,08 log cfu/ml (Foschino и сар., 2002).

Број квасаца и плесни у свим испитаним узорцима млека магарице био је испод границе детекције методе (<1 log cfu/ml). Према литературним наводима број квасаца и плесни у сировом млеку магарице је био у интервалу од 0,69 до 4,50 log cfu/ml (Corrola и сар., 2002; Zhang и сар., 2008). Узроци варијације у резултатима одређивања броја квасаца и плесни у сировом млеку могу бити различити, од хигијене током muže (манипулације млеком), преко поднебља, сезоне, расе, до примењене аналитичке методе. Са здравственог аспекта, присуство квасаца и плесни у сировом млеку је од мањег значаја, јер је познато да инфекције патогеним квасцима (као што су нпр. *Candida albicans* и *Cryptococcus neoformans*), не могу да се догоде конзумирањем хране (Fleet, 1990), док канцерогени афлатоксин М₁, који може да се јави у млеку, настаје као последица храњења животиња сточном храном контаминираном афлатоксином Б₁ (Godič Torkar и Vengušt, 2008). До контаминације млека квасцима и плеснима долази најчешће из ваздуха, у просторијама у којима се врши muže и манипулација млеком, а до контаминације може доћи и преко контакта млека са контаминираном површином опреме за muže и складиштење. Квасци и плесни много већи значај имају у индустрији млечних производа, где могу да изазову различите врсте кварења ових производа (Godič Torkar и Vengušt, 2008; Lendenbach и Marchall, 2009). Извештаји о броју квасаца и плесни у сировом

крављем, козијем и овчијем млеку варирају од 0,60 до 5,63 log cfu/ml (Agnihotri и Pal, 1996; Godić Torkar и Vengušt, 2008; El-Diasty и El-Kaseh, 2009; Janković и сар., 2009; Kondyli и сар., 2012)

Аеробне спорогене бактерије биле су изоловане из 6 испитиваних узорка млека магарице. У питању су били узорци 7 ($1,32 \pm 0,05$ log cfu/ml) и 3 ($1,39 \pm 0,05$ log cfu/ml) из октобра 2011., узорци 8 ($1,3 \pm 0,00$ log cfu/ml) и 12 ($1,34 \pm 0,03$ log cfu/ml) из новембра 2011., као и узорци 51 ($1,08 \pm 0,10$ log cfu/ml) и 136 (из $1,20 \pm 0,08$ log cfu/ml) из јула 2012., односно јуна 2013. године. Аеробне спорогене бактерије су у овом истраживању биле присутне у 4,38% испитаних узорака, а њихов број се налазио интервалу од 1,08 до 1,39 log cfu/ml. Сви позитивни узорци имали су УБМ већи од 4 log cfu/ml (Табеле 5, 6 и 8). С обзиром на да ови микроорганизми нису детектовани у осталим анализираним узорцима (са мањим УБМ), њихово присуство у ових 6 узорака упућује на извесне пропусте у хигијени током muže.

Аеробне спорогене бактерије, као и анаеробне спорогене бактерије из рода *Clostridium* су убиквитарни микроорганизми и могу бити изоловани из широке лепезе станишта на фарми, укључујући земљиште, силажу, концентровану храну, простирку и фецес. Постоје два најчешћа правца контаминације сировог млека овим микроорганизмима: један може бити директна контаминација вимена из земљишта, а други индиректна, путем конзумирања контаминиране сточне хране. Животиње заједно са храном у организам уносе и бактеријске споре, које потом избацују фецесом на простирку. Из простирке или фецеса ове бактерије контаминирају површину вимена, одакле током muže могу доспети у млеко. Са становишта млечне индустрије, од аеробних спорогених бактерија најзначајније врсте су *Bacillus cereus*, као и терморезистентни *Bacillus sporothermodurans* и *Geobacillus stearothermophilus*. Они су из ове групе микроорганизма најчешћи изазивачи кварења пастеризованог млека складиштеног на ниским температурама, јер њихове споре преживљавају пастеризацију и имају способност исклијавања у условима хлађења. Добра произвођачка пракса на фармама захтева прање вимена пре muže (FAO и IDF, 2011), међутим, прање вимена са микробиолошког аспекта није у потпуности ефикасно и на њему у случају јаке фекалне контаминације или контаминације материјалом са простирке, остају фракције вегетативних или спорогених бактерија (Driehuis, 2013).

Према подацима из литературе након прања вимена број бактеријских спора у млеку се редукује за 45 до 96% (Magnusson и сар., 2006).

Резултати испитивања броја суспектног *B. cereus* су били у складу са резултатима добијеним за број аеробних спорогених бактерија. Суспектни *B. cereus* није детектован ни у једном од 137 анализираних узорака млека магарице, односно број овог патогена је у свим узорцима био мањи од границе детекције примењене методе ($<1 \log \text{cfu/ml}$). Садржај спора овог земљишног микроорганизма у сировом млеку у директној је корелацији са степеном контаминације вимена партикулама земљишта (Christiansson и сар., 1999). Према извештајима из литературе споре *B. cereus* су у зависности од влажности и састава тла биле присутне у броју мањем од 50 cfu/g, па све до 380 000 cfu/g земљишта (Christiansson и сар., 1999). Повољна микробиолошка слика испитаних узорака млека магарице у смислу одсуства суспектног *B. cereus*, могла би бити последица не пуштања магарица на пашњаке за време трајања муже и начина сакупљања млека у специјалном резервату природе „Засавица“.

У доступној научној литератури постоје тек спорадични извештаји о налазима *B. cereus* у сировом млеку магарице (Scatassa и сар., 2011; Cavallarin и сар., 2015;). Cavallarin и сар., (2015) су током свог истраживања у само једном узорку сировог млека магарице констатовали присуство *B. cereus* (2,11 log cfu/ml). Радило се о узорку млека са високим нивоом укупних микроорганизама (5,77 log cfu/ml), који је био последица неадекватне дезинфекције опреме за машинску мужу. *B. cereus* је као спорогени микроорганизам отпоран на утицаје из спољашње средине и може да преживи на опреми за мужу, уколико није извршена правилна санитација. Scatassa и сар., (2011) су *B. cereus* детектовали у 3 од 32 испитана појединачна узорка сировог млека магарице, у концентрацији од 1 до 1,77 log cfu/ml, док је у једном збирном узорку тај број износио 3,08 log cfu/ml, што је опет имало везе са хигијеном током муже. У овој дисертацији индивидуални узорци млека су сакупљани ручно у стерилне посуде, тако да опрема за мужу није могла бити евентуални извор контаминације овим микроорганизмима.

Са друге стране, *Bacillus* spp. је веома значајан контаминент крављег млека и његових производа, јер су претходна истраживања показала да је *Bacillus* spp. (углавном *B. cereus* и *B. polymyxa*) био узрок више од 77% регистрованих случајева кварења млека и млечних производа изазваних Грам позитивним бактеријама

(Lendenbach и Marchall, 2009). Извештаји о учесталости контаминације сировог крављег млека *B. cereus* сојевима су различити и крећу се од 27% до преко 80% позитивних узорака (Nempen и сар., 2004; Lendenbach и Marchall, 2009; Yobouet и сар., 2014).

Сулфиторедукујуће клостридије су изоловане из само два испитана узорка млека магарице и у оба случаја њихов број је био мањи од 1 log cfu/ml. Реч је о узорцима 51 и 136 у којима је УБМ био већи од 4 log cfu/ml (Табеле 6 и 8). С обзиром на вредност УБМ, радило се о узорцима који су имали нешто лошију микробиолошку слику од већине испитаних узорака. Са аспекта прехранбених намирница, најзначајнија бактерија из ове групе је *C. perfringens*. Конзумирање намирница контаминираних овом бактеријом може да доведе до обољења људи, чији су симптоми дијареја и абдоминални болови. Симптоми настају као последица синтезе ентеротоксина током спорулације ових бактерија у танком цреву оболелог. Извештаји других истраживача такође говоре о малом броју ових бактерија у млеку магарице (<1 log cfu/ml) (Conte и сар., 2006) или о њиховом одсуству (Salimei и Chiofalo, 2006). Nempen и сар., (2004) су известили о томе да је 31,6% узорака сировог крављег млека било контаминирано сулфиторедукујућим клостридијама.

Свих 137 испитаних узорака сировог млека магарице балканске расе са аспекта УБМ, задовољава италијанске регулативе (Bucchini, 2012), као и хрватски *Pravilnik o pregledu sirovog mlijeka namijenjenog javnoj potrošnji* (Narodne novine, broj 110/100), те би се сходно томе могло наћи у продаји на тржишту тих земаља. Само 4 од 137 (2,92%) испитаних узорака млека магарице, у погледу УБМ, нису задовољили захтеве енглеске регулативе (*The Food Hygiene (England) Regulations*, 2006). Сви испитани узорци млека су задовољили критеријум за *S. aureus* регулативе 92/46/ЕЕС, јер је број коагулаза позитивних стафилокока био испод дозвољене доње границе (2,7 log cfu/ml), као и за *Salmonella* spp., с обзиром на да присуство ових бактерија није детектовано. Број колиформних бактерија у свим испитаним узорцима млека био је испод границе детекције (<1 cfu/ml), тако да је и овај критеријум био задовољен.

Резултати испитивања сировог млека магарице балканске расе, добијени у овој докторској дисертацији, као и резултати других истраживача (Corpora и сар., 2002; Salimei и сар., 2004; Chiavari и сар., 2005; Zhang и сар., 2008; Alabiso и сар., 2009;

Ivanković и сар., 2009; Pilla и сар., 2010; Sorrentino и сар., 2010; Alberghini и сар., 2012; Sarno и сар., 2012), недвосмислено указују на то да је млеко магарице у поређењу са млеком конвенционалних врста неупоредиво бољег микробиолошког квалитета, и да оно задовољава много строжије критеријуме од оних постављених у регулативи ЕС 853/2004. Дакле, за млеко магарице намењено директној потрошњи без претходне топлотне обраде, потребно је установити нове микробиолошке критеријуме прихватљивости или евентуално преузети критеријуме дефинисане за сирово кравље млеко.

4.1.2. Микробиолошки квалитет сировог млека магарице током 6 дана складиштења на +4 °C

У Табелама 12 и 13 приказани су резултати мониторинга микробиолошког квалитета сировог млека магарице (збирни узорци из 2011., 2012., 2013. године) током 6 дана складиштења на +4 °C.

Табела 12. Микробиолошки квалитет сировог млека магарице из 2011. године током 6 дана складиштења на +4 °C (Xsr (SD) log cfu/ml)

	Време складиштења (дани)						
	0	1	2	3	4	5	6
УБМ	4,57 ^a (0,29)	4,65 ^a (0,30)	4,66 ^a (0,27)	4,73 ^a (0,31)	4,91 ^a (0,40)	5,21 ^{a,b} (0,55)	6,41 ^b (0,21)
БМК	2,31 ^a (0,39)	2,34 ^a (0,40)	2,49 ^a (0,36)	2,54 ^a (0,33)	2,60 ^{a,b} (0,16)	2,71 ^{a,b} (0,13)	2,82 ^{a,b} (0,19)
АСБ	1,30 ^a (0,00)	1,30 ^a (0,07)	1,59 ^b (0,16)	1,60 ^b (0,16)	1,73 ^{b,c} (0,01)	1,83 ^c (0,03)	1,15 ^c (1,06)
ЕНТ	н.д.	н.д.	н.д.	0,60 ^a (0,16)	0,78 ^b (0,07)	1,00 ^c (0,02)	1,04 ^c (0,03)
КОЛ	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0,85 ^a (0,05)	1,00 ^b (0,07)

Средње вредности са различитим „*superscript*“ словима у истом реду су статистички значајно различите (P<0,05). УБМ - укупан број микроорганизама; БМК - бактерије млечне киселине; АСБ - аеробне спорогене бактерије; ЕНТ - Enterobacteriaceae; КОЛ - колиформне бактерије; н.д - није детектовано.

Табела 13. Микробиолошки квалитет сировог млека магарице из 2012-2013. године током 6 дана складиштења на +4 °C (Xsr (SD) log cfu/ml)

	Време складиштења (дани)						
	0	1	2	3	4	5	6
УБМ	1,72 ^a (0,54)	1,77(0,48)	1,77 ^a (0,34)	1,70 ^a (0,65)	1,75 ^a (0,38)	1,77 ^a (0,45)	1,78 ^a (0,38)
БМК	0,97 ^a (0,31)	0,98 ^a (0,30)	1,11 ^a (0,25)	1,21 ^a (0,19)	1,26 ^a (0,19)	1,24 ^a (0,07)	1,34 ^a (0,09)
АСБ	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
ЕНТ	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
КОЛ	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.

Средње вредности са различитим „*superscript*“ словима у истом реду су статистички значајно различите (P<0,05). УБМ - укупан број микроорганизама; БМК - бактерије млечне киселине; АСБ - аеробне спорогене бактерије; ЕНТ - Enterobacteriaceae; КОЛ - колиформне бактерије; н.д - није детектовано.

Резултати огледа спроведеног 2011. године, представљени у Табели 12, указују на то да је сирово млеко магарице након три дана складиштења на +4 °С било микробиолошки исправно и безбедно за употребу, односно да је задовољавало захтеве регулативе ЕС 853/2004. У испитиваним узорцима млека магарице *Salmonella* spp., *E. coli*, *C. perfringens*, *L. monocytogenes*, коагулаза позитивне стафилококе, *B. cereus*, као и квасци и плесни нису детектовани до краја складиштења.

Три наредна испитивања под истим експерименталним условима извршена су током 2012. и 2013. године, а средње вредности добијених резултата приказане су у Табели 13. Испитивани патогени микроорганизми нису детектовани ни у овим огледима. Аеробне спорогене бактерије, колиформне бактерије и Enterobacteriaceae су биле испод границе детекције до краја инкубирања.

Сходно томе, узорци млека магарице из 2012. и 2013. године су током свих 6 дана инкубирања били безбедни за конзумирање и задовољавали захтеве ЕС 853/2004, као и критеријуме за сирово млеко већине европских земаља, укључујући и Енглеску.

Нешто лошији микробиолошки квалитет збирног млека магарице из 2011. године, у поређењу са узорцима из 2012. и 2013. године, највероватније је последица чињенице да су у саставу збирног узорка били узорци млека магарице 3 и 7, односно 8 и 12, са повећаним укупним бројем микроорганизама и бројем бактерија млечне киселине (Табела 5), који је опет највероватније био резултат пропуста у хигијени током muže.

Претходна истраживања других аутора показала су одређену варијабилност у смислу микробиолошког квалитета сировог млека магарице током складиштења на +4 °С. Zhang и сар., (2008) су известили да је укупан број бактерија у сировом млеку магарице након 4 дана складиштења био испод максимално дозвољене границе за сирово кравље млеко дефинисане регулативом ЕС 853/2004, али је број колиформних бактерија у старту био већи од дозвољене границе прописане енглеском регулативом и уредбама других европских земаља (Hillerton и Berry, 2004; *The Food Hygiene (England) Regulations*, 2006). У истој студији, током 4 дана складиштења број *S. aureus* у млеку се није значајно мењао и био је у складу са регулативом 92/46/ЕЕС, а осим тога није дошло ни до битне промене броја квасаца и плесни и аеробних спорогенних бактерија. Такође, у истим узорцима млека до краја

складиштења није било детектовано присуство *Salmonella* spp. У другом истраживању (Salimei и Chiofalo, 2006) број Enterobacteriaceae и колиформних бактерија у сировом млеку магарице током 14 дана складиштења није премашио границу дозвољену енглеском регулативом (*The Food Hygiene (England) Regulations*, 2006), али је млеко након три дана имало укупан број бактерија већи од границе дозвољене регулативом ЕС 853/2004.

Основни критеријум прихватљивости сировог млека за директно конзумирање, осим укупног броја бактерија јесте и број соматских ћелија, који према регулативи ЕС 853/2004 мора бити мањи од 400 000/ml. Соматске ћелије су ћелије ткива музних животиња и чине их леукоцити, макрофаги, неутрофили и епителне ћелије пореклом из вимена. Ове ћелије имају одбрамбену улогу у случају маститиса, па је број соматских ћелија у млеку већи од 400 000/ml индикатор појаве овог обољења. Пошто је у оквиру ове докторске дисертације анализиран искључиво микробиолошки аспект млека магарице, број соматских ћелија у узорцима млека није одређиван. Међутим, прегледом литературе се може закључити да магарци, попут других чланова породице *Equidae*, нису подложни маститису. У кобиљем млеку просечан број соматских ћелија је мали и износи око 4,61 log/ml (Salimei и Fantuz, 2012), тако да маститис не представља лимитирајући фактор у производњи кобиљег млека. Према подацима из литературе број соматских ћелија у млеку магарице се налази у интервалу од 3,5 до 4,7 log/ml (Salimei и Chiofalo 2006; Beghelli и сар., 2009; Ivanković и сар., 2009; Salimei и Fantuz, 2012). Појава маститиса код магарца је изузетно ретка и она је углавном трауматске природе (Salimei и Fantuz, 2012), што је у складу са малим садржајем микроорганизама у млеку магарице, а посебно са малим бројем главних изазивача маститиса, као што је *S. aureus*. Највећи део соматских ћелија у млеку магарице чине полиморфонуклеарни неутрофили (40%), након чега следе епителне ћелије (28%), моноцити/макрофаги (18%) и лимфоцити (13%) (Beghelli и сар., 2009).

4.2. Антибактеријска активност млека магарице

У овом делу докторске дисертације представљени су резултати испитивања утицаја температуре инкубирања, нивоа контаминације, садржаја лизозима, лактоферина и калцијума на антибактеријску активност млека магарице према одабраним сојевима

L. monocytogenes, *S. aureus*, *Salmonella* spp., *E. coli* и *K. pneumoniae*. Вештачки контаминирани узорци млека магарице различитих нивоа контаминације (10^2 , 10^3 и 10^4 cfu/ml) складиштени су 4 дана на температури од +9 и +15 °C. Током периода инкубирања праћене су промене броја тест микроорганизама на дневном нивоу, док је на +38 °C тај мониторинг у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^2 cfu/ml) вршен на сваких сат времена током осам сати инкубирања. У свим огледима је као негативна контрола коришћено неинокулисано млеко магарице, док је позитивна контрола била вештачки контаминирани хранљиви бујон. Поред тога, представљени су и резултати испитивања утицаја концентрације калцијума на антибактеријску активност млека магарице према тестираним сојевима *E. coli*, *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* у вештачки контаминираним узорцима у које је претходно додат CaCl_2 и EDTA.

У овом делу тезе су такође приказани резултати одређивања садржаја масних киселина у одабраним узорцима млека магарице који су коришћени за испитивање антибактеријске активности према *L. monocytogenes* и *S. aureus* на +38 °C, са акцентом на масне киселине са документованом антимикуробном активношћу.

4.2.1. Антибактеријска активност млека магарице према *L. monocytogenes*

4.2.1.1. Антибактеријски тест на +9 °C

У Табели 14 су дати садржаји лизозима, лактоферина и калцијума одређени у узорцима млека магарице коришћеним за антибактеријске тестове према *L. monocytogenes* на +9 и +15 °C. У Табелама 15, 16 и 17 приказани су резултати испитивања антибактеријске активности према *L. monocytogenes* на +9 °C за различите нивое контаминације.

У огледу на +9 °C током 4 дана инкубирања ни у једном испитаном узорку млека магарице није забележено смањење броја тестираног соја *L. monocytogenes* у односу на његову почетну вредност (Табеле 15-17).

Табела 14. Садржај лизозима (LYZ), лактоферина (LF) и калцијума (Ca) у узорцима млека магарице коришћеним за испитивање антибактеријске активности према *L. monocytogenes* на +9 и +15 °C

Узорци млека магарице								
	12	16	48	57	58	59	60	61
LYZ	3,03 ^D	3,46 ^F	1,04 ^B	3,27 ^E	2,52 ^A	2,50 ^A	2,79 ^C	2,45 ^A
(g/l)	(0,08)	(0,06)	(0,08)	(0,04)	(0,07)	(0,06)	(0,12)	(0,10)
LF	н.д.	54,30 ^F	2,90 ^A	9,40 ^C	н.д.	39,90 ^E	7,80 ^B	12,40 ^D
(mg/l)	н.д.	(0,40)	(0,07)	(0,70)	н.д.	(0,80)	(0,20)	(0,60)
Ca	400,50 ^A	765,00 ^E	544,25 ^B	845,00 ^F	642,50 ^D	864,00 ^G	391,00 ^A	583,50 ^C
(mg/l)	(0,54)	(0,75)	(9,75)	(19,00)	(5,20)	(4,50)	(3,00)	(10,00)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истом реду са различитим малим словима су статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано.

Табела 15. Број *L. monocytogenes* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^2 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на +9 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	12	16	48	57	58	59	60	61	ХБ
0.	2,55 ^{a,A}	2,55 ^{a,A}	2,55 ^{a,A}	2,55 ^{a,A}	2,55 ^{a,A}	2,55 ^{a,A}	2,54 ^{a,A}	2,58 ^{a,A}	2,56 ^{a,A}
	(0,03)	(0,04)	(0,04)	(0,05)	(0,03)	(0,05)	(0,05)	(0,03)	(0,05)
1.	2,55 ^a	2,54 ^a	2,58 ^a	2,57 ^a	2,55 ^a	2,57 ^a	2,58 ^a	2,57 ^a	3,02 ^b
	(0,03)	(0,05)	(0,01)	(0,04)	(0,03)	(0,04)	(0,04)	(0,04)	(0,02)
2.	2,55 ^a	2,56 ^a	2,57 ^a	2,56 ^a	2,50 ^b	2,52 ^a	2,56 ^a	2,65 ^a	3,70 ^c
	(0,04)	(0,03)	(0,03)	(0,04)	(0,01)	(0,03)	(0,03)	(0,01)	(0,15)
3.	2,57 ^a	2,57 ^a	2,59 ^a	2,54 ^a	2,55 ^a	2,58 ^a	2,58 ^a	2,67 ^a	4,45 ^d
	(0,04)	(0,04)	(0,04)	(0,03)	(0,02)	(0,03)	(0,02)	(0,00)	(0,01)
4.	2,57 ^{a,AB}	2,56 ^{a,AB}	2,61 ^{a,AB}	2,55 ^{a,A}	2,64 ^{c,B}	2,57 ^{a,AB}	2,60 ^{a,AB}	3,00 ^{b,C}	5,35 ^{e,D}
	(0,06)	(0,06)	(0,04)	(0,05)	(0,01)	(0,01)	(0,00)	(0,03)	(0,01)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

Табела 16. Број *L. monocytogenes* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^3 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на +9 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	12	16	48	57	58	59	60	61	ХБ
0.	3,54 ^{a,A}	3,54 ^{a,A}	3,57 ^{a,A}	3,53 ^{a,A}	3,54 ^{a,A}	3,56 ^{b,A}	3,55 ^{a,A}	3,55 ^{a,A}	3,55 ^{a,A}
	(0,03)	(0,03)	(0,02)	(0,03)	(0,01)	(0,03)	(0,05)	(0,00)	(0,03)
1.	3,55 ^a	3,55 ^a	3,57 ^a	3,54 ^a	3,58 ^a	3,60 ^{bc}	3,59 ^a	3,57 ^{ab}	3,84 ^b
	(0,03)	(0,03)	(0,04)	(0,02)	(0,02)	(0,02)	(0,05)	(0,02)	(0,03)
2.	3,57 ^a	3,57 ^a	3,56 ^a	3,54 ^a	3,60 ^a	3,62 ^a	3,56 ^a	3,57 ^{ab}	4,54 ^c
	(0,04)	(0,04)	(0,05)	(0,04)	(0,01)	(0,04)	(0,03)	(0,01)	(0,01)
3.	3,53 ^a	3,53 ^a	3,58 ^a	3,56 ^a	3,55 ^a	3,66 ^a	3,55 ^a	3,62 ^b	5,54 ^d
	(0,03)	(0,03)	(0,09)	(0,02)	(0,03)	(0,03)	(0,05)	(0,07)	(0,01)
4.	3,57 ^{a,A}	3,57 ^{a,A}	3,85 ^{b,B}	3,59 ^{a,D}	3,69 ^{b,A}	3,66 ^{a,A}	3,65 ^{a,A}	4,13 ^{c,C}	6,34 ^{c,E}
	(0,04)	(0,04)	(0,12)	(0,06)	(0,08)	(0,02)	(0,01)	(0,02)	(0,04)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

Табела 17. Број *L. monocytogenes* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^4 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на +9 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	12	16	48	57	58	59	60	61	ХБ
0.	4,53 ^{a,A} (0,02)	4,52 ^{a,A} (0,03)	4,53 ^{a,A} (0,02)	4,54 ^{a,A} (0,01)	4,54 ^{a,A} (0,01)	4,53 ^{b,A} (0,02)	4,54 ^{a,A} (0,02)	4,54 ^{a,A} (0,03)	4,54 ^{a,A} (0,02)
1.	4,52 ^a (0,01)	4,58 ^a (0,03)	4,56 ^a (0,01)	4,54 ^a (0,03)	4,56 ^a (0,01)	4,57 ^{bc} (0,03)	4,53 ^a (0,01)	4,71 ^{ab} (0,15)	5,01 ^b (0,00)
2.	4,53 ^a (0,02)	4,53 ^a (0,01)	4,57 ^a (0,03)	4,53 ^a (0,04)	4,66 ^a (0,04)	4,56 ^a (0,02)	4,54 ^a (0,04)	4,66 ^{ab} (0,00)	5,54 ^c (0,02)
3.	4,54 ^a (0,01)	4,54 ^a (0,02)	4,55 ^a (0,04)	4,56 ^a (0,04)	4,83 ^a (0,04)	4,55 ^a (0,04)	4,54 ^a (0,04)	4,69 ^b (0,01)	6,52 ^d (0,04)
4.	4,55 ^{a,A} (0,01)	4,56 ^{a,A} (0,03)	4,94 ^{b,B} (0,03)	4,64 ^{b,D} (0,04)	4,90 ^{b,A} (0,02)	4,55 ^{a,A} (0,02)	4,56 ^{a,A} (0,05)	5,05 ^{c,C} (0,04)	7,51 ^{e,E} (0,01)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Стандардне девијације су дате у заградама. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

Међутим, уколико се погледа брзина умножавања тестираног патогена у хранљивом бујону, раст *L. monocytogenes* у узорцима овог млека био је значајно инхибиран на сва три нивоа контаминације (Табеле 15-17).

Под овим експерименталним условима, антибактеријска активност млека магарице према *L. monocytogenes* практично се састојала у продужењу њене лаг фазе (Табеле 15-17). У огледу са најнижим нивоом контаминације трајање лаг фазе испитиваних узорка је продужено на 96 сати (Табела 15). Изузетак је био узорак 61 у којем је број тестираног патогена почео да расте након 72 сата. У огледу са средњим нивоом контаминације регистрована је слична ситуација, с том разликом што је лаг фаза узорка 48 и 58 трајала 72 сата, а узорка 61 свега 48 сати (Табела 16). Повећањем нивоа контаминације, време трајања лаг фазе за поменуте узорке је остало непромењено, изузев код узорка 57 где је лаг фаза била скраћена за 24 сата (Табела 17). Време трајања лаг фазе *L. monocytogenes* у хранљивом бујону је било краће од 24 сата (Табеле 15-17). Упркос томе што је на +9 °C при вишим нивоима контаминације у узорцима са већим садржајем лизозима регистрована нешто јача инхибиција умножавања *L. monocytogenes* (Табеле 16 и 17), није детектована стриктна зависност инхибиције раста овог патогена од садржаја лизозима у млеку магарице. Најбољи пример за то је узорак 61 у којем је забележен већи број *L. monocytogenes* на крају огледа у односу на узорак 48, иако је узорак 61 имао више него дупло већи садржај лизозима (Табеле 14, 16 и 17). Постоји могућност да на +9 °C лактоферин не игра

значајну улогу у антибактеријској активности млека магарице према *L. monocytogenes*, с обзиром на да је узорак 12 у којем је овај протеин био испод границе детекције, показао сличну антибактеријску активност као узорак 16 који је имао највећу детектовану концентрацију лактоферина (54,3 mg/l) у овом експерименту (Табеле 15-17). Такође није утврђена веза између садржаја калцијума и степена инхибиције раста тестираног соја *L. monocytogenes* (Табеле 14-17). У негативним контролама током трајања експеримента није детектовано присуство *L. monocytogenes*.

4.2.1.2. Антибактеријски тест на +15 °C

У Табелама 18, 19 и 20 приказани су резултати испитивања антибактеријске активности одабраних узорака млека магарице према *L. monocytogenes* на +15 °C за различите нивое контаминације. Слично као у огледу спроведеном на +9 °C, антибактеријска активност млека магарице према *L. monocytogenes* на +15 °C огледала се у инхибирању њеног умножавања. Раст тест микроорганизама био је инхибиран у свим испитиваним узорцима, али се степен инхибиције *L. monocytogenes* у њима разликовао. У огледу са најнижим нивоом контаминације у већини испитаних узорака млека, лаг фаза *L. monocytogenes* је продужена на 48 часова, у поређењу са лаг фазом овог патогена у хранљивом бујону која је била краћа од 24 сата (Табела 18).

Табела 18. Број *L. monocytogenes* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^2 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на +15 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	12	16	48	57	58	59	60	61	ХБ
0.	2,50 ^{a,A} (0,05)	2,51 ^{a,A} (0,04)	2,51 ^{a,A} (0,04)	2,51 ^{a,A} (0,02)	2,51 ^{a,A} (0,03)	2,52 ^{a,A} (0,02)	2,51 ^{a,A} (0,02)	2,51 ^{a,A} (0,02)	2,51 ^{a,A} (0,04)
1.	2,53 ^a (0,03)	2,50 ^a (0,01)	2,56 ^{ab} (0,02)	2,55 ^a (0,04)	2,52 ^a (0,02)	2,50 ^a (0,04)	2,52 ^a (0,04)	2,53 ^a (0,01)	4,04 ^b (0,06)
2.	2,54 ^a (0,01)	2,48 ^a (0,04)	2,61 ^b (0,02)	2,53 ^a (0,04)	2,58 ^b (0,06)	2,56 ^a (0,03)	2,50 ^a (0,00)	2,52 ^a (0,05)	6,00 ^c (0,03)
3.	2,94 ^b (0,00)	2,86 ^b (0,02)	2,99 ^c (0,03)	2,91 ^b (0,02)	2,97 ^c (0,01)	2,89 ^b (0,03)	2,85 ^b (0,01)	3,27 ^b (0,02)	7,76 ^d (0,01)
4.	3,53 ^{c,BC} (0,01)	3,48 ^{c,AB} (0,00)	3,61 ^{d,CD} (0,03)	3,51 ^{c,AB} (0,03)	3,56 ^{d,CD} (0,00)	3,46 ^{c,A} (0,05)	3,50 ^{c,AB} (0,00)	4,36 ^{c,F} (0,06)	8,02 ^{e,E} (0,01)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Стандардне девијације су дате у заградама. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

Табела 19. Број *L. monocytogenes* у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^3 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на $+15$ °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	12	16	48	57	58	59	60	61	ХБ
0.	3,52 ^{a,A} (0,02)	3,54 ^{a,A} (0,02)	3,53 ^{a,A} (0,04)	3,54 ^{a,A} (0,01)	3,53 ^{a,A} (0,03)	3,53 ^{a,A} (0,03)	3,54 ^{a,A} (0,02)	3,51 ^{a,A} (0,01)	3,55 ^{a,A} (0,02)
1.	3,55 ^{ab} (0,03)	3,54 ^a (0,02)	3,56 ^a (0,03)	3,54 ^a (0,01)	3,57 ^a (0,04)	3,52 ^a (0,04)	3,59 ^a (0,00)	3,57 ^a (0,03)	4,08 ^b (0,01)
2.	3,67 ^b (0,10)	3,74 ^b (0,00)	3,68 ^b (0,01)	3,70 ^b (0,04)	3,71 ^b (0,02)	3,62 ^b (0,03)	3,78 ^b (0,03)	3,66 ^b (0,06)	6,28 ^c (0,02)
3.	3,82 ^c (0,04)	3,89 ^c (0,04)	3,80 ^c (0,02)	3,86 ^c (0,01)	3,89 ^c (0,01)	3,79 ^c (0,02)	3,84 ^c (0,03)	4,48 ^c (0,01)	7,83 ^d (0,03)
4.	4,39 ^{d,A} (0,11)	4,00 ^{d,A} (0,00)	4,28 ^{d,A} (0,01)	4,20 ^{d,A} (0,02)	4,18 ^{d,A} (0,02)	4,24 ^{d,A} (0,00)	4,41 ^{d,A} (0,05)	5,64 ^{d,B} (0,03)	8,03 ^{e,C} (0,02)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Стандардне девијације су дате у заградама. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

Након истека овог времена, па све до самог краја инкубирања, број тестираног патогена се повећавао, али знатно спорије у поређењу са растом у хранљивом бујону. У огледу са средњим нивоом контаминације лаг фаза *L. monocytogenes* је у свим тестираним узорцима млека магарице трајала 24 сата (Табела 19), да би повећањем нивоа контаминације код узорака 12, 48 и 61 време трајања лаг фазе *L. monocytogenes* било краће од 24 сата (Табела 20).

Табела 20. Број *L. monocytogenes* у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^4 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на $+15$ °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	12	16	48	57	58	59	60	61	ХБ
0.	4,51 ^{a,A} (0,01)	4,51 ^{a,A} (0,01)	4,50 ^{a,A} (0,02)	4,51 ^{a,A} (0,01)	4,51 ^{a,A} (0,02)	4,50 ^{a,A} (0,02)	4,52 ^{a,A} (0,02)	4,51 ^{a,A} (0,01)	4,52 ^{a,A} (0,01)
1.	4,63 ^b (0,02)	4,52 ^a (0,01)	4,59 ^b (0,05)	4,52 ^a (0,01)	4,54 ^a (0,04)	4,50 ^a (0,04)	4,51 ^a (0,05)	4,55 ^b (0,02)	5,16 ^b (0,03)
2.	4,74 ^c (0,04)	4,58 ^b (0,04)	4,66 ^c (0,03)	4,55 ^b (0,02)	4,60 ^b (0,02)	4,65 ^b (0,01)	4,52 ^b (0,03)	4,60 ^c (0,00)	6,38 ^c (0,01)
3.	4,84 ^d (0,03)	5,00 ^c (0,02)	5,34 ^d (0,01)	4,60 ^c (0,01)	5,14 ^c (0,01)	5,21 ^c (0,04)	5,05 ^c (0,01)	5,12 ^d (0,01)	7,94 ^d (0,01)
4.	5,00 ^{e,B} (0,02)	5,66 ^{d,G} (0,01)	5,72 ^{e,A} (0,01)	5,11 ^{d,C} (0,01)	5,60 ^{d,F} (0,02)	5,54 ^{d,E} (0,03)	5,46 ^{d,D} (0,00)	5,75 ^{e,A} (0,04)	8,12 ^{e,H} (0,10)

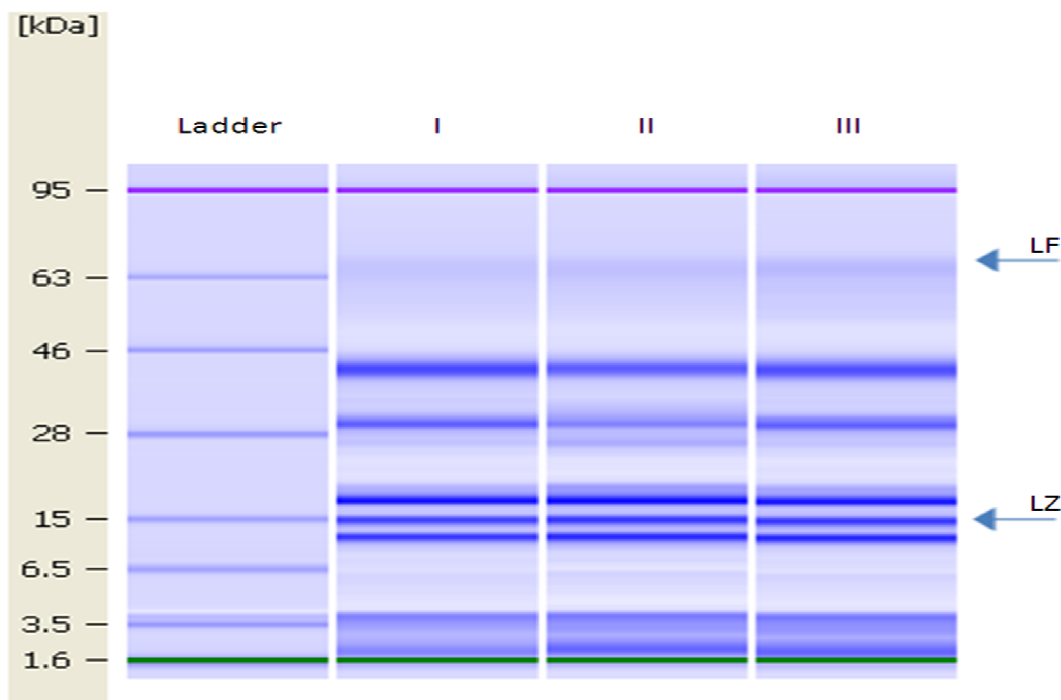
Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

Међутим, након завршетка лаг фазе раст *L. monocytogenes* био је спорији у односу на раст у хранљивом бујону, тако да је извесна антибактеријска активност млека

магарице, иако ослабљена и даље постојала. Степен инхибиције умножавања *L. monocytogenes* на +15 °C није био у строгој корелацији са садржајем лизозима, иако је најмањи број ових бактерија забележен у узорцима са садржајем лизозима већим од 3 g/l. На основу добијених резултата, не може се закључити да постоји веза између садржаја лактоферина и калцијума у тестираним узорцима млека магарице и њихове антибактеријске активности према *L. monocytogenes* (Табеле 14 и 18-20). У негативним контролама током трајања експеримента, није детектовано присуство *L. monocytogenes*.

Лизозим и лактоферин су идентификовани као протеини са молекулским масама од 15 и 78 kDa (Tidona и сар., 2011). Садржај лизозима у тестираним узорцима је био у интервалу од 1,04 до 3,46 g/l, док се концентрација лактоферина налазила у опсегу од 2,9 до 54,3 mg/l (Табела 14). У два узорка лактоферин је био испод границе детекције методе. Различите вредности лизозима добијене у овом истраживању су највероватније резултат ефекта периода лактације музних животиња, будући да су магарице укључене у овај експеримент биле у различитим периодима лактације. Иако је према доступним резултатима истраживања везаних за лактацију магарица вредност протеина сурутке била скоро константна од 60-ог до 150-ог дана *post partum* (Salimei и сар., 2004; Guo и сар., 2007), садржај лизозима се мењао током лактације (Vincenzetti и сар., 2008). На Слици 5. је приказан електрофореграм протеина млека магарице, где су мерења изведена у три независна понављања.

У литератури постоје различити подаци о садржају лизозима у млеку магарице. Његове концентрације варирају од 1 g/l (Vincenzetti и сар., 2008) до 4 g/l (Coppola и сар., 2002), што би могло бити и последица примењених различитих аналитичких метода (Salimei и Fantuz, 2012). Литературни извори о садржају лактоферина у млеку магарице су веома лимитирани. Пошто је лактоферин саставни део протеина сурутке у млеку магарице (Salimei и сар., 2004), његов садржај се мења током лактације.



Слика 5. Електрофореграм протеина млека магарице. Стрелице показују позиције лактоферина (LF) и лизозима (LZ).

Концентрација калцијума у испитиваним узорцима млека била је у интервалу од 391,0 до 864,0 mg/l (Табела 14). Публиковани подаци о садржају макроминерала у млеку магарице су малобројни. Концентрације калцијума детерминисане у овој студији биле су у опсегу претходно утврђених концентрација овог метала у млеку магарица других раса (Salimei и Fantuz, 2012). Различит садржај калцијума присутан у узорцима млека магарице у овој студији највероватније је последица различитих периода лактације којима су узорци припадали. Према налазима Fantuz и сар., (2012) садржај калцијума у млеку магарице се до периода од 116-ог до 142-ог дана лактације смањило за око 30%. Слична тенденција промене садржаја калцијума током лактације је забележена и код кобиљег млека (Summer и сар., 2004).

4.2.1.3. Антибактеријски тест на +38 °C

У Табели 21 приказани су резултати испитивања антибактеријске активности вештачки контаминираних узорака млека магарице (ниво контаминације 10^2 cfu/ml) према *L. monocytogenes* на +38 °C, као и садржаји лизозима, лактоферина и калцијума у испитаним узорцима.

Табела 21. Број *L. monocytogenes* (log cfu/ml) у млеку магарице током 8 сати инкубирања на +38 °C

Време инкубирања (h)	Узорци млека магарице								
	21	22	24	51	52	53	54	55	ХБ
0	2,34 ^{dA} (0,05)	2,30 ^{eA} (0,03)	2,32 ^{dA} (0,03)	2,30 ^{deA} (0,05)	2,31 ^{eA} (0,04)	2,30 ^{dA} (0,04)	2,33 ^{eA} (0,02)	2,30 ^{fA} (0,02)	2,33 ^{aA} (0,04)
1	1,85 ^{aB} (0,04)	1,92 ^{aCD} (0,02)	1,85 ^{aB} (0,04)	1,94 ^{aDE} (0,03)	1,78 ^{aA} (0,00)	1,90 ^{aBCD} (0,05)	1,99 ^{aE} (0,04)	1,87 ^{aBC} (0,03)	2,39 ^{bF} (0,02)
2	2,02 ^{bA} (0,07)	2,00 ^{bA} (0,05)	2,07 ^{bA} (0,06)	2,08 ^{bA} (0,04)	2,04 ^{bA} (0,18)	2,10 ^{eA} (0,08)	2,00 ^{abA} (0,05)	2,11 ^{bA} (0,04)	2,38 ^{abB} (0,02)
3	2,01 ^{bAB} (0,05)	2,08 ^{cBC} (0,04)	2,06 ^{bBC} (0,04)	1,93 ^{aA} (0,08)	2,03 ^{bB} (0,02)	2,09 ^{cBC} (0,03)	2,07 ^{abBC} (0,08)	2,13 ^{cdeC} (0,04)	2,85 ^{cD} (0,03)
4	2,10 ^{bcA} (0,08)	2,11 ^{eA} (0,06)	2,06 ^{bA} (0,09)	2,25 ^{dB} (0,07)	1,97 ^{bA} (0,12)	2,07 ^{bcA} (0,05)	2,10 ^{bA} (0,09)	2,07 ^{bcdA} (0,06)	3,37 ^{dC} (0,01)
5	1,99 ^{abAB} (0,10)	2,09 ^{cBCD} (0,00)	2,02 ^{bABC} (0,04)	2,10 ^{bcCD} (0,05)	1,95 ^{bA} (0,00)	2,03 ^{bcABC} (0,05)	2,05 ^{abABCD} (0,06)	2,15 ^{deD} (0,08)	3,80 ^{eE} (0,00)
6	2,06 ^{bcBC} (0,04)	2,12 ^{cC} (0,03)	2,04 ^{bBC} (0,05)	2,25 ^{dD} (0,07)	1,94 ^{bA} (0,03)	1,98 ^{aAB} (0,06)	2,04 ^{abBC} (0,04)	2,05 ^{bcBC} (0,05)	4,11 ^{fE} (0,07)
7	2,15 ^{cB} (0,07)	2,19 ^{dAB} (0,05)	2,18 ^{cAB} (0,03)	2,20 ^{cdAB} (0,05)	2,25 ^{eA} (0,01)	2,22 ^{dAB} (0,04)	2,25 ^{eA} (0,06)	2,21 ^{eAB} (0,03)	4,54 ^{gC} (0,02)
8	2,35 ^{dAB} (0,03)	2,26 ^{deA} (0,04)	2,30 ^{dAB} (0,03)	2,37 ^{eB} (0,10)	2,27 ^{caB} (0,08)	2,28 ^{dAB} (0,06)	2,33 ^{eAB} (0,04)	2,32 ^{fAB} (0,07)	5,00 ^{hC} (0,01)
LYZ (g/l)	1,74 ^C (0,06)	1,24 ^B (0,07)	3,42 ^E (0,07)	3,52 ^E (0,08)	3,54 ^E (0,09)	1,3 ^B (0,05)	0,67 ^A (0,05)	2,52 ^D (0,07)	-
LF (mg/l)	6,30 ^A (0,60)	н.д.	н.д.	46,45 ^F (0,05)	7,45 ^C (0,25)	4,50 ^B (0,70)	17,40 ^D (0,20)	33,70 ^E (0,30)	-
Ca (mg/l)	980,00 ^H (12,5)	721,30 ^D (16,30)	885,00 ^G (27,50)	765,75 ^E (0,75)	617,50 ^B (12,00)	850,00 ^F (17,50)	363,75 ^A (8,75)	666,41 ^C (0,60)	-

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано; ХБ - хранљиви бујон; LYZ - лизозим; LF - лактоферин; Са - калцијум.

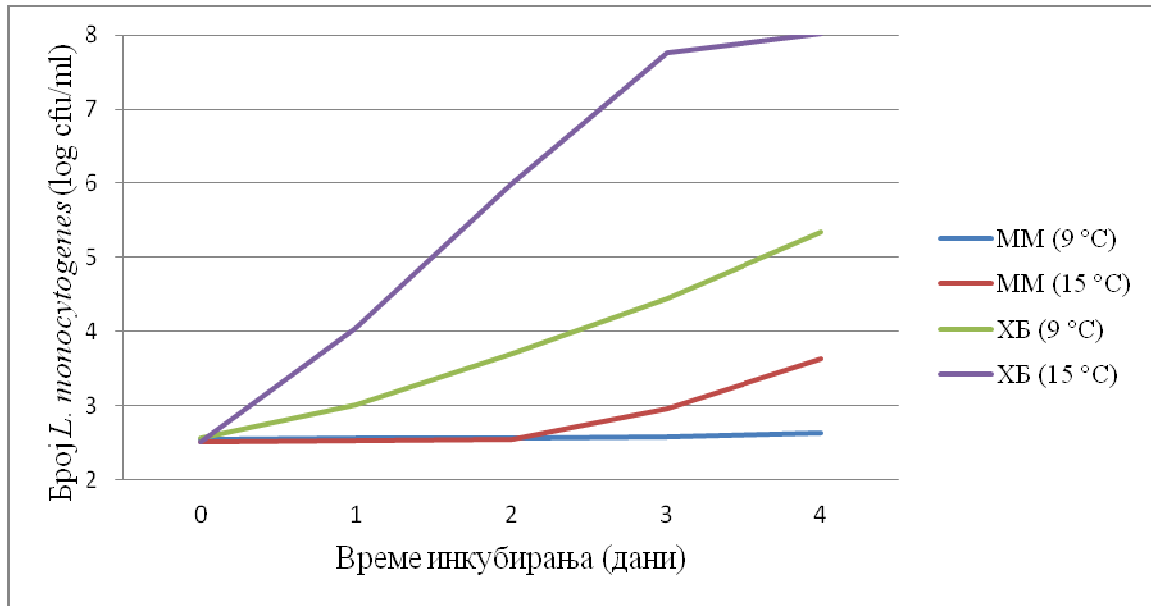
Резултати представљени у Табели 21 указују на антибактеријско дејство испитаних узорака млека магарице према тестираном соју *L. monocytogenes*, с обзиром на да је након 8 сати инкубирања на температури од +38 °C број овог патогена у узорцима млека био значајно мањи ($P < 0,05$) у односу на позитивну контролу. Након првог сата инкубирања број *L. monocytogenes* се у свим испитиваним узорцима млека редуковао на најнижу вредност забележену у огледу. Од тог тренутка до краја експеримента број тест микроорганизама је растао, али је брзина умножавања била знатно спорија у односу на раст у хранљивом бујону. Дакле, изузимајући први сат инкубирања антибактеријска активност млека магарице према *L. monocytogenes* састојала се у успоравању умножавања ових бактерија. Тачније, антимицробне компоненте млека магарице су под овим експерименталним условима практично

продужиле трајање лаг фазе са 2 сата (колико траје лаг фаза у хранљивом бујону) на 8 сати (Табела 21). Корелација инхибиције бактеријског раста и садржаја лизозима, лактоферина и калцијума није регистрована ни у огледу на +38 °C. Један од примера је узорак 22 са садржајем лизозима од 1,24 g/l, у којем је по завршетку инкубирања детектован мањи број *L. monocytogenes* у односу на узорак 51, где је концентрација лизозима износила 3,52 g/l. Узорци 22 и 24 у којима је концентрација лактоферина била испод границе детекције методе, показали су сличан антибактеријски потенцијал узорцима 51 и 55, упркос томе што су они поседовали највећи садржај овог протеина регистрован у испитиваним узорцима у овом огледу (Табела 21). На основу примера узорака 21 и 54 очигледно је да концентрација калцијума није играла значајну улогу у антибактеријској активности млека магарице под овим експерименталним условима.

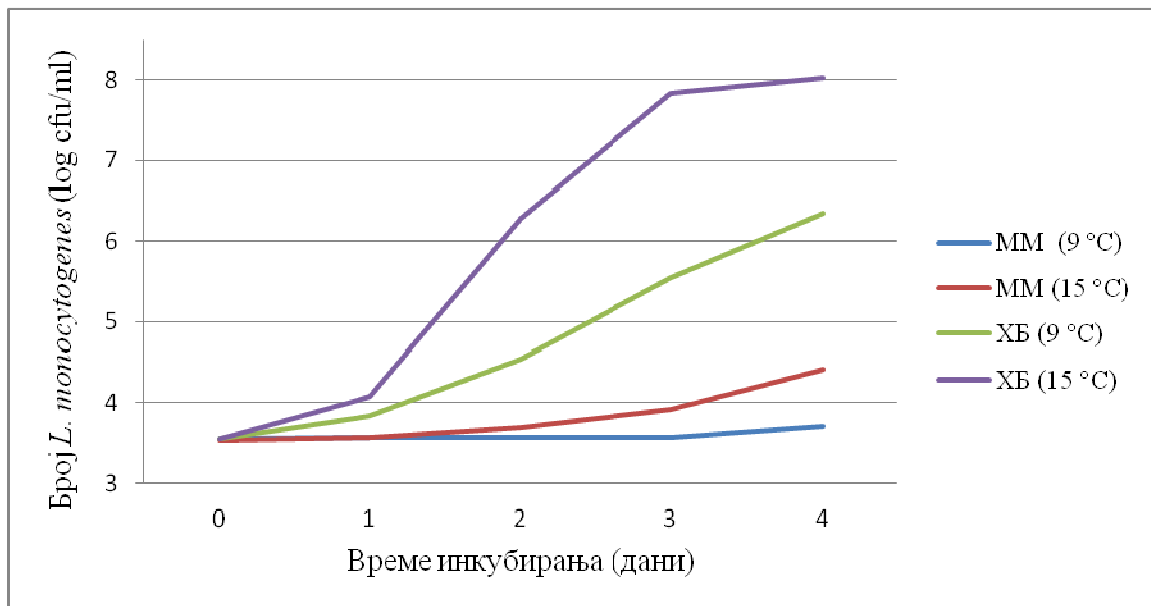
4.2.1.4. Утицај температуре инкубирања и нивоа контаминације на антибактеријска својства млека магарице према *L. monocytogenes*

Резултати антибактеријских испитивања представљени у Табелама 15-20 упућују на значај температуре инкубирања и нивоа контаминације тестираним патогеном на антибактеријску активност млека магарице према *L. monocytogenes*. На Сликама 6-8 приказане су просечне вредности броја *L. monocytogenes* у вештачки контаминираним узорцима млека магарице и хранљивог бујона током 4 дана инкубирања на +9 и +15 °C.

Број *L. monocytogenes* у тестираним узорцима млека магарице је на крају огледа на +15 °C био већи у односу на регистровани број овог патогена на +9 °C, што се може објаснити чињеницом да је температура од +15 °C много повољнија за раст *L. monocytogenes* у односу на 9 °C.

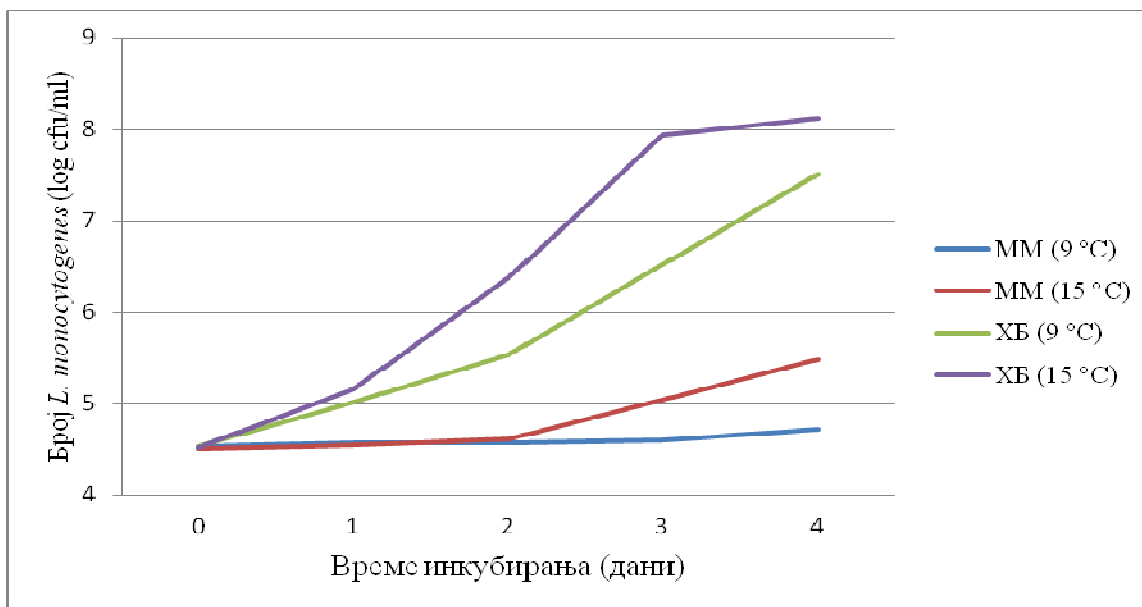


Слика 6. Просечне вредности броја *L. monocytogenes* у тестираним узорцима млека магарице (ММ) и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^2 cfu/ml, током инкубирања на +9 и +15 °C.



Слика 7. Просечне вредности броја *L. monocytogenes* у тестираним узорцима млека магарице (ММ) и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^3 cfu/ml, током инкубирања на +9 и +15 °C.

Услед интензивнијег умножавања *L. monocytogenes* на +15 °С, вероватно се брже трошио антибактеријски капацитет млека магарице. Међутим, уколико се погледају просечне вредности броја *L. monocytogenes* у узорцима млека магарице током првих 48 сати инкубирања на +9 и +15 °С, приказане на Сликама 6-8, види се да су те вредности сличне, за разлику од броја овог патогена у хранљивом бујону на +9 и +15 °С, које се драстично разликују.



Слика 8. Просечне вредности броја *L. monocytogenes* у тестираним узорцима млека магарице (ММ) и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^4 cfu/ml, током инкубирања на +9 и +15 °С.

На пример, на средњем нивоу контаминације на +15 °С, број тестираног соја *L. monocytogenes* у испитиваним узорцима млека је био у интервалу од 3,62 до 3,78 log cfu/ml (Табела 19), док је на +9 °С имао вредност од 3,54 до 3,62 log cfu/ml (Табела 16). Иако је нешто већи број ових бактерија забележен на +15 °С, у прилог снажнијој антибактеријској активности млека магарице на +15 °С иде много већи број *L. monocytogenes* забележен у хранљивом бујону (6,28 log cfu/ml) на овој температури у поређењу са огледом на +9 °С (4,54 log cfu/ml), након 48 сати инкубирања.

Ове чињенице указују на то да је антибактеријска активност млека магарице према *L. monocytogenes* генерално била интензивнија на +15 °С него на +9 °С, али да је била лимитирана бржим умножавањем *L. monocytogenes* на овој температури. Осим тога, +15 °С је повољнија температура и за раст пропратне микробиоте узорака

млека, па и њихово брже умножавање на овој температури вероватно даје извештан допринос слабљењу антибактеријске активности млека магарице током трајања огледа.

Што се тиче утицаја величине бактеријског инокулума на антибактеријску активност млека магарице према *L. monocytogenes*, на обе температуре инкубирања регистрован је очекивани тренд: већа почетна контаминација је значила и већи број овог патогена на крају огледа, односно бржу потрошњу антибактеријског капацитета млека магарице. Конкретно, у случају *L. monocytogenes* код већине испитаних узорака млека магарице, повећање нивоа контаминације је значило скраћење лаг фазе.

4.2.2. Антибактеријска активност млека магарице према *S. aureus*

4.2.2.1. Антибактеријски тест на +9 °C

У Табели 22 приказани су садржаји лизозима, лактоферина и калцијума одређени у узорцима млека магарице коришћеним за антибактеријске тестове према *S. aureus* на +9 и +15 °C. У Табелама 23, 24 и 25 су представљени резултати испитивања антибактеријске активности према *S. aureus* на +9 °C за различите нивое контаминације.

Табела 22. Садржај лизозима (LYZ), лактоферина (LF) и калцијума (Ca) у узорцима млека магарице коришћеним за испитивање антибактеријске активности према *S. aureus* на +9 и +15 °C

	Узорци млека магарице							
	1	10	21	51	52	54	55	56
LYZ	2,24 ^E	1,88 ^D	1,74 ^C	3,52 ^A	3,54 ^A	0,67 ^B	2,52 ^F	3,38 ^G
(g/l)	(0,02)	(0,09)	(0,06)	(0,08)	(0,09)	(0,05)	(0,07)	(0,10)
LF	27,80 ^D	49,80 ^G	6,30 ^A	46,45 ^F	7,45 ^A	17,4 ^B	33,70 ^E	23,9 ^C
(mg/l)	(2,20)	(0,06)	(0,60)	(0,05)	(0,25)	(0,20)	(0,30)	(0,04)
Ca	612,4 ^A	466,10 ^D	980,00 ^G	765,75 ^F	617,50 ^A	363,75 ^B	666,41 ^E	388,00 ^C
(mg/l)	(0,86)	(0,40)	(12,50)	(0,75)	(12,00)	(8,75)	(0,60)	(3,00)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истом реду са различитим малим словима су статистички различите ($P < 0,05$).

Млеко магарице је на +9 °C на нижим нивоима контаминације показало слабо антибактеријско дејство према испитиваном соју *S. aureus* (Табеле 23 и 24). У огледу са нивоом контаминације од 10^2 cfu/ml код већине узорака млека је забележено

продужење лаг фазе испитиваног патогена на 4 дана, у односу на 3 дана колико траје лаг фаза у хранљивом бујону (Табела 23).

Табела 23. Број *S. aureus* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^2 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на +9 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	1	10	21	51	52	54	55	56	ХБ
0.	2,61 ^{a,A} (0,02)	2,62 ^{a,A} (0,04)	2,62 ^{b,A} (0,04)	2,59 ^{a,A} (0,01)	2,61 ^{b,A} (0,03)	2,60 ^{a,A} (0,03)	2,63 ^{c,A} (0,03)	2,59 ^{a,A} (0,03)	2,57 ^{ab,A} (0,02)
1.	2,55 ^a (0,04)	2,61 ^a (0,16)	2,53 ^a (0,03)	2,57 ^a (0,11)	2,54 ^{ab} (0,06)	2,56 ^a (0,03)	2,57 ^{abc} (0,03)	2,53 ^a (0,03)	2,55 ^{ac} (0,04)
2.	2,56 ^a (0,06)	2,54 ^a (0,02)	2,56 ^{ab} (0,02)	2,57 ^a (0,10)	2,54 ^{ab} (0,02)	2,55 ^a (0,04)	2,55 ^{ab} (0,05)	2,53 ^a (0,04)	2,57 ^{ab} (0,08)
3.	2,54 ^a (0,05)	2,52 ^a (0,05)	2,54 ^a (0,04)	2,57 ^a (0,05)	2,53 ^{ab} (0,06)	2,56 ^a (0,01)	2,52 ^a (0,04)	2,51 ^a (0,05)	2,63 ^{bc} (0,02)
4.	2,56 ^{a,A} (0,19)	2,56 ^{a,A} (0,08)	2,57 ^{ab,A} (0,03)	2,57 ^{a,A} (0,03)	2,52 ^{a,A} (0,04)	2,57 ^{a,A} (0,04)	2,59 ^{bc,A} (0,02)	2,59 ^{a,A} (0,08)	2,69 ^{c,B} (0,01)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

Табела 24. Број *S. aureus* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^3 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на +9 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	1	10	21	51	52	54	55	56	ХБ
0.	3,61 ^{a,A} (0,03)	3,60 ^{a,A} (0,03)	3,62 ^{b,A} (0,03)	3,61 ^{a,A} (0,02)	3,62 ^{b,A} (0,04)	3,58 ^{a,A} (0,02)	3,60 ^{a,A} (0,02)	3,62 ^{b,A} (0,02)	3,61 ^{a,A} (0,02)
1.	3,56 ^a (0,02)	3,58 ^a (0,05)	3,54 ^a (0,03)	3,59 ^a (0,06)	3,56 ^{ab} (0,04)	3,53 ^a (0,03)	3,57 ^a (0,02)	3,53 ^a (0,05)	3,61 ^a (0,01)
2.	3,55 ^a (0,05)	3,56 ^a (0,04)	3,56 ^a (0,04)	3,55 ^a (0,03)	3,50 ^a (0,07)	3,54 ^a (0,02)	3,55 ^a (0,06)	3,55 ^a (0,04)	3,62 ^a (0,01)
3.	3,60 ^a (0,08)	3,57 ^a (0,04)	3,55 ^a (0,01)	3,62 ^a (0,02)	3,54 ^{ab} (0,04)	3,57 ^a (0,04)	3,53 ^a (0,01)	3,54 ^a (0,03)	3,70 ^b (0,00)
4.	3,52 ^{a,A} (0,00)	3,56 ^{a,A} (0,10)	3,55 ^{a,A} (0,04)	3,56 ^{a,A} (0,03)	3,55 ^{ab,A} (0,03)	3,52 ^{a,A} (0,05)	3,59 ^{a,A} (0,06)	3,56 ^{ab,A} (0,03)	3,77 ^{c,B} (0,06)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

Иако је на крају огледа код 7 од 8 испитиваних узорака млека магарице забележен нешто нижи број *S. aureus*, тај број се изузев у случају узорка 52, није статистички значајно разликовао ($P > 0,05$) од почетне вредности. Сличан тренд је регистрован и у огледу са средњим нивоом контаминације (Табела 24). У огледу са највишим нивоом контаминације није утврђена статистички значајна разлика ($P > 0,05$) између броја *S. aureus* у тестираним узорцима и хранљивом бујону (Табела 25).

Табела 25. Број *S. aureus* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^4 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на +9 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	1	10	21	51	52	54	55	56	ХБ
0.	4,58 ^{a,A} (0,01)	4,58 ^{a,A} (0,02)	4,59 ^{a,A} (0,02)	4,58 ^{a,A} (0,01)	4,59 ^{a,A} (0,15)	4,59 ^{a,A} (0,01)	4,59 ^{a,A} (0,02)	4,58 ^{a,A} (0,02)	4,57 ^{a,A} (0,02)
1.	4,55 ^a (0,05)	4,55 ^a (0,03)	4,55 ^a (0,04)	4,61 ^a (0,01)	4,57 ^a (0,05)	4,54 ^a (0,02)	4,53 ^a (0,06)	4,57 ^a (0,04)	4,57 ^a (0,00)
2.	4,54 ^a (0,02)	4,56 ^a (0,03)	4,53 ^a (0,03)	4,63 ^a (0,02)	4,57 ^a (0,02)	4,57 ^a (0,05)	4,54 ^a (0,04)	4,56 ^a (0,05)	4,55 ^a (0,05)
3.	4,59 ^a (0,04)	4,52 ^a (0,05)	4,54 ^a (0,05)	4,58 ^a (0,01)	4,54 ^a (0,04)	4,58 ^a (0,02)	4,51 ^a (0,07)	4,53 ^a (0,04)	4,63 ^b (0,03)
4.	4,54 ^{a,A} (0,12)	4,59 ^{a,AB} (0,06)	4,52 ^{a,A} (0,03)	4,71 ^{b,B} (0,08)	4,56 ^{b,B} (0,03)	4,66 ^{b,AB} (0,06)	4,59 ^{a,AB} (0,06)	4,57 ^{a,AB} (0,17)	4,68 ^{c,AB} (0,04)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

Температура инкубирања од +9 °C је генерално неповољна за раст *S. aureus* (*The Food Safety File*, 2008), што се види и из спорог умножавања ових бактерија у хранљивом бујону (Табеле 23-25), тако да ови експериментални услови нису били нарочито погодни за утврђивање инхибиторног дејства млека магарице на раст тестираног соја *S. aureus*.

У овим огледима није регистрована веза између антимикуробне активности испитиваних узорака млека магарице и њиховог садржаја лизозима, лактоферина и калцијума. Наиме, сви тестирани узорци млека су показали исти антибактеријски потенцијал без обзира на различите концентрације лизозима (0,67-3,52 g/l), лактоферина (6,3-49,8 mg/l) и калцијума (363,75-980,0 mg/l) (Табеле 23-25). Коагулаза позитивне стафилококе нису детектоване ни у једној негативној контроли током 4 дана инкубирања на +9 °C.

4.2.2.2. Антибактеријски тест на +15 °C

У Табелама 26, 27 и 28 приказани су резултати испитивања антибактеријске активности одабраних узорака млека магарице према *S. aureus* на +15 °C за различите нивое контаминације. У огледима са нижим нивоима контаминације сви испитивани узорци млека магарице су током 4 дана инкубирања на +15 °C показали инхибиторно дејство према *S. aureus*, с обзиром на забележен спорији раст овог патогена у поређењу са растом у хранљивом бујону (Табеле 26 и 27).

Табела 26. Број *S. aureus* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^2 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на +15 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	1	10	21	51	52	54	55	56	ХБ
0.	2,77 ^{a,A} (0,03)	2,77 ^{a,A} (0,05)	2,77 ^{a,A} (0,04)	2,79 ^{a,A} (0,03)	2,79 ^{a,A} (0,05)	2,81 ^{a,A} (0,02)	2,79 ^{a,A} (0,02)	2,80 ^{a,A} (0,07)	2,78 ^{a,A} (0,04)
1.	2,80 ^a (0,04)	2,81 ^a (0,03)	2,77 ^a (0,04)	2,79 ^a (0,02)	2,81 ^a (0,05)	2,85 ^a (0,02)	2,80 ^a (0,04)	2,78 ^a (0,04)	2,78 ^a (0,03)
2.	3,18 ^b (0,00)	3,15 ^b (0,00)	3,25 ^b (0,04)	2,83 ^b (0,03)	2,84 ^a (0,02)	3,10 ^b (0,01)	3,12 ^c (0,05)	2,70 ^c (0,04)	3,25 ^b (0,02)
3.	3,42 ^c (0,03)	3,24 ^c (0,02)	3,34 ^c (0,01)	2,95 ^c (0,01)	3,02 ^b (0,02)	3,28 ^c (0,03)	3,19 ^b (0,02)	2,98 ^b (0,04)	4,97 ^c (0,01)
4.	3,61 ^{d,E} (0,01)	3,37 ^{d,B} (0,07)	3,53 ^{d,D} (0,02)	3,06 ^{d,A} (0,00)	3,05 ^{b,A} (0,04)	3,41 ^{d,B} (0,04)	3,24 ^{b,C} (0,03)	3,01 ^{b,A} (0,01)	6,14 ^{d,F} (0,01)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

Табела 27. Број *S. aureus* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^3 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на +15 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	1	10	21	51	52	54	55	56	ХБ
0.	3,84 ^{a,A} (0,03)	3,83 ^{a,A} (0,03)	3,80 ^{b,A} (0,03)	3,81 ^{b,A} (0,02)	3,85 ^{b,A} (0,04)	3,85 ^{a,A} (0,03)	3,82 ^{b,A} (0,03)	3,85 ^{b,A} (0,02)	3,84 ^{a,A} (0,02)
1.	3,96 ^b (0,03)	3,94 ^a (0,04)	3,89 ^a (0,04)	3,91 ^c (0,02)	3,94 ^a (0,01)	3,92 ^b (0,00)	3,90 ^a (0,05)	3,95 ^a (0,00)	3,95 ^b (0,05)
2.	4,32 ^c (0,02)	3,86 ^a (0,15)	3,93 ^a (0,02)	3,94 ^d (0,01)	3,96 ^a (0,02)	3,97 ^c (0,04)	3,94 ^a (0,03)	4,00 ^c (0,02)	4,54 ^c (0,03)
3.	4,97 ^d (0,06)	4,52 ^b (0,02)	4,61 ^c (0,00)	3,98 ^a (0,02)	3,96 ^a (0,05)	4,64 ^d (0,01)	4,38 ^c (0,03)	3,95 ^a (0,00)	5,90 ^d (0,03)
4.	5,61 ^{e,G} (0,01)	5,03 ^{c,D} (0,05)	5,09 ^{d,E} (0,02)	4,00 ^{a,A} (0,01)	4,03 ^{c,A} (0,04)	5,23 ^{e,F} (0,02)	4,98 ^{d,C} (0,01)	4,06 ^{d,B} (0,02)	6,27 ^{e,H} (0,01)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

На највећем тестираном нивоу контаминације током првих 48 сати инкубирања регистровано је спорије умножавање *S. aureus* у поређењу са хранљивим бујоном (Табела 28). Констатована чињеница указује на антибактеријско деловање узорка млека магарице према *S. aureus* у почетном периоду инкубирања, које се огледало у инхибицији раста тестираног патогена. Након истека тог времена, антибактеријску активност су поседовали искључиво узорци 51, 52 и 56, у којима се *S. aureus* и на нижим нивоима контаминације најспорије умножавао (Табеле 26 и 27).

Табела 28. Број *S. aureus* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^4 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на $+15$ °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	1	10	21	51	52	54	55	56	ХБ
0.	4,81 ^{a,A} (0,02)	4,82 ^{a,A} (0,03)	4,82 ^{a,A} (0,01)	4,82 ^{a,A} (0,02)	4,83 ^{c,A} (0,02)	4,83 ^{a,A} (0,01)	4,80 ^{a,A} (0,03)	4,82 ^{b,A} (0,01)	4,84 ^{a,A} (0,02)
1.	4,92 ^b (0,00)	4,93 ^a (0,05)	4,96 ^b (0,04)	4,91 ^b (0,01)	4,93 ^a (0,02)	4,95 ^b (0,01)	4,92 ^b (0,00)	5,04 ^a (0,08)	4,94 ^b (0,02)
2.	5,23 ^c (0,11)	5,30 ^b (0,12)	5,39 ^c (0,03)	4,98 ^c (0,00)	4,99 ^a (0,07)	5,44 ^c (0,02)	5,25 ^c (0,01)	5,03 ^a (0,11)	5,90 ^c (0,01)
3.	6,54 ^d (0,01)	6,12 ^c (0,03)	6,20 ^d (0,01)	5,02 ^d (0,01)	5,08 ^b (0,02)	6,17 ^d (0,01)	6,10 ^d (0,02)	5,03 ^a (0,03)	6,16 ^d (0,05)
4.	6,90 ^{e,F} (0,00)	6,49 ^{d,AB} (0,07)	6,52 ^{e,B} (0,02)	5,07 ^{e,C} (0,04)	5,11 ^{b,C} (0,04)	6,55 ^{e,D} (0,00)	6,45 ^{e,A} (0,01)	5,00 ^{d,E} (0,01)	6,47 ^{e,AB} (0,01)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

Насупрот томе, остали узорци више нису били активни, јер је брзина умножавања тестираног патогена у њима била једнака оној у хранљивом бујону. У неколико узорака млека магарице, на крају огледа је забележен већи број *S. aureus* у односу на хранљиви бујон (Табела 28). Иако по завршетку инкубирања на $+15$ °C није доказана егзактна зависност броја *S. aureus* од садржаја лизозима, већи степен инхибиције умножавања овог патогена је детектован у узорцима млека магарице који су имали садржај лизозима већи од 3 g/l (Табеле 22 и 26-28). Корелација антибактеријске активности тестираних узорака млека магарице и садржаја лактоферина и калцијума на $+15$ °C није доказана (Табеле 22 и 26-28). Коагулаза позитивне стафилококе нису детектоване ни у једној негативној контроли током 4 дана инкубирања на $+15$ °C.

4.2.2.3. Антибактеријски тест на $+38$ °C

У Табели 29 приказани су резултати испитивања антибактеријске активности вештачки контаминираних узорака млека магарице (ниво контаминације 10^2 cfu/ml) према *S. aureus* на $+38$ °C, као и садржаји лизозима, лактоферина и калцијума у испитаним узорцима млека.

У испитаним узорцима млека магарице је након 8 сати инкубирања забележен значајно ($P < 0,05$) мањи број тест микроорганизама у поређењу са хранљивим бујоном, што говори у прилог антибактеријског деловања овог млека према *S. aureus*. Лаг фаза је у хранљивом бујону под овим екперименталним условима трајала

3 сата, с обзиром на то да је у том периоду број тестираног соја *S. aureus* остао непромењен.

У 6 од 8 узорака млека магарице лаг фаза је трајала до другог или трећег сата инкубирања, изузев у узорцима 51 и 52, где је током прва три сата регистрован изванредан пораст броја *S. aureus*.

Табела 29. Број *S. aureus* (log cfu/ml) у млеку магарице током 8 сати инкубирања на +38 °C

Време инкубирања (h)	Узорци млека магарице								
	21	22	24	51	52	53	54	55	ХБ
0	2,34 ^{abA} (0,05)	2,33 ^{abA} (0,05)	2,35 ^{aA} (0,05)	2,32 ^{aA} (0,05)	2,30 ^{aA} (0,05)	2,34 ^{bA} (0,05)	2,33 ^{abA} (0,05)	2,32 ^{abA} (0,04)	2,30 ^{aA} (0,05)
1	2,33 ^a (0,07)	2,26 ^a (0,01)	2,34 ^a (0,09)	2,43 ^b (0,04)	2,43 ^b (0,01)	2,22 ^b (0,06)	2,46 ^{ab} (0,10)	2,27 ^a (0,04)	2,25 ^a (0,04)
2	2,28 ^a (0,02)	2,27 ^{ab} (0,09)	2,32 ^a (0,01)	2,45 ^b (0,04)	2,44 ^b (0,00)	2,18 ^a (0,03)	2,27 ^a (0,05)	2,25 ^a (0,07)	2,26 ^a (0,06)
3	2,28 ^a (0,06)	2,35 ^{ab} (0,04)	2,57 ^b (0,03)	2,48 ^{bc} (0,02)	2,44 ^b (0,02)	2,28 ^{ab} (0,06)	2,35 ^{ab} (0,03)	2,41 ^c (0,03)	2,30 ^a (0,00)
4	2,71 ^b (0,01)	2,27 ^{ab} (0,06)	2,60 ^b (0,12)	2,52 ^{bc} (0,04)	2,56 ^c (0,02)	2,49 ^c (0,06)	2,40 ^{ab} (0,13)	2,38 ^{bc} (0,05)	2,70 ^b (0,00)
5	2,71 ^b (0,21)	2,26 ^a (0,24)	3,21 ^a (0,06)	2,55 ^c (0,03)	2,52 ^c (0,10)	2,53 ^c (0,19)	2,75 ^b (0,05)	2,70 ^d (0,01)	3,71 ^c (0,02)
6	2,87 ^b (0,09)	2,28 ^{ab} (0,20)	3,64 ^c (0,03)	2,57 ^c (0,02)	2,68 ^d (0,05)	2,85 ^d (0,00)	3,07 ^b (0,10)	3,00 ^e (0,04)	4,39 ^d (0,09)
7	3,57 ^c (0,11)	2,48 ^b (0,00)	3,92 ^d (0,03)	3,06 ^d (0,02)	3,45 ^e (0,02)	3,14 ^e (0,01)	3,37 ^c (0,02)	3,33 ^f (0,03)	5,39 ^e (0,09)
8	3,90 ^{dD} (0,09)	3,00 ^{cA} (0,01)	3,92 ^{dD} (0,03)	3,29 ^{dB} (0,11)	3,85 ^{TD} (0,02)	3,30 ^{TB} (0,05)	3,83 ^{dD} (0,03)	3,70 ^{gC} (0,04)	6,84 ^{TE} (0,06)
LYZ (g/l)	1,74 ^C (0,06)	1,24 ^B (0,07)	3,42 ^E (0,07)	3,52 ^E (0,08)	3,54 ^E (0,09)	1,3 ^B (0,05)	0,67 ^A (0,05)	2,52 ^D (0,07)	-
LF (mg/l)	6,30 ^A (0,60)	н.д.	н.д.	46,45 ^F (0,05)	7,45 ^C (0,25)	4,50 ^B (0,70)	17,40 ^D (0,20)	33,70 ^E (0,30)	-
Ca (mg/l)	980,00 ^H (12,5)	721,30 ^D (16,30)	885,00 ^G (27,50)	765,75 ^E (0,75)	617,50 ^B (12,00)	850,00 ^F (17,50)	363,75 ^A (8,75)	666,41 ^C (0,60)	-

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано; ХБ - хранљиви бујон; LYZ - лизозим; LF - лактоферин; Са - калцијум.

Међутим, без обзира на забележене разлике између тестираних узорак млека током прва три сата огледа, након истека тог времена број тест микроорганизама је до краја експеримента наставио да расте, али много мањом брзином у односу на позитивну контролу. Након 8 сати инкубирања најмањи број тестираног соја *S. aureus* регистрован је у узорцима 51, 53 и 22 у којима је лизозим био у опсегу од 1,24 до 3,52 g/l.

На крају огледа број *S. aureus* је у узорцима млека био у интервалу од 3,00 до 3,92 log cfu/ml, док је у хранљивом бујону достигао вредност од 6,84 log cfu/ml. То значи да се антимикуробна активност млека магарице према *S. aureus* на +38 °C огледала у инхибицији, односно успоравању његовог раста. У овом огледу није утврђена веза између степена инхибиције умножавања *S. aureus* у тестираним узорцима млека магарице и њиховог садржаја лизозима, лактоферина и калцијума. Коагулаза позитивне стафилококе нису детектоване у негативним контролама током 8 сати инкубирања.

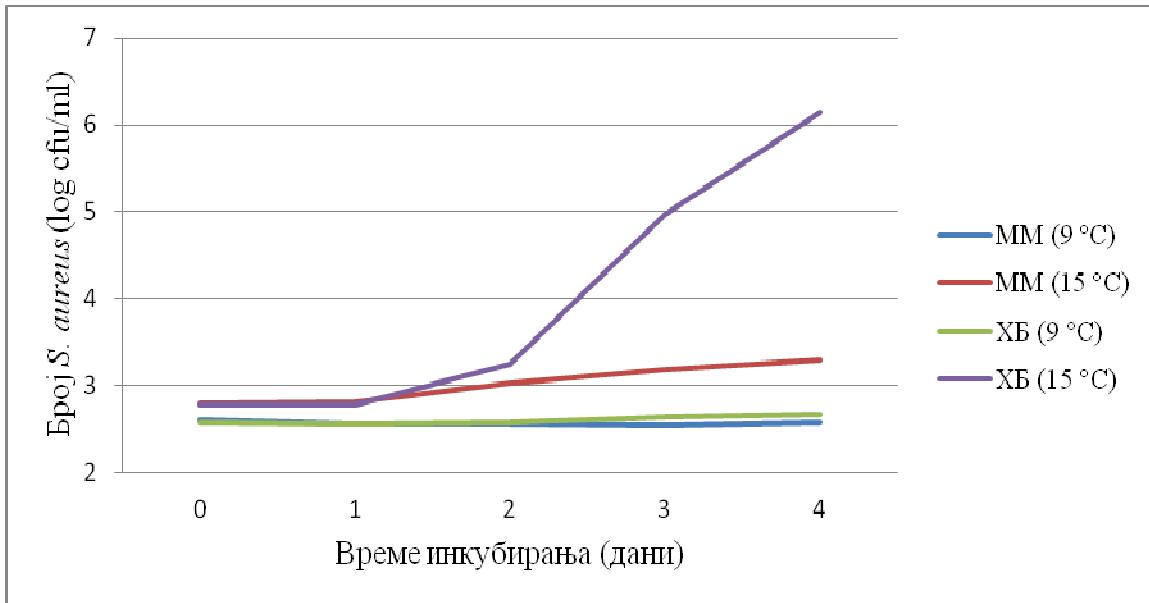
4.2.2.4. Утицај температуре инкубирања и нивоа контаминације на антибактеријска својства млека магарице према *S. aureus*

Резултати антибактеријских испитивања добијени у овој докторској дисертацији указују на значај температуре инкубирања и величине бактеријског инокулума на антибактеријску активност млека магарице према *S. aureus*.

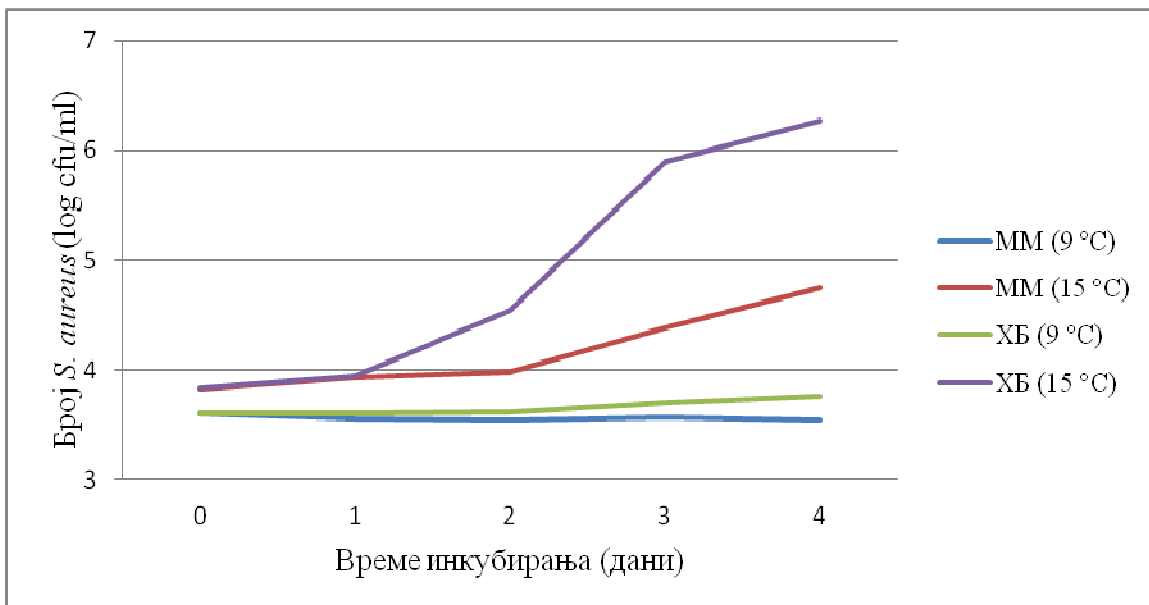
На Сликама 9-11 приказане су просечне вредности броја *S. aureus* у испитиваним узорцима млека магарице и хранљивом бујону (ХБ) на тестираним нивоима контаминације, током инкубирања на +9 и +15 °C.

Мањи просечан број *S. aureus* забележен у узорцима млека магарице на +9 °C не значи његову јачу антибактеријску активност под овим експерименталним условима, већ се ради о споријој брзини умножавања *S. aureus* на овој температури (Слике 9-11).

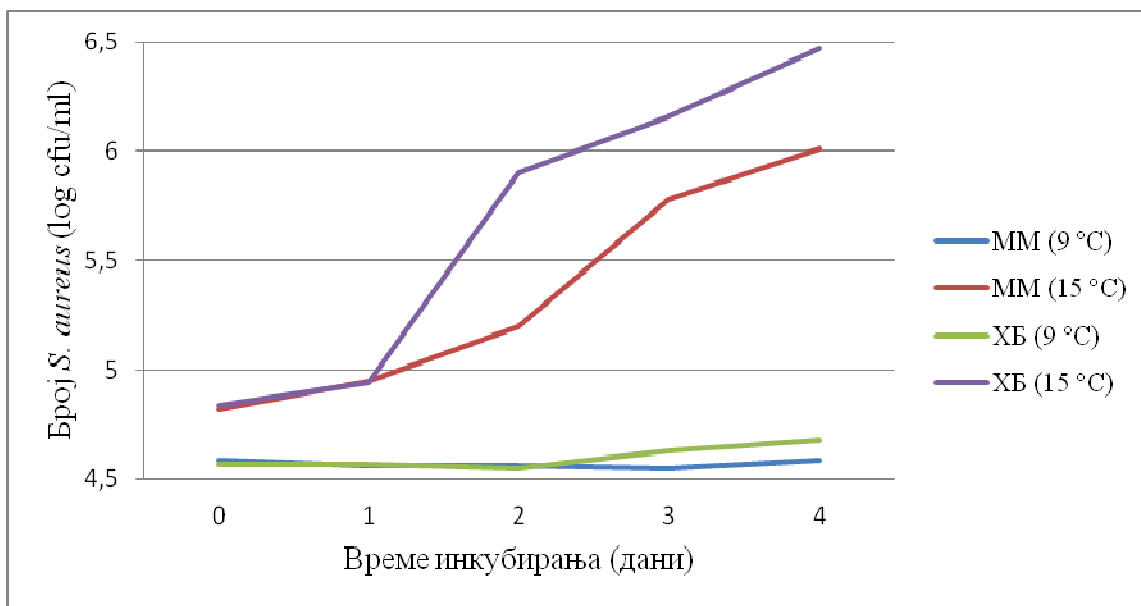
Ако се упореди разлика у брзини умножавања *S. aureus* у хранљивом бујону и узорцима млека магарице на +9 и на +15 °C, очигледно је да је антибактеријска активност млека магарице била интензивнија на +15 °C (Слике 9-11).



Слика 9. Просечне вредности броја *S. aureus* у тестираним узорцима млека магарице (ММ) и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^2 cfu/ml, током инкубирања на +9 и +15 °C.



Слика 10. Просечне вредности броја *S. aureus* у тестираним узорцима млека магарице (ММ) и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^3 cfu/ml, током инкубирања на +9 и +15 °C.



Слика 11. Просечне вредности броја *S. aureus* у тестираним узорцима млека магарице (ММ) и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^4 cfu/ml, током инкубирања на +9 и +15 °C.

На температури инкубирања од +15 °C са повећањем нивоа контаминације регистровано је смањење разлике у брзини умножавања *S. aureus* у узорцима млека и хранљивом бујону. Температура инкубирања од +15 °C је много повољнија за раст испитиваног соја *S. aureus* у поређењу са температуром од +9 °C (Слике 9-11), што (у случају већег почетног броја *S. aureus*) највероватније доводи до брже потрошње антибактеријског потенцијала млека магарице на +15 °C.

4.2.3. Антибактеријска активност млека магарице према *Salmonella* spp.

4.2.3.1. Антибактеријски тест на +9 °C

У Табели 30 дати су садржаји лизозима, лактоферина и калцијума одређени у узорцима млека магарице који су коришћени за антибактеријске тестове према *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* на +9 °C. У Табелама 31, 32 и 33 приказани су резултати испитивања антибактеријске активности према *S. Enteritidis* на +9 °C за различите нивое контаминације.

Резултати испитивања антибактеријске активности узорака млека магарице према *S. Enteritidis* на +9 °C указују на зависност те активности од садржаја калцијума у узорцима млека (Табеле 30-33). Највећи степен смањења броја *S. Enteritidis* након 96

сати инкубирања, регистрован је у узорцима са највећом концентрацијом овог метала (узорци 15 и 19). Број тест микроорганизама се у поменутиим узорцима код сва три нивоа контаминације смањивао током 4 дана инкубирања, што у осталим узорцима није био случај. *S. Enteritidis* узорцима 15 и 19 није била детектована по завршетку инкубирања у огледу са најнижим нивоом контаминације (Табела 31).

Узорак 10 је у односу на друге тестиране узорке имао најнижи садржај калцијума (Табела 30) и једини није показао антибактеријско дејство према *S. Enteritidis* под дефинисаним експерименталним условима (Табеле 31-33). Узорци 6 и 23 такође су имали нижи садржај калцијума, а инхибиторни ефекат су испољили само у огледу са најнижим нивоом контаминације (Табела 31).

Табела 30. Садржај лизозима (LYZ), лактоферина (LF) и калцијума (Ca) у узорцима млека магарице коришћеним за испитивање антибактеријске активности према *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* на +9 °C

Узорци млека магарице								
	6	10	15	19	20	22	23	24
LYZ	1,00 ^B	1,88 ^D	2,70 ^A	3,19 ^E	4,14 ^G	1,24 ^C	2,83 ^A	3,42 ^F
(g/l)	(0,06)	(0,07)	(0,08)	(0,05)	(0,12)	(0,07)	(0,07)	(0,07)
LF	н.д.	49,80 ^C	н.д.	28,70 ^A	38,70 ^B	н.д.	н.д.	н.д.
(mg/l)	н.д.	(1,40)	н.д.	(1,00)	(0,16)	н.д.	н.д.	н.д.
Ca	655,60 ^A	466,10 ^C	961,30 ^F	903,75 ^B	845,00 ^E	721,25 ^D	665,00 ^A	885,00 ^B
(mg/l)	(3,08)	(0,40)	(3,75)	(1,25)	(12,5)	(16,25)	(27,50)	(27,50)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истом реду са различитим малим словима су статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано.

Табела 31. Број *S. Enteritidis* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^2 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на +9 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	6	10	15	19	20	22	23	24	ХБ
0.	2,38 ^{b,A}	2,39 ^{b,A}	2,38 ^{c,A}	2,38 ^{a,A}	2,39 ^{c,A}	2,39 ^{b,A}	2,38 ^{b,A}	2,39 ^{a,A}	2,38 ^{a,A}
	(0,04)	(0,03)	(0,06)	(0,03)	(0,05)	(0,05)	(0,05)	(0,04)	(0,04)
1.	2,26 ^a	2,20 ^a	2,06 ^b	2,33 ^a	2,25 ^b	2,49 ^b	2,23 ^a	2,47 ^b	2,38 ^a
	(0,04)	(0,02)	(0,06)	(0,45)	(0,07)	(0,09)	(0,03)	(0,08)	(0,03)
2.	2,24 ^a	2,21 ^a	1,48 ^a	1,46 ^c	2,26 ^b	2,04 ^a	2,22 ^a	2,40 ^{ab}	2,39 ^a
	(0,02)	(0,05)	(0,00)	(0,15)	(0,08)	(0,21)	(0,09)	(0,00)	(0,02)
3.	2,52 ^c	2,68 ^c	1,36 ^a	1,00 ^b	2,00 ^a	2,08 ^a	2,54 ^c	2,41 ^{ab}	2,39 ^a
	(0,05)	(0,03)	(0,01)	(0,00)	(0,04)	(0,04)	(0,01)	(0,01)	(0,01)
4.	2,77 ^{d,B}	2,90 ^{d,C}	н.д.	н.д.	1,97 ^{a,D}	2,14 ^{a,A}	2,70 ^{d,B}	2,19 ^{c,A}	2,97 ^{b,C}
	(0,06)	(0,05)	н.д.	н.д.	(0,03)	(0,12)	(0,03)	(0,01)	(0,04)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано; ХБ - хранљиви бујон.

У овим узорцима број тестираног патогена се редуковао током прва 24 сата, затим био константан до 48-ог сата инкубирања, да би након тога почео лагано да расте. Међутим, антибактеријске компоненте у овом млеку, очигледно су успоравале раст *S. Enteritidis*, јер је након 96 сати инкубирања забележен мањи број овог микроорганизма у тестираним узорцима у односу на хранљиви бујон (Табела 31). У узорцима 22, 20 и 24, (са садржајем калцијума од 721,25 до 885,0 mg/l) број *S. Enteritidis* је након 96 сати, био значајно мањи од броја овог патогена у позитивним контролама (Табеле 31-33).

Табела 32. Број *S. Enteritidis* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^3 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на +9 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	6	10	15	19	20	22	23	24	ХБ
0.	3,37 ^{a,A} (0,03)	3,37 ^{a,A} (0,01)	3,38 ^{d,A} (0,03)	3,36 ^{e,A} (0,03)	3,38 ^{e,A} (0,04)	3,36 ^{a,A} (0,03)	3,37 ^{b,A} (0,02)	3,39 ^{b,A} (0,03)	3,38 ^{a,A} (0,02)
1.	3,25 ^b (0,02)	3,35 ^a (0,04)	3,07 ^c (0,04)	3,14 ^d (0,02)	3,25 ^d (0,01)	3,31 ^a (0,03)	3,28 ^a (0,01)	3,40 ^b (0,00)	3,38 ^a (0,03)
2.	3,38 ^a (0,04)	3,42 ^a (0,03)	2,33 ^b (0,31)	2,43 ^c (0,03)	3,14 ^c (0,01)	3,26 ^{ab} (0,05)	3,00 ^{ab} (0,09)	2,40 ^c (0,00)	3,40 ^a (0,02)
3.	3,67 ^c (0,02)	4,21 ^b (0,61)	2,23 ^{ab} (0,03)	2,05 ^b (0,14)	2,89 ^b (0,04)	3,19 ^{ab} (0,02)	3,72 ^c (0,02)	3,23 ^a (0,00)	3,47 ^a (0,11)
4.	3,95 ^{d,AB} (0,03)	4,07 ^{b,B} (0,00)	2,00 ^{a,E} (0,00)	1,67 ^{a,D} (0,19)	2,51 ^{a,F} (0,07)	3,13 ^{b,C} (0,19)	3,91 ^{d,AB} (0,00)	3,22 ^{a,C} (0,06)	3,89 ^{b,A} (0,04)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

Табела 33. Број *S. Enteritidis* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^4 cfu/ml) током 96 сати складиштења на +9 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	6	10	15	19	20	22	23	24	ХБ
0.	4,38 ^{a,A} (0,02)	4,39 ^{a,A} (0,02)	4,38 ^{d,A} (0,02)	4,38 ^{e,A} (0,03)	4,40 ^{d,A} (0,01)	4,39 ^{d,A} (0,01)	4,38 ^{a,A} (0,01)	4,37 ^{a,A} (0,02)	4,38 ^{a,A} (0,02)
1.	4,37 ^a (0,04)	4,39 ^a (0,03)	4,10 ^c (0,04)	4,08 ^d (0,02)	4,26 ^a (0,00)	4,30 ^a (0,01)	4,36 ^a (0,02)	4,40 ^a (0,10)	4,37 ^a (0,03)
2.	4,41 ^a (0,02)	4,56 ^b (0,01)	2,98 ^b (0,02)	3,65 ^c (0,04)	4,19 ^a (0,07)	4,06 ^b (0,02)	4,45 ^b (0,01)	4,33 ^a (0,01)	4,39 ^a (0,01)
3.	4,68 ^b (0,04)	4,74 ^c (0,02)	2,93 ^{ab} (0,03)	3,10 ^b (0,02)	4,02 ^c (0,06)	4,15 ^c (0,00)	4,65 ^c (0,01)	3,23 ^b (0,03)	4,64 ^b (0,01)
4.	4,91 ^{c,A} (0,06)	4,93 ^{d,A} (0,04)	2,87 ^{a,D} (0,09)	2,49 ^{a,C} (0,04)	3,89 ^{b,E} (0,02)	4,26 ^{a,B} (0,07)	4,82 ^{d,A} (0,05)	4,13 ^{c,B} (0,18)	4,90 ^{c,A} (0,02)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

Под овим експерименталним условима није утврђена директна веза између садржаја лизозима, лактоферина и антибактеријске активности испитиваних узорака млека магарице према *S. Enteritidis*.

На пример, узорак 19 је показао снажнију антибактеријску активност у односу на узорак 20, иако је имао значајно нижи садржај лизозима (Табеле 30 и 32). Исти је случај био са узорцима 22 и 23 (Табеле 30 и 32). Слично томе, узорак 15 је испољио снажну антибактеријску активност у поређењу са узорком 10 (који није деловао антибактеријски), без обзира на то што у узорку 15 лактоферин није детектован, док је у узорку 10 имао највећу вредност забележену у овом огледу (Табеле 30, 32 и 33). Током 4 дана инкубирања на +9 °C *Salmonella* spp. није детектована ни у једној негативној контроли.

У Табелама 34, 35 и 36 приказани су резултати испитивања антибактеријске активности одабраних узорака млека магарице према *S. Typhimurium* на +9 °C за различите нивое контаминације.

Најјачи антибактеријски потенцијал према *S. Typhimurium* регистрован је у узорцима млека са највећим садржајем калцијума (узорци 15, 19 и 20). У овим узорцима се у огледима на сва три тестирана нивоа контаминације број *S. Typhimurium* смањивао од почетка до краја експеримента (Табеле 34-36).

Табела 34. Број *S. Typhimurium* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^2 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на +9 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	6	10	15	19	20	22	23	24	ХБ
0.	2,18 ^{c,A} (0,05)	2,15 ^{a,A} (0,03)	2,17 ^{d,A} (0,06)	2,16 ^{b,A} (0,04)	2,18 ^{c,A} (0,03)	2,18 ^{b,A} (0,03)	2,15 ^{a,A} (0,05)	2,16 ^{d,A} (0,04)	2,16 ^{a,A} (0,06)
1.	2,14 ^c (0,04)	2,17 ^a (0,03)	1,43 ^c (0,10)	1,00 ^a (0,00)	1,00 ^b (0,00)	2,01 ^b (0,02)	2,11 ^a (0,07)	1,88 ^a (0,03)	2,15 ^a (0,11)
2.	2,10 ^{ab} (0,03)	2,15 ^a (0,03)	1,30 ^b (0,00)	0,94 ^a (0,06)	0,30 ^a (0,00)	1,67 ^a (0,06)	2,16 ^a (0,02)	1,86 ^a (0,03)	2,50 ^b (0,07)
3.	2,08 ^{ab} (0,04)	2,16 ^a (0,04)	0,30 ^a (0,00)	н.д.	н.д.	1,55 ^a (0,05)	2,08 ^a (0,04)	1,26 ^c (0,24)	3,05 ^c (0,01)
4.	2,05 ^{a,A} (0,04)	2,12 ^{a,A} (0,05)	н.д.	н.д.	н.д.	1,52 ^{a,C} (0,34)	1,98 ^{b,A} (0,03)	1,00 ^{b,B} (0,00)	3,76 ^{d,D} (0,07)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано; ХБ - хранљиви бујон.

Табела 35. Број *S. Typhimurium* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^3 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на $+9$ °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	6	10	15	19	20	22	23	24	ХБ
0.	3,18 ^{a,A} (0,03)	3,16 ^{a,A} (0,05)	3,17 ^{d,A} (0,05)	3,17 ^{d,A} (0,04)	3,18 ^{d,A} (0,04)	3,18 ^{a,A} (0,07)	3,18 ^{a,A} (0,03)	3,17 ^{a,A} (0,07)	3,18 ^{a,A} (0,05)
1.	3,17 ^a (0,03)	3,12 ^a (0,04)	2,68 ^c (0,03)	2,18 ^c (0,07)	1,78 ^c (0,00)	3,15 ^a (0,02)	3,14 ^a (0,02)	3,13 ^a (0,01)	3,19 ^a (0,04)
2.	3,16 ^a (0,01)	3,15 ^a (0,03)	2,28 ^b (0,05)	1,74 ^b (0,13)	1,00 ^b (0,00)	3,13 ^a (0,02)	3,14 ^a (0,01)	3,15 ^a (0,03)	3,61 ^b (0,02)
3.	3,27 ^b (0,02)	3,31 ^b (0,02)	1,78 ^a (0,00)	1,20 ^a (0,17)	0,69 ^a (0,09)	3,16 ^a (0,01)	3,18 ^a (0,03)	3,13 ^a (0,03)	4,06 ^c (0,04)
4.	3,50 ^{c,D} (0,04)	3,64 ^{c,E} (0,05)	н.д.	н.д.	н.д.	3,15 ^{a,B} (0,09)	3,38 ^{b,C} (0,07)	3,26 ^{b,A} (0,04)	4,68 ^{d,F} (0,01)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано; ХБ - хранљиви бујон.

Табела 36. Број *S. Typhimurium* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^4 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на $+9$ °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	6	10	15	19	20	22	23	24	ХБ
0.	4,16 ^{a,A} (0,02)	4,18 ^{a,A} (0,03)	4,18 ^{e,A} (0,05)	4,17 ^{e,A} (0,02)	4,19 ^{e,A} (0,02)	4,17 ^{a,A} (0,02)	4,19 ^{a,A} (0,02)	4,17 ^{a,A} (0,02)	4,18 ^{a,A} (0,03)
1.	4,15 ^a (0,03)	4,16 ^a (0,03)	3,71 ^d (0,00)	3,72 ^d (0,01)	3,96 ^d (0,06)	4,17 ^a (0,01)	4,14 ^a (0,03)	4,15 ^a (0,05)	4,20 ^a (0,01)
2.	4,18 ^a (0,04)	4,17 ^a (0,03)	3,41 ^c (0,00)	2,72 ^c (0,03)	2,13 ^b (0,14)	4,16 ^a (0,05)	4,17 ^a (0,03)	4,15 ^a (0,04)	4,56 ^b (0,05)
3.	4,43 ^b (0,03)	4,42 ^b (0,04)	2,72 ^b (0,08)	2,18 ^b (0,00)	1,62 ^c (0,28)	4,17 ^a (0,02)	4,34 ^b (0,03)	4,15 ^a (0,03)	5,12 ^c (0,04)
4.	4,60 ^{c,A} (0,01)	4,70 ^{c,A} (0,03)	1,94 ^{a,D} (0,27)	1,45 ^{a,B} (0,03)	1,51 ^{a,B} (0,03)	4,16 ^{a,C} (0,03)	4,54 ^{c,A} (0,02)	4,17 ^{a,C} (0,03)	5,78 ^{d,E} (0,00)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

Под овим експерименталним условима однос антибактеријске активности узорака млека магарице и садржаја калцијума требало је посматрати и у контексту садржаја лизозима.

На пример, узорак 24 је у поређењу са узорком 20 испољио значајно слабије антибактеријско дејство, иако је поседовао већу концентрацију калцијума (Табеле 35 и 36). Међутим, узорак 20 је имао ванредно висок садржај лизозима (4,14 g/l). Антибактеријска активност узорака млека магарице са нижим садржајем калцијума

(466,1-665,0 mg/l), огледала се у инхибицији раста *S. Typhimurium* током 96, 72 или 48 сати, у зависности од нивоа контаминације (Табеле 34-36).

Поред тога што је број овог микроорганизма након тог времена почео да расте, антибактеријска једињења поменутих узорака млека су очигледно и даље била активна, јер је брзина умножавања *S. Typhimurium* до краја огледа била знатно спорија у односу на позитивну контролу. Узорци млека са већим садржајем лизозима су на +9 °C углавном показали јачу антибактеријску активност, али су то истовремено били и узорци са највећим садржајем калцијума (Табеле 34-36). Лактоферин није детектован у 5 од 8 испитаних узорака. У три преостала узорка био је у интервалу од 28,7 до 49,8 mg/l (Табела 30). На основу резултата овог огледа не може се тврдити да постоји веза између садржаја лактоферина и антибактеријске активности млека магарице према *S. Typhimurium*. Тако је на пример у једном од три испитана узорка са најјачом антибактеријском активношћу лактоферин био испод границе детекције (Табеле 30 и 34-36), док је узорак 10 са концентрацијом овог ензима од 49,8 mg/l поседовао слабији антибактеријски потенцијал од узорака 15, 22 и 24, иако лактоферин у њима није детектован (Табела 30). Током 4 дана инкубирања на +9 °C *Salmonella* spp. није детектована ни у једној негативној контроли.

4.2.3.2. Антибактеријски тест на +15 °C

У Табели 37 приказани су садржаји лизозима, лактоферина и калцијума одређени у узорцима млека магарице који су коришћени за антибактеријске тестове према *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* на +15 °C. У Табелама 38, 39 и 40 приказани су резултати испитивања антибактеријске активности одабраних узорака млека магарице према *S. Enteritidis* на +15 °C за различите нивое контаминације.

Најјаче антибактеријско дејство млека магарице према испитиваном соју *S. Enteritidis*, забележено је у огледу са најнижим нивоом контаминације, где у узорцима са највећим садржајем калцијума (узорци 32, 40, 19, 38), присуство тест микроорганизма није детектовано након 24, 72, односно 96 сати инкубирања (Табела 38). У узорцима који су имали значајно мањи садржај овог метала (529,4-665,0 mg/l), број *S. Enteritidis* је од почетка инкубирања константно растао, али много спорије него што је то био случај у хранљивом бујону (Табела 38). У експериментима са

вишим нивоима контаминације антибактеријска активност свих тестираних узорака млека магарице се огледала у успоравању умножавања *S. Enteritidis* (Табеле 39 и 40).

Табела 37. Садржај лизозима (LYZ), лактоферина (LF) и калцијума (Ca) у узорцима млека магарице коришћеним за испитивање антибактеријске активности према *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* на +15 °C

	Узорци млека магарице							
	3	19	23	32	38	39	40	41
LYZ (g/l)	3,12 ^A (0,02)	3,19 ^F (0,05)	2,83 ^E (0,04)	2,47 ^C (0,11)	3,61 ^G (0,04)	2,67 ^D (0,06)	3,02 ^A (0,02)	2,00 ^B (0,09)
LF (mg/l)	н.д.	28,70 ^C (1,00)	н.д.	22,80 ^A (0,65)	н.д.	34,30 ^D (0,60)	23,20 ^A (0,20)	15,80 ^B (0,08)
Ca (mg/l)	529,4 ^C (5,88)	903,75 ^A (1,25)	665,00 ^E (27,50)	986,25 ^B (13,75)	903,00 ^A (2,50)	752,50 ^F (20,00)	1004,0 ^B (4,00)	592,35 ^D (0,85)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истом реду са различитим малим словима су статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано.

Табела 38. Број *S. Enteritidis* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^2 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на +15 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	3	19	23	32	38	39	40	41	ХБ
0.	2,38 ^{b,A} (0,04)	2,39 ^{c,A} (0,03)	2,40 ^{a,A} (0,03)	2,41 ^A (0,03)	2,41 ^{b,A} (0,04)	2,41 ^{d,A} (0,03)	2,39 ^{c,A} (0,04)	2,40 ^{a,A} (0,04)	2,39 ^{a,A} (0,04)
1.	2,77 ^c (0,02)	1,85 ^b (0,29)	2,71 ^b (0,01)	н.д.	1,32 ^a (0,28)	1,64 ^a (0,15)	1,86 ^b (0,24)	2,80 ^b (0,02)	3,13 ^b (0,08)
2.	2,96 ^a (0,04)	0,30 ^a (0,24)	3,00 ^c (0,00)	н.д.	1,24 ^a (0,04)	1,73 ^{ab} (0,12)	0,48 ^a (0,15)	3,11 ^c (0,02)	4,61 ^c (0,18)
3.	3,02 ^a (0,02)	н.д.	3,05 ^d (0,05)	н.д.	1,24 ^a (0,01)	1,85 ^b (0,13)	н.д.	3,29 ^d (0,04)	7,38 ^d (0,02)
4.	3,60 ^{d,A} (0,04)	н.д.	3,65 ^{e,A} (0,01)	н.д.	н.д.	2,16 ^{c,B} (0,01)	н.д.	3,87 ^{e,C} (0,03)	8,19 ^{e,C} (0,10)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано; ХБ - хранљиви бујон.

Међутим, и овде је најјачи ефекат у погледу инхибиције раста тестираног патогена установљен у узорцима са највећим садржајем калцијума (узорци 32, 40, 19, 38), у којима је при нивоу контаминације од 10^3 cfu/ml лаг фаза тестираног патогена била продужена на 48 сати (Табела 39).

Табела 39. Број *S. Enteritidis* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^3 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на $+15$ °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	3	19	23	32	38	39	40	41	ХБ
0.	3,38 ^{a,A} (0,02)	3,40 ^{a,A} (0,01)	3,40 ^{b,A} (0,04)	3,40 ^{a,A} (0,01)	3,39 ^{b,A} (0,02)	3,39 ^{b,A} (0,02)	3,38 ^{a,A} (0,03)	3,39 ^{a,A} (0,03)	3,40 ^{a,A} (0,01)
1.	3,36 ^a (0,04)	3,45 ^b (0,03)	3,68 ^c (0,03)	3,42 ^a (0,01)	3,47 ^a (0,04)	3,62 ^c (0,05)	3,44 ^b (0,02)	3,79 ^b (0,07)	3,95 ^b (0,02)
2.	4,12 ^b (0,02)	3,43 ^{ab} (0,01)	4,13 ^a (0,21)	3,41 ^a (0,06)	3,50 ^a (0,01)	4,47 ^d (0,03)	3,40 ^{ab} (0,05)	4,22 ^c (0,06)	5,76 ^c (0,02)
3.	4,31 ^c (0,05)	3,77 ^c (0,01)	4,21 ^a (0,03)	3,70 ^b (0,02)	3,87 ^c (0,03)	5,06 ^a (0,00)	3,65 ^c (0,04)	4,43 ^d (0,02)	7,92 ^d (0,03)
4.	5,20 ^{d,C} (0,02)	4,20 ^{d,B} (0,04)	5,27 ^{d,C} (0,01)	4,10 ^{c,A} (0,05)	4,25 ^{d,B} (0,02)	5,12 ^{a,D} (0,08)	4,05 ^{d,A} (0,01)	5,47 ^{e,E} (0,07)	8,44 ^{e,F} (0,04)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

Табела 40. Број *S. Enteritidis* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^4 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на $+15$ °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	3	19	23	32	38	39	40	41	ХБ
0.	4,38 ^{a,A} (0,02)	4,39 ^{a,A} (0,02)	4,39 ^{a,A} (0,02)	4,40 ^{a,A} (0,01)	4,38 ^{b,A} (0,02)	4,38 ^{a,A} (0,03)	4,39 ^{a,A} (0,01)	4,39 ^{a,A} (0,03)	4,38 ^{a,A} (0,03)
1.	4,71 ^b (0,02)	4,58 ^b (0,04)	4,78 ^b (0,03)	4,50 ^b (0,05)	4,73 ^a (0,03)	4,52 ^b (0,03)	4,48 ^b (0,06)	4,89 ^b (0,11)	4,98 ^b (0,02)
2.	5,25 ^c (0,02)	5,10 ^c (0,05)	5,18 ^c (0,04)	5,00 ^c (0,02)	4,97 ^a (0,03)	5,05 ^c (0,04)	4,81 ^c (0,02)	5,39 ^c (0,06)	6,55 ^c (0,02)
3.	5,97 ^d (0,03)	5,66 ^d (0,01)	6,10 ^d (0,01)	5,70 ^d (0,02)	5,33 ^c (0,31)	5,90 ^d (0,00)	5,20 ^d (0,04)	6,23 ^d (0,02)	8,24 ^d (0,04)
4.	6,95 ^{e,B} (0,02)	6,20 ^{e,A} (0,03)	7,03 ^{e,B} (0,06)	6,22 ^{e,A} (0,05)	6,10 ^{d,A} (0,02)	6,87 ^{e,D} (0,01)	6,00 ^{e,C} (0,05)	7,06 ^{e,B} (0,15)	8,45 ^{e,E} (0,11)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

Насупрот томе, при највишем нивоу контаминације (10^4 cfu/ml) за 24 сата је дошло до мањег пораста броја *S. Enteritidis* (Табела 40). Након завршетка лаг фазе, број *S. Enteritidis* је наставио да се до краја експеримента успорено увећава у односу на стопу раста у хранљивом бујону (Табеле 39 и 40). У огледима са температуром инкубирања од $+15$ °C није детектована стриктна зависност антибактеријске активности млека магарице од садржаја лизозима (Табеле 37-40). У прилог томе говори много јачи антибактеријски потенцијал узорка 32 у поређењу са узорцима 3 и 23, који је забележен упркос мањем садржају лизозима у узорку 32 (Табеле 37-40).

Што се тиче лактоферина, под датим експерименталним условима није утврђена веза између његовог садржаја и антибактеријске активности узорака млека магарице према *S. Enteritidis*. На пример, јачу антибактеријску активност показао је узорак 38 у поређењу са узорцима 39 и 41 (Табеле 38-40), иако у њему лактоферин није детектован (Табела 37), док је у узорцима 39 и 41 лактоферин био присутан у концентрацији 34,3 mg/l, односно 15,8 mg/l.

У Табелама 41, 42 и 43 приказани су резултати испитивања антибактеријске активности одабраних узорака млека магарице према *S. Typhimurium* на +15 °C за различите нивое контаминације.

Табела 41. Број *S. Typhimurium* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10² cfu/ml) током 96 сати складиштења на +15 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	3	19	23	32	38	39	40	41	ХБ
0.	2,37 ^{a,A} (0,06)	2,36 ^{c,A} (0,05)	2,37 ^{bc,A} (0,04)	2,37 ^{b,A} (0,04)	2,36 ^{a,A} (0,03)	2,40 ^{a,A} (0,03)	2,38 ^{c,A} (0,04)	2,37 ^{b,A} (0,04)	2,39 ^{a,A} (0,04)
1.	2,11 ^d (0,02)	1,85 ^b (0,29)	2,15 ^b (0,13)	1,56 ^a (0,41)	2,19 ^a (0,15)	2,25 ^a (0,22)	1,86 ^b (0,24)	2,05 ^a (0,18)	3,87 ^b (0,05)
2.	1,40 ^b (0,05)	0,30 ^a (0,24)	1,60 ^a (0,28)	1,12 ^a (0,17)	1,22 ^b (0,08)	1,52 ^b (0,02)	0,48 ^a (0,15)	1,92 ^a (0,08)	5,73 ^c (0,03)
3.	1,67 ^c (0,03)	н.д.	1,78 ^a (0,07)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	2,33 ^b (0,06)	7,87 ^d (0,05)
4.	2,30 ^{a,A} (0,04)	н.д.	2,48 ^{c,B} (0,15)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	3,12 ^{c,C} (0,07)	8,14 ^{e,D} (0,00)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано; ХБ - хранљиви бујон.

У огледу са најнижим нивоом контаминације на +15 °C, *S. Typhimurium* након 72 сата инкубирања није била детектована у узорцима млека који су имали садржај калцијума $\geq 752,5$ mg/l (Табела 41). Што се тиче узорака са садржајем калцијума у интервалу од 529,4 до 665,0 mg/l, њихов антимикуробни потенцијал је ослабио након 48 сати инкубирања (Табела 41). Иако је број *S. Typhimurium* у тим узорцима после 48 сати почео да расте, ово млеко је и даље поседовало антибактеријску активност, која се огледала у успоравању бактеријског раста. Број *S. Typhimurium* у хранљивом бујону након 72 и 96 сати инкубирања, био је много већи у поређењу са бројем овог патогена у поменутих узорцима у том периоду (Табела 41). У огледу са средњим нивоом контаминације број *S. Typhimurium* у узорцима млека са садржајем

калцијума од 752,5 до 1003,8 mg/l током првих 72 сата остаје приближно једнак почетној вредности, односно, зависно од узорка, благо се повећава или смањује (Табела 42).

Табела 42. Број *S. Typhimurium* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^3 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на +15 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	3	19	23	32	38	39	40	41	ХБ
0.	3,37 ^{a.A} (0,02)	3,38 ^{a.A} (0,05)	3,38 ^{a.A} (0,04)	3,38 ^{b.A} (0,01)	3,39 ^{b.A} (0,02)	3,38 ^{b.A} (0,03)	3,40 ^{d.A} (0,04)	3,38 ^{a.A} (0,02)	3,39 ^{a.A} (0,02)
1.	3,36 ^a (0,01)	3,38 ^a (0,01)	3,38 ^a (0,02)	3,32 ^a (0,04)	3,35 ^{ab} (0,03)	3,32 ^b (0,08)	3,29 ^c (0,01)	3,38 ^a (0,01)	4,78 ^b (0,00)
2.	3,50 ^b (0,03)	3,40 ^a (0,04)	3,35 ^a (0,02)	3,32 ^a (0,02)	3,36 ^{ab} (0,04)	3,22 ^a (0,04)	3,21 ^b (0,02)	3,61 ^b (0,01)	6,85 ^c (0,04)
3.	3,99 ^c (0,02)	3,63 ^b (0,09)	3,90 ^b (0,07)	3,34 ^{ab} (0,05)	3,31 ^a (0,02)	3,15 ^a (0,04)	3,04 ^a (0,01)	4,25 ^c (0,03)	8,11 ^d (0,03)
4.	6,05 ^{d.B} (0,02)	4,06 ^{c.D} (0,04)	6,00 ^{c.B} (0,05)	3,95 ^{c.A} (0,02)	3,93 ^{c.A} (0,03)	4,28 ^{c.E} (0,06)	3,70 ^{e.C} (0,03)	6,33 ^{d.F} (0,12)	8,25 ^{e.G} (0,11)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

Табела 43. Број *S. Typhimurium* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^4 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на +15 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	3	19	23	32	38	39	40	41	ХБ
0.	4,34 ^{b.A} (0,01)	4,34 ^{a.A} (0,02)	4,35 ^{a.A} (0,04)	4,33 ^{a.A} (0,03)	4,34 ^{a.A} (0,02)	4,34 ^{a.A} (0,02)	4,34 ^{a.A} (0,01)	4,34 ^{a.A} (0,03)	4,34 ^{b.A} (0,04)
1.	4,39 ^a (0,01)	4,33 ^a (0,02)	4,40 ^b (0,03)	4,32 ^a (0,02)	4,30 ^a (0,01)	4,38 ^a (0,01)	4,38 ^a (0,05)	4,96 ^b (0,02)	5,39 ^c (0,09)
2.	4,41 ^a (0,02)	4,35 ^a (0,02)	4,45 ^c (0,02)	4,35 ^a (0,01)	4,31 ^a (0,04)	4,36 ^a (0,03)	4,32 ^a (0,02)	5,58 ^c (0,03)	7,90 ^d (0,03)
3.	6,02 ^c (0,03)	4,73 ^b (0,03)	6,00 ^d (0,03)	4,90 ^b (0,02)	4,97 ^b (0,01)	5,04 ^b (0,01)	4,68 ^b (0,02)	6,13 ^d (0,02)	8,30 ^a (0,05)
4.	7,18 ^{d.DE} (0,01)	6,87 ^{c.AB} (0,02)	7,20 ^{e.E} (0,01)	6,95 ^{c.BC} (0,03)	6,98 ^{c.C} (0,04)	7,10 ^{c.D} (0,05)	6,82 ^{c.A} (0,04)	7,52 ^{e.F} (0,03)	8,34 ^{a.G} (0,13)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

Број тестираног патогена у тим узорцима, након 72 сата инкубирања био је у интервалу од 3,04-3,63 log cfu/ml, за разлику од позитивне контроле у којој је тај број био достигао вредност од 8,11 log cfu/ml. Број *S. Typhimurium* од 72-ог до 96-ог сата расте, али много спорије у односу на хранљиви бујон. Што се тиче антимицробне активности узорака млека са нижом концентрацијом калцијума (узорци 3, 23 и 41)

(Табела 37), она је на средњем нивоу контаминације била најјача током прва 24 сата инкубирања, с обзиром на то да се у том периоду број тест микроорганизама није мењао. У периоду од 24-ог до 72-ог сата, раст *S. Typhimurium* је успорен у поређењу са позитивном контролом, да би након 72 сата антибактеријски потенцијал ових узорак био у потпуности потрошен (Табела 42). У експерименту са нивоом контаминације од 10^4 cfu/ml, антибактеријска активност узорак млека са већим садржајем калцијума (узорци 38, 39, 32, 40, 19) (Табела 37), огледала се у продужењу лаг фазе тест микроорганизма за 48 сати, као и инхибираном бактеријском расту до 72 сата инкубирања (Табела 43). Након тога, интензитет умножавања *S. Typhimurium* у узорцима млека магарице је до краја огледа био једнак оном у хранљивом бујону. До истека 48-ог, односно 24-ог сата инкубирања, у узорцима са нижим садржајем калцијума (узорци 3, 23 и 14) (Табела 37), регистрован је благи пораст броја *S. Typhimurium*. После тог времена његово умножавање се одвијало једнаком брзином као у позитивној контроли, што недвосмислено указује на потрошен антибактеријски капацитет ових узорак (Табела 42). Иако је узорак 41 са најнижим садржајем лизозима утврђеним у овом огледу (Табела 37) показао најслабије антибактеријско деловање (Табеле 41-43), не може се тврдити да је примарни разлог томе његов садржај лизозима. Тако је на пример узорак 3 имао много слабији антибактеријски потенцијал у поређењу са узорцима 19, 23 и 39 (Табеле 41-43), иако је поседовао знатно већи садржај лизозима у односу на поменуте узорке (Табела 37). Лактоферин се у пет испитаних узорак коришћених за антибактеријски тест на +15 °C налазио у интервалу од 15,8 до 34,3 mg/l, док је у преосталих три био испод границе детекције (Табела 37). Пошто су четири од пет узорак са најјачом антибактеријском активношћу имала релативно висок садржај овог ензима (22,8-34,3 mg/l) (а само у једном узорку лактоферин није детектован), не може се са сигурношћу тврдити да постоји/не постоји веза између садржаја лактоферина и антибактеријске активности узорак млека магарице према *S. Typhimurium* +15 °C. Током 4 дана инкубирања на +15 °C *Salmonella* spp. није детектована ни у једној негативној контроли.

4.2.3.3. Антибактеријски тест на +38 °C

У Табели 44 је приказана концентрација калцијума, лизозима и лактоферина, као и рН вредност одређена у узорцима млека магарице коришћеним за антибактеријски тест према *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* на +38 °C. У Табелама 45 и 46 представљене су промене броја *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^2 cfu/ml) током 8 сати инкубирања на +38 °C.

Резултати антибактеријског теста јасно указују на различит антибактеријски потенцијал испитиваних узорака млека магарице према *S. Enteritidis* (Табела 45). Најинтензивнија редуција броја *S. Enteritidis* је регистрована у узорцима 27, 14, 29, 15, 30, 31 и 32 у којима тестиране бактерије нису биле детектоване након 2, 3 или 4 сата инкубирања. Насупрот томе, у осталим узорцима млека, ниво овог патогена је износио 2,8-3,5 log cfu/ml (Табела 45). У испитиваним узорцима млека магарице током инкубирања на +38 °C забележен је тренд смањења броја *S. Typhimurium* са различитим финалним бројем ових бактерија након 8 сати инкубирања (Табела 46). Узорци 27, 14, 15, 31 и 32 су испољили најјачу антибактеријску активност према тест микроорганизму, с обзиром на то да је његов број у овим узорцима након 1, 2 и 3 сата инкубирања био испод границе детекције. Поменути узорци су истовремено имали и највећи садржај калцијума (961,3-1127,5 mg/l) (Табела 44). Узорци 29, 30 и 16 поседовали су нешто слабији антибактеријски потенцијал према овом патогену, јер је његово присуство било бележено све до четвртог, петог, односно седмог сата инкубирања (Табела 46). На крају огледа, *S. Typhimurium* био је детектован само у узорцима са малим садржајем калцијума (400,5-691,3 mg/l). Број *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* је у позитивним контролама током инкубирања константно растао, да би након 8 сати достигао вредност од $8,09 \pm 0,04$ log cfu/ml, односно $8,05 \pm 0,05$ log cfu/ml. Уколико се у млеку магарице садржај лизозима посматра независно од концентрације калцијума, веза антибактеријске активности и садржаја лизозима није била уочљива. На пример, узорци 27, 29 и 15 су показали скоро исту антибактеријску активност према *S. Enteritidis* (Табела 45), иако је садржај лизозима у овим узорцима био 3,89, 1,88 и 2,70 g/l. Такође, у огледу на +38 °C није утврђена веза између садржаја лактоферина и антибактеријске активности млека магарице

према *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium*. Присуство *Salmonella* spp. није било детектовано у негативним контролама.

Табела 44. Садржај калцијума (mg/l), лизозима (g/l), лактоферина (mg/l) и рН вредност млека магарице

	Узорци млека магарице																	
	2	5	7	8	12	14	15	16	27	29	30	31	32	33	34	35	36	37
Ca	529,4 ^c (5,88)	630,0 ^{gh} (12,50)	637,2 ^h (0,27)	691,3 ⁱ (1,25)	400,5 ^a (0,54)	1127,5 ^o (2,50)	961,3 ^m (3,75)	765,0 ^j (0,75)	969,0 ^m (5,00)	902,5 ^l (0,00)	877,5 ^k (2,50)	962,5 ^m (5,00)	986,3 ⁿ (13,75)	597,1 ^e (1,36)	608,0 ^{ef} (24,5)	566,3 ^d (23,75)	620,3 ^{fg} (1,85)	508,1 ^b (0,12)
LYZ	1,96 ^d (0,03)	3,67 ^k (0,05)	2,08 ^e (0,08)	1,73 ^c (0,09)	3,03 ⁱ (0,06)	3,74 ^{kl} (0,05)	2,70 ^h (0,06)	3,46 ^j (0,06)	3,89 ^m (0,04)	1,88 ^d (0,08)	1,92 ^d (0,03)	3,84 ^m (0,05)	2,47 ^s (0,06)	1,44 ^b (0,04)	3,05 ⁱ (0,05)	3,14 ⁱ (0,14)	2,23 ^f (0,04)	0,97 ^a (0,02)
LF	16,20 ^e (1,2)	7,0 ^{bc} (0,05)	40,06 ⁱ (0,30)	5,4 ^{ab} (0,40)	н.д.	11,15 ^d (0,05)	н.д.	54,30 ^j (0,40)	32,8 ^h (1,80)	н.д.	26,80 ^s (1,95)	4,10 ^a (1,14)	22,80 ^f (2,80)	7,60 ^c (0,30)	15,40 ^e (0,10)	7,50 ^c (0,50)	7,90 ^c (0,07)	9,60 ^d (0,20)
pH	7,15 ^{bcde} (0,01)	7,21 ^g (0,02)	7,15 ^{bcde} (0,01)	7,11 ^a (0,00)	7,19 ^{fg} (0,02)	7,12 ^{ab} (0,02)	7,19 ^{fg} (0,03)	7,15 ^{bcde} (0,02)	7,12 ^{ab} (0,01)	7,14 ^{abcd} (0,02)	7,16 ^{cdef} (0,01)	7,13 ^{abc} (0,01)	7,17 ^{def} (0,02)	7,13 ^{abc} (0,02)	7,18 ^{efg} (0,01)	7,17 ^{def} (0,02)	7,14 ^{abcd} (0,01)	7,16 ^{cdef} (0,02)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истом реду са различитим малим словима су статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано; LYZ - лизозим; LF - лактоферин; Ca - калцијум.

Табела 45. Број *S. Enteritidis* (log cfu/ml) у млеку магарике током 8 сати инкубирања на +38 °C

Време инкубирања (h)	Узорци млека магарике																		
	2	5	7	8	12	14	15	16	27	29	30	31	32	33	34	35	36	37	ХБ
0	2,50 ^{dA} (0,03)	2,50 ^{eA} (0,03)	2,50 ^{bA} (0,02)	2,51 ^{bA} (0,04)	2,50 ^{bA} (0,04)	2,51 ^{cA} (0,03)	2,52 ^{cA} (0,04)	2,51 ^{fA} (0,05)	2,50 ^{cA} (0,04)	2,51 ^{cA} (0,03)	2,51 ^{dA} (0,04)	2,51 ^{bA} (0,02)	2,50 ^{bA} (0,03)	2,50 ^{bA} (0,04)	2,50 ^{aA} (0,02)	2,51 ^{cA} (0,03)	2,50 ^{dA} (0,03)	2,50 ^{aA} (0,05)	2,50 ^{aA} (0,03)
1	2,72 ^a (0,03)	2,81 ^{cd} (0,02)	2,75 ^c (0,05)	2,47 ^b (0,06)	3,01 ^a (0,00)	1,82 ^b (0,04)	2,36 ^b (0,04)	1,87 ^e (0,01)	2,12 ^b (0,07)	2,40 ^b (0,05)	2,10 ^c (0,05)	1,20 ^a (0,06)	1,00 ^a (0,00)	2,49 ^b (0,02)	2,50 ^a (0,04)	2,55 ^c (0,04)	2,35 ^c (0,06)	2,52 ^a (0,03)	2,71 ^b (0,04)
2	2,70 ^a (0,05)	2,83 ^d (0,01)	2,88 ^d (0,02)	2,60 ^f (0,04)	3,00 ^a (0,06)	1,52 ^a (0,07)	1,46 ^a (0,15)	1,72 ^a (0,01)	1,30 ^a (0,05)	1,50 ^a (0,06)	1,82 ^b (0,05)	н.д.	н.д.	2,32 ^d (0,02)	2,29 ^c (0,04)	2,66 ^d (0,05)	2,27 ^c (0,03)	2,55 ^a (0,04)	3,44 ^c (0,06)
3	2,71 ^a (0,01)	2,70 ^a (0,06)	3,06 ^e (0,01)	3,00 ^e (0,00)	3,00 ^a (0,07)	н.д.	н.д.	1,69 ^a (0,01)	н.д.	н.д.	1,26 ^a (0,04)	н.д.	н.д.	2,41 ^e (0,01)	2,44 ^a (0,05)	2,90 ^b (0,02)	2,58 ^{ad} (0,06)	2,92 ^b (0,05)	4,40 ^d (0,03)
4	2,85 ^b (0,09)	2,72 ^{ab} (0,02)	3,14 ^a (0,06)	3,05 ^{ac} (0,04)	3,02 ^a (0,00)	н.д.	н.д.	1,54 ^d (0,03)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	2,66 ^c (0,03)	2,60 ^d (0,02)	2,94 ^b (0,05)	2,62 ^a (0,04)	2,94 ^b (0,06)	5,37 ^e (0,03)
5	2,84 ^b (0,07)	2,71 ^{ab} (0,02)	3,18 ^a (0,00)	3,08 ^a (0,05)	2,98 ^a (0,04)	н.д.	н.д.	1,33 ^c (0,02)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	2,67 ^c (0,03)	2,71 ^e (0,04)	2,98 ^{ab} (0,06)	2,61 ^a (0,06)	2,96 ^b (0,07)	6,40 ^f (0,02)
6	3,02 ^c (0,02)	2,76 ^{bc} (0,01)	3,16 ^a (0,04)	3,11 ^{ad} (0,03)	2,98 ^a (0,04)	н.д.	н.д.	1,20 ^b (0,05)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	2,88 ^a (0,01)	2,80 ^b (0,03)	3,04 ^a (0,05)	2,79 ^b (0,03)	3,30 ^c (0,05)	6,94 ^g (0,05)
7	3,05 ^c (0,01)	2,72 ^{ab} (0,02)	3,15 ^a (0,03)	3,18 ^{de} (0,05)	2,82 ^c (0,09)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	2,87 ^a (0,01)	2,85 ^b (0,04)	3,03 ^a (0,04)	2,81 ^b (0,04)	3,35 ^c (0,04)	7,70 ^h (0,05)
8	3,16 ^{e,D} (0,02)	2,80 ^{cd,A} (0,02)	3,20 ^{a,D} (0,03)	3,20 ^{e,D} (0,04)	3,17 ^{d,D} (0,01)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	2,89 ^{a,B} (0,01)	2,93 ^B (0,05)	3,05 ^{a,C} (0,06)	2,80 ^{b,A} (0,05)	3,50 ^{d,E} (0,06)	8,09 ^{i,F} (0,04)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон; н.д. - није детектовано.

Табела 46. Број *S. Typhimurium* (log cfu/ml) у млеку магарике током 8 сати инкубирања на +38 °C

Време инкубирања (h)	Узорци млека магарике																		
	2	5	7	8	12	14	15	16	27	29	30	31	32	33	34	35	36	37	ХБ
0	2,47 ^{dA} (0,02)	2,48 ^{fA} (0,01)	2,48 ^{aA} (0,06)	2,48 ^{aA} (0,03)	2,49 ^{gA} (0,03)	2,50 ^A (0,04)	2,48 ^{bA} (0,08)	2,48 ^{cA} (0,01)	2,48 ^{bA} (0,02)	2,51 ^{aA} (0,04)	2,48 ^{dA} (0,05)	2,49 ^{bA} (0,03)	2,49 ^{cA} (0,04)	2,48 ^{fA} (0,04)	2,49 ^{gA} (0,03)	2,47 ^{cA} (0,04)	2,49 ^{aA} (0,06)	2,49 ^{eA} (0,04)	2,48 ^{aA} (0,04)
1	2,44 ^{cd} (0,05)	2,78 ^a (0,00)	2,54 ^{ab} (0,04)	2,62 ^c (0,03)	2,74 ^{ab} (0,01)	н.д.	2,75 ^c (0,01)	2,48 ^c (0,01)	1,32 ^a (0,04)	2,74 ^c (0,06)	2,69 ^e (0,03)	1,28 ^a (0,02)	2,00 ^b (0,03)	2,69 ^b (0,04)	2,71 ^b (0,06)	2,68 ^b (0,04)	2,49 ^a (0,05)	2,77 ^a (0,00)	2,65 ^b (0,04)
2	2,35 ^c (0,06)	2,71 ^a (0,01)	2,68 ^b (0,05)	2,60 ^b (0,05)	2,80 ^b (0,06)	н.д.	2,19 ^a (0,10)	1,30 ^a (0,00)	н.д.	2,49 ^a (0,04)	2,41 ^c (0,05)	н.д.	1,40 ^a (0,05)	2,72 ^b (0,05)	2,75 ^{bc} (0,03)	2,65 ^{ab} (0,06)	2,60 ^b (0,03)	2,84 ^f (0,04)	3,39 ^c (0,05)
3	2,19 ^g (0,03)	2,58 ^g (0,03)	2,66 ^b (0,06)	2,72 ^d (0,04)	2,97 ^{cd} (0,03)	н.д.	н.д.	1,98 ^b (0,03)	н.д.	1,26 ^b (0,24)	1,48 ^b (0,03)	н.д.	н.д.	2,91 ^a (0,04)	2,88 ^a (0,05)	2,66 ^{ab} (0,04)	2,61 ^b (0,00)	2,98 ^h (0,05)	4,20 ^d (0,04)
4	1,95 ^{ab} (0,05)	2,29 ^e (0,03)	2,48 ^a (0,01)	2,73 ^d (0,05)	3,06 ^e (0,00)	н.д.	н.д.	1,84 ^b (0,06)	н.д.	н.д.	1,20 ^a (0,00)	н.д.	н.д.	2,93 ^a (0,00)	2,86 ^a (0,05)	2,59 ^{ad} (0,04)	2,53 ^{ab} (0,04)	2,91 ^g (0,05)	5,15 ^e (0,06)
5	2,00 ^b (0,06)	2,08 ^d (0,04)	2,43 ^a (0,04)	2,51 ^{ab} (0,06)	3,00 ^{de} (0,07)	н.д.	н.д.	1,26 ^a (0,24)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	2,92 ^a (0,06)	2,80 ^{ac} (0,04)	2,53 ^{cd} (0,05)	2,14 ^f (0,05)	2,71 ^a (0,04)	6,10 ^f (0,03)
6	1,87 ^a (0,04)	1,46 ^c (0,15)	2,07 ^d (0,06)	2,00 ^g (0,04)	2,93 ^c (0,03)	н.д.	н.д.	1,00 ^d (0,00)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	2,23 ^e (0,06)	2,18 ^f (0,04)	2,21 ^g (0,05)	1,96 ^e (0,06)	2,10 ^d (0,05)	6,85 ^g (0,02)
7	1,61 ^f (0,04)	1,00 ^b (0,00)	1,30 ^c (0,24)	1,67 ^f (0,05)	2,73 ^a (0,02)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	1,43 ^d (0,05)	1,39 ^e (0,03)	1,48 ^f (0,05)	1,50 ^d (0,09)	1,80 ^c (0,04)	7,54 ^h (0,03)
8	1,46 ^{eE} (0,15)	н.д.	н.д.	1,35 ^{cD} (0,10)	1,23 ^{fBC} (0,03)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	1,30 ^{cCD} (0,07)	1,20 ^{dB} (0,08)	1,25 ^{eBC} (0,05)	1,00 ^{cA} (0,00)	1,60 ^{bF} (0,04)	8,05 ^{iG} (0,05)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P<0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P<0,05$). ХБ - хранљиви бујон; н.д. - није детектовано.

Садржај лизозима у испитиваним узорцима млека магарице био је у опсегу од 0,97 до 3,89 g/l, док је лактоферин био присутан у концентрацији од 4,1 до 54,3 mg/l. Овај протеин није детектован у три тестирана узорка. Концентрација калцијума у узорцима млека била је у интервалу од 400,5 до 1127,5 mg/l (Табела 44). Различите вредности концентрација лизозима, лактоферина и калцијума, детерминисне за различите узорке млека, највероватније су последица различитих периода лактације, којима испитивани узорци млека магарице припадају.

Вредност рН узорака млека магарице се налазила у опсегу од 7,11 до 7,21 (Табела 44), што је било у складу са литературним наводима за млеко магарице других раса (Conte и сар., 2006; Guo и сар., 2007). Према извештајима других аутора рН вредност млека магарице није зависила од расе или периода лактације (Salimei и сар., 2004; Guo и сар., 2007). Већа рН вредност млека магарице у поређењу са крављим млеком, могла би се објаснити мањим садржајем к-казеина (CN) и фосфата у млеку магарице (Salimei и сар., 2004). У Табелама 47 и 48 приказане су промене броја *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^2 cfu/ml) са додатим CaCl_2 и EDTA, након 8 сати инкубирања на $+38$ °C.

Значај концентрације калцијумових јона у антибактеријском деловању млека магарице је демонстриран додавањем CaCl_2 и калцијум везујућег EDTA у испитиване узорке. Додатак веће концентрације CaCl_2 у млеко магарице је унапредио његову антибактеријску активност према обе тестиране бактерије (Табеле 47 и 48). У узорцима млека магарице 14, 15, 16, 27, 29, 30, 31 и 32 *S. Enteritidis* није био детектован након 8 сати инкубирања на $+38$ °C (Табела 45), а исти случај је забележен и у узорцима А, Б и Ц након додавања CaCl_2 и EDTA. Инхибиторни ефекат самог CaCl_2 на тестиране сојеве није утврђен, с обзиром на то да је њихов број у позитивним контролама након 8 сати инкубирања имао вредност од $8,11 \pm 0,03$ и $8,12 \pm 0,02$ log cfu/ml (*S. Enteritidis*), односно $8,04 \pm 0,04$ и $8,07 \pm 0,03$ log cfu/ml (*S. Typhimurium*).

Табела 47. Број *S. Enteritidis* (log cfu/ml) у млеку магарице са додатим CaCl₂ и EDTA након 8 сати инкубирања на +38 °C

Узорци	Млеко магарице	А	Б	Ц
2	3,16 ^a (0,02)	1,35 ^d (0,06)	н.д.	3,17 ^e (0,04)
5	2,80 ^b (0,02)	1,20 ^c (0,05)	н.д.	2,95 ^a (0,02)
7	3,20 ^a (0,03)	2,54 ^g (0,05)	1,28 ^a (0,04)	3,26 ^b (0,04)
8	3,20 ^a (0,04)	2,77 ⁱ (0,05)	2,55 ^d (0,04)	3,25 ^b (0,05)
12	3,17 ^a (0,01)	2,20 ^e (0,00)	1,77 ^c (0,07)	3,24 ^b (0,04)
33	2,89 ^c (0,01)	2,68 ^h (0,02)	2,64 ^e (0,00)	3,00 ^a (0,00)
34	2,93 ^c (0,05)	1,10 ^b (0,06)	н.д.	3,00 ^a (0,02)
35	3,05 ^d (0,06)	0,90 ^a (0,05)	н.д.	3,09 ^d (0,04)
36	2,80 ^b (0,05)	2,35 ^f (0,03)	1,65 ^b (0,00)	2,82 ^c (0,06)
37	3,50 ^e (0,06)	3,30 ⁱ (0,05)	3,22 ^f (0,04)	3,52 ^f (0,03)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим редовима са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). А - млеко магарице са додатим CaCl₂ (276,93 mg/l); Б - млеко магарице са додатим CaCl₂ (553,87 mg/l); Ц - млеко магарице са додатим EDTA (1,39 g/l); н.д. - није детектовано.

Слабљење антибактеријске активности према *S. Typhimurium* је забележено у узорцима млека магарице са додатим EDTA (Табела 48). У случају *S. Enteritidis*, додавање EDTA је проузроковало благо повећање броја тест бактерија на крају инкубирања (Табела 47). *S. Enteritidis* је иначе потврђена као отпорнија на антибактеријско дејство млека магарице у поређењу са *S. Typhimurium* (Табеле 45 и 46). У прилог томе иде и слабија редукција броја ћелија *S. Enteritidis* након додавања CaCl₂ (Табела 47), што указује на то да антибактеријска активност млека магарице зависи и од бактеријског соја.

Tabela 48. Број *S. Typhimurium* (log cfu/ml) у млеку магарике са додатим CaCl₂ и EDTA након 8 сати инкубирања на +38 °C

Узорци	Млеко магарике	А	Б	Ц
2	1,46 ^c (0,15)	1,10 ^d (0,05)	0,60 ^c (0,00)	3,18 ^k (0,00)
5	н.д.	н.д.	н.д.	3,02 (0,04)
7	н.д.	н.д.	н.д.	3,14 (0,06)
8	1,35 ^{bc} (0,10)	0,90 ^a (0,05)	0,50 ^b (0,00)	3,08 ^{ghi} (0,04)
12	1,23 ^{ab} (0,03)	0,80 ^{ac} (0,00)	н.д.	3,05 ^{fgh} (0,07)
14	н.д.	н.д.	н.д.	1,20 (0,05)
15	н.д.	н.д.	н.д.	1,10 (0,04)
16	н.д.	н.д.	н.д.	1,05 (0,05)
27	н.д.	н.д.	н.д.	1,27 (0,06)
29	н.д.	н.д.	н.д.	1,40 (0,00)
30	н.д.	н.д.	н.д.	1,17 (0,05)
31	н.д.	н.д.	н.д.	1,35 (0,04)
32	н.д.	н.д.	н.д.	1,22 (0,06)
33	1,30 ^{ab} (0,07)	0,90 ^a (0,04)	0,40 ^a (0,06)	3,00 ^f (0,05)
34	1,20 ^a (0,08)	0,70 ^{bc} (0,05)	н.д.	3,10 ^{ghij} (0,05)
35	1,25 ^{ab} (0,05)	0,60 ^b (0,07)	н.д.	3,15 ^{ijk} (0,03)
36	1,00 ^d (0,00)	н.д.	н.д.	3,12 ^{hijk} (0,06)
37	1,60 ^e (0,04)	1,15 ^d (0,10)	0,70 ^d (0,05)	3,20 ^k (0,05)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим редовима са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). А - млеко магарике са додатим CaCl₂ (276,93 mg/l); Б - млеко магарике са додатим CaCl₂ (553,87 mg/l); Ц - млеко магарике са додатим EDTA (1,39 g/l); н.д. - није детектовано.

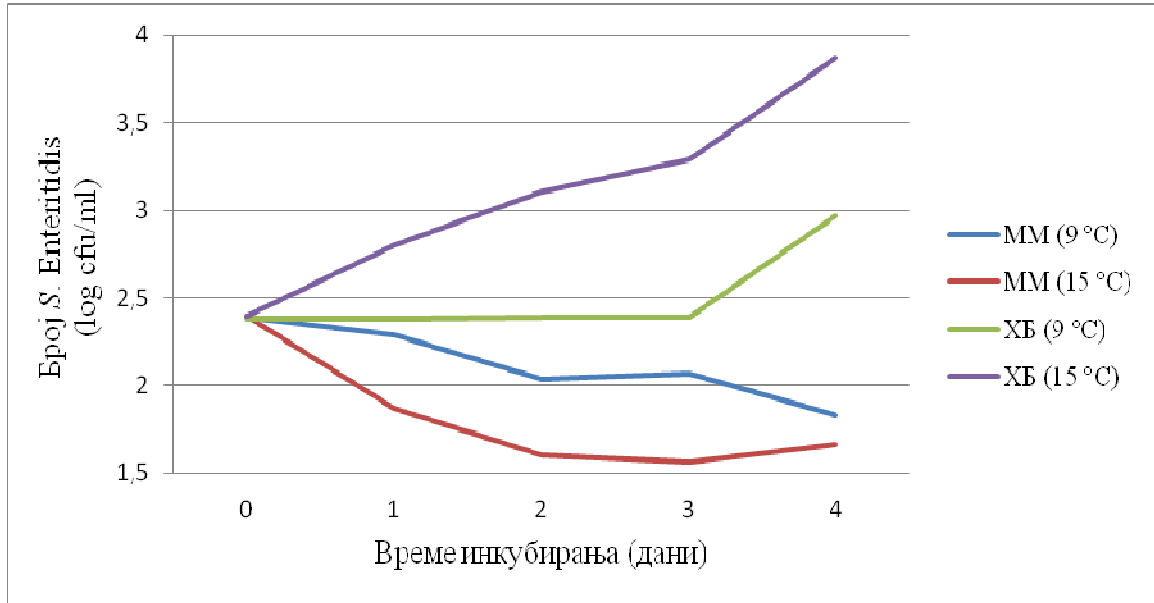
4.2.3.4. Утицај температуре инкубирања и нивоа контаминације на антибактеријска својства млека магарице према тестираним *Salmonella* сојевима

Резултати испитивања антибактеријске активности млека магарице према *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* добијени под експерименталним условима дефинисаним у овој докторској дисертацији (Табеле 31-43 и 45-46), указују на то да је интензитет антибактеријске активности овог млека примарно зависио од садржаја калцијума, а секундарно од концентрације лизозима. Међутим, антибактеријски потенцијал млека магарице био је условљен и температуром инкубирања и нивоом контаминације тестираним *Salmonella* сојем. На Сликама 12-17 приказане су просечне вредности броја *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* у вештачки контаминираним узорцима млека магарице током 4 дана инкубирања на +9 и +15 °C.

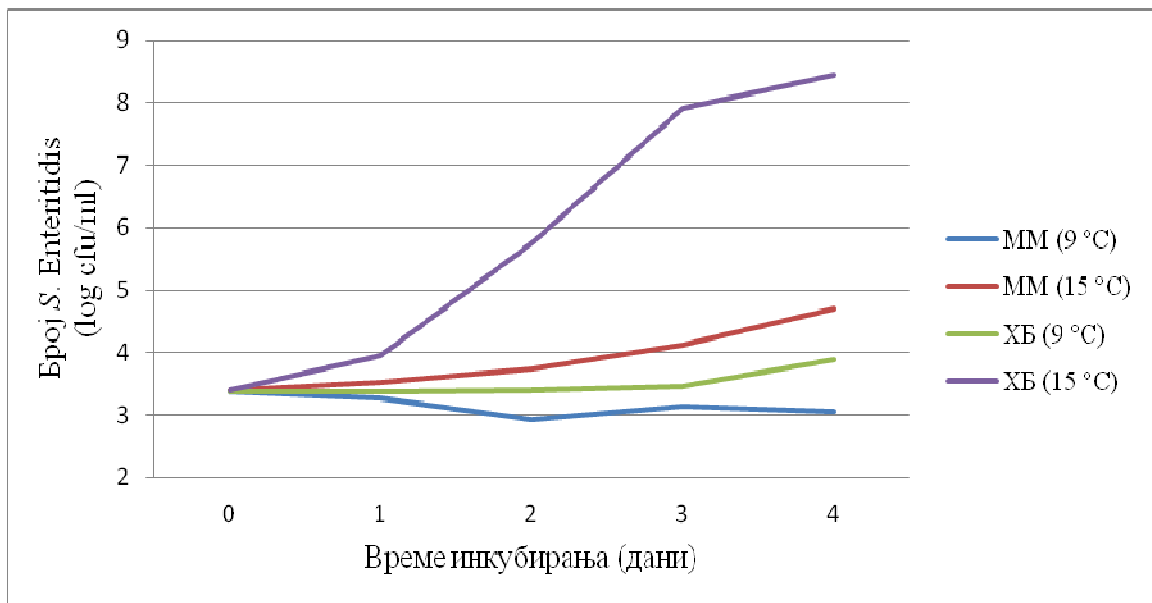
Утицај температуре инкубирања на антибактеријску активност млека магарице не може се посматрати одвојено од вредности почетне контаминације млека тестираним *Salmonella* сојевима. На Сликама 12-17 се може видети да је млеко магарице на најнижем нивоу контаминације према оба тестирана патогена показало јачи антибактеријски ефекат на +15 °C.

Међутим, виша температура инкубирања значи и брже умножавање тест микроорганизама, што након одређеног времена на вишим нивоима контаминације (10^3 и 10^4 cfu/ml) доводи до слабљења, а често и потпуног престанка деловања антимикробних компонената овог млека.

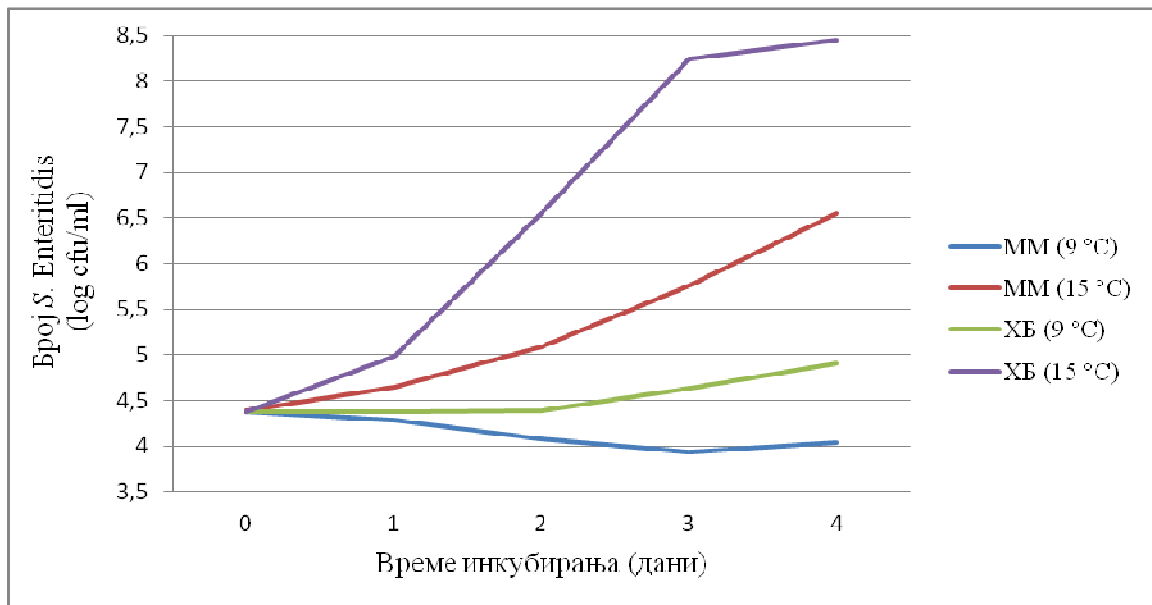
Из тог разлога је у огледима са вишим нивоима контаминације током целог периода инкубирања бележен већи број и *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* на +15 °C (Слике 13-14 и 16-17). Осим тога, на вишим температурама долази и до бржег пораста пропратне микробиоте, која вероватно у извесној мери може допринети потрошњи антимикробног капацитета млека. Испитивања извршена у овој докторској дисертацији, такође су показала различиту осетљивост тестираних *Salmonella* сојева на антибактеријску активност млека магарице балканске расе. На Сликама 18-24 упоређене су промене просечног броја *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* у вештачки контаминираним узорцима млека магарице и хранљивом бујону (ХБ), током инкубирања на +9, +15 и +38 °C.



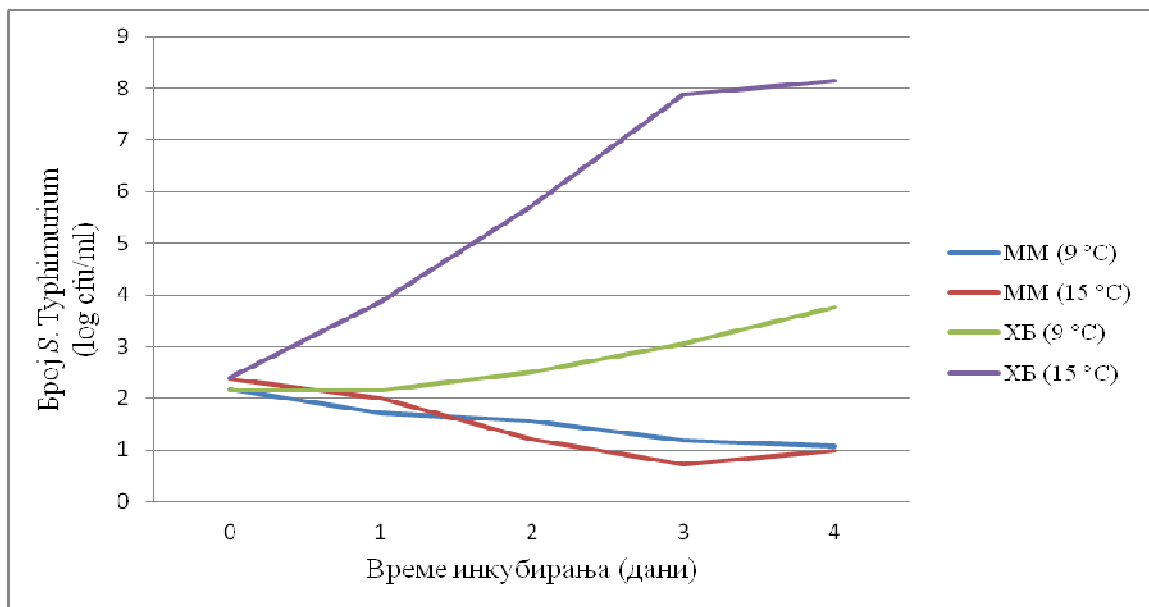
Слика 12. Просечне вредности броја *S. Enteritidis* у тестираним узорцима млека магарице (ММ) и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^2 cfu/ml, током инкубирања на +9 и +15 °C.



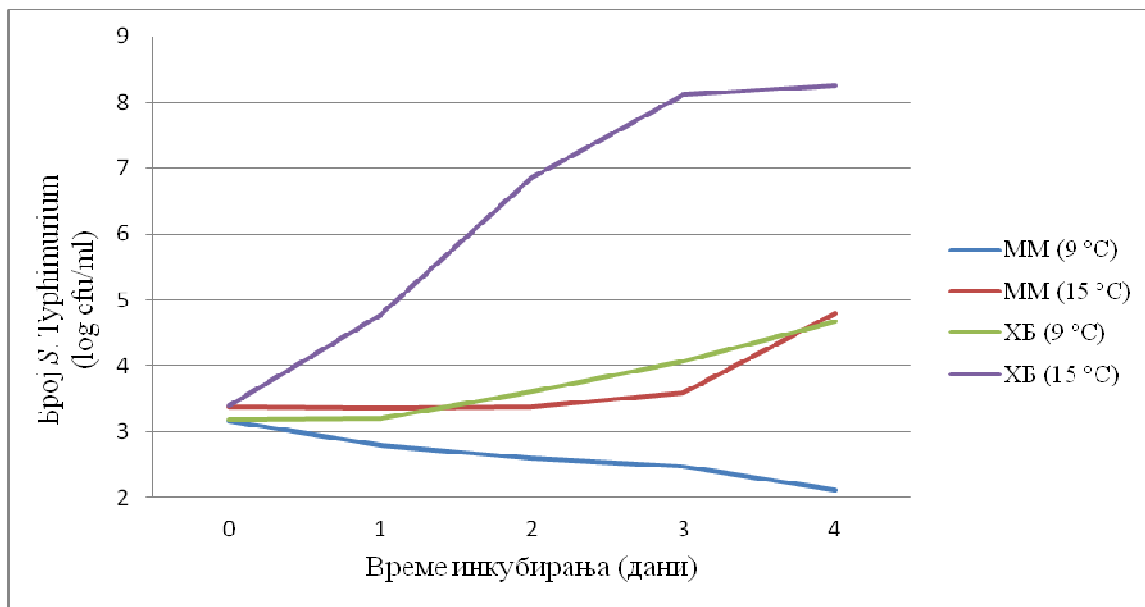
Слика 13. Просечне вредности броја *S. Enteritidis* у тестираним узорцима млека магарице (ММ) и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^3 cfu/ml, током инкубирања на +9 и +15 °C.



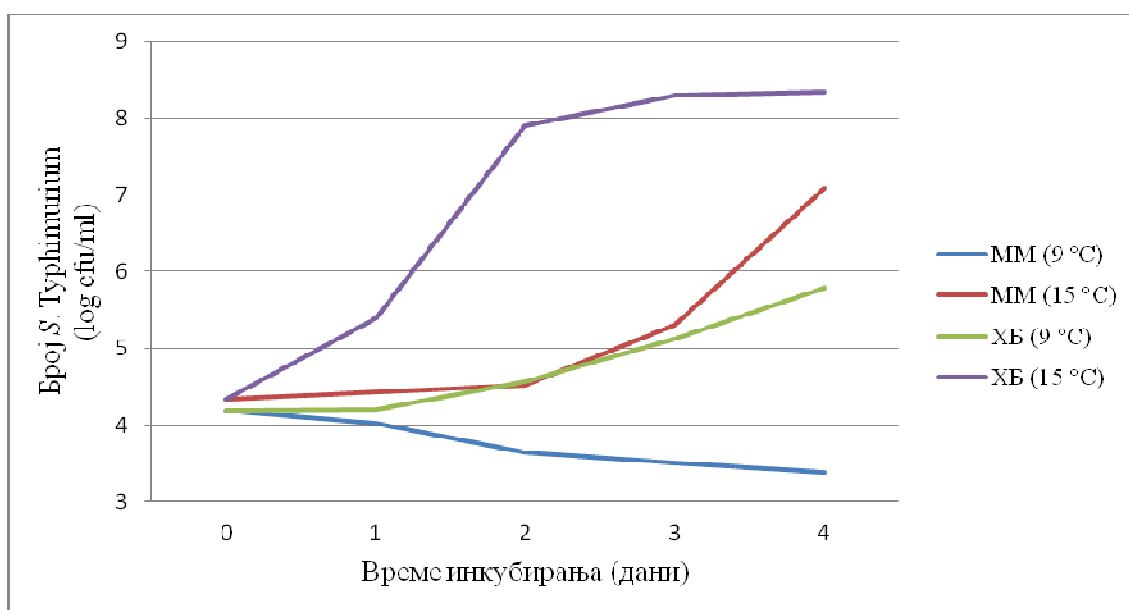
Слика 14. Просечне вредности броја *S. Enteritidis* у тестираним узорцима млека магарице (ММ) и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^4 cfu/ml, током инкубирања на +9 и +15 °C.



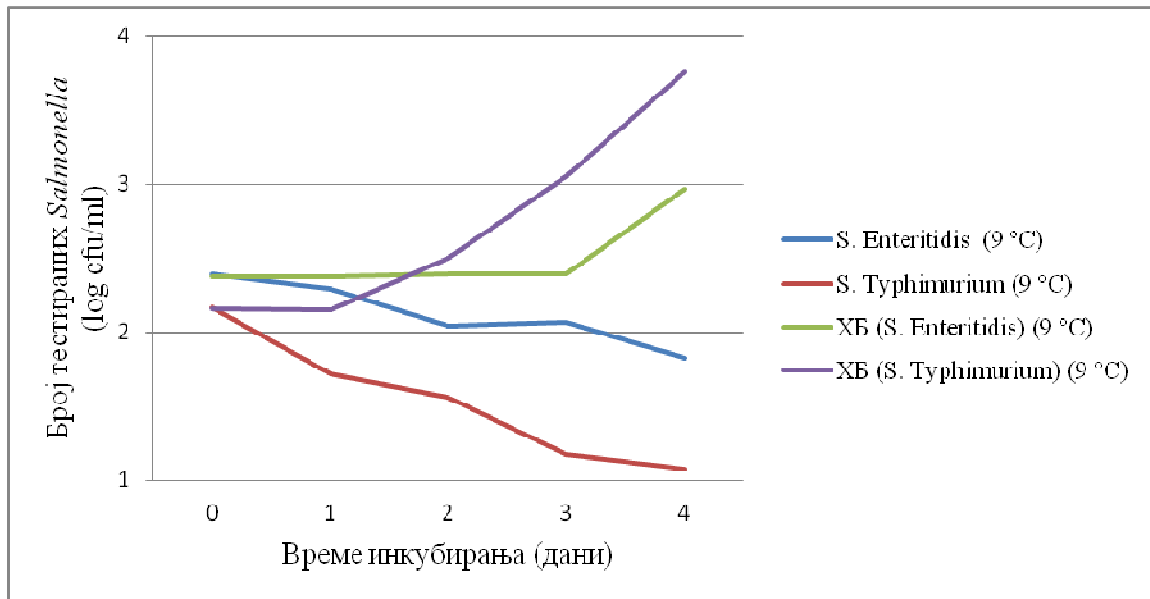
Слика 15. Просечне вредности броја *S. Typhimurium* у тестираним узорцима млека магарице (ММ) и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^2 cfu/ml, током инкубирања на +9 и +15 °C.



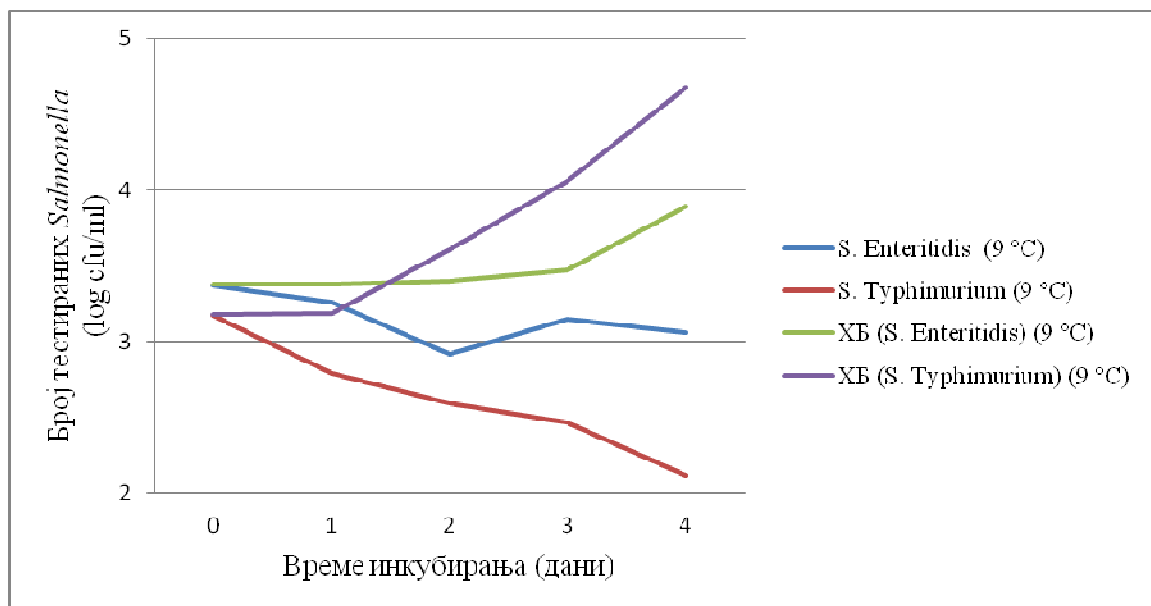
Слика 16. Просечне вредности броја *S. Typhimurium* у тестираним узорцима млека магарице (ММ) и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^3 cfu/ml, током инкубирања на +9 и +15 °C.



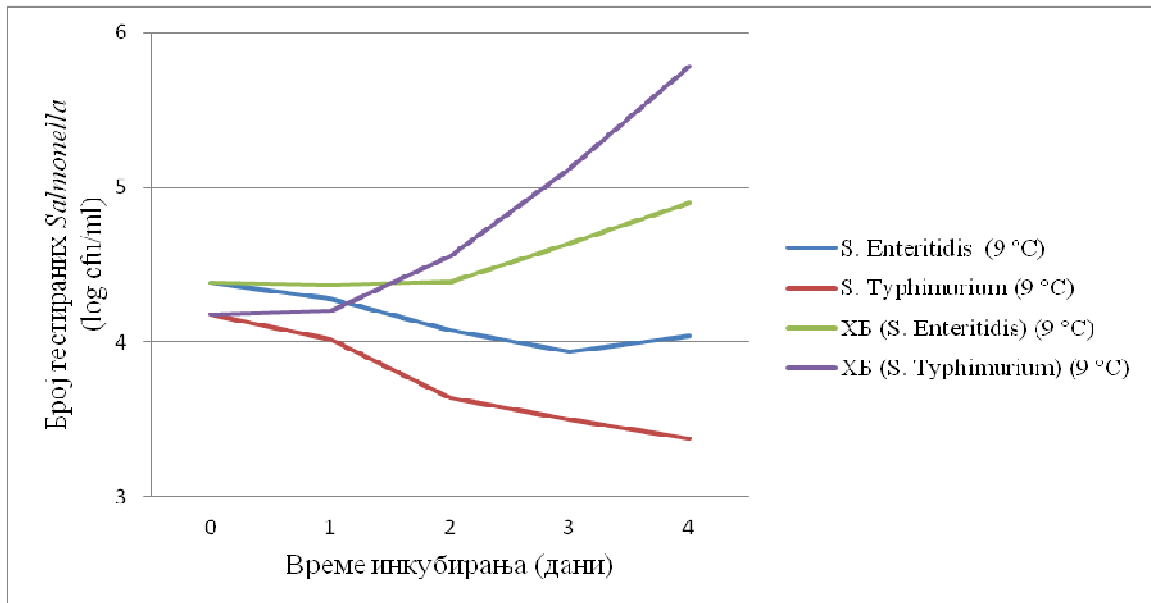
Слика 17. Просечне вредности броја *S. Typhimurium* у тестираним узорцима млека магарице (ММ) и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^4 cfu/ml, током инкубирања на +9 и +15 °C.



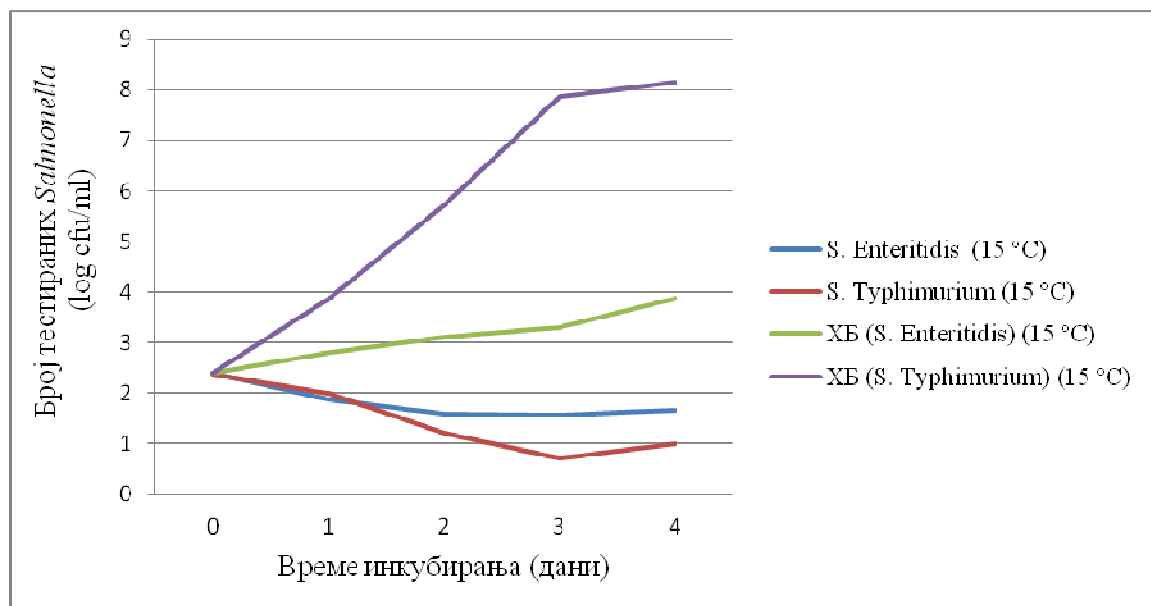
Слика 18. Просечне вредности броја *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* у тестираним узорцима млека магарице и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^2 cfu/ml, током инкубирања на +9 °C



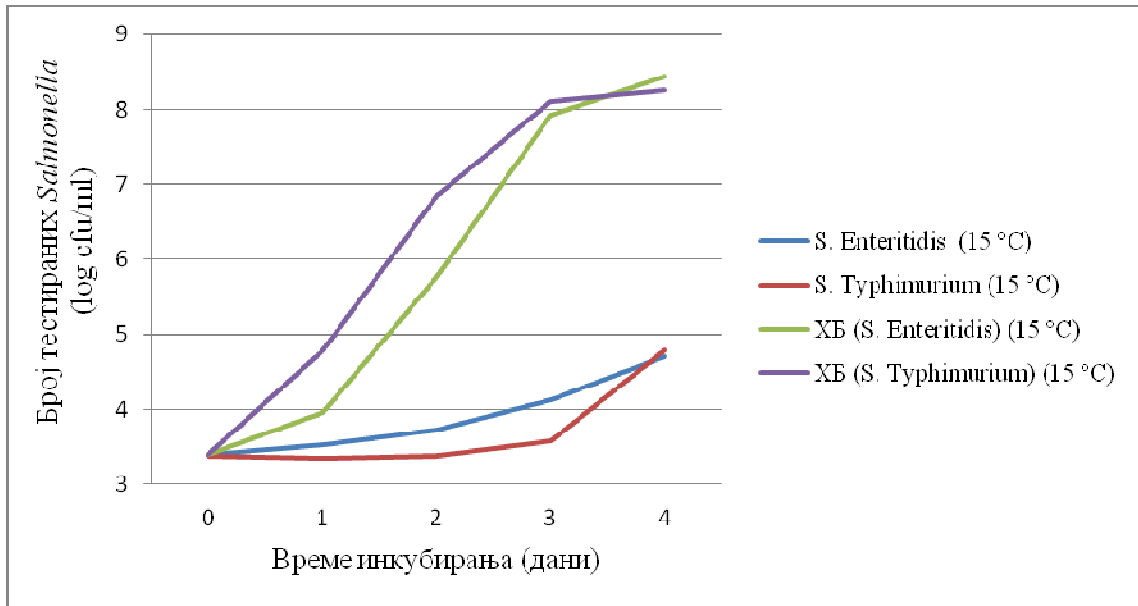
Слика 19. Просечне вредности броја *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* у тестираним узорцима млека магарице и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^3 cfu/ml, током инкубирања на +9 °C



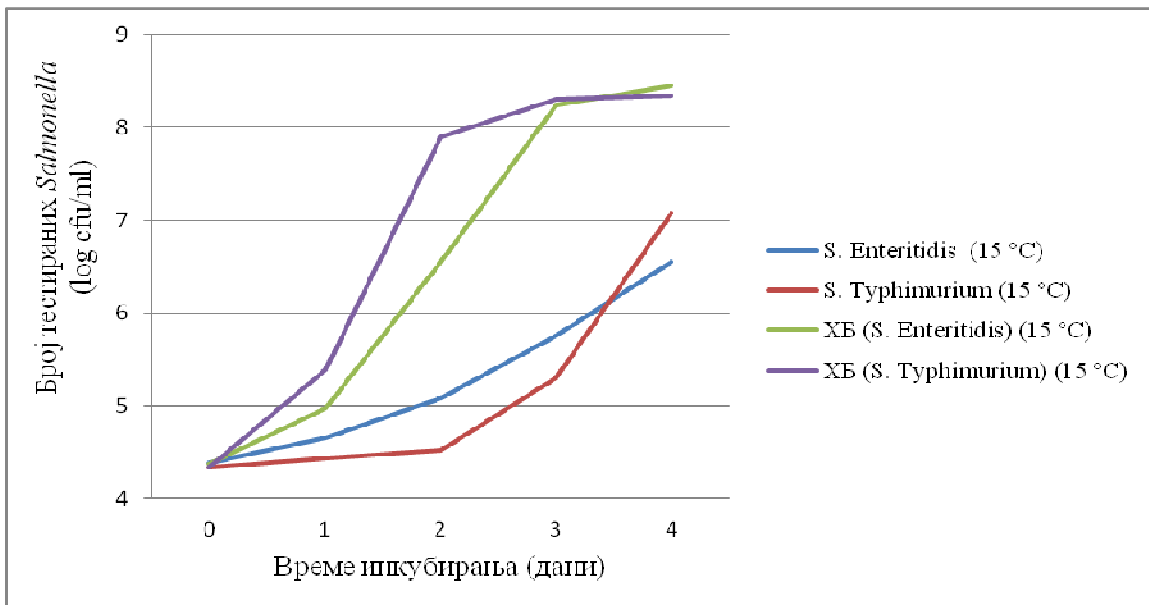
Слика 20. Просечне вредности броја *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* у тестираним узорцима млека магарице и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^4 cfu/ml, током инкубирања на +9 °C



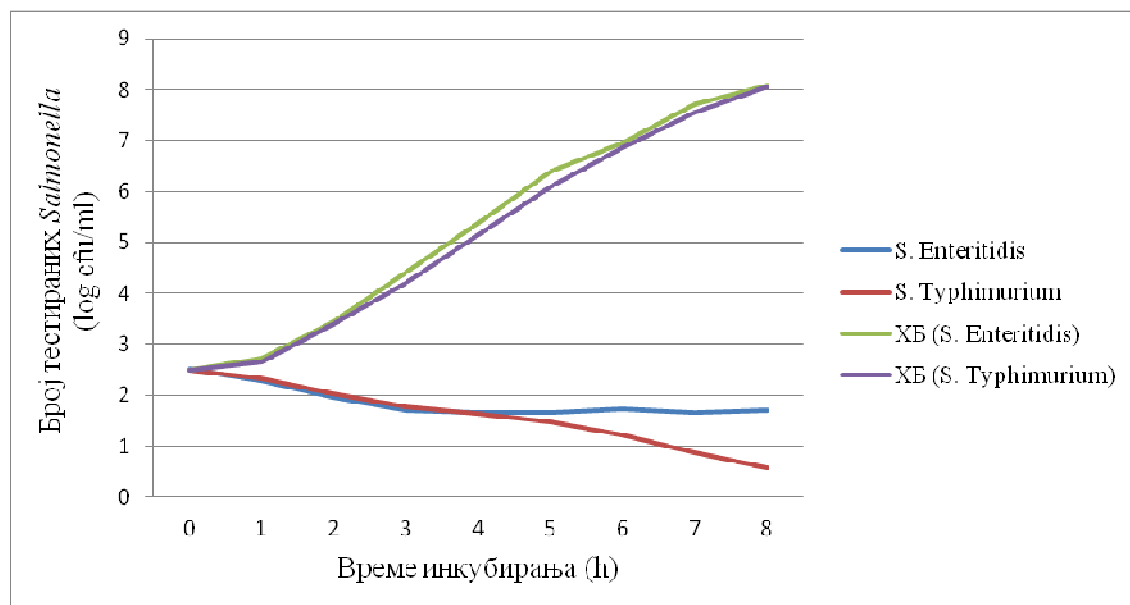
Слика 21. Просечне вредности броја *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* у тестираним узорцима млека магарице и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^2 cfu/ml, током инкубирања на +15 °C



Слика 22. Просечне вредности броја *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* у тестираним узорцима млека магарице и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^3 cfu/ml, током инкубирања на $+15$ °C



Слика 23. Просечне вредности броја *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* у тестираним узорцима млека магарице и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^4 cfu/ml, током инкубирања на $+15$ °C.



Слика 24. Просечне вредности броја *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* у тестираним узорцима млека магарице и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^2 cfu/ml, током инкубирања на $+38$ °C.

Млеко магарице је на свим радним температурама показало јачи антибактеријски ефекат према *S. Typhimurium* у поређењу са *S. Enteritidis*. Та разлика у антибактеријском деловању млека магарице према два тестирана *Salmonella* соја додатно добија на значају када се сагледа разлика у њиховој брзини умножавања у хранљивом бујону, која је забележена и на $+9$ и на $+15$ °C (Слике 18-23). У огледима на $+9$ °C на сва три тестирана нивоа контаминације, број *S. Typhimurium* је од почетка до краја инкубирања био знатно нижи у односу на број *S. Enteritidis* (Слике 18-20). Када се изврши поређење антибактеријске активности испитаних узорка млека магарице према *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* на вишим нивоима контаминације на температури инкубирања од $+15$ °C (Слике 22 и 23), прво што се да приметити је другачији тренд промене броја тест микроорганизама у овим узорцима. Антибактеријска активност испитаних узорка млека магарице према *S. Enteritidis* састојала се у успоравању, односно инхибицији њеног раста током свих 96 сати инкубирања, док се у случају *S. Typhimurium* у почетку углавном огледала у продужењу лаг фазе, затим у успоравању раста и на крају у потпуном престанку антимикуробног деловања. Из тог разлога је након 4 дана инкубирања у узорцима млека магарице, генерално забележен већи број *S. Typhimurium* у односу на *S. Enteritidis*, иако то није био случај након 24, 48 и 72 сата инкубирања. Оваква

тенденција промене броја *S. Typhimurium* је највероватније последица много веће брзине умножавања *S. Typhimurium* на +15 °C у односу на *S. Enteritidis*. Већа брзина умножавања тестираног соја вероватно значи бржу потрошњу антибактеријског потенцијала млека магарице. Снажнија антибактеријска активност млека магарице према *S. Typhimurium* је регистрована и на +38 °C (Слика 24). Број тестираних патогена је током прва 4 сата инкубирања био приближно исти, да би након истека тог времена па све до краја огледа број *S. Typhimurium* опадао, за разлику од броја *S. Enteritidis* који је био константан или је лагано растао.

4.2.4. Антибактеријска активност млека магарице према *E. coli*

4.2.4.1. Антибактеријски тест на +9 °C

У Табели 49 приказани су садржаји лизозима, лактоферина и калцијума одређени у узорцима млека магарице коришћеним за антибактеријске тестове према *E. coli* ATCC 8739 на +9 и +15 °C. У Табелама 50, 51 и 52 представљени су резултати испитивања антибактеријске активности према *E. coli* ATCC 8739 на +9 °C за различите нивое контаминације.

Резултати представљени у Табелама 50-52, јасно указују да на +9 °C на сва три тестирана нивоа контаминације постоји снажна антибактеријска активност млека магарице према *E. coli* ATCC 8739. Различит број тестираног микроорганизма у испитиваним узорцима млека детектован након 96 сати инкубирања, упућује на различит антибактеријски потенцијал појединачних узорака млека магарице.

Табела 49. Садржај лизозима (LYZ), лактоферина (LF) и калцијума (Ca) у узорцима млека магарице коришћеним за испитивање антибактеријске активности према *E. coli* ATCC 8739 на +9 и +15 °C

	Узорци млека магарице							
	3	16	19	20	21	22	23	24
LYZ	3,12 ^A	3,46 ^B	3,19 ^A	4,14 ^F	1,74 ^A	1,24 ^C	2,83 ^E	3,42 ^B
(g/l)	(0,02)	(0,10)	(0,05)	(0,12)	(0,06)	(0,07)	(0,07)	(0,07)
LF	н.д.	54,30 ^D	28,70 ^B	38,70 ^C	6,30 ^A	н.д.	н.д.	н.д.
(mg/l)	н.д.	(0,70)	(1,00)	(0,16)	(0,60)	н.д.	н.д.	н.д.
Ca	549,10 ^B	765,00 ^E	903,75 ^A	845,00 ^F	980,00 ^G	721,25 ^D	665,00 ^C	885,00 ^A
(mg/l)	(1,07)	(0,75)	(1,25)	(12,50)	(12,50)	(16,25)	(27,50)	(27,50)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истом реду са различитим малим словима су статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано.

Табела 50. Број *E. coli* ATCC 8739 (log cfu/ml) у вештачки контаминираним (ниво контаминације 10^2 cfu/ml) узорцима млека магарице током 96 сати инкубирања на +9 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	3	16	19	20	21	22	23	24	ХБ
0.	2,51 ^{d,A} (0,01)	2,51 ^{b,A} (0,02)	2,50 ^{b,A} (0,03)	2,50 ^A (0,04)	2,52 ^{c,A} (0,03)	2,49 ^{d,A} (0,02)	2,49 ^{c,A} (0,03)	2,51 ^{c,A} (0,02)	2,50 ^{a,A} (0,04)
1.	1,92 ^c (0,08)	1,04 ^a (0,04)	0,95 ^a (0,05)	н.д.	1,29 ^b (0,07)	2,23 ^c (0,02)	2,67 ^d (0,07)	1,68 ^a (0,05)	2,86 ^b (0,05)
2.	0,95 ^b (0,05)	н.д.	н.д.	н.д.	1,04 ^a (0,04)	1,79 ^b (0,01)	2,23 ^b (0,08)	1,69 ^a (0,04)	3,30 ^c (0,00)
3.	0,67 ^a (0,06)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	1,20 ^a (0,05)	1,16 ^a (0,06)	1,20 ^b (0,05)	3,81 ^d (0,03)
4.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	4,19 ^e (0,03)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано; ХБ - хранљиви бујон.

Број *E. coli* ATCC 8739 се у свим узорцима млека са најнижим нивоом контаминације константно смањивао током трајања експеримента, да би на крају огледа био испод границе детекције (Табела 50). У огледу са средњим нивоом контаминације, најјаче антибактеријско дејство су испољили узорци 19, 20 и 21 у којима присуство тест микроорганизма није детектовано након 72 сата инкубирања (Табела 51).

Табела 51. Број *E. coli* ATCC 8739 (log cfu/ml) у вештачки контаминираним (ниво контаминације 10^3 cfu/ml) узорцима млека магарице током 96 сати инкубирања на +9 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	3	16	19	20	21	22	23	24	ХБ
0.	3,51 ^{d,A} (0,03)	3,51 ^{d,A} (0,01)	3,49 ^{c,A} (0,04)	3,52 ^{c,A} (0,02)	3,50 ^{c,A} (0,01)	3,51 ^{e,A} (0,01)	3,49 ^{e,A} (0,02)	3,51 ^{c,A} (0,03)	3,50 ^{a,A} (0,01)
1.	3,35 ^c (0,03)	3,28 ^c (0,07)	2,22 ^b (0,02)	1,90 ^b (0,04)	3,40 ^b (0,06)	3,42 ^d (0,04)	3,32 ^d (0,06)	3,60 ^d (0,01)	3,61 ^b (0,09)
2.	2,11 ^b (0,03)	2,18 ^b (0,03)	1,03 ^a (0,02)	0,85 ^a (0,00)	1,79 ^a (0,29)	2,90 ^c (0,01)	2,24 ^c (0,07)	2,50 ^b (0,02)	4,11 ^c (0,00)
3.	1,58 ^a (0,10)	1,30 ^a (0,04)	н.д.	н.д.	н.д.	2,82 ^b (0,06)	2,10 ^b (0,04)	1,93 ^a (0,05)	5,15 ^d (0,03)
4.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	2,74 ^{a,B} (0,01)	1,90 ^{a,A} (0,02)	н.д.	5,43 ^{c,C} (0,00)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано; ХБ - хранљиви бујон.

Антибактеријска активност испитаних узорака млека магарице била је условљена концентрацијом суспензије тест микроорганизма, будући да је присуство *E. coli*, у

огледу са највишим нивоом контаминације (Табела 52), било детектовано у свим испитаним узорцима након 96 сати инкубирања.

Табела 52. Број *E. coli* ATCC 8739 (log cfu/ml) у вештачки контаминираним (ниво контаминације 10^4 cfu/ml) узорцима млека магарице током 96 сати инкубирања на $+9$ °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	3	16	19	20	21	22	23	24	ХБ
0.	4,51 ^{a.A} (0,03)	4,50 ^{e.A} (0,00)	4,52 ^{e.A} (0,01)	4,50 ^{e.A} (0,01)	4,50 ^{e.A} (0,01)	4,51 ^{b.A} (0,01)	4,50 ^{c.A} (0,01)	4,50 ^{e.A} (0,02)	4,50 ^{a.A} (0,02)
1.	4,52 ^a (0,01)	3,84 ^d (0,13)	3,29 ^d (0,01)	3,33 ^d (0,05)	3,87 ^d (0,05)	4,50 ^b (0,01)	4,47 ^b (0,01)	4,39 ^d (0,02)	4,78 ^b (0,00)
2.	3,82 ^d (0,02)	3,08 ^c (0,04)	2,60 ^c (0,00)	2,75 ^c (0,02)	2,90 ^c (0,06)	4,48 ^c (0,01)	4,46 ^{ab} (0,02)	3,87 ^c (0,05)	5,54 ^c (0,02)
3.	3,51 ^b (0,01)	1,88 ^b (0,02)	1,65 ^b (0,04)	1,50 ^b (0,01)	1,67 ^b (0,02)	4,47 ^a (0,01)	4,46 ^{ab} (0,01)	2,58 ^b (0,03)	5,81 ^d (0,01)
4.	3,60 ^a (0,04)	1,61 ^{a.A} (0,14)	1,00 ^{a.C} (0,00)	1,10 ^{a.D} (0,05)	1,22 ^{a.D} (0,05)	4,47 ^{a.B} (0,00)	4,45 ^{a.B} (0,01)	1,69 ^{a.A} (0,02)	6,24 ^{e.G} (0,03)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

Под овим експерименталним условима, међусобна зависност антибактеријске активности узорака млека и садржаја калцијума, била је највише видљива, јер је најнижи број тестиране *E. coli* детектован у узорцима са највећим садржајем овог метала (16, 19, 20, 21, 24) (Табела 49).

Антибактеријска активност узорака 22 и 23 састојала се у благој редукацији почетног броја тест микроорганизама током прва два сата инкубирања, а затим у инхибицији његовог раста до краја огледа (Табела 52). У узорку 3 млека магарице забележен је мањи број *E. coli* на крају инкубирања (Табела 52), иако је овај узорак имао нижи садржај калцијума у поређењу са узорцима 22 и 23 (Табела 49). Међутим, садржај лизозима у узорку 3 био је статистички значајно већи ($P < 0,05$) у односу на садржај овог протеина у узорцима 22 и 23 (Табела 49). Садржај лактоферина је у 4 испитана узорка био испод границе детекције, док је његова максимална вредност забележена у узорку 16 (Табела 49). Генерално, узорци који су показали јачу антибактеријску активност према *E. coli* ATCC 8739 имали су већи садржај овог ензима, тако да изванредан допринос лактоферина укупној антибактеријској активности млека магарице не може бити занемарен, упркос његовој нижој концентрацији у односу на лизозим.

У Табели 53 приказани су садржаји лизозима, лактоферина и калцијума одређени у узорцима млека магарице коришћеним за антибактеријске тестове према *E. coli* ATCC 10536 на +9 и +15 °C. У Табелама 54, 55 и 56 представљени су резултати испитивања антибактеријске активности према *E. coli* ATCC 10536 на +9 °C за различите нивое контаминације.

Табела 53. Садржај лизозима (LYZ), лактоферина (LF) и калцијума (Ca) у узорцима млека магарице коришћеним за испитивање антибактеријске активности према *E. coli* ATCC 10536 на +9 и +15 °C

	Узорци млека магарице							
	6	10	15	23	25	26	27	28
LYZ	1,00 ^C	1,88 ^E	2,70 ^A	2,83 ^A	3,25 ^F	3,85 ^B	3,89 ^B	1,40 ^D
(g/l)	(0,06)	(0,07)	(0,08)	(0,04)	(0,05)	(0,12)	(0,06)	(0,11)
LF	н.д.	49,80 ^D	н.д.	н.д.	32,10 ^A	20,70 ^C	32,80 ^A	3,50 ^B
(mg/l)	н.д.	(1,4)	н.д.	н.д.	(0,90)	(0,90)	(0,80)	(0,40)
Ca	655,60 ^A	466,10 ^C	961,30 ^B	665,00 ^A	1003,80 ^F	867,50 ^E	969,00 ^B	716,25 ^D
(mg/l)	(3,08)	(0,40)	(3,75)	(27,50)	(6,20)	(17,50)	(5,00)	(3,25)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истом реду са различитим малим словима су статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано.

У огледима са нижим нивоима контаминације број *E. coli* ATCC 10536 се у свим испитиваним узорцима млека константно смањивао током 96 сати инкубирања (Табеле 54 и 55), са том разликом што је интензитет редукције био већи у узорцима са већим садржајем калцијума (15, 25, 26, 27) (Табела 53).

Табела 54. Број *E. coli* ATCC 10536 (log cfu/ml) у вештачки контаминираним (ниво контаминације 10^2 cfu/ml) узорцима млека магарице током 96 сати инкубирања на +9 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	6	10	15	23	25	26	27	28	ХБ
0.	2,43 ^{d,A}	2,41 ^{d,A}	2,41 ^{c,A}	2,43 ^{d,A}	2,41 ^{c,A}	2,40 ^{c,A}	2,42 ^{c,A}	2,40 ^{d,A}	2,42 ^{a,A}
	(0,05)	(0,04)	(0,04)	(0,05)	(0,05)	(0,03)	(0,02)	(0,05)	(0,04)
1.	1,81 ^c	1,90 ^c	1,25 ^b	1,77 ^c	1,66 ^b	1,20 ^b	1,10 ^b	1,69 ^c	2,44 ^a
	(0,02)	(0,03)	(0,05)	(0,01)	(0,04)	(0,03)	(0,03)	(0,16)	(0,04)
2.	1,69 ^b	1,78 ^b	0,79 ^a	1,65 ^b	0,75 ^a	0,88 ^a	0,59 ^a	1,11 ^b	2,43 ^a
	(0,03)	(0,04)	(0,04)	(0,04)	(0,05)	(0,03)	(0,00)	(0,01)	(0,03)
3.	1,36 ^a	1,59 ^a	н.д.	1,41 ^a	н.д.	н.д.	н.д.	0,69 ^a	2,43 ^a
	(0,05)	(0,02)	н.д.	(0,03)	н.д.	н.д.	н.д.	(0,36)	(0,05)
4.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	2,55 ^b
	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	(0,04)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано; ХБ - хранљиви бујон.

У поменутиим узорцима млека магарице тестирани сој *E. coli* није био детектован након 48, односно 96 сати инкубирања (Табеле 54 и 55).

Табела 55. Број *E. coli* ATCC 10536 (log cfu/ml) у вештачки контаминираним (ниво контаминације 10^3 cfu/ml) узорцима млека магарице током 96 сати инкубирања на +9 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	6	10	15	23	25	26	27	28	ХБ
0.	3,42 ^{e,A} (0,03)	3,41 ^{e,A} (0,04)	3,41 ^{d,A} (0,04)	3,40 ^{d,A} (0,04)	3,40 ^{d,A} (0,04)	3,40 ^{d,A} (0,03)	3,41 ^{d,A} (0,05)	3,41 ^{e,A} (0,04)	3,40 ^{a,A} (0,04)
1.	2,99 ^d (0,00)	3,10 ^d (0,05)	3,02 ^c (0,05)	2,92 ^c (0,08)	3,08 ^c (0,04)	2,93 ^c (0,03)	2,90 ^c (0,07)	2,69 ^d (0,01)	3,41 ^a (0,03)
2.	2,71 ^c (0,02)	2,81 ^c (0,03)	2,29 ^b (0,04)	2,65 ^a (0,03)	2,23 ^b (0,08)	2,25 ^b (0,02)	2,21 ^b (0,03)	2,32 ^c (0,02)	3,42 ^a (0,04)
3.	2,64 ^b (0,01)	2,70 ^b (0,00)	1,95 ^a (0,05)	2,59 ^a (0,02)	1,90 ^a (0,10)	1,84 ^a (0,01)	1,88 ^a (0,00)	2,19 ^b (0,04)	3,41 ^a (0,03)
4.	2,55 ^{a,C} (0,03)	2,63 ^{a,D} (0,02)	н.д.	2,40 ^{b,B} (0,04)	н.д.	н.д.	н.д.	2,01 ^{a,A} (0,01)	3,54 ^{b,E} (0,03)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано; ХБ - хранљиви бујон.

Табела 56. Број *E. coli* ATCC 10536 (log cfu/ml) у вештачки контаминираним (ниво контаминације 10^4 cfu/ml) узорцима млека магарице током 96 сати инкубирања на +9 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	6	10	15	23	25	26	27	28	ХБ
0.	4,38 ^{e,A} (0,02)	4,39 ^{e,A} (0,02)	4,40 ^{e,A} (0,01)	4,40 ^{e,A} (0,01)	4,39 ^{e,A} (0,02)	4,40 ^{d,A} (0,02)	4,40 ^{d,A} (0,02)	4,39 ^{c,A} (0,02)	4,39 ^{a,A} (0,01)
1.	4,20 ^d (0,01)	4,18 ^d (0,05)	3,82 ^d (0,05)	4,12 ^d (0,03)	3,87 ^d (0,01)	3,69 ^c (0,00)	3,72 ^c (0,01)	3,98 ^b (0,02)	4,41 ^a (0,02)
2.	3,52 ^a (0,05)	3,67 ^a (0,02)	3,50 ^c (0,02)	3,43 ^a (0,03)	2,95 ^c (0,02)	2,69 ^a (0,09)	2,73 ^a (0,06)	3,97 ^b (0,01)	4,40 ^a (0,02)
3.	3,79 ^b (0,07)	3,80 ^b (0,03)	2,93 ^b (0,01)	3,74 ^b (0,02)	2,82 ^b (0,03)	2,72 ^a (0,02)	2,68 ^a (0,05)	3,92 ^a (0,00)	4,39 ^a (0,01)
4.	3,90 ^{c,A} (0,05)	3,99 ^{c,A} (0,02)	2,68 ^{a,C} (0,06)	3,87 ^{c,A} (0,01)	2,52 ^{a,B} (0,05)	2,47 ^{b,B} (0,16)	2,45 ^{b,B} (0,04)	3,88 ^{a,A} (0,04)	4,64 ^{b,D} (0,03)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

Најнижи ниво тестираног патогена на крају инкубирања (уз константно смањење његовог броја од почетка огледа) регистрован је у истим узорцима и у експерименту са највишим нивоом контаминације (Табела 56). Насупрот томе, у узорцима 6, 10, 23 и 28 број *E. coli* је лагано опадао током првих 48 сати, да би након тога растао или био константан до краја огледа (Табела 56). Реч је о узорцима са најнижим садржајем калцијума (466,1-716,3 mg/l), у којима је очигледно након 48 сати

инкубирања дошло до слабљења антибактеријског дејства. Пошто је то забележено само у узорцима са највишим нивоом контаминације (10^4 cfu/ml), јасно је да је ниво почетне контаминације тестираним патогеном био један од лимитирајућих фактора у погледу антимикуробне активности овог млека. Снажна зависност антибактеријске активности млека магарице од садржаја калцијума забележена је код сва три нивоа контаминације (Табеле 53-56). Одсуство раста тестираног соја *E. coli* забележено је искључиво у узорцима са највећом концентрацијом калцијума и то само у случају нижих нивоа контаминације (Табеле 53-55). Поменути узорци млека магарице су истовремено имали и највећи садржај лизозима. Други антимикуробни агенс - лактоферин, није детектован у три узорка млека магарице, док је у осталим испитиваним узорцима његова вредност била у интервалу од 3,50 до 49,80 mg/l (Табела 53). На основу добијених резултата, не може се закључити да је на +9 °C лактоферин играо значајну улогу у антимикуробном деловању млека магарице према *E. coli* ATCC 10536. На пример, већа редукција броја тестираног микроорганизма забележена је у узорку 15 него у узорку 10, иако лактоферин у узорку 15 није био детектован, док је у узорку 10 регистрована његова максимална вредност (49,80 mg/l) (Табеле 53 и 56). Слично томе, у узорцима 23, 28 и 10 је након истека 96 сати инкубирања детектован исти степен редукције тестираног соја *E. coli*, поред тога што је садржај лактоферина у овим узорцима био испод границе детекције, па све до 49,80 mg/l (Табеле 53 и 56).

4.2.4.2. Антибактеријски тест на +15 °C

У Табелама 57, 58 и 59 приказани су резултати испитивања антибактеријске активности одабраних узорака млека магарице према *E. coli* ATCC 8739 на +15 °C за различите нивое контаминације.

У испитаним узорцима млека магарице са најнижим нивоом контаминације, присуство *E. coli* ATCC 8739 није детектовано након 24 сата инкубирања на +15 °C (Табела 57). Оглед са узорцима средњег нивоа контаминације (Табела 58) је показао да је тест микроорганизам на крају инкубирања био испод границе детекције само у узорцима млека који су истовремено имали висок садржај лизозима и калцијума (16, 19, 20, 24) (Табела 49).

Табела 57. Број *E. coli* ATCC 8739 (log cfu/ml) у вештачки контаминираним (ниво контаминације 10^2 cfu/ml) узорцима млека магарице током 96 сати инкубирања на +15 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	3	16	19	20	21	22	23	24	ХБ
0.	2,51 ^A (0,03)	2,50 ^A (0,04)	2,49 ^A (0,03)	2,51 ^A (0,02)	2,50 ^A (0,03)	2,51 ^A (0,02)	2,51 ^A (0,03)	2,50 ^A (0,02)	2,49 ^{a,A} (0,03)
1.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	4,13 ^b (0,05)
2.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	6,31 ^c (0,04)
3.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	6,92 ^d (0,02)
4.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	7,13 ^e (0,16)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано; ХБ - хранљиви бујон.

У осталим узорцима број испитиваног соја се *E. coli* смањивао током првих 72 сата инкубирања, да би након 96 сати био забележен његов пораст. Овај тренд указује на то да је после 72 сата дошло до слабљења дејства антибактеријских компонената у млеку магарице. Међутим, изгледа да су ова једињења и даље поседовала извесну активност, с обзиром на то да је брзина умножавања тестиране *E. coli* у том периоду била неупоредиво мања у поређењу са растом у хранљивом бујону (Табела 58).

Табела 58. Број *E. coli* ATCC 8739 (log cfu/ml) у вештачки контаминираним (ниво контаминације 10^3 cfu/ml) узорцима млека магарице током 96 сати инкубирања на +15 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	3	16	19	20	21	22	23	24	ХБ
0.	3,51 ^{e,A} (0,02)	3,50 ^{d,A} (0,01)	3,51 ^{b,A} (0,02)	3,50 ^{d,A} (0,01)	3,50 ^{e,A} (0,01)	3,50 ^{e,A} (0,01)	3,49 ^{b,A} (0,01)	3,51 ^{d,A} (0,01)	3,50 ^{b,A} (0,01)
1.	3,15 ^d (0,04)	3,22 ^c (0,05)	0,84 ^a (0,06)	1,55 ^c (0,02)	2,93 ^d (0,05)	3,10 ^d (0,00)	3,27 ^a (0,04)	2,81 ^c (0,03)	5,29 ^c (0,01)
2.	2,71 ^b (0,02)	2,60 ^b (0,05)	0,89 ^a (0,21)	1,37 ^b (0,12)	2,77 ^c (0,07)	2,80 ^b (0,01)	3,62 ^c (0,01)	2,00 ^b (0,04)	7,22 ^d (0,02)
3.	2,52 ^a (0,03)	1,40 ^a (0,04)	1,06 ^a (0,16)	0,60 ^a (0,11)	1,86 ^a (0,08)	2,62 ^a (0,04)	3,80 ^d (0,03)	1,10 ^a (0,05)	7,79 ^a (0,03)
4.	3,00 ^{c,C} (0,02)	н.д.	н.д.	н.д.	2,02 ^{b,A} (0,02)	2,90 ^{c,B} (0,05)	4,12 ^{e,D} (0,02)	н.д.	7,83 ^{a,F} (0,06)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано; ХБ - хранљиви бујон.

Табела 59. Број *E. coli* АТСС 8739 (log cfu/ml) у вештачки контаминираним (ниво контаминације 10^4 cfu/ml) узорцима млека магарице током 96 сати инкубирања на +15 °С

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	3	16	19	20	21	22	23	24	ХБ
0.	4,50 ^{a,A} (0,02)	4,50 ^{e,A} (0,00)	4,51 ^{c,A} (0,02)	4,51 ^{d,A} (0,02)	4,51 ^{a,A} (0,01)	4,50 ^{a,A} (0,01)	4,50 ^{a,A} (0,01)	4,50 ^{e,A} (0,01)	4,50 ^{b,A} (0,01)
1.	4,50 ^a (0,01)	3,64 ^d (0,05)	2,97 ^d (0,01)	1,39 ^a (0,09)	4,40 ^c (0,02)	4,42 ^b (0,02)	4,41 ^b (0,02)	4,19 ^d (0,02)	6,34 ^c (0,06)
2.	4,49 ^{ab} (0,01)	3,51 ^c (0,06)	2,73 ^b (0,03)	1,15 ^a (0,39)	4,49 ^a (0,01)	4,50 ^a (0,03)	4,50 ^a (0,01)	3,87 ^c (0,05)	7,42 ^d (0,03)
3.	4,48 ^{ab} (0,01)	3,13 ^a (0,02)	2,11 ^a (0,00)	2,14 ^b (0,03)	4,48 ^{ab} (0,03)	4,51 ^a (0,01)	4,50 ^a (0,00)	3,58 ^b (0,03)	7,95 ^a (0,05)
4.	4,47 ^{b,A} (0,02)	3,20 ^{b,D} (0,05)	2,78 ^{c,B} (0,04)	2,81 ^{c,B} (0,09)	4,45 ^b (0,02)	4,52 ^{a,A} (0,03)	4,51 ^{a,E} (0,02)	2,90 ^{a,C} (0,01)	8,00 ^{a,F} (0,08)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано; ХБ - хранљиви бујон.

Узорак 21 је поседовао висок ниво калцијума, али је са друге стране у односу на узорке 16, 19, 20 и 24 имао значајно мањи садржај лизозима (1,74 g/l) (Табела 49), што би могао бити узрок његове слабије антимицробне активности у односу на претходно поменуте узорке. Узорак 22 је од свих испитаних узорака имао најнижу концентрацију лизозима (1,24 g/l) и уједно најслабију антибактеријску активност. Слична тенденција је забележена и у узорцима млека са нивоом контаминације од 10^4 cfu/ml (Табела 59), где је највећа редукација броја тестираног соја *E. coli* такође регистрована у узорцима 16, 19, 20 и 24. Узорци сиромашнији калцијумом и/или лизозимом (3, 21, 22, 23) (Табела 49) показали су значајно слабију антибактеријску активност према тестираном соју. Највећи садржај лактоферина је забележен у узорцима који су показали најјачу антибактеријску активност према *E. coli* АТСС 8739 (Табеле 49, 58 и 59), слично као и у огледу на +9 °С.

У Табелама 60, 61 и 62 приказани су резултати испитивања антибактеријске активности одабраних узорака млека магарице према *E. coli* АТСС 10536 на +15 °С за различите нивое контаминације. На температури инкубирања од +15 °С регистровано је интензивно антибактеријско дејство млека магарице према *E. coli* АТСС 10536, са одређеним разликама између тестираних узорака (Табеле 60-62).

На најнижем нивоу контаминације, ова бактерија у 7 од 8 испитаних узорака није била детектована након 24 сата инкубирања (Табела 60). Изузетак је био узорак 10, који је од свих испитаних узорака имао најнижи садржај калцијума (400,1 mg/l), а у

којем је после 72 сата инкубирања *E. coli* и даље била присутна. Под дефинисаним експерименталним условима при свим тестираним нивоима контаминације, бактерицидно дејство према *E. coli* АТСС 10536 су испољили само узорци 15, 25 и 26 (Табеле 60-62).

Табела 60. Број *E. coli* АТСС 10536 (log cfu/ml) у вештачки контаминираним (ниво контаминације 10^2 cfu/ml) узорцима млека магарнице током 96 сати инкубирања на +15 °С

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарнице								
	6	10	15	23	25	26	27	28	ХБ
0.	2,42 ^A (0,04)	2,50 ^{ab,A} (0,03)	2,42 ^A (0,02)	2,51 ^A (0,03)	2,52 ^A (0,03)	2,43 ^A (0,04)	2,40 ^A (0,05)	2,43 ^A (0,05)	2,52 ^{a,A} (0,03)
1.	н.д.	2,54 ^a (0,03)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	2,52 ^a (0,02)
2.	н.д.	2,59 ^a (0,06)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	2,51 ^a (0,04)
3.	н.д.	2,44 ^b (0,06)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	2,51 ^a (0,03)
4.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	2,99 ^b (0,01)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано; ХБ - хранљиви бујон.

Табела 61. Број *E. coli* АТСС 10536 (log cfu/ml) у вештачки контаминираним (ниво контаминације 10^3 cfu/ml) узорцима млека магарнице током 96 сати инкубирања на +15 °С

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарнице								
	6	10	15	23	25	26	27	28	ХБ
0.	3,50 ^{d,A} (0,03)	3,50 ^{e,A} (0,04)	3,52 ^{c,A} (0,03)	3,52 ^{d,A} (0,03)	3,52 ^{d,A} (0,05)	3,52 ^{c,A} (0,03)	3,51 ^{d,A} (0,03)	3,51 ^{d,A} (0,02)	3,52 ^{a,A} (0,03)
1.	3,10 ^c (0,03)	3,41 ^d (0,02)	1,01 ^b (0,02)	3,08 ^c (0,02)	2,14 ^c (0,05)	1,75 ^b (0,05)	2,92 ^c (0,02)	3,27 ^a (0,00)	3,51 ^a (0,04)
2.	2,77 ^b (0,05)	3,00 ^c (0,05)	0,30 ^a (0,24)	2,79 ^b (0,01)	1,56 ^b (0,07)	1,04 ^a (0,04)	2,82 ^b (0,03)	3,17 ^a (0,02)	3,52 ^a (0,03)
3.	2,39 ^a (0,06)	2,81 ^b (0,05)	н.д.	2,33 ^a (0,08)	1,22 ^a (0,20)	н.д.	1,39 ^a (0,01)	2,65 ^c (0,15)	3,52 ^a (0,03)
4.	н.д.	2,50 ^{a,B} (0,02)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	1,93 ^{b,A} (0,04)	3,79 ^{b,C} (0,01)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано; ХБ - хранљиви бујон.

Антимикробна активност узорака 28 и 10 који су поседовали знатно мањи садржај калцијума и лизозима у поређењу са узорцима 15, 25 и 26 (Табела 53), огледала се у

инхибицији раста тетраног патогена, односно у продужетку трајања лаг фазе до краја самог експеримента (Табела 62).

Табела 62. Број *E. coli* ATCC 10536 (log cfu/ml) у вештачки контаминираним (ниво контаминације 10^4 cfu/ml) узорцима млека магарице током 96 сати инкубирања на $+15$ °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	6	10	15	23	25	26	27	28	ХБ
0.	4,52 ^{e,A} (0,02)	4,52 ^{a,A} (0,03)	4,53 ^{d,A} (0,01)	4,52 ^{e,A} (0,02)	4,53 ^{d,A} (0,01)	4,53 ^{d,A} (0,01)	4,52 ^{e,A} (0,02)	4,52 ^{b,A} (0,01)	4,50 ^{a,A} (0,03)
1.	4,12 ^d (0,05)	4,51 ^a (0,01)	2,60 ^c (0,01)	4,03 ^d (0,01)	3,61 ^c (0,02)	1,54 ^c (0,06)	3,76 ^d (0,01)	4,50 ^{ab} (0,01)	4,51 ^a (0,03)
2.	3,95 ^c (0,02)	4,50 ^a (0,02)	1,87 ^b (0,03)	3,80 ^c (0,05)	3,50 ^b (0,03)	1,08 ^b (0,04)	3,52 ^c (0,06)	4,49 ^{ab} (0,03)	4,53 ^a (0,01)
3.	3,50 ^b (0,06)	4,49 ^a (0,02)	0,78 ^a (0,00)	3,32 ^b (0,02)	2,15 ^a (0,01)	0,60 ^a (0,11)	2,18 ^b (0,15)	4,49 ^{ab} (0,01)	4,52 ^a (0,02)
4.	3,35 ^{a,D} (0,05)	4,48 ^{a,A} (0,02)	н.д.	2,61 ^{a,C} (0,06)	н.д.	н.д.	1,28 ^{a,B} (0,04)	4,47 ^{a,A} (0,03)	6,70 ^{b,E} (0,02)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано; ХБ - хранљиви бујон.

Под дефинисаним експерименталним условима, лаг фаза *E. coli* ATCC 10536 у хранљивом бујону је трајала 72 сата. Узорци са најјачом антибактеријском активношћу (Табеле 60-62) су имали највећу концентрацију калцијума, али истовремено и највећи садржај лизозима (Табеле 53). Из тог разлога је и у овим огледима било тешко дати предност утицају садржаја калцијума на антибактеријску активност млека магарице, у односу на директан утицај саме концентрације лизозима. Међутим, чињеница је да је узорак са најнижим садржајем овог метала (466,10 mg/l) уједно показао и најслабије антибактеријско дејство према *E. coli* ATCC 10536 (Табела 60). Што се тиче лактоферина, слично огледу са *E. coli* ATCC 10536 на $+9$ °C, није установљена веза између његовог садржаја (Табела 53) и степена редукције тестиране *E. coli* (Табеле 60-62). Наиме, у једном од три узорка која су показала најјачу антибактеријску активност према тестираном микроорганизму (Табела 62), овај ензим био је испод границе детекције (Табела 53), док је антибактеријско деловање узорка 6 било интензивније у поређењу са узорком 10, упркос томе што лактоферин у узорку 6 није био детектован.

4.2.4.3. Антибактеријски тест на +38 °C

У Табели 63 приказане су концентрације калцијума, лизозима и лактоферина, као и рН вредност у узорцима млека магарице коришћеним за антибактеријски тест према *E. coli* АТСС 8739 и *E. coli* АТСС 10536 на +38 °C. У Табелама 64 и 65 представљене су промене броја *E. coli* АТСС 10536 и *E. coli* АТСС 8739 у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^2 cfu/ml) током 8 сати инкубирања на +38 °C.

Табела 63. Садржај калцијума (mg/l), лизозима (g/l), лактоферина (mg/l) и рН вредност млека магарице

		Узорци млека магарице																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Ca	612,4 ^h (0,86)	529,4 ^e (5,88)	549,1 ^f (1,07)	527,5 ^e (12,5)	630,0 ⁱ (12,50)	655,6 ^j (3,08)	637,2 ⁱ (0,27)	691,3 ^k (1,25)	377,1 ^a (4,10)	466,1 ^d (0,40)	433,3 ^c (0,81)	400,5 ^b (0,54)	1231,0 ^p (4,00)	1127,5 ^o (2,50)	961,3 ⁿ (3,75)	765,0 ^l (0,75)	567,4 ^g (2,65)	845,0 ^m (19,5)	
LYZ	2,24 ^{ef} (0,02)	1,96 ^c (0,03)	3,12 ⁱ (0,02)	2,18 ^e (0,04)	3,67 ^k (0,05)	1,00 ^a (0,03)	2,08 ^d (0,08)	1,73 ^b (0,10)	3,06 ^{hi} (0,02)	1,88 ^e (0,09)	2,23 ^{ef} (0,07)	3,03 ^{hi} (0,08)	2,98 ^h (0,03)	3,74 ^k (0,05)	2,70 ^g (0,06)	3,46 ^j (0,06)	2,33 ^f (0,08)	0,98 ^a (0,02)	
LF	27,80 ^h (2,20)	16,20 ^f (1,20)	н.д.	26,70 ^g (0,70)	7,00 ^c (0,05)	н.д.	40,06 ⁱ (0,30)	5,40 ^b (0,20)	15,30 ^f (0,02)	49,80 ^j (0,60)	2,20 ^a (0,03)	н.д.	н.д.	11,15 ^e (0,05)	н.д.	54,30 ^k (0,40)	15,70 ^f (0,09)	9,90 ^d (0,08)	
рН	7,16 ^{abcde} (0,02)	7,11 ^a (0,03)	7,25 ^f (0,03)	7,13 ^{abc} (0,04)	7,21 ^{ef} (0,02)	7,18 ^{bcde} (0,03)	7,15 ^{abcde} (0,01)	7,11 ^a (0,01)	7,12 ^{ab} (0,03)	7,20 ^{def} (0,05)	7,18 ^{bcde} (0,04)	7,16 ^{abcde} (0,02)	7,15 ^{abcde} (0,04)	7,12 ^{ab} (0,02)	7,19 ^{cde} (0,03)	7,15 ^{abcde} (0,02)	7,16 ^{abcde} (0,06)	7,14 ^{abcd} (0,03)	

Вредности дате у табели представљају средњу вредност три понављања. Стандардна девијација је дата у заградама. Средње вредности у истом реду са различитим малим словима су статистички различите ($P < 0,05$). Ca - калцијум, LYZ - лизозим, LF - лактоферин, н.д. - није детектовано.

Табела 64. Број *E. coli* ATCC 10536 (log cfu/ml) у млеку магарике током 8 сати инкубирања на +38 °С

Време инкубирања (h)	Узорци млека магарике																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	ХБ
0	2,40 ^{f.A} (0,02)	2,40 ^{ab.A} (0,05)	2,40 ^{a.A} (0,02)	2,40 ^{d.A} (0,05)	2,40 ^{ad.A} (0,05)	2,40 ^{a.A} (0,02)	2,40 ^{b.A} (0,02)	2,40 ^{b.A} (0,02)	2,40 ^{b.A} (0,02)	2,40 ^{e.A} (0,02)	2,40 ^{f.A} (0,02)	2,40 ^{d.A} (0,05)	2,40 ^{c.A} (0,05)	2,40 ^{c.A} (0,05)	2,40 ^{c.A} (0,05)	2,40 ^{c.A} (0,05)	2,40 ^{ad.A} (0,02)	2,40 ^{d.A} (0,05)	2,40 ^{a.A} (0,02)
1	2,24 ^b (0,01)	2,41 ^{ab} (0,02)	2,48 ^{ab} (0,09)	2,67 ^a (0,02)	2,48 ^a (0,03)	2,40 ^a (0,07)	2,27 ^b (0,06)	2,59 ^{ab} (0,05)	2,94 ^a (0,03)	2,75 ^a (0,05)	2,58 ^c (0,06)	2,65 ^a (0,05)	2,20 ^b (0,05)	1,84 ^b (0,06)	1,16 ^b (0,15)	1,85 ^b (0,05)	2,32 ^{cd} (0,04)	2,00 ^c (0,04)	2,70 ^b (0,02)
2	2,17 ^b (0,00)	2,46 ^b (0,03)	2,46 ^a (0,01)	2,85 ^b (0,02)	2,46 ^a (0,01)	2,31 ^a (0,09)	2,19 ^b (0,04)	2,61 ^a (0,01)	2,97 ^a (0,01)	2,79 ^{ab} (0,02)	2,84 ^d (0,09)	2,69 ^{ab} (0,01)	2,10 ^a (0,03)	0,95 ^a (0,05)	0,73 ^a (0,05)	0,85 ^a (0,15)	2,49 ^{ab} (0,01)	1,60 ^b (0,05)	3,45 ^c (0,02)
3	1,84 ^a (0,06)	2,33 ^{ab} (0,07)	2,60 ^{bc} (0,11)	3,07 ^e (0,04)	2,20 ^{cd} (0,03)	2,42 ^a (0,06)	1,90 ^a (0,05)	2,76 ^a (0,03)	2,96 ^a (0,00)	2,82 ^{bc} (0,05)	2,96 ^{ab} (0,00)	2,75 ^{abc} (0,05)	2,07 ^a (0,10)	н.д.	н.д.	н.д.	2,56 ^b (0,02)	1,00 ^a (0,04)	4,48 ^d (0,02)
4	1,77 ^a (0,07)	2,21 ^a (0,24)	2,62 ^c (0,02)	2,75 ^{ab} (0,13)	2,04 ^c (0,08)	2,31 ^a (0,01)	1,74 ^a (0,21)	2,56 ^{ab} (0,01)	2,97 ^a (0,04)	2,88 ^{cd} (0,03)	3,01 ^{be} (0,02)	2,88 ^{bc} (0,05)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	2,50 ^{ab} (0,03)	н.д.	5,32 ^e (0,02)
5	1,76 ^a (0,02)	1,86 ^c (0,24)	2,60 ^{bc} (0,04)	2,74 ^{ab} (0,04)	1,63 ^f (0,31)	2,03 ^c (0,12)	1,74 ^a (0,04)	2,11 ^f (0,07)	2,96 ^a (0,02)	2,90 ^d (0,02)	3,08 ^e (0,12)	2,94 ^c (0,00)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	2,48 ^{ab} (0,00)	н.д.	6,37 ^f (0,04)
6	1,39 ^e (0,09)	2,03 ^{cd} (0,02)	2,16 ^f (0,07)	2,46 ^d (0,05)	1,39 ^e (0,09)	1,29 ^b (0,32)	1,39 ^d (0,29)	1,83 ^e (0,05)	2,93 ^a (0,03)	2,82 ^{bc} (0,05)	2,95 ^{ab} (0,00)	2,83 ^{abc} (0,07)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	2,33 ^{cd} (0,01)	н.д.	6,98 ^g (0,04)
7	1,20 ^d (0,02)	2,00 ^{cd} (0,04)	1,98 ^e (0,03)	1,79 ^c (0,11)	1,10 ^b (0,17)	1,31 ^b (0,02)	1,10 ^c (0,09)	1,43 ^d (0,32)	2,96 ^a (0,02)	2,73 ^a (0,01)	2,88 ^{ad} (0,01)	2,33 ^d (0,31)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	2,24 ^c (0,06)	н.д.	7,62 ^h (0,04)
8	0,92 ^{c.A} (0,03)	1,46 ^{e.C} (0,15)	1,39 ^{d.C} (0,12)	1,69 ^{c.D} (0,09)	1,11 ^{b.B} (0,10)	1,10 ^{b.B} (0,05)	1,07 ^{c.B} (0,06)	1,08 ^{c.B} (0,03)	2,95 ^{a.H} (0,00)	2,56 ^{f.G} (0,04)	2,63 ^{c.G} (0,00)	2,39 ^{d.F} (0,09)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	1,86 ^{e.E} 0,15	н.д.	8,10 ^{i.I} (0,05)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон; н.д. - није детектовано

Табела 65. Број *E. coli* ATCC 8739 (log cfu/ml) у млеку магарице током 8 сати инкубирања на +38 °C

Време инкубирања (h)	Узорци млека магарице																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	ХБ
0	2,40 ^{ba} (0,02)	2,40 ^{ca} (0,05)	2,40 ^{ca} (0,05)	2,40 ^{da} (0,05)	2,40 ^{ba} (0,05)	2,40 ^{ca} (0,05)	2,40 ^{ca} (0,05)	2,40 ^{ba} (0,05)	2,40 ^{da} (0,05)	2,40 ^{ca} (0,05)	2,40 ^{ba} (0,05)	2,40 ^{da} (0,05)	2,40 ^{ba} (0,05)	2,40 ^{ba} (0,05)	2,40 ^{ba} (0,05)	2,40 ^c (0,05)	2,40 ^d (0,05)	2,40 ^b (0,05)	2,40 ^a (0,02)
1	2,75 ^c (0,01)	2,63 ^d (0,03)	1,04 ^b (0,04)	1,69 ^c (0,15)	2,30 ^a (0,05)	2,19 ^b (0,01)	1,78 ^b (0,00)	2,51 ^c (0,01)	1,95 ^c (0,08)	2,70 ^d (0,05)	2,59 ^c (0,04)	1,80 ^c (0,11)	1,42 ^a (0,03)	1,74 ^a (0,04)	1,56 ^a (0,15)	0,59 ^b (0,11)	2,00 ^c (0,02)	1,80 ^a (0,02)	2,50 ^b (0,02)
2	1,68 ^a (0,05)	1,57 ^b (0,02)	1,00 ^a (0,00)	0,84 ^b (0,06)	н.д.	1,51 ^a (0,03)	0,84 ^a (0,05)	0,30 ^a (0,00)	1,54 ^b (0,05)	1,93 ^b (0,02)	2,74 ^d (0,06)	1,63 ^b (0,05)	н.д.	н.д.	н.д.	0,30 ^a (0,00)	1,20 ^b (0,02)	н.д.	3,30 ^c (0,02)
3	н.д.	1,19 ^a (0,18)	н.д.	0,26 ^a (0,24)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	1,35 ^a (0,06)	0,58 ^a (0,03)	1,21 ^a (0,02)	1,29 ^a (0,07)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	1,10 ^a (0,07)	н.д.	4,33 ^d (0,02)
4	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	5,35 ^e (0,04)
5	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	6,47 ^f (0,04)
6	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	7,25 ^g (0,04)
7	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	7,50 ^h (0,04)
8	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	8,01 ⁱ (0,06)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ, хранљиви бујон; н.д., није детектовано.

Концентрација лизозима у испитиваним узорцима млека магарице се налазила у опсегу од 0,98 до 3,74 g/l, док је садржај лактоферина био у интервалу од 2,2 до 54,3 mg/l (Табела 63). У 5 узорака лактоферин је био испод границе детекције методе. Садржај калцијума у тестираним узорцима млека је био у интервалу од 377,1 до 1231 mg/l (Табела 63). рН вредност узорака млека магарице се налазила у опсегу од 7,11 до 7,25 (Табела 63).

Сви испитани узорци млека магарице су на +38 °C показали снажно антибактеријско дејство према оба тестирана соја *E. coli*, обзиром на њихов раст у хранљивом бујону као позитивној контроли (Табеле 64 и 65). Присуство различитог броја *E. coli* АТСС 10536 у испитиваним узорцима млека након 8 сати инкубирања, указује на то да су испитани узорци поседовали различит антибактеријски потенцијал (Табела 64). Према исказаној антибактеријској активности на тестирани патоген, узорци млека магарице могли су да се грубо класификују у 4 групе. *E. coli* АТСС 10536 је била испод лимита детекције (<1 cfu/ml) након 3 или 4 сата инкубирања у узорцима 13, 14, 15, 16 и 18 (Табела 63), који су имали статистички значајно већи садржај калцијума у поређењу са осталим узорцима млека (Табела 63). Број ових бактерија у узорцима 1, 5, 6, 7 и 8 је на крају инкубирања био у интервалу од 0,92 до 1,11 log cfu/ml. Калцијум је у овим узорцима био присутан у концентрацији од 612,35 до 691,25 mg/l (Табела 63).

Број *E. coli* АТСС 10536 у узорцима 2, 3, 4 и 17 (са садржајем калцијума од 527,5 до 567,35 mg/l) је имао вредност од 1,39 до 1,86 log cfu/ml након 8 сати инкубирања (Табела 64). Најслабија антибактеријска активност према истим бактеријама је забележена у узорцима 9, 10, 11 и 12, у којима је број *E. coli* АТСС 10536 након 8 сати инкубирања био на нивоу од 2,39 до 2,95 log cfu/ml. Од свих испитаних узорака млека магарице, ови узорци су имали најмањи садржај калцијума (377,1-466,1 mg/l).

E. coli АТСС 8739 је под датим експерименталним условима у поређењу са *E. coli* АТСС 10536, показала већу осетљивост на антибактеријско дејство млека магарице. Њено присуство није било детектовано након 2, 3 или 4 сата трајања експеримента (Табела 65). Након 3 сата инкубирања, ова бактерија је била присутна само у узорцима чији садржај калцијума је био једнак или мањи од 529,37 mg/l (Табеле 63 и 65).

У позитивним контролама број *E. coli* ATCC 10536 и *E. coli* ATCC 8739 је константно растао, да би након 8 сати од почетка огледа достигао вредност од $8,10 \pm 0,05$, односно $8,01 \pm 0,06 \log \text{ cfu/ml}$. Под овим експерименталним условима, узорци млека магарице су испољили скоро једнаку антибактеријску активност према *E. coli* ATCC 8739 (Табела 65), без обзира на забележене разлике у садржају лизозима (Табела 63). *E. coli* није била детектована у негативним контролама током 8 сати инкубирања на $+38 \text{ }^\circ\text{C}$. У Табели 66 је приказан број *E. coli* ATCC 10536 у узорцима млека магарице са додатим CaCl_2 и EDTA, након 8 сати инкубирања на $+38 \text{ }^\circ\text{C}$.

Интензивирање антибактеријске активности узорака млека магарице према *E. coli* ATCC 10536, забележено је након додатка одговарајућих количина CaCl_2 у млеко (Табела 66). Број *E. coli* ATCC 10536 је у пет узорака млека (1, 5, 6, 7 и 8) био редукован испод нивоа детекције ($<1 \text{ cfu/ml}$). CaCl_2 додат у већој концентрацији је узроковао интензивније смањење броја ових бактерија. *E. coli* ATCC 8739 на крају огледа није детектована у узорцима млека са додатим CaCl_2 . Сам CaCl_2 није показао инхибиторни ефекат ни према једном тестираном соју *E. coli*, обзиром да је њихов број у позитивним контролама (хранљиви бујон са додатим CaCl_2), након 8 сати инкубирања имао вредност од $8,13 \pm 0,03$ и $8,11 \pm 0,05 \log \text{ cfu/ml}$ (*E. coli* ATCC 10536), односно $8,07 \pm 0,05$ и $8,10 \pm 0,02 \log \text{ cfu/ml}$ (*E. coli* ATCC 8739). Насупрот томе, додаток EDTA у узорке млека магарице је довео до слабљења њихове антибактеријске активности, обзиром да је на крају експеримента, број *E. coli* ATCC 10536 у млеку са EDTA био статистички значајно већи ($P < 0,05$) у поређењу са узорцима без додатог EDTA. Након 8 сати инкубирања, *E. coli* ATCC 8739 је била детектована само у узорцима са додатим EDTA, који су имали садржај калцијума мањи од 600 mg/l (2, 3, 4, 9, 10, 11, 12, 17). Број овог патогена у тим узорцима је био у опсегу од 1,20 до $1,52 \log \text{ cfu/ml}$.

Табела 66. Број *E. coli* ATCC 10536 (log cfu/ml) у млеку магарице са додатим CaCl₂ и EDTA након 8 сати инкубирања на +38 °С

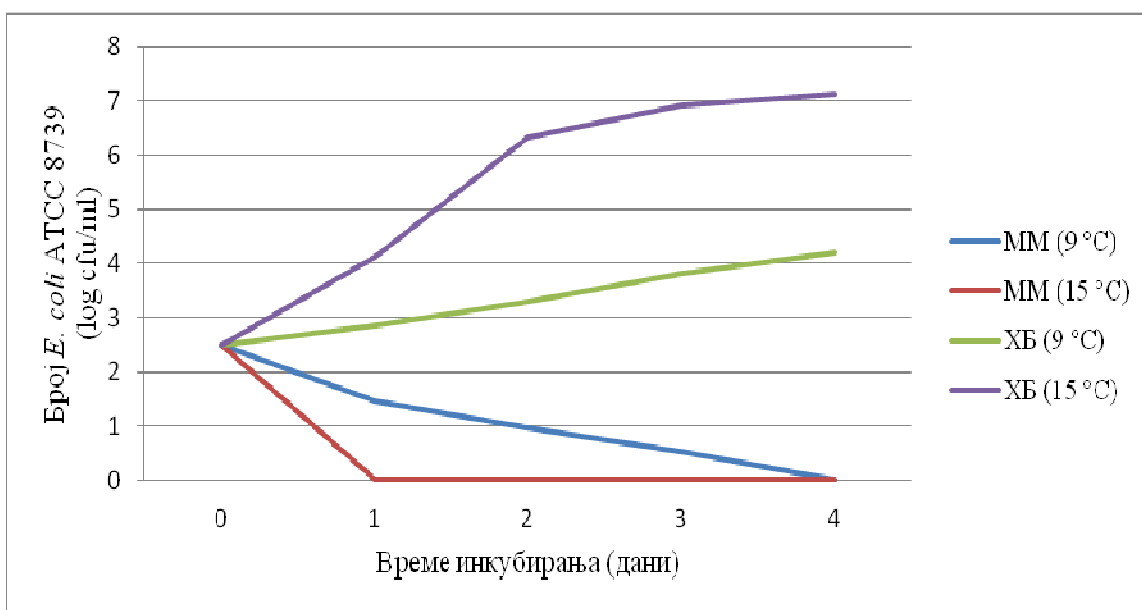
Узорци	Млеко магарице	А	Б	Ц
1	0,92 ^a (0,03)	н.д.	н.д.	3,07 ^{gh} (0,05)
2	1,46 ^c (0,15)	0,70 ^a (0,00)	0,50 ^a (0,10)	3,02 ^{fg} (0,04)
3	1,39 ^c (0,12)	0,90 ^f (0,09)	0,40 ^a (0,00)	3,06 ^{fg} (0,02)
4	1,69 ^d (0,09)	1,54 ^b (0,06)	0,88 ^d (0,11)	3,24 ^j (0,02)
5	1,11 ^b (0,10)	0,50 ^d (0,00)	н.д.	3,15 ^{hi} (0,00)
6	1,10 ^b (0,05)	0,70 ^a (0,09)	н.д.	3,10 ^{gh} (0,02)
7	1,07 ^b (0,06)	0,60 ^e (0,07)	н.д.	3,00 ^f (0,07)
8	1,08 ^b (0,03)	н.д.	н.д.	2,80 ^e (0,04)
9	2,95 ^h (0,00)	2,00 ^c (0,05)	1,75 ^c (0,04)	3,65 ^l (0,04)
10	2,56 ^g (0,04)	1,95 ^c (0,01)	1,60 ^b (0,02)	3,50 ^k (0,01)
11	2,63 ^g (0,00)	2,56 ^h (0,05)	2,41 ^f (0,02)	3,20 ^{ij} (0,03)
12	2,39 ^f (0,09)	2,10 ^g (0,03)	1,65 ^{bc} (0,08)	3,25 ^j (0,08)
13	н.д.	н.д.	н.д.	1,10 ^b (0,05)
14	н.д.	н.д.	н.д.	0,90 ^a (0,05)
15	н.д.	н.д.	н.д.	1,20 ^c (0,04)
16	н.д.	н.д.	н.д.	1,43 ^d (0,01)
17	1,86 ^e (0,15)	1,60 ^b (0,00)	1,41 ^e (0,04)	3,08 ^{gh} (0,10)
18	н.д.	н.д.	н.д.	1,39 ^d (0,01)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим редовима са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). А - млеко магарице са додатим CaCl₂ (276,93 mg/l); Б - млеко магарице са додатим CaCl₂ (553,87 mg/l); Ц, млеко магарице са додатим EDTA (1,39 g/l); н.д., није детектовано.

4.2.4.4. Утицај температуре инкубирања и нивоа контаминације на антибактеријска својства млека магарице према тестираним сојевима *E. coli*

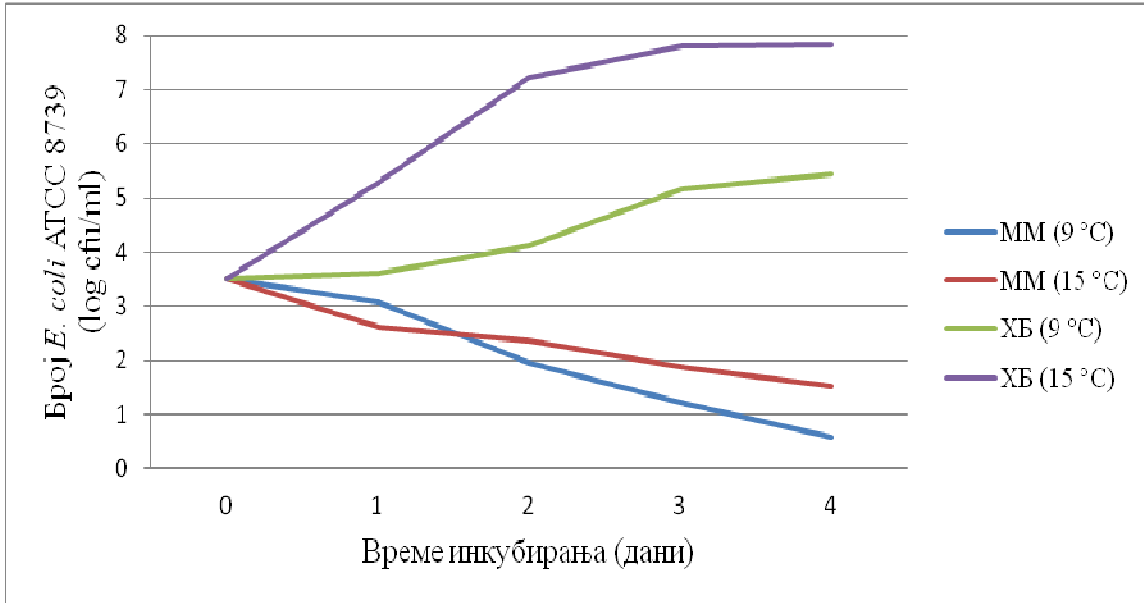
Резултати антибактеријских тестова спроведених у овој докторској дисертацији указују на значај температуре инкубирања и величине бактеријског инокулума на антибактеријску активност млека магарице према тестираним сојевима *E. coli*.

На Сликама 25-30 приказане су просечне вредности броја *E. coli* ATCC 8739 и *E. coli* ATCC 10536 у вештачки контаминираним узорцима млека магарице током 4 дана инкубирања на +9 и +15 °C.

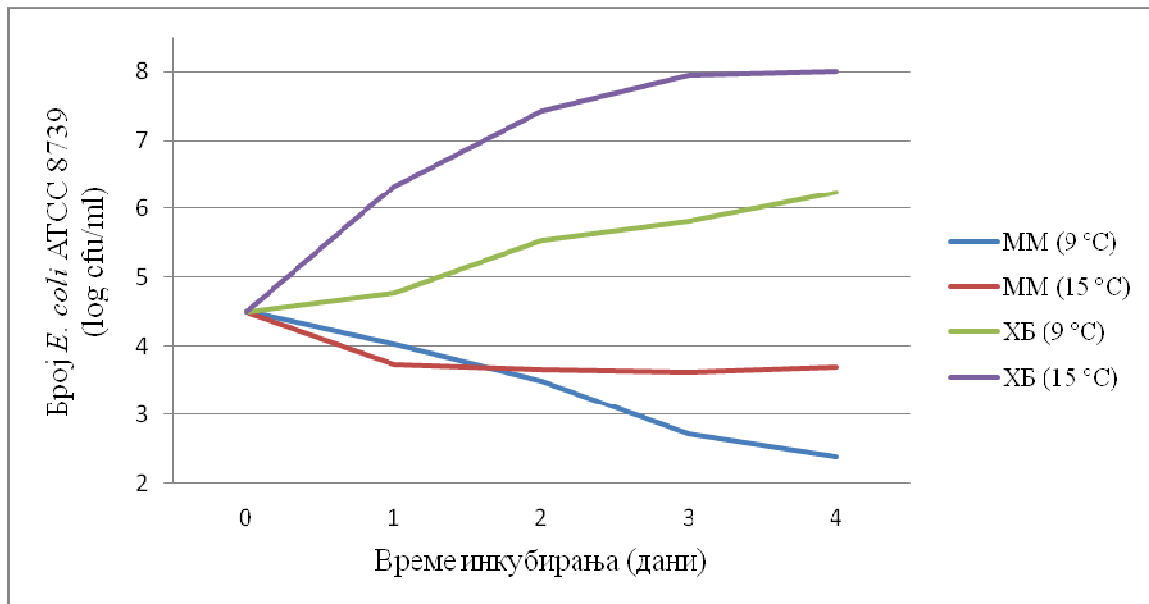


Слика 25. Просечне вредности броја *E. coli* ATCC 8739 у тестираним узорцима млека магарице (ММ) и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^2 cfu/ml, током инкубирања на +9 и +15 °C

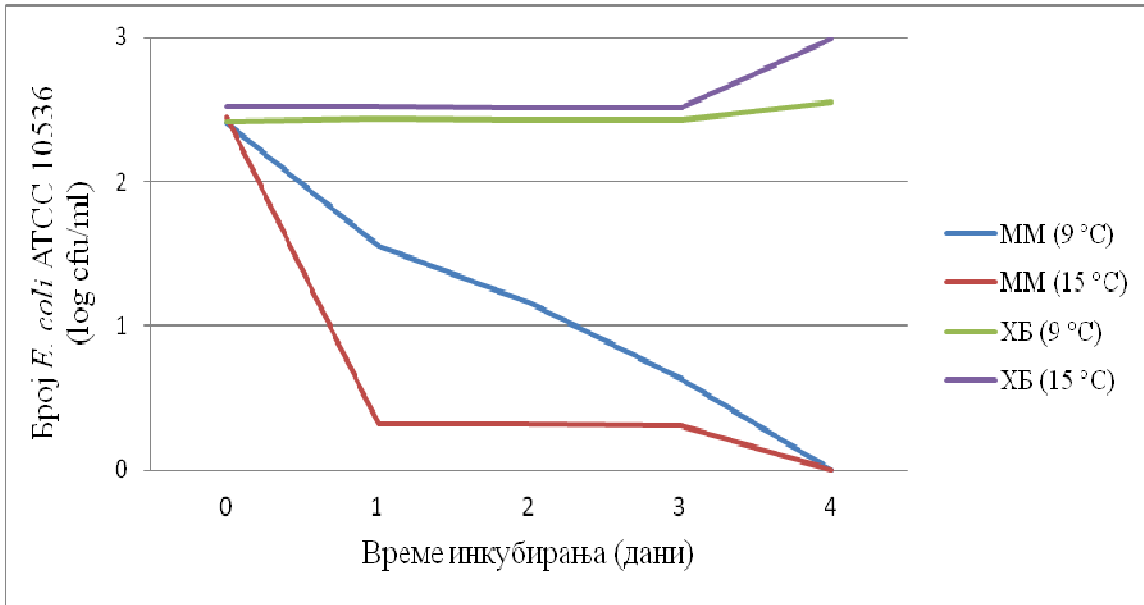
Уколико се у огледу са најнижим нивоом контаминације изврши компарација резултата антибактеријског теста према *E. coli* ATCC 8739 спроведеног на +9 и +15 °C, види се да је јаче антибактеријско дејство млека магарице забележено на +15 °C (Слика 25). Ако се пак посматра број бактерија након 4 дана инкубирања то није био случај на вишим нивоима контаминације (Слике 26 и 27).



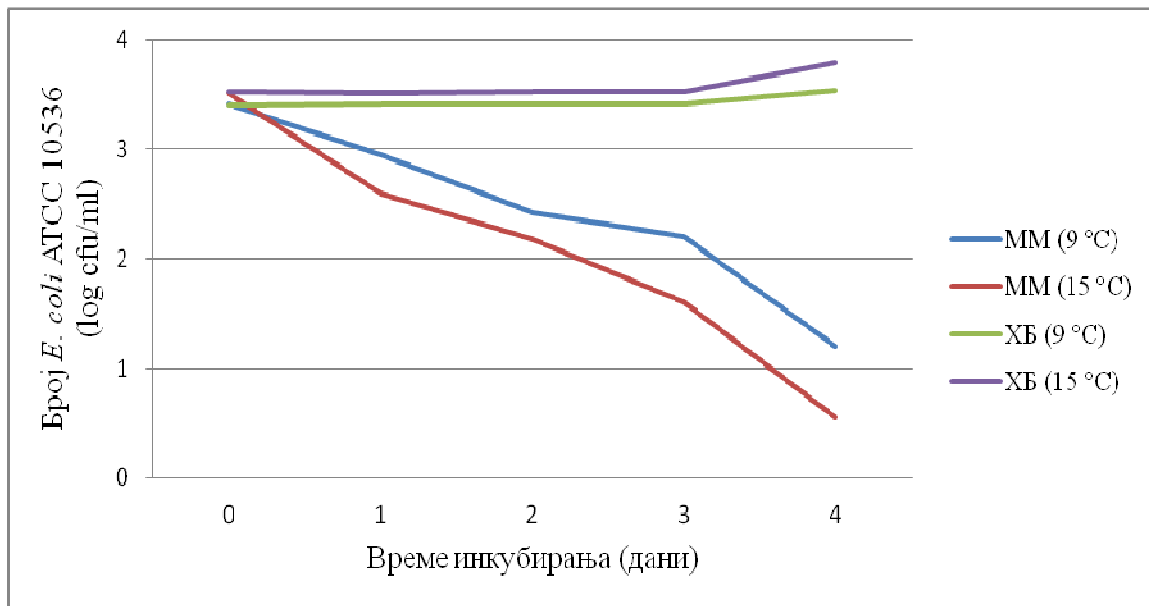
Слика 26. Просечне вредности броја *E. coli* ATCC 8739 у тестираним узорцима млека магарице (ММ) и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^3 cfu/ml, током инкубирања на +9 и +15 °C



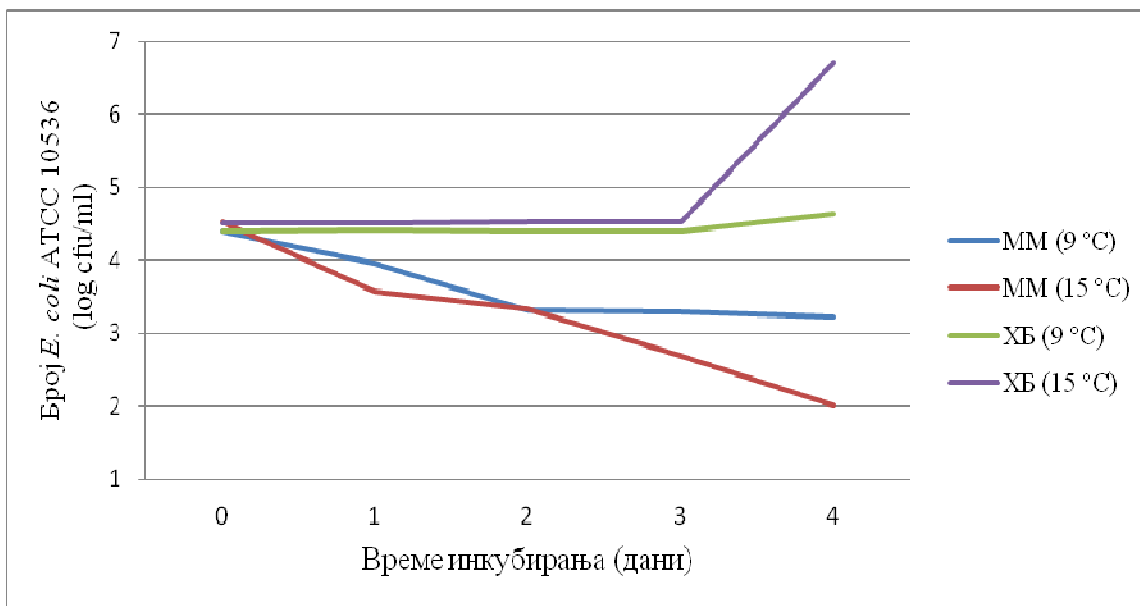
Слика 27. Просечне вредности броја *E. coli* ATCC 8739 у тестираним узорцима млека магарице (ММ) и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^4 cfu/ml, током инкубирања на +9 и +15 °C.



Слика 28. Просечне вредности броја *E. coli* ATCC 10536 у тестираним узорцима млека магарице (ММ) и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^2 cfu/ml, током инкубирања на +9 и +15 °C



Слика 29. Просечне вредности броја *E. coli* ATCC 10536 у тестираним узорцима млека магарице (ММ) и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^3 cfu/ml, током инкубирања на +9 и +15 °C

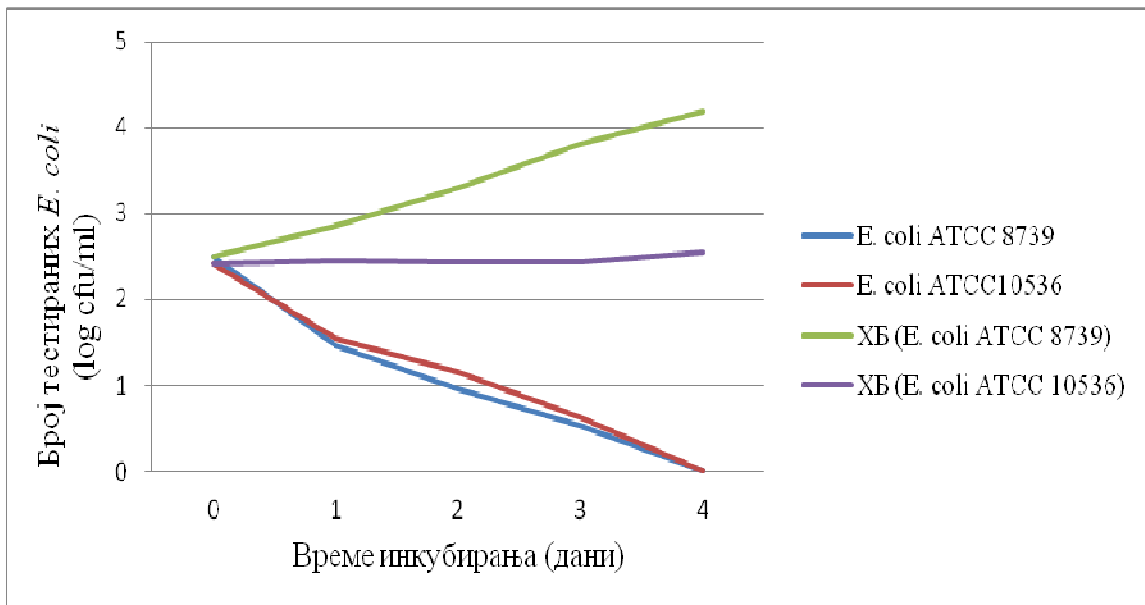


Слика 30. Просечне вредности броја *E. coli* ATCC 10536 у тестираним узорцима млека магарице (ММ) и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^4 cfu/ml, током инкубирања на +9 и +15 °C

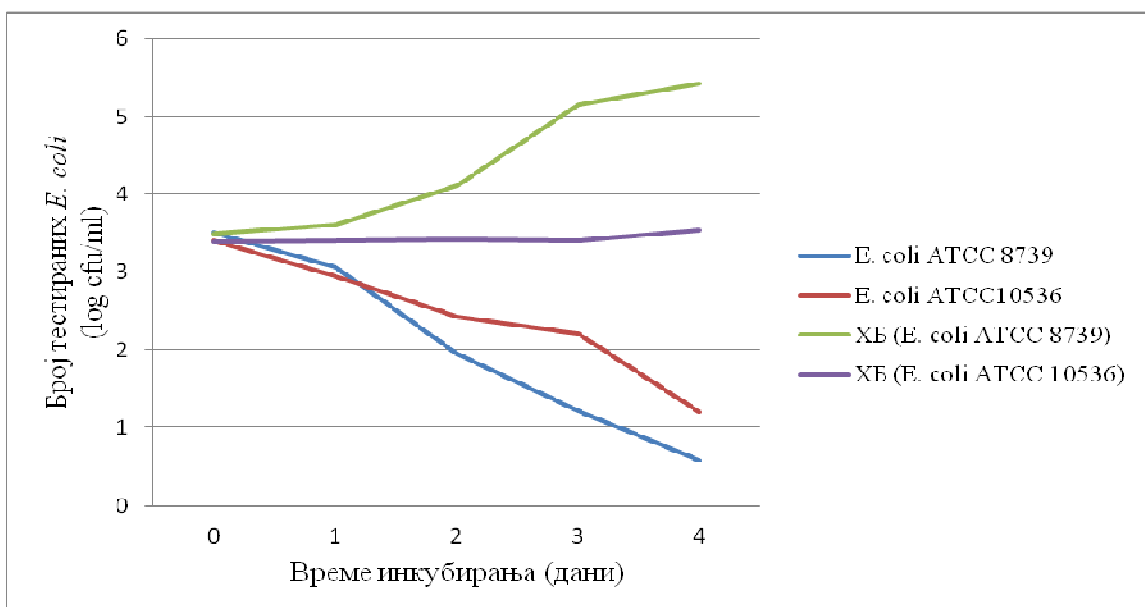
Међутим, под овим експерименталним условима, после 24 сата инкубирања редукција бактеријског броја је била већа на +15 °C. Након тога је дејство антимикуробних компонената млека магарице почело да слаби. Ово слабљење антибактеријске активности имплицира брже трошење антибактеријског капацитета млека магарице у условима веће температуре инкубирања и веће почетне контаминације узорака. Разлог због којег након 24 сата долази до постепеног слабљења антибактеријске активности млека магарице на +15 °C, треба тражити у много бржем размножавању тест микроорганизама на +15 °C у односу на +9 °C. Број *E. coli* ATCC 8739 је у хранљивом бујону на +15 °C након 96 сати достигао вредност од 7,83 log cfu/ml (за ниво контаминације 10^3 cfu/ml), односно 8,00 log cfu/ml (за ниво контаминације 10^4 cfu/ml), што је неупоредиво више у односу на вредности регистроване на +9 °C (Табеле 51 и 52). Осим тога, ограничавању антимикуробног потенцијала млека магарице на +15 °C, вероватно у извесној мери доприноси и интензивнији раст пропратне микробиоте млека.

У оквиру истраживања спроведених у овој докторској дисертацији утврђена је различита осетљивост тестираних сојева *E. coli* на антибактеријску активност млека магарице балканске расе. На Сликама 31-37 упоређене су промене просечног броја

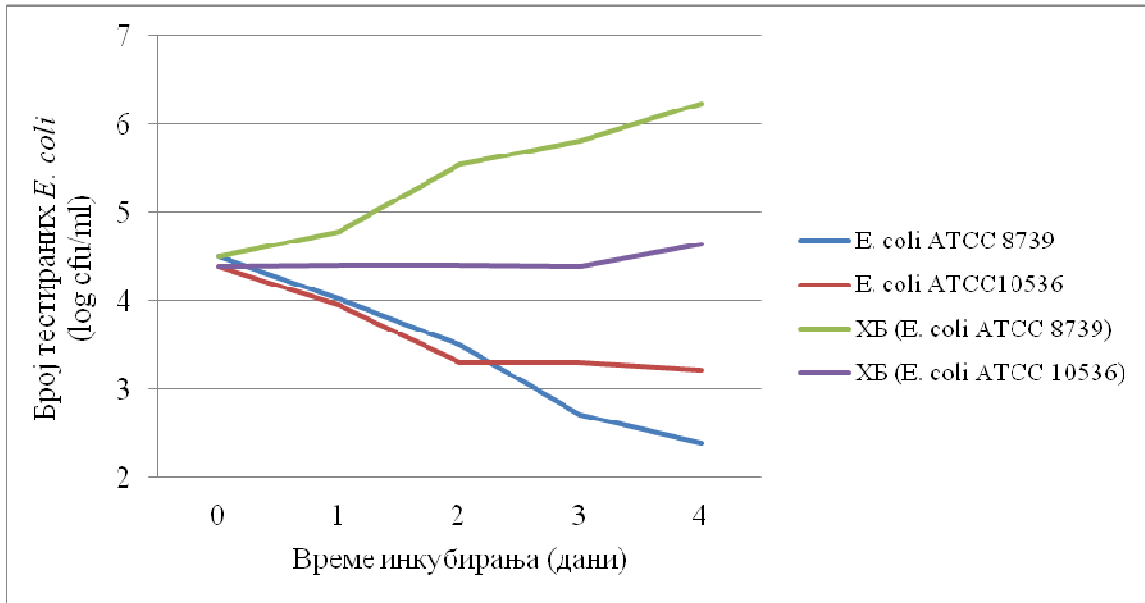
E. coli ATCC 8739 и *E. coli* ATCC 10536 у вештачки контаминираним узорцима млека магарице и хранљивом бујону (ХБ), током инкубирања на +9, +15 и +38 °С.



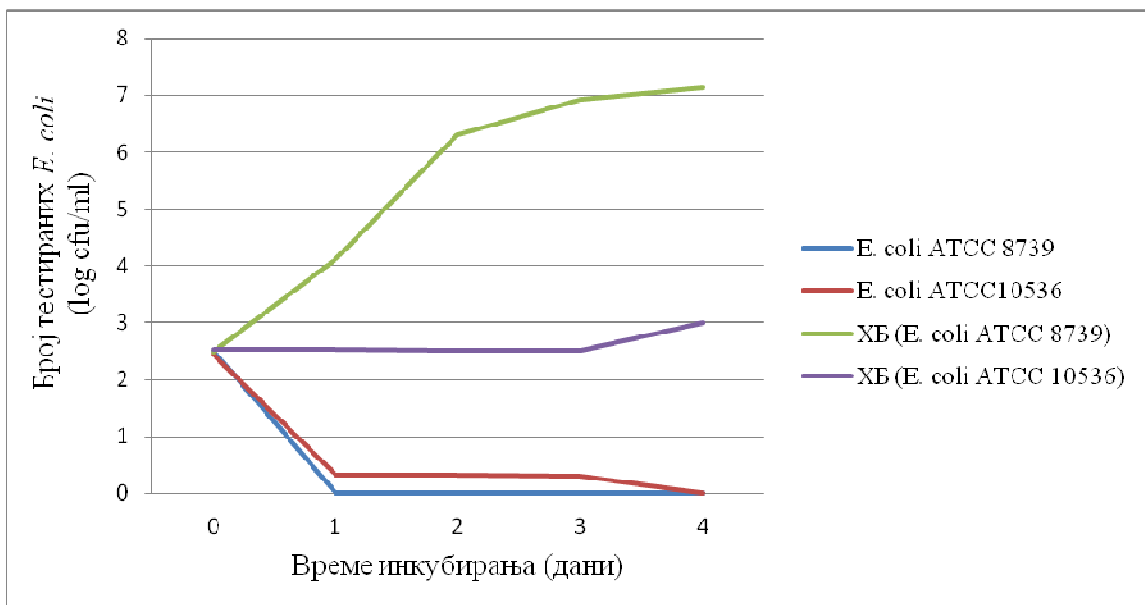
Слика 31. Просечне вредности броја *E. coli* ATCC 8739 и *E. coli* ATCC 10536 у тестираним узорцима млека магарице и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^2 cfu/ml, током инкубирања на +9 °С



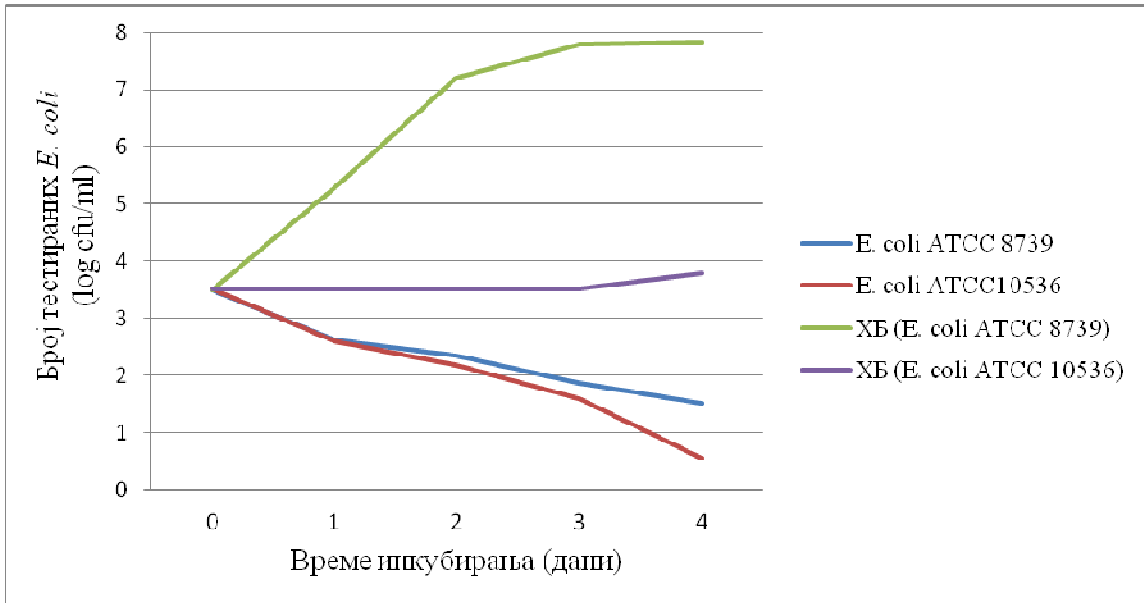
Слика 32. Просечне вредности броја *E. coli* ATCC 8739 и *E. coli* ATCC 10536 у тестираним узорцима млека магарице и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^3 cfu/ml, током инкубирања на +9 °С



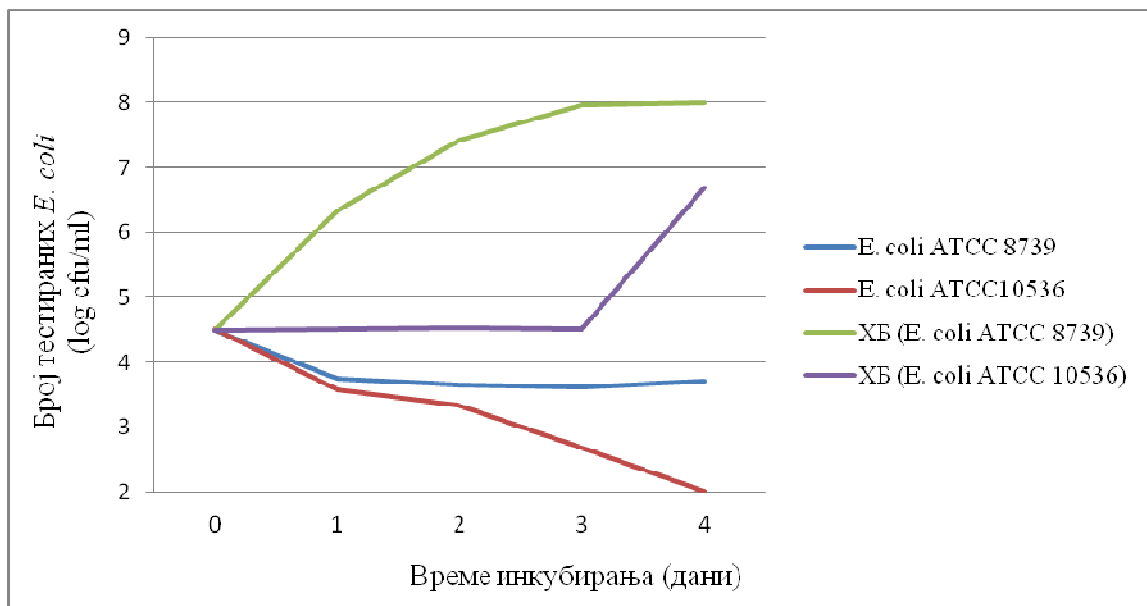
Слика 33. Просечне вредности броја *E. coli* ATCC 8739 и *E. coli* ATCC 10536 у тестираним узорцима млека магарице и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^4 cfu/ml, током инкубирања на $+9$ °C



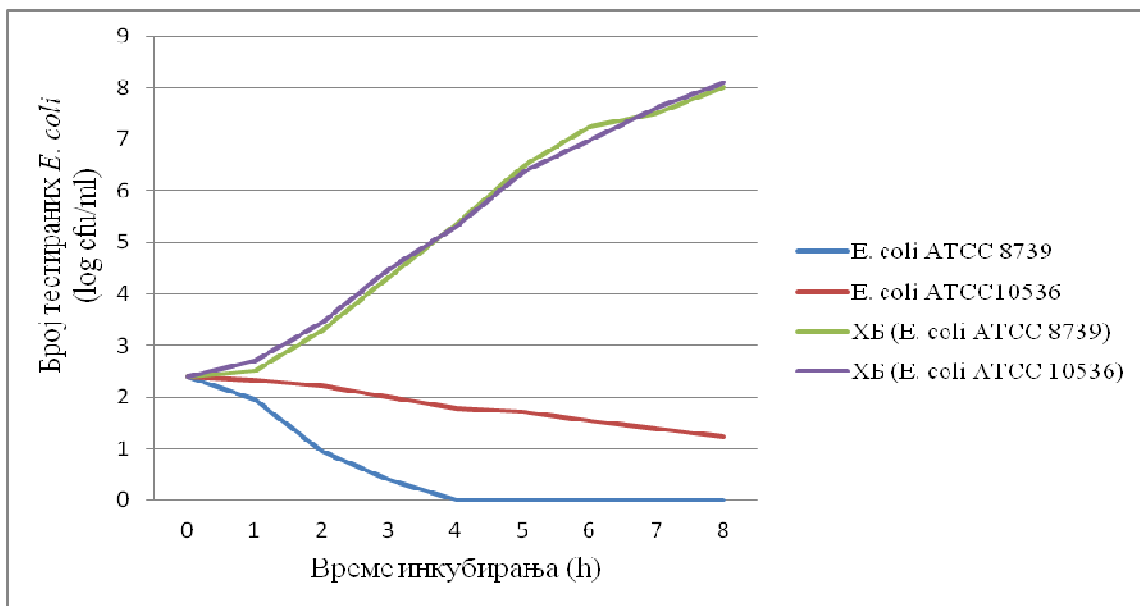
Слика 34. Просечне вредности броја *E. coli* ATCC 8739 и *E. coli* ATCC 10536 у тестираним узорцима млека магарице и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^2 cfu/ml, током инкубирања на $+15$ °C.



Слика 35. Просечне вредности броја *E. coli* ATCC 8739 и *E. coli* ATCC 10536 у тестираним узорцима млека магарице и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^3 cfu/ml, током инкубирања на +15 °С.



Слика 36. Просечне вредности броја *E. coli* ATCC 8739 и *E. coli* ATCC 10536 у тестираним узорцима млека магарице и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^4 cfu/ml, током инкубирања на +15 °С



Слика 37. Просечне вредности броја *E. coli* ATCC 8739 и *E. coli* ATCC 10536 у тестираним узорцима млека магарице и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^2 cfu/ml, током инкубирања на $+38$ °C

Иако се *E. coli* ATCC 8739 у односу на *E. coli* ATCC 10536 показала генерално осетљивијом на антибактеријско дејство млека магарице, ниво контаминације и температура инкубирања су ипак одређивали крајње резултате антибактеријских испитивања. На $+9$ °C је забележена јача антибактеријска активност млека магарице према *E. coli* ATCC 8739, изузев у огледу са највишим нивоом контаминације током прва два дана инкубирања (Слике 31-33). Од другог до четвртог дана инкубирања регистровано је слабљење дејства овог млека према *E. coli* ATCC 10536 и интензивирање редукције броја *E. coli* ATCC 8739 (Слика 33). Јачина антибактеријског деловања овог млека према *E. coli* ATCC 8739 нарочито добија на тежини када се узме у обзир разлика у брзини умножавања тестираних сојева *E. coli* у хранљивом бујону на $+9$ °C (Слике 31-33). На $+15$ °C у огледу са најнижим нивоом контаминације млеко магарице је такође испољило снажнији антибактеријски ефекат на *E. coli* ATCC 8739 (Слика 34-36). Међутим, на температури инкубирања од $+15$ °C у огледима са вишим нивоима контаминације, млеко магарице је показало јачи антибактеријски ефекат према *E. coli* ATCC 10536 (Слике 35 и 36). Овде је кључну улогу највероватније одиграла много спорија брзина умножавања *E. coli* ATCC 10536 (поготову током прва три дана инкубирања), у комбинацији са нивоом контаминације. То значи да је највероватније већа брзина умножавања *E. coli* ATCC

8739 на +15 °C потпомогнута великим почетним бројем овог патогена, довела је до брже потрошње антибактеријског капацитета млека магарице. У складу са тим, са порастом нивоа контаминације расла је и разлика у броју два тестирана соја *E. coli* током трајања огледа. Резултати огледа на +38 °C можда дају и најреалнију слику у погледу осетљивости *E. coli* АТСС 8739 и *E. coli* АТСС 10536 на антибактеријско дејство млека магарице, јер је овде био искључен утицај брзине умножавања. На овој температури инкубирања брзине умножавања два тестирана соја *E. coli* су биле готово исте, а антибактеријски потенцијал узорака млека знатно већи према *E. coli* АТСС 8739 (Слика 37).

4.2.5. Антибактеријска активност млека магарице према *K. pneumoniae*

4.2.5.1. Антибактеријски тест на +9 °C

У Табели 67 приказани су садржаји лизозима, лактоферина и калцијума одређени у узорцима млека магарице коришћеним за антибактеријске тестове према *K. pneumoniae* на +9 и +15 °C.

У Табелама 68, 69 и 70 представљени су резултати испитивања антибактеријске активности према *K. pneumoniae* на +9 °C за различите нивое контаминације.

Табела 67. Садржај лизозима (LYZ), лактоферина (LF) и калцијума (Ca) у узорцима млека магарице коришћеним за испитивање антибактеријске активности према *K. pneumoniae* на +9 и +15 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице								
	13	27	28	32	35	39	42	49	50
LYZ (g/l)	2,98 ^F (0,03)	3,89 ^B (0,04)	1,40 ^C (0,11)	2,47 ^A (0,06)	3,14 ^G (0,14)	2,67 ^E (0,06)	2,41 ^A (0,02)	3,99 ^B (0,05)	1,83 ^D (0,10)
LF (mg/l)	н.д.	32,80 ^A (1,80)	3,50 ^B (0,40)	22,80 ^D (2,80)	7,50 ^C (0,50)	34,3 ^A (0,60)	н.д.	40,80 ^E (0,70)	н.д.
Ca (mg/l)	1231,00 ^F (4,00)	969,00 ^A (5,00)	716,25 ^C (3,25)	986,30 ^A (13,75)	566,30 ^B (23,75)	752,58 ^D (20,00)	980,00 ^A (0,55)	1323,50 ^G (26,50)	880,00 ^E (2,50)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истом реду са различитим малим словима су статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано.

Табела 68. Број *K. pneumoniae* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^2 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на +9 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице									
	13 ХБ	27	28	32	35	39	42	49	50	
0.	2,60 ^{a,A} (0,05)	2,61 ^{a,A} (0,04)	2,60 ^{a,A} (0,05)	2,62 ^{a,A} (0,05)	2,60 ^{a,A} (0,03)	2,59 ^{b,A} (0,05)	2,59 ^{a,A} (0,08)	2,61 ^{a,A} (0,05)	2,60 ^{a,A} (0,05)	2,61 ^{a,A} (0,06)
1.	2,60 ^a (0,06)	2,60 ^a (0,05)	2,62 ^a (0,05)	2,59 ^a (0,03)	2,59 ^a (0,04)	2,50 ^{ab} (0,05)	2,59 ^a (0,04)	2,59 ^a (0,04)	2,64 ^a (0,05)	2,63 ^{ab} (0,01)
2.	2,59 ^a (0,05)	2,61 ^a (0,05)	2,60 ^a (0,06)	2,38 ^{ac} (0,05)	2,62 ^a (0,06)	2,35 ^{ab} (0,05)	2,63 ^a (0,05)	2,30 ^a (0,05)	2,60 ^a (0,05)	2,65 ^{ab} (0,02)
3.	2,62 ^a (0,06)	2,41 ^a (0,04)	2,62 ^a (0,05)	2,13 ^{bc} (0,23)	2,60 ^a (0,06)	1,97 ^{ac} (0,45)	2,62 ^a (0,04)	1,70 ^b (0,40)	2,60 ^a (0,08)	2,70 ^{bc} (0,05)
4.	2,63 ^{a,A} (0,05)	1,97 ^{b,C} (0,05)	2,60 ^{a,A} (0,06)	1,83 ^{b,BC} (0,32)	2,59 ^{a,A} (0,05)	1,77 ^{c,BC} (0,46)	2,60 ^{a,A} (0,05)	1,53 ^{b,B} (0,31)	2,60 ^{a,A} (0,05)	2,76 ^{c,A} (0,02)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

Табела 69. Број *K. pneumoniae* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^3 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на +9 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице									
	13	27	28	32	35	39	42	49	50	ХБ
0.	3,59 ^{a,A} (0,04)	3,60 ^{a,A} (0,01)	3,61 ^{a,A} (0,05)	3,60 ^{a,A} (0,04)	3,60 ^{a,A} (0,05)	3,60 ^{a,A} (0,05)	3,61 ^{a,A} (0,05)	3,59 ^{a,A} (0,05)	3,60 ^{ab,A} (0,04)	3,60 ^{a,A} (0,04)
1.	3,60 ^a (0,04)	3,59 ^a (0,03)	3,59 ^a (0,04)	3,60 ^a (0,04)	3,61 ^a (0,08)	3,58 ^a (0,05)	3,59 ^a (0,05)	3,59 ^a (0,03)	3,63 ^{ab} (0,04)	3,60 ^a (0,05)
2.	3,58 ^a (0,05)	3,60 ^a (0,05)	3,60 ^a (0,06)	3,59 ^a (0,04)	3,58 ^a (0,07)	3,59 ^a (0,03)	3,60 ^a (0,04)	3,59 ^a (0,04)	3,59 ^a (0,04)	3,65 ^{ab} (0,10)
3.	3,60 ^a (0,05)	3,59 ^a (0,05)	3,61 ^a (0,03)	3,62 ^a (0,06)	3,59 ^a (0,04)	3,60 ^a (0,06)	3,59 ^a (0,08)	3,59 ^a (0,04)	3,60 ^a (0,05)	3,69 ^{ab} (0,02)
4.	3,64 ^{a,ABC} (0,02)	3,59 ^{a,A} (0,05)	3,66 ^{a,BC} (0,03)	3,59 ^{a,A} (0,03)	3,67 ^{a,BD} (0,02)	3,61 ^{a,A} (0,04)	3,66 ^{a,BCD} (0,02)	3,59 ^{a,A} (0,05)	3,67 ^{b,BD} (0,02)	3,72 ^{b,D} (0,02)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

Резултати антибактеријског теста спроведеног на +9 °C, показали су слабу антибактеријску активност тестираних узорака млека магарице према испитиваном клиничком изолату *K. pneumoniae*. Антибактеријска активност млека магарице је у овом случају подразумевала мало спорији раст *K. pneumoniae* у односу на раст у позитивној контроли.

Табела 70. Број *K. pneumoniae* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^4 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на +9 °С

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице									
	13	27	28	32	35	39	42	49	50	ХБ
0.	4,60 ^{a,A} (0,02)	4,60 ^{a,A} (0,01)	4,60 ^{a,A} (0,02)	4,60 ^{a,A} (0,01)	4,59 ^{a,A} (0,03)	4,60 ^{a,A} (0,02)	4,60 ^{a,A} (0,01)	4,59 ^{a,A} (0,03)	4,59 ^{a,A} (0,02)	4,61 ^{a,A} (0,02)
1.	4,60 ^a (0,02)	4,60 ^a (0,02)	4,62 ^{ab} (0,01)	4,59 ^a (0,02)	4,62 ^{ab} (0,02)	4,60 ^a (0,02)	4,61 ^a (0,02)	4,60 ^a (0,03)	4,61 ^a (0,04)	4,63 ^a (0,05)
2.	4,61 ^a (0,01)	4,61 ^a (0,03)	4,64 ^{bc} (0,02)	4,60 ^a (0,01)	4,63 ^{bc} (0,01)	4,60 ^a (0,01)	4,63 ^b (0,01)	4,60 ^a (0,01)	4,65 ^b (0,01)	4,67 ^{ab} (0,02)
3.	4,63 ^b (0,01)	4,60 ^a (0,01)	4,65 ^c (0,02)	4,61 ^{ab} (0,00)	4,65 ^{cd} (0,01)	4,60 ^a (0,02)	4,65 ^b (0,01)	4,61 ^a (0,03)	4,67 ^{bc} (0,02)	4,70 ^{bc} (0,03)
4.	4,69 ^{c,A} (0,01)	4,63 ^{a,B} (0,01)	4,70 ^{d,A} (0,01)	4,62 ^{b,B} (0,02)	4,68 ^{d,A} (0,01)	4,62 ^{a,B} (0,02)	4,70 ^{c,A} (0,01)	4,63 ^{a,B} (0,01)	4,70 ^{c,A} (0,01)	4,75 ^{d,C} (0,03)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

Снажнији антибактеријски потенцијал рачунајући сва три нивоа контаминације, регистрован је код узорака 27, 32, 39 и 49, који су имали већи садржај лактоферина (22,8-40,8 mg/l) и релативно велику концентрацију лизозима (2,47-3,89 g/l) (Табеле 68-70). У овом огледу није детектована међузависност садржаја калцијума и антибактеријске активности узорака млека магарице. Ни у једној негативној контроли није детектовано присуство Enterobacteriaceae.

4.2.5.2. Антибактеријски тест на +15 °C

У Табелама 71, 72 и 73 приказани су резултати испитивања антибактеријске активности одабраних узорка млека магарице према *K. pneumoniae* на +15 °C за различите нивое контаминације.

Табела 71. Број *K. pneumoniae* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10² cfu/ml) током 96 сати инкубирања на +15 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице									
	13	27	28	32	35	39	42	49	50	ХБ
0.	2,48 ^{a,A} (0,04)	2,48 ^{a,A} (0,04)	2,49 ^{a,A} (0,02)	2,48 ^{c,A} (0,02)	2,49 ^{a,A} (0,03)	2,48 ^{a,A} (0,02)	2,48 ^{b,A} (0,03)	2,49 ^{a,A} (0,03)	2,48 ^{b,A} (0,04)	2,48 ^{a,A} (0,03)
1.	2,80 ^b (0,08)	1,98 ^b (0,05)	2,46 ^a (0,08)	2,13 ^b (0,05)	2,75 ^b (0,05)	2,10 ^b (0,05)	1,99 ^a (0,07)	2,66 ^a (0,00)	2,02 ^a (0,02)	4,31 ^b (0,02)
2.	3,33 ^c (0,00)	1,28 ^c (0,05)	2,50 ^a (0,03)	1,12 ^a (0,13)	3,05 ^c (0,04)	1,65 ^c (0,15)	2,62 ^c (0,01)	1,18 ^b (0,18)	2,05 ^a (0,02)	6,46 ^c (0,05)
3.	3,76 ^d (0,03)	н.д.	4,87 ^b (0,01)	н.д.	3,30 ^d (0,04)	1,12 ^d (0,18)	2,79 ^d (0,01)	н.д.	2,06 ^a (0,03)	7,35 ^d (0,03)
4.	4,60 ^{e,B} (0,01)	н.д.	5,93 ^{c,C} (0,04)	н.д.	3,44 ^{e,A} (0,00)	н.д.	3,48 ^{e,A} (0,02)	н.д.	3,43 ^{c,A} (0,06)	7,81 ^{e,H} (0,01)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

Табела 72. Број *K. pneumoniae* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10³ cfu/ml) током 96 сати инкубирања на +15 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице									
	13	27	28	32	35	39	42	49	50	ХБ
0.	3,48 ^{a,A} (0,02)	3,48 ^{e,A} (0,03)	3,45 ^{a,A} (0,08)	3,48 ^{c,A} (0,02)	3,50 ^{a,A} (0,04)	3,48 ^{d,A} (0,03)	3,48 ^{a,A} (0,04)	3,49 ^{e,A} (0,03)	3,49 ^{a,A} (0,04)	3,49 ^{a,A} (0,03)
1.	3,87 ^a (0,12)	2,97 ^d (0,02)	3,82 ^b (0,02)	3,34 ^{ab} (0,01)	3,70 ^b (0,13)	2,99 ^c (0,04)	3,46 ^a (0,01)	2,95 ^d (0,00)	3,49 ^a (0,02)	5,65 ^b (0,03)
2.	4,74 ^c (0,01)	2,65 ^c (0,07)	5,88 ^c (0,01)	3,40 ^{bc} (0,11)	4,28 ^c (0,05)	2,87 ^b (0,01)	4,51 ^b (0,02)	2,60 ^c (0,01)	4,43 ^b (0,02)	7,51 ^c (0,01)
3.	5,23 ^b (0,58)	2,36 ^b (0,04)	6,25 ^d (0,01)	3,27 ^a (0,08)	4,47 ^d (0,03)	2,52 ^a (0,02)	4,66 ^c (0,01)	2,39 ^b (0,02)	4,75 ^c (0,03)	7,83 ^d (0,02)
4.	5,30 ^{b,F} (0,01)	2,23 ^{a,A} (0,08)	6,99 ^{e,G} (0,05)	2,79 ^{d,D} (0,03)	4,65 ^{e,E} (0,00)	2,54 ^{a,C} (0,03)	5,10 ^{d,B} (0,01)	2,20 ^{a,A} (0,01)	5,13 ^{d,B} (0,02)	7,96 ^{e,H} (0,01)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

Табела 73. Број *K. pneumoniae* (log cfu/ml) у вештачки контаминираним узорцима млека магарице (ниво контаминације 10^4 cfu/ml) током 96 сати инкубирања на +15 °C

Време инкубирања (дани)	Узорци млека магарице									
	13	27	28	32	35	39	42	49	50	ХБ
0.	4,48 ^{b,A} (0,02)	4,49 ^{a,A} (0,02)	4,48 ^{a,A} (0,01)	4,48 ^{a,A} (0,01)	4,48 ^{a,A} (0,01)	4,49 ^{a,A} (0,01)	4,49 ^{a,A} (0,04)	4,48 ^{a,A} (0,02)	4,49 ^{a,A} (0,03)	4,48 ^{a,A} (0,03)
1.	4,92 ^c (0,00)	4,49 ^a (0,01)	4,99 ^b (0,00)	4,47 ^a (0,03)	4,56 ^a (0,32)	4,50 ^a (0,02)	4,90 ^b (0,05)	4,49 ^a (0,03)	4,97 ^b (0,01)	6,50 ^b (0,02)
2.	6,08 ^a (0,04)	4,48 ^a (0,02)	6,24 ^c (0,01)	4,55 ^b (0,03)	5,81 ^b (0,03)	4,49 ^a (0,03)	6,05 ^c (0,04)	4,52 ^a (0,05)	6,17 ^c (0,02)	7,55 ^c (0,05)
3.	6,38 ^a (0,46)	4,48 ^a (0,03)	6,50 ^d (0,00)	4,97 ^c (0,04)	6,29 ^c (0,01)	4,50 ^a (0,02)	6,45 ^d (0,01)	4,49 ^a (0,03)	6,41 ^d (0,03)	7,94 ^d (0,02)
4.	7,40 ^{d,A} (0,01)	4,47 ^{a,D} (0,01)	7,45 ^{e,BC} (0,02)	5,90 ^{d,G} (0,01)	6,85 ^{d,H} (0,01)	5,40 ^{b,F} (0,01)	7,43 ^{e,AB} (0,03)	4,54 ^{a,E} (0,03)	7,47 ^{e,C} (0,02)	8,04 ^{e,I} (0,04)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). ХБ - хранљиви бујон.

У огледима на +15 °C лако се може уочити зависност степена редукције броја *K. pneumoniae* (Табеле 71-73) од садржаја лактоферина у испитаним узорцима (Табела 67). Међутим, овде се при вишим нивоима контаминације види и корелација интензитета антибактеријске активности (Табеле 72 и 73) и садржаја лизозима у узорцима млека (Табела 67). Бактерицидна активност млека магарице је забележена само при најнижем нивоу контаминације и то искључиво у узорцима са највећом концентрацијом лактоферина (Табела 71). Антибактеријска активност узорака млека са ниским нивоом контаминације (10^2 cfu/ml), у којима лактоферин није детектован или је био присутан у малим концентрацијама (3,5-7,5 mg/l), састојала се у успоравању раста *K. pneumoniae* до краја инкубирања (Табела 71). На средњем нивоу контаминације (10^3 cfu/ml) у узорцима са највећим садржајем лактоферина, регистровано је смањење броја тест микроорганизама до краја инкубирања (Табела 72). У узорцима 42 и 50 лаг фаза је продужена за 24 сата у односу на раст у хранљивом бујону. Након тога, дошло је до слабљења антибактеријске активности ових узорака млека, али не и до њеног потпуног престанка, с обзиром да се број *K. pneumoniae* до краја инкубирања умножавао много мањом брзином у односу на хранљиви бујон (Табела 72). На овом нивоу контаминације, била је веома уочљива међузависност садржаја лизозима и антибактеријске активности узорака млека. Тако је узорак 28 са најмањим садржајем овог протеина (1,4 g/l) показао најслабији антибактеријски потенцијал према *K. pneumoniae*. У тесту са највећим нивоом

контаминације (Табела 73), најјачу антибактеријску активност испољили су узорци 27 и 49 који су, осим високе концентрације лактоферина, имали и највећи садржај лизозима (Табела 67). У узорцима са мањим садржајем лактоферина (3,5-7,5 mg/l) најјача антибактеријска активност забележена је током прва 24 сата инкубирања, када је дошло до малог повећања броја тест микроорганизама. Након истека 24 сата, број *K. pneumoniae* је почео убрзано да расте, што упућује на то да ови узорци млека више нису поседовали антибактеријску активност. У експерименту на +15 °C није утврђена зависност антибактеријске активности узорака млека магарице према *K. pneumoniae* од садржаја калцијума у овим узорцима. Присуство Enterobacteriaceae није детектовано у негативним контролама.

4.2.5.3. Антибактеријски тест на +38 °C

У Табели 74 приказани су резултати испитивања антибактеријске активности вештачки контаминираних узорака млека магарице (ниво контаминације 10^2 cfu/ml) према клиничком изолату *K. pneumoniae* на +38 °C. У Табели 74 такође су дати и садржаји лизозима, лактоферина и калцијума, одређени у испитаним узорцима млека магарице.

Резултати антибактеријског испитивања, представљени у Табели 74, указују на антибактеријску активност испитаних узорака млека магарице према тестираном изолату *K. pneumoniae*. Код свих тестираних узорака број *K. pneumoniae* је током 8 сати инкубирања имао сличну тенденцију промене. Наиме, тај број је од почетка инкубирања растао до четвртог или петог сата (неупоредиво мањом брзином у поређењу са хранљивим бујоном), да би након тога почео да опада. Међутим, јасно је да постоје разлике у антибактеријском потенцијалу између тестираних узорака, јер је након 8 сати инкубирања забележен различит број тест микроорганизама. За разлику од теста са одабраним сојевима *E. coli* и *Salmonella*, овде није утврђена веза између степена редукције броја тест микроорганизама и садржаја калцијума у узорцима млека. То се најбоље види на примеру узорака 46 и 47, који су показали значајно јаче антибактеријско дејство од узорка 29, иако он има скоро дупло већи садржај калцијума (Табела 74). То упућује на постојање различитог механизма антибактеријског деловања млека магарице према *K. pneumoniae* у односу на

тестиране сојеве *E. coli* и *Salmonella*. С обзиром на много веће концентрације лизозима у поређењу са лактоферином (Табела 67), вероватно је да и код *K. pneumoniae* лизозим има главну улогу у антимикуробној активности млека магарице. Без обзира на то што је најјаче антибактеријско дејство забележено у узорку са највећим садржајем лизозима (Табела 74), не може се извести сигуран закључак о директној повезаности садржаја лизозима и степена редукције тестираног патогена под овим експерименталним условима.

Табела 74. Број *K. pneumoniae* (log cfu/ml) у млеку магарице током 8 сати инкубирања на +38 °С

Време инкубирања (h)	Узорци млека магарице								
	29	41	43	44	45	46	47	48	ХБ
0	2,60 ^{c,A} (0,04)	2,59 ^{a,A} (0,03)	2,60 ^{d,A} (0,04)	2,59 ^{c,A} (0,05)	2,59 ^{c,A} (0,03)	2,59 ^{b,A} (0,05)	2,60 ^{b,A} (0,06)	2,60 ^{c,A} (0,05)	2,59 ^{a,A} (0,04)
1	2,81 ^d (0,01)	2,62 ^a (0,03)	2,81 ^{ab} (0,02)	2,83 ^d (0,09)	2,83 ^a (0,03)	2,82 ^a (0,06)	2,84 ^a (0,03)	2,85 ^a (0,02)	2,76 ^b (0,01)
2	2,88 ^a (0,03)	2,64 ^a (0,01)	2,83 ^{abc} (0,02)	2,91 ^b (0,03)	2,84 ^a (0,03)	2,85 ^a (0,02)	2,83 ^a (0,01)	2,87 ^a (0,05)	3,35 ^c (0,01)
3	2,96 ^b (0,06)	2,70 ^b (0,02)	2,80 ^{ab} (0,08)	2,95 ^{ab} (0,05)	2,91 ^b (0,02)	2,87 ^a (0,01)	2,85 ^a (0,02)	2,91 ^{ab} (0,04)	4,04 ^d (0,02)
4	2,94 ^{ab} (0,06)	2,86 ^e (0,04)	2,81 ^{ab} (0,07)	3,00 ^a (0,01)	3,03 ^e (0,05)	2,88 ^a (0,04)	2,94 ^a (0,00)	2,90 ^{ab} (0,03)	5,20 ^e (0,15)
5	2,93 ^{ab} (0,05)	2,82 ^{de} (0,07)	2,91 ^c (0,03)	3,01 ^a (0,02)	3,18 ^g (0,06)	2,68 ^b (0,01)	2,76 ^{ab} (0,02)	2,89 ^{ab} (0,02)	6,10 ^f (0,19)
6	2,91 ^{ab} (0,01)	2,77 ^{cd} (0,02)	2,86 ^{ac} (0,03)	2,97 ^{ab} (0,02)	3,11 ^f (0,03)	2,32 ^e (0,06)	2,04 ^d (0,00)	2,88 ^{ab} (0,03)	6,87 ^g (0,03)
7	2,92 ^{ab} (0,02)	2,72 ^{bc} (0,02)	2,88 ^{ac} (0,05)	2,94 ^{ab} (0,06)	2,94 ^b (0,01)	1,73 ^d (0,12)	1,67 ^c (0,33)	2,90 ^{ab} (0,02)	7,72 ^h (0,01)
8	2,92 ^{ab,A} (0,00)	2,70 ^{b,C} (0,00)	2,77 ^{b,E} (0,02)	2,94 ^{ab,A} (0,00)	2,74 ^{d,D} (0,02)	1,30 ^{c,B} (0,00)	н.д.	2,94 ^{b,A} (0,03)	8,19 ^{i,F} (0,01)
LYZ (g/l)	1,88 ^B (0,08)	2,00 ^C (0,09)	2,86 ^E (0,02)	2,26 ^D (0,04)	3,54 ^G (0,03)	3,28 ^F (0,01)	4,85 ^H (0,06)	1,04 ^A (0,08)	-
LF (mg/l)	н.д.	15,80 ^A (0,09)	14,35 ^C (0,06)	н.д.	15,70 ^A (0,08)	31,45 ^D (0,46)	36,70 ^E (0,20)	2,90 ^B (0,07)	-
Ca (mg/l)	902,5 ^H (0,00)	592,35 ^D (0,85)	704,5 ^G (2,50)	633,1 ^F (3,10)	365,9 ^A (3,90)	567,1 ^C (1,10)	621,5 ^E (0,40)	544,25 ^B (9,75)	-

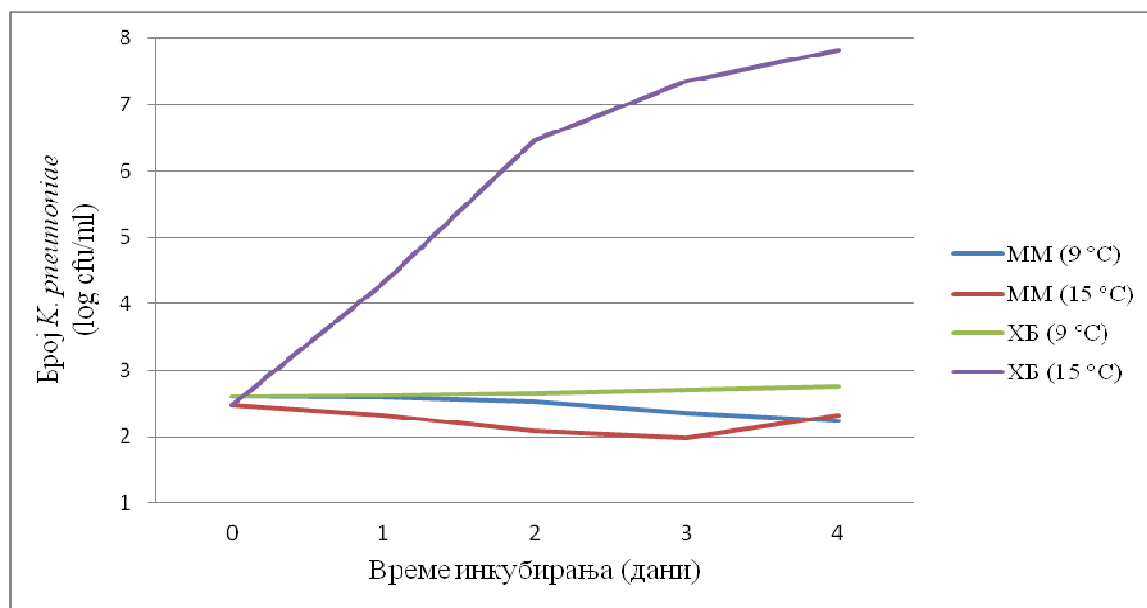
Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим колонама са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). Средње вредности у истим редовима са различитим великим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано; ХБ - хранљиви бујон; LYZ - лизозим; LF - лактоферин; Са . калцијум.

За разлику од тога, степен редукције испитиваног соја *K. pneumoniae* био је директно пропорционалан садржају лактоферина у узорцима млека магарице. Тако је на крају огледа највећи број тестираног патогена био детектован у узорцима у којима је

лактоферин био испод границе детекције или је био присутан у малој концентрацији (2,9 mg/l), а најмањи број у узорцима са највећом концентрацијом овог протеина (Табела 74). Присуство *Enterobacteriaceae* није детектовано у негативним контролама.

4.2.5.4. Утицај температуре инкубирања и нивоа контаминације на антибактеријска својства млека магарице према *K. pneumoniae*

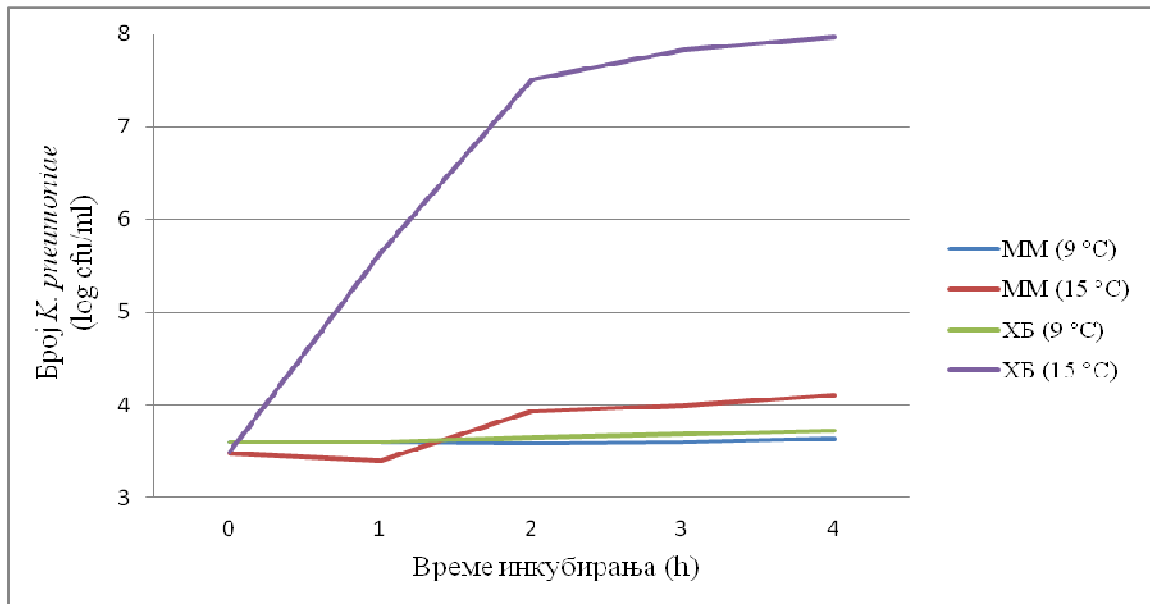
Антибактеријски капацитет млека магарице према *K. pneumoniae* је осим садржајем лизозима и лактоферина био условљен и температуром инкубирања и нивоом контаминације млека тестираним патогеном. На Сликама 38-40 приказане су промене просечног броја *K. pneumoniae* у вештачки контаминираним узорцима млека магарице и хранљивом бујону (ХБ), током инкубирања на +9 и +15 °С.



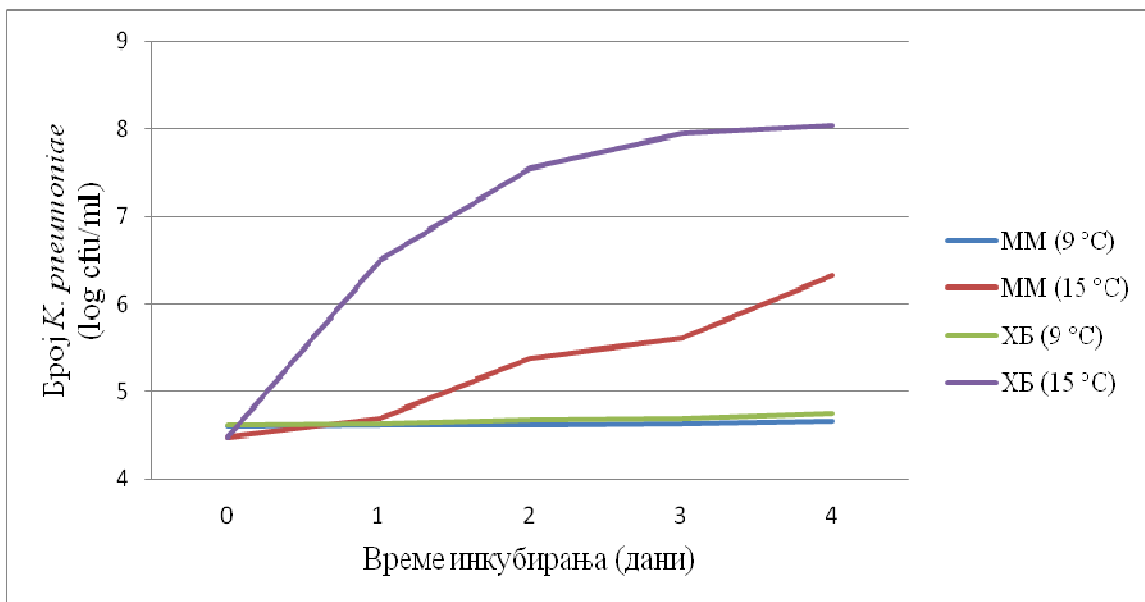
Слика 38. Просечне вредности броја *K. pneumoniae* у тестираним узорцима млека магарице (ММ) и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^2 cfu/ml, током инкубирања на +9 и +15 °С.

Мањи број тестиране *K. pneumoniae* регистрован у млеку магарице након 96 сати инкубирања на +9 °С у поређењу са +15 °С не значи његову јачу антибактеријску активност на овој температури, већ је разлог томе спорији раст овог патогена на +9 °С. То се јасно види ако се пореди број ових бактерија у хранљивом бујону на 15 и +9 °С. Управо се температура од +15 °С показала као повољнија за антибактеријско

дејство млека магарице према испитиваном соју *K. pneumoniae* у односу на +9 °C. Та чињеница је била најочигледнија у Табели 64, где *K. pneumoniae* у четири узорка није била детектована након 72 сата. Разлог томе вероватно лежи у већој активности лизозима и лактоферина на вишој температури инкубирања.



Слика 39. Просечне вредности броја *K. pneumoniae* у тестираним узорцима млека магарице (ММ) и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^3 cfu/ml, током инкубирања на +9 и +15 °C.



Слика 40. Просечне вредности броја *K. pneumoniae* у тестираним узорцима млека магарице (ММ) и хранљивом бујону (ХБ) на нивоу контаминације од 10^4 cfu/ml, током инкубирања на +9 и +15 °C.

Према извештајима из литературе минимална температура на којој је лизозим млека магарице показао антибактеријско (ензиматско) деловање била је +15 °С (Mariani, 2010). Међутим, с обзиром на, у извесној мери успорен раст *K. pneumoniae* у млеку магарице утврђен на +9 °С, очигледно је да су антибактеријске компоненте овог млека биле активне и на овој температури. Такође је велика и вероватноћа да је том успоравању раста допринела и нижа температура инкубирања, на којој су бактерије иначе осетљивије на дејство лизозима.

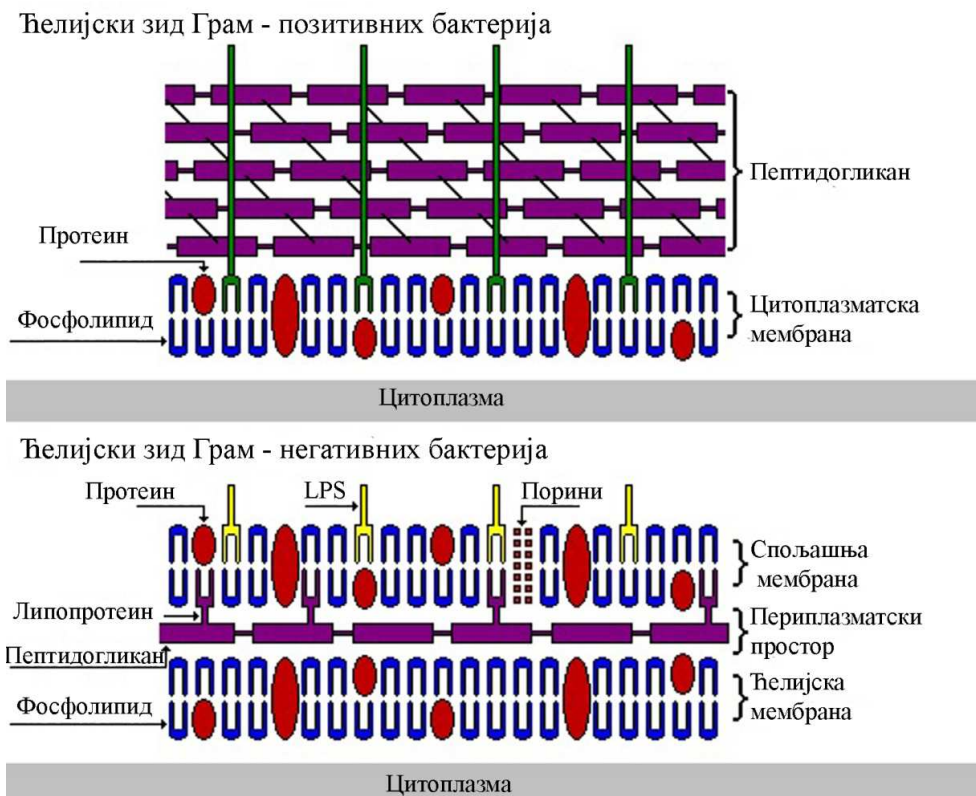
Зависност интензитета антибактеријске активности млека магарице од почетне контаминације тестираним патогеном, практично значи да антимицробне компоненте млека магарице имају неки свој ограничен капацитет који може да буде потрошен. На пример, испитивани сој *K. pneumoniae* је у огледу са најнижим нивоом контаминације након 72, односно 96 сати инкубирања у узорцима 32, 49, 27 и 39 био испод границе детекције (Табела 71). Међутим, повећањем нивоа контаминације овај патоген је у истим узорцима на крају огледа био детектован, с тим што је био присутан у већем броју што је ниво контаминације био већи (Табеле 72 и 73). Број *K. pneumoniae* је након 96 сати инкубирања у експерименту на +9 °С био сразмеран нивоу контаминације.

У тесту са *K. pneumoniae* повећање нивоа контаминације је такође довело до брже потрошње антибактеријског капацитета млека магарице. Тако је просечан број *K. pneumoniae* само при најнижем нивоу контаминације током целог експеримента био нижи у огледу на +15 °С у односу на +9 °С, (Слика 38). Повећањем нивоа контаминације смањивао се период током којег је на +15 °С бележен нижи број овог патогена у односу на оглед на +9 °С (Слике 39 и 40). Повећањем нивоа контаминације долази до изражаја утицај температуре инкубирања на антибактеријску активност млека магарице. *K. pneumoniae* се на +15 °С брже умножава, па се захваљујући томе при већим нивоима контаминације постепено инхибира антибактеријско дејство млека магарице.

4.3. Механизми антибактеријског деловања млека магарице

4.3.1. Механизми антибактеријског деловања млека магарице на Грам позитивне бактерије

Према извештајима других аутора лизозим је носилац антимикуробне активности млека магарице (Qureshi и Enbergs, 2012; Zhang и сар., 2008). Антимикуробна активност лизозима се заснива на способности овог протеина да хидролизује β -1,4 гликозидне везе између N-ацетилмураминске киселине и N-ацетилглукозамина присутног у пептидогликанском слоју ћелијског зида бактерија, што за последицу има његову деградацију и смрт ћелије (Floris и сар., 2003). Према наводима из литературе, Грам позитивне бактерије су веома осетљиве на лизозим, јер је 90% њиховог ћелијског зида састављено од пептидогликана (Floris и сар., 2003). Са друге стране, пептидогликан код Грам негативних бактерија чини од 5 до 10% структуре ћелијског зида, а ове бактерије поред тога поседују и спољашњу мембрану која штити ћелију од негативних утицаја из спољашње средине (Barbioli и сар., 2012) (Слика 41). Међутим, поређењем резултата испитивања антибактеријске активности млека магарице на Грам позитивне и Грам негативне бактерије добијених у овој докторској дисертацији, уочен је слабији антибактеријски потенцијал овог млека према Грам позитивним сојевима. У доступној научној литератури постоје различити наводи о осетљивости *L. monocytogenes* и *S. aureus* и на антимикуробно дејство лизозима, који иду од потпуне резистентности ових бактерија на његово дејство, па све до значајног успоравања њиховог раста (Benkerroum, 2008; Vera и сар., 2005; Burke и сар., 2014; Maga и сар., 1998; Maga и сар., 2006; Floris и сар., 2003). Објашњење отпорности *L. monocytogenes* и *S. aureus* на бактерицидно дејство лизозима треба тражити у процесима модификације пептидогликанског слоја њиховог ћелијског зида (Aubry и сар., 2011; Benkerroum, 2008; Burke и сар., 2014; Callewaert и Michiels, 2010). Код бактерија постоје различите стратегије одбране од хидролитичког дејства лизозима. Док неки механизми укључују додатне ћелијске структуре, као што су спољашња мембрана или капсула око пептидогликанског слоја које спречавају приступ молекула лизозима његовим β -1,4 гликозидним везама, други подразумевају модификације пептидогликана (Benkerroum, 2008).



Слика 41. Структура ћелијског зида Грам позитивних и Грам негативних бактерија (<http://legacy.earlham.edu/~stephse/Streptococcuspyogenes.htm>)

Једна од тих модификација назива се О-ацетилација и представља додаток ацетата С-6 хидроксилној групи ланца N-ацетилмураминске киселине. О-ацетилација има за последицу стварање просторне баријере за молекуле лизозима. Ова ацетилација одвија се под каталитичким дејством О-ацетилтрансферазе, коју синтетишу сојеви *L. monocytogenes* и *S. aureus* који поседују *oatA* ген (Burke и сар., 2014; Laaberki и сар., 2011).

Степен О-ацетилације варира у зависности од бактеријског соја и старости културе, и обично је модификовано од 15 до 70% пептидогликана у ћелијском зиду. Успоравање раста *L. monocytogenes* и *S. aureus* у млеку магарице би могло бити последица тога што пептидогликански слој није у потпуности модификован, па лизозим ипак има одређени приступ циљним местима на пептидогликану. Директна корелација између степена О-ацетилације пептидогликана и отпорности на лизозим је осим за *S. aureus*, доказана и за друге бактеријске врсте (Laaberki и сар., 2011).

Док код *S. aureus* О-ацетилација има примарну улогу у његовој резистентности на дејство лизозима (Benkerroum, 2008), код *L. monocytogenes* постоји још једна модификација пептидогликанског слоја која је позната под називом N-деацетилација (Вонеса и сар., 2011). То је структурна модификација омогућена геномом *pgdA* који носи код за синтезу ензима пептидогликан N-деацетилазе, под чијим каталитичким дејством долази до овог процеса (Вонеса и сар., 2011; Burke и сар., 2014). Претходна истраживања су показала да је након инактивације гена *pgdA* *L. monocytogenes* постала екстремно осетљива на бактерицидну активност лизозима (Вонеса и сар., 2011).

Дакле, *L. monocytogenes* и *S. aureus* су на бактерицидно дејство лизозима отпорни због способности синтезе ензима О-ацетил трансферазе и пептидогликан N-деацетилазе. Међутим, извештаји који говоре о потпуној отпорности *L. monocytogenes* и *S. aureus* на антимикуробно дејство лизозима, махом се односе на комерцијални лизозим беланца кокошијег јајета (Вера и сар., 2005; Burke и сар., 2014). Насупрот томе, друга истраживања су установила антимикуробну активност лизозима хуманог млека на *S. aureus*, изражено кроз значајно успоравање његовог раста (Мага и сар., 1998; Мага и сар., 2006). Иако тачан механизам овог дејства није познат, претпоставља се да је он последица додатне активности неких других компонената млека (Мага и сар., 2006). Налази за хумано млеко су генерално у складу са резултатима добијеним у овој докторској дисертацији, јер је и овде регистровано смањење брзине умножавања тестираног соја *S. aureus*. Добијени резултати су такође у сагласности са извештајима о антибактеријском деловању кобиљег лизозима, структурно најближег лизозиму млека магарице, који говоре о бактерицидној активности овог протеина према *E. coli*, али не и према *S. aureus* (Bruhn и сар., 2011). У иначе врло лимитираним литературним подацима о антимикуробној активности млека магарице, постоје подаци о антибактеријској активности овог млека према *S. aureus* након дигестије (Nazzaro и сар., 2010). Tidona и сар., (2011) су у свом истраживању установили значајно инхибиторно деловање млека магарице према *L. monocytogenes* пре и након дигестије.

Резултати добијени у оквиру ове докторске дисертације указују на то да је укупна антибактеријска активност млека магарице према *L. monocytogenes* и *S. aureus* много комплекснија од простог хидролитичког деловања његовог лизозима, јер без обзира

на неке изузетке регистроване у огледима са *S. aureus* на +15 °C (Табеле 26-28) и *L. monocytogenes* на +9°C (Табеле 16 и 17), строга веза између антибактеријског потенцијала млека магарице према поменутиим сојевима и садржаја лизозима није утврђена.

Података о антибактеријском деловању лактоферина из млека магарице према *L. monocytogenes* и *S. aureus* нема у доступној научној литератури. Насупрот томе, постоје извештаји о бактериостатској активности хуманог лактоферина према *S. aureus*, која је у функцији његове способности везивања гвожђа (Diarra и сар., 2002). Иако извесни допринос лактоферина укупној антибактеријској активности млека магарице према *L. monocytogenes* и *S. aureus* не треба занемарити, лизозим је највероватније примарни носилац антибактеријске активности, с обзиром на много веће концентрације лизозима утврђене у испитиваним узорцима млека магарице. У прилог томе такође иде и чињеница да у овој докторској тези није доказана веза између концентрације лактоферина и антибактеријске активности млека магарице према тестираним Грам позитивним сојевима.

Слаба, али ипак регистрована инхибиторна активност испитаних узорака млека магарице према *S. aureus* на +9 °C при нижим нивоима контаминације (Табеле 23 и 24), могла би да иде у прилог деловању неких других активних компоненти овог млека. Наиме, према литературним подацима минимална температура потребна за ензиматску антибактеријску активност лизозима из млека магарице према Грам позитивном *Micrococcus lysodeikticus* је износила +15 °C (Mariani, 2010). У овом случају допринос ниске температуре инхибирању раста *S. aureus* може бити веома значајан. Осим тога што је дефинисана температура инкубирања била само за степен виша од минималне температуре неопходне за раст *S. aureus* (8 °C), она га је вероватно чинила мање отпорним на лизозим, услед продукције мање количине биомасе (Johansen и сар., 1994).

Дакле, с обзиром на комплексност медијума какво је млеко магарице, постоји велика вероватноћа да и неке друге компоненте овог млека осим лизозима и лактоферина, појединачно или у синергизму, дају изванредан допринос успоравању раста тестираних Грам позитивних бактерија. То би на првом месту могле бити неке масне киселине са добро познатим и документованим антибактеријским дејством према Грам

позитивним бактеријама, као што су лиолна (C_{18:2}), лауринска (C_{12:0}) и олеинска киселина (C_{18:1}) (Galbraith и сар., 1971; Galbraith и Miller, 1973).

Из тог разлога је у узорцима млека магарице балканске расе који су коришћени за испитивање антибактеријске активности према *L. monocytogenes* и *S. aureus* на +38 °C, одређен садржај масних киселина, који је приказан у Табели 75.

Табела 75. Садржај масних киселина (% m/m) одабраних узорака млека магарице

Масне киселине (% m/m)	Ознака узорка							
	21	22	24	51	52	53	54	55
8:0	4,0 ^e (0,10)	3,7 ^d (0,34)	4,2 ^e (0,13)	2,2 ^b (0,12)	2,8 ^c (0,19)	1,5 ^a (0,14)	2,6 ^c (0,21)	2,1 ^b (0,24)
10:0	11,0 ^c (0,18)	13,8 ^d (0,99)	11,3 ^c (0,59)	5,3 ^a (0,37)	12,8 ^d (1,28)	4,8 ^a (0,34)	9,3 ^b (0,33)	5,4 ^a (0,25)
11:0	2,1 ^b (0,16)	2,2 ^b (0,17)	1,1 ^a (0,15)	0,9 ^a (0,04)	2,1 ^b (0,19)	0,8 ^a (0,05)	1,9 ^b (0,12)	1,1 ^a (0,12)
12:0	11,8 ^c (0,72)	14,2 ^d (0,12)	10,6 ^c (0,20)	6,1 ^b (0,42)	15,7 ^e (0,98)	4,8 ^a (0,15)	13,3 ^d (1,19)	6,2 ^b (0,39)
14:0	10,7 ^e (0,86)	12,2 ^e (0,86)	8,6 ^c (0,31)	6,3 ^b (0,42)	13,5 ^f (0,94)	5,1 ^a (0,41)	13,3 ^f (0,81)	6,6 ^b (0,36)
14:1	0,2 ^b (0,03)	н.д.	н.д.	0,2 ^a (0,03)	0,9 ^e (0,04)	0,5 ^d (0,01)	1,1 ^f (0,05)	0,4 ^c (0,03)
15:0	н.д.	н.д.	0,8 ^c (0,09)	1,0 ^d (0,08)	0,5 ^a (0,03)	0,6 ^b (0,03)	0,8 ^{cd} (0,06)	0,8 ^c (0,09)
16:0	18,3 ^{bcd} (1,14)	18,8 ^{cd} (0,50)	16,0 ^a (0,58)	19,4 ^d (0,95)	17,8 ^b (0,09)	18,1 ^{bc} (0,14)	18,5 ^{bcd} (0,64)	19,2 ^{cd} (0,46)
16:1	3,5 ^a (0,04)	4,3 ^b (0,42)	6,3 ^d (0,59)	6,6 ^d (0,46)	4,1 ^{ab} (0,31)	6,1 ^d (0,14)	6,6 ^d (0,66)	5,2 ^c (0,15)
18:0	1,0 ^a (0,10)	1,6 ^c (0,21)	1,6 ^c (0,01)	1,3 ^b (0,15)	1,9 ^d (0,28)	1,4 ^{bc} (0,13)	1,5 ^{bc} (0,05)	1,5 ^{bc} (0,06)
18:1	15,0 ^c (0,55)	12,3 ^{ab} (1,22)	13,1 ^b (0,16)	20,1 ^d (0,90)	10,9 ^a (1,13)	20,9 ^d (0,08)	11,8 ^{ab} (1,04)	20,3 ^d (1,35)
18:2n6	18,1 ^c (0,30)	12,6 ^a (1,54)	18,9 ^c (0,47)	24,3 ^e (0,52)	14,4 ^b (1,37)	28,7 ^f (0,49)	15,8 ^b (0,42)	21,9 ^d (0,90)
18:3n3	4,1 ^c (0,34)	4,4 ^c (0,21)	7,6 ^e (0,62)	6,3 ^d (0,11)	2,6 ^a (0,07)	6,5 ^d (0,15)	3,4 ^b (0,38)	8,6 ^f (0,48)
20:2	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0,8 (0,08)

Вредности дате у Табели представљају средњу вредност три понављања. Средње вредности у истим редовима са различитим малим словима су међусобно статистички различите ($P < 0,05$). н.д. - није детектовано.

У испитаним узорцима млека магарице, од масних киселина са антибактеријским дејством, детектовано је присуство линолне (C_{18:2}), лауринске (C_{12:0}) и олеинске киселине (C_{18:1}), које су у збиру у анализираним узорцима млека магарице чиниле од 40,3 до 54,7% од укупних масних киселина (Табела 75). Антибактеријско дејство линолне и олеинске киселине огледа се у стимулацији усвајања кисеоника од стране Грам позитивних бактерија до бактерицидних концентрација, које изазивају лизирање протопласта (Galbraith и Miller, 1973). Такође, постоје подаци о синергистичком дејству линолне и олеинске киселине према *S. aureus* (Dilika и сар., 2000), док се сматра да лауринска киселина међу засићеним масним киселинама, поседује најјаче антибактеријско дејство на Грам позитивне бактерије (Kabara и сар., 1972). Линолна киселина својим деловањем продужава трајање лаг фазе код Грам позитивних бактерија (Galbraith и сар., 1971).

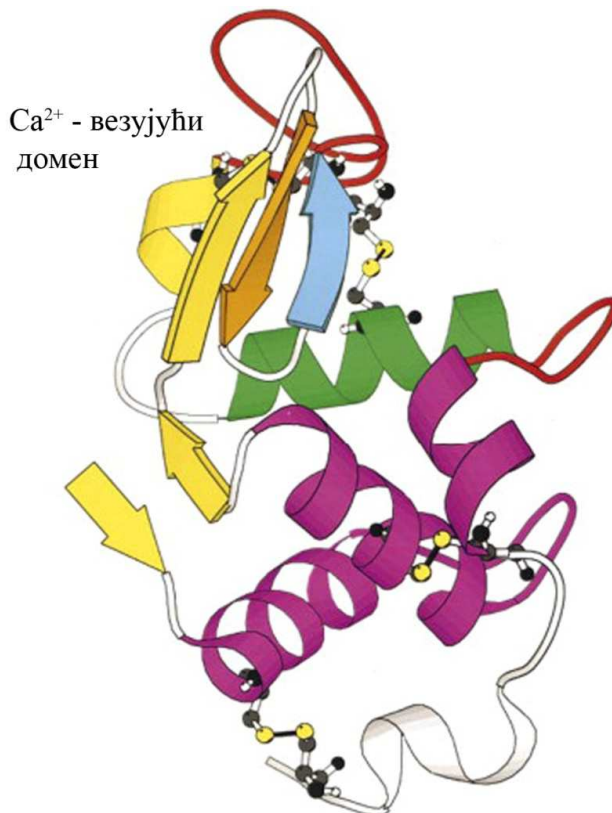
Према наводима из литературе лауринска киселина (C_{12:0}) је према *L. monocytogenes* у лабораторијским условима показала бактерицидно дејство при концентрацији од 10-20 µg/ml (Wang и Johnson, 1992).

4.3.2. Механизми антибактеријског деловања млека магарице на Грам негативне бактерије

4.3.2.1. Механизми антибактеријског деловања млека магарице на *E. coli*, *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium*

Резултати антибактеријског испитивања добијени у оквиру ове докторске дисертације указују на корелацију између садржаја калцијума у млеку магарице и смањења броја ћелија тестираних сојева *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* и *E. coli*. Ова зависност би се могла тумачити способношћу лизозима млека фамилије *Equidae* да веже јоне калцијума (Ca²⁺) и формира линеарне протофиламенте, што је већ доказано код кобиљег лизозима. С обзиром да коњи и магарци представљају блиске врсте сисара, које су чланови исте *Equidae* фамилије (Хи и сар., 1996), постоји велика вероватноћа сличности структура њихових лизозима, посебно што оба лизозима припадају g-типу (Wilhelm, 2009; Bruhn и сар., 2011). Наиме, снажна корелација између активности лизозима и садржаја калцијума већ је забележена у

кобиљем млеку (Sarwar и сар., 2001), а у доступној научној литератури постоје извештаји који говоре о бактерицидној активности кобиљег лизозима према Грам негативним бактеријама, укључујући *E. coli* (Bruhn и сар., 2011). Ти извештаји сугеришу да јони Ca^{2+} путем везивања за кобиљи лизозим чине овај протеин стабилнијим и побољшавају његову антибактеријску активност према Грам негативним бактеријама. Кобиљи лизозим показује 50-51% идентичности секвенце са лизозимом беланца кокошијег јајета (Bruhn и сар., 2011). За разлику од лизозима беланца кокошијег јајета (који припада *c*-типу) и чија антибактеријска активност је примарно усмерена ка Грам позитивним бактеријама (Floris и сар., 2003), кобиљи лизозим има способност везивања јона Ca^{2+} (Nitta и сар., 1987; Tsuge и сар., 1991). Ова способност је условљена молекулском структуром кобиљег лизозима и активно учествује у формирању његових олигомерних облика (Desmet и сар., 1992; Van Dael, 1993). Формирање линеарних или прстенастих структура лизозима зависи од концентрације калцијумових јона (Malisauskas и сар., 2003), где удео линеарних структура расте са повећањем садржаја јона Ca^{2+} , док су прстенасте структуре у већем броју присутне само у случају њиховог одсуства. Транзиција молекула лизозима из нативне форме у филаментозне структуре одвија се под утицајем наелектрисања његовог молекула (Malisauskas и сар., 2003). С обзиром да лизозим млека магарице припада *g*-типу (Wilhelm, 2009), његов молекул вероватно има структуру калцијум везујућег β -домена сличну оној код кобиљег лизозима (Permyakov и сар., 2006). Због тога је овај део молекула највероватније негативно наелектрисан. Млеко магарице садржи различите концентрације калцијума чији јони при рН 7,11-7,25 (рН вредност испитаних узорака млека магарице), могу да неутралишу негативно наелектрисање на молекулу лизозима, и доведу до образовања линеарних форми. На слици 42, дат је шематски приказ нативне форме молекула кобиљег лизозима.



Слика 42. Шематски приказ молекула кобиљег лизозима у нативној форми. Жутом бојом је означен део молекула за који се везују Ca^{2+} јони (Wilhelm, 2009).

Слично томе, формирање линеарних амилоида кобиљег лизозима на $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ и при pH 2, објашњено је неутрализацијом негативног наелектрисања на молекулу кобиљег лизозима, које се одвија у маниру неутрализације јонима калцијума (Malisauskas и сар., 2003). Везивање јона калцијума такође редукује хидрофобност кобиљег лизозима, с обзиром да су конформацијске промене такве да хидрофобни региони на молекулу протеина постају мање приступачни (Haezebrouck и сар., 1992; Norpe и сар., 1996). То може бити од значаја за антибактеријску активност, због тога што спољашња мембрана Грам негативних бактерија, као хидрофилни негативно наелектрисани слој, представља баријеру за хидрофобне молекуле (Masschalck и Michiels, 2003).

Механизам антибактеријског деловања лизозима млека магарице на *E. coli*, могао би бити сличан механизму деловања SP-A „surfactant“ протеина. Иако SP-A протеини припадају *c*-типу лецитина (Wu и сар., 2003), њихова антимикуробна активност је

такође зависна од калцијума. Молекуларни механизам њиховог деловања укључује јонске интеракције између позитивно наелектрисаних резидуа протеина и негативног наелектрисуња на површини ћелије *E. coli* (Wu и сар., 2003).

Калцијум зависна природа антибактеријске активности млека магарице према *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* и оба тестирана соја *E. coli*, потврђена је у огледу на +38 °C додавањем CaCl_2 и EDTA у одабране узорке овог млека. Додатак веће концентрације CaCl_2 је довео до снажније редуције броја живих ћелија *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* и *E. coli* ATCC 10536 (Табеле 47, 48 и 66), што би се могло објаснити већим уделом линеарних форми лизозима у присуству веће концентрације калцијумових јона. Након додавања CaCl_2 веће смањење броја *S. Enteritidis* је забележено у узорцима млека са већим садржајем лизозима (Табела 47), што је највероватније последица већег броја рецептора за јоне калцијума. Насупрот томе, инхибирање антибактеријске активности млека магарице, регистровано након додатка EDTA, могло би да буде последица калцијум - EDTA интеракција (Christensen и сар., 2003), тј. везивања калцијумових јона из млека магарице за додати EDTA. Захваљујући том везивању, одређен проценат јона калцијума постаје недоступан за интеракцију са лизозимом овог млека, а смањење концентрације расположивих јона овог метала имплицира и смањење садржаја линеарних структура формираних у млеку магарице. Везујући капацитет додатог EDTA (1,39 g/l), израчунат на основу молекулских маса калцијума и EDTA, као и на бази њиховог односа везивања, био је око 190 mg/l калцијума.

Иако су аутори претходних истраживања сугерисали да се калцијум везујући β -домен на молекулу кобиљег лизозима денатурише на нижим температурама, не постоје подаци о његовој транзицији у кобиљем или магарећем лизозиму на температурама од +15 °C или нижим. Упркос томе што је Mariani (2010) известио да лизозим млека магарице није био активан испод +15 °C, истраживања спроведена у оквиру ове докторске дисертације показала су постојање снажне антибактеријске активности млека магарице према *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* и *E. coli* на температурама од +9 и +15 °C, током 4 дана инкубирања. Објашњење ових контрадикторних налаза би се могло наћи у различитом начину антибактеријског деловања лизозима млека магарице према Грам негативним *E. coli*, *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* у поређењу са Грам позитивном *Micrococcus lysodeikticus* (Mariani,

2010). Наиме, у условима ниских температура током продуженог времена инкубирања, антибактеријска активност лизозима млека магарице према горе поменутиим Грам негативним бактеријама, највероватније је не-ензиматског карактера, и одвија се путем његове трансформације у филаментозне структуре у присуству јона калцијума. Разни облици не-ензиматског антимикуробног деловања различитих врста лизозима, укључујући повећање пропустљивости спољашњих мембрана бактеријских ћелија, потврђени су у претходним студијама других аутора (Ibrahim и сар., 1996; Masschalck и Michiels, 2003). Тако су испитивања која су вршена на хемијски и топлотно денатурираном лизозиму беланца јајета показала слабљење његове ензиматске активности, а са друге стране интензивирање антибактеријске активности према Грам негативним бактеријама, без слабљења његовог дејства према Грам позитивним бактеријама.

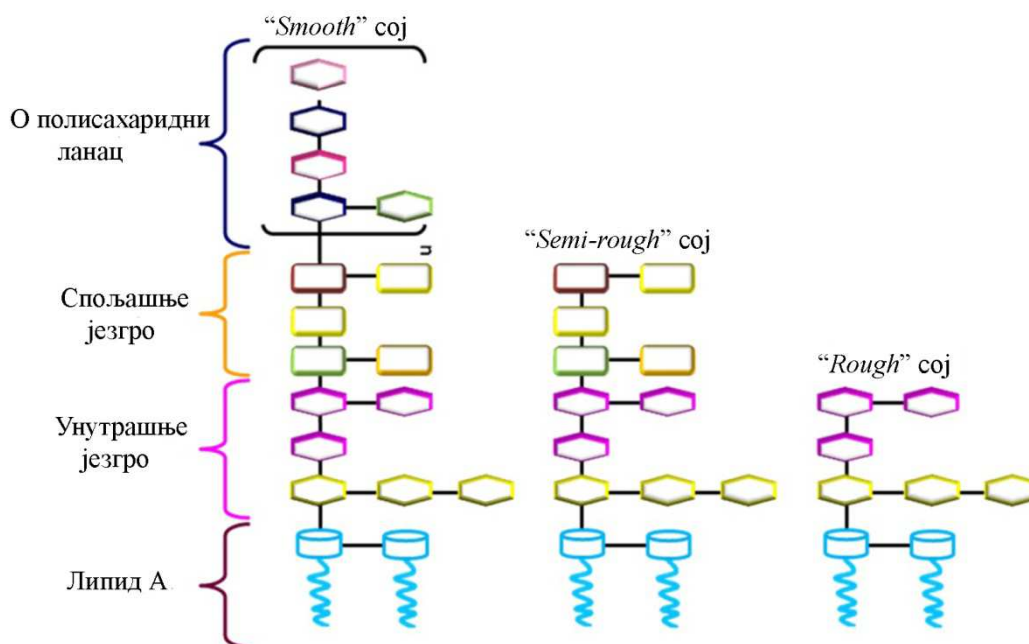
Антибактеријски потенцијал млека магарице према *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* на 9 и +15 °C, утврђен у овој докторској дисертацији, био је примарно условљен садржајем калцијума (Табеле 31-43), што је детектовано и за оба тестирана соја *E. coli* (Табеле 50-62). Одсуство директне зависности антибактеријског потенцијала млека магарице (према *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium*) од садржаја лизозима у огледу на +15 °C (Табеле 38-43), могло би се објаснити чињеницом да су сви испитани узорци млека магарице имали релативно висок садржај лизозима (2,0-3,6 g/l), захваљујући којем су највероватније поседовали довољан број рецептора за везивање свих присутних Ca^{2+} јона. Отуда је вероватно да се у узорцима млека са већим концентрацијама калцијума (односно Ca^{2+} јона) формирао већи удео линеарних протофиламената лизозима, па су без обзира на садржај лизозима ови узорци испољавали снажнију антибактеријску активност. Насупрот томе, у експерименту на +9 °C испитани узорци су поседовали лизозим у много већем опсегу концентрација (1,0-4,1 g/l) (Табеле 31-36). Међутим, на овако ниској температури синтеза линеарних протофиламената лизозима се вероватно одвија спорије него на +15 °C, тако да већи садржај нативног лизозима, не значи обавезно и већи удео линеарних форми лизозима, односно јачу антибактеријску активност. Спора трансформација нативног лизозима у линеарне протофиламенте на ниским температурама је највероватније разлог непостојања директне међузависности нивоа лизозима и антибактеријске активности млека магарице према *E.coli* ATCC 8739 на +9 °C

(Табеле 50-52). С обзиром на то да је +38 °C много повољнија температура за синтезу линеарних протофиламената лизозима (Malisauskas и сар., 2003), било је за очекивати да у овом огледу веза између концентрације нативног лизозима и антимикробне активности млека магарице буде видљива. Међутим, то није био случај највероватније због ниског нивоа контаминације тестираним патогенима (10^2 cfu/ml) и релативно кратког времена инкубирања узорака млека. Свакако да је ниски ниво контаминације (10^2 cfu/ml) могао значајно да допринесе томе да и они узорци у којима је лизозим био присутан у мањим концентрацијама покажу антибактеријско деловање. Врло је вероватно да би на неком већем ниву контаминације на температури од +38 °C антибактеријски ефекат оваквих узорака изостао, поготову ако се има у виду да је ова температура блиска оптималној температури за размножавање тестираних патогена (Brisse и сар., 2006).

Јаче антибактеријско дејство млека магарице према *E. coli* ATCC 8739 и *E. coli* ATCC 10536 регистровано на +15 °C (у поређењу са огледом на +9 °C), највероватније је као и у случају тестираних сојева *Salmonella* spp. резултат већег садржаја линеарних протофиламената лизозима на овој температури. Наиме како је већ претходно наведено, садржај линеарних форми лизозима поред рН вредности и садржаја калцијумових јона, зависи и од температуре инкубирања (Permyakov и сар., 2006). Виша температура инкубирања би можда могла да значи бржу трансформацију протеина у линеарну форму и већи удео линеарних протофиламената лизозима, што имплицира јачу антибактеријску активност. Интензитет антибактеријске активности млека магарице на +15 °C био је ограничен нивоом контаминације, односно већом брзином умножавања тестираних патогена на овој температури.

Обе температуре инкубирања (+9 и +15 °C) су ниске у односу на оптималну температуру раста тестираних патогена, тако да треба узети у обзир и чињеницу да су бактерије на нижим температурама генерално осетљивије на дејство лизозима. Бактеријске ћелије на нижим температурама имају мање димензије, што за последицу има продукцију мањих количина биомасе за исти број ћелија и већу осетљивост на лизозим (Johansen и сар., 1994).

Различита осетљивост тестираних сојева *E. coli* и *Salmonella* spp. на антибактеријско деловање млека магарике, утврђена у овој докторској дисертацији, могла би бити последица неких разлика у њиховим ћелијским структурама. Грам негативне *Enterobacteriaceae* су од утицаја из спољашње средине заштићене комплексном структуром своје спољашње ћелијске мембране. У њен састав улази липополисахаридни слој (*LPS*) са негативно наелектрисаним молекулима, примарно локализованим на спољашњој страни мембране и стабилованим присуством двовалентних катјона. Бочни полисахаридни ланци *LPS* молекула обезбеђују хидрофилну површину бактеријске ћелије, док ланци засићених масних киселина чине ову мембрану релативно чврстом у поређењу са другим фосфолипидним структурама (Ellison и Giehl, 1991). На Слици 43 дат је приказ структуре *LPS* слоја спољашње мембране Грам негативних бактерија.



Слика 43. Шематски приказ структуре липополисахаридног слоја (*LPS*) спољашње мембране Грам негативних бактерија.

LPS има есенцијалну структуралну и функционалну улогу, првенствено у транспорту хидрофобних молекула у унутрашњост бактеријске ћелије (Reyes и сар., 2012). *LPS* чини 10-15% укупне структуре спољашње мембране и чак 75% укупне бактеријске површине. Као што се види са слике 43, *LPS* је сачињен од липида А,

олигосахаридног језгра и опционо О-антигена. Липид А је део слоја који је причвршћен за мембрану и представља хидрофобне и ендотоксичне делове структуре. Олигосахаридно језгро је подељено на унутрашње и спољашње језгро. Спољашње језгро је придружено О-антигену и састоји се од моносахарида. О-антиген је полисахарид чији ланци могу да садрже до 40 јединица дидеоксихексоза и пружају се од олигосахаридног језгра ка спољашњој површини бактеријске ћелије. О-антиген је хидрофилни имунодоминантни део *LPS*-а и представља мету имунолошког одговора инфицираног домаћина, па се на бази О-антигена врши серолошка класификација ентеробактерија (Reyes и сар., 2012). Enterobacteriaceae се на основу тога да ли поседују или не О-антиген сврставају у „smooth“ и „rough“ сојева, мада се у литератури помињу још и „semi-rough“ сојеви који поседују само подјединицу О-антигена (Reyes и сар., 2012).

Двојна хидрофилна/хидрофобна природа чини спољашњу мембрану непропусном баријером за велике молекуле попут лизозима, односно спречава њихову пенетрацију у унутрашњост ћелије (Ellison и Giehl, 1991). Међутим, лизозим може бити ефикасан према Грам негативним бактеријама у присуству неког агенса који делује дестабилизујуће на њихову спољашњу мембрану (Barbioli и сар., 2012). Један од таквих агенаса је и лактоферин (Ellison и Giehl, 1991). Према наводима из литературе лактоферин може да повећа пропустљивост спољашње мембране Грам негативних ентеробактерија (Ellison и Giehl, 1991; Farnaud и Evans, 2003), али механизми тог дејства нису у потпуности познати. Постоји неколико теорија: једна од њих се базира на способности лактоферина да везивањем за свој молекул уклања стабилизујуће металне катјоне са *LPS* слоја у маниру сличном EDTA. Ова хипотеза је подржана чињеницом да сатурација лактоферина калцијумом инхибира његов утицај на пропустљивост спољашње мембране бактеријске ћелије. Према другој теорији лактоферин повећава пропустљивост спољашње ћелијске мембране стимулацијом продукције бактеријских сидерофора (Finkelstein и сар., 1983). Трећи потенцијални механизам је у вези са великим катјонским зонама, присутним на површини молекула лактоферина (Jenssen и Hancock, 2009). Постојање тих катјонских зона омогућава директно повезивање са анјонским структурама *LPS* слоја спољашње мембране. Тим везивањем је омогућено лактоферину да делује слично поликатјонски мембран активним агенсима, где физичко присуство везаног протеина

мења нормалну мембранску физиологију (Ellison и Giehl, 1991). Ова интеракција има за последицу повећање пропустљивости спољашње мембране услед ослобађања *LPS* слоја, што отвара пут лизозиму ка циљним местима на пептидогликану ћелијског зида (Barbioli и сар., 2012). Способност директног везивања за *LPS* слој и његовог накнадног ослобађања из структуре спољашње мембране, осим говеђег има и хумани лактоферин (Yamauchi и сар., 1993; Applemelk и сар., 1994).

Синергистичко антимикробно деловање лизозима и лактоферина према „smooth“ бактеријским сојевима је већ доказано у ранијим истраживањима других аутора (Ellison и Giehl, 1991; Jenssen и Hancock, 2009). Ellison и Giehl (1991) су у својој студији указали на синергистичко бактерицидно дејство ова два протеина према „smooth“ сојевима *S. Typhimurium* и *E. coli*. У том истраживању трансмисионом електронском микроскопијом су детектовани сферобласти (ћелије без ћелијског зида), што указује на то да је лактоферин својим дејством омогућио пролаз молекулима лизозима до циљних места на пептидогликану ћелијског зида. Са друге стране, сам лизозим без лактоферина, није имао бактерицидно дејство на испитиване сојеве. Синергистичка активност лизозима и лактоферина била је условљена концентрацијом лизозима и лактоферина, нивоом контаминације тест микроорганизама, садржајем калцијума, као и карактеристикама средине (Ellison и Giehl, 1991). Њихова студија је показала да је бактерицидни ефекат синергистичког дејства лизозима и лактоферина захтевао директан контакт лактоферина са *LPS* слојем спољашње ћелијске мембране, што упућује на то да је у питању био горе поменути трећи механизам синергистичког дејства лизозима и лактоферина. Ellison и Giehl (1991) су показали да је повећање концентрације калцијумових јона довело до инхибирања заједничког бактерицидног деловања ова два протеина, иако лактоферин под датим експерименталним условима није везивао калцијумове јоне. Промене у концентрацији калцијума у околној средини могу да утичу на удео катјона инкорпорираних у спољашњу мембрану и да на тај начин мењају осетљивост мембране на мембран активне агенсе (Ellison и Giehl, 1991). Осим тога, двовалентни катјони калцијума доказано блокирају активност поликатјонских мембран активних агенаса, у које се убраја и лактоферин (Ellison и Giehl, 1991).

Бактеријски сојеви који су се у овој докторској дисертацији показали најосетљивијим на антибактеријско дејство млека магарице (*S. Typhimurium* ATCC

14028, *E. coli* ATCC 8739 и *E. coli* ATCC 10536) припадају „smooth“ бактеријским сојевима (Fields и сар., 1986; Chawner и Gilbert, 1989; Slauch и сар., 1995; Public Health England, 2013). У складу са тим, снажнија антибактеријска активност млека магарице према *S. Typhimurium* ATCC 14028 у односу на *S. Enteritidis* ATCC 13076, могла би бити последица допунског синергистичког антибактеријског деловања лизозима и лактоферина. Насупрот томе, у доступној научној литератури нема података о овом синергизму према *S. Enteritidis* ATCC 13076, који се у овој тези показао много отпорнијим на антибактеријско деловање млека магарице у поређењу са *S. Typhimurium* ATCC 14028.

У овој докторској дисертацији додаток CaCl_2 у одабране узорке млека магарице није довео до смањења њихове антибактеријске активности према тестираним сојевима, већ је управо имао супротан ефекат. Неслагање ових резултатата са налазима Ellison и Giehl (1991) је вероватно последица везивања додатих калцијумових јона за молекуле лизозима млека магарице. Тим везивањем се искључује могућност инхибиторног дејства повећане концентрације јона калцијума на евентуално синергистичко дејство лизозима и лактоферина. Ellison и Giehl (1991) су у свом истраживању користили хумани лизозим који припада *c*-типу лизозима (Inaka и сар., 1991) и који нема способност везивања јона калцијума. Упркос томе што оба тестирана соја *E. coli* припадају „smooth“ бактеријским сојевима, већу осетљивост на антибактеријско дејство млека магарице показао је сој *E. coli* ATCC 8739. Узрок томе би можда могла бити различита дужина ланца олигосахаридног језгра њиховог *LPS* слоја. Иако подаци о дужини ланца олигосахаридног језгра *LPS* слоја сојева *E. coli* ATCC 8739 и *E. coli* ATCC 10536 нису доступни, ова могућност се не треба искључити. Applemelk и сар., (1994) су констатовали да са повећањем дужине ланца олигосахаридног језгра *LPS* слоја расте степен инхибиције везивања лактоферина за липид А. За сатурацију липида А *LPS* слоја *E. coli* потребне су мале концентрације лактоферина, које су се према извештајима из литературе у зависности од соја *E. coli* налазиле у интервалу од 0,016 до 1,0 mg/l (Applemelk и сар., 1994). Из тог разлога се чак ни у узорцима у којима је лактоферин био испод границе детекције методе не може искључити допринос синергистичког деловања лизозима и лактоферина укупној антибактеријској активност млека магарице према тестираним сојевима *E. coli*.

Узорци млека магарице са јачом антибактеријском активношћу према *E. coli* ATCC 8739 (Табеле 50-52 и 57-59) генерално су имали већи садржај лактоферина у односу на остале испитиване узорке (Табела 49). Насупрот томе, у огледима са *E. coli* ATCC 10536 није утврђена веза између антибактеријске активности узорака млека магарице (Табеле 54-56 и 60-62) и садржаја лактоферина (Табела 53). Ове чињенице говоре у прилог томе да у случају *E. coli* ATCC 8739 постоји велика вероватноћа допунског доприноса самог лактоферина (осим синергизма са лизозимом) укупној антибактеријској активности млека магарице. Према наводима из литературе способност лактоферина да веже гвожђе из околне средине има за последицу инхибицију бактеријског раста (Jenssen и Hancock, 2009). Пошто је гвожђе есенцијални фактор раста бактерија, његово везивање за лактоферин чини га недоступним за бактерије. Управо би то могао бити још један начин деловања лактоферина према *E. coli* ATCC 8739, поготову што постоје извештаји других аутора који говоре о интеракцији овог протеина са поринима *OmpF* и *OmpL* *E. coli* који су у вези са механизмом искоришћења гвожђа (Erdei и сар., 1994). Иако је генерално антибактеријски потенцијал тестираних узорака млека магарице према одабраним сојевима *Salmonella* и *E. coli* био пропорционалан садржају калцијума, у оквиру ове тезе забележени су и неки изузеци. Тако је у огледима са *S. Typhimurium* на +9 °C у узорку 24 детектована антибактеријска активност слична оној у узорцима 23 и 22 (Табеле 35 и 36), упркос томе што је узорак 24 имао значајно већи садржај калцијума и лизозима (Табела 30). Један од узрока ове појаве би могао да се налази у сложености процеса трансформације лизозима из нативног облика у олигомерне форме (Malisauskas и сар., 2003), који значајно варира у зависности од експерименталних услова. Температура инкубирања је та која у првом реду одређује брзину трансформација лизозима, па је врло могуће да узорци млека магарице на +9 °C не покажу очекивану снажну антибактеријску активност чак и поред већег садржаја лизозима и калцијума. Такође је занимљиво да је узорак 6 на +15 °C показао јачу антибактеријску активност према *E. coli* ATCC 10536 у поређењу са узорком 28 (Табеле 61 и 62), иако је имао нижи садржај калцијума и лизозима (Табела 53). С обзиром да и *S. Typhimurium* ATCC 14028 и *E. coli* ATCC 10536 припадају „smooth“ бактеријским сојевима забележена одступања би могла бити последица саме природе узорака млека, у смислу њеног утицаја на везивање

лактоферина за *LPS* слој ових бактерија. Према извештајима из литературе интеракција лактоферина са *LPS* слојем је доминантно електростатичке природе и условљена је јонском јачином средине (Applemelk и сар., 1994). Осим од садржаја јона калцијума, та интеракција је зависна и од концентрације јона магнезијума и гвожђа (Ellison и Giehl, 1991). Без обзира на то што садржај ових метала није био предмет испитивања ове докторске дисертације, могуће је да је њихова концентрација (односно концентрација њихових јона) била један од разлога одступања у погледу антибактеријске активности поменутих узорака млека магарице. На пример уколико је узорак 28 имао повећану концентрацију јона магнезијума и/или гвожђа, ти јони су могли да се вежу на ајонске зоне *LPS* слоја, неутралишу њихово наелектрисање и тиме у извесној мери инхибирају интеракцију катјонских зона лактоферина са *LPS* слојем. На тај начин би у узорку 28, без обзира на већи садржај калцијума који обезбеђује већи удео линеарних протофиламената лизозима, био инхибиран допунски антибактеријски механизам млека магарице.

У доступној научној литератури се не могу пронаћи подаци о антибактеријском деловању млека магарице према *K. pneumoniae*, делом вероватно и због тога што су истраживања антимикробне активности млека магарице генерално јако лимитирана. Исто тако, нису доступни ни подаци о евентуалној антибактеријској активности лизозима или лактоферина из млека магарице према овом плућном патогену. Са друге стране, постоје извештаји о бактерицидном дејству других лизозима према *K. pneumoniae*, укључујући и кобиљи лизозим (Markart и сар., 2004; Bruhn и сар., 2011). Међутим, не наводи се много о самом механизму тог дејства. С обзиром да је у оквиру ове докторске дисертације утврђено да су узорци млека магарице са већим садржајем лактоферина показали снажније антибактеријско дејство према *K. pneumoniae*, овде је највероватније у питању антибактеријски синергизам лизозима и лактоферина према овом клиничком соју. Претходним истраживањима је утврђено да хумани лизозим преко својих катјонских зона има способност директног везивања за липид А *LPS* слоја спољашње мембране *K. pneumoniae* (Applemelk и сар., 1994). То за последицу има инхибицију или потпуни престанак бактеријског раста. Чињеница да су узорци млека магарице са малим садржајем лактоферина, као и они узорци у којима је овај протеин био испод границе детекције методе ипак показали антибактеријску активност (Табела 74), могла би да се објасни тиме што су за

сатурацију липида А *LPS* слоја *K. pneumoniae* потребне мале концентрације лактоферина. Оне су се у зависности од соја *K. pneumoniae* налазиле у интервалу од 0,125 до 1,0 mg/l (Applemelk и сар., 1994). Пошто у овим истраживањима није утврђена међузависност садржаја калцијума и антибактеријске активности млека магарице према *K. pneumoniae*, највероватније је да забележена инхибиција раста *K. pneumoniae* није последица трансформације лизозима у линеарне протофиламенте, већ да се у овом случају антибактеријска активност базира на синергистичком деловању лизозима и лактоферина.

5. ЗАКЉУЧАК

На основу резултата добијених у овој докторској дисертацији изведени су следећи закључци:

- Присуство *L. monocytogenes* и *Salmonella* spp. није утврђено ни у једном од 137 испитаних узорака сировог млека магарице, док је број *E. coli*, колиформних бактерија, Enterobacteriaceae, квасаца и плесни и суспектног *B. cereus* био испод границе детекције методе. Укупан број микроорганизама у сировом млеку магарице се налазио у интервалу од $0,8 \pm 0,1$ до $4,6 \pm 0,02$ log cfu/ml, а број бактерија млечне киселине у опсегу од $0,3 \pm 0,0$ до $2,54 \pm 0,01$ log cfu/ml. Бактерије млечне киселине нису детектоване у четири узорка овог млека. Аеробне спорогене бактерије су у броју од 1,08 до 1,39 log cfu/ml биле присутне у шест од 137 испитаних узорака сировог млека магарице, док су само два узорка била позитивна на сулфиторедукујуће клостридије. У оба случаја њихов број је био мањи од 1,0 log cfu/ml. У 37,23% испитаних узорака сировог млека магарице регистровано је присуство коагулаза позитивних стафилокока, чији број се кретао у интервалу од $1,0 \pm 0,0$ до $2,62 \pm 0,02$ log cfu/ml.
- Збирни узорци сировог млека магарице узорковани 2011. године су након три дана складиштења на +4 °C задовољавали захтеве европске регулативе ЕС 853/2004 за сирово млеко намењено директном конзумирању, за разлику од збирних узорака млека магарице из 2012. и 2013. године који су током свих 6 дана складиштења на +4 °C били у складу са овом регулативом.
- Сви испитани узорци сировог млека магарице балканске расе су задовољавали захтеве европских регулатива 92/46/ЕЕС и ЕС 853/2004 и са микробиолошког аспекта су у потпуности били безбедни за директно конзумирање без претходне топлотне обраде. Резултати добијени у овој докторској дисертацији су указали на то да је за млеко магарице намењено директном конзумирању неопходно установити нове микробиолошке критеријуме прихватљивости или евентуално преузети критеријуме дефинисане за сирово кравље млеко.
- Сирово млеко магарице балканске расе је показало различиту антибактеријску активност према Грам позитивним и Грам негативним бактеријским сојевима

тестираним у оквиру ове докторске дисертације. Антибактеријска активност сировог млека магарице према *L. monocytogenes* и *S. aureus* се на свим радним температурама састојала од продужења лаг фазе и инхибирања бактеријског раста, док се у случају *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* ATCC 10536 и *K. pneumoniae* она огледала у редукцији њиховог иницијалног броја и/или продужењу лаг фазе. Интензитет те редукције и време трајања лаг фазе су били одређени експерименталним условима и природом самих узорака млека.

- Интензитет антибактеријске активности млека магарице балканске расе према свим испитаним бактеријама је био условљен нивоом контаминације узорака млека тестираним патогеном и температуром инкубирања.
- Код већине испитаних узорака млека магарице повећање нивоа контаминације је значило скраћење лаг фазе и повећање броја тестираних патогена детектованих на крају инкубирања. Сходно томе, са повећањем нивоа контаминације у огледима са *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* ATCC 10536 и *K. pneumoniae*, смањивао се број узорака у којима су тестиране бактерије по завршетку инкубирања биле испод границе детекције.
- Уколико се посматрају просечне вредности промене броја тестираних микроорганизама у млеку магарице током трајања огледа, закључује се да је температура инкубирања од +15 °C била генерално повољнија за активност антибактеријских супстанци у млеку магарице према свим тестираним патогенима, у поређењу са температуром од +9 °C. Међутим, антибактеријски потенцијал узорака млека магарице на +15 °C био лимитиран бржим умножавањем испитаних бактерија на овој температури инкубирања. То је посебно важило за узорке са већим нивоима контаминације (10^3 и 10^4 cfu/ml) у којима је после извесног времена дошло до слабљења антибактеријске активности и регистравања већег броја тестираних бактерија на крају инкубирања у односу на огледе спроведене на +9 °C. Према томе, утицај температуре инкубирања на антибактеријску активност млека магарице према тестираним бактеријским сојевима се не није могао посматрати одвојено од нивоа контаминације испитаним бактеријама.

- Резултати ове докторске дисертације су указали на калцијум зависну природу антибактеријске активности сировог млека магарице према *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* и оба тестирана соја *E. coli*. У складу са тим, по завршетку инкубирања највећи степен редукције њихових бактеријских ћелија забележен је у узорцима млека магарице са највећим концентрацијама овог метала. Насупрот томе, у овој докторској дисертацији није утврђена веза између антибактеријске активности млека магарице према *L. monocytogenes*, *S. aureus* и *K. pneumoniae* и садржаја калцијума.
- Различити сојеви исте бактеријске врсте, односно различите врсте истог рода су у овој докторској дисертацији показале различиту осетљивост на антибактеријско деловање млека магарице. Тако се *S. Typhimurium* на температурама инкубирања од +9 и +38 °C, као и на +15 °C у узорцима са најнижим нивоом контаминације (10^2 cfu/ml), показала осетљивијом на антибактеријско деловање млека магарице у односу на *S. Enteritidis*, што је био случај и са *E. coli* ATCC 8739 у поређењу са *E. coli* ATCC 10536. Међутим, у узорцима млека са већим нивоима контаминације (10^3 и 10^4 cfu/ml) у огледима на +15 °C регистрован је обрнут случај. Разлог томе је вероватно брже умножавање *E. coli* ATCC 8739 и *S. Typhimurium* на +15 °C у односу на *E. coli* ATCC 10536 и *S. Enteritidis*. Већа брзина умножавања поменутих бактеријских сојева, потпомогнута релативно великим иницијалним бројем, вероватно је проузроковала бржу потрошњу антибактеријског потенцијала тестираних узорака млека магарице на овој температури, па је након четири дана инкубирања у узорцима млека магарице углавном бележен већи број *S. Typhimurium* и *E. coli* ATCC 8739 у односу на *S. Enteritidis* и *E. coli* ATCC 10536, иако то није био случај након 24, 48 и/или 72 сата инкубирања.
- Зависност антибактеријске активности тестираних узорака млека магарице према *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* ATCC 10536, *L. monocytogenes* и *S. aureus* од садржаја лактоферина у овој докторској дисертацији није доказана. Изузетак би могао бити оглед са *E. coli* ATCC 8739 на +15 °C, где су узорци са најснажнијим антибактеријским потенцијалом поред великог садржаја калцијума и лизозима имали и највећи садржај лактоферина. У овом случају се евентуални допринос овог ензима укупној антибактеријској активности млека магарице не може

искључити. Са друге стране, антибактеријска активност испитаних узорака млека магарице према *K. pneumoniae* је била условљена концентрацијом лактоферина.

- Стриктна корелација антибактеријске активности узорака млека магарице и садржаја лизозима такође није утврђена у овој докторској дисертацији. Међутим, највећи степен инхибиције раста *L. monocytogenes* и *S. aureus* у огледу на +15 °C, забележен је у узорцима са садржајем лизозима већим од 3 g/l. У огледу са *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* и *E. coli* ATCC 8739 на +15 °C најснажнију антибактеријску активност показали су узорци млека који су осим великог садржаја калцијума имали и велики садржај лизозима. То је био случај и са *E. coli* ATCC 8739 и *E. coli* ATCC 10536 у огледима на +9 °C. Због тога је под овим експерименталним условима било тешко дати предност утицају садржаја калцијума на антибактеријску активност млека магарице у односу на директан утицај саме концентрације лизозима. Ипак, чињеница је да је узорак са најмањим садржајем калцијума (466,10 mg/l) уједно показао и најслабије антибактеријско дејство према *E. coli* ATCC 8739. У огледима на +15 °C при већим нивоима контаминације (10^3 и 10^4 cfu/ml), узорци са највећим садржајем лизозима су показали најснажнију антибактеријску активност према *K. pneumoniae*.
- Лизозим је највероватније главни носилац антибактеријске активности млека магарице балканске расе, обзиром да је у односу на други антимикуробни агенс – лактоферин у тестираним узорцима млека магарице детектован у вишеструко већој концентрацији. Обзиром на утврђену калцијум зависну природу антибактеријске активности тестираних узорака млека магарице према *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *E. coli* ATCC 8739 и *E. coli* ATCC 10536, врло је могуће да је детектована антибактеријска активност последица способности лизозима млека магарице да везивањем јона калцијума из млека мења своју структуру (формира линеарне протофиламенте) и на тај начин унапређује антибактеријску активност према поменутиим Грам негативним бактеријама. Одсуство зависности антибактеријске активности млека магарице према *K. pneumoniae* од садржаја калцијума у тестираном млеку, упућује на другачији механизам антибактеријског деловања млека магарице према овом клиничком изолату у односу на друге тестиране Грам негативне бактерије. У овом случају би основни механизам антибактеријског деловања млека магарице могао бити синергизам лизозима и лактоферина. Слаба

антибактеријска активност млека магарице према Грам позитивним *L. monocytogenes* и *S. aureus* забележена на температури инкубирања од +9 °C, могла би да указује на ензиматско антибактеријско деловање лизозима према овим патогеним бактеријама. Известан допринос антибактеријској активности млека магарице балканске расе према *L. monocytogenes* и *S. aureus* могле би да дају и масне киселине са документованим антибактеријским дејством према Грам позитивним бактеријама (линолна, лауринска и олеинска киселина), које су у анализираним узорцима млека магарице у збиру чиниле од 40,3 до 54,7% од укупних масних киселина.

- Антибактеријска активност млека магарице балканске расе утврђена у овој докторској дисертацији, уз добру микробиолошку слику узорака сировог и складиштеног млека, представља потпору становишту да се млеко магарице може безбедно конзумирати без претходне топлотне обраде. Исто тако, резултати испитивања антибактеријске активности су показали да антибактеријски потенцијал узорака сировог млека магарице није неограничен, тако да је неопходно испунити све хигијенске стандарде током муче, манипулације и складиштења овог млека. Утврђени антибактеријски потенцијал млека магарице балканске расе отвара могућност његове примене као функционалног састојка у формулацији разних врста прехранбених производа, а такође упућује и на евентуалну могућност његове примене у лечењу пнеумонија плућа. Осим тога, подаци о микробиолошком квалитету сировог млека магарице и његовом антибактеријском деловању, у великој мери могу допринети бољој процени ризика и анализи биолошких опасности приликом увођења *HACCP*-а, који би допринео унапређењу производње млека магарице високог квалитета и безбедности.

6. ЛИТЕРАТУРА

- Adlerova, L., Bartoskova, A., Faldyna, M. (2008). Lactoferrin: a review. *Veterinarni Medicina*, 53 (9), 457–468.
- Aganga, A. A., Aganga, A. O., Thema, T., Obocheleng, K. O. (2003). Carcass analysis and meat composition of the donkey. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2, 138–147.
- Agnihotri, M. K. & Pal, U. K. (1996). Quality and shelf-life of goat milk Paneer in refrigerated storage. *Small Ruminant Research*, 20, 75–81.
- Alabiso, M., Giosue, C., Alicata, M. L., Mazza, F., Iannolino, G. (2009). The effects of different milking intervals and milking times per day in jennet milk production. *Animal*, 3 (4), 543–547.
- Alberghini, L., Catellani, P., Norbiato, M. A., Giaccone, V. (2012). Microbial status of donkey's milk: first results. *Italian Journal of Food Safety*, 1 (3), 7–10.
- Amagliani, G., Petruzzelli, A., Omiccioli, E., Tonucci, F., Magnani, M., Brandi, G. (2012). Microbiological surveillance of a bovine raw milk farm through multiplex real-time PCR. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9, 1–6.
- Amati, L., Marzulli, G., Martulli, M., Tafaro, A., Jirillo, F., Pugliese, V., Martemucci, G., D'Alessandro, A. G., Jirillo, E. (2010). Donkey and goat milk intake and modulation of the human aged immune response. *Current Pharmaceutical Design*, 16, 864–869.
- Andelković, S. (2010). *Bakterijski uzročnici mastitisa u krava*. [приступљено 20.05.2015]; Доступно: <http://bib.irb.hr/prikazi-rad?lang=en&rad=496874>
- АОАС, Званична метода 963.22, Метил естри масних киселина у уљима и мастима. Washington, 2000.
- Applemelk, B. J., An, Y. Q., Geerts, M., Thijs, B. G., De Boer, H. A., Maclaren, D. M., De Graaff, J., Nuijens, J. H. (1994). Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infection and Immunity*, 62 (6), 2628–2632.
- Aubry, C., Goulard, C., Nahori, M. A., Cayet, N., Decalf, J., Sachse, M., Boneca, I. G., Cossart, P., Dussurget, O. (2011). OatA, a peptidoglycan O-acetyltransferase involved in *Listeria monocytogenes* immune escape, is critical for virulence. *Journal of Infectious Disease*, 204 (5), 731–740.
- Barbioli, A., Bonomi, F., Capretti, G., Iametti, S., Manzoni, M., Piergiovanni, L., Rollini, M. (2012). Antimicrobial activity of lysozyme and lactoferrin incorporated in cellulose-based food packaging. *Food Control*, 26, 387–392.
- Baumslag, N. (1986). Breastfeeding: cultural practices and variations. *Human lactation*, 2, 621–642.

- Baylis, C., Uyttendaele, M., Joosten H., Davies A. (2011). *The Enterobacteriaceae and their significance to the food industry*. [приступљено 20.05.2015]; Доступно: <http://www.ilsa.org/Europe/Documents/EP%20Enterobacteriaceae.pdf>
- Beckers, H. J., Soentoro, P. S. S., Delgon-van Asch, E. H. M. (1987). The occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses and raw milk and its resistance to heat. *International Journal of Food Microbiology*, 4 (3), 249–256.
- Beghelli, D., Roscini, A., Valiani, A., Vincenzetti, S., Cavallucci, C., Polidori, P. (2009). Somatic (CSS) and differential cell count (DCC) during a lactation period in ass' milk. *Italian Journal of Animal Science*, 8 (2), 691–693.
- Beghelli, D., Vincenzetti, S., Micozzi, D., Vita, V., Polidori, P. (2011). Antioxidant properties of donkey milk, *Italian Journal of Animal Science*, 48 (10), supplement 1, C-112.
- Benkerroum, N. (2008). Antimicrobial activity of lysozyme with special relevance to milk. *African Journal of Biotechnology*, 7 (25), 4856–4867.
- Bera, A., Herbert, S., Jakob, A., Vollmer, W., Friedrich Gatz, F. (2005). Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 55 (3), 778–787.
- Bidasolo, I. B., Ramos, M., Gomez-Ruiz, J. A. (2012). In vitro simulated gastrointestinal digestion of donkeys' milk. Peptide characterization by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *International Dairy Journal*, 24, 146–152.
- Boneca, I. G., Dussurget, O., Cabanes, D., Nahori, M. A., Sousa, S., Lecuit, M., Psylinakis, E., Bouriotis, V., Hugot, J. P., Giovannini, M., Coyle, A., Bertin, J., Namane, A., Rouselle, J. C., Cayet, N., Prévost, M. C., Balloy, V., Chignard, M., Philpott, D. J., Cossart, P., Girardin, S. E. (2011). A critical role for peptidoglycan N-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the USA*. 104 (3), 997–1002.
- Brew, K. (2003). α -Lactalbumin. In P. F. Fox & P. L. H. McSweeney (Eds), *Advanced Dairy Chemistry* (3rd ed.) (pp. 387–419). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Brisse, S., Grimont, F., Grimont, P. A. D. (2006). The genus *Klebsiella*. *Prokaryotes*, 6, 159–196.
- Bruhn, O., Grötzinger, J., Cascorbi, I., Jung, S. (2011). Antimicrobial peptides and proteins of the horse - insights into a well-armed organism. *Veterinary Research*, 42 (98), 1–22.
- Bucchini, L. (2012). Italy's experience liberalizing raw milk sales. [приступљено 16.07.2014]; Доступно: http://www.foodsafetynews.com/2012/04/italys-experience-with-liberalizing-raw-milk-sales-cant-put-the-genie-back-in-the-bottle/#.U8Y_25R_sQo
- Burke, T. P., Loukitcheva, A., Zemansky, J., Wheeler, R., Boneca, I. G., Portnoy, D. A. (2014). *Listeria monocytogenes* is resistant to lysozyme through the regulation, not the acquisition, of cell wall-modifying enzymes. *Journal of Bacteriology*, 196 (21). 3756–3767.

Businco, L., Giampietro, P. G., Lucenti, P., Lucaroni, F., Pini, C., Di Felice, G., Lacovacci, P., Curadi, C., Orlandi, M. (2000). Allergenicity of mare's milk in children with cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105, 1031–1034.

Callewaert, L. & Michiels, C. W. (2010). Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Biosciences*, 35 (1), 127–160.

Carminati, D., Tidona, F., Fornasari, M. E., Rossetti, L., Meucci, A., Giraffa, G. (2014). Biotyping of cultivable lactic acid bacteria isolated from donkey milk. *Letters in Applied Microbiology*, 59 (3), 299–305.

Caron J., Larivière L., Nacache M., Tam M., Stevenson M. M., McKerly C., Gros P., Danielle Malo, D. (2006). Influence of Slc11a1 on the outcome of *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection in mice is associated with Th polarization. *Infection and Immunity*, 74, 2787-2802.

Carroccio, A., Cavataio, F., Iacono, G. (1999). Cross-reactivity between milk proteins of different animals. *Clinical and Experimental Allergy*, 29, 1014–1016.

Carroccio, A., Cavataio, F., Montaldo, G. D., Amico, D., Alabrese, L., Iacono, G. (2000). Intolerance to hydrolyzed cow's milk protein in infants: Clinical characteristics and dietary treatment. *Clinical and Experimental Allergy*, 30, 1597–1603.

Cavallarin, L., Giribaldi, M., Rio, M. D. S-D., Valle, E., Barbarino, G., Gennero, M. S., Civera, T. (2015). A survey on the milk chemical and microbiological quality in dairy donkey farms located in NorthWestern Italy. *Food Control*, 50, 230–235.

Chambers, J. V. (2002). The microbiology of raw milk. In R. K. Robinson (Ed.), *Dairy microbiology handbook: The microbiology of milk and milk products*, (3rd ed) (pp. 39–91). John Wiley and Sons, Inc. New York, USA.

Chaneton, L., Pérez Sáez, J. M., Bussmann, L. E. (2011). Antimicrobial activity of bovine β -lactoglobulin against mastitis-causing bacteria. *Journal of Dairy Science*, 94, 138–145.

Chatterton, D. E. W., Rasmussen, J. T., Heegaard, C. W., Sørensen, E. S., Petersen, T. E. (2004). In vitro digestion of novel milk protein ingredients for use in infant formula: research on biological functions. *Food Science and Technology*, 15, 373–383.

Chawner, J. A. & Gilbert, P. (1989). Adsorption of alexidine and chlorhexidine to *Escherichia coli* and membrane components. *International Journal of Pharmaceutics*, 55, 209–215.

Chiavari, C., Coloretti, F., Nanni, M., Sorrentino, E., Grazia L. (2005). Use of donkey's milk for a fermented beverage with lactobacilli. *Lait*, 85, 481–490.

Chiofalo, B., Salimei, E., Chiofalo, L., (2001). *Ass's milk: exploitation of an alimentary resource*. [приступљено 14.07.2015];

Доступно: <http://www.atnesa.org/donkeydocuments/Chiofalo-et-al-2001-donkeymilk-EN.pdf>

- Christensen, T., Gooden, D. M., Kung, J. E., Toone, E. J. (2003) Additivity and the physical basis of multivalency effects: A thermodynamic investigation of the calcium EDTA interaction. *Journal of American Chemical Society*, 125, 7357–7366.
- Christiansson, A., Bertilsson, J., Svensson, B. (1999). *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *Journal of Dairy Science*, 82 (2), 305–314.
- Chye, F.Y., Abdullah, A., Khan, M. (2004). Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiology*, 21, 535–541.
- Claeys, W. L., Cardoen, S., Daube, G., De Block, J., Dewettinck, K., Dierick, K., De Zutter, L. (2013). Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control*, 31, 251–262.
- Claeys, W. L., Verraes, C., Cardoen, S., De Block J., Huyghebaert A., Raes, K., Dewettinck, K., Herman L. (2014). Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control*, 42, 188–201.
- Clare, D. A., Catignani, G. L., Swaisgood, H. E. (2003). Biodefense properties of milk: the role of antimicrobial proteins and peptides. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1239–1255.
- Conte, F., Scatassa, M. L., Monsu, G., Lo Verde, V., Finocchiaro, A., De Fino, M. (2006). *Monitoring of safety and quality of donkey's milk*. [приступљено 15.07.2014]; Доступно: http://books.google.rs/books?hl=en&lr=&id=uyhIRD4vTB0C&oi=fnd&pg=PA265&dq=donkey+milk+microbiology+&ots=Jil12jEX7&sig=XQdtm_ecUQejBypUyXxTfRYruMw&redir_esc=y#v=onepage&q=donkey%20milk%20microbiology&f=false
- Coppola, R., Salimei, E., Succi, M., Sorrentino, E., Nanni, M., Ranieri, P. (2002). Behaviour of *Lactobacillus rhamnosus* strains in ass's milk. *Annals of Microbiology*, 52, 55–60.
- Cosentino, R. P., Freschi, P., Calluso, A. M. (2012). Short communication: Jenny milk production and qualitative characteristics. *Journal of Dairy Science*, 95, 2910–2915.
- D'aoust, J. Y. (1985). Infective dose of *Salmonella typhimurium* in cheddar cheese. *American Journal of Epidemiology*, 122, 717–720.
- De Wit, J. N. (1998) Marschall Rho^{ne}-Poulenc award lecture. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science*, 81, 597–608.
- Delgado-Pertinez, M., Alcalde, M. J., Guzman-Guerrero, J. L., Castel, J. M., Mena, Y., Caravaca, F. (2003). *Small Ruminant Research*, 47 (1), 51–61.
- Demmer, J., Ross, I. K., Ginger, M. R., Piote, C. K., Grigor, M. R. (1998). Differential expression of milk protein genes during lactation in the common brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Journal of Molecular Endocrinology*, 20, 37–44.
- Desmasures, N., Bazin, F., Gueguen, M. (1997). Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camambert region of Normandy. *Journal of Applied Microbiology*, 83 (1), 53–58.

Desmet, J., Van Dael, H., Van Cauwelaert, F., Nitta, K., Sugai, S. (1989). Comparison of the binding of Ca^{2+} and Mn^{2+} to bovine α -lactalbumin and equine lysozyme. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 37, 185–191.

Diarra, M. S., Petitclerc, D., Lacasse, P. (2002). Effect of lactoferrin in combination with Penicillin on the morphology and the physiology of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 85 (5), 1141–1149.

Dilika, F., Bremner, P. D., Meyer, J. J. M. (2000). Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from *Helichrysum pedunculatum*: a plant used during circumcision rites. *Fitoterapia*, 71, 450–452.

Driehuis, F. (2013). Silage and the safety and quality of dairy foods: a review. *Agricultural and food science*, 22, 16–34.

EC, Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products, *Official Journal of the European Communities*, No L 125, 10–32 (1996).

EC, Regulation No 853/2004 of the European Parliament and of the council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Official Journal of the European Union*, L 139, 22–82 (2004).

EC, Regulation No 852/2004 of the European Parliament and of the council of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, (OJ L 139, 30.04.2004, P.1), 1–23 (2004).

EC, Commission Regulation No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L338, 1–26 (2005).

EEC, Council Regulation No 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Communities*, No L 224, 1–8 (1990).

EEC, Council Directive 92/46/EEC of 16 June 1992 laying down the health rules for the production and placing on the market of raw milk, heat-treated milk and milk-based products. [приступљено 20.05.2015]; Доступно: http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/mr/mr03_en.pdf

EFSA (2015). *Salmonella*. European Food Safety Authority. [приступљено 20.05.2015]; Доступно: [http://www.reachcompliance.eu/greek/documents/links/european union/EFSA.html](http://www.reachcompliance.eu/greek/documents/links/european_union/EFSA.html)

El-Diasty, E. M. & El-Kaseh, R. M. (2009). Microbiological monitoring of raw milk and yoghurt samples collected from El-Beida city. *Arab Journal of Biotechnology*, 12, (1), 57–64.

Ellison, R. T. & Giehl, T. J. (1991). Killing of Gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme, 88 (4), *Journal of Clinical Investigation*, 1080–1091.

- Elmoslemany, A. M., Keefe, G. P., Dohoo, I. R., Dingwell, R. T. (2009). Microbiological quality of bulk tank raw milk in Prince Edward Island dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 92 (9), 4239–4248.
- El Zubeir, I. E. M. & Ahmed, M. I. A. (2007). The hygienic quality of raw milk produced by some dairy farms in Khartoum State, Sudan. *Research Journal of Microbiology*, 2 (12), 988–991.
- Erdei, J., Forsgren, A., A. S. Naidu, A. S. (1994). Lactoferrin binds to porins OmpF and OmpC in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 62 (4), 1236–1240.
- Fantuz, F., Vincenzetti, S., Polidori, P., Vita, A., Polidori, F., Salimei, E. (2001). Study on the protein fractions of donkey's milk. Proceedings of the XIV A.S.P.A. Congress 635–637.
- Fantuz, F., Ferraro, S., Todini L., Piloni, R., Mariani, P., Salimei, E. (2012). Donkey milk concentration of calcium, phosphorus, potassium, sodium and magnesium. *International Dairy Journal*, 24, 143–145.
- FAO & IDF. (2011). Guide to good dairy farming practice. *Animal Production and Health Guidelines No. 8*. Food and Agriculture Organization of the United Nations and International Dairy Federation, Rome, Italy.
- Farber, J. M. & Peterkin., P. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55 (3), 476–511.
- Farber, J. M., Rossb, W. H., Harwig, J. (1996). Health risk assessment of *Listeria monocytogenes* in Canada. *International Journal of Food Microbiology*, 30, 145–156.
- Farnaud, S. и Evans, R. W. (2003). Lactoferrin-a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology*, 40, 395–405.
- Farrell, H. M. Jr., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Hicks, C. L., Holler, C. M., Ng-Kwai-Huang, K. F., Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk – sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87, 1641–47.
- Faye, B. & Konuspayeva, G. (2012). The sustainability challenge to the dairy sector – The growing importance of non-cattle milk production worldwide. *International Dairy Journal*, 24, 50–56.
- Fernando, P. & Starkey, P. (2000). *Donkeys and development: socio-economic issues in the use and management of donkeys*. [приступљено 20.05.2015]; Доступно: <http://www.atnesa.org/donkeys/donkeys-fernando-socioeconomic.pdf>
- Fields, P. I., Swanson, R. V., Haidaris, C. G., Heffron, F. (1986). Mutants of *Salmonella* Typhimurium that cannot survive the macrophage are virulent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 83, 5189–5193.
- Finkelstein, R. A., Sciortino, C. V., McIntosh, M. A. (1983). The role of iron in microbe-host interactions. *Reviews of Infectious Disease*, 5 (4), 759–777.

- Fleet, G. H. (1990). Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Microbiology*, 68 (3), 199–211.
- Floris, R., Recio, I., Berkhout, B., Visser, S. (2003). Antibacterial and antiviral effects of milk proteins and derivatives thereof. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1257–1275.
- Foschino, R., Invernizzi, A., Barucco, R., Stradiotto, K., (2002). Microbial composition including the incidence of pathogens of goat milk from bergamo region of Italy during lactation year. *Journal of Dairy Research*, 69 (2), 213–225.
- Franciosi, E., Settani, L., Cavazza, A., Poznanski, E. (2009). Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal*, 19, 3–11.
- Galbraith, H. и Miller, T. B. (1973). Effect of metal cations and pH on the antibacterial activity and uptake of long chain fatty acids. *Journal of Applied Bacteriology*, 36 (4), 635–646.
- Galbraith, H., Miller, T. B., Paton, A. M., Thompson, J. K. (1971). Antibacterial Activity of Long Chain Fatty Acids and the Reversal with Calcium, Magnesium, Ergocalciferol and Cholesterol. *Journal of Applied Bacteriology*, 34 (4), 803–813.
- Gapper, L., Copestake, D., Otter, D., Indyk, H. (2007). Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum and dietary supplements: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389 (1). 93–109 .
- Gastaldi, D., Bertino, E., Monti, G., Baro, C., Fabris, C., Lezo, A., Medana, C., Baiocchi, C., Mussap, M., Galvano, F., Conti, A. (2010). Donkey's milk detailed lipid composition. *Frontiers in Bioscience*, E2, 537–546.
- Gaya, P., Medina, M., Nunez, M. (2008). Enterobacteriaceae, coliforms, faecal coliforms and Salmonellas in raw ewe's milk. *Journal of applied microbiology*, 62 (4), 321–326.
- Giuffrida, M. G., Cantisani, A., Napoletano, L., Conti, A., Godovac-Zimmerman, J. (1992). The amino-acid sequence of two isoforms of α -lactalbumin from donkey (*Equus asinus*) milk is identical. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 373, 931–935.
- Godič Torkar, K. & Golc Teger, S. (2008). The microbiological quality of raw milk after introducing the two day's milk collecting system. *Acta agriculturae Slovenica*, 92 (1), 61–74.
- Godič Torkar, K. & Vengušt, A. (2008): The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control*, 19 (6), 570-577.
- Guo, H. Y., Pang, K., Zhang, X. Y., Zhao, L., Chen, S. W., & Dong, M. L. (2007). Composition, physiochemical properties, nitrogen fraction distribution, and amino acid profile of donkey milk. *Journal of Dairy Science*, 90, 1635–1643.
- Haezebrouck, P., Noppe, W., Van Dael, H., Hanssens, I. (1992). Hydrophobic interaction of lysozyme and alpha-lactalbumin from equine milk whey. *BBA-Protein Struct M*, 1122, 305–310.

- Havemose, M., Weisbjerg, M., Bredie, W., Neilsen, J. (2004). Influence of feeding different types of roughage on the oxidative stability of milk. *International Dairy Journal*, 14, 563–570.
- Hempfen, M., Unger, F., Münstermann, S., Talla Seck, M., Niemy, V. (2004). The hygienic status of raw and sour milk from smallholder dairy farms and local markets and potential risk for public health in The Gambia, Senegal and Guinea. Animal Health Research Working Paper 3. URL. <http://www.itc.gm/downloads/animalhealthworkingpaperno3.pdf> Accessed: 25.05.2014.
- Herrouin, M., Mollé, D., Fauquant, J., Ballestra, F., Maubois, J. L., Léonil, J. (2000) New genetic variants identified in donkey's milk whey proteins. *Journal of Protein Chemistry*, 19, 105–115.
- Hill, B., Smythe, B., Lindsay, D., Shepherd, J. (2012). Microbiology of raw milk in New Zealand. *International Journal of Food Microbiology*, 157, 305–308.
- Hillerton, J. E. & Berry, E. A. (2004). Quality of the milk supply: European regulations versus practice. *NMC Annual Meeting Proceedings*, 207–214, [приступљено 15.07.2014]; Доступно: <http://www.nmconline.org/articles/qualityeuro.pdf>
- Hohmann, E. (2001). Nontyphoidal salmonellosis. *Clinical Infectious Diseases*, 32, 263–269.
- Hurley, W. L. (2003). Immunoglobulins in mammary secretions. In P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced dairy chemistry: Proteins* (3rd ed) (pp. 422–447). New York, NY, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Iacono, G., Carroccio, A., Cavataio, F., Montaldo, G., Soresi, M., & Balsamo, V. (1992). Use of ass's milk in multiple food allergy. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 14, 177–181.
- Ibrahim, H. R., Higashiguchi, S., Koketsu, M., Juneja, L. R., Kim, M., Yamamoto, T., Sugimoto, Y., Aoki, T. (1996). Partially unfolded lysozyme at neutral pH agglutinates and kills Gram-negative and Gram-positive bacteria through membrane damage mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3799–3806.
- Inaka, K., Taniyama, Y., Kikuchi, M., Morikawa, K., Matsushima, M. (1991). The crystal structure of a mutant human lysozyme C77/95A with increased secretion efficiency in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 266 (19), 12599–12603.
- Ivanković, A., Ramljak, J., Štulina, I., Antunac, N., Bašić, I., Kelava, N., Konjačić, M. (2009). Characteristics of the lactation, chemical composition and milk hygiene quality of the Littoral-Dinaric ass. *Mljekarstvo*, 59 (2), 107–113.
- Janković, V. V., Vukojević, J. B., Lakićević, B. M., Mitrović, R. R., Vuković, D. I. (2009). Presence of moulds and aflatoxin M1 in milk. *Зборник Матице српске за природне науке*, 117, 63–68.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A. (2005). *Modern Food Microbiology*, 7th Ed. (pp. 591–629). Springer Science + Business Media. New York, NY.

- Jayarao, B. M. & Wang, L. (1999). A study on the prevalence of Gram-negative bacteria in bulk tank milk. *Journal of Dairy Science*, 82, (12), 2620–2624.
- Jenssen, H. & Hancock, R. E. W. (2009). Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie*, 91, 19–29.
- Johansen, C., Gram, L., Meyer, A. S. (1994). The combined inhibitory effect of lysozyme and low pH on growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 57, 561–566.
- Kabara, J. J., Swieczkowski, D. M., Conley, A. J., Truant, J.P. (1972). Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2 (1), 23–28.
- Kondyli, E., Svarnas, C., Samelis, J., Katsiari, M. C. (2012). Chemical composition and microbiological quality of ewe and goat milk of native Greek breeds. *Small Ruminant Research*, 103, 194–199.
- Kongo, J. M, Gomes, A. P., Malcata, F. X. (2008). Monitoring and identification of bacteria associated with safety concerns in the manufacture of São Jorge, a Portuguese traditional cheese from raw cow's milk. *Journal of Food Protection*, 71 (5), 986–992.
- Korhonen, H. (1977). Antimicrobial factors in bovine colostrum. *Journal of the Scientific Agricultural Society of Finland*, 49, 434–447.
- Kothary, M. H. & Babu, U.S. (2001). Infective dose of foodborne pathogens in volunteers: a review. *Journal of Food Protection* 21 (1), 49–73.
- Kravić, S., Marjanović, N., Suturović, Z., Švarc-Gajić, J., Stojanović, Z., Pucarević, M. (2010). Determination of trans fatty acid content of Serbian shortening by gas chromatography-mass spectrometry. *Acta Alimentaria*, 39, 413–423.
- Kugler, W., Grunenfelder, H. P., Broxham, E. (2008). Donkey breeds in Europe: inventory, description, need for action, conservation: report 2007/2008. URL. <http://www.savefoundation.net/pdf/donkey.pdf> Accessed 15.03.12
- Laaberki, M. H., Pfeffer, J., Clarke, A. J., Dworkin, J. (2011). O-acetylation of peptidoglycan is required for proper cell separation and S-layer anchoring in *Bacillus anthracis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 286 (7), 5278–5288.
- Lee, D. G., Park, J. M., Kang, H., Hong, S. Y., Lee, K. R., Chang, H. B., Trujillo, M. E. (2013). *Asinibacterium lactis* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Chitinophagaceae*, isolated from donkey (*Equus asinus*) milk. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 3180–3185.
- Lendenbach, H. L. & Marshall, R. T. (2009). *Microbiological spoilage of dairy products*. In: W.H. Sperber, M.P. Doyle (eds.), *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages. Food Microbiology and Food Safety*, DOI 10.1007/978-1-4419-0826-1_2, C Springer Science+Business Media, LLC. pp. 41–67.
- Loir, Y. L., Baron, F., Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2 (1), 63–76.

- Lopez-Exposito, I., Gomez-Ruiz, J.A., Amigo, L., & Recio, I. (2006). Identification of antibacterial peptides from ovine alfa2-casein. *International Dairy Journal*, 16, 1072–1080.
- Lund, B. M. & O'Brien, S. J. (2011). The occurrence and prevention of foodborne disease in vulnerable people. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8, 961–973.
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A.M.P., Pintado, M.E., Malcata, F. X. (2007). Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40, 1197–1211.
- Maga, E. A., Anderson, G. B., Cullor, J. S., Smith, W., Murray, J. D. (1998). Antimicrobial properties of human lysozyme transgenic mouse milk. *Journal of Food Protection*, 1, 5–131.
- Maga, E. A., Cullor, J. S., Smith, W., Anderson, G. B., Murray, J. D. (2006). Human lysozyme expressed in the mammary gland of transgenic dairy goats can inhibit the growth of bacteria that cause mastitis and the cold-spoilage of milk. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3 (4), 384–392.
- Magnusson, M., Christiansson, A., Svensson, B., Kolstrup, C. (2006). Effect of different premilking manual teat-cleaning methods on bacterial spores in milk. *Journal of Dairy Science*, 89, 3866–3875.
- Malisauskas, M., Zamotin, V., Jass, J., Noppe, W., Dobson, C. M., Morozova-Roche, L. A. (2003). Amyloid protofilaments from the calcium-binding protein equine lysozyme: formation of ring and linear structures depends on pH and metal ion concentration. *Journal of Molecular Biology*, 330, 879–890.
- Marco, M. L. & Wells-Bennik, M. H. J. (2008). Impact of bacterial genomics on determining quality and safety in the dairy production chain. *International Dairy Journal*, 18, 486–495
- Mariani, P. L. (2010). *Donkey milk nutraceutical characteristics: a biochemical evaluation of nutritive and clinical properties*. [приступљено 12.12.2013]; Доступно: http://cameprints.unicam.it/284/1/Donkey_milk.pdf
- Mariani, P., Summer, A., Martuzzi, F., Formaggioni, P., Sabbioni, A., Catalano, A. L. (2001). Physicochemical properties, gross composition, energy value and nitrogen fractions of Haflinger nursing mare milk throughout 6 lactation months. *Animal Research*, 50, 415–425.
- Markart, P., Korfhagen, T. R., Weaver, T. E., Akinbi H. T. (2004). Mouse lysozyme M is important in pulmonary host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 169 (4), 454–458.
- Markiewicz-Keszycka, M., Wójtowski, J., Czyzak-Runowska, G., Kuczynska, B., Kamila Puppel, K., Krzyzewski, J., Strzalkowska, N., Józwik, A., Bagnicka, E. (2014). Concentration of selected fatty acids, fat-soluble vitamins and b-carotene in late lactation mares' milk. *International Dairy Journal*, 38, 31–36.
- Masschalck, B. & Michiels, C. W. (2003). Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 29, 191–214.

- Miranda, G., Mahé, M. F., Leroux, C., Martin, P. (2004). Proteomic tools to characterize the protein fractions of Equidae milk. *Proteomics*, 4, 2496–2509.
- Mølbak, K., Olsen, E. J., Wegener, H. C. (2006). *Salmonella* infections. In: H. P. Riemann and D. O. Cliver (Eds.). *Foodborne infections and intoxications*. 3rd Ed. Elsevier Inc. (pp. 57–115). Amsterdam. The Netherlands: Academic Press.
- Morgan, F., Massouras, T., Barbosa, M., Roseiro, L., Ravasco, F., Kandarakis, I., Bonnin, V., Fistakoris, M., Anifantakis, E., Jaubert, G., Raynal-Ljutovac, K. (2003). Characteristics of goat milk collected from small and medium enterprises in Greece, Portugal and France. *Small Ruminant Research*, 47, 39–49.
- Muehlherr, J. E., Zweifel, C., Corti, S., Blanco, J. E., Stephan, R. (2003). Microbiological quality of raw goat's milk and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. *Journal of Dairy Science*, 86 (12), 3849–3856.
- Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., Coppola, R. (2010). Isolation of components with antimicrobial property from the donkey milk: A preliminary study. *The Open Food Science Journal*, 4, 43–47.
- Nitta, K., Tsuge, H., Sugai, S., Shimazaki, K. (1987). The calcium-binding property of equine lysozyme. *FEBS Letters*, 223, 405–408.
- Noppe, W., Hanssens, I., De Cuyper, M. (1996) Simple two-step procedure for the preparation of highly active pure equine milk lysozyme. *Journal of Chromatography A*, 719, 327–331.
- Oftedal, O. T. & Jenness, R. (1988). Interspecies variation in milk composition among horses, zebras and asses (Perissodactyla: Equidae). *Journal of Dairy Research*, 55, 57–66.
- Oliveira, C. J. B., Hisrich, E. R., Moura, J. F. P., Givisiez, P. E. N., Costa, R.G., Gebreyes, W. A. (2011). On farm risk factors associated with goat milk quality in Northeast Brazil. *Small Ruminant Research*, 98, 64–69.
- Oscar, T. P. (2011). Development and validation of a predictive microbiology model for survival and growth of *Salmonella* on chicken stored at 4 to 12 °C, *Journal of Food Protection*, 74, 279–284.
- Park, Y. W., Juarez, M., Ramos, M., & Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, 88–113.
- Passantino, A. (2011). Welfare issues of donkey (*Equus asinus*): a checklist based on the five freedoms. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 6, 215–221.
- Pellegrini, A., Dettling, C., Thomas, U., Hunziker, P. (2001). Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1526, 131–140.

Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Hunziker, P., von Fellenberg, R. (1999). Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine α -lactalbumin molecule. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1426, 439–448.

Permyakov, S. E., Khokhlova, T. I., Nazipova, A. A., Zhadan, A. P., Morozova-Roche, L. A., Permyakov, E. A. (2006). Calcium-Binding and Temperature Induced Transitions in Equine Lysozyme: New Insights From the pCa–Temperature ‘Phase Diagrams’. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 65, 984–998.

Petrujkić, T., Trailović, D., Petrujkić, B., Magaš, V., Ljeskovac, N., Simić, S. (2011). Reprodukcijska i zdravstveno stanje domaćeg magarca u rezervatu Zasavica. Zbornik „Ishrana i patologija konja“, 188–193.

Pilla, R., Daprà, V., Zecconi, A., Piccinini, R. (2010). Hygienic and health characteristics of donkey milk during a follow-up study. *Journal of Dairy Research*, 77, 392–397.

Poppe, C. (2011). Diseases of Dairy Animals - Infectious Diseases: Salmonellosis. In: J. W. Fuquay, P. F. Fox & P. H. L. Sweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, (2nd ed.). Academic Press.

Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa (Službeni glasnik RS, broj 72/2010).

Pravilnik o pregledu sirovog mlijeka namijenjenog javnoj potrošnji (Narodne novine, broj 110/100) (2010). [приступљено 16.07.2014]; Доступно: <http://www.mps.hr/default.aspx?id=7585>

Public Health England (2013). [приступљено 16.07.2014]; Доступно: <http://www.phculturecollections.org.uk/products/bacteria/detail.jsp?refId=NCTC%2010418&collection=nctc>

Puntis, J. (2004). Infant feeding practices - past, present and future. [приступљено 04.04.2014]; Доступно: <http://www.dutchlady.com.my/bm/content/nutrition/articles/infant.pdf>

Qureshi, A. S. и Enbergs, H. (2012). Studies on the lysozyme activity in the milk of female donkeys (*Equus Asinus*) in relation to reproductive physiology. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 22 (2), 70–74.

Ramljak, J. (2010). *Mlijeko magarice-hrana ili lijek?*, [приступљено 15.07.2014]; Доступно: http://www.hmu.hr/index.php?option=com_content&id=180:mlijeko-magarice-hran.

Raw milk across the world (2012). [приступљено 16.07.2014]; Доступно: <http://rawmilkconsumer.ca/pdf/rawmilk-world-wide.pdf>

Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., Chilliard, Y. (2008). Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research*, 79, 57–72.

- Reyes, R. E., González, C. R., Jiménez, R. C., Herrera, M. O., Andrade, A. A. (2012). *Mechanisms of O-Antigen Structural Variation of Bacterial Lipopolysaccharide (LPS)*. [приступљено 04.04.2014]; Доступно: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/40579.pdf>
- Rodríguez, E., González, B., Gaya, P., Nuñez, M., Medina, M. (2000). Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 10, 7–15.
- Salimei, E. (2011). Animals that produce dairy foods - Donkey. In: J. W. Fuquay, P. F. Fox & P. H. L. Sweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, (2nd ed.). Academic Press.
- Salimei, E. и Chiofalo, B. (2006). Asses: milk yield and composition. In: N. Miraglia and W. Martin-Rosset (Eds.). *Nutrition and the feeding of the broodmare*. EAAP Publication No 120 (pp. 117-131). Wageningen. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Salimei, E., и Fantuz, F. (2012). Equid milk for human consumption. *International Dairy Journal*, 24, 130–142.
- Salimei, E., Fantuz, F., Coppola, R., Chiofalo, B., Polidori, P., Varisco, G. (2004). Composition and characteristics of ass's milk. *Animal Research*, 53, 67–78.
- Sarno, E., Santoro, A. M. L., Di Palo, R., Costanzo, N. (2012). Microbiological quality of raw donkey milk from Campania Region. *Italian Journal of Animal Science*, 11 (49), 266–269.
- Sarwar, A., Enbergs, H., Klug, E. (2001) Influences of parity, age and mineral and traceelement mixture on lysozyme activity in mare's milk during early lactation period. *Veterinarski Arhiv*, 71, 139–147.
- Scatassa, M. L., Carrozzo, A., Ducato, B., Giosuè, C., Miraglia, V., Arcuri, L., Mancuso, I. (2011). *Bacillus cereus*: isolation in jennet milk. *Italian Journal of Food Safety*, 1 (1), 243–246.
- Schaafsma, G. (2003). Nutritional significance of lactose and lactose derivatives. In H. Roginski, J. W. Fuquay & P. F. Fox (Ed.). *Encyclopedia of Dairy Science* (Vol. 3, pp. 1529–1533). London: Academic Press.
- Scherrer, D., Corti, S., Muehlherr, J. E., Zweifel, C., Stephan, R. (2004). Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. *Veterinary Microbiology*, 101 (2), 101–107.
- Schutz, M. & Ferree, M. (2012). *Raw Milk FAQs*. [приступљено 20.05.2015]; Доступно: <https://www.extension.purdue.edu/extmedia/AS/AS-612-W.pdf>
- Scintu, M. F. & Pirreda, G. (2007). Typicity and biodiversity of goat and sheep milk products. *Small Ruminant Research*, 68, 221–231.
- Škrinjar, M. & Tešanović, D. (2007). *Hrana u ugostiteljstvu i njeno čuvanje*. Izdavač: Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu. 20–24.

- Slauch, J. M. Mahan, M. J., Michetti, P., Neutra, M. R., Mekalanos, J. J. (1995). Acetylation (O-Factor 5) Affects the Structural and Immunological Properties of Salmonella typhimurium Lipopolysaccharide O Antigen. *Infection and Immunity*, 63 (2), 437–441.
- Sorrentino, E., Di Renzo T., Succi, M., Reale, A., Tremonte, P., Coppola, R., Salimei, E., Colavita, G. (2010). Microbiological characteristics of raw ass's milk: manual vs. machine milking. *Book of Abstracts of the 61st Annual Meeting of the European Association for Animal Production*, pp. 44. Wageningen Academic Publishers.
- Spreer, E. (1998). Milk and dairy product technology (p. 483). Dresden: Marcel Dekker Inc.
- Starkey, P., Starkey, M. (2000). *Regional and world trends in donkey populations*. [приступљено 07.04.2014]; Доступно: <http://ecoport.org/storedReference/559531.pdf>
- Summer, A., Sabbioni, A., Formaggioni, P., Mariani, P. (2004). Trend in ash and mineral element content of milk from Haflinger nursing mares throughout six lactation months. *Livestock Production Science*, 88, 55–62.
- Šarić, Lj., Šarić, B., Mandić, A., Torbica, A., Tomić, J., Cvetković, D., Okanović, Đ. (2012). Antibacterial properties of Domestic Balkan donkeys' milk. *International Dairy Journal*, 25, 142–146.
- Tadesse, T. (2010). Investigation on nutritional and microbiological properties of Abyssinian donkey milk from Adea Woreda. [приступљено 09.04.2014]; Доступно: <http://etd.aau.edu.et/dspace/bitstream/123456789/2103/1/106269243304001441109869231529309209426>
- Tafaro, A., Magrone, T., Jirillo, F., Martemucci, G., D'Alessandro, A. G., Amati, L., Jirillo, E. (2007). Immunological properties of donkey's milk: Its potential use in the prevention of atherosclerosis. *Current Pharmaceutical Design*, 13 (36), 3711–3717.
- Tasci, F. (2011). Microbiological and chemical properties of raw milk consumed in Burdur. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10 (5), 635–641.
- Tellez, A., Corredig, M., Turner, P. V., Morales, R., Griffiths, M., (2011). A peptidic fraction from milk fermented with *Lactobacillus helveticus* protects mice against *Salmonella* infection. *International Dairy Journal*, 21, 607–614.
- The Food Hygiene (England) Regulations* (2006). [приступљено 15.07.2014]; Доступно: http://www.legislation.gov.uk/ukxi/2006/14/pdfs/ukxi_20060014_en.pdf
- The Food Hygiene (Wales) Regulations* (2006). [приступљено 20.05.2015]; Доступно: http://www.legislation.gov.uk/wsi/2006/31/pdfs/wsi_20060031_mi.pdf
- The Food Safety File: Staphylococcus aureus* (2008). [приступљено 15.07.2014]; Доступно: http://www.fooddoctors.com/FSF/S_aureus.pdf
- Tidona, F., Sekse, C., Criscione, A., Jacobsen, M., Bordonaro, S., Marletta, D., Vegarud, G. E. (2011). Antimicrobial effect of donkeys' milk digested in vitro with human gastrointestinal enzymes. *International Dairy Journal*, 21, 158–165.

- Torbica, A., Živančev, D., Nikolić, Z., Đorđević, V., Nikolovski, B. (2010). The advantages of lab-on-a-chip method in determination of Kunitz trypsin inhibitor in soybean varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 7980–7985.
- Torkar, K. Godič & Vengušt, A. (2008). The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M₁ in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control*, 19 (6), 570–577.
- Trailović, R., Ivanov, S., Dimitrijević, V., Trailović, D. (2011). Eksterijerne karakteristike i zdravstveno stanje domaćeg magarca u parku prirode Stara planina. Zbornik „Ishrana i patologija konja“, 180–187.
- Tsuge, H., Koseki, K., Miyano, M., Shimazaki, K., Chuman, T., Matsumoto, T., Noma, M., Nitta, K., Sugai, S. (1991) A structural study of calcium-binding equine lysozyme by two-dimensional 1H-NMR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1078, 77–84.
- Uniacke-Lowe, T. (2011). *Studies on equine milk and comparative studies on equine and bovine milk systems*. [приступљено 04.04.2014]; Доступно: <http://library.ucc.ie/record=b2027873~S0>
- Uniacke-Lowe, T., Huppertz, T., Fox, P. F. (2010). Equine milk proteins: Chemistry, structure and nutritional significance. *International Dairy Journal*, 20, 609–629.
- Van Dael, H., Haezebrouck, P., Morozova, L., Arico-Muendel, C., Dobson, C. M. (1993) Partially folded states of equine lysozyme. Structural characterization and significance for protein folding. *Biochemistry*, 32, 11886–11894.
- Van Kessel, J. S., Karns, J. S., Gorski, L., McCluskey, B. J., Perdue, M. L. (2004). Prevalence of Salmonellae, *Listeria monocytogenes*, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies. *Journal of Dairy Science*, 87, (9), 2822–2830.
- Vincenzetti, S., Polidori, P., Mariani, P., Cammertoni, N., Fantuz, F., Vita, A. (2008). Donkey's milk protein fractions characterization. *Food Chemistry*, 106, 640–649.
- Vučičević, M., Drljačić, A., Francuski, J., Ivanov, S., Trailović, R., Trailović, D. (2011). Prilog poznavanju fizioloških vrednosti osnovnih hematoloških parametara krvi domaćeg balkanskog magarca u periodu pre i nakon povlačenja sa ispaše. Zbornik „Ishrana i patologija konja“, 194 – 200.
- Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A., Van Boekel, M. A. J. S. (1999). Dairy technology, principles of milk properties and processes. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Wang, L. L. & Johnson, E. A. (1992). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 624–629.
- Weinberg, F. (1993). Infant feeding through the ages. *Canadian family physician*, 39, 2016 – 2020.
- White, S. L., Bertrand, J. A., Wade, M. R., Washburn, S. P., Green, Jr., J. T., Jenkins, T. C. (2001). Comparison of fatty acid content of milk from Jersey and Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *Journal of Dairy Science*, 84, 2295–2301.

Wilhelm KR (2009). *Protein Complexes: Assembly, Structure and Function*. [приступљено 04.04.2014]; Доступно:<http://umu.diva-portal.org/smash/get/diva2:278077/FULLTEXT02>

Wu, H., Kuzmenko, A., Wan, S., Schaffer, L., Weiss, A., Fisher, J. H., Kim, K. S., McCormack, F. X. (2003). Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability. *Journal of Clinical Investigation*, 111, 1589–1602.

Xu, X., Gullberg, A., Arnason, U. (1996). The complete mitochondrial DNA (mtDNA) of the donkey and mtDNA comparisons among four closely related mammalian species-pairs. *Journal of Molecular Evolution*, 43, 438–446.

Yamauchi, K., Tomita, M., Giehl, T. J., Ellison, R. T. (1993). Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infection and Immunity*, 61 (2), 719–728.

Yobouet, B. A., Kouamé-Sina, S. M., Dadié, A., Makita, K., Grace, D., Djè, K. M., Bonfoh, B. (2014). Contamination of raw milk with *Bacillus cereus* from farm to retail in Abidjan, Côte d'Ivoire and possible health implications. *Dairy Science and Technology*, 94 (1), 54–60.

Zhang, X. Y., Zhao, L., Jiang, L., Dong, M. L., Ren, F. Z. (2008). The antimicrobial activity of donkey milk and its microflora changes during storage. *Food Control*, 19, 1191–1195.