

3
4
5
6
7
8 **ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**
9

10
11
12
13
14 **I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ:**

15
16 1. **Датум и назив органа који је именовao комисију:** 21.10.2015. год, Наставно научно
17 веће Факултета ветеринарске медицине

18
19 2. **Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива**
20 **уже научне области за коју је изабран у звање, годином избора у звање и назив**
21 **факултета, установе у којој је члан комисије запослен:**

22
23 **Др Зора Мијачевић**, редовни професор у пензији, хигијена и технологија млека, 1994.
24 Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду.

25 **Др Снежана Булајић**, ванредни професор, хигијена и технологија млека, 2014,
26 Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду.

27 **Др Вера Катић**, редовни професор, хигијена и технологија млека, 1996. Факултета
28 ветеринарске медицине Универзитета у Београду.

29 **Др Драго Недић**, ванредни професор, ветеринарска економика, 2012, Факултет
30 ветеринарске медицине Универзитета у Београду.

31 **Др Радослав Грујић**, редовни професор, прехранбена технологија, 2000, Технолошки
32 факултет Зворник, Универзитета Источно Сарајево.

33
34
35 **II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:**

36
37 1. **Име, име једног родитеља, презиме:** Голић Милан Бојан

38
39 2. **Датум рођења, општина, Република:** 27.11.1977. године, Градишка, општина
40 Градишка, Република Српска, БиХ.

41
42 3. **Датум одбране, место и назив магистарске тезе*:** 12.03.2010., Факултет
43 ветеринарске медицине Универзитета у Београду, „Испитивање утицаја пробиотика и
44 пребиотика на поствакцинални одговор бројлерских пилића после пероралне
45 вакцинације атенуираним сојем *Salmonella Enteritidis*“,

46
47 4. **Научна област из које је стечено академско звање магистра наука*:** Клиничка
48 патологија и терапија животиња,

49
50 **III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:** „Утицај фактора средионе и услова
51 производње традиционалних сирева на динамику развоја и синтезу ентеротоксина код
52 популације коагулаза позитивних стафилокока“.

53
54 **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (навести броја страна поглавља, слика,**
55 **шема, графикана и сл.):**

56
57 Докторска дисертација је написана на 93 стране компјутерски обрађеног текста и
58 садржи уобичајена поглавља: Увод, Преглед литературе, Циљ и задаци рада,
59 Материјал и методе, Резултати испитивања, Дискусија, Закључци, Литература, Кратак
60 садржај на српском и енглеском језику. Документована је са 40 табела и 44 графикана.

1
2 **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ (дати кратак**
3 **опис сваког поглавља дисертације: увода, прегледа литературе, циља и задатака**
4

5 У **Уводу докторанд** истиче да се традиционални сиреви, који су били предмет
6 испитивања у оквиру ове докторске дисертације, производе од термички необрађеног
7 млека и у промет стављају као свежи сир и меки сир са зрењем (Влашићки сир). У
8 односу на механизам коагулације припадају групи киселокоагулишућих и
9 сиришнокоагулишућих сирева. Код свежег сира, који припада групи киселокоагулишућих
10 сирева, коагулација настаје активношћу аутохтоних бактерија млечне киселине.
11 Влашићки сир припада групи сиришнокоагулишућих сирева. Будући да се производе од
12 сировог млека, традиционални сиреви могу да представљају ризик од налаза
13 ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока. Велики број манипулација током
14 процеса производње и промета сира, температура на којој се производи и складишти,
15 дужина складиштења, као и физичко хемијске карактеристике сира (концентрација NaCl,
16 рН и a_w), погодују расту стафилокока и стварању ентеротоксина у сиру. Током
17 производње и складиштења меког сира коагулаза позитивне стафилококе могу да се
18 размножавају и стварају ентеротоксине, посебно ако производњу сира не прати
19 млечнокиселинска ферментација. Првих 48-72 часова производње сира у односу на
20 недовољни развој киселости у супстрату (млеко, груш, сир) погодују расту стафилокока.
21 Како је раст стафилокока у корелацији са стварањем ентеротоксина, објективна
22 процена ризика од налаза ентеротоксина стафилокока у сиру могућа је само у првих 48-
23 72 часа од почетка производње сира, када се уједно и очекује максимална популација
24 стафилокока. Количина ентеротоксина, која доводи до интоксикације, настаје при броју
25 коагулаза позитивних стафилокока већем од 10^5 cfu/g сира. За процену ризика од
26 налаза ентеротоксина стафилокока у меком сиру, произведеном у домаћинству, важно
27 је да се одреде физичко хемијске карактеристике сира, број коагулаза позитивних
28 стафилокока у сиру као и способност стафилокока да стварају ентеротоксине. На овај
29 начин би се раст стафилокока и стварање ентеротоксина довели у везу са условима
30 производње (процесни параметри - температура и време ферментације односно
31 коагулације, зрења и складиштења) и физичко-хемијским карактеристикама супстрата
32 (млеко, груш, сир), чиме би се пружила могућност да се модификацијом наведених
33 фактора, супстрат учини неповољном средином за раст стафилокока и синтезу
34 ентеротоксина.
35

36 Поглавље **Преглед литературе**, је подељено на седам подпоглавља: Епидемије
37 интоксикација ентеротоксинима *Staphylococcus aureus* настале после конзумирања
38 млека и производа од млека, Токсична доза, Остале врсте коагулаза позитивних
39 стафилокока које производе ентеротоксине, Извори контаминације, Ентеротоксини
40 стафилокока, Фактори који утичу на производњу ентеротоксина, Услови производње
41 који стимулишу продукцију ентеротоксина.

42 Докторанд је навео податке о епидемијама интоксикација ентеротоксинима
43 стафилокока насталим после конзумирања млека и производа од млека, литературне
44 податке о биолошким карактеристикама ентеротоксина, токсичној дози, као и податке о
45 преваленцији SEA-SEE ентеротоксина стафилокока у појединим намирницама. Посебну
46 пажњу докторанд је посветио условима који омогућавају раст стафилокока и стварање
47 ентеротоксина, односно факторима везаним за супстрат хране (рН, активност воде,
48 концентрација натријум хлорида), активност стартерске и нестартерске микрофлоре
49 бактерија млечне киселине али и условима процесног окружења (температура
50 ферментације, коагулације, зрења и складиштења). Разумевање међузависности ових
51 фактора је од суштинског значаја за објективну процену развоја популације
52 стафилокока и потенцијала стварања ентеротоксина.
53

54 **Циљ истраживања** ове докторске дисертације је био да се утврди да ли физичко-
55 хемијски фактори средине и услови производње традиционалних сирева омогућују раст
56 и размножавање коагулаза позитивних стафилокока и продукцију ентеротоксина, а што
57 треба да допринесе објективној процени ризика од налаза коагулаза позитивних
58 стафилокока у традиционалним сиревима произведеним од сировог млека. За
59 реализацију утврђених циљева постављени су следећи задаци:
60

- 1 - изолација и идентификација коагулаза позитивних стафилокока пореклом из
- 2 традиционалних сирева,
- 3 - утврђивање ентеротоксогеног потенцијала изолата коагулаза позитивних
- 4 стафилокока,
- 5 - постављање експерименталног протокола који симулира услове производње
- 6 традиционалних сирева у циљу утврђивања утицаја фактора средине и услова
- 7 производње на динамику развоја популације коагулаза позитивних стафилокока
- 8 и
- 9 - постављање експерименталног протокола који симулира услове производње
- 10 традиционалних сирева у циљу утврђивања утицаја фактора средине и услова
- 11 производње на синтезу ентеротоксина код коагулаза позитивних стафилокока.

12 У оквиру поглавља **Материјал и методе** детаљно су описани материјал и методе
13 коришћени током израде докторске дисертације. У циљу утврђивања контаминације
14 сира коагулаза позитивним стафилококама испитано је 100 узорка сира (50
15 киселокоагулишућих и 50 сиришнокоагулишућих сирев) узетих из промета. Способност
16 стафилокока да продукују ентеротоксине је испитана код 215 изолата коагулаза
17 позитивних стафилокока. Присуство *spa* гена, карактеристичног за *Staphylococcus*
18 *aureus* и детекција ентеротоксина (CEA-CEE), испитано је код 61 изолата коагулаза
19 позитивних стафилокока. За припрему медијума млеко + бактерије млечне киселине
20 (БМК) коришћене су лактококе изоловане из сира које су показале добру способност
21 кисељења. За испитивање раста и стварања ентеротоксина током производње сира
22 коришћен је *Staphylococcus aureus* који продукује ентеротоксин С (SEC).

23
24 На основу података, прикупљених о производњи традиционалних сирева, постављен је
25 експериментални протокол за производњу киселокоагулишућег и сиришнокоагулишућег
26 сира. Током експерименталне производње сира праћена је промена броја коагулаза
27 позитивних стафилокока, pH и a_w . Број коагулаза позитивних стафилокока у сиру је
28 одређен BAS EN ISO 6888-1/Amd 1:2005 методом; pH вредност је мерена помоћу pH
29 метра произвођача Mettler Toledо; a_w вредност је мерена инструментом LabMaster-
30 a_w произвођача Novasina; ентеротоксини стафилокока у сиру су доказивани ELISA
31 техником, комерцијалног произвођача BioControl, ELISA Кит Transia plate Staphylococcal
32 Enterotoxin, који детектује А, В, C₁, C₂, C₃, D и Е ентеротоксине; идентификација гена за
33 синтезу стафилококног ентеротоксина С рађена је Ral Time PCR методом, а присуство
34 *spa* гена PCR методом. За доказивање *spa* гена коришћени су прајмери: *spa-f*- 5'-
35 TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC-3' и *spa-r* 5'-CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT-3'. За
36 испитивање присуства гена за продукцију ентеротоксина С стафилокока коришћени су
37 следећи прајмери: *sec-f*- 5'- CGTATTAGCAGAGAGCCAACCA - 3' и *sec-r*- 5'-
38 GTGAATTTACTCGCTTTGTGCAA-3'.

39
40 За тестирање и утврђивања статистички значајних разлика између испитиваних
41 експерименталних третмана, коришћена је вишефакторска анализа варијансе (ANOVA).

42
43 **Резултати** испитивања су приказани у четири подпоглавља. У првом подпоглављу су
44 приказани резултати испитивања налаза коагулаза позитивних стафилокока у узорцима
45 традиционалних сирева и физичко хемијске карактеристике сирева. Коагулаза
46 позитивне стафилококе су изоловане из 74 узорка сира, од тога 36 узорка
47 киселокоагулишућег сира и 38 узорка сиришнокоагулишућег сира. Број коагулаза
48 позитивних стафилокока у киселокоагулишућим сиревима кретао се од 1,70 до 5,15 log
49 CFU/g, са просечном вредношћу $2,91 \pm 0,67$ log CFU/g, а број коагулаза позитивних
50 стафилокока у сиришнокоагулишућим сиревима кретао се од 1,70 до 4,54 log CFU/g, са
51 просечном вредношћу $3,00 \pm 0,82$ log CFU/g. pH вредност у киселокоагулишућим
52 сиревима била је нижа, а a_w вредност виша него у сиришнокоагулишућим сиревима.
53 Коагулаза позитивне стафилококе у броју ≥ 4 log CFU/g утврђене су у 2 (5,56%) узорка
54 киселокоагулишућег сира и у 7 (18,42%) узорка сиришнокоагулишућег сира.

55

1 Од 215 коагулаза позитивних стафилокока изолованих из сира, применом ELISA
2 технике је доказано да 58 (26,98%) изолата ствара ентеротоксине (SEA-SEE). Свих 58
3 изолата који су стварали ентеротоксин, идентификовани су, на основу присуства *spa*
4 гена, као *Staphylococcus aureus*. Будући да је ELISA техником утврђено да 58 изолата
5 стварају ентеротоксине SEA-SEE, а према подацима из литературе *Staphylococcus*
6 *aureus* изолован у случајевима субклиничких маститиса најчешће ствара SEC, за
7 испитивање стварања ентетотоксина у симулираним условима производње сира,
8 изабран је изолат *Staphylococcus aureus* за који је применом Real Time PCR технике
9 доказано да ствара SEC. У експерименталном протоколу производње
10 киселокоагулишућих сирева, ентеротоксогене коагулаза позитивне стафилококе су
11 додате у три различита медијума у почетном броју 10^1 CFU/ml и 10^2 CFU/ml. Утврђен је
12 статистички значајно већи пораст *Staphylococcus aureus* при почетном броју
13 стафилокока 10^2 CFU/ml ($p < 0,01$). Анализом утицаја медијума (BHI бујон, млеко,
14 млеко+БМК) (70 узорак) на раст стафилокока, установљене су значајне разлике
15 ($p < 0,01$) између сва три медијума међусобно. Највећи пораст раст броја *Staphylococcus*
16 *aureus* утврђен је у BHI бујону ($4,24 \pm 1,94 \log$ CFU/ml), затим у млеку ($3,97 \pm 1,88$), а
17 најмањи у млеку+БМК ($3,44 \pm 0,95 \log$ CFU/ml). Испитивањем утицаја фазе производње
18 киселокоагулишућег сира на брзину размножавања *Staphylococcus aureus* утврђене су
19 значајне разлике између свих фаза производње сира ($p < 0,01$).

20
21 Током ране фазе производње сира, интринзик параметри везани за матрикс намирнице
22 (pH, a_w) као и фактори средине, пре свега температура, су такви да погодују
23 размножавању стафилокока и продукцији ентеротоксина. Резултати добијени током
24 испитивања утицаја промене физичко хемијских карактеристика супстрата кроз фазе
25 производње сира, су показали да снижење pH, ниска a_w , конкуренција и антагонизам од
26 стране бактерија млечне киселине утичу на смањење популације стафилокока у
27 медијуму.

28
29 Током производње сиришнокоагулишућих сирева, у првих 72 часа долази до промена
30 pH и a_w вредности медијума. У овом периоду, коагулација је производ деловања
31 ензима, који своју активност исказује на pH 6,3-6,4. После коагулације, врши се обрада
32 груша и одвајање сурутке, тако да добијена грудa, после пресовања, има повећану суву
33 материју, али незнатну промену pH у односу на почетно млеко. Током саламурања со
34 делује на активност бактерија млечне киселине, тако да се pH успорено мења, али
35 доводи до издвајања сурутке, што је последица повећања суве материје грудe.
36 Стављање сира у саламуру, због смањене активности бактерија млечне киселине,
37 такође утиче на спорију промену pH, и даље издвајање сурутке што утиче на повећање
38 суве материје и смањење a_w вредности.

39
40 Резултати праћења промене pH вредности кроз фазе производње
41 сиришнокоагулишућих и слаткокоагулишућих сирева су показали да pH вредност
42 значајно брже опада током процеса производње киселокоагулишућих сирева у односу
43 на слаткокоагулишуће сиреве ($p < 0,01$).

44
45
46 У медијумима млеко и млеко+БМК, ентеротоксин није доказан у симулираним условима
47 производње киселокоагулишућих сирева. Присуство ентеротоксина је доказано у сиру
48 из саламуре старом 36 односно 72 часа од почетка производње сиришнокоагулишућих
49 сирева, при оба почетна инокулума стафилокока (10^1 CFU/ml и 10^2 CFU/ml).

50
51 У поглављу **Дискусија** добијени резултати детаљно су објашњени и упоређени са
52 подацима из литературе. За поређење резултата добијених у оквиру ове докторске
53 дисертације корешћене су 143 библиографске јединице са освртом на најновије
54 резултате истраживања у области од интереса.

55
56
57
58

1 VI **ЗАКЉУЧЦИ ИСТРАЖИВАЊА** (навести закључке који су приказани у
2 докторској дисертацији): На основу добијених резултата, изводе се следећи
3 закључци:

- 4
- 5 1. Коагулаза позитивне стафилококе доказане су код 72% киселокоагулишућих и
6 76% сиришнокоагулишућих сирева. Просјечан број коагулаза позитивних
7 стафилокока код киселокоагулишућих сирева је $2,91 \pm 0,67 \log \text{CFU/g}$, а код
8 сиришнокоагулишућих $3,00 \pm 0,82 \log \text{CFU/g}$. Стафилококе у броју $\geq 4 \log \text{CFU/g}$,
9 утврђене су код 5,56% киселокоагулишућих и код 18,42% сиришнокоагулишућих
10 сирева.
- 11 2. На основу присуства *sra* гена изолати стафилокока идентификовани су као
12 *Staphylococcus aureus*. Од испитиваних сојева *Staphylococcus aureus*, утврђено
13 је да 26,98% има ентеротоксогени потенцијал.
- 14 3. Почетна контаминација стафилококама има статистички значајан утицај на раст
15 стафилокока током процеса производње сира ($p < 0,01$). У условима производње
16 традиционалних сирева, гдје се ферментација одвија на 22°C , повећање броја
17 коагулаза позитивних стафилокока код киселокоагулишућих сирева је у првих 36
18 часова производње, а код сиришнокоагулишућих сирева је у првих 72 часа
19 производње.
- 20 4. Налаз ентеротоксина стафилокока директно је зависио од врсте медијума,
21 достигнутог броја стафилокока (изнад $5 \log \text{CFU/g}$) и рН медијума.
- 22 5. У производњи киселокоагулишућих сирева анализирани услови указују да током
23 правилног процеса ферментације не постоје услови за формирање критичног
24 нивоа стафилокока, а с тим и за стварање ентеротоксина.
- 25 6. У производњи сиришнокоагулишућих сирева, у првих 72 часа, активност
26 бактерија млијечне киселине и опадање рН не инхибирају раст стафилокока и
27 стварање ентеротоксина.
- 28 7. У производњи сиришнокоагулишућих сирева, ентеротоксогене коагулаза
29 позитивне стафилококе представљају ризик за налаз ентеротоксина у сиревима,
30 што не зависи од почетног броја стафилокока у млеку, па је неопходно да се у
31 производњи ових сирева број ентеротоксогених коагулаза позитивних
32 стафилококе сведе на прихватљив ниво.

33
34 **VII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА**
35 (навести да ли су добијени резултати у складу са постављеним циљем и
36 задацима истраживања, као и да ли закључци произилазе из добијених
37 резултата):

38
39 Добијени резултати у докторској дисертацији су у складу са постављеним циљевима у
40 задацима истраживања и закључци произилазе из добијених резултата.

41
42 **VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

43
44 1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави
45 теме?

46
47 Дисертација је у потпуности написана у складу са образложењем наведеним у пријави
48 теме.

49
50 2. Да ли дисертација садржи све елементе прописане за завршену докторску
51 дисертацију?

52 Дисертација садржи све елементе прописане за завршену докторску дисертацију.
53
54

1 **3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?**
2

3 У научној и стручној литератури нема довољно података о ризику који традиционални
4 сиреви, произведени од сировог млека, када су у питању интоксикације
5 ентеротоксинима стафилокока, представљају по здравље људи.

6 Оригиналан допринос ове дисертације науци је у јасно дефинисаним условима
7 производње традиционалних сирева при којима се у сиру размножавају коагулаза
8 позитивне стафилококе и стварају ентеротоксине. Брзина снижавања рН вредности,
9 током производње киселокоагулишућег сира, успорава размножавање стафилокока,
10 чиме је онемогућено стварање ентеротоксина. Током производње слаткокоагулишућег
11 сира рН спорије опада, па коагулаза позитивне стафилококе уколико су присутне у
12 млеку употребљеном за производњу сира, могу да се размножавају и стварају
13 ентеротоксине.

14
15 **IX ПРЕДЛОГ:**

16
17 **На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже (одабрати једну од**
18 **три понуђених могућности):**

19
20 **- да се докторска дисертација прихвати, а кандидату одобри одбрана**
21

22
23 11.12.2015. године

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

24
25
26 **Др Зора Мијачевић,**
27 редовни професор, у пензији
28 Факултета ветеринарске
29 медицине Универзитета у
30 Београду

31
32
33 **Др Снежана Булајић**
34 ванредни професор
35 Факултета ветеринарске
36 медицине Универзитета у
37 Београду

38
39
40 **Др Вера Катић**
41 редовни професор,
42 Факултета ветеринарске
43 медицине Универзитета у
44 Београду

45
46
47 **Др Драго Недић**
48 ванредни професор
49 Факултета ветеринарске
50 медицине Универзитета у
51 Београду

52
53
54
55 **Др Радослав Грујић**
56 редовни професор
57 Технолошки факултет Зворник
58 Универзитет Источно Сарајево