

ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
<p>1. Датум и орган који је именовео комисију: 13.03.2015. године, Наставно-научно веће Технолошког факултета, Универзитета у Новом Саду</p> <p>2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:</p> <p>1. Проф. др Владимир Томовић, ванредни професор, Прехрамбено инжењерство, 25.02.2015. године, Технолошки факултет, Универзитета у Новом Саду, председник комисије</p> <p>2. Проф. др Марија Шкрињар, редован професор, Прехрамбена микробиологија, 31.10.1996. године, Технолошки факултет, Универзитета у Новом Саду, ментор и члан комисије</p> <p>3. др Јованка Левић, научни саветник, Прехрамбено инжењерство, 27.06.2012. године, Научни институт за прехрамбене технологије, Универзитета у Новом Саду, члан комисије</p> <p>4. др Дубравка Миланов, виши научни сарадник, 30.4.2014. године, Биотехничке науке-Ветеринарство, Научни институт за ветеринарство „Нови Сад“, члан комисије</p>
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
<p>1. Име, име једног родитеља, презиме: Ивана, Светислав, Чабаркапа</p> <p>2. Датум рођења, општина, држава: 13.12.1977, Врбас, Врбас, Република Србија</p> <p>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив: Природно математички факултет - Департман за биологију и екологију, Биологија - Дипломирани биолог, Дипломирани биолог.</p> <p>4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија: -</p> <p>5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: -</p> <p>6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: -</p>
III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:
<p>„Способност формирања биофилма различитих сојева <i>Salmonella Enteritidis</i> и инхибиторни ефекат старских уља на иницијалну адхезију и формирано биофилм“</p>
IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:
<p>Навести кратак садржај са назнаком броја страна, поглавља, слика, шема, графикона и сл.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Увод (стр. 1 - 3), • Преглед литературе (стр. 4 - 42), • Циљ рада (стр. 43),

- Материјал и методе (стр. 44 - 61),
- Резултати и дискусија (стр.62 - 136),
- Закључак (стр. 143 - 148),
- Литература (стр 151 - 170).

Дисертација је написана на 170 страница А4 формата, са 73 слике, 16 табела и 223 литературна навода, а на почетку дисертације су дате кључне документацијске информације са кратким изводом на српском и енглеском језику

VI ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Наслов докторске дисертације је јасано формулисан и у складу са тематиком дисертације.

У **уводном делу** докторске дисертације, кандидат Ивана Чабаркапа је на јасан, систематичан и сажет начин приказала циљ и оправданост теме истраживања. Истакнут је значај биофилмова које бактерије формирају на различитим врстама материјала у погонима прехранбене индустрије, и тиме постају извори дуготрајне и понављане контаминације намирница, не само врстама које изазивају кварење, већ и патогенима које се путем хране преносе на људе. Образложен је значај истраживања и разумевања механизма адхезије једног од најважнијих алиментарних патогена: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis. У наставку уводног дела кандидат указује да се поред имплементираних система Добре произвођачке праксе (ДПП) и Добре хигијенске праксе (ДХП) у циљу превенције и контроле биолошке опасности као што је бактеријски биофилм, могу применити различити физички и хемијски третмани санитације. Наводећи да поједини физички третмани попут ултразвука, магнетних и електричних поља имају добре резултате, али се из економских разлога методе елиминације углавном своде на употребу хемијских третмана. Спровођење конвенционалних хемијских метода санитације обично укључује употребу агресивних једињења као што су хлор, пероксиди и квартерерна амонијумова једињења која осим што могу имати резидуалан ефекат, потенцијално штетан по људско здравље могу изазвати и непожељне сензорне особине крајњих производа. Такође, сукцесивна примена дезинфицијенаса исте врсте може проузроковати редукујућу осетљивости појединих врста микроорганизама који остају на површинама узрокујући константну контаминацију. Производња и употреба здравствено безбедне хране, као и повећани захтеви потрошача који се односе на употребу природних производа, тзв. “зелених хемикалија”, захтевају нове контролне стратегије. Потенцијална биолошка решења укључују употребу различитих ензима, фага и антимикуробних једињења које продукују микроорганизми. У новије време, све је атрактивнија и примена једињења биљног порекла са потенцијалном или доказаном антимикуробном ефикасношћу, као што су биљни екстракти, етарска уља и различити зачини. На крају уводног поглавља кандидат наводи да је досадашњим истраживањима на овом пољу углавном показана ефикасност етарских уља и њихових конституената у инхибицији раста вегетативних бактеријских ћелија, док се само мали број истраживања базира на испитивању ефеката ових природних супстанци на бактерије у биофилму. Тиме је потврђено да постоји више него оправдана потреба да се направи реална, научно заснована процена употребе супстанци биљног порекла у циљу превенције и елиминације већ постојећих бактеријских биофилмова.

Поглавље **Преглед литартуре** обухвата три целине у којима је кандидат систематисао основне сегменте обрађене у дисертацији. У првом делу овог поглавља кандидат је приказао основне карактеристике бактерија из рода *Salmonella* spp., њихову природну распрострањеност и карактеристике инфекција које изазивају код људи и животиња, аргументоване релевантним епидемиолошким подацима. У другом делу прегледа литературе приказани су релевантни подаци о бактеријском биофилму: историјат, дефиниција биофилма, фазе формирања, структура и механизми резистенције на антимикуробна средства, екстрацелуларни матрикс (ЕЦМ) са акцентом на структурне компоненте ЕЦМ салмонела. Кандидат у оквиру овог дела указује на последице формирања биофилма у индустрији као и превенцију и контролу биофилмова. Трећи део прегледа литературе је посвећен етарским уљима. У оквиру овог дела поред хемијског састава етарских уља приказани су и механизми антимикуробног деловања као и утицај етарских уља на биофилм.

Циљеви испитивања су јасно дефинисани и односе се на:

-испитивање способности различитих сојева *Salmonella* Enteritidis изолованих из клиничког

материјала, хране за животиње и одабраног референтног соја да формирају биофилм на температурама од 25°C и 37°C;

-испитивање способности адхеренције сојева *Salmonella* Enteritidis на површине од стакла и нерђајућег челика;

- преживљавање бактерија у формираним биофилмовима у условима исушивања и повремене доступности хранљивих материја у функцији времена;

- визуализацију структуре биофилма применом различитих техника микроскопирања високе резолуције: скенинг електронске и ласерске конфокалне скенинг микроскопије;

-испитивање хемијског састава етарских уља;

-испитивање антимикробног ефекта етарских уља и појединачних компоненти етарског уља (карвакрола и тимола) на бујонске културе тестираних сојева *Salmonella* Enteritidis и одређивање минималне инхибиторне концентрације (МИЦ) и минималне бактерицидне концентрације (МБЦ) етарских уља на 14 изолата *Salmonella* Enteritidis и референтни сој *S. Enteritidis* ATCC 13076;

-испитивање ефекта одабраних концентрација етарских уља на иницијалну адхезију и већ формирано биофилм одабраних сојева *Salmonella* Enteritidis.

У делу **Материјал и методе** дат је приказ и порекло коришћених изолата као и детаљан опис коришћеног материјала. Свака од примењених метода је детаљно описана и нема нејасноћа. Методе истраживања су адекватно одабране, верификоване у савременој литератури и пружају могућност добијања поузданих и репродуктивних резултата.

Резултати и дискусија су подељени у више целина у складу са постављеним циљевима истраживања. Први део овог поглавља се односи на потврђивање културелних, биохемијских и серолошких карактеристика коришћених изолата. Затим је дат приказ резултата испитивања способности продукције биофилма, утврђеног степена адхерентности за површине од стакла и челика, способности преживљавања и визуализације тродимензионалне структуре биофилма. У другом делу овог поглавља врло детаљно је дат приказ резултата хемијског састава етарских уља, антимикробне активности и утицаја етарских уља на иницијалну адхезију и формирано биофилм. Резултати су приказани на адекватан начин како у научном тако и у техничком смислу. Добијени резултати су детаљно анализирани и поређени са резултатима других студија које се баве истом или сличном проблематиком и јасно прате постављене циљеве истраживања. Дискусија приказана уз резултате је обимна, свеобухватна и указује на завидно познавање проблематике на коју се дисертација односи.

Закључци су јасни и адекватно изведени из добијених резултата и њихове дискусије, те се могу сматрати поузданим. Након прецизно дефинисаних закључака, кандидат је јасно образложио значај изведених испитивања, као и даље истраживачке могућности које су овим истраживањем отворене.

У последњем делу **Литература**, наведена су 223 литературна навода. Литература је цитирана на уобичајен и правилан начин, а избор референци је актуелан и примерен тематици која је проучавана.

VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Рад у међународном часопису (M23)

Ћабаркара, I., Škrinjar, M., Lević, J., Kokić, B., Blagojević, N., Milanov, D., Suvajdžić, Lj. (2015). Biofilm forming ability of *Salmonella* Enteritidis in vitro. Acta Veterinaria – Beograd (accepted for publication)

Поглавље у монографији међународног значаја (M14)

Ћабаркара, I., Lević, J., Đuragić, O., (2013). Biofilm, in: Méndez-Vilas, A. (Ed.), Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, Formatex Research Center, Badajoz, Spain 42-51.

Саопштење са међународног скупа штампано у целини (M33)

Čabarkapa, I., Škrinjar, M., Lević, J., Kostadinović, Lj., Kokić, B., Plavšić, D., Varga, A. (2014). Influence of *Thymus vulgaris* on initial cell attachment and biofilm of *Salmonella* Enteritidis. II International Congress "Food Technology, Quality and Safety", Novi Sad, 28-30.10. 2014, Serbia, 158-165.

Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M34)

Čabarkapa, I., Đuragić, O., Lević, J., Škrinjar, M., Sredanović, S. (2013). Microbiological study of biofilm formation of *Salmonella* Enteritidis isolated from poultry feed. 1st Conference of BacFoodNet and 3rd MC Meeting and WG Workshops of the COST Action FA1202, 27-28 November 2013, Prague, Czech Republic, p 23

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

На основу приказаних резултата испитивања кандидат је извео следеће закључке:

→ Експресија карактеристичног морфотипа и биофилм фенотипа у виду пеликуле формиране на ваздух вода међуфази код тестираних изолата је била условљена нижом температуром инкубирања (25°C).

→ На температури инкубирања од 25°C код испитиваних изолата су установљена три морфотипа RDAR, BDAR и SAW, док је инкубирањем на температури од 37°C код свих 14 испитиваних изолата и референтног соја установљен само SAW морфотип.

→ Најинтензивнија експресија биофилм фенотипа у виду пеликуле формиране на вода ваздух међуфази је евидентирана на температури инкубирања од 25°C. На температури инкубирања од 37°C продукција пеликула је била углавном врло слаба (+) са изузетком изолата SE5, SE7, SE14 и SE15 код којих је формирана танка више мрвичаста пеликула, склона брзој дезинтеграцији (++) . При овој температури инкубирања једино код изолата SE8 није запажено формирање пеликуле.

→ На основу резултата квантификације формираних биофилмова установљено је да су се испитивани изолати међусобно разликовали по способности формирања биофилма, при чему је способност формирања биофилма тестираних изолата *S. Enteritidis* диференцирана у три различите категорије (јаки, умерени и слаби биофилм продуцери).

→ На способност формирања биофилма велики утицај је имала температура инкубирања. Тестирани изолати *S. Enteritidis* су формирали статистички значајно већу количину биофилма ($p < 0,001$) на температури инкубирања од 25°C у поређењу са температуром инкубирања од 37°C.

→ Упоредном анализом резултата примењених скрининг тестова за утврђивање способности продукције биофилма на температури инкубирања од 25°C установљена је повезаност између експресије одређеног морфотипа на Конго црвеном агару и способности продукције биофилма у тестовима у течним медијумима. RDAR морфотип је био повезан са јаком биофилм продукцијом у кристал виолет тесту и појавом чврсте дебеле пеликуле (+++). BDAR морфотип је био повезан са умереном продукцијом биофилма у кристал виолет тесту и формирањем танке пеликуле (++) , док је за SAW морфотип у оба теста показана слаба биофилм продукција.

→ У тестовима спроведеним на температури инкубирања од 37°C није установљена повезаност између експресије одређеног морфотипа на Конго црвеном агару и способности продукције биофилма у тестовима спроведеним на течним медијумима са изузетком изолата SE8.

→ У односу на порекло изолата најслабију способност продукције биофилма су имали изолати пореклом из органа живине који су на обе температуре инкубирања окарактерисана као слаби биофилм продуцери. Изолати пореклом из фецеса су на обе температуре инкубирања показали различиту способност продукције биофилма, која је у зависности од изолата процењена као слаба, умерена и јака биофилм продукција. Изолате пореклом из хране за животиње на температури инкубирања од 25°C је одликовала јака биофилм продукција, док је њихова способност формирања биофилма на температури инкубирања од 37°C окарактерисана као слаба и умерена.

→ Сви тестирани изолати су показали способност адхеренције на површину стакла и нерђајућег челика, али у различитој мери. На способност адхеренције повољнији утицај је имала температура инкубирања од 25°C ($p < 0,05$), са изузетком изолата SE3 ($p > 0,05$). Између степена адхеренције изолата на површине стакла и нерђајућег челика установљена је незнатно већа адхерентност за површине од нерђајућег челика, али нису установљене статистички значајне разлике ($p > 0,05$). Способност адхеренције бактерија на површине од стакла и нерђајућег челика поред температуре је била условљена и способношћу изолата да синтетише матрикс биофилма.

→ Примењеним микроскопским техникама (CLSM и SEM) омогућена је детаљна визуализација

структуре формираних биофилмова.

→ Праћењем четвородневног развоја биофилма изолата SE_{RDAR} морфотипа утврђено је да се под датим експерименталним условима процес формирања биофилма одвија у три фазе: 1) иницијална адхезија за површину и формирање мањих ћелијских агрегата (24h); 2) формирање већих ћелијских агрегата уз продукцију ЕПС (48h); 3) сазревање биофилма уз значајну продукцију ЕПС што омогућава формирање стабилне тродимензионалне структуре биофилма (96h).

→ Примењене технике микроскопирања CLSM и SEM су се показале као микроскопске технике избора за визуализацију и одређивање карактеристика структуре биофилма.

→ Праћењем стопе преживљавања током 28 дана у условима исушивања евидентирана је знатно већа стопа преживљавања ћелија изолата RDAR морфотипа у односу на стопу преживљавања ћелија BDAR морфотипа ($p < 0,05$).

→ У условима повремене доступности хранљивих материја након деведесетог дана испитивања код обе групе изолата проценат вијабилних ћелија је износио више од 50%.

→ Коришћена етарска уља је карактерисао висок збирни удео главних фенолних компоненти карвакрола и тимола: *O. heracleoticum* (71,6%), *O. vulgare* (63,6%), *Th. vulgaris* (59,77%), *Th. serpyllum* (40,04%).

→ На основу високог процента карвакрола у етарским уљима *O. heracleoticum* (69,98%) и *O. vulgare* (58,84%) закључено је да припадају карвакрол типу.

→ На основу високог процента тимола у етарским уљима *Th. vulgaris* (43,2%) и *Th. serpyllum* (34,48%) закључено је да припадају тимол типу.

→ Етарска уља су према изолатима *S. Enteritidis* показала уједначен антимикробни ефекат следећим редоследом: *O. heracleoticum* > *O. vulgare* = *Th. vulgaris* > *Th. serpyllum*.

→ Антимикробни ефекат етарских уља је био директно сразмеран збиру фенолних компоненти (карвакрола и тимола) у етарском уљу.

→ Појединачне компоненте етарских уља карвакрол и тимол су показале уједначен антимикробни ефекат према изолатима *S. Enteritidis*.

→ Етарска уља, карвакрол и тимол су показали инхибиторни ефекат на иницијалну адхезију, а тиме и на формирање биофилма испитаних изолата на дозно зависан начин.

→ Упоредивањем утицаја етарских уља на инхибицију иницијалне адхезије и метаболичке активности ћелија између изолата RDAR и BDAR морфотипа установљене разлике нису биле статистички значајне ($p > 0,05$).

→ Испитивањем утицаја етарских уља, карвакрола и тимола на укупну биомасу предходно формираних биофилмова и метаболичку активност ћелија показано је да етарска уља у примењеним концентрацијама доводе до редукције укупне масе формираног биофилма/метаболичке активности ћелија у биофилму на дозно зависан начин у функцији времена.

→ За ерадикацију биофилмова (у износу $\geq 50\%$) формираних од стране изолата RDAR морфотипа је била потребна већа концентрација супстанци и дуже време експозиције у односу на биофилмове формиране од стране BDAR морфотипа ($p < 0,05$).

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.

Приказани резултати дају јасне одговоре на питања која су садржана у циљевима рада. Резултати се тумаче детаљно и јасно и пореде се са резултатима других истраживања. Закључци су адекватни, научно оправдани и логично проишлазе из добијених резултата рада.

На основу наведеног, Комисија даје позитивну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.

IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме Докторска дисертација је написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.
2. Да ли дисертација садржи све битне елементе Докторска дисертација садржи све битне елементе.
3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци Истраживања спроведена у овој дисертацији значајно доприносе надоградњи постојећих сазнања у оквиру науке о биофилму. Пре свега, проширена су сазнања, о способности формирања биофилма, и егзистенцији врсте <i>S. Enteritidis</i> у оквиру биофилма. Имајући у виду да познавање и разумевање адхезивне способности и формирања биофилма алиментарних патогена, као и њиховог односа према факторима који могу стимулисати или инхибирати развој биофилма, има велики значај са аспекта превенције стварања биофилма, као и његове елиминације. Стога, резултати овог истраживања представљају релевантну научну информацију о способности формирања биофилма, условима под којим се биофилм формира, степену адхезије за површине, изгледу тродимензионалне структуре биофилма и способности преживљавања ћелија унутар биофилма различитих изолата епидемиолошки најфреквентнијег патогена, <i>S. Enteritidis</i> . Приказани CLSM снимци представљају прве снимке биофилма <i>S. Enteritidis</i> у Републици Србији. Резултати способности преживљавања биофилм продукујућих изолата доприносе спознаји колико појава оваквих сојева у индустријским погонима може представљати озбиљну претњу на пољу безбедности хране. Резултати представљени у оквиру истраживања антимикуробног ефекта и утицаја етарских уља на иницијалну адхезију и формирани биофилм указују да примена етарских уља у циљу спречавања формирања биофилма представља изузетно користан приступ у контексту превенције бактеријске адхезије на местима производње намирница. Стечена сазнања у оквиру ових истраживања имају могућност имплементације у протоколе оптимизације постојећих и развоја нових контролних стратегија у циљу превенције настанка и елиминације биофилмова. Приказани резултати представљају научну основу за практични развој и имплементацију од стране индустрије, превентивне стратегије за осигурање безбедности хране. Увидом у докторску дисертацију кандидата Иване Чабаркапе, Комисија је закључила да дисертација садржи све елементе оригиналног научног рада
4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања Недостаци докторске дисертације нису уочени
X ПРЕДЛОГ:
На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:
Полазећи од позитивне оцене докторске дисертације кандидата Иване Чабаркапе, под називом „Способност формирања биофилма различитих сојева <i>Salmonella</i> Enteritidis и инхибиторни ефекат етарских уља на иницијалну адхезију и формирани биофилм“, Комисија са задовољством предлаже да се прихвати ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ, а кандидату одобри одбрана дисертације.

НАВЕСТИ ИМЕ И ЗВАЊЕ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ
ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

Проф. др Владимир Томовић, ванредни професор

Проф. др Марија Шкрињар, редовни професор

др Јованка Левић, научни саветник

др Дубравка Миланов, виши научни сарадник

НАПОМЕНА: Члан комисије који не жели да потпише извештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извештај образложење односно разлоге због којих не жели да потпише извештај.