

DOI: 10.7251/VETJ1702182V

UDK 636.2.09:[616-008.9:577.334

Стручни рад

ПОЛИФЕНОЛИ ГРОЖЋА У ЗАШТИТИ ДОМАЋИХ ЖИВОТИЊА ОД ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА

Оливера Валчић, Светлана Милановић*

Кратак садржај

Актуелни трендови употребе биљних производа у заштити здравља људи и животиња довели су до широке примене природних полифенола присутних у биљкама, као што су зелени чај, боровница, аронија, итд. На основу досадашњих испитивања настанка оксидативног стреса као и начина превенције, можемо закључити да су грожђе, семенке грожђа, као и комина показали одређене про-теktivне ефекте. *In vivo* студије ефикасности полифенола су изузетно комплекс-не и до сада су дале контроверзне резултате. У овде представљеном раду дат је преглед до сада постигнутих сазнања ефеката употребе полифенола грожђа у заштити од оксидативног стреса домаћих животиња.

Кључне речи: полифеноли, грожђе, оксидативни стрес, домаће животиње

DOI: 0.7251/VETJ1702182V

UDK 636.2.09:[616-008.9:577.334

Professional paper

GRAPE POLYPHENOLS IN THE PROTECTION OF DOMESTIC ANIMALS FROM OXIDATIVE STRESS

Olivera Valčić, Svetlana Milanović*

Summary

Current trends on the use of plant products in the protection of human and animal health have resulted in the widespread use of natural polyphenols present in plants such as green tea, chokeberries, blackberries, etc. According to a wide array of trials on oxidative stress and its prevention it can be concluded that grapes, grapeseeds and

¹ Проф. др Оливера Валчић и проф.др Светлана Милановић
Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду, Булевар ослобођења 18, 11000 Београд,
Република Србија

Електронска пошта кореспондентног аутора: olja@vet.bg.ac.rs

* Prof.dr Olivera Valčić, Prof.dr Svetlana Milanović, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Serbia

pomace have some protective effects. In vivo polyphenol efficacy studies are extremely complex and up to date have raised a number of controversial results. In the here presented paper we have offered a review on the knowledge on grape polyphenols in oxidative stress protection of domestic animals.

Key words: polyphenols, grapes, oxidative stress, domestic animals

УВОД

Природни екстракти биљака су нашли широку примену у очувању здравља, производних и репродуктивних карактеристика домаћих животиња. Потреба за изналагањем ефикасних, лако доступних природних препарата је настала као последица све чешће појаве непожељних ефеката синтетских производа. Установљено је да бројни биљни деривати имају пожељна антиоксидативна, антиинфламаторна, кардио и неуропротективна дејства као и антидијабетичке ефекте. Бројна истраживања која су спроведена у циљу идентификације активних молекула одговорних за набројана дејства су указала на широку групу органских једињења познатих као полифеноли (*Graf u cap., 2005; Arts u Hallman, 2005*).

ОКСИДАТИВНИ СТРЕС – УТИЦАЈ НА ЗДРАВЉЕ ДОМАЋИХ ЖИВОТИЊА

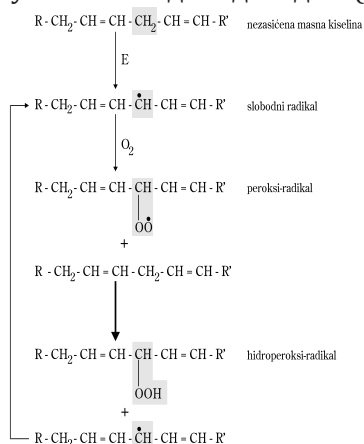
Током еволуције организми су се метаболички прилагодили на аеробне услове, међутим као последица оваквих адаптивних процеса дошло је до настанка слободних реактивних кисеоничних радикала. Слободни радикали су молекули који су у стању да реагују са кључним органским молеку-

лима у ћелији (липидима, угљеним хидратима, протеинима и нуклеинским киселинама) при чему доводе до поремећаја њихове структуре и последичног нарушавања функције (*Li u cap., 2010*). Наиме, липиди који су присутни првенствено у ћелијским мембранама подлежу процесу пероксидације уз ослобађање токсичног малондиалдехида (МДА), ензими могу бити инактивисани услед оксидације сулфидрилних група, могући су агрегација полисахаридних ланаца, депомелиризација угљених хидрата и оштећења генетског материјала (*Halliwel, 2008*).

Поред ендогених фактора на настаanak слободних радикала утичу и други фактори као што су инфламаторни процеси, загађење средине, јонизујуће зрачење, стрес, физички напор, итд.

Процењује се да су ћелије једног човека свакодневно изложене удару од 10^5 реактивних слободних радикала, што индукује настанак оксидативног стреса (*Valko u cap., 2004*). Услед дејства слободних радикала ћелијски протеини могу бити модификовани на један од следећих начина: (а) оксидација специфичних аминокиселина, (б) цепање на пептиде, (в) умрежавање са производима липидне пероксидације (*Lobo u cap., 2010*). Фентонова ре-

акција представља кључни механизам настанка хидроксилних радикала који оштећују РНК и ДНК хеликс. Истовремено, хидроксилни радикали доводе до оксидативних оштећења. За време иницијалне фазе гликолизе долази до настанка кратколанчаних молекула који су склони самооксидацији и настанку супероксидног радикала. Овај радикал индукује ланчану реакцију и формацију дикарбонилних једињења која су изузетно мутагена (*Benov и Beena, 2003*). Најосетљивији молекули на дејство слободних радикала јесу ланци незасићених масних киселина. Наиме, присутне двогубе везе у ланцима незасићених масних киселина лако отпуштају водоникове атоме, при чему настају високореактивни слободни радикали (СЛИКА 1). Након губитка водониковог атома може доћи до молекуларног реаранжмана и настанка пероксидног радикала чиме се омогућава настанак ланчане реакције пероксидације липида уз ослобађање молекула малондиалдехида (МДА).



Интензивна липидна пероксидација биолошких мембрана доводи до нарушавања структурног интегритета мембрана, губитка флуидности, смањења мембранског потенцијала и повећања пермеабилности. Наведене промене резултирају губитком интегритета мембране и испуштањем целуларног садржаја (*Halliwell u Chirico, 1993*).

Природни физиолошки одговор на синтезу слободних радикала се огледа у повећаној активности система антиоксидативне заштите ћелије. Антиоксидативна заштита ћелије је вишестепена и чине је ензимски и неензимски фактори. У ензимске факторе (прва линија одбране) спадају супероксид дисмутаза, каталаза и глутатион пероксидаза, док се међу неензимским факторима (друга линија одбране) истичу витамин Ц, витамин Е, глутатион, таурин, итд. (*Halliwell u Gutteridge, 1999; Cadenas u Packer, 1996*).

У физиолошким условима, код здравих организама, постоји равнотежа између оксидативних процеса и антиоксидативних способности. Уколико дође до нарушавања равнотеже, долази до појаве оксидативног стреса.

ПОЛИФЕНОЛИ ГРОЖЉА КАО ПРИРОДНИ АНТИОКСИДАНСИ

Već dugi niz godina se radi na iznalaženju „idealnog“ antioksidativnog sredstva koje bi pružilo adekvatnu zaštitu od oksidativnog stresa. Suvremeni trendovi svakako da potenciraju primenu prirodnih suplemenata ne samo u cilju očuvanja zdravlja ljudi

Слика 1. Шематски приказ ланчане реакције пероксидације масних киселина.

и домаћих животиња, већ и у прерађивачкој индустрији нпр. ради продужење одрживости меса током дуготрајног складиштења (Пешум, 2005).

Полифеноли присутни у биљкама представљају метаболите који су задужени за заштиту од ултраљубичастиг зрачења или напада биљних патогена (Beckman, 2000). У природи постоји више од 8000 једињења која спадају у биљне полифеноле. Они представљају деривате фенилаланина. Налазе се првенствено коњуговани са угљенохидратном резидуом која је везана за хидроксилну групу (Panday и Riszvi, 2009), мада није ретка ни њихова конјугација са органским киселинама, липидима или аминима. Полифеноли се могу класификовати на основу броја присутних фенолних прстенова у више група које укључују: фенолне киселине, флавоноиде, стилбене и лигнанае.

Полифеноли су добри донори редукционих еквивалената (електрони/атоми водоника) помоћу којих неутралишу слободне радикале и реактивне кисеоничне молекуле (РОС). Процес неутрализације слободних радикала представља суштину одбране од оксидативног стреса.

Грожђе представља богат извор полифенола који су присутни у кожици (трансресвератрол, кверцетин, проантоцијанидини), петелци (рутин, кверцетин, трансресвератрол), семенкама (катехин, епикатехин) (Brenes и сар., 2016). Међутим, треба имати у виду да састав и релативна заступљеност

појединих полифенола зависе од сорте, климе и степена зрелости грожђа (Rodriguez и сар., 2006).

Бројне *in vitro* студије су доказале антиоксидативне и антиинфламаторне ефекте биљних полифенола, међутим *in vivo* студије су често дале контрадикторне резултате. Овакво неслагање литературних података је првенствено последица чињенице да се слободни полифеноли и њихови једноставни коњугати ресорбују у горњим партијама гастроинтестиналног тракта, при чему је њихова биолошка расположивост ниска у поређењу са витаминима који имају такође антиоксидативни ефекат (Van Duynhoven и сар., 2011). Након интестиналне ресорпције мање комплексни полифеноли подлежу даљем метаболизму у самим ентероцитима и хепатоцитима. Метаболичка трансформације биофенола резултира настанком серије хидросолубилних коњугата који се постепено ослобађају у општу циркулацију (Manach и сар., 2004). Сматра се да од укупне количине унетих полифенола моногастрични организми ресорбују свега 5–10%. Преостали нересорбовани полифеноли се акумулирају у дебелом цреву где подлежу микробној разградњи. Након дејства микробних ензима деривати полифенола се могу екскретовати, или ресорбовати и путем порталног крвотока даље метаболисати у јетри. Из наведеног је јасно да микрофлора дигестивног тракта има кључну улогу у процесу разградње полифенола у молекуле мање молекулске масе, као што су фенолна

једињења, која су биолошки расположива и одговорна за биолошку активност. Због ниске биолошке расположивости физиолошке концентрације полифенола и њихових метаболита у крвној плазми су изузетно ниске ($<1 \mu\text{mol/L}$) чиме је додатно отежано ефикасно *in vivo* деловање. Екскреција полифенола се обавља првенствено преко бубрега након гликуронизације, сулфовања и метилације (Nicholson *u cap.*, 2012).

Велики проблем у ветеринарској и хуманој медицини представља мишљење да ефекти природних суплемената, па самим тим и ефекти полифенола грожђа, расту са порастом њихове унете количине. Овакав став је изузетно погрешан и штетан. Наиме, полифеноли реагују са јонима прелазних елемената при чему настају про-оксиданси који имају негативне ефекте по здравље људи и животиња (Halliwell, 2012), при чему про-оксиданси настају у реакцијама које се одвијају у самом гастроинтестиналном тракту. Дакле, полифеноле можемо сматрати мачем са две оштрице. Са једне стране када се налазе у одговарајућој концентрацији делују као антиоксиданси и заштитници од оксидативног стреса, док са друге стране, када се путем дијетарних суплемената дају у високим дозама показују непожељну прооксидативну активност (Bouayed *u Bohn*, 2010).

Најновије студије (Zhang *u Tsao*, 2016) су показале да при ниским концентрацијама полифеноли не само да

повећавају активност ензимске антиоксидативне заштите, већ инхибирају проинфламаторне цитокине и директно атенуирају ћелијску сигнализацију током инфламаторних процеса.

ДИЈЕТАРНА ПРИМЕНА ПОЛИФЕНОЛА ГРОЖЂА У ВЕТЕРИНАРСКОЈ ПРАКСИ

Живинарска производња је једна од првих грана у којој је почела примена производа винарске индустрије (екстракта семенки грожђа и коми-на), односно природних полифенола грожђа. Испитивања ефеката ресвератрола, антоцијанидина, катехина и осталих полифенола присутних у семенкама грожђа и коми-на су указала да постоји значајан ефекат на смањење оксидације ткивних липида (Goni *u cap.*, 2007; Liu *u cap.*, 2014) као и на смањене показатеља оксидативног стреса током инфекције кокцидијама (Wang *u cap.*, 2008). Наведени аутори нису установили значајан ефекат суплементације полифенолима грожђа на прираст живине током тога. Ефекти природних екстракта грожђа на стабилност ткивних липида се подударају са раније описаним антиоксидативним ефектима дијетарне суплементације бројлера у тову витамином Е и селенизираним квасцем (Пешум, 2005, 2006; Валчић *u сар.*, 2011). Поред наведеног, слично ефектима дијетарне суплементације селеном и витамином Е, полифеноли грожђа су показали значајан ефекат на одрживост живинског меса током складиштења на ниским температурама (Brenes *u cap.*, 2016). Несумњиво је да су овакви

ефекти полифенола грожђа на заштиту од оксидативног стреса, стабилност ткивних липида, као и продужене одрживости мяса током складиштења на ниским температурама, изузетно пожељни. Поред наведеног, ови препарати су и економски исплативи јер користе споредне производе индустрије вина и сокова чиме њихова примена постаје, поред технолошки и медицински оправданом и економски исплативом.

Убрзо након охрабрујућих резултата примене полифенола грожђа у живинарској производњи почела су испитивања на свињама у тову. Серија најновијих студија спроведених на товним свињама дала је прилично охрабрујуће резултате, што указује на потребу да се спроведу детаљнија испитивања у контролисаним условима како би се пратили мултифакторијални ефекти исхране, смештаја, температуре, инфекција итд. *Fiesel и сар.* (2014) и *Zhang и сар.* (2014) установили су повољне ефекте на конверзију хране и на смањење вредности МДА у крвној плазми што указује на нижи ниво оксидације ткивних липида услед смањеног оксидативног стреса. Поред повољних ефеката на оксидативни стрес свиња у тову аутори су уочили да дијетарна суплементација полифенолима грожђа доводи до модификације и побољшања квалитета микрофлоре дигестивног тракта. Аутори су тестирали широк опсег доза од 1г/кг до 30г/кг, при чему нису уочени непожељни ефекти. За разлику од горенаведених новијих радова, ра-

није објављене студије нису установиле ефекте полифенола грожђа на оксидативну стабилност липида свиња у интензивном или екстензивном тову (*Gonzales и Tejada, 2007; O'Grady и сар, 2008*). Описане разлике можемо приписати вероватно слабо контролисаним експерименталним условима и уплитањем низа спољних фактора који су додатно допринели појави оксидативног стреса.

Интересовање о повољним ефектима полифенола грожђа се проширило са економски значајних категорија као што су товне свиње и бројлери и на кућне љубимце и спортске коње. Током дуготрајног физичког напора и захтевних такмичења као што су ендјуранс трке и *three day event*, коњи се ослањају првенствено на аеробни катаболизам масних киселина, што као последицу има повећан ризик од дејства кисеоничних радикала и последичног оксидативног стреса (*Јовић и сар. 2013*). Превентивна дијетарна суплементација obroка спортских коња полифенолима грожђа (посебно ресвератрола) је данас изузетно заступљена услед доказаних антиинфламаторних и протективних ефеката. *Етете и сар. (2015)* су испитивали ефекат ресвератрола код старих коња који су патили од хромости услед инфламаторних процеса на локомоторном систему. Резултати су показали да ресвератрол има заштитни ефекат који постиже повећањем антиоксидативног капацитета коња.

Штетним ефектима оксидативног стреса такође су изложени спорт-

ски и радни пси. *Куковска и сар.* (2015) су установили да интезиван тренинг службених војних паса доводи до пораста кисеоничних метаболита (РОМ) и производа оксидације (МДА). Међутим, двомесечна суплементација екстрактом семенки грозђа није довела до значајних промена показатеља оксидативног стреса (РОМ, МДА, ФРАП). Наведеној студији су претходили и радови *Dunlap и сар.* (2006) који су испитивали ефекте биљних полифенола на параметре оксидативног стреса радних поларних паса. Наиме, аутори су одредили значајан ефекат екстракта боровнице (богата полифенолним једињењима) на смањење оксидативног стреса након интензивног физичког рада.

ЗАКЉУЧАК

Проблематика заштите домаћих животиња од негативних ефеката оксидативног стреса, посебно у условима интензивне производње или значајног физичког оптерећења, свакако је актуелна. Међутим, иако су бројна *in vitro* истраживања утврдила позитивне заштитне ефекте полифенолних молекула грозђа и других биљака, разлике које постоје између објављених *in vivo* резултата указују на потребу да се спроведу даље детаљне студије које би биле методолошки стандардизоване. Садашња сазнања су још увек недовољна у смислу давања препорука дневних доза и хемијског облика биљних препарата са високим садржајем полифенола у превенцији и терапији оштећења организма живо-

тиња услед оксидативног стреса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Arts I., Hollman P. C. H. (2005): Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81:317–325.
2. Backman C. (2000): Phenolic storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiol Mol Plant Pathol* 57: 101–110.
3. Benov L., Beema A.F. (2003): Superoxide-dependence of the short chain sugars-induced mutagenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 34: 429–433.
4. Bouayed J., Bohn T. (2010): Exogenous antioxidants - double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev* 3:228–237.
5. Brenes A., Viveros A., Chamorro S., Arija I. (2016): Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. *Animal Feed Science and Technology* 211: 1–17.
6. Cadenas E., Packer L. (1996): *Handbook of antioxidants*. Marcel Dekker, New York.
7. Dunlap K., Reynolds A., Duffy L. (2006): Total antioxidant power in sled dogs supplemented with blueberries and the comparison of blood parameters associated with exercise. *CBP, Part A*, 143: 429–434.

8. Ememe M., Abdullahi U., Sackey A., Ayo J., Mshelia W., Edeh R. (2016): Effects of a joint supplement whose main components are resveratrol and hyaluronic acid on some biochemical parameters in aged lame horses. *Equine Sci.* 27 (1): 19–22.
9. Fiesel A., Gassner DK., Erika Most., Eder K., (2014): Effects of dietary polyphenol- rich plant products from grape or hop on pro-inflammatory gene expression in the intestine, nutrient digestibility and fecal microbiota of weaned pigs. *BMC Vet. Res.* 10: 196–206.
10. Fiesel A., Gessner DK., Erika Most E., Eder K. (2014): Effects of dietary polyphenol-rich plant products from grape of hop on pro-inflammatory gene expression in the intestine, nutrient digestibility and faecal microbiota of weaned pigs. *BMC Vet. Res.* 10: 196–206.
11. Goñi I., Brenes A., Centeno C., Viveros A., Saura-Calixto R., Rebolé A., Arijia I., Esteve R. (2007): Effect of dietary grape pomace and vitamin E on growth performance, nutrient digestibility, and susceptibility to meat lipid oxidation. *Poult. Sci* 43:5111–5123.
12. Gonzalez E., Tejeda JF. (2007): Effects of dietary incorporation of different antioxidant extracts and free-range rearing on fatty acid composition and lipid oxidation of Iberian pig meat. *Animal* 1: 1060–1067.
13. Halliwell B. (2012): Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev* 70:257–237.
14. Halliwell, B. (2008): Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys* 476: 107.
15. Halliwell, B., Chirico, S. (1993): Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. Clin. Nutr.* 57,715–724.
16. Halliwell B, Gutteridge JMC. (1999): Free radicals in biology and medicine. 3 nd ed. Clarendon Press, Oxford.
17. Hua Zhang and Rong Tsao (2016): Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr Opin. In Food Sci* 8:33–42.
18. Jović S., Stevanović J., Borozan S., Dimitrijević B., Milosavljević P. (2013): Influence of physical activity of racehorses on lactate dehydrogenase and creatine kinase activities, and protein synthesis. *Acta Vet* 63:549–568.
19. Kukovska V., Celeska I., Ruškovska T., Valčić O., (2015): Effects of rose-hip and grapeseed dietary supplementation on serum oxidative stress parameters in dogs before and after physical exercise, *Acta Vet* 65: 404–416.
20. Li I., Lin P.H., Yao Q., Chen C. (2010): Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental

- approaches and model systems. *Cell Mod. Med.* 14: 840–860
21. Lin LL., He JH., Xie HB., Yang YS., Li JC., Zou Y. (2014): Resferatrol induces antioxidant and heat shock protein mRNA expression on response to heat stress in black-boned chicken. *Poult.Sci.* 93:54–62.
 22. Lobo V., Phatak A., Chandra N. (2010): Free radicals and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* 4: 118–126.
 23. Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jimenez L. (2004): Polyphenol: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin.Nutr.* 79:727–744.
 24. Nicholson JK., Holmes E., Kinross J., Burcelin R., Gibson G., Jia W., Pettersson S. (2012): Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 336:1262–1267.
 25. Panday K. B., Riszvi S. I. (2009): Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2(5):270–278.
 26. Pešut O., Nollet L. and Tucker L. (2006): Effect of Se (Sel-Plex) in combination with α tocopherol on fresh and frozen poultry meat. *Experimentelle Modelle der Spurenelementforschung. Schriftenreihe der Gesellschaft für Mineralstoffe und Spurenelemente e.V. Book of Proceedings of 21.Jahrestagung der GMS am 28 und 29. Oktober. Wien, Austria*, 244–248.
 27. Pešut O., Nollet L. and Tucker L. (2005): Effect of Se (Sel-Plex) in combination with α tocopherol on fresh and frozen poultry meat. *Proceedings of the 15 european Symposium on Poultry Nutrition*, 25 - 29 September, Baltonfüred, Hungary, 499–502.
 28. O'Grady MN, Carpsenter R, Lynch PB, O'Brien NM, Kerry JP. (2008): Addition of grape seed extract and bearberry to porcine diets: influence on quality attributes of raw and cooked pork. *Meat Sci.* 78:485–495.
 29. Pešut Olivera, (2005) „*Uticaj selenia i vitamina E dodatog u hranu na sastav i oksidativnu stabilnost lipida u svežem i zamrznutom mesu brojlera*“, Doktorska disertacija, Fakultet vetinarske medicine u Beogradu.
 30. Rodriguez-Montealegre R., Romero R., Chacón JL., Martinez J., Garcia E. (2006): Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in warm climate. *J. Food compos. Anal.* 19:687–693.
 31. Valčić Olivera, I.B. Jovanović and Svetlana Milanović, (2011). Selenium, thiobarbituric acid reactive substances, and thyroid hormone activation in broilers supplemented with selenium as selenized yeast or sodium selenite, *Jpn J Vet Res* 59 (2&3):69–77.
 32. Valko, M., Izakovic, M. Mazur. M. Rhodes, C., Telser, (2004): Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell.*

- Biochem. 266, 37-56. Villanueva. C., Kross. R.D. 2012. Antioxidant-induced stress. Int. Mol. Sci. 13: 2091–2109.
33. Van Diynhoven J., Vaughan EE., Jacobs DM., Kemperman RA., Van Velzen EJ., Gross G., Roger LC., Possemiers S., Smide AK., Doré J (2011): Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 108(Suppl.1):4531–4538.
34. Wang ML., Suo X., Gu JH, Zhang WW., Fant Q., Wang X. (2008): Influence of grape seed proanthocyanidin extract in broiler chickens: effect on chicken cocciosis and antioxidatn status. Poult. Sci. 87:2273–2280.
35. Zhang HJ., Jiang XR., Mantovani G., Valdez AE., Comi M., Alborali G., Savoini G, Dell’Orto B., Bontepo V. (2014): Modulation of plasma antioxidant activity in weaned pigs by plant polyphenols. Ital. J. Anim. Sci. 13:424–430.

Рад примљен: 21.7.2017.

Рад прихваћен: 12.10.2017.

Originalni naučni rad

SADRŽAJ PESTICIDA I TOKSIČNIH ELEMENATA U JETRI LABUDOVA (*CYGNUS OLOR*)

Željko Mihaljev, Brankica Kartalović, Biljana Božić, Marko Pajić, Dejan Bugarski, Jelena Petrović, Vladimir Polaček*

Kratak sadržaj

Labudovi su divlje ptice vodenih staništa i pripadaju familiji *Anatidae*, rodu *Anseriformes*. S obzirom na stanište, način života i ishranu, labudovi predstavljaju značajnu bioindikatorsku vrstu za monitoring zagađivača u prirodi. Hrane se uglavnom vodenim biljkama i zelenim algama koje predstavljaju direktan pokazatelj zagađenja životne sredine i vodenih staništa. Poznato je da se pesticidi kao i toksični elementi akumuliraju i perzistiraju u vodenim ekosistemima i vodenim organizmima (alge, ribe, beskičmenjaci itd.) i preko lanca ishrane dospevaju i u kopnene biljke, životinje i čoveka. Cilj ovog rada je bio utvrđivanje stepena ugroženosti labudova kao zaštićene vrste, usled štetnog dejstva pesticida i toksičnih elemenata. Priprema uzoraka za određivanje pesticida je urađena u skladu sa multirezidualnom metodom QuEChERS. Ova metoda pripreme se zasniva na ekstrakciji sa acetonitrilom u prisustvu soli. Za kvantifikaciju rezidua pesticida korišćen je gasni hromatograf sa masenim detektorom, Agilent Technology GCMSD 7890B/5977A sa elektronskom jonizacijom i kvadropolnim detektorom. Uzorci za merenje toksičnih elemenata pripremljeni su metodom mikrotalasne digestije u sistemu Ethos, Microwave Labstation, Milestone, a određivanje je izvršeno tehnikom Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry na instrumentu Agilent ICP-MS 7700 preko izotopa: ^{75}As , ^{111}Cd , ^{201}Hg , ^{208}Pb , ^{56}Fe , ^{63}Cu i ^{66}Zn . Rezultati ispitivanja pesticida pokazuju da je u svim analiziranim uzorcima njihov sadržaj veoma nizak i nalazi se ispod granice kvantifikacije upotrebljene metode. Na osnovu izmerenih vrednosti toksičnih elemenata, može se zaključiti, da se njihov sadržaj kretao u intervalu, i to: za arsen 0.004 – 0.027 mg/kg; za kadmijum 0.023 – 0.473 mg/kg; za živu 0.007 – 0.188 mg/kg; za olovo 0.108 – 0.248 mg/kg; za bakar 81 – 810 mg/kg; za gvožđe 362 – 3288 mg/kg i za cink 21 – 127 mg/kg. Dobijeni rezultati ispitivanja ukazuju da je lokalitet prirodnog rezervata „Koviljsko-petrovaradinski rit“ nezagađen pesticidima ali da treba u daljim ispitivanjima, na većem broju uzoraka, utvrditi uzroke značajno povećanog sadržaja nekih toksičnih elemenata (Cd, Hg, Cu, Fe) u ispitivanim uzorcima jetre labudova.

Ključne reči: labudovi, jetra, pesticidi, toksični elementi

* Željko Mihaljev, Brankica Kartalović, Biljana Božić, Marko Pajić, Dejan Bugarski, Jelena Petrović, Vladimir Polaček

Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Rumenački put 20, 21000 Novi Sad, Srbija

Korespondentni autor: Željko Mihaljev, imejl: zeljko@niv.ns.ac.rs

DOI: 10.7251/VETJ1702192M

UDK 636.5/.6.09:616.91]:632.95.024

Original scientific paper

THE CONTENT OF PESTICIDES AND TOXIC ELEMENTS IN THE SWAN'S LIVER (*CYGNUS OLOR*)

Željko Mihaljev, Brankica Kartalović, Biljana Božić, Marko Pajić, Dejan Bugarski, Jelena Petrović, Vladimir Polaček*

Abstract

Swans are wild birds living in water habitats and belong to the Anatidae family, Anseriformes order. Considering their habitat, way of living and diet, swans represent a significant bioindicator species for monitoring of environmental pollutants. Their diet is composed of water plants and green algae which are direct indicators of environmental and water habitat pollution. It is known that pesticides as well as toxic elements accumulate and persist in water ecosystems and water organisms (algae, fish, invertebrates, etc.) and reach embriophyte, animals and humans through the food chain. The aim of this paper is to determine the extent to which swans are endangered, as a protected species, due to harmful effects of pesticides and toxic elements. The sample preparation for determining pesticides has been conducted in accordance with the Multiresidue Method QuEChERS. This preparation method is based on the extraction with acetonitrile in the presence of salt. Gas chromatography with mass spectrometry has been used for quantification of pesticide residues. Agilent Technology GCMSD 7890B/5977A with electron ionization and quadrupole mass spectrometer. The samples for toxic element measurement have been prepared using the method of microwave digestion in the system Ethos, Microwave Labstation, Milestone and determination has been conducted using the Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry technique on the Agilent ICP-MS 7700 instrument through isotopes: ⁷⁵As, ¹¹¹Cd, ²⁰¹Hg, ²⁰⁸Pb, ⁵⁶Fe, ⁶³Cu and ⁶⁶Zn. Pesticide examination results show their low content in all analysed samples, below quantification limit of the used method. According to the measured values of toxic elements, it can be concluded that their content range was the following: for arsen 0.004-0.027 mg/kg; for cadmium 0.023-0.473 mg/kg; for mercury 0.007-0.188 mg/kg; for lead 0.108 -0.248 mg/kg; for copper 81-810 mg/kg; for iron 362-3288 mg/kg and for zinc 21 -127 mg/kg. The obtained examination results indicate the absence of pesticide pollution at the locality of the natural reserve „Koviljsko-petrovaradinski rit“. However, the causes of

* Željko Mihaljev, Brankica Kartalović, Biljana Božić, Marko Pajić, Dejan Bugarski, Jelena Petrović, Vladimir Polaček
Scientific Veterinary Institute „Novi Sad“, Rumenački put 20, 21000 Novi Sad, Srbija

significantly higher content of toxic elements (Cd, Hg, Cu, Fe) in the examined samples in the swan's liver should be further examined on a larger number of samples.

Key words: swans, liver, pesticides, toxic elements

UVOD

Labudovi su divlje ptice vodenih staništa i pripadaju rodu *Anseriformes*. Malo je podataka u literaturi o brojnosti populacije, teritorijalnom ponašanju kao i migratornim putevima ove vrste ptica u Srbiji. Međutim, zna se da je kod ove vrste divljih ptica trend veličine areala u povećanju, tj. širenju. Crvenokljuni labud (*Cygnus olor*) je jedina vrsta labudova koja se u našoj zemlji od osamdesetih godina prošlog veka i gnezdi na području Vojvodine i povremeno uz Savu i Dunav, sa južne strane (Puzović i sar., 2001). Tokom epizootije visoko patogene avijarne influence podtipa H5N8 u Srbiji krajem 2016. i početkom 2017. godine, visok mortalitet uočen je kod crvenokljunih labudova, sa lokaliteta specijalnog rezervata prirode „Koviljsko-petrovaradinski rit“ (Božić i sar., 2016).

Specijalni rezervat prirode „Koviljsko-petrovaradinski rit“ je prirodno dobro od izuzetnog značaja i svrstano je u prvu kategoriju zaštite. Vrednosti ovog prirodnog dobra ogledaju se u očuvanosti i raznovrsnosti flore i faune, naročito ornitofaune. Stanište je velikog broja ptica (oko 200 vrsta) uključujući i migratorne vrste ptica. Zbog bogate flore veoma je značajan izvor hrane migratornim vrstama ptica tokom reproduktivnog perioda. Procenjeno je da je u zimskom perio-

du populacija crvenokljunih labudova na ovom lokalitetu oko 150–200 jedinki.

Tokom zime 2016–2017 kao posledica infekcije izazvane visoko patogenim sojem avijarne influence H5N8 došlo je do značajnog smanjenja brojnosti populacije labudova sa ovog područja. Uginuli labudovi nisu bili prstenovani i iz tog razloga se ne može tačno utvrditi njihovo poreklo. Rezultati ranijih istraživanja dokazuju da su prstenovani primerci labudova u našoj zemlji poreklom iz zapadne Mađarske i južne Poljske (Žuljević, 2003).

Leševi labudova bili su dobrog kondicionog stanja i uhranjenosti s obzirom na vremenske i temperaturne uslove za zimski period. Tom prilikom sakupljani su uzorci organa i tkiva uginulih labudova radi patoanatomskih, molekularnih i hemijskih ispitivanja.

Labudovi predstavljaju značajnu sentinel vrstu i bioindikatore za monitoring zagađivača u prirodi. Hrane se uglavnom vodenim biljkama i zelenim algama koje predstavljaju direktan pokazatelj zagađenja životne sredine i vodenih staništa. Poznato je da se teški metali akumuliraju i perzistiraju u vodenim ekosistemima i vodenim organizmima (alge, ribe, beskičmenjaci itd.) i preko lanca ishrane dospevaju i u kopnene biljke,

životinje i čoveka. Zbog intenzivne poljoprivredne proizvodnje i nekontrolisane upotrebe hemijskih sredstava u poljoprivredi i šumarstvu, stvoren je niz nepovoljnih činilaca za čitav ekosistem. Cilj ovog rada jeste ispitivanje koncentracije pesticida i toksičnih elemenata kod ove vrste ptica.

MATERIJAL I METODE

Uzorci tkiva jetre prikupljeni su od 6 nasumično izabranih uginulih labudova (2 jedinke ženskog pola i 4 jedinke muškog pola). Uzorci jetre čuvani su u plastičnim kesama u frižideru do analize.

Priprema uzoraka je urađena u skladu sa multirezidualnom metodom QuEChERS. Ova metoda pripreme se zasniva na ekstrakciji sa acetonitrilom u prisustvu soli. Za kvantifikaciju rezidua pesticida korišćen je gasni hromatograf sa masenim detektorom, Agilent Technology GCMSD 7890B/5977A sa elektronskom jonizacijom i kvadropolnim detektorom. Pri analizi je upotrebljavan standard pesticida čistoće 99%, proizvođača Sigma-Aldrich. Korišćeni rastvarači su visoke čistoće, bez prisustva rezidua pesticida, hexan, metanol i acetonitril (Sigma-Aldrich). Od soli za ekstrakciju je korišćen anhidrovani magnezijum sulfat i natrijum acetat. Za prečišćavanje uzoraka su korišćena disperzna SPE punjenja i to Bundesil C18, sa prečnikom pora od 40 μm i Bundesil PSA, sa prečnikom pora od 40 μm proizvođača Merck (Darmstadt, Germany). Koncentracija OCP-a u osnovnom rastvoru smeše pesticida bila je 500 $\mu\text{g/mL}$. Radni rastvor pesticida od 5 $\mu\text{g/mL}$ je pravljen tako što je 0,1

mL osnovnog rastvora razblaživano u sudu zapremine 10 ml sa heksanom. Serija kalibracionih rastvora je dobijena razblaživanjem radnog rastvora, tako da je napravljeno pet kalibracionih rastvora u koncentracionom opsegu od 0,005 do 0,5 $\mu\text{g/mL}$.

Za eliminisanje uticaja matriksa, rađena je i kalibracija kroz matriks koji ne sadrži tragove pesticida. Odmerene probe uzoraka su kontaminirane sa radnim rastvorom pesticida, tako da se sadržaj pesticida u njima nalazio u opsegu od 0,005 do 0,01 $\mu\text{g/kg}$.

Osnovni i radni rastvor pesticida čuvani su u frižideru na 4 $^{\circ}\text{C}$ i to ne duže od tri meseca za osnovni rastvor, odnosno ne duže od jedne nedelje za radni rastvor. Uzorci matrix spike i uzorci jetre su pripremani na isti način, u skladu sa QuEChERS metodom. Odmeravano je po 3 g uzorka i zatim prenošeno u polietilensku tubu od 50 mL, a zatim dodavano po 3 mL dejonizovane vode i 3 mL acetonitrila. Uzorci su intenzivno mešani na Vortex-u, nakon čega je dodavano po 3 g anhidrovanog magnezijum sulfata i po 1 g anhidrovanog natrijum acetata. Nakon intenzivnog mešanja na Vortex-u tokom 1 min, dolazilo je do egzotermne reakcije. Uzorci su zatim centrifugirani u trajanju od 5 min na 3000 rpm. Zatim je po 1 mL gornjeg sloja acetonitrilnog ekstrakta prenošeno u tubu od 5 mL koja je sadržala 150 mg anhidrovanog magnezijum sulfata, 100 mg PSA i 50 mg C18. Sadržaj tube je centrifugiran u trajanju od 5 min na 3000 rpm. Nakon centrifugiranja dobijani su

prečišćeni, bistri ekstrakti. Zapremina od 0,5 mL ekstrakta je uparavana u struji azota, gotovo do suva i rekonstituisana sa heksanom. Ovako pripremljen uzorak je spreman za određivanje sadržaja pesticida na GC-MS-u (Kartalović i sar, 2015).

Organohlorni pesticidi razdvajani su na DB-5MS koloni (30m•0.25μm•0.25mm). Zapremina uzorka od 4 μL (splitless mode) injektovana je pri konstantnom pritisku od 11,36 psi i protoku kroz kolonu gasa nosača od 1,2 mL/min. Gas nosač je helijum čistoće 99,999%. Korišćen je temperaturni program sa temperaturom injektora od 250°C i temperaturom detektora od 280°C tako što se temperaturni program pećnice kretao od početnih 75°C u trajanju od 0,5 min, a potom se brzinom od 10°C/min temperatura povećavala do 300°C i na njoj se zadržavala u trajanju od 2 min. Ukupno trajanje temperaturnog programa, pa prema tome i ukupno vreme analize je iznosilo 25 min. Retenciono vreme, molekulska težina i joni od interesa za analizu izomera OCP-a prikazani su u Tabeli 1. Obrada dobijenih podataka je urađena kroz MassHunter Software. Analiza performansi metode je rađena u kalibracionom opsegu od 0,005 do 0,1 μg/g. Uzorci za merenje toksičnih elemenata pripremljeni su metodom mikrotalasne digestije u sistemu Ethos, Microwave Labstation, Milestone. Razaranje je izvršeno sa 8ml razblažene HNO₃ (2:1) i 2ml H₂O₂ (30%) na t_{max}=180°C. Zada ti program mikrotalasne digestije ukupno je trajao 30 min. sa max. snagom od 1000W. Ispitivani toksični elementi

određeni su tehnikom spregnute plazme sa masenom detekcijom, na instrumentu Agilent ICP-MS 7700 preko izotopa: ⁷⁵As, ¹¹¹Cd, ²⁰¹Hg, ²⁰⁸Pb, ⁵⁶Fe, ⁶³Cu i ⁶⁶Zn i to pri sledećim uslovima merenja: Arsen (He-M, IT 1 s/P), Kadmijum (NoG-M, IT 1 s/P), Živa (NoG-M, IT 1 s/P), Olovo (NoG-M, IT 0.1 s/P), Gvožđe (He-M, IT 0.1 s/P), Bakar (He-M, IT 0.1 s/P) i Cink (He-M, IT 0.1 s/P). Za izradu kalibracionih krivih korišćeni su sertifikovani standardi AccuTrace™ Reference Standard (USA) koncentracije 1000μg/ml, a za utvrđivanje efikasnosti mikrotalasne digestije i hemijskog prinosa metode upotrebljen je uzorak za kontrolu kvaliteta ispitivanja sa dodeljenim vrednostima i definisanim rasponima: Fapas QC Material Data Sheet, T07182Qcsale, Matrix-Canned Fish.

REZULTATI

Dobijena retenciona vremena, molekulska masa analiziranog jedinjenja, jon najjačeg intenziteta – target jon kao i sekundarni i tercijalni joni (Q1 i Q2) prikazani su u tabeli 1. U tabeli 2 dati su eksperimentalni podaci koji potvrđuju da je upotrebljena standardna metoda gasno-masene hromatografije naučno opravdana i ispunjava sve neophodne uslove za kvalitetno i pouzdano određivanje pesticida u ispitivanim uzorcima. Izmereni sadržaj toksičnih elemenata u jetri labudova, prikazan je u tabeli 3 kao srednja vrednost od 6 merenja kao i interval varijacije svih pojedinačnih merenja.

Tabela 1. Retenciono vreme (t_R), molekulska masa (MW), primarni (target) jon (T) i sekundarni i tercijalni jon (Qualifier Ions, Q1, Q2) za HCH izomere

Pesticid	t_R (min)	MW	T	Q1	Q2
α HCH	11,28	290.8	183	181	219
β HCH	12,47	290.8	219	181	183
γ HCH (lindan)	12,57	290.8	181	183	109
δ HCH	13,74	290.8	109	219	183
Heptahlor	15,74	370	272	235	237
Aldrin	17,40	362	263	220	291
heptahlore-poksid	19,55	386	353	81	355
trans hlordan	20,88	406	373	375	-
alfa endosulfan	21,46	404	195	159	133
cis hlordan	21,71	406	373	375	-
pp'DDE	22,84	378	79	277	239
dieldrin	23,09	316	246	176	211
Endrin	23,80	378	263	191	226
endosulfan	24,26	404	195	157	159
pp'DDE	24,90	318	235	165	237
endrin aldehid	25,065	378	67	345	-
endosulfansul-fat	25,97	420	272	274	387
pp'DDT	26,26	352	235	165	200
metoksihlor	26,88	344	227	165	184
endrin keton	27,46	240	317	67	-

Tabela 2. Preciznost, ponovljivost, hemijski prinos, linearnost, granica kvantifikacije (LOQ) i granica detekcije (LOD) gasno-masene metode određivanja pesticida

Pesticid	Preciznost (%)	Ponovljivost (%)	Prinos (%)	Linearnost (r^2)	LOQ (mg/kg)	LOD (mg/kg)
alfa bhc	2,21	13,32	129,75	0,9985	0,0045	0,0014
beta bhc	3,86	7,58	102,37	0,9967	0,0046	0,0014
lindan	9,35	8,06	107,8	0,9977	0,005	0,0015
delta bhc	5,74	15,03	111,42	0,9979	0,001	0,0003
heptahlor	9,95	17,16	128,18	0,9960	0,0036	0,0011
aldrin	3,32	1,58	112,24	0,9985	0,0045	0,0014
heptahlorepoksid	7,68	1,84	106,09	0,9979	0,0021	0,0006
trans hlordan	13,22	5,1	100,63	0,9983	0,0036	0,0011
alfa endosulfan	4,14	15,86	110,19	0,9979	0,0024	0,0007
cis hlordan	14,82	4,78	104,16	0,9981	0,0032	0,001
ppDDE	1,22	14,58	123,76	0,9987	0,0048	0,0015
dieldrin	10,27	15,53	115,4	0,9980	0,0046	0,0014
endrin	9,29	12,87	123,48	0,9941	0,0034	0,001
endosulfan II	9,65	1,63	100,92	0,9978	0,0046	0,0014
pp DDD	5,35	4,63	113,3	0,9952	0,0043	0,0013
endosulfan sulfat	5,7	12,06	103,55	0,9953	0,0049	0,0015
pp DDT	6,17	10,67	102,42	0,9948	0,0047	0,0014
metoxihlor	2,94	17,3	98,04	0,9966	0,0047	0,0014
min	1,22	1,58	98,04	0,9913	0,0010	0,0003
max	14,82	17,30	129,75	0,9987	0,0050	0,0015

Tabela 3. Sadržaj toksičnih elemenata u ispitivanim uzorcima jetre labudova

Ispitivani element Vrsta Uzorka	As [mg/ kg]	Cd [mg/ kg]	Hg [mg/ kg]	Pb [mg/ kg]	Cu [mg/ kg]	Fe [mg/ kg]	Zn [mg/ kg]
Jetra * $\bar{X}$ =	0.012	0.162	0.053	0.176	342.8	1210	65.9
labuda * I.v. =	0.004 -0.027	0.023 -0.473	0.007 -0.188	0.108 -0.248	81.2 -810.0	362.3 -3288.0	21.3 -126.7

* $\bar{X}$ – srednja vrednost svih izmerenih vrednosti (n=6)

* **I.v.** – Interval varijacije (raspon) = |min.vrednost – max.vrednost|

DISKUSIJA

Na osnovu rezultata određivanja pesticida u jetri labudova, metodom gasno-masene hromatografije, možemo zaključiti da se u svim analiziranim uzorcima utvrđeni nivo ispitivanih pesticida nalazi ispod granice kvantifikacije (LOQ) korišćene metode (Tabela 2). Saznanja o mogućem štetnom delovanju mnogih organohlornih pesticida (kumulativnost, perzistentnost, toksičnost) uslovlila su da se njihova primena ograniči ili potpuno zabrani. To je dovelo do značajnog smanjenja njihovog prisustva u životnoj sredini, što potvrđuju i naši rezultati, s obzirom na to da ni u jednom od analiziranih uzoraka jetre labudova nisu utvrđeni ostaci nekog od ispitivanih pesticida. Kapetanov i sar., 2015, u svojim radovima takođe iznose rezultate nalaženja pesticida u prirodi i unutrašnjim organima divljih ptica.

Od ispitivanih elemenata, arsen predstavlja jedan od najvećih toksikoloških rizika za divlje životinje, s obzirom na to da se u velikoj meri koristi za izradu insekticida, herbicida i u šumarstvu kao sredstvo za zaštitu drveća. Kao što se iz prikazanih rezultata vidi (Tabela 3), izmerena količina arsena u jetri labudova nije značajna (0.004 – 0.027 mg/kg) obzirom da se arsen akumulira u jetri, odakle se sporo oslobađa i raspoređuje u druga tkiva. Ovaj zaključak se takođe odnosi i na sadržaj olova (0.108 - 0.248 mg/kg), čiji je sadržaj relativno nizak i veoma ujednačen kod svih ispitanih uzoraka, jer prema literaturnim podacima (Lawrence, 1994) a i prema našim višegodišnjim ispitivanjima nakupljanje olova u jetri uvek je značajno veće nego u ostale organe i tkiva (Mihaljev i sar., 2014).

Pored arsena i olova, kadmijum takođe predstavlja veoma toksičnu supstancu jer unošenje veće količine kadmijuma u organizam dovodi do mnogobrojnih, štetnih metaboličkih promena kod mnogih vrsta životinja. Kadmijum se, od svih organa, najviše deponuje prvenstveno u jetri. Naši rezultati pokazuju (Tabela 3) da je prosečan sadržaj kadmijuma u ispitanim uzorcima jetre iznosio 0.162 mg/kg, međutim, kod nekih ispitanih jedinki dostizao je i vrednost od 0.473 mg/kg. Slične rezultate za koncentraciju kadmijuma u jetri divljih ptica, dobijali smo i u našim ranijim istraživanjima (Mašić i sar., 2001).

Živa je neesencijalni element i zbog niskog potencijala za prirodnu detoksikaciju a veoma izražene težnje ka deponovanju, naročito u jetri, jedan je od najopasnijih kontaminanata u životnoj sredini. Rezultati naših ispitivanja ukazuju da je živa prisutna u merljivim količinama kod svih ispitanih uzoraka jetre labudova a izmerene vrednosti su se kretale u intervalu 0.007 – 0.188 mg/kg. Ovakav nalaz je u skladu sa rezultatima drugih autora (*Schummer i sar., 2011*) kao i sa našim ranijim ispitivanjima (Mihaljev i sar., 2003).

Iz rezultata datih u Tabeli 3. sledi da su u ispitanim uzorcima jetre labudova izmerene najveće količine gvožđa, bakra i cinka i u proseku su iznosile: za Fe, 1210 mg/kg, za Cu 342.8 mg/kg i za Zn 65.9 mg/kg, što je u potpunosti u skladu sa dosadašnjim saznanjima o bioakumulaciji i ekskreciji ovih elemenata iz organizma ptica (*Navdeep*

and Hanju, 2013). Ovi teški metali se posle resorpcije u krv, veoma brzo raznose do ćelija raznih tkiva i organa, a tolerancija organizma prema ovim metalima zavisi od njihove koncentracije i međusobnog odnosa (*Kastori, 1997*). Na osnovu naših rezultata, sadržaj gvožđa u nativnim uzorcima jetre labudova veoma varira, a neuobičajeno visoke vrednosti kreću se i do 3288 mg/kg.

Ako životinje kontinuirano unose bakar, njegov višak se akumulira u različitim tkivima a prvenstveno u jetri gde oštećuje njene funkcije. Intoksikaciju bakrom mogu izazvati njegova mnogobrojna jedinjenja koja se koriste u poljoprivredi. Naša merenja pokazuju da se sadržaj bakra u jetri ispitanih labudova kretao u intervalu od 81.2 do 810.0 mg/kg sa prosečnom vrednošću od 343 mg/kg što je u korelaciji sa našim prethodnim ispitivanjima (Mihaljev i sar., 2012).

S obzirom na to da cink ima veoma široku primenu u industriji kao i u proizvodnji fungicida i pesticida, predstavlja veoma značajan kontaminant životne sredine. Nakon unošenja u organizam u većoj količini, on stupa u veoma složene metaboličke interakcije sa drugim mikroelementima u jetri, a prvenstveno sa gvožđem i bakrom (Čupić i Mihaljev, 2010). Rezultati prikazani u Tabeli 3. pokazuju da je količina cinka u ispitanim uzorcima jetre labudova veoma ujednačena (21.3 – 126.7 mg/kg) sa prosečnom vrednošću od 65.9 mg/kg.

ZAKLJUČAK

U ispitivanim uzorcima jetre određen je sadržaj pesticida i toksičnih elemenata: olova, kadmijuma, arsena i žive. Određen je sadržaj i gvožđa, bakra i cinka – elemenata koji imaju značajnu fiziološku ulogu u organizmu, ali ako se unesu u organizam u prekomernim količinama, mogu imati i toksične efekte. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da su u uzorcima jetre labudova, od ispitivanih hemijskih kontaminanata najviše zastupljeni gvožđe, bakar i cink. Takođe je veoma važno napomenuti i iznenađujuće prisustvo kadmijuma i žive u povećanim koncentracijama kod nekih uzoraka jetre. Zato, u daljim istraživanjima, treba obratiti posebnu pažnju na utvrđivanje uzroka i porekla ovih elemenata u zemljištu i biljkama. To nas upućuje na to da zagađenje hemijskim kontaminantima u svim delovima biosfere treba sistematski pratiti da bi se uočili eventualni trendovi povećanja, a u cilju što efikasnije zaštite životne sredine. Da bi se i divlje ptice efikasno zaštitile od ovih opasnih agenasa, trebalo bi ispitati što je moguće veći broj uzoraka, kako bi se locirali izvori zagađenja i dobila realnija ekološka slika ispitivanih područja.

ZAHVALNOST/ ACKNOWLEDGMENTS

Istraživanje je finansijski podržano od strane Ministarstva za obrazovanje, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (Projekat br. TR31084).

LITERATURA

1. Božić B., Pajić M., Petrović T., Pelić M., Samojlović M., Polaček V. (2016): Pathologic changes in swans infected with highly pathogenic avian influenza (H5N8) virus. *Archives of Veterinary Medicine*, 9, 2, 77–86.
2. Kartalović B., Mihaljev Ž., Prica N., Jakšić S., Živkov-Baloš M., Ćirković M. (2015): Validacija metode za utvrđivanje rezidua organohlornih pesticida u namirnicama i hrani za životinje, *Arhiv veterinarske medicine*, 8, 1, 37–46.
3. Kastori, R. (1997): Heavy Metals in the Environment, Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, str. 261–297.
4. Kapetanov M., Ljubojević D., Ratajac R., Živkov-Baloš M., Stojanov I., Prica N., Mihaljev Ž. (2015): Relationship between the use of pesticides and survival of grey partridge in Vojvodina, *Ecologica*, 22, 79, 434–437.
5. Lawrence J. B. (1994): A review of lead poisoning in swans, *Camp. Biochem. Physiol.* 108C. 3, 25–267.
6. Mašić Z., Kljajić R., Mihaljev Ž., Živkov-Baloš M., Đilas S. (2001): Teški metali u životnoj sredini kao faktor poremećaja zdravlja životinja, 13. Savetovanje veterinara Srbije, Zbornik radova, referat po pozivu, Zlatibor, 115–126.

7. Mihaljev Ž., Kartalović B., Prica N., Jakšić S., Živkov-Baloš M. (2014): Sadržaj pesticida i toksičnih elemenata u mesu i unutrašnjim organima divljači (područje Vojvodine), Zbornik radova, 3 Međunarodni simpozijum o lovstvu „Savremeni aspekti održivog gazdovanja populacijama divljači“, Zemun – Beograd.
8. Mihaljev Ž., Živkov-Baloš M., Kapetanov M., Jakšić S. (2012): Sadržaj mikroelemenata u divljim pticama sa područja Vojvodine, Međunarodni simpozijum o lovstvu „Savremeni aspekti održivog gazdovanja populacijama divljači“, Zemun-Beograd, 129–131.
9. Mihaljev Ž., Živkov-Baloš M., Ratajac R. (2003): Rasprostranjenost žive u različitim uzorcima iz životne sredine. Ekološki pokret grada Novog Sada, Novi Sad.
10. Navdeep K., Hanju K. (2013): Heavy Metals concentration in excreta of free living wild Birds as indicator of environmental contamination, The bioscan, 8 (3): 1089–1093.
11. Puzović, S., Simić, D., Saveljić, D., Gergelj, J., Tucakov, M., Stojnić, N., Hulo, I., Ham, I., Vizi, O., Šćiban, M., Ružić, M., Vučanović, M., Jovanović, T. (2003): Ptice Srbije i Crne Gore – veličine gnezdišnih populacija i trendovi: 1990–2002. Ciconia 12: 35–120.
12. Schummer M.L., Scott A. Petrie A.S., Shannon S. Badzinski S.S., Misty Deming M., Wei Chen Yu W., Belzile N. (2011): Elemental Contaminants in Livers of Mute Swans on Lakes Erie and St. Clair, Arch Environ Contam Toxicol.
13. Ćupić Ž., Mihaljev Ž. (2010): Uloga i značaj cinka u ishrani ljudi i životinja, Hemijski pregled, god. 51, Srpsko hemijsko društvo, br 5, 121–124.
14. Žuljević, A. (2003): Brojnost i poreklo jata crvenokljunog labuda *Cygnus olor* u Podunavlju u Bačkoj tokom zime 2002/2003, Ciconia 12: 130–135.

Rad primljen: 18.6.2017.

Rad prihvaćen: 7.8.2017.

Pregledni rad

PREDNOSTI I MANE GENOMSKOG OCENJIVANJA PRIPLODNIH BIKOVA

Igor Prka*

Kratak sadržaj

Pomoću analize gena moguće je ranije saznati nešto više o genetskom nasleđu goveda. Analize koje se vrše usmerene su pre svega u pravcu određivanja proizvodnih osobina koje se prenose na potomstvo. Već sada, baza podataka obuhvata desetine hiljada grla i čini podatke dobijene na taj način veoma pouzdanima (oko 75%). Vrednost grla koja su genomski testirana dostižu vrednosti onih progeno testiranih. Pored ovih podataka koji se tiču proizvodnih osobina goveda, analizom genoma došlo se do informacija i o genetskim anomalijama koje se prenose pre svega preko semena priplodnih bikova. Analize se rade kod mladih životinja ali i kod starijih, kako bi se uporedili rezultati progenih rezultata potomaka.

Nakon izbora mladog teleta i određivanjem markera, sa oko dva meseca, te poređenjem s markerima referentne populacije, dobija se zadovoljavajuća pouzdana procena njegove priplodne vrednosti u tom uzrastu. Seme takvog bika počinje da se koristi sa 14 meseci, kada je testiranje već završeno. Pored većeg genetskog napretka, genomski selekcija omogućava i bolju kontrolu porekla i sprečavanje uzgoja u srodstvu, a najveća prednost genomске селекције је у побољшању својстава са niskom heritabilnošću, kao što su dugovečnost, lakoća teljenja i plodnost. Praksa korišćenja mladih, genomski testiranih bikova se povećava u Evropi ali nosi i svoje rizike jer pouzdanost odgajivačkih vrednosti mladih bikova nije još na dovoljno visokom nivou da bi se bilo koji od njih masovno koristio bez ograničenja.

Poslednjih godina, pored opravdanog uvoza kvalitetnih bikova i semena iz drugih zemalja, došlo je i do uvoza prosečnih bikova koji ne osiguravaju očekivani genetski napredak u uzgoju, a broj testiranih bikova iz nacionalnog odgajivačkog programa sveden je na minimum. Navedeni faktori doveli su do velike opasnosti da će se „izgubiti geni“ koji predstavljaju nacionalno bogatstvo i koji u velikoj meri omogućavaju prilagođavanje gajenja u našem podneblju, te doprinose ukupnoj genetskoj raznolikosti.

Ključne reči: genomski selekcija, priplodni bik, veštačko osemenjavanje

* Centar za skladištenje i distribuciju semena za veštačko osemenjavanje Toplek, Belosavci, Republika Srbija / Center for storage and distribution of semen for artificial insemination Toplek, Belosavci, Republic of Serbia

Elektronska pošta korespondentnog autora / E-mail of Corresponding Author: igorprka@yahoo.com

DOI: 10.7251/VETJ1702203P

UDK 591.463.1:636.237

Review paper

ADVANTAGES AND DISADVANTAGES OF GENOMIC EVALUATION OF BREEDING BULLS

Igor Prka*

Abstract

Using analysis of genes it is possible to previously know more about the genetic heritage of cattle. The analyzes carried out are directed primarily towards determining the production characteristics that are transmitted to offsprings. Already, the database includes tens of thousands of animals and makes the data obtained in this way is very confident (about 75%). The value of animals that have tested genomic reach values of those who are progeny tested. In addition to these data concerning that the production traits of cattle, genome analysis came to the information and the genetic anomalies are transmitted primarily through semen of breeding bulls. Analyses are performed in young animals but also the elderly in order to compare the results of progeny results descendants.

After the selection of young calves and the determination of markers, within about two months, and by comparison with the reference population markers obtained satisfactory reliable estimate of its breeding value at that age. When semen of that breeding bull starts to be used for artificial insemination, with about 14 months age, a young animal was already tested. In addition to greater genetic progress, genomic selection allows better control of origin and prevention of breeding in relationship, but the biggest advantage of genomic selection is to improve the traits with the low heritability, such as longevity, easycalving and fertility. The practice of using young genomic tested bulls is increasing in Europe but carries its own risks, because the reliability of the breeding values of young bulls is not yet at a sufficiently high level to any of them massively used without restrictions.

Keywords: genomic selection, breeding bull, artificial insemination

UVOD / INTRODUCTION

Poslednjih godina, pored opravdanog

uvoza kvalitetnih bikova i semena iz drugih zemalja, došlo je i do uvoza prosečnih bikova koji ne osiguravaju

* Center for storage and distribution of semen for artificial insemination Toplek, Belosavci, Republic of Serbia

E-mail of Corresponding Author: igorprka@yahoo.com

I. Prka:

Prednosti i mane genomskog ocenjivanja priplodnih bikova

očekivani genetski napredak u uzgoju, a broj testiranih bikova iz nacionalnog odgajivačkog programa sveden je na minimum. Navedeni faktori doveli su do velike opasnosti da će se „izgubiti geni“ koji predstavljaju nacionalno bogatstvo i koji u velikoj meri omogućavaju prilagođavanje gajenja u našem podneblju, te doprinose ukupnoj genetskoj raznolikosti.

Selekcijom se ne stvaraju novi geni već se menja njihova učestalost, a cilj svake selekcije je povećanje frekvencije poželjnih, a smanjenje frekvencije nepoželjnih gena. Promene u frekvenciji gena dovode do promene genotipova, a posledica svega toga je i promena fenotipova populacije.

Brzi razvoj molekularne genetike omogućio je direktnu analizu genoma životinja, proučavanje strukture i funkcije gena, te tako doprineo boljem razumevanju delovanja nasledne osnove. Pružajući uvid u strukturu i funkciju genoma, oblikovane genske karte domaćih životinja i genetski markeri postaju oruđe delotvornije selekcije, unapređenja bitnih proizvodnih svojstava, eliminacije naslednih bolesti i veće pouzdanosti u selekcijskom radu. Primenom znanja iz molekularne genetike, omogućavaju se bolji rezultati u selekciji, naročito za svojstva koja se teško poboljšavaju korištenjem metoda konvencionalne (fenotipske) selekcije, i to svojstava niskog heritabiliteta ili svojstava čiji se fenotip teško meri (dugovečnost, otpornost na bolesti) ili merenje nije izvodljivo kod kandidata za selekciju (klanična svojstva).

Kako su veterinarima često ti koji pored samog veštačkog osemenjavanja krava farmerima preporučuju i seme bikova za korišćenje, postoji potreba za detaljnije tumačenje vrednovanja genomski testiranih mladih bikova, pre svega kod simentalске rase, kao najzastupljenije kod nas.

PROGENO TESTIRANJE PRIPLODNIH BIKOVA / PROGEN TESTING OF BREEDING BULLS

Selekcija po potomstvu temelji se na proizvodnim podacima potomaka životinje čiju odgajivačku vrednost nameravamo proceniti. Takav oblik selekcije naziva se još i progeni test. U progenom testu jedinka se ocenjuje na temelju proseka svoga potomstva. Taj prosek zavisi od nasledne osnove i uslova spoljašnje sredine, tj. proseka fenotipova potomaka (Uremović, 2002).

Što je veći broj potomaka, to je i tačnija ocena njihovog fenotipa. Potrebno je najmanje pet godina da bi se dobili rezultati. Selekcija po progenom testu ima i svoje nedostatke, a koji se sastoje u tome da se zbog dužeg generacijskog intervala podaci o odgajivačkoj vrednosti dobiju relativno kasno, a za donošenje selekcijskih odluka potrebne su informacije što je moguće ranije. Osim navedenih nedostataka tu su još i sporo i skupo testiranje priplodnih bikova, te je nemoguće brzo preusmeravanje odgajivačkih ciljeva. Ovaj dugotrajan i skup proces moguće je skratiti uvođenjem genomske selekcije. Već u

prvom mesecu života moguće je odrediti da li je tele nasledilo određene poželjne gene određivanjem genetskih markera (Calus, 2009).

GENOMSKA SELEKCIJA / GENOMIC SELECTION

Genomska selekcija podrazumeva korišćenje genetičkih informacija koje se mogu dobiti direktnom analizom genoma (DNK) životinje za raniji i bolji opis njene priplodne vrednosti (Veerkamp, 2009). Ovo je omogućeno dešifrovanjem genoma govečeta 2004. godine i razvijanjem postupaka njegove analize uz pomoć kojih se brzo i ekonomski povoljno može ispitati mnogo hiljada lokusa gena istovremeno, kao i utvrđivanjem velikog broja genetskih markera (Collard, 2005.)

Polimorfizam pojedinačnih nukleotida (Single Nucleotide Polymorphism – SNP) označava genomske markere, koji leže vrlo blizu gena ili direktno u njima. SNP su jednostavno markeri koji

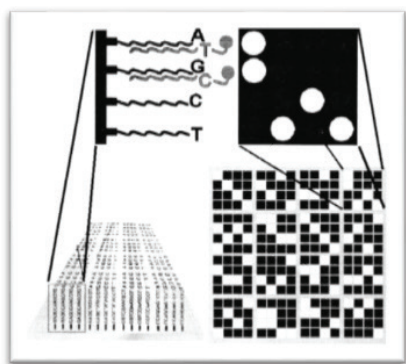
su pogodni za genotipizaciju (Falconer, 1996). Oni omogućuju veoma rano determinisanje osobina koje na primer tele nasleđuje od svojih roditelja. Na osnovu ovih informacija mogu se predvideti karakteristike nekog grla u njegovom ranom uzrastu, odmah po rođenju. Odgovarajućom statističkom analizom za sve SNP, ocenjuje se njihov odnos, odnosno njihov udeo u priplodnoj vrednosti. Genomska priplodna vrednost (gPV) jedne životinje je izračunata suma svih SNP efekata (Hayes, 2007).

Sam proces genotipizacije postavlja relativno visoke zahteve u pogledu kvaliteta DNK, mogu se koristiti uzorci semena, korena dlake, tkiva, ali se krvne probe smatraju pravim izborom (Weigel, 2010).

Firma Illumina iz San Dijega (SAD) prva je razvila i krajem 2007. ponudila čip za identifikaciju mesta gena u kome se nalazi preko 50.000 ravnomerno razvrstanih SNP genoma govečeta (Wiggans, 2011) (slika 1).

Veoma je značajno određivanje vrednosti svakog pojedinačnog markera. Ono se radi u odnosu na tzv. referentnu populaciju. Referentna populacija je grupa bikova sa sigurnim priplodnim vrednostima zasnovanim na podacima progenog testa (konvencionalna priplodna vrednost) i ispitanim DNK profilom. Ona čini potrebnu osnovu za izračunavanje pouzdanih genomskih efekata i genomskih priplodnih vrednosti (Scheffers, 2012).

Mlada grla na koja se odnose ova izračunavanja priplodnih vrednosti



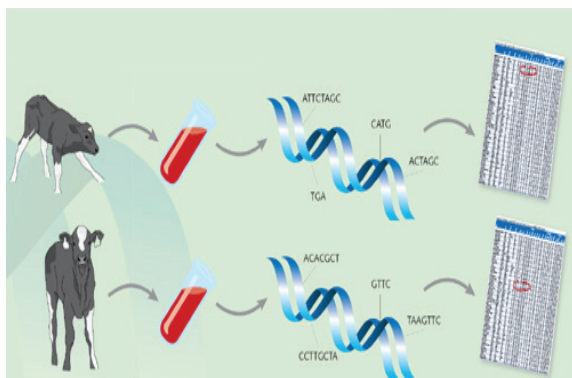
Slika 1. Šematski prikaz principa genotipizacije pomoću SNP čipa

označavaju se kao kandidati za selekciju. Kao uslov navodi se da referentna populacija treba da uključuje najmanje oko 2.000 bikova s preciznim indeksima za proizvodne i funkcionalne osobine (Sullivan, 2009). Kako mnoge selekcijske organizacije u Evropi sarađuju međusobno, stvorena je mogućnost da referentna populacija bude daleko brojnija od ovog standarda. Uz pomoć rezultata dobijenih analizom SNP izvode se obrasci ocene za proizvodne i funkcionalne osobine i iskazuju priplodne vrednosti mladih grla (Patry, 2011). Određivanjem efekata za svaki marker u odnosu na prosek i sabiranjem efekata svih markera za pojedina grla dobijaju se indeksi genomске селекције. Genomski testovi se mogu sprovoditi odmah po rođenju, ili čak i ranije ukoliko se može uzeti uzorak. (Cassell, 2010).

Genomska selekcija se u odgajivačkom programu koristi od 2008. god. U dosadašnjoj praksi testiranja bikova po potomstvu, da bi se garantovala njihova priplodna vrednost, bilo je potrebno da se ona bazira na najmanje 100 na mlečnost ispitanih kćeri. Ovaj sistem se potvrdio u prošlosti kao veoma dobar, s izuzetnim doprinosom u osobinama mlečnosti i eksterijera (Habier, 2009). U praksi doduše postoje dva faktora koja ograničavaju maksimalan genetski

napredak – preferencijalni tretman bikovskih majki i dug generacijski interval kod goveda. Genomska selekcija eliminiše oba ova ograničenja, jer se priplodna vrednost individua oba pola utvrđuje direktnom analizom genoma i to u najranijem uzrastu. I dok su u progenom testu pouzdani podaci o kvalitetu bika, u najboljem slučaju, na raspolaganju kada je on pet godina star, s genomskom selekcijom ovaj proces se znatno skraćuje (Avisé, 2004).

Pouzdanost priplodnih vrednosti od 99 odsto se postiže samo u progenom testu za bikove koji imaju dokazano veliki broj kćeri s proizvodnjom (Henderson, 1976). Rezerve mnogih proizvođača mleka u Evropi prema novoj metodi selekcije otklonjene su kada je počelo objavljivanje poređenja indeksa priplodnih vrednosti bikova na bazi podataka o njihovim kćerima s njihovim čisto genomskim vrednostima utvrđenim ranije. To potvrđuje i stepen korišćenja genomskih mladih bikova u osemenjavanju krava u pojedinim zemljama. U 2014. god. u Nemačkoj je taj udeo bio 47 odsto, Francuskoj 49 odsto, Španiji 46 odsto, asocijaciji (Holandija/Flandrija) 42 i asocijaciji Viking (Danska, Finska, Švedska) čak 60 odsto (Fürst C., 2016).



Slika 2. Fenotipovi se prikupljaju i ocenjuju samostalno u svakoj zemlji, što za rezultat ima dobijanje procenjene odgajivačke vrednosti. Podaci se razmenjuju i kombinuju preko Interbull-a (organizacija koja je odgovorna za međunarodno genetsko vrednovanje bikova), pa se seme takvih bikova može slobodno prodavati po celom svetu (Wiggans, 2011).

Pored selekcije bikova, ova tehnologija se može koristiti i za selekciju krava za koje možemo proceniti odgajivačku vrednost na isti način i s istom tačnošću. U budućnosti, uspešnost progenog testiranja će se značajno povećati, jer će unapred biti poznato da li je mladi bik nasledio povoljan uzorak gena svojih roditelja i pre početka njegovog korištenja za priplod. Najznačajniji doprinos genotipiziranja tako mladih jedinki je značajno smanjenje generacijskog intervala (Rogers, 2008).

Stručnjaci u Centrima za veštačko osemenjavanje, koriste genomsku selekciju kao preliminarnu za mlade bikove. Iz velikog broja muške teladi oni na ovaj način mogu izabrati grupu potencijalnih bikova koji će se koristiti kao mladi očevi. Smanjenjem broja mladih bikova, smanjuje se trošak uzgoja (Meuwissen, 2001). Pored većeg genetskog napretka, genomski selekcija omogućava i bolju kontrolu porekla i sprečavanje uzgoja u srodstvu, a najveća prednost genomski selekcije je u poboljšanju svojstava sa niskom heritabilnošću kao što su dugovečnost, lakoća teljenja i plodnost. U poređenju s

klasičnim progenim testom, pouzdanost genomskog testa je manja za proizvodne i eksterijerne osobine (Habier, 2007).

Činjenica je da Srbija nema dovoljno veliku referentnu populaciju za razvoj sopstvene SNP jednačine, pa je stoga potrebno uključivanje u jedan od velikih sistema, na primer Nemačke i Austrije (DEU/AT sistem), odakle je i poreklom najveći broj priplodnih bikova simentalne rase kod nas.

Prateći šta se događa u DEU/AT sistemu uzgoja, posebno trendove nakon uvođenja genomski selekcije, može se zapaziti da se udeo korištenja mladih bikova povećao, posebno kod austrijskih odgajivača, gde neki od njih već prelaze 70%-tno korištenje genomski bikova. Ovakva praksa ima svoje prednosti, brži je genetski napredak, ali ima i rizika jer pouzdanost odgajivačkih vrednosti mladih bikova nije još na dovoljno visokom nivou da bi se bilo koji od njih masovno koristio bez ograničenja. Rizik se smanjuje korištenjem više bikova po manji broj doza sve do dobijanja prvih rezultata na kćerima u proizvodnji – progenih testova.

Na sledećih nekoliko konkretnih primera možemo videti koliko genomski testovi mogu „zavarati“, tj. koliko su pouzdani. Progeni testovi mogu biti lošiji ili bolji te, često mogu potpuno promeniti odluku o korišćenju nekog

bika. Posebno treba obratiti pažnju na brojke u zagrada, % pouzdanosti, indeksi u genomskom razdoblju imaju pouzdanost <70%, a prvi progeni testovi dižu pouzdanost na 80–90%.

Tabela 1. HermannAT 000375872116, rođ. 14.11.2008., simentalac



mesec/godina	UPV	Mlečnost	Mleko	M.M.	Prot.	Per.	Mesnatost	Fitnes	Brzina muže
Decembar 2012	130 (69%)	124 (68%)	+912	+35	+27	105	104 (70%)	112 (68%)	115 (67%)
April 2013	129 (71%)	122 (68%)	+859	+33	+25	104	108 (91%)	112 (69%)	113 (68%)
Avugust 2013	130 (72%)	121 (69%)	+785	+31	+24	103	111 (97%)	115 (71%)	112 (69%)
Decembar 2013	126 (78%)	116 (78%)	+717	+21	+22	106	112 (98%)	116 (74%)	104 (82%)
April 2014	121 (89%)	111 (94%)	+563	+16	+14	110	112 (98%)	117 (79%)	88 (95%)

Hermann (Hades x Winnipeg) je austrijski bik koji je dosta korišten kao mladi genomski, ali progeni testovi se nisu pokazali dobri, došlo je do pada

indeksa mleka za čak 13 bodova, veliki pad odgajivačke vrednosti za količinu mleka a najviše mu je pala vrednost za brzinu muže sa odličnih 115 na loših 88.

Tabela 2. Helderberg, DE 000943975145, rođ. 30.03.2009, simentalac



mesec/godina	UPV	Mlečnost	Mleko	M.M.	Prot.	Per.	Mesnatost	Fitnes	Brzina muže
Decembar 2012	119 (67%)	115 (66%)	+444	+18	+20	108	100 (63%)	111 (66%)	100 (65%)
April 2013	117 (67%)	112 (66%)	+378	+13	+17	108	100 (63%)	112 (67%)	98 (65%)
Avugust 2013	116 (68%)	110 (67%)	+351	+ 9	+16	105	99 (63%)	115 (69%)	98 (66%)
Decembar 2013	123 (72%)	116 (69%)	+628	+16	+22	105	107 (94%)	113 (70%)	101 (69%)
April 2014	127 (80%)	127 (82%)	+1167	+39	+34	98	102 (94%)	104 (73%)	109 (83%)

Helderberg(Hades x Wal). Potpuno suprotno događalo se ovom bavarskom Hermannovom bratu po ocu. Nije bio puno korišćen kao mladi genomski bik pa za sada ima 56 kćeri u početku laktacije

samo u Bavarskoj (u 51. stadu). Sve to donosi mu za sada pouzdanost malo iznad 80%, ali vidi se odličan trend rasta, posebno količine mleka i muže.

Tabela 3. Hochwurze, AT 000866230314, rođ.29.03.2008, simentalac

mesec/ godina	UPV	Mlečnost	Mleko	M.M.	Prot.	Per.	Mesnatost	Fitnes	Brzina muže
Decembar 2012	116 (72%)	110 (69%)	+366	+13	+12	104	98 (87%)	113 (70%)	105 (69%)
April 2013	115 (73%)	111 (72%)	+446	+15	+13	102	98 (88%)	111 (70%)	106 (73%)
Avgust 2013	119 (78%)	115 (78%)	+868	+17	+22	107	98 (88%)	111 (74%)	108 (82%)
Decembar 2013	126 (82%)	121 (85%)	+1119	+23	+31	114	98 (89%)	113 (75%)	108 (86%)
April 2014	127 (85%)	124 (88%)	+1235	+28	+34	115	97 (89%)	113 (77%)	104 (88%)

Primer bika koji je sa genomskom završetkom progenog testa dostigao 127, ocenom za ukupnu priplodnu vrednost kao i status bikovskog oca. bio na 115 u aprilu 2013.g. da bi sa

Tabela 4. Matogroso, DE 000942741459, rođ.08.05.2008. simentalac

mesec/godina	UPV	Mlečnost	Mleko	M.M.	Prot.	Per.	Mesnatost	Fitnes	Brzina muže
Decembar 2012	115 (72%)	113 (70%)	+436	+17	+17	96	98 (89%)	108 (69%)	104 (69%)
April 2013	123 (80%)	120 (83%)	+971	+20	+30	103	100 (91%)	111 (73%)	111 (83%)
Avgust 2013	128 (85%)	125 (89%)	+1198	+33	+36	106	100 (91%)	110 (76%)	112 (88%)
Decembar 2013	125 (87%)	123 (91%)	+1114	+29	+33	106	100 (91%)	108 (77%)	110 (90%)
April 2014	125 (87%)	123 (91%)	+1095	+27	+33	107	100 (91%)	108 (78%)	109 (90%)

Tabela 5. Mattawa, DE 000942900133, rođ. 27.03.2008. simentalac

mesec/godina	UPV	Mlečnost	Mleko	M.M.	Prot.	Per.	Mesnatost	Fitnes	Brzina muže
Decembar 2012	120 (71%)	126 (69%)	+921	+34	+33	103	84 (90%)	105 (69%)	112 (68%)
April 2013	115 (75%)	121 (75%)	+591	+26	+28	105	85 (92%)	103 (71%)	114 (75%)
Avgust 2013	108 (83%)	114 (86%)	+305	+21	+18	102	85 (92%)	101 (75%)	110 (87%)
Decembar 2013	103 (86%)	108 (89%)	+160	+16	+10	97	86 (92%)	101 (77%)	107 (88%)
April 2014	106 (87%)	110 (90%)	+113	+20	+12	99	86 (92%)	104 (77%)	107 (89%)

Među najvećim „razočarenjima“ brojni su Rau-ovi sinovi od kojih se puno očekivalo:

Tabela 6. **Rave**, AT000400484214, rođ. 26.02.2008. simentalac


mesec/godina	UPV	Mlečnost	Mleko	M.M.	Prot.	Per.	Mesnatost	Fitnes	Brzina muže
Decembar 2012	133 (73%)	127 (71%)	+1065	+34	+37	99	97 (94%)	123 (71%)	105 (71%)
April 2013	127 (79%)	121 (80%)	+747	+23	+31	96	97 (94%)	120 (75%)	105 (85%)
Avгust 2013	124 (87%)	117 (90%)	+629	+12	+26	95	97 (96%)	122 (78%)	102 (92%)
Decembar 2013	122 (89%)	116 (93%)	+637	+17	+24	101	96 (97%)	119 (80%)	103 (94%)
April 2014	120 (90%)	113 (94%)	+567	+12	+20	99	97 (98%)	119 (81%)	103 (94%)

Tabela 7. **Rooney**, AT 000400479514, rođ. 16.02.2008. simentalac


mesec/godina	UPV	Mlečnost	Mleko	M.M.	Prot.	Per.	Mesnatost	Fitnes	Brzina muže
Decembar 2012	120 (76%)	118 (76%)	+813	+19	+25	86	94 (92%)	114 (71%)	104 (79%)
April 2013	106 (83%)	106 (86%)	+82	+4	+9	89	93 (93%)	107(74%)	97 (89%)
Avгust 2013	103 (86%)	102 (90%)	0	0	+3	85	94 (93%)	107(77%)	95 (91%)
Decembar 2013	102 (87%)	100 (91%)	-18	-1	+1	82	93 (93%)	109 (78%)	96 (91%)
April 2014	101 (88%)	100 (91%)	-12	-2	0	79	93 (93%)	108 (79%)	96 (91%)

Pouzdanost genomskih testova za eksterijer prilično je niska, posebno za osobine nogu i papaka (ispod 60%) i zato je izuzetno važno ocenjivanje eksterijera kćeri bikova koje koristimo u osemenjavanju. Za to su nam neophodni specijalizovani ocenjivači koji bi dobro sarađivali sa farmerima i kontinuirano se međusobno usklađivali u ocenama, te stalno komunicirali sa ocenjivačima iz najjačih uzgoja (AT/DEU/CZ/IT). Njihove ocene i preporuke bi tada bile značajne.

GENETSKI DEFEKTI / GENETIC DEFECTS

Pored ovih podataka koji se tiču proizvodnih osobina goveda, analizom genoma došlo se do informacija i o genetskim anomalijama koje se prenose pre svega preko

semena priplodnih bikova. Analize se rade kod mladih životinja ali i kod starijih kako bi se uporedili rezultati progenih rezultata potomaka. Tako da ne treba da čudi otkrivanje genetskih anomalija i kod bikova za koje se smatralo da ih ne prenose na potomstvo. Odnosno, nije isključeno da će se u budućnosti lista bikova sa ovim negativnim podacima i proširiti. Najjednostavnija i najsigurnija taktika bi bila nadalje koristiti samo bikove slobodne od genetskih defekata, ali to je lakše reći nego sprovesti, jer dostupnost semena bikova nije svuda jednaka pa su pojedini farmeri prisiljeni koristiti i bikove nosioce (Gholap, 2014).

Genetski defekti još uvek ne pričinjavaju bitne ekonomske štete, ali ako bi se zanemarivalo i ignorisalo njihovo postojanje,

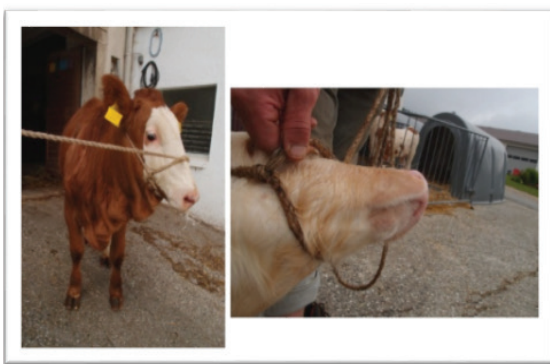
neminovno širenje u populaciji donelo bi sve veće štete. U razvijenim govedarstvima, bikovi nosioci se koriste kontrolisano i

ograničeno. Podaci koji se objavljuju o bikovima sadrže i podatke o genetskim anomalijama (A, BMS, P, TP, ZDL, DW, FH2).

Slika 3. Arachnomelia (A)



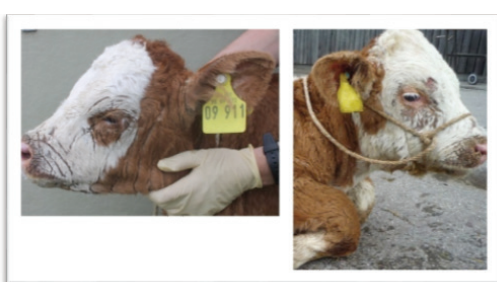
Slika 4. Patuljast rast (DW)



Slika 5. Fankoni Bikelov sindrom – usporen rast (FH2)



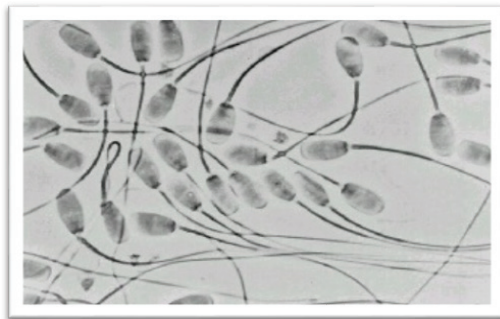
Slika 6. Sindrom nedostatka cinka (ZDL)



Slika 7. Trombopatija (TP), hemofilija



Slika 8. Subfertilnost bikova (BMS)



ZAKLJUČAK

Razvojem genomske selekcije, odnosno procene odgajivačke vrednosti goveda na osnovu genoma, otvorena je mogućnost da se mladi priplodni bikovi mogu koristiti u priplodu ranije nego što je to bilo konvencionalnim putem. Glavna je prednost genomske selekcije da se za životinju odmah po sprovedenoj genotipizaciji može izračunati genomska odgajivačka vrednost putem SNP jednačine. Pošto se životinje genotipiziraju pri rođenju, genomska selekcija omogućava smanjenje generacijskog intervala, značajno se smanjuju troškovi testiranja i dolazi do dodatnog povećanja genetskog napretka i selekcijskog inteziteta. Takođe, ovom metodom se kontroliše poreklo goveda, smanjuje mogućnost gajenja u srodstvu i stvara mogućnost otkrivanja genetskih defekata koji mogu prouzrokovati ekonomske štete. Genomski testovi mogu zavarati, jer progeni testovi mogu biti lošiji, te često potpuno promeniti odluku o korišćenju nekog bika.

LITERATURA / REFERENCES

1. Avise, J. C. (2004): *The hope, hype, and reality of genetic engineering*. Oxford University Press. New York, 135–138.
2. Calus, M. P. L. (2009): *Genomic breeding value prediction: methods and procedures*. Animal 4 (2), 157–164.
3. Cassell, B. (2010): *Genetic Improvement Using Young Sires With Genomic Evaluations*. Virginia Cooperative Extension, Publication 404-090, 1–8.
4. Collard, B. C. Y., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer J. B., Pang, E. C. K. (2005): *An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts*. Euphytica 142, 169–196.
5. Falconer, D.S., Mackay, T.F.C. (1996): *Introduction to Quantitative Genetics*. Fourth edition. Longman Group Ltd. 1529–1536.

6. Fürst Christian, (2016): *Vorstellung von nachkommen geprüften Stieren und genomischen Jungstieren*. Fleckvieh Austria Magazin 2/16. 24–29.
7. Gholap P.N., Kale D.S. and Sirothia A.R. (2014): *Genetic Diseases in Cattle: A Review*. Research Journal of Animal Veterinary and Fishery Sciences. vol 2/2, 24–33.
8. Habier, D., Fernando, R. L., Dekkers, J. C. M. (2007): *The Impact of Genetic Relationship Information on Genome-Assisted Breeding Values*. Genetics 177, 2389–2397.
9. Habier, D., Fernando, R. L., Dekkers, J. C. M. (2009): *Genomic Selection Using Low-Density Marker Panels*. Genetics 182, 343–353.
10. Hayes, B. (2007): *QTL Mapping, MAS, and Genomic Selection. A short-course*. Animal Breeding & Genetics Department of Animal Science. Iowa State University. 3–4, 66.
11. Henderson, C. R. (1976): *A simple method for computing the inverse of a numerator relationship matrix used in prediction of breeding values*. Biometrics 32–69. 32.
12. Meuwissen, T. H. E., Hayes, B. J., Goddard, M. E. (2001): *Prediction of Total Genetic Value Using Genome - Wide Dense Marker Maps*. Genetics 157, 1819–1829.
13. Patry, C., Ducrocq, V. (2011): *Accounting for genomic preselection in national BLUP evaluations in dairy cattle*. Genetics Selection Evolution, 43(30).
14. Rogers, G. W., Van Tassell, C. P., Van Raden, P. M., Wiggans, G. R. (2008): *Four ways genomic selection will change dairy cattle genetic improvement in the near future*. Progressive Dairyman Publishing. 366–383.
15. Schefers, J. M., Weigel, K. A. (2012): *Genomic selection in dairy cattle: Integration of DNA testing into breeding programs*. Animal Frontiers 2 (1), 4–9.
16. Sullivan, P. (2009): *Options for Combining Direct Genomic and Progeny-Test Results*. Genetic Evaluation Board Meeting, June 24, 2009.
17. Uremović, Z., Uremović, M., Pavić, V., Mioč, B., Mužić, S., Janječić, Z. (2002): *Stočarstvo*. Agronomski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, 55, 74.
18. Veerkamp, R., Calus, M. P. L. (2009): *Genomics revolution*. Veepromagazine 71, 4–6.
19. Weigel, K. (2010): *Understanding Genomics and Its Applications on a Commercial Dairy Farm*. High Plains Dairy Conference. Amarillo, Texas.
20. Wiggans, G. R., Vanraden, P. M., Cooper, T. A. (2011): *The genomic evaluation system in the United States: past, present, future*. Journal of Dairy Science 94(6), 3202–3211.

Rad primljen: 18.6.2017.

Rad prihvaćen: 21.10.2017.

DOI: 10.7251/VETJ1702215G

UDK 636.085:[615.918:616-073

Оригинални научни рад

ПРИМЕНА УЛТРАЗВУКА У ОТКРИВАЊУ ЗАПАЉЕНСКИХ ПРОМЕНА У ВИМЕНУ КРАВА КОД СУБКЛИНИЧКИХ МАСТИТИСА

**Анна-мари Галфи¹, Коста Петровић², Ивана Давидов¹, Мира Говорчин²,
Миодраг Радиновић¹**

Кратак садржај

Контрола здравља вимена крава је битан елемент у процесу производње здравствено безбедног млека, те се на фармама високомлечних крава, кроз програм контроле маститиса, редовно спроводе мере откривања и превенције болести вимена. У циљу откривања промена у паренхиму вимена може се применити ултразвучни преглед који омогућава визуализацију структурних промена вимена насталих као последица упалних процеса и тако олакшава дијагностику обољења. Истраживање је спроведено на фарми високомлечних крава холштајн фризијске расе, при чему је укупно прегледано 56 животиња Калифорнија маститис тестом у циљу идентификовања крава са субклиничким маститисом. Ултразвучни преглед вимена крава урађен је код свих 56 крава, где је код 24 краве паренхим био очуван, а код 32 краве је утврђен субклинички маститис Калифорнија маститис тестом. Ултразвучни преглед паренхима вимена урађен је методом директног контакта. Код 27/32 (84,38%) крава уочена је нехомогеност паренхима са смањењем анехогености млечних каналића. Код 5/32 (15,62%) крава паренхим вимена се ултразвучно визуализовао као хомогена, хиперехогена структура са анехогеним подручјима која одговарају крвним судовима и млечним каналићима. Код субклиничког маститиса, паренхим вимена уочава се као нехомогена структура са смањењем јасне визуализације млечних алвеола и каналића. Повећан број соматских ћелија у млеку, као последица запаљеног процеса, доводи до промена у паренхиму вимена крава.

Кључне речи: ултразвук, крава, виме, субклинички маститис

¹ Анна-мари Галфи, Ивана Давидов, Миодраг Радиновић, Департман за ветеринарску медицину, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду, Трг Доситеја Обрадовића 8, Нови Сад, Република Србија

² Коста Петровић, Мира Говорчин, Катедра за радиологију, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду, Хајдук Вељкова 3, Нови Сад, Република Србија
Адреса коресподентног аутора: annamariagalfi@gmail.com

DOI: 10.7251/VETJ1702215G

UDK 636.085:[615.918:616-073

Original scientific paper

USE OF ULTRASOUND IN DETECTION OF INFLAMMATORY CHANGES IN COWS UDDER WITH SUBCLINICAL MASTITIS

Annamaria Galfi¹, Kosta Petrović², Ivana Davidov¹, Mira Govorčin², Miodrag Radinović¹

Abstract

Control of udder health is an essential element in the process of safe milk production, thus, through the mastitis control program, dairy farms regularly conduct measures of detection and prevention of udder diseases. In order to detect changes in the parenchyma of the udder, an ultrasound can be applied which allows visualization of udder structural changes incurred as a result of inflammatory processes, thus facilitating diagnosis of diseases. The study was conducted on a dairy farm of Holstein – Friesian breed, where were in total examined 56 cows with California mastitis test in order to identify cows with subclinical mastitis. In this study, all 56 cows were examined by ultrasound. There were 24 cows with healthy udder parenchyma and 32 cows were with subclinical mastitis positive by California mastitis test. Ultrasound examination of the udder parenchyma is performed using the direct contact method. In 27/32 (84,38%) cows was observed non – homogenous parenchyma with increased anechogenicity of lactiferous ducts. In 5/32 (15,62%) cows udder parenchyma was appeared homogenous hyperechogenic structure with anechoic areas that correspond to blood vessels and lactiferous ducts. In subclinical mastitis, udder parenchyma appeared as non – homogenous structure with a lack of clear visualisation of milk alveoli and lactiferous ducts. Increased somatic cell count leads to inflammatory process and changes in parenchyma of cow udder.

Keywords: ultrasonography, cow, udder, subclinical mastitis

¹ * Annamaria Galfi, Ivana Davidov, Miodrag Radinović, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad

² Kosta Petrović, Mira Govorčin, Faculty of Medicine, University of Novi Sad
Corresponding author: annamariagalfi@gmail.com

УВОД / INTRODUCTION

Маститис представља једну од најзначајнијих болести високомлечних крава која наноси велике економске губитке, при чему утиче на квалитет и хигијенску исправност млека, као и на добробит животиња (Khan и Khan, 2006). Најчешћи узрок настанка запаљења вимена је продор патогених микроорганизама преко сисног канала у виме, при чему се болест карактерише патолошким променама у ткиву млечне жлезде (Nielsen, 2009).

Током периода лактације и инволуције млечне жлезде крава, неопходно је редовно спроводити клиничке прегледе вимена, адспекцијом и палпацијом, ради утврђивања присуства поремећаја здравственог статуса. Клинички преглед, као основна метода прегледа вимена, омогућава једноставну и лаку дијагностику споља видљивих промена на вимену, али најлази на потешкоће у детекцији промена у паренхиму вимена. У циљу откривања промена у паренхиму вимена крава, може се применити ултразвучни преглед који омогућава визуализацију структурних промена вимена насталих као последица упалних процеса и тако олакшава дијагностику обољења.

Прво ултразвучно снимање сисе вимена крава урадили су Caruolo i Mochrie (1967), при чему су користили ултразвучни апарат у А моду и сонду фреквенције 1 MHz, док су Cartee и сар. (1986) обавили испитивање структурних промена паренхима вимена ул-

трасонографијом у Б моду. Током последњих година, ултразвук је нашао широку примену у дијагностици субклиничког маститиса код високомлечних крава. Истраживања су показала да ултрасонографија пружа значајне информације о здравственом статусу вимена и омогућава визуализацију њених структура (Flöck и Winter, 2006; Hussein и сар., 2015).

Циљ истраживања је да се укаже на значај ултразвучне дијагностике у раном откривању субклиничког маститиса код високомлечних крава.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ / MATERIAL AND METHODS

Истраживање је спроведено на фарми високомлечних крава холштајн фризијске расе на територији Аутономне Покрајине Војводине Републике Србије. Укупно је прегледано 56 крава старости 3–5 година, у периоду касне лактације. Током тог периода лактације, може се уочити повећање броја соматских ћелија у млеку. Пре ултразвучног прегледа вимена крава, урађен је Калифорнија маститис тест у циљу откривања субклиничког маститиса. Код крава, са позитивним налазом Калифорнија маститис теста, урађен је ултразвучни преглед вимена.

Пре ултразвучног прегледа, виме крава се очистило и опрало од нечистоћа. Длака се није шишала, пошто је виме високомлечних крава слабо обрасло њима и не ометају ултразвучни преглед. Потом се апликовао гел за ултразвучни преглед на ултразвучну

сонду и кожу вимена како би се осигурао добар контакт између сонде и коже. Ултразвучна визуализација вимена крава урађена је директном методом (транскутана ехографија), при чему се користио апарат *Esaote pie medical – falco* (Холандија) и линеарна сонда фреквенције 6–8 MHz (слика

1). Како би се извршила визуализација целог паренхима вимена крава, ултразвучна сонда се постављала у проксимално дистални и кранио каудални положај и померала у свим правцима по површини коже вимена (Fasulkov, 2012).



Слика 1. Ултразвучни преглед паренхима млечне жлезде (Галфи, 2016).

РЕЗУЛТАТИ / RESULTS

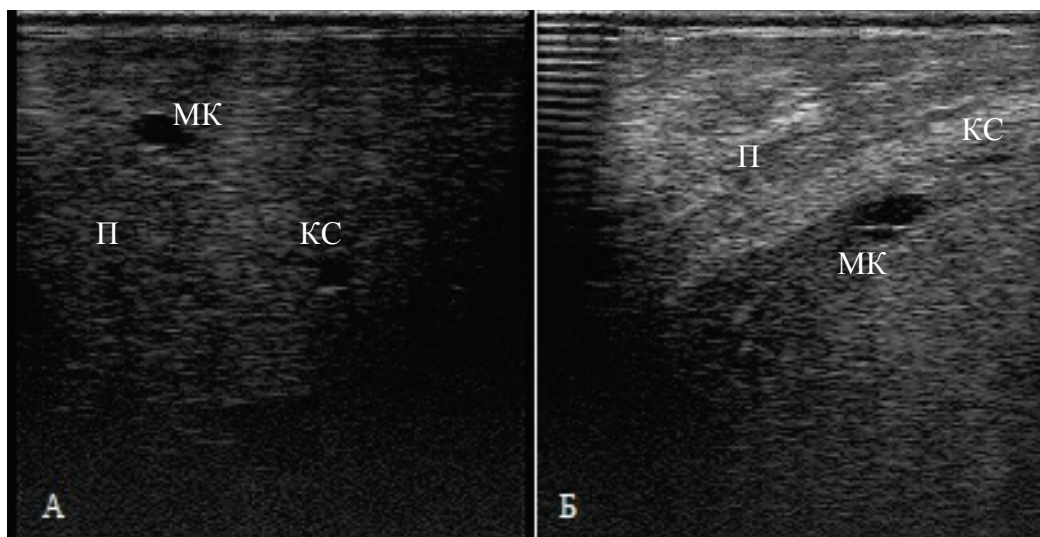
На фарми крава, Калифорнија маститис тестом, укупно је прегледано 56 крава у циљу откривања крава са субклиничким маститисом. Код 32/56 (57,14%) крава утврђено је Калифорнија маститис тестом повећан број соматских ћелија, док код 24/56 (42,86%) није утврђено повећање соматских ћелија.

Ултразвучни преглед вимена крава урађен је код свих 56 крава, где је код

24 краве паренхим био очуван (слика 2А), а код 32 краве је утврђен субклинички маститис Калифорнија маститис тестом. Код 5/32 (15,62%) крава, са позитивним резултатом Калифорнија маститис теста, нису уочене промене паренхима вимена ултразвуком, док су код 27/32 (84,38%) крава уочене промене паренхима вимена у виду губитка хомогености. Паренхим вимена примећује се ултразвучно као хомогена, хиперехогена структура са анехогеним подручјима која одговарају

крвним судовима и каналикуларном систему паренхима вимена (слика 2А). Код субклиничког маститиса, паренхим вимена уочава се као нехомогена

структура са стањењем анехогености млечних алвеола и каналића (слика 2Б).



Слика 2. Ултразвучни приказ паренхима вимена крава без знакова субклиничког маститиса (А); и са субклиничким маститисом (Б) (П – паренхим вимена, МК – млечни каналић, КС – крвни суд)

ДИСКУСИЈА / DISSCUSION

Субклинички маститис код високомлечних крава представља значајан проблем на фармама, тако да је брза и тачна дијагноза од пресудног значаја у циљу смањења економских губитака. Стандардна метода откривања субклиничког маститиса код крава је Калифорнија маститис тест. Према истраживањима Sharma и сар. (2010), лажно позитиван резултат Калифорнија маститис теста је уочен у 23,79% четврти вимена, док је лажан негативан резултат детектован у 25,72% случајева. Varatanović и сар. (2010) су у свом ис-

траживању добили лажно позитиван резултат Калифорнија маститис теста код 10,78% четврти вимена, док је лажно негативан резултат био забележен код 7,94%. Према нашим истраживањима, код 15,62% крава ултразвучно нису уочене промене паренхима вимена, иако су имали позитиван резултат Калифорнија маститис теста.

Ултрасонографија вимена крава омогућава откривање свих интра-маларних патолошких промена које могу представљати предиспозицију за настанак маститиса (Fasulkov, 2012; Szencziová и Strapak, 2012).

Код крава без знакова субклиничког маститиса паренхим вимена се ултразвучно визуализовао као хомогена ехогена структура са израженим анехогеним пољима који одговарају крвним судовима и млечним каналићима вимена. Ови налази слажу се са резултатима истраживања других аутора (Franz и сар., 2009; Kotb и сар., 2014; Галфи и сар., 2016). Карактеристичан ултразвучни изглед паренхима вимена резултат је присуства везивног ткива који поседује већу ехогену густину и жлезданог паренхима који има мању ехогену густину (Flöck и Winter, 2006).

Ултразвучни налаз вимена крава са субклиничким обликом маститиса зависи од степена структурних промена које се појављују у ткиву. Запаљенски процеси у вимену доводе до промене ехогености органа. Паренхим вимена се најчешће уочава као нехомогена структура, при чему ехогеност може бити смањена или повећана (Галфи и сар., 2015). Trostle и O'Brien (1998) уочили су нехомогену хипоехогену структуру паренхима вимена код крава са акутним маститисом, док су повећање ехогености запазили код хроничног маститиса као резултат бујања фиброзног ткива. Код крава са субклиничким маститисом, паренхим вимена постаје нехомоген, док се повећавала ехогеност млечних каналића. Овакви налази су у складу са налазима других аутора који наводе да је повећање ехогености млечних каналића последица повећања броја соматских ћелија у млеку (Kotb и сар., 2014; Ismail и сар., 2016).

ЗАКЉУЧАК / CONCLUSION

На основу литературних података да Калифорнија маститис тест може да да лажну реакцију, а ултразвучна дијагностика омогућава детекцију промена у паренхиму вимена крава може се закључити да ултразвучна дијагностика има значајну улогу у раној дијагностици субклиничког маститиса код високомлечних крава, јер је омогућено откривање промена у паренхиму вимена крава које су имале негативну реакцију Калифорнија маститис теста.

ЗАХВАЛНОСТ / ACKNOWLEDGEMENT

Рад је реализован по пројекту ТР 31034 који је финансиран од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Cartee R.E., Ibrahim A.K., McLeary D. (1986): *B-mod ultrasonography of the bovine udder and teat*. Journal of American Veterinary Medical Association. 188(11): 1284–1287.
2. Caruolo E.V., Mochrie R:D (1967): *Ultrasonograms of lactating mammary gland*. Journal of Dairy Science. 50(2): 225–230.
3. Fasulkov I. R. (2012): *Ultrasonography of the mammary gland in ruminants: a review*. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine. 15(1): 1–12.
4. Flöck M., Winter P. (2006): *Diagnostic ultrasonography in cattle with disease of the mammary gland*.

- The Veterinary Journal. 171(2): 314–321.
5. Franz S., Floek M., Hofmann-Parisot M. (2009): *Ultrasonography of the bovine udder and teat*. Veterinary Clinic of North America. Food Animal Practice. 25(3): 669–85.
 6. Галфи А., Радиновић М., Давидов И., Говорчин М., Петровић К. (2015): *Ултрасонографија вимена високомлечних крава*. Летопис научних радова Пољопривредног факултета. 39: 72–78.
 7. Галфи А. (2016): *Клинички и ултразвучни преглед вимена крава након примене лактоферина у периоду инволуције*. Докторска дисертација. Универзитет у Новом Саду. Пољопривредни факултет.
 8. Галфи А., Радиновић М., Петровић К., Говорчин М., Давидов И. (2016): *Ултрасонографија паренхима вимена крава и припадајућих лимфних чворова*. Летопис научних радова Пољопривредног факултета. 40(1): 111–115.
 9. Hussein H., EL-Khabazb K., Malekb S. (2015) *Is udder ultrasonography a diagnostic tool for subclinical mastitis in sheep*. Small Rumin Res 129: 121–128.
 10. Ismail B.Z., Alekish M., Al-Sheyab O. (2016): *Relationships between somatic cell count and certain udder and teat echo-morphometric measurements in mastitis caused by Staphylococcus aureus in Awassi sheep*. Revue de Médecine Vétérinaire. 167(1-2): 33–37.
 11. Khan M.Z., Khan A. (2006): *Basic facts of mastitis in dairy animals*. A review. Pakistan Veterinary Journal. 26(4): 204–208.
 12. Kotb E. E. Z., Abu-Seida A. M., Fadel M. S. (2014): *The correlation between ultrasonographic and laboratory findings of mastitis in buffaloes (Bubalus bubalis)*. Global Veterinaria. 13(1): 68–74.
 13. Nielsen C. (2009): *Economic impact of mastitis in dairy cows*. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Science. Uppsala.
 14. Szencziová I., Strapák P. (2012): *Ultrasonography of the udder and teat in cattle: perspective measuring technique*. Slovak Journal of Animal Science. 45(3): 96–104.
 15. Sharma N., Pandey V., Sudan N. A. (2010): *Comparison of some indirect screening tests for detection of subclinical mastitis in dairy cows*. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine. 13(2): 98–103.
 16. Trostle S., O'Brien R. (1998): *Ultrasonography of the bovine mammary gland*. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian. 20(2 part 1): 64–71.
 17. Varatanović N., Podžo M., Mutevelić T., Podžo K., Čengiћ B., Hodžić A., Hodžić E. (2010): *Use of Californija mastitis test, somatic cells count and bacteriological findings in diagnostics of subclinical mastitis*. Biotechnology of Animal Husbandry. 26(1–2): 65–74.
- Рад примљен: 18.6.2017.
Рад прихваћен: 9.10.2017.

Оригинални научни рад

БРОЈ МИКРООРГАНИЗАМА КАО ПАРАМЕТАР КВАЛИТЕТА СИРОВОГ МЛИЈЕКА

Бојан Голић¹, Александра Бабић¹, Милијана Голић¹, Зора Мијачевић²

Кратак садржај

Да би се произвело млијеко задовољавајућег квалитета у погледу микробиолошког статуса, микробиолошки критеријуми примјењују се на сирово млијеко. Сирово млијеко, као полазна сировина за производњу термички обрађеног млијека, испитује се у оквиру система контроле квалитета сировог млијека. Кравље сирово млијеко мора да задовољи критеријум $\leq 100.000 \text{ CFU/ml}$. Број микроорганизама израчунава се из појединачних резултата добијених током двомјесечног периода, са најмање два узорка мјесечно, кориштењем геометријске средине.

Циљ испитивања је да се на основу резултата испитивања сировог крављег млијека на број микроорганизама, сагледа квалитет сировог млијека и услови хигијене у процесу производње.

Узорци сировог крављег млијека потичу из мљекаре која врши откуп млијека са територије Републике Српске, а узорковани су са једне линије откупа, која обухвата 23 сабирна мјеста. Током шестомјесечног периода узорковано је укупно 278 узорака сировог млијека.

За микробиолошко испитивање сировог млијека кориштена је метода одређивања укупног броја бактерија методом проточне цитометрије на инструменту VastoScan FC Type 73700.

Геометријске средине резултата испитивања сировог млијека на број микроорганизама су, током шест мјесеци, у преко 95% сабирних мјеста биле $\leq 100.000 \text{ CFU/ml}$, а геометријска средина броја микроорганизама у сировом млијеку за линију откупа задовољава критеријум дат правилником о квалите-

¹ Др Бојан Голић спец. др вет., Јавна установа Ветеринарски институт Републике Српске „Др Васо Бутозан“ Бања Лука, Бранка Радичевића 18

¹ Мр Александра Бабић др вет., Јавна установа Ветеринарски институт Републике Српске „Др Васо Бутозан“ Бања Лука, Бранка Радичевића 18

¹ ма Милијана Голић дипл. инж. технологије, Јавна установа Ветеринарски институт Републике Српске „Др Васо Бутозан“ Бања Лука, Бранка Радичевића 18

² Проф. др Зора Мијачевић, Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду, Булевар ослобођења 18, 11000 Београд

Кореспондентни аутор: Др Бојан Голић спец. др вет., bojan.golic@virsvb.com,

ту свјежег сировог млијека. У овом периоду је 7,60% узорака имало број микроорганизама $>100.000\text{CFU/ml}$.

Кључне речи: квалитет сировог млијека, укупан број микроорганизама

DOI: 10.7251/VETJ1702222G

UDK 637.12:632.1

Original scientific paper

THE TOTAL COLONY COUNT AS A PARAMETER OF QUALITY OF RAW MILK

Bojan Golic¹, Aleksandra Babic¹, Milijana Golic¹, Zora Mijacevic²

ABSTRACT

Microbiological criteria are applied to raw milk in order to produce milk of satisfactory quality in terms of microbiological status. Raw milk, as a starting material for the manufacture of heat-treated milk, is examined within the system of quality control of raw milk. Raw cow's milk must meet the criteria $\leq 100.000\text{CFU/ml}$. The total colony count is calculated from the individual results obtained over a two-month period, with at least two samples per month, using the geometric mean.

The aim of the study is to determine the quality of raw milk and hygiene conditions in the production process.

Samples of raw cow's milk originating from dairy that purchases milk from the territory of Republic of Srpska, were sampled from one purchase line, which includes 23 collected points. During the six-month period a total of 278 samples of raw milk were sampled.

For the determining of the total bacterial count using flow cytometry on an instrument BactoScan Type FC 73700 was used.

¹ Dr. Sci. Bojan Golic Spec. Dr. Vet., Public Institution Veterinary Institute of the Republic of Srpska „Dr Vaso Butozan“ Banja Luka, Branka Radicevica 18

¹ MSc. Aleksandra Babic Dr Vet., Public Institution Veterinary Institute of the Republic of Srpska „Dr Vaso Butozan“ Banja Luka, Branka Radicevica 18

¹ MA Milijana Golic BSc. Technology Engineer, Public Institution Veterinary Institute of the Republic of Srpska „Dr Vaso Butozan“ Banja Luka, Branka Radicevica 18

² Prof. Dr. Sci. Zora Mijacevic, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, Bulevar oslobođenja 18, 11000 Belgrade

Corresponding author: Dr. Sci. Bojan Golic Spec. Dr. Vet., bojan.golic@virsyb.com, Public Institution Veterinary Institute of the Republic of Srpska „Dr. Vaso Butozan“, Branka Radičevića 18, 78000 Banja Luka

The geometric means of test results of raw milk considering the total bacterial count, within six months period, in over 95% of the collection points were $\leq 100.000 \text{ CFU/ml}$, and the geometric mean of the total bacterial count in raw milk, considering purchase line, meets the criteria given by the regulation of quality of raw fresh milk. In this period, 7.60% of the samples had the total bacterial count $> 100.000 \text{ CFU/ml}$.

Keywords: quality of raw milk, total colony count

УВОД

Закон о храни примјењује се на све фазе производње, прераде, складиштења и дистрибуције хране за исхрану људи и хране за исхрану животиња (1). Храна је свака материја или производ прерађен, дјелимично прерађен или непрерађен, а намијењен употреби од стране људи или се може очекивати да ће га људи употребљавати (2).

Да би се произвело млијеко задовољавајућег квалитета у погледу микробиолошког статуса, микробиолошки критеријуми примјењују се на сирово млијеко. Сирово млијеко, као полазна сировина за производњу термички обрађеног млијека, испитује се у оквиру система контроле квалитета свјежег сировог млијека.

Сирово млијеко је млијеко добијено секрецијом млијечне жлијезде једне или више здравих музних животиња из узгоја, које није загријавано на температури изнад 40°C или није излагано никаквом третману са истим ефектом. Да би се сирово млијеко могло прерађивати, оно мора:

– потицати од музне животиње која

до порода има најмање 30 дана, или је од порода прошло више од 8 дана,

- зависно од врсте музне животиње од које је добијено, бити разврстано као кравље млијеко, те овчије млијеко, козје млијеко и бивоље млијеко,
- имати својствен изглед, боју, мирис, укус и конзистенцију,
- у случају свакодневног скупљања сировог млијека, млијеко мора одмах бити охлађено до температуре не више од 8°C или не више од 6°C , ако се скупљање сировог млијека не обавља свакодневно (3).

Контаминација млијека микроорганизмима настаје секреторно и постсекреторно. Секреторна контаминација настаје из изводног млијечног канала. Млијеко поријеклом из здравог вимена крава садржи мање од 100 CFU/ml и нема значајан утицај на укупан број микроорганизама у већој количини млијека (4). Међутим, млијеко од крава са латентном инфекцијом вимена или субклиничким маститисима садржи узрочнике маститиса и доводи до повећања укупног броја микроорганизама у млијеку са фарме (5). Постсекреторна контаминација млијека потиче са површине вимена и тијела

животиње, прибора и опреме за мужу и чување млијека и из ваздуха (6). Према свом саставу, млијеко представља погодну средину за размножавање микроорганизама (7).

Повећан број микроорганизама у сировом млијеку значајно утиче на технолошке особине млијека за прераду односно на квалитет производа од млијека. Овај утицај је вишеструк и огледа се у нарушавању хигијенске исправности, хемијског састава и промјенама органолептичких особина, када долази до разградње протеина и масти, појаве горког укуса, промјене конзистенције, повећаног степена киселости, одвајања сурутке, варирирања у карактеристикама и квалитету производа, смањења рока употребе производа итд. До овога долази током самог процеса производње или током периода складиштења производа. Из тог разлога, важан параметар за одређивање квалитета млека јесте укупан број микроорганизама.

Укупан број микроорганизама, између осталог, индикатор је здравственог статуса стада, одржавања хигијене на фарми, поступка приликом муже и хлађења млијека (8).

Устаљене навике у манипулацији и хлађењу млијека након муже, ефикасно онемогућавају раст микроорганизама, али се они размножавају током транспорта у неадекватном расхладном режиму или током лагерована у неадекватним условима (9, 10, 11, 12, 13, 14). Уколико

се млијеко чува на температури 1–2°C, повећање броја микроорганизама се може успорити, али не неограничено дуго (15). Како би се супримирао раст микроорганизама и млијеко учинило подесним за прераду, уколико се млијеко скупља у периоду не мањем од два часа, оно се мора охладити на температуру од 8°C или мање у случају дневног скупљања, односно на 6°C уколико скупљање није свакодневно (16).

Сирово млијеко које ће се у даљој преради термички обрађивати, у погледу броја микроорганизама мора да задовољи следећи критеријум:

- кравље млијеко $\leq 100.000 \text{ CFU/ml}$,
- овчије и козје млијеко $\leq 1.500.000 \text{ CFU/ml}$ (3, 17).

Број микроорганизама израчунава се из појединачних резултата добијених током двомјесечног периода, са најмање два узорка мјесечно, кориштењем геометријске средине (3, 17, 16), примјеном стандардне методе за одређивање броја микроорганизама ISO 4833 (18).

С обзиром на то да је потребно да се у кратком времену испита велики број узорака, примјеном стандардне методе то се не може постићи, па су развијене инструменталне методе, које су у сагласности са стандардном методом. У великом броју држава откупљивачи млијека искључиво користе точну цитометрију за одређивање укупног броја микроорганизама у си-

ровом млијеку. Већина произвођача млијека у ЕУ без већих проблема производе млијеко са мањим бројем микроорганизама од 100.000 CFU/ml. Национални просјек је врло често мањи од 10.000 CFU/ml (19).

Стандарди за вредновање млијека на основу броја микроорганизама крећу се од 20.000 CFU/ml (Аустрија и Велика Британија) до 300.000 CFU/ml (Јапан), а најчешћи одабрани број је између 100.000 и 300.000 CFU/ml (12, 13, 20).

ЦИЉ РАДА

Циљ испитивања је да се на основу резултата испитивања сировог крављег млијека на број микроорганизама процијене квалитет сировог млијека и услови хигијене у процесу производње.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Материјал

Узорци сировог крављег млијека потичу из мљекаре која врши откуп млијека са територије Републике Српске. Узорковани су у оквиру самоконтроле од стране мљекаре, а узорковање је рађено у периоду јануар-јун 2013. године. Узорци сировог млијека узорковани су са једне линије откупа, која обухвата 23 сабирна мјеста. Узорковање је вршено минимално два пута мјесечно, а са неких сабирних мјеста три пута мјесечно. У јануару је узорковано 49 узорака сировог млијека, у фебруару, марту, априлу и мају 46 узорака, а у јуну 45 узорака. За период јану-

ар-јун узорковано је укупно 278 узорака сировог млијека, а испитивање је вршено на укупан број микроорганизама.

Методе

Лабораторијско испитивање узорака рађено је у ЈУ Ветеринарски институт Републике Српске „Др Васо Бутозан“ Бања Лука. Испитивање је рађено у периоду јануар-јун 2013. године. Узорци су узети у стерилне пластичне бочице у којима се налазио конзерванс азидиол, а транспортовани су до лабораторије на температури $4\pm 2^{\circ}\text{C}$. За микробиолошко испитивање сировог млијека кориштена је метода одређивања укупног броја бактерија методом проточне цитометрије на инструменту BactoScan FC Type 73700, која је акредитована према стандарду *BAS EN ISO/IEC 17025:2006* (21).

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

У оквиру микробиолошких критеријума за сирово млијеко, правилницима (3, 17) предвиђена је обавезна контрола сировог млијека које ће се даље термички обрађивати. Овим критеријумом предвиђено је да се у сировом млијеку одређује број микроорганизама.

Резултати испитивања појединачних узорака сировог млијека у односу на граничну вриједност броја микроорганизама утврђену поменутих правилницима, за сваки мјесец, приказани су у Табели 1.

Табела 1. Резултати испитивања појединачних узорак сировог млијека у односу на граничну вриједност броја микроорганизама

Мјесец	Узорци са $\leq 100.000 \text{CFU/ml}$		Узорци са $> 100.000 \text{CFU/ml}$	
	n	%	n	%
Јануар	46	93,90	3	6,10
Фебруар	44	95,70	2	4,30
Март	41	89,10	5	10,90
Април	42	91,30	4	8,70
Мај	43	93,50	3	6,50
Јун	41	91,10	4	8,90

У јануару је 93,90% узорак сировог млијека имало број микроорганизама у млијеку $\leq 100.000 \text{CFU/ml}$, у фебруару 95,70%, у марту 89,10%, априлу 91,30%, мају 93,50%, а у јуну 91,10% узорак. Током шестомјесечног периода испитивања узорак сировог млијека, сваког мјесеца је преко 89% узорак имало број микроорганизама $\leq 100.000 \text{CFU/ml}$, односно просјечно 92,40%. Укупно је 7,60% узорак

ка (21) имало број микроорганизама $> 100.000 \text{CFU/ml}$. Добијени резултати су у складу с резултатима испитивања броја микроорганизама у сировом млијеку произвођача млијека у ЕУ (19).

Резултати испитивања узорак сировог млијека за сабирна мјеста у односу на граничну вриједност броја микроорганизама, за сваки мјесец, приказани су у Табели 2.

Табела 2. Резултати испитивања сировог млијека за сабирна мјеста у односу на граничну вриједност броја микроорганизама

Мјесец	Сабирна мјеста са $\leq 100.000 \text{CFU/ml}$		Сабирна мјеста са $> 100.000 \text{CFU/ml}$	
	n	%	n	%
Јануар	21	91,30	2	8,70
Фебруар	21	91,30	2	8,70
Март	18	78,30	5	21,70
Април	20	87,00	3	13,00
Мај	20	87,00	3	13,00
Јун	19	82,60	4	17,40

У јануару и фебруару 91,30% сабирних мјеста (21) имало је број микроорганизама у сировом млијеку $\leq 100.000\text{CFU/ml}$, у марту 78,30% сабирних мјеста (18), у априлу и мају 87,00% сабирних мјеста (20), а у јуну 82,60% сабирних мјеста (19).

Резултати испитивања сировог млијека приказани у Табели 3. и 4., изражени су према правилницима (3,

17), као геометријска средина из појединачних резултата испитивања добијених током двомјесечног периода, са најмање два узорка мјесечно.

Резултати испитивања узорака сировог млијека за сабирна мјеста у односу на граничну вриједност броја микроорганизама, изражени као геометријска средина за двомјесечни период, приказани су у Табели 3.

Табела 3. Резултати испитивања сировог млијека за сабирна мјеста у односу на граничну вриједност броја микроорганизама, изражени као геометријска средина

Двомјесечни период	Сабирна мјеста са $\leq 100.000\text{CFU/ml}$		Сабирна мјеста са $> 100.000\text{CFU/ml}$	
	n	%	N	%
Јануар-фебруар	23	100	0	0
Фебруар-март	23	100	0	0
Март-април	22	95,70	1	4,30
Април-мај	22	95,70	1	4,30
Мај-јун	22	95,70	1	4,30

У два двомјесечна периода (јануар-фебруар и фебруар-март) 100% сабирних мјеста (23) имало је број микроорганизама у сировом млијеку $\leq 100.000\text{CFU/ml}$, док је у три двомјесечна периода (март-април, април-мај и мај-јун) 95,70% сабирних мјеста (22) имало број микроорганизама у сировом млијеку $\leq 100.000\text{CFU/ml}$. У ова три двомјесечна периода, једно исто сабирно мјесто имало је број микроорганизама у сировом млијеку, изражен као геометријска средина, $> 100.000\text{CFU/ml}$ (март-април 320.000

CFU/ml , април-мај 308.000 CFU/ml , мај-јун 127.000 CFU/ml). Када су у питању геометријске средине резултата испитивања сировог млијека током шест мјесеци, преко 95% сабирних мјеста имало је број микроорганизама $\leq 100.000\text{CFU/ml}$. Добијени резултати су у овом периоду, код већине сабирних мјеста нижи од граничне вриједности утврђене правилницима (3, 12), односно у складу су с резултатима испитивања броја микроорганизама у сировом млијеку произвођача млијека у ЕУ (19). Вриједности броја

микроорганизама $>100.000\text{CFU/ml}$ код једног сабирног мјеста током три двомјесечна периода, указују на контаминацију млијека микроорганизмима (4, 5, 6), уз могуће неадекватне услове транспорта и лагровања млијека (9, 10, 11, 12, 13, 14).

Резултати испитивања узорака сировог млијека за посматрану линију откупа у односу на граничну вриједност броја микроорганизама, изражени као геометријска средина за двомјесечни период, приказани су у Табели 4.

Табела 4. Геометријска средина резултата испитивања сировог млијека за линију откупа сировог млијека у односу на граничну вриједност броја микроорганизама

Двомјесечни период	Број микроорганизама CFU/ml
Јануар-фебруар	16.000
Фебруар-март	18.000
Март-април	22.000
Април-мај	20.000
Мај-јун	20.000

Када је у питању квалитет сировог млијека за откупну линију током шест мјесеци, резултати испитивања у погледу броја микроорганизама били су $<100.000\text{CFU/ml}$ у свих пет двомјесечних периода тј. били су нижи од граничне вриједности утврђене правилницима (3, 17) и задовољавају их. Ове вриједности броја микроорганизама у сировом млијеку задовољавају стандарде за сирово млијеко европских држава (12, 13, 20) и веома су блиске националним просјецима појединих држава ЕУ (19).

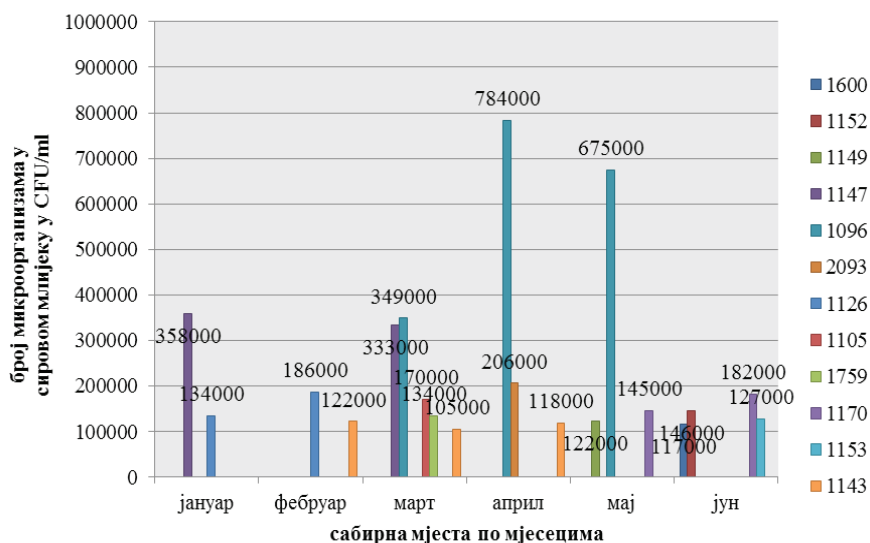
Међутим, и поред задовољавајућег квалитета сировог млијека за посматрану линију откупа, постоје сабирна мјеста са веома високим вриједностима броја микроорганизама. Супротно овоме, такође, постоје сабирна мјеста са веома ниским вриједностима броја микроорганизама. Минималне и максималне вриједности појединачних резултата испитивања сировог млијека за линију откупа, у шестомјесечном периоду, приказани су у Табели 5.

Табела 5. Минималне и максималне вриједности појединачних резултата испитивања сировог млијека за линију откупа сировог млијека

Мјесец	Минимална вриједност CFU/ml	Максимална вриједност CFU/ml
Јануар	4.000	358.000
Фебруар	4.000	186.000
Март	4.000	349.000
Април	4.000	784.000
Мај	4.000	675.000
Јун	4.000	182.000

Минимална вриједност резултата испитивања сировог млијека за линију откупа у шестомјесечном периоду износила је 4.000CFU/ml, док је максимална вриједност у овом периоду износила 784.000CFU/ml.

Максималне вриједности броја микроорганизама у сировом млијеку које су >100.000CFU/ml, по сабирним мјестима на мјесечном нивоу, у шестомјесечном периоду, приказане су у Графикону 1.

**Графикон 1.** Максималне вриједности броја микроорганизама у сировом млијеку које су >100.000CFU/ml, по сабирним мјестима на мјесечном нивоу

Максималне вриједности броја микроорганизама у сировом млијеку које су $>100.000\text{CFU/ml}$, по сабирним мјестима на мјесечном нивоу, у шестомјесечном периоду кретале су се од 105.000 до 784.000CFU/ml. Веома високе вриједности броја микроорганизама у сировом млијеку несумњиво су посљедица контаминације микроорганизмима, секреторне и/или постсекреторне (4, 5, 6), јер мале количине микроорганизама, које се могу излучивати из здравог вимена, не могу значајније утицати на број микроорганизама у већој количини млијека (4). Такође, овим вриједностима броја микроорганизама доприносе и неадекватни услови транспорта односно лагровања сировог млијека (9, 10, 11, 12, 13, 14), па чак и адекватни услови (15), уколико је велики почетни број микроорганизама у млијеку.

Посматрајући приказане резултате уочава се да су поједине вриједности појединачних резултата испитивања значајно веће од граничне вриједности прописане правилником, а да проценат појединачних резултата преко граничне вриједности износи и 10,90% на мјесечном нивоу. Такође, приказано по сабирним мјестима, проценат оних који имају резултате преко граничне вриједности достиже и до 21,70% на мјесечном нивоу. Ово је стање код појединачних резултата испитивања. Међутим, слика се значајно мијења уколико резултате посматрамо у складу с правилником тј. као геометријску средину исказану за двомјесечни

период. Број незадовољавајућих резултата тада се значајно смањује. Током три двомјесечна периода само једно сабирно мјесто имало је број микроорганизама у сировом млијеку $>100.000\text{CFU/ml}$, док су у преостала два двомјесечна периода сва сабирна мјеста имала број микроорганизама $\leq 100.000\text{CFU/ml}$. Коначно, посматрајући линију откупа сировог млијека током шестомјесечног периода, уочава се да резултати испитивања, исказани као геометријска средина, имају веома ниске вриједности и не прелазе 22.000 CFU/ml, при чему је квалитет сировог млијека задовољавајући.

ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата, изводе се следећи закључци:

1. Током шестомјесечног периода испитивања узорака сировог млијека, сваког мјесеца је преко 89% узорака имало број микроорганизама $\leq 100.000\text{CFU/ml}$, односно просјечно по мјесецу 92,40%. Укупно је 7,60% узорака имало број микроорганизама $>100.000\text{CFU/ml}$.
2. Геометријске средине резултата испитивања сировог млијека на број микроорганизама су, током шест мјесеци, у преко 95% сабирних мјеста биле $\leq 100.000\text{CFU/ml}$.
3. Минимална вриједност резултата испитивања сировог млијека за линију откупа у шестомјесечном периоду износила је 4.000CFU/ml, док је максимална вриједност у овом периоду износила 784.000CFU/ml.

4. Геометријска средина броја микроорганизама у сировом млијеку за линију откупа са 23 сабирна мјеста, за период јануар-јун, задовољава критеријум дат у Правилнику о квалитету свјежег сировог млијека. Сирово млијеко је, као полазна сировина за производњу термички обрађеног млијека, задовољавајућег квалитета у погледу броја микроорганизама.

ЛИТЕРАТУРА

1. Закон о храни "Службени гласник Републике Српске" број 49, 2009.
2. Закон о храни "Службени гласник БиХ" број 50, 2004.
3. Правилник о сировом млијеку "Службени гласник БиХ" број 21, 2011.
4. Murphy S. C. and Boor K. J. (2006): Sources and cousec of high bacteria counts in raw milk: An alberviated review.
5. Bramley A. J. and MxKinnon C. H. (1990): The Microbiology of raw milk. Pp. 163.208. In Dairy Microbiology. Vol. 1. Robinson, RK (Ed) Elsenier Science Publishers London.
6. Wallace L. R. (2009): Bacteria counts in raw milk. IlliniDairyNet Quality.
7. Вујичић И. Ф. (1985): Млекарство – први део. Научна књига Београд. 177-185.
8. Berry D. P., Brien B. O., Callaghan E. J. O., Sullivan K. O. and Meaney W. J. (2006): Temporal trends in bulk tank somatic cell count and total bacterial count in Irish dairy heards during the past decade. J. Dairy Sci. 89:4083-4093.
9. Недић Н. Драго (1999): Дефинисање критеријума квалитета сировог млијека у лонгитудинално интегрисаној контроли. Докторска дисертација. Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду.
10. Недић Д., Мијачевић З., Бјелајац Б., Митровић Н. (2005): Предност увођења независне контроле квалитета сировог млијека. Зборник кратких садржаја. 11. Годишње савјетовање ветеринара Републике Српске, 37-, Теслић, 1 – 4.6.2005
11. Недић Д., Мијачевић Зора, Булајић Снежана (2004): Контрола сировог млијека у циљу плаћања млијека по квалитету. Зборник кратких садржаја. 16. Савјетовање ветеринара Србије, 9-10, Златибор, 27-, 10.9.2004.
12. Недић Н.Д., Мијачевић М. Зора (2002): Услови за производњу млијека и процјена хигијенске исправности млијека према Директиви Савјета Европске Уније 92/46 ЕЕС. Зборник радова, Савремени трендови у млекарству, 1-10, Врњачка Бања, 2002.
13. Nedić D. Bulajić Snežana, Mijačević Zora (1999): The criteria for payment of raw milk based on hygienic quality. 2. Slovenian Congress, „Milk and Dairy Products“, 60, Portorož- Slovenija 1999.
14. Недић Д. (1999): Место контроле

- млека у функцији плаћања. Зборник радова, Савремени трендови у млекарству, 97-104, Златибор 1999.
15. Murphy S. C. and Boor K. J. (2000): Trouble-shooting source and cause of high bacteria counts in raw milk. Dairy, food environmental sanitation. 20:606–611.
16. Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council. Official Journal of the European Union, L226, 22–82, 2004.
17. Правилник о квалитету свјежег сировог млијека "Службени гласник Републике Српске" број 60, 2013.
18. ISO 4833:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30 degrees C.
19. Hillerton J. E. and Berry E. A. (2004): Quality of milk supply: European Regulations versus practice. NMC Annula Meeting Proceedings.
20. Катић В, Стојановић Л. (2002): Број микроорганизама и број соматских ћелија у функцији оцјене квалитета млијека. Зборник радова Савремени трендови у млекарству. Врњачка Бања.
21. BAS EN ISO/IEC 17025:2006 Општи захтјеви за компетентност испитних и калибрационих лабораторија.
- Рад примљен: 02.06.2017.
Рад прихваћен: 29.09.2017.