

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ**  
**ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ**  
**КАТЕДРА ЗА ХИГИЈЕНУ И ТЕХНОЛОГИЈУ НАМИРНИЦА**  
**АНИМАЛНОГ ПОРЕКЛА**

**мр Бојан М. Голић, ДВМ спец.**

**УТИЦАЈ ФАКТОРА СРЕДИНЕ И УСЛОВА**  
**ПРОИЗВОДЊЕ ТРАДИЦИОНАЛНИХ СИРЕВА НА**  
**ДИНАМИКУ РАЗВОЈА И СИНТЕЗУ**  
**ЕНТЕРОТОКСИНА КОД ПОПУЛАЦИЈЕ**  
**КОАГУЛАЗА ПОЗИТИВНИХ СТАФИЛОКОКА**

**докторска дисертација**

**Београд, 2015.**

**UNIVERSITY OF BELGRADE**  
**FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**  
**DEPARTMENT OF HYGIENE AND TECHNOLOGY OF FOOD OF**  
**ANIMAL ORIGIN**

**MSc. Bojan M. Golic, DVM spec.**

**INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS AND  
CONDITIONS OF ARTISANAL CHEESES  
PRODUCTION ON THE DYNAMIC OF  
DEVELOPMENT AND ENTEROTOXIN SYNTHESIS  
IN POPULATION OF COAGULASE-POSITIVE  
STAPHYLOCOCCI**

**Doctoral Thesis**

**Belgrade, 2015.**

Комисија за оцјену докторске дисертације:

1. ментор: **др Зора Мијачевић** редовни професор,  
Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине  
Београд
  
2. члан: **др Снежана Булајић** ванредни професор,  
Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине  
Београд
  
3. члан: **др Вера Катић** редовни професор,  
Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине  
Београд
  
4. члан: **др Драго Недић** ванредни професор,  
Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине  
Београд
  
5. члан: **др Радослав Грујић** редовни професор,  
Универзитет у Источном Сарајеву, Технолошки факултет  
Зворник

Датум одбране докторске дисертације: \_\_\_\_\_

*Овим путем желим да се захвалим свима онима, који су ми, на било који начин, помогли у изради докторске дисертације.*

*Захваљујем се проф. др Зори Мијачевић, која ми је, као ментор, несебично помагала током свих фаза истраживачког рада и израде докторске дисертације.*

*У изради докторске дисертације, велику помоћ и савјете дале су проф. др Вера Катић и проф. др Снежана Булајић, којима се пуно захваљујем.*

*Посебну захвалност исказујем проф. др Драги Недићу, који ми је, као непосредни руководилац, дао велику подршку и помоћ и који је омогућио да се реализује овај научноистраживачки рад.*

*Јавној установи Ветеринарски институт Републике Српске „Др Васо Бутозан“ Бања Лука, а посебно особљу лабораторије за микробиологију хране, захваљујем се на свесрдној помоћи и разумијевању.*

*На указаној подршци, помоћи и стрпљењу, захваљујем се мојој породици, супрузи Милијани, сину Луки и кћерки Вери.*

*На разне начине, помоћ су указали Синиша Вељовић, Амна Торлаковић, Горан Вучић, Слободан Дојчиновић, Бранко Велебит и Радован Бабић, којима се неизмјерно захваљујем.*

*Аутор*

# УТИЦАЈ ФАКТОРА СРЕДИНЕ И УСЛОВА ПРОИЗВОДЊЕ ТРАДИЦИОНАЛНИХ СИРЕВА НА ДИНАМИКУ РАЗВОЈА И СИНТЕЗУ ЕНТЕРОТОКСИНА КОД ПОПУЛАЦИЈЕ КОАГУЛАЗА ПОЗИТИВНИХ СТАФИЛОКОКА

## РЕЗИМЕ

Традиционални сиреви који се производе од термички необрађеног млијека, због начина производње, носе ризик од присуства ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока. У односу на механизам коагулације припадају групи сиришнокоагулишућих и киселокоагулишућих сирева. Велики број манипулација сиром током процеса производње и промета, температура на којој се производи и складишти, вријеме складиштења, као и особине сира (концентрација NaCl, pH и  $a_w$ ) су фактори који погодују расту стафилокока и продукцији ентеротоксина у сиреу.

Циљ испитивања био је да се утврди да ли физичко-хемијски фактори матрикса и услови производње традиционалних сирева омогућују раст и размножавање коагулаза позитивних стафилокока и синтезу ентеротоксина, што треба да допринесе објективној процјени ризика у производњи традиционалних сирева у односу на присуство ентеротоксогених стафилокока.

На присуство коагулаза позитивних стафилокока испитани су традиционални сиреви поријеклом из Републике Српске, који припадају сиревима од термички необрађеног млијека и тиме носе ризик од присуства ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока. Анкетирањем произвођача испитани су услови производње ових сирева, а затим је урађен мониторинг услова производње код одабраних произвођача. Укупно је испитано 100 узорака сира, и то 50 киселокоагулишућих и 50 сиришнокоагулишућих сирева. У току мониторинга праћен је технолошки процес, критична температура, pH и  $a_w$ .

На основу анкете о условима и процесу производње сира, спроведене међу индивидуалним произвођачима сира у домаћинствима, постављен је експериментални протокол који симулира услове и процес производње сира, током ког је праћен број коагулаза позитивних стафилокока у сиреу, pH и  $a_w$  сира.

Утврђивање броја коагулаза позитивних стафилокока рађено је методом BAS EN ISO 6888-1/Amd 1:2005, pH вриједност одређивана је инструментално pH метром, а одређивање  $a_w$  вриједности рађено је инструментално, мјерењем електролитичког отпора. Доказивање ентеротоксина стафилокока рађено је ELISA тестом (SEA-SEE), доказивање *spa* гена карактеристичног за *Staphylococcus aureus* рађено је примјеном конвенционалне PCR технике, а доказивање *sec* гена који кодира стварање SEC ентеротоксина, рађено је примјеном Real Time PCR технике.

У 72% киселокоагулишућих и у 76% сиришнокоагулишућих сирева утврђено је присуство коагулаза позитивних стафилокока. Просјечан број коагулаза позитивних стафилокока код киселокоагулишућих сирева био је  $2,91 \pm 0,67 \log \text{CFU/g}$ , а код сиришнокоагулишућих  $3,00 \pm 0,82 \log \text{CFU/g}$ . Стафилококе у броју  $\geq 4 \log \text{CFU/g}$ ,

утврђене су код 5,56% киселокоагулишућих и код 18,42% сиришнокоагулишућих сирева. На основу присуства *spa* гена изолати стафилокока идентификовани су као *Staphylococcus aureus*. Од испитиваних сојева *Staphylococcus aureus*, утврђено је да 26,98% има ентеротоксогени потенцијал. Почетна контаминација стафилококама имала је статистички значајан утицај на раст стафилокока током процеса производње сира ( $p < 0,01$ ). У условима производње традиционалних сирева, гдје се ферментација одвија на 22°C, повећање броја коагулаза позитивних стафилокока код киселокоагулишућих сирева било је у првих 36 часова производње, а код сиришнокоагулишућих сирева у првих 72 часа производње. Налаз ентеротоксина стафилокока директно је зависио од врсте медијума, достигнутог броја стафилокока (изнад 5 log CFU/g) и рН медијума. У производњи киселокоагулишућих сирева анализирани услови указују да током правилног процеса ферментације не постоје услови за формирање критичног нивоа стафилокока, а с тим и за стварање ентеротоксина. У производњи сиришнокоагулишућих сирева, у првих 72 часа, активност бактерија млијечне киселине и опадање рН не инхибишу раст стафилокока и стварање ентеротоксина. У производњи сиришнокоагулишућих сирева, ентеротоксогене коагулаза позитивне стафилококе представљају ризик за налаз ентеротоксина у сиревима, што не зависи од почетног броја стафилокока у млијеку, па је неопходно да се у производњи ових сирева број ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока сведе на прихватљив ниво.

**Кључне речи:** коагулаза позитивне стафилококе, ентеротоксин, сир

**Научна област:** Ветеринарска медицина

**Ужа научна област:** Хигијена и технологија намирница

**УДК број:** 579.62:637.33

# INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS AND CONDITIONS OF ARTISANAL CHEESES ON THE DYNAMIC OF DEVELOPMENT AND ENTEROTOXIN SYNTHESIS IN POPULATION COAGULASE-POSITIVE STAPHYLOCOCCI

## SUMMARY

Artisanal cheeses, produced from thermically untreated milk, may, due to their specific production process, pose a risk of presence of enterotoxigenic coagulase positive staphylococci. According to the mechanism of curd formation, these cheeses are divided into two groups: rennet-coagulated and sour-coagulated cheeses. Conditions favourable to staphylococci growth and enterotoxin production in cheese are: frequent handling and suitable temperature during processing, storage and trade, long storage time and suitable physical and chemical features of the cheese (NaCl concentration, pH and  $a_w$ ).

The aim of the study was to determine whether physical and chemical characteristics of matrix and production conditions of traditional cheeses allow the growth and reproduction of coagulase-positive staphylococci and enterotoxin production. Those data should contribute to objective assessment of risk of the presence of enterotoxigenic staphylococci in the production of artisanal cheeses.

A number of artisanal cheeses, originating from Republic of Srpska, produced from uncooked milk and thus having a risk of containing enterotoxigenic coagulase positive staphylococci, were analysed during this study. Production process was surveyed by interviewing of each manufacturer, and according to this monitoring of production conditions was done. Subsequently, total of 100 samples (50 sour-coagulated and 50 rennet-coagulated) of cheese were analysed. Monitoring of technological process, critical temperature, pH and  $a_w$  was performed along with testing of samples.

The results of the interviews displaying manufacturing conditions were used to set up an experimental protocol of simulated cheese production process in appropriate conditions. During this protocol, the number of coagulase positive staphylococci, pH and  $a_w$  were regularly monitored.

Enumeration of coagulase-positive staphylococci was performed by the method BAS EN ISO 6888-1/Amd 1:2005, while pH meter and electrolytic resistance measuring device were used to measure pH value and  $a_w$ , respectively. Detection of staphylococcal enterotoxins (SEA-SEE) was done by the use of ELISA test. Detection of *spa* genes characteristic of *Staphylococcus aureus* and *sec* gene encoding synthesis of SEC enterotoxins, was done by means of conventional PCR technique and Real Time PCR technique, respectively.

Total of 72% sour-coagulated and 76% rennet-coagulated cheeses revealed the presence of coagulase positive staphylococci. Average number of coagulase-positive staphylococci was  $2,91 \pm 0,67$  log CFU/g in sour-coagulated, and  $3,00 \pm 0,82$  log CFU/g in rennet-coagulated cheese. In 5,56% of sour-coagulated cheeses and in 18,42% of rennet-coagulated cheeses staphylococci were found in greater number than 4 log CFU/g. Based on the presence of *spa* gene the isolates of staphylococci were identified as *Staphylococcus*

*aureus*. It was found that 26,98% of the tested strains of *Staphylococcus aureus* had enterotoxigenic potential. Initial contamination with staphylococci had statistically significant effect on the growth of staphylococci in the process of cheese production ( $p < 0,01$ ). For traditional cheeses fermented at 22°C, number of coagulase-positive staphylococci in sour-coagulated cheeses increased within the first 36 hours of production, whilst in rennet-coagulated cheeses during the first 72 hours of production process. Detection of staphylococcal enterotoxin was directly dependent on the type of media, the number of staphylococci (above 5 log CFU/g) and the pH of the medium. Conditions analyzed during the production of sour-coagulated cheeses show that, due to proper fermentation process, no critical level of staphylococci, nor enterotoxin production may occur. However, during the production of rennet-coagulated cheeses, the activity of the lactic acid bacteria and the decline of the pH during the first 72 hours of the production process, do not inhibit the growth of staphylococci and formation of enterotoxin. Hence, during the production of rennet-coagulated cheeses, enterotoxigenic coagulase-positive staphylococci and subsequently synthesis of enterotoxin pose a risk, independently of the initial number of staphylococci in milk. Therefore, it is essential to reduce the number of enterotoxigenic coagulase-positive staphylococci during the production of these cheeses to an acceptable level.

**Keywords:** coagulase positive staphylococci, enterotoxin, cheese

**Scientific area:** Veterinary Medicine

**Field of Academic Expertise:** Hygiene and Technology of Food

**The UDK number:** 579.62:637.33



**СПИСАК КОРИШТЕНИХ СКРАЋЕНИЦА И ЊИХОВА ЗНАЧЕЊА:**

<b>Скраћеница</b>	<b>Значење</b>
pH	Концентрација водоникових јона
$a_w$	Активност воде
SE	Ентеротоксин стафилокока
SEI	Ентеротоксину сличан протеин
SEA	А ентеротоксин стафилокока
SEB	В (Б) ентеротоксин стафилокока
SEC	С (Ц) ентеротоксин стафилокока
SED	Д ентеротоксин стафилокока
SEE	Е ентеротоксин стафилокока
SEH	Н (Х) ентеротоксин стафилокока
TSST-1 (SEF)	Токсин токсик шок синдрома
T	Температура
BHI бујон	Brain Heart infusion бујон
PCA	Plate count agar
$pK_a$	Константа дисоцијације киселина
D вриједност	Вриједност децималног преживљавања (децималне редукције)
CFU	Colony Forming Units (број јединица које формирају колоније)
WDCM	World Data Centre for Microorganisms
ATCC	American Type Culture Collection
БМК	Бактерије млијечне киселине
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
DNA	Deoxyribonucleic Acid
RNA	Ribonucleic Acid
PCR	Polymerase chain reaction
КПС	Коагулаза позитивне стафилококе

## САДРЖАЈ:

1. УВОД .....	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ .....	3
2.1. Епидемије интоксикација ентеротоксинима стафилокока настале после конзумирања млијека и производа од млијека.....	3
2.2. Токсична доза .....	4
2.3. Остале врсте стафилокока које производе ентеротоксине .....	4
2.4. Извори контаминације.....	4
2.5. Ентеротоксини стафилокока .....	5
2.6. Фактори који утичу на производњу ентеротоксина .....	6
2.6.1. Физичко-хемијски фактори.....	9
2.6.1.1. Активност воде/отпорност на со .....	9
2.6.1.2. Толеранција киселости.....	10
2.6.1.3. Отпорност на топлоту .....	10
2.6.1.4. Кисеоник.....	11
2.6.2. Конкурентске бактерије .....	12
2.7. Услови производње који стимулишу продукцију ентеротоксина .....	12
2.7.1.1. Свјежи сиреви .....	12
2.7.1.2. Меки сиреви .....	13
3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ ИСПИТИВАЊА .....	15
3.1. Циљ испитивања .....	15
3.2. Задаци испитивања .....	15
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ .....	16
4.1. Материјал.....	16
4.1.1. Сиреви.....	16
4.1.2. Микроорганизми.....	16
4.1.3. Храњиве подлоге и реагенси .....	16
4.2. Методе.....	17
4.2.1. Услови производње традиционалних сирева.....	17
4.2.2. Постављање експерименталног протокола који симулира услове производње сира у домаћинству .....	17
4.2.2.1. Постављање експерименталног протокола који симулира услове производње киселокоагулишућег сира.....	17
4.2.2.2. Постављање експерименталног протокола који симулира услове производње сирешкоагулишућег сира .....	18

4.2.3. Микробиолошке, физичко-хемијске, имуноензимске и молекуларне методе испитивања .....	18
4.2.3.1. Утврђивање броја коагулаза позитивних стафилокока .....	18
4.2.3.2. Одређивање рН вриједности .....	18
4.2.3.3. Одређивање $a_w$ вриједности.....	18
4.2.3.4. Доказивање ентеротоксина стафилокока .....	18
4.2.3.5. Идентификација врста коагулаза позитивних стафилокока.....	18
4.2.3.5.1. Реагенси за испитивање присуства гена <i>sra</i> .....	18
4.2.3.5.2. Метода испитивања присуства гена <i>sra</i> .....	19
4.2.3.6. Идентификација гена за синтезу стафилококног ентеротоксина .....	20
4.2.3.6.1. Реагенси за испитивање присуства гена за синтезу стафилококних ентеротоксина (SEA-SEE).....	20
4.2.3.6.2. Испитивање присуства гена за синтезу стафилококних ентеротоксина (SEA-SEE) код стафилокока .....	21
4.2.3.7. Статистичка обрада података.....	22
5. РЕЗУЛТАТИ ИСПИТИВАЊА.....	23
5.1. Изолација и идентификација коагулаза позитивних стафилокока из традиционалних сирева .....	23
5.2. Утврђивање ентеротоксогеног потенцијала сојева коагулаза позитивних стафилокока .....	27
5.3. Резултати испитивања утицаја фактора средине и услова производње на динамику развоја популације коагулаза позитивних стафилокока у сиру.....	28
5.3.1. Резултати испитивања утицаја фактора средине и услова производње на динамику развоја популације коагулаза позитивних стафилокока у киселокоагулишућем сиру.....	29
5.3.2. Резултати испитивања утицаја фактора средине и услова производње на динамику развоја популације коагулаза позитивних стафилокока у сиришнокоагулишућем сиру .....	47
5.4. Утицај фактора средине и услова производње на синтезу ентеротоксина коагулаза позитивних стафилокока у производњи традиционалних сирева .....	66
5.4.1. Утицај фактора средине и услова производње на синтезу ентеротоксина коагулаза позитивних стафилокока у производњи киселокоагулишућег сира.....	66
5.4.2. Утицај фактора средине и услова производње на синтезу ентеротоксина коагулаза позитивних стафилокока у производњи сиришнокоагулишућег сира ....	67
6. ДИСКУСИЈА .....	68
7. ЗАКЉУЧЦИ.....	73
8. ЛИТЕРАТУРА .....	74

## 1. УВОД

Традиционални сиреви који се производе од термички необрађеног млијека, због начина производње, носе ризик од присуства ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока. Ови сиреви се производе без додавања бактерија млијечне киселине. У односу на механизам коагулације припадају групи киселокоагулишућих и сиришнокоагулишућих сирева. Код свјежег сира, који припада групи киселокоагулишућих сирева, коагулација наступа активношћу бактерија млијечне киселине које се налазе у сировом млијеку и које у млијеко доспијевају из околине (нестартерске бактерије млијечне киселине). Овај сир се ставља на тржиште као млади сир, без зрења. Влашићи сир припада групи сиришнокоагулишућих сирева, који се добијају сиришном коагулацијом, додавањем сирила у сирово млијеко. Овај сир се, уобичајено, ставља на тржиште после периода зрења у саламури од 60 дана.

Људски фактор и услови производње сирева произведених од термички необрађеног млијека, имају значајну улогу у развоју стафилокока и продукцији ентеротоксина у сиру. Велики број манипулација сиром током процеса производње и промета, температура на којој се производи и складишти, вријеме складиштења, као и особине сира (концентрација NaCl, pH и  $a_w$ ) су фактори који погодују расту стафилокока и продукцији ентеротоксина у сиру. Температура производње традиционалних сирева омогућава интензиван раст стафилокока и постизање критичног броја  $\geq 5 \log \text{CFU/g}$ , значајног за доказивање ентеротоксина у сиру. Вриједност pH, која је један од значајних интринзик фактора, према подацима из литературе ствара рестриктивне услове у матриксу, који утичу на раст стафилокока, а такође и  $a_w$  вриједност традиционалних сирева погодује расту стафилокока.

Стафилококно тровање храном је узроковано ентеротоксином, којег углавном продукују сојеви *Staphylococcus aureus*, који расту у храни и формирају ентеротоксине. Непастеризовано млијеко и сир су типични производи од млијека који су повезани са епидемијама тровањем храном узрокованим ентеротоксином стафилокока. *Staphylococcus aureus* може доспјети у млијеко директним излучивањем из вимена са субклиничким маститисом или контаминацијом из окружења приликом руковања и прераде сировог млијека.

Ако сирово млијеко садржи висок број *Staphylococcus aureus*, ентеротоксин може бити произведен у току процеса производње производа од млијека, уколико је омогућен раст ентеротоксогених стафилокока.

Ентеротоксогени сојеви стафилокока, и поред тога што имају ген за продукцију ентеротоксина, не продукују увијек ентеротоксин током производње и чувања, јер услови у производњи сира могу утицати на испољавање способности продукције ентеротоксина. Прва 2-3 дана у производњи већине сирева критичан су период за продукцију ентеротоксина. У том периоду број стафилокока може достићи максимум, а потом може почети да опада. Постизање високог броја стафилокока на самом почетку производње сира, може имати за посљедицу и продукцију ентеротоксина у датом производу.

Раст *Staphylococcus aureus* у храни представља потенцијалну опасност по јавно здравље, јер многи сојеви *Staphylococcus aureus* производе ентеротоксине, који су узрок стафилококног тровања храном. Епидемије тровања храном изазване ентеротоксином стафилокока, су једна од најчешћих тровања људи, имају потенцијал

да утичу на велики број појединаца и често су повезане са великим скуповима на којима се служи храна. Ентеротоксини стафилокока се наводе као узрок тровања у преко 50% случајева алиментарних тровања у 2009. години.

Симптоми тровања су мучнина, повраћање, бол у стомаку и пролив, а понекад могу да се јаве главобоља и пад крвног притиска. Током прераде и складиштења хране, температуре изван опсега 7-48°C спречавају раст *Staphylococcus aureus*. Међутим, *Staphylococcus aureus* је веома толерантан на NaCl и расте добро све до концентрације од 10%, па чак и до 20% раст је могућ, иако отежан. Ентеротоксине стафилокока, протеине отпорне на топлоту, продукују многи сојеви *Staphylococcus aureus*, али и неке друге коагулаза позитивне стафилококе као што су сојеви *Staphylococcus intermedius* и *Staphylococcus hyicus*. Да би изазвале тровање храном, стафилококе морају бити у стању да расту и производе ентеротоксине. Производња ентеротоксина могућа је и у условима који мало прелазе границу услова раста стафилокока. Зависно од бројних фактора, као што су врста хране, рН, температура, активност воде, атмосферски услови и присуство других микроорганизама, различите количине ентеротоксина стафилокока могу да се произведу у храни.

Микробиолошки критеријуми који се примјењују за *Staphylococcus aureus* треба да спријече продукцију ентеротоксина стафилокока током процеса производње и њихову појаву у финалном производу. У легислативи Европске уније постоје микробиолошки критеријуми за *Staphylococcus aureus* у млијеку и производима од млијека. У зависности од категорије хране, највиши лимити (М) су у распону  $10^2$  до  $10^4$ CFU/g за сир произведен од сировог млијека. Само два критеријума (меки сир и сир од сировог млијека и термички обрађеног млијека) узимају у обзир производњу ентеротоксина стафилокока из сојева изолованих из ових производа, док не постоје критеријуми у млијеку и другим производима од млијека (**European Commission, 2003**). Правилником о микробиолошким критеријумима за храну (**Службени гласник Републике Српске 109/12**), као критеријум безбједности хране за сиреве, млијеко у праху и сурутку у праху дефинисано је одсуство ентеротоксина стафилокока у 25g за ове производе стављене у промет, током рока трајања производа, у случају да се у њима утврде вриједности коагулаза позитивних стафилокока  $\geq 10^5$ CFU/g.

## 2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

### 2.1. Епидемије интоксикација ентеротоксинима стафилокока настале после конзумирања млијека и производа од млијека

Од 59 епидемија алиментарних интоксикација ентеротоксинима стафилокока, које укључују млијеко и производе од млијека, у периоду 1992-1997. године у Француској, сиреви су били укључени у 53 епидемије (**De Buyser и сар., 2001**). У 28 епидемија сиреви су били произведени од сировог млијека, а у преосталих 25 епидемија сиреви су произведени од млијека обрађеног различитим режимима термичке обраде.

У периоду 1980-2000. године у различитим државама описане су епидемије са *Staphylococcus aureus* у које су укључени млијеко и производи од млијека, које су приказане у табели 2.1.1.

**Табела 2.1.1. Епидемије *Staphylococcus aureus* у различитим државама, у које су укључени млијеко и производи од млијека (De Buyser и сар., 2001; Asao и сар., 2003)**

Држава	Година	Број случајева	Врста хране (врста SE)	Врста млијека	Референца
Канада	1980	62	Киселокоагулишући сир (SEA, SEC)	Непознато	<b>Todd и сар., 1981</b>
САД	1981	16	Сир	Пастеризовано	<b>Altekruse и сар., 1998</b>
Енглеска	1983	2	Сир	Пастеризовано	<b>Barrett, 1986</b>
Француска	1983	20	Овчији сир (SEA, SED)	Сирово	<b>De Buyser и сар., 1985</b>
Шкотска	1984	27	Овчији сир (SEA)	Сирово	<b>Bone и сар., 1989</b>
Шкотска	1985	2	Козји сир	Непастеризовано	<b>Sharp, 1989</b>
САД	1985	860	Чоколадно млијеко (SEA)	Пастеризовано	<b>Evenson и сар., 1988</b>
Израел	1987	3	Козји сир (SEB)	Сирово	<b>Gross и сар., 1988</b>
Енглеска	1988	155	Стилтон сир	Непастеризовано	<b>Maguire и сар. 1991</b>
Бразил	1994	7	Сир (SEN)	Непознато	<b>Pereira и сар., 1996</b>
Јапан	2000	13.420	Обрано млијеко у праху које се користи за производњу млијека са ниским садржајем масти и јогурта	Непознато	<b>Asao и сар., 2003</b>

## 2.2. Токсична доза

**Notermans и сар. (1991)** потврдили су способност референтног материјала, који садржи око 0,5µg ентеротоксина А (SEA), да изазове повраћање, о чему је извијестио **Bergdoll (1970)**. **Mossel и сар. (1995)** наводе еметичку дозу 50 од око 0,2µg SE/kg тјелесне масе човјека, и закључују да одрасла особа мора да унесе 10-20µg SE да испољи симптоме. Други аутори (**Martin и сар., 2001**) сматрају да мање од 1µg SE може изазвати симптоме тровања храном код осјетљивих особа.

## 2.3. Остале врсте стафилокока које производе ентеротоксине

Међу осталим коагулаза позитивним стафилококама, **Becker и сар. (2001)** су утврдили ентеротоксогени потенцијал *Staphylococcus intermedius*. *Staphylococcus intermedius* био је укључен у једној епидемији насталој послје конзумирања мјешавине маслаца и маргарина, која обухвата више од 265 случајева у октобру 1991. у САД (**Khambaty и сар. 1994; Bennett, 1996**).

*Staphylococcus hyicus*, коагулаза позитиван или негативан стафилокок, који производи ентеротоксине, осим ентеротоксина А-Е, изазива повраћање у биолошком огледу на мајмунима (**Adesiyun и сар., 1984**).

## 2.4. Извори контаминације

Природне еколошке нише за *Staphylococcus aureus* су носне шупљине и кожа топлокрвних животиња. Кожа, мембрана слузокоже, папиле и виме млијечних животиња су најважнији резервоар овог контаминента. У случају инфекције вимена, *Staphylococcus aureus* може контаминисати млијеку током muže у распону 10<sup>1</sup>-10<sup>8</sup>CFU/ml, углавном око 10<sup>4</sup>CFU/ml (**Baird-Parker, 2000; Asperger и Zangerl, 2003; Boynukara и сар., 2008**). **Peles и сар. (2007)** сматрају да је стафилокок био узрочник појаве 30-40% свих случајева маститиса у свијету.

У условима примарне производње млијека, поред инфициране млијечне жлијезде, извор контаминације млијека могу да буду људи и производно окружење. Трећина људи су асимптоматски носиоци *Staphylococcus aureus*. Он се често налази на кожи, у носу, испод пазуха, на пупку, гастроинтестиналном и урогениталном тракту људи. Учесталост ентеротоксогених сојева изолованих из људи је висока и варира између 40-60%. Они доспијевају у храну путем руку (инфициране ране, кожне лезије), кашљања и кихања (**Baird-Parker, 2000; Asperger и Zangerl, 2003; Garzoni и Kelley, 2009; Boynukara и сар., 2008; Lawryniewicz-Paciorek и сар., 2007**).

Према **Boynukara и сар. (2008)**, **Mørk и сар. (2010)** и **Pelisser и сар. (2008)** учесталост *Staphylococcus aureus* у узорцима сировог млијека варира од 6-28%. У Словачкој је пријављена слична инциденција (4-9%) *Staphylococcus aureus* у сировом млијеку крава или оваца (**Zigo и сар., 2011; Dudriková и сар., 2010**). Међутим, **Rall и сар. (2008)** установили су да је *Staphylococcus aureus* био присутан у 70,4% узорака сировог млијека. Преваленција ентеротоксогених сојева ових изолата је у распону од 25,5% до више од 72%, са SEA и SEC као доминантним ентеротоксинима. Претпоставља се да је SEA заједно са SED, најчешћи токсин у епидемијама стафилококног тровања храном (**Baird-Parker, 2000; Normanno и сар., 2007**;

**Lindqvist и сар., 2002; Rosengren и сар., 2010**). SEA најчешће стварају изолати *Staphylococcus aureus* поријеклом од људи (**Akineden и сар., 2008; Rosengren и сар., 2010**), а уједно је SEA и најчешћи ентеротоксин утврђен у случајевима стафилококних тровања храном (**Balaban и Rasooly, 2000**).

У истраживањима млијека које су спровели **Medved'ová и Valík (2012)**, *Staphylococcus aureus* био је присутан у 20% узорака сировог млијека, са бројем од 2,2 log CFU/ml. Од тога, 33% тих изолата су ентеротоксоеми, са SEA као јединим ентеротоксином чији је ген утврђен. Исти аутори, присуство *Staphylococcus aureus* у 46% словачких сирева (свјежа грудa сира, Bryndza сир) и у 83% сурутке након производње, објашњавају неспровођењем одговарајућих хигијенских мјера током процеса производње или накнадном контаминацијом термички обрађеног млијека. У већини изолата утврђен је ген за SEA, у 11% изолата утврђена је комбинација *sea* и *sec* гена, а *see* ген и комбинација *sea* и *see* гена утврђени су у једном од изолата. **Kousta и сар. (2010)** утврдили су да 96% сирева од непастеризованог и пастеризованог млијека испуњава прописе Европске уније за коагулаза позитивне стафилококе. У осталим узорцима сирева, коагулаза позитивне стафилококе утврђене су у броју већем од 4 log CFU/g, али ни у једном од њих није утврђен ентеротоксин. Испитујући производе од млијека, укључујући сиреве, сурутку, маслац, али и неке узорке меса, производе од меса, кобасице и јаја, *Staphylococcus aureus* је утврђен у 13-20% узорака (**Kérouanton и сар., 2007; Normanno и сар., 2007; Ertas и сар., 2010; Ayidin и сар., 2011; Trnčíková, 2010**), или 35-45% (**Akineden и сар., 2008; Pelisser и сар., 2008**), или чак и 70-80% (**Morandi и сар., 2007; Pereira и сар., 2009**). Преваленција ентеротоксоемих сојева била је изнад 30% у свим поменутих истраживањима, а најчешће су утврђени *sea* и *sec* гени.

Корелација између присуства одређеног гена и стварне продукције ентеротоксина је око 70-80%, што се може објаснити непотпуном експресијом гена за ентеротоксин. Ово зависи од температуре и физичко-хемијских фактора супстрата, као што су рН и активност воде, који су важни и за развој стафилокока и за продукцију ентеротоксина (**Ertas и сар., 2010; Morandi и сар., 2007; Ayidin и сар., 2011; Pereira и сар., 2009**).

## 2.5. Ентеротоксини стафилокока

Ентеротоксине стафилокока примарно продукује *Staphylococcus aureus* и неки од коагулаза позитивних стафилокока (**European Commission, 2003**): *S. aureus subsp. aureus* (**Rosenbach, 1884**), *S. aureus subsp. anaerobius* (**De la Fuente и сар., 1985**), *S. intermedius* (**Haјek, 1976**), *S. hyicus* (**Devriese и сар., 1978**), *S. delphini* (**Varaldo и сар., 1988**), *S. schleiferi subsp. coagulans* (**Igimi и сар., 1990**) и *S. lutrae* (**Foster и сар., 1997**). SEF продукују сојеви *Staphylococcus aureus*, узрочници токсик шок синдрома (**Bergdoll и сар., 1981**). Касније је постало јасно да то није ентеротоксин и еметик. Тако је уклоњен из система номенклатуре SE и сада се означава као токсин токсик шок синдрома TSST-1 (**Betley и сар., 1990**). Ентеротоксини стафилокока признати до данас, формирају групу серолошки различитих екстрацелуларних протеина, дијелећи низ важних особина, и то (**European Commission, 2003**):

- способност изазивања повраћања и гастроентеритиса код примата,



- суперантигеност (неспецифична активација Т лимфоцита праћена ослобађањем цитокина и системским шоком) објављена од **Fraser и сар. (2000)**, **Papageorgiou и Acharya (2000)** и **Ulrich (2000)**,
- отпорност на топлоту и дигестију пепсином и
- структурне сличности (два домена молекула и интрамолекуларне дисулфидне везе) коју су разматрали **Balaban и Rasooly (2000)** и **Dinges и сар. (2000)**.

Ентеротоксини стафилокока су сличне величине. Молекулске масе ентеротоксина стафилокока износе 25-29kDa (**Bergdoll, 1983; Betley и сар., 1992; Su и Wong, 1995; Munson и сар., 1998**). Синтеза SE је регулисана активношћу гена локализованих на профагу (нпр. SEA) (**Betley и Mekalanos, 1985**), плазмиду (SED) (**Bayles и Iandolo, 1989**) или хромозомским острвцима патогености (нпр. SEB) (**Yarwood и сар., 2002**).

До данас је пронађен 21 ентеротоксин стафилокока (SE) или ентеротоксину сличан протеин (SEI) (**Schelin и сар., 2011**).

Комерцијално доступни тестови за утврђивање SE у храни или културама стафилокока, укључују детекцију SEA-SEE. **Wieneke (1974)** је испитивањем 120 сојева стафилокока укључених у случајевима тровања храном у Великој Британији, утврдио да је 113 епидемија (94,2%) изазвано овим ентеротоксинима. Код 88 ентеротоксогених сојева (77,9%) утврђен је SEA, а код 48 (42,5%) SED, појединачно или у комбинацији са другим токсином. У студији која је испитивала 131 епидемију у САД у периоду 1977-1981. године, ентеротоксини су идентификовани у 29 случајева, од чега SEA у 27, SEB у два, док SED није утврђен (**Holmberg и Blake, 1984**). Епидемија у Бразилу, која ја обухватила седам чланова једне породице, повезана је са конзумирањем сира (**Pereira и сар., 1996**). SEH је детектован у сиру и код сојева *Staphylococcus aureus* изолованих из сира. Сојеви *Staphylococcus aureus* изоловани од људи често производе SEA, док сојеви поријеклом од крава производе SEC или SED, а од оваца SEC (**European Commission, 2003**). **Stephan и сар. (2001)** су, међутим, код сојева изолованих из носа људи, утврдили 9 сојева који продукују искључиво SED или у комбинацији са другим токсинима. Генерално, висок проценат изолата (око 40-50%) поријеклом од здравих људи продукује ентеротоксин (**Bergdoll, 1989**). Код здравих животиња, проценат ентеротоксогених сојева изолованих из млијека је мањи (3,9-6%) (**Gilmour and Harvey, 1990**). Учесталост токсин продукујућих сојева код маститиса зависи од врсте животиња: 14,6-41,3% код маститиса крава, а 70,4-83% код маститиса оваца. Анализирајући податке, **Bergdoll (1989)** је утврдио да 70-80% сојева изолованих код маститиса оваца продукује SEC.

## 2.6. Фактори који утичу на производњу ентеротоксина

Стафилококно тровање храном често се повезује са храном богатом протеинима, као што су производи од млијека и меса (**Le Loir и сар., 2003; De Buysер и сар., 2001**). Ова храна је изузетно сложен матрикс у погледу садржаја микроба, соли, рН вриједности, доступности храњивих материја, кисеоника и температуре (**Valero и сар., 2009**).

Генерално, за продукцију ентеротоксина неопходан је раст *Staphylococcus aureus*, међутим, раст није увијек праћен продукцијом ентеротоксина (**Wallin-Carlquist и сар., 2010.**).

Спроведене су студије у циљу идентификације кључних параметара који спречавају или стимулишу продукцију ентеротоксина у лабораторијским медијумима и у различитим категоријама хране (**Cretenet и сар., 2011; Wallin-Carlquist и сар., 2010; Genigeorgis, 1989**). *Staphylococcus aureus* има способност да расте и производи ентеротоксин у широком распону температуре, рН вриједности, концентрације натријум хлорида (NaCl) и активности воде ( $a_w$ ) (**Adams и Moss, 2008**). Физичко-хемијски фактори у храни, са температуром као и конкуренција са пропратном микрофлором, који утичу на продукцију ентеротоксина, приказани су у табели 2.6.1.

**Табела 2.6.1. Фактори који утичу на раст и производњу ентеротоксина (Adams и Moss, 2008):**

Фактор	Оптimalан раст	Опсег раста	Оптimalна продукција SE	Опсег продукције SE	Пријављени утицај на ентеротоксин	Забилешке о ефектима на продукцију ентеротоксина	Примјери анализа специфичних фактора у производима од хране	Референце
T	35-41°C	6-48°C	34-40°C	10-46°C	SEA, SEB, SEC, SED	Чини се да температура више утиче на продукцију ентеротоксина него на раст стафилокока.	Млијеко Сланина Производи од јаја	<b>Donnelly и сар., 1968; Yang и сар., 2001; Tatini, 1973; Scheusner и сар., 1973; Notermans и Heuvelman, 1973; Genigeorgis и сар., 1969</b>
pH	6-7	4-10	7-8	5-9,6	SEA, SEB, SEC, SED, SEE	Већа толеранција је у аеробним него у анаеробним условима раста. Бактерије млијечне киселине посебно инхибишу стварање ентеротоксина. агг зависна регулација (SEC).	Сланина Кобасице	<b>Márta и сар., 2011; Barber LE и Deibel, 1972; Scheusner и сар., 1973; Notermans и Heuvelman, 1973; Regassa и Betley, 1992; Domenech, 1992; Genigeorgis, 1976</b>

$a_w$	0,99	$0,83 \geq 0,99$	0,99	$0,86 \geq 0,99$	SEA, SEB, SEC, SEH	SEB и SEC могу бити знатно осјетљивији од SEA и SEH. SEH продукција ентеротоксина на $0,97 > a_w > 0,95$	Надјев од говеђег меса Надјев од свињског меса Сланина Намаз од шкампа Кобасице	Regassa и Betley, 1993; Sakai и сар., 2008; Bang и сар., 2008; Tatini, 1973; Genigeorgis, 1976; Onoue и Mori, 1997; Qi и Miller, 2000; Troller, 1971; Troller, 1972; Lee и сар., 1981
NaCl	0%	0-20%	0%	<12%	SEA, SEB, SEC	Подигне температурни лимит за продукцију SEA. Низак осмоларитет повећава продукцију ентеротоксина. Чини се да више инхибише продукцију SEB него раст стафилокока.	Сланина Кобасице	Regassa и Betley, 1993; Schmidt и сар., 2004; Bang и сар., 2008; Notermans и Heuvelman, 1973; Genigeorgis и Sadler, 1966; Genigeorgis и сар., 1971; Hughes и Hurst, 1980; McLean и сар., 1968; Genigeorgis и сар., 1969
Кисеоник	Аеробно	Анаеробно - аеробно	Аеробно	Анаеробно - аеробно	SEA, SEB, SEC, SEH	Повећава продукцију SEB и до 10 пута. 10% кисеоник је оптималан за продукцију SEB.	Сланина Шкампи Кобасице	Markus и Silverman, 1969; Belay и Rasooly, 2002; Baird-Parker, 1971; Dietrich и сар., 1972; Carpenter и Silverman, 1974; Carpenter и Silverman, 1976; Woodburn и сар., 1973
Редокс потенцијал (Eh)	>+200mV	$\geq 200$ до +200mv	>+200mV	$\geq 100$ до +200mv	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i>	-	-	-	-	sec, sel (sek, seg, seh)	Снажно редукује транскрипцију sec и sel, а уочено је и sek, seg, seh.	Сир	Cretenet и сар., 2011; Even и сар., 2009; Gómez-Lucía и сар., 1992
					sea	Може да фаворизује одржавање sea у стационарној фази.		

## 2.6.1. Физичко-хемијски фактори

### 2.6.1.1. Активност воде/отпорност на со

Активност воде је веома значајна за раст стафилокока и стварање ентеротоксина, јер су ове бактерије у стању да расту у ширем распону  $a_w$  од других патогених бактерија које се преносе храном. Могу да расту при минималној  $a_w$  0,86 (еквивалентно 20% NaCl) под условом да су оптимални сви остали услови раста (**Qi и Miller, 2000**), а оптимална  $a_w$  је 0,99 (**Smith и cap., 1983**). Толеранција стафилокока на различите  $a_w$  вриједности (концентрација NaCl) зависи од специфичности соја, стварне вриједности рН, температуре и атмосферских услова. Није утврђен раст више сојева *Staphylococcus aureus* у ВНИ бујону са додатком NaCl и сахарозе, при 8°C, рН 4,3 и  $a_w$  0,85 (19% NaCl) или при 12°C, рН<5,5 и  $a_w$  0,9 (14% NaCl) или при 12°C, рН<4,9 и  $a_w$  0,96 (8% NaCl) (**Jay, 2000**). Један сој *Staphylococcus aureus* у РСА или ВНИ бујону са додатком NaCl, није могао да се размножава при различитим концентрацијама NaCl: 5% ( $a_w$  0,97) при 12°C; 13% ( $a_w$  0,91) при 15°C; 15% ( $a_w$  0,89) при 18-21°C и 18% ( $a_w$  0,86) при температурама од 25-30°C. При оптималној температури за раст (35-37°C) може да се умножава при концентрацији 20% NaCl ( $a_w$  0,84) (**Medved'ová, 2009**). Вриједности  $a_w$  за стварање ентеротоксина нису исте за све ентеротоксине и разликују се од вриједности за раст стафилокока. Продукција SEA и SED јавља се под готово свим условима који омогућавају оптималан раст *Staphylococcus aureus*. Продукција SEB је веома осјетљива на смањење  $a_w$  и, упркос обимном расту, незнатна је на  $a_w$  0,93. Утицај  $a_w$  на продукцију SEC идентичан је као и код продукције SEB (**Ewald и Notermans, 1988; Qi и Miller, 2000**). **Thota и cap. (1973)** утврдили су продукцију SEE у медијуму који садржи 10% NaCl, а ова концентрација одговара  $a_w$  0,92 (**Troller, 1971**). Важни фактори који утичу на раст и продукцију ентеротоксина стафилокока су такође и средства која се користе за снижавање  $a_w$ , рН, присуство кисеоника, као и температура инкубације. Услови за раст и продукцију ентеротоксина стафилокока у лабораторијским медијумима и у храни, могу се разликовати у извјесној мјери. У студијама осмоадаптивности *Staphylococcus aureus*, утврђено је да, при култивисању у медијуму с ниском активношћу воде, долази до акумулације једињења мале молекулске масе, названих компатибилним растворима. Глицин бетаин, карнитин и пролин су основни састојци компатибилних раствора, акумулисани у току осмотског стреса *Staphylococcus aureus*, као резултат транспортног система зависног од натријума (**Gutierrez и cap., 1995; Qi и Miller, 2000**). У поређењу с другим патогеним бактеријама, *Staphylococcus aureus* не акумулише шећере као компатибилне растворе, а слободни пептиди служе као извор пролина (**O'Byrne и Booth, 2002**). Постоје докази да компатибилни раствори стимулишу не само раст стафилокока него и синтезу ентеротоксина. Продукција SEB значајно је стимулисана у бујону са ниском  $a_w$ , када је пролин био доступан (**Qi и Miller, 2000**). Поред акумулације компатибилних раствора, *Staphylococcus aureus* подлијеже обимном програму генске експресије ради одржавање тургора изазваног повећањем концентрације NaCl. Један од њих је и *ars* ген који кодира отпорност на арсенат, арсенит и антимоит. Међутим, мутација у *ars* оперону значајно смањује способност *Staphylococcus aureus* да расте у присуству NaCl, пошто ниска експресија *ars* омета способност *Staphylococcus aureus* да се ослободи цитоплазматског  $Na^+$  у ћелијама под стресом (**Scybert и cap., 2003**).

### 2.6.1.2. Толеранција киселости

Већина сојева стафилокока расте при рН вриједности 4-10, оптимално 6-7. Када други параметри нису оптимални, распон рН се смањује. Најнижи рН који дозвољава раст и продукцију ентеротоксина *Staphylococcus aureus* у аеробним условима био је 4,0, док су најниже рН вриједности у анаеробним условима биле 4,6 и 5,3 (**Smith и сар., 1983**). Остали фактори који утичу на реакцију *Staphylococcus aureus* на рН су величина инокулума, врста медијума за раст, концентрација NaCl ( $a_w$ ), температура и концентрација гасова (**Genigeorgis, 1989**). Резултати студије **Barber и Deibel (1972)**, који су користили пуферисан ВНИ бујон са контролисаним рН вриједностима, показују да већина испитаних сојева *Staphylococcus aureus*, при аеробним условима, продукује детектабилне количине SE при рН 5,1, међутим анаеробно, већина сојева није успјела да продукује детектабилне количине SE испод рН 5,7. Брза ацидификација у матриксу хране до вриједности која не подржава раст, најефикаснији је начин за инхибицију *Staphylococcus aureus*. Киселине немају исти капацитет инхибиције при одређеној рН вриједности, па ће утицај на инхибицију раста *Staphylococcus aureus* варирати у зависности од киселине која се користи. Органске киселине, при рН вриједностима еквивалентним онима које су добијене кориштењем неорганских киселина, показују значајнију инхибицију раста *Staphylococcus aureus*. Ефикасност органских киселина генерално зависи од њихове концентрације у недисосованом облику, што је одређено константом дисоцијације органске киселине. Тако су сирћетна и пропионска киселина са  $pK_a$  4,8 и 4,9 ( $pK_a$  је рН када је однос дисосованих и недисосованих форми 50:50) много јачи инхибитори од млијечне киселине са  $pK_a$  3,9 (**Baird-Parker, 2000; Charlier, 2009**). Раст *Staphylococcus aureus* инхибисан је 0,1% сирћетном киселином, као и у присуству нижих (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) масних киселина (**Normanno и сар., 2007**). Осим тога, *Staphylococcus aureus* је осјетљивији на ацидификацију када је концентрација соли повећана, иако је халотолерантан микроорганизам. Уопштено, толеранција *Staphylococcus aureus* рН вриједности изнад 5,5 настаје усљед одржавања интрацелуларног рН од стране маскираних или ослобађајућих протона из цитоплазме, а такође и експресије гена одговорних за пуферисање цитоплазме (**Charlier, 2009; Baker-Austin и Dopson, 2007**).

### 2.6.1.3. Отпорност на топлоту

*Staphylococcus aureus* расте на температури 7-48°C, оптимално око 37°C. Утицај температуре зависи од соја и врсте медијума за раст. У обимној студији **Schmitt и сар., (1990)**, која је обухватала 77 сојева стафилокока изолованих из различитих намирница, оптимална температура раста била је у опсегу 35-40°C. Минималне температуре раста су варирале у опсегу 7-13°C, а максималне 40-48°C. Минималне температуре за продукцију SE варирале су у широком опсегу 14-38°C, а максималне 35-38°C и 45°C. Загријавање изазива оштећење ћелија *Staphylococcus aureus*. У храни с високом активношћу воде, D<sub>60</sub> износи 1-6 минута, а у фосфатном пуферу 1-2,5 минута. У уљу, масти или срединама с ниском активношћу воде, D<sub>60</sub> су високе (у млијеку 5,3 минута, у млијеку са 57% сахарозе 42,3 минута, у месу које садржи 3-4% NaCl 6 минута, а у месу са 8% NaCl 25 минута). Насупрот овоме, рН вриједности које нису оптималне, смањују отпорност на топлоту (**Baird-Parker, 2000**). Такође, 99,6% ћелија стафилокока оштећено је пастеризацијом млијека при 72°C током 15 секунди, а при 72°C током 35 секунди све ћелије су уништене. Примijeћено је да се ентеротоксини продукују у ужем опсегу температуре у односу на онај за раст. Уопштено, продукција ентеротоксина

очекује се у температурном опсегу 10-46°C, с оптимумом 40-46°C (**Baird-Parker, 2000; Bremer и сар., 2004; Jay, 2000; Ertas и сар., 2010**). Резултати за доње границе температуре за продукцију SE у сагласности су с подацима из литературе (**Schmitt и сар., 1990**), према којима је температура од 15°C најчешће утврђена за производњу токсина након 3-4 дана инкубације. О продукцији SE на 10°C извијестио је **Tatini (1973)**. Ентеротоксини су отпорни на загријавање у млијеку. Њихова отпорност на загријавање је представљена D<sub>121</sub> и D<sub>100</sub> у распону 9,9-11,4 до 70 минута (**Sutherland и сар., 1994; Notermans и van Hoesj, 2008**). Отпорност ентеротоксина на топлоту се смањује како слиједи: SEC>SEB>SEA, а такође, значајно је смањена у киселим условима (**Jay, 2000**). Ентеротоксини могу да опстану и после процеса пастеризације млијека или стерилизације конзервисане хране (**Baird-Parker, 2000; Asperger и Zangerl, 2003**).

Једна од најефикаснијих мјера за инактивацију *Staphylococcus aureus* у храни је термичка обрада (**European Commission, 2003**). Бактерије ће бити уништене у млијеку ако се примијени одговарајућа термичка обрада. *Staphylococcus aureus* се потпуно инактивише у млијеку након примјене следећих комбинација температуре и времена: 57,2°C/80 минута, 60,0°C/24 минута, 62,8°C/6,8 минута, 65,6°C/ 1,9 минута, 71,7°C/0,14 минута (**Bergdoll, 1989**). **Troller (1986)** сматра да су стафилококе у производима од млијека, у којима a<sub>w</sub> опада до нивоа 0,70-0,80, отпорније на топлоту.

*Staphylococcus aureus* није резистентан на поступке термичке обраде који се примјењују у индустрији млијека. Међутим, ентеротоксини стафилокока у храни веома су отпорни на топлоту. Отпорност на топлоту примарно зависи од релативне чистоће SE. После загријавања на 100°C у току 130 минута, количина непречишћеног SEA у пуферу смањена је са 21 µg/ml на <1µg/ml. Међутим, пречишћени SEA (0,2 mg/ml), био је потпуно инактивисан у пуферу после загријавања на 80°C у трајању од 3 минута или на 100°C током 1 минута (**Minor и Marth, 1976**). Термичка обрада која се уобичајено користи за прераду хране није ефикасна за потпуно уништавање SE, када су ентеротоксини присутни у количини која се очекује у случајевима тровања (0,5 – 10 µg/100 ml или g) (**Bergdoll, 1989**). Такви нивои су већи од оних који су утврђени у 10 епидемија стафилококног тровања храном у Француској 2002. године, у распону 0,05-0,4ng/g. Међутим, треба имати у виду да инактивација температуром често доводи до губитка серолошке реактивности SE. Биолошка активност може бити изгубљена прије серолошке активности. С друге стране, неке епидемије су резултат конзумирања хране која је загријавана након продукције SE (**Bergdoll, 1989**). На термичку стабилност SE утиче природа хране, рН, присуство NaCl итд., као и врста токсина. SEA је нпр. релативно стабилнији на топлоту при рН 6,0 или на рН вриједностима вишим од 4,5-5,5. SED је релативно стабилнији на рН 4,5-5,5 него на рН 6,0 или вишем (**Tatini, 1976**).

#### 2.6.1.4. Кисеоник

*Staphylococcus aureus* је факултативна анаеробна бактерија, која најбоље расте у присуству кисеоника. Међутим, у анаеробним условима раст је много слабији, па чак и после неколико дана, број ћелија не достиже онај који је добијен у аеробним условима. Аерисане културе производе приближно 10 пута више SEB у поређењу с културама инкубисаним у атмосфери са 95% H<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>. Слично томе, повећава се продукција SEA, SEB и SEC код култура које су аерисане, у односу на оне које нису. Ниво раствореног кисеоника има веома важну улогу (**Bergdoll, 1989; Genigeorgis, 1989**). Под стриктно анаеробним условима, раст *Staphylococcus aureus* био је спорији

него у аеробним условима. У бујону инкубисаном анаеробно на 37°C, генерацијско вријеме је било 80 минута, у поређењу са 35 минута у аеробним условима. Са споријим анаеробним растом, релативно мање SAA се продукује него у аеробним условима, али у оба случаја токсин је детектован послје 120 минута инкубације (**Belay и Rasooly, 2002**).

## 2.6.2. Конкурентске бактерије

*Staphylococcus aureus* не расте добро у присуству конкурентске флоре (**Genigeorgis, 1989**). Његова инхибиција је углавном због киселих продуката метаболизма, снижавања рН, продукције H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или других инхибиторних супстанци као што су антибиотици, испарљива једињења или конкуренције за хранљиве материје. Фактори који утичу на степен инхибиције су број конкурентских врста бактерија у односу на број *Staphylococcus aureus*, као и температура инкубације (**Smith и сар., 1983; Genigeorgis, 1989**).

Стартер културе које се користе у производњи ферментисаних млијечних производа као што су сир, јогурт, кисело млијеко и др., могу ефикасно спријечити раст *Staphylococcus aureus* и стварање ентеротоксина стафилокока. Међутим, у случају неактивности тих култура, *Staphylococcus aureus* неће бити инхибисан (**European Commission, 2003**).

## 2.7. Услови производње који стимулишу продукцију ентеротоксина

### 2.7.1.1. Свјежи сиреви

Свјежи сиреви се припремају од сировог или пастеризованог млијека, са или без употребе стартера. Вриједност рН обично брзо пада на ниво испод 5,0, а садржај воде у њима остаје већи од 55% (a<sub>w</sub>=0,95-0,97). Након припреме конзумирају се свјежи, без периода зрења, с роком трајања 5-30 дана на температурама фрижидера.

**Zarate и сар. (1997)** испитивали су *Staphylococcus aureus* у козјем сиру са Тенерифа, произведеног од сировог млијека, без додавања стартера, који се конзумира свјеж (у року 2-3 дана) или након зрења од 60 дана. Примећено је повећање *Staphylococcus aureus* за 2-3 log CFU/g у сиру старом два дана, али је након тога забиљежен брз пад.

**Намама и сар. (2002)** припремали су Ибен, традиционални марокански свјежи сир, са и без додатка *Lactococcus lactis* који продукује низин. Млијеко је инокулисано са 10<sup>3</sup> до 10<sup>5</sup>CFU/ml SEC продукујућим сојем *Staphylococcus aureus*, који је брзо опадао у сиру са *Lactococcus lactis*, док је преживио током дужег периода у сиру припремљеном без стартера који продукује низин. Међутим, када је кориштен велики почетни инокулум *Staphylococcus aureus* (>10<sup>5</sup>CFU/ml), SEC је детектован у року од 3 дана. **Daminelli (1999)** није детектовао ентеротоксин у италијанском свјежем сиру типа Crescenza, из пастеризованог млијека са добром активношћу стартера, чак и када је користио инокулум 10<sup>6</sup>CFU/ml млијека.

**Lodi и сар. (1994)** су, на основу бактерија млијечне киселине, сврстали 32 врсте свјежег сира у 3 категорије:

1. сиреви са високим бројем бактерија млијечне киселине,
2. сиреви са одсуством бактерија млијечне киселине и малим бројем природне микрофлоре и
3. сиреви са одсуством бактерија млијечне киселине, али са високим садржајем природне микрофлоре.

Они су закључили да се у првој категорији број патогених бактерија нагло смањује током обраде, док у другој и трећој категорији патогене бактерије преживљавају неколико недеља. Постојећи подаци показују да је раст *Staphylococcus aureus* ограничен код свјежих сирева, ако је коагулација последица млијечне ферментације. SEA, а много рјеђе ентеротоксин SED, детектовани су у свјежим сиревима припремљеним од свјежег или пастеризованог млијека, када је *Staphylococcus aureus* могао да достигне популацију од  $10^6$  CFU/g сира. Раст и продукција токсина зависе од почетног броја ентеротоксогеног *Staphylococcus aureus* у млијеку, активности стартер бактерија, антагонистичког ефекта, природне микрофлоре, концентрације соли, пада рН и температуре прераде и складиштења сира (**Meyrand и Vernozy-Rozand, 1999**).

*Staphylococcus aureus* је бактерија веома толерантна на со, способна да продукује ентеротоксин у супстратима са концентрацијом соли до 10% ( $a_w=0,92$ ), док је при истим условима спријечен раст многих антагониста *Staphylococcus aureus* (**Letondeur-Lafarge и Lahellec, 1997**).

У свјежем сиру ентеротоксин може бити произведен када је смањена активност стартера или је број природне микрофлоре низак. Постојећи подаци указују да у свјежим сиревима, са великим бројем бактерија млијечне киселине, број стафилокока нагло опада, а продукција ентеротоксина је спријечена и при великом броју стафилокока ( $10^3$ - $10^5$  CFU/ml) присутном на почетку процеса производње (**European Commission, 2003**).

### 2.7.1.2. Меки сиреви

Категорија меких сирева представља највећу породицу сирева са стотинама типова и имена у Европи и широм свијета. Многи сиреви су контролисаног назива и поријекла, укључујући и традиционалне производе, а сваки од њих је јединствен амбијент што се тиче раста микроорганизама. Меки сиреви произведени су од свјежег млијека, а ферментација се заснива на аутохтоној микрофлори бактерија млијечне киселине (**European Commission, 2003**). Међутим, због проблема хигијене, већина сирева се данас производи термизацијом ( $65$ - $68^\circ\text{C}/5$ - $15$  секунди) или пастеризацијом ( $72^\circ\text{C}/15$  секунди) млијека, уз кориштење одабраних стартер култура (**Scott, 1986; Meyrand и Vernozy-Rozand, 1999**).

**Dengremeont и сар. (1995)** су проучавали раст *Staphylococcus aureus* и продукцију ентеротоксина у експериментално произведеним меким сиревима. Ентеротоксин није детектован иако је ентеротоксогени *Staphylococcus aureus* достигао ниво од  $10^7$  CFU/g. Након повећања за  $1$ - $3$  log у почетку, број *Staphylococcus aureus* се смањио током  $30$  дана складиштења за  $3$  log CFU/g.

**Tham и сар. (1990)** нису утврдили ентеротоксин у козјем сиру, произведеном од термизованог млијека с додатком стартер бактерија. С друге стране, у сиру



произведеном од сировог козјег млијека без додатка стартер културе, *Staphylococcus aureus* био је у стању да расте до нивоа гдје је детектован ентеротоксин.

**Vernozy-Rozand и сар. (1998)** проучавали су раст *Staphylococcus aureus* у два сира од сировог козјег млијека и примијетили производњу ентеротоксина само када су користили велики инокулум стафилокока ( $>10^5$ CFU/ml млијека).

Сличне резултате добио је **Provent (1986)**, када је припремао Mont d'Or сир, користећи пастеризовано млијеко и стартер културе, који показују да је активност стартер културе од највећег значаја за редукцију броја *Staphylococcus aureus* испод оног када је у стању да формира ентеротоксин.

**Daminelli (1999)**, испитујући италијански меки сир типа Italicо, није детектовао ентеротоксин користећи инокулум у распону  $10^3$ - $10^6$ CFU/ml млијека. С друге стране, ентеротоксин А детектовали су **Anunciacao и сар. (1994)** у бразилском меком бијелом сиру, када је употребљен инокулум  $10^4$  CFU *Staphylococcus aureus*/ml млијека.

**Santos и Genigeorgis (1981)** проучавали су услове стварања ентеротоксина SEA, SEB и SEC, у Минас сиру (полу-меки бијели сир), користећи сирово или пастеризовано млијеко, са или без стартера додатог у млијеко. Аутори су запазили да примјеном стартера, само велики инокулум *Staphylococcus aureus* ( $>10^5$ CFU/ml млијека), може довести до стварања ентеротоксина. Закључили су да је пастеризација млијека и кориштење стартер културе био бољи начин за спречавање раста *Staphylococcus aureus* и формирање ентеротоксина.

**Mueller и сар. (1996)** испитивали су стварање ентеротоксина стафилокока у сиру Camembert произведеном од пастеризованог млијека са додатком стартер културе и *Staphylococcus aureus*  $10^3$ - $10^5$ CFU/ml млијека и при томе утврдили да је, у 10 од 11 експеримената, ентеротоксин детектован после 24 часа, када је број *Staphylococcus aureus* достигао вриједност  $10^6$ CFU/g сира. Сличне резултате добили су **Mejrads и сар. (1998)** који су испитивали стварање ентеротоксина у сиру Camembert, када су детектовали ентеротоксин А, при почетном инокулуму *Staphylococcus aureus*  $10^4$ - $10^6$ CFU/ml млијека. Међутим, исти аутори нису детектовали ентеротоксине у бијелом меком сиру произведеном од млијека с истом почетном контаминацијом стафилокока.

Проучавањем услова производње киселокоагулишућих и сиришнокоагулишућих сирева, под којима ентеротоксигене стафилококе могу да се размножавају и производе ентеротоксине (А, В, С), примијећено је да се, с добром активношћу стартера, стафилококе у таквим сиревима могу размножавати само током прва 2-3 часа прераде и када је кориштен велики почетни инокулум ( $>10^3$ CFU/ml) (**Mantis, 1973**). У истим тим узорцима ентеротоксин није детектован.

Код смањене активности стартера или потпуне неактивности, чак и при ниском инокулуму ( $2 \times 10^2$ CFU/ml), стафилококе могу да се умножавају и продукују ентеротоксин. При крају периода зрења (60 дана) број стафилокока се смањује до нивоа  $<10$ CFU/g сира, али ентеротоксин и даље постоји (**European Commission, 2003**).

Киселокоагулишући и сиришнокоагулишући сиреви представљају неповољно окружење за раст *Staphylococcus aureus* и продукцију ентеротоксина. Ентеротоксин је произведен само када је ферментација поремећена због неактивности стартера и великог инокулума *Staphylococcus aureus* ( $>10^4$ - $10^5$ CFU/ml млијека) (**European Commission, 2003**).

### **3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ ИСПИТИВАЊА**

#### **3.1. Циљ испитивања**

Циљ испитивања је да се утврди да ли физичко-хемијски фактори матрикса и услови производње традиционалних сирева омогућују раст и размножавање коагулаза позитивних стафилокока и синтезу ентеротоксина, што треба да допринесе објективној процјени ризика у производњи традиционалних сирева у односу на присуство ентеротоксогенних стафилокока.

#### **3.2. Задаци испитивања**

За реализацију утврђених циљева испитивања, постављени су следећи задаци:

1. Изолација и идентификација коагулаза позитивних стафилокока поријеклом из традиционалних сирева
2. Утврђивање ентеротоксогеног потенцијала сојева коагулаза позитивних стафилокока
3. Постављање експерименталног протокола који симулира услове производње традиционалних сирева у циљу утврђивања утицаја фактора средине и услова производње на динамику развоја популације коагулаза позитивних стафилокока
4. Постављање експерименталног протокола који симулира услове производње традиционалних сирева у циљу утврђивања утицаја фактора средине и услова производње на синтезу ентеротоксина код коагулаза позитивних стафилокока

## 4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

### 4.1. Материјал

#### 4.1.1. Сиреви

Узорци за испитивање су традиционални сиреви поријеклом из Републике Српске, који припадају сиревима од термички необрађеног млијека. У односу на механизам коагулације припадају групи сиришнокоагулишућих и киселокоагулишућих сирева. Укупно је испитано 100 узорака сира, и то 50 киселокоагулишућих и 50 сиришнокоагулишућих сирева. Узорци потичу из производње, узети из домаћинстава која се баве традиционалном производњом сира, као и из промета, узети у слободној продаји на тржишту Бање Луке и Градишке. Киселокоагулишући сиреви били су старости 2 до 6 дана, а сиришнокоагулишући 7 дана до 8 мјесеци.

#### 4.1.2. Микроорганизми

Ентеротоксин стафилокока испитиван је код 215 изолованих сојева коагулаза позитивних стафилокока.

Ген *spa*, карактеристичан за *Staphylococcus aureus*, као и ген за синтезу одређеног ентеротоксина, испитивани су код 58 изолованих сојева коагулаза позитивних стафилокока.

За контролу квалитета храњивих подлога за изолацију и бројање коагулаза позитивних стафилокока, кориштен је референтни сој *Staphylococcus aureus* WDCM 00032 (АТСС 6538).

За припрему медијума млијеко+БМК кориштени су сојеви лактокока који су показали добру способност кисељења.

Инокулација медијума урађена је сојем стафилокока који носи ген за SEC ентеротоксин.

#### 4.1.3. Храњиве подлоге и реагенси

У експерименталном протоколу кориштене су храњиве подлоге и реагенси од комерцијалних произвођача, предвиђени стандардима и протоколима за одређену врсту испитивања.

## 4.2. Методе

### 4.2.1. Услови производње традиционалних сирева

Примјеном анкете испитани су услови производње свјежег сира који припада групи киселокоагулишућих сирева и Влашићког сира који је из групе сирева са зрењем и добијен је сирешном коагулацијом.

У оквиру анкете постављена су следећа питања:

1. Које млијeko користите за производњу сира?
2. Који су услови коагулације?
3. Како обрађујете груш?
4. Који су услови зрења?

Послије анкете урађен је мониторинг услова производње код одабраних произвођача сира. У току мониторинга праћен је технолошки процес, температура, рН и  $a_w$ .

### 4.2.2. Постављање експерименталног протокола који симулира услове производње сира у домаћинству

На основу анкете о условима и процесу производње сира, спроведене међу индивидуалним произвођачима сира у домаћинствима, постављен је експериментални протокол који симулира услове и процес производње сира. У експерименталном протоколу кориштен је сој стафилокока који носи ген за SEC ентеротоксин, а у медијум млијeko+БМК додавали смо лактококе у броју  $10^4$ CFU/ml.

#### 4.2.2.1. Постављање експерименталног протокола који симулира услове производње киселокоагулишућег сира

У производњи киселокоагулишућих сирева, млијeko послије муже оставља се у амбијенталним условима да ферментише до појаве груша, који се потом пресује и ставља у промет као киселокоагулишући сир без зрења. Током експерименталног протокола, у ком смо симулирали температуру и вријеме у производњи киселокоагулишућих сирева, кориштена су три медијума: ВНИ бујон као вјештачки медијум који на основу свог састава подржава раст и размножавање стафилокока, млијeko које представља полазну сировину у производњи сира и млијeko са додатком бактерија млијечне киселине које воде процес ферментације односно дестабилизације казеинског комплекса и чине основу добијања груша у производњи киселокоагулишућег сира. Кориштено је реконституисано млијeko у праху, стерилисано у аутоклаву ( $121^\circ\text{C}$  током 15 минута), чиме је искључена конкуренција сапрофитске флоре. У оквиру експерименталног протокола, за производњу киселокоагулишућег сира, засијан је ВНИ бујон ентеротоксогеним коагулаза позитивним стафилококама почетног броја  $10^1$ CFU/ml и  $10^2$ CFU/ml. Истим почетним бројем ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока засијано је млијeko и млијeko којем су, поред ентеротоксогеног коагулаза позитивног стафилокока, додате

бактерије млијечне киселине. Температура и вријеме инкубације ових узорака опонашали су услове производње киселокоагулишућег сира у индивидуалним домаћинствима.

#### **4.2.2.2. Постављање експерименталног протокола који симулира услове производње сиришнокоагулишућег сира**

Праћењем производње традиционалног Влашићког сира у индивидуалним домаћинствима, забиљежене су фаза коагулације, обраде груша, пресовања (формирања груде), сољења груде и зрења сира у саламури. У оквиру експерименталног протокола, за производњу сиришнокоагулишућег сира, засијано је млијеко ентеротоксогеним коагулаза позитивним стафилококом при почетном броју  $10^1$ CFU/ml и  $10^2$ CFU/ml и млијеко којем су, поред ентеротоксогеног коагулаза позитивног стафилокока, додате бактерије млијечне киселине. Температура и вријеме инкубације ових узорака опонашали су услове производње сиришнокоагулишућег сира у индивидуалним домаћинствима.

#### **4.2.3. Микробиолошке, физичко-хемијске, имуноензимске и молекуларне методе испитивања**

##### **4.2.3.1. Утврђивање броја коагулаза позитивних стафилокока**

Утврђивање броја коагулаза позитивних стафилокока рађено је методом BAS EN ISO 6888-1/Amd 1:2005.

##### **4.2.3.2. Одређивање рН вриједности**

Вриједност рН одређивана је инструментално, рН метром произвођача Mettler Toledo.

##### **4.2.3.3. Одређивање $a_w$ вриједности**

Одређивање  $a_w$  вриједности рађено је инструментом LabMaster- $a_w$  произвођача Novasina, које је засновано на мјерењу електролитичког отпора.

##### **4.2.3.4. Доказивање ентеротоксина стафилокока**

За доказивање ентеротоксина стафилокока кориштена је европска рутинска метода ELISA тест, комерцијалног произвођача BioControl (Transia plate Staphylococcal Enterotoxin), која детектује А, В, С<sub>1</sub>, С<sub>2</sub>, С<sub>3</sub>, D и Е ентеротоксине.

##### **4.2.3.5. Идентификација врста коагулаза позитивних стафилокока**

###### **4.2.3.5.1. Реагенси за испитивање присуства гена *sra***

За испитивање присуства гена *sra* кориштени су следећи реагенси:

1. MasterPure Complete DNA and RNA Purification kit (Tissue and Cell Lysis solution, MPC protein Precipitation Reagent, TE buffer) – кит за изолацију укупних нуклеинских киселина (произвођач Epicentre, USA)
2. Протеиназа К (произвођач Merck, Њемачка)
3. Изопропанол (произвођач Sigma Aldrich, Њемачка)
4. Етанол 75% (произвођач Sigma Aldrich, Њемачка)
5. Amplitaq Gold PCR Master Mix (2×) – кит за припрему реакционе смјесе (произвођач Invitrogen, САД)
6. Агарозни гел у праху (произвођач Invitrogen, САД)
7. Етидијум бромид (произвођач Sigma Aldrich, Њемачка)
8. Gel Loading Dye – маркер за визуелизацију амплификованих секвенци у електрофоретском пољу (произвођач Invitrogen, САД)
9. Сет прајмера: *spa-f*, *spa-r* (произвођач Invitrogen, САД)

Списак прајмера приказан је у табели 4.2.3.5.1.1.

Табела 4.2.3.5.1.1.Списак прајмера кориштених за испитивање присуства гена *spa*

Прајмер	Таргет ген	Дужина амплификата	Секвенца
<i>spa-f</i> <i>spa-r</i>	<i>spa</i>	180-600 bp	5'- TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC -3' 5'- CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT -3'

#### 4.2.3.5.2. Метода испитивања присуства гена *spa*

Софтверском анализом конструисани су парови прајмера који се комплементарно вежу испред и иза одговарајуће секвенце одређеног гена. Првог дана испитивања изоловане су укупне нуклеинске киселине из свих испитиваних примозолата. У сваку од минутубица које су садржавале преципитоване бактеријске ћелије додато је по 0,3 ml Tissue and Cell раствора и по 1 µl протеиназе К концентрације 50 µg/µl. Узорци су потом постављени у водено купатило на температуру од 65°C у трајању од 15 минута. Након инкубисања, узорци су стављени на лед у трајању од 5 минута, а затим је у сваки узорак додато по 0,15 ml MPC Protein Precipitation реагенса. Узорци су потом мијешани на вибратору за епрувете током 10 секунди. Након мијешања, узорци су центрифуговани током 10 минута при 13.000 обртаја у минути. Добијени супернатант је пипетиран у нове минутубе и у сваку је потом додато по 0,5 ml изопропанола. Потом су нуклеинске киселине преципитоване центрифуговањем током 10 минута при 13.000 обртаја у минути. Изопропанол је одливан, а преципитат је 2 пута испран 75% етанолом, а потом је сав резидуални етанол уклоњен. Добијени преципитат нуклеинских киселина растворен је у 35 µl пуфера за чување ДНК и стављен у замрзивач на температуру од -30°C.

Очекивана величина PCR производа износила је варијабилно 180-600 bp, што указује на присуство гена за синтезу стафилококног протеина А, који је јединствени

маркер за идентификацију *Staphylococcus aureus*. Уколико не постоји трака за *sra* ген, примоизолат није припадник врсте *Staphylococcus aureus*, већ друге врсте и неопходна је идентификација алтернативним методама.

Програм мултиплекс PCR реакције дат је у табели 4.2.3.5.2.1.

**Табела 4.2.3.5.2.1. Програм за конвенционални мултиплекс PCR**

<b>Иницијална денатурација</b>	95°C	5 минута
<b>30 циклуса</b>	95°C	30 секунди
	55°C	30 секунди
	72°C	60 секунди
<b>Финална елонгација</b>	72°C	7 минута

Након амплификације, по 10 µl добијеног амплификата помијешано је са 2 µl боје за електрофорезу и мјешавина је пипетирана у бунарчиће 2% агарозног гела обојеног етидијум бромидом. Гел је стављен у каду и подвргнут електрофорези при напону од 120 V и јачини струје од 400 mA, током 30 минута. Након електрофорезе, гелови су стављени на UV трансилуминатор ради визуелизације трака, након чега су снимљени системом за фотографисање гелова GelDoc (Eppendorf, Њемачка).

#### **4.2.3.6. Идентификација гена за синтезу стафилококног ентеротоксина**

Идентификација гена за синтезу стафилококног ентеротоксина рађена је PCR методом уз примјену одговарајућих прајмера.

##### **4.2.3.6.1. Реагенси за испитивање присуства гена за синтезу стафилококних ентеротоксина (SEA-SEE)**

1. MasterPure Complete DNA and RNA Purification kit (Tissue and Cell Lysis solution, MPC protein Precipitation Reagent, TE buffer) – кит за изолацију укупних нуклеинских киселина (произвођач Epicentre, САД)
2. Протеиназа К (произвођач Merck, Њемачка)
3. Изопропанол (произвођач Sigma Aldrich, Њемачка)
4. Етанол 75% (произвођач Sigma Aldrich, Њемачка)
5. Amplitaq Gold PCR Master Mix (2×) – кит за припрему реакционе смјесе (произвођач Invitrogen, САД)
6. SYBR Green MasterMix (2×) – кит за припрему *RealTime* PCR реакционе смјесе (произвођач Invitrogen, САД)
7. Агарозни гел у праху (произвођач Invitrogen, САД)
8. Етидијум бромид (произвођач Sigma Aldrich, Њемачка)
9. Gel Loading Dye – маркер за визуелизацију амплификованих секвенци у електрофоретском пољу (произвођач Invitrogen, САД)

10. Сет прајмера за испитивање присуства гена за синтезу стафилококних ентеротоксина (SEA-SEE) (произвођач Invitrogen, САД)

Списак прајмера приказан је у табели 4.2.3.6.1.1.

**Табела 4.2.3.6.1.1. Списак прајмера кориштених за испитивање присуства гена за синтезу стафилококних ентеротоксина**

Прајмер	Таргет ген	Дужина амплификоване секвенце (bp)	Секвенца
<i>sea-f</i> <i>sea-r</i>	<i>sea</i>	93	5'- TCAATTTATGGCTAGACGGTAAACAA-3' 5'- GAAGATCCAACCTCCTGAACAGTTACA -3'
<i>seb-f</i> <i>seb-r</i>	<i>seb</i>	85	5'- AACAACTCGCCTTATGAAACGGGAT -3' 5'- CTCCTGGTGCAGGCATCATGTCA -3'
<i>sec-f</i> <i>sec-r</i>	<i>sec</i>	284	5'- CGTATTAGCAGAGAGCCAACCA -3' 5'- GTGAATTTACTCGCTTTGTGCAA -3'
<i>sed-f</i> <i>sed-r</i>	<i>sed</i>	150	5'- AAACGTAAAGCCAATGAAAACA -3' 5'- TGATCTCCTGTACTIONTTTATTTCTCCTA -3'
<i>see-f</i> <i>see-r</i>	<i>see</i>	171	5'- TACCAATTAACCTTGTGGATAGAC -3' 5'- CTCTTTGCACCTTACCGC -3'

**4.2.3.6.2. Испитивање присуства гена за синтезу стафилококних ентеротоксина (SEA-SEE) код стафилокока**

Након анализе генома ентеротоксин продукујућих сојева *Staphylococcus aureus* „BLAST“ софтвером, за испитивање су изабрани следећи гени: ген *sea* који кодира синтезу стафилококног ентеротоксина А, *seb* који кодира синтезу стафилококног ентеротоксина В, *sec* који кодира синтезу стафилококног ентеротоксина С, ген *sed* који кодира синтезу стафилококног ентеротоксина D и *see* који кодира синтезу стафилококног ентеротоксина Е. Софтверском анализом конструисани су парови прајмера који се комплементарно вежу испред и иза одговарајуће секвенце одређеног гена.

Првог дана испитивања изоловане су укупне нуклеинске киселине из свих испитиваних примозолата. У сваку од минутубица, које су садржавале преципитоване бактеријске ћелије, додато је по 0,3 ml Tissue and Cell раствора и по 1 µl протеиназе К концентрације 50 µg/µl. Узорци су потом постављени у водено купатило на температуру од 65°C у трајању од 15 минута. Након инкубисања, узорци су стављени на лед у трајању од 5 минута, а затим је у сваки узорак додато по 0,15 ml MPC Protein Precipitation реагенса. Узорци су потом мијешани на вибратору за епрувете током 10 секунди. Након мијешања, узорци су центрифуговани током 10 минута при 13.000 обртаја у минути. Добијени супернатант је пипетиран у нове минутубе и у сваку је потом додато по 0,5 ml изопропанола. Потом су нуклеинске киселине преципитоване центрифуговањем током 10 минута при 13.000 обртаја у минути. Изопропанол је одливен, а преципитат је 2 пута испран 75% етанолом, а потом је сав резидуални етанол уклоњен. Добијени преципитат нуклеинских киселина растворен је у 35 µl пуфера за чување ДНК и стављен у замрзивач на температуру од -30°C.



Присуство гена за синтезу SE у добијеним екстрактима ДНК испитано је конвенционалном мултиплекс PCR техником (за гене *sea*, *seb* и *sed*), односно техником RealTime PCR (за gene *sec* и *see*). За гене испитиване конвенционалном мултиплекс PCR техником припремљена је посебна смјеса.

Програм мултиплекс PCR реакције дат је у табели 4.2.3.6.2.1.

**Табела 4.2.3.6.2.1. Програм за конвенционални мултиплекс PCR**

<b>Иницијална денатурација</b>	95°C	5 минута
<b>30 циклуса</b>	95°C	30 секунди
	55°C	30 секунди
	72°C	60 секунди
	72°C	7 минута
<b>Финална елонгација</b>	72°C	7 минута

Након амплификације, по 10 µl добијеног амплификата помијешано је са 2 µl боје за електрофорезу и мјешавина је пипетирана у бунарчиће 2% агарозног гела обојеног етидијум бромидом. Гел је стављен у каду и подвргнут електрофорези при напону од 120 V и јачини струје од 400 mA, током 30 минута. Након електрофорезе, гелови су стављени на UV трансилуминатор ради визуелизације трака, након чега су снимљени системом за фотографисање гелова GelDoc (Eppendorf, Њемачка).

#### 4.2.3.7. Статистичка обрада података

У статистичкој анализи добијених резултата, као основне статистичке методе, користили смо дескриптивне статистичке параметре. Ови параметри омогућавају описивање добијених експерименталних резултата и њихово тумачење. Од дескриптивних статистичких параметара користили смо аритметичку средину, стандардну девијацију, стандардну грешку, интервал варијације и коефицијент варијације. Приликом тестирања и утврђивања статистички значајних разлика између испитиваних експерименталних третмана, користили смо вишефакторску анализу варијансе (ANOVA). У овом истраживању, код киселокоагулишућег сира, испитиван је утицај три фактора: почетног броја стафилокока ( $10^1$ CFU/ml и  $10^2$ CFU/ml), медијума (ВН1 бујон, млијеко, млијеко+ВМК) и утицај фаза производње на раст стафилокока (медијум на 32-33°C, хлађење на 27°C 30 минута, ферментација 12 часова на 22°C, ферментација 24 часа на 22°C, ферментација 36 часова на 22°C, ферментација 48 часова на 22°C, обрада груша 30 минута на 35°C). У истраживању код сиришнокоагулишућег сира, такође је испитиван утицај три фактора: почетног броја стафилокока ( $10^1$ CFU/ml и  $10^2$ CFU/ml), медијума (млијеко, млијеко+ВМК) и утицај фаза производње на раст стафилокока (млијеко на 30°C, коагулација 60 минута на 30°C, обрада груша 30 минута на 30°C, цијеђење 12 часова на 22°C, пресовање 12 часова на 22°C, сољење 12 часова на 22°C, сир из саламуре стар 12 часова на 22°C и сир из саламуре стар 36 часова на 22°C). За појединачна поређења значајних разлика кориштен је појединачни, Tukey test, помоћу ког су установљаване статистички значајне разлике између третмана појединачно. Значајност разлика установљавана је на нивоима значајности од 5 и 1%. Сви добијени резултати приказани су табеларно и графички. Статистичка анализа добијених резултата урађена је у статистичком пакету PASW Statistics 18 и MS Excel-у.

Резултати броја изолованих коагулаза позитивних стафилокока приказани су као  $\log_{10}$  CFU/g.

## 5. РЕЗУЛТАТИ ИСПИТИВАЊА

### 5.1. Изолација и идентификација коагулаза позитивних стафилокока из традиционалних сирева

Резултати испитивања традиционалних сирева који се односе на изолацију коагулаза позитивних стафилокока, приказани су у табели 5.1.1.

Табела 5.1.1 Налаз коагулаза позитивних стафилокока у традиционалним сиревима

Врста сира	Број сирева	КПС доказане		КПС нису доказане	
		n	%	n	%
Киселокоагулишући	50	36	72	14	28
Сиришнокоагулишући	50	38	76	12	24
Укупно	100	74	74	26	26

Коагулаза позитивне стафилококе изоловане су из 74 узорка сира, од тога 36 узорака киселокоагулишућег сира и 38 узорака сиришнокоагулишућег сира.

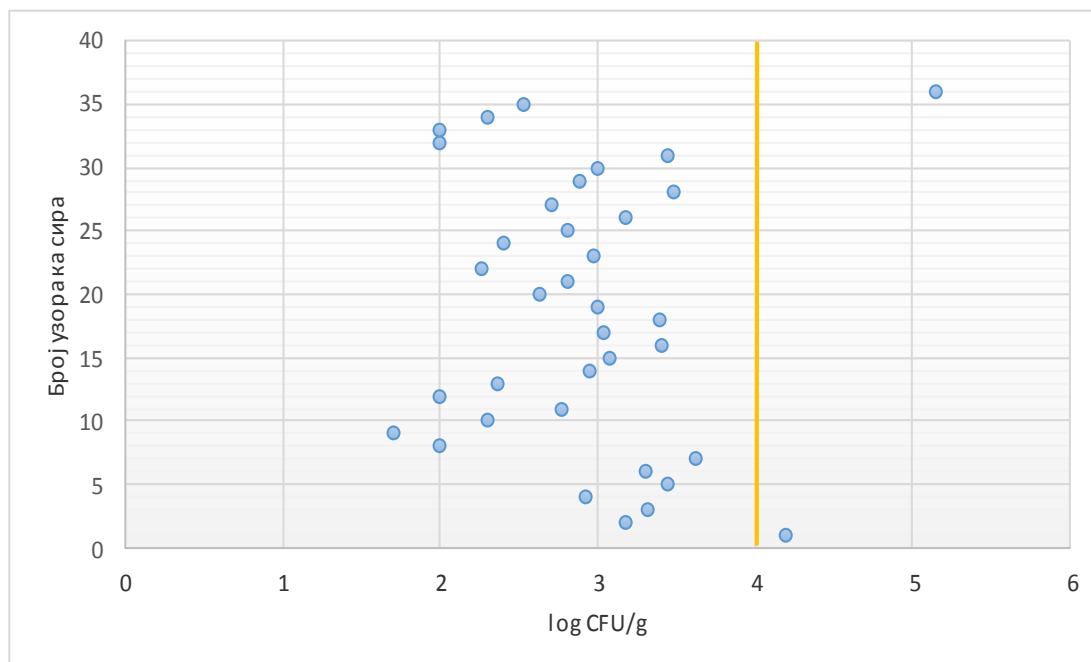
Просјечан број ( $\log$  CFU/g) коагулаза позитивних стафилокока, pH и  $a_w$  вриједности у традиционалним сиревима, приказани су у табели 5.1.2.

Табела 5.1.2 Просјечан број ( $\log$  CFU/g) коагулаза позитивних стафилокока, pH и  $a_w$  вриједност у традиционалним сиревима

Врста сира	n	Статистички параметри	Број КПС ( $\log$ CFU/g)	pH сира	$a_w$ сира
Киселокоагулишући	36	$\bar{x} \pm \delta$	2,91±0,67	4,46±0,32	0,979±0,004
		min	1,70	4,00	0,973
		max	5,15	5,59	0,988
Сиришнокоагулишући	38	$\bar{x} \pm \delta$	3,00±0,82	5,01±0,30	0,913±0,019
		min	1,70	4,43	0,855
		max	4,54	5,98	0,951

Број коагулаза позитивних стафилокока у киселокоагулишућим сиревима кретао се од 1,70 до 5,15  $\log$  CFU/g, с просјечном вриједношћу 2,91±0,67  $\log$  CFU/g. Број коагулаза позитивних стафилокока у сиришнокоагулишућим сиревима кретао се од 1,70 до 4,54  $\log$  CFU/g, с просјечном вриједношћу 3,00±0,82  $\log$  CFU/g. pH вриједност у киселокоагулишућим сиревима била је нижа, а  $a_w$  вриједност виша од сиришнокоагулишућих сирева, док се просјечан број коагулаза позитивних стафилокока није разликовао.

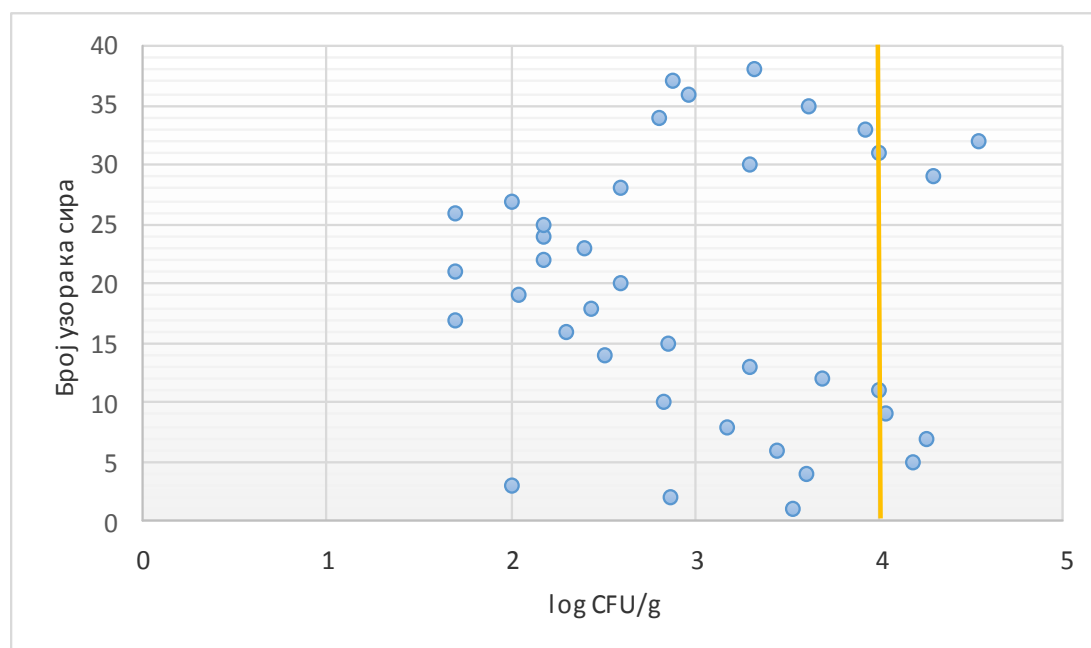
Дистрибуција узорака киселокоагулишућих сирева са различитим бројем коагулаза позитивних стафилокока ( $\log$  CFU/g) приказана је у графикону 5.1.1.



**Графикон 5.1.1.** Дистрибуција узорака киселокоагулишућих сирева са различитим бројем коагулаза позитивних стафилокока ( $\log$  CFU/g)

Коагулаза позитивне стафилококе у броју  $\geq 4 \log$  CFU/g, утврђене су у 2 (5,56%) узорка киселокоагулишућег сира.

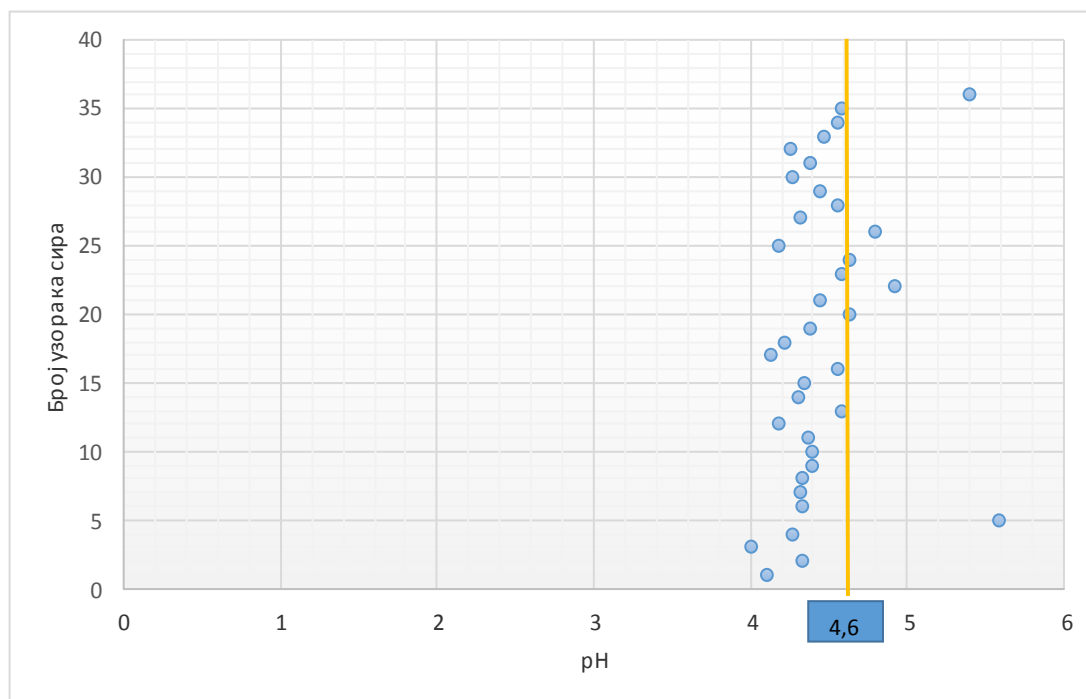
Дистрибуција узорака сиришнокоагулишућих сирева са различитим бројем коагулаза позитивних стафилокока ( $\log$  CFU/g) приказана је у графикону 5.1.2.



**Графикон 5.1.2.** Дистрибуција узорака сиришнокоагулишућих сирева са различитим бројем коагулаза позитивних стафилокока ( $\log$  CFU/g)

Коагулаза позитивне стафилококе у броју  $\geq 4 \log \text{CFU/g}$ , утврђене су у 7 (18,42%) узорака сиришнокоагулишућег сира.

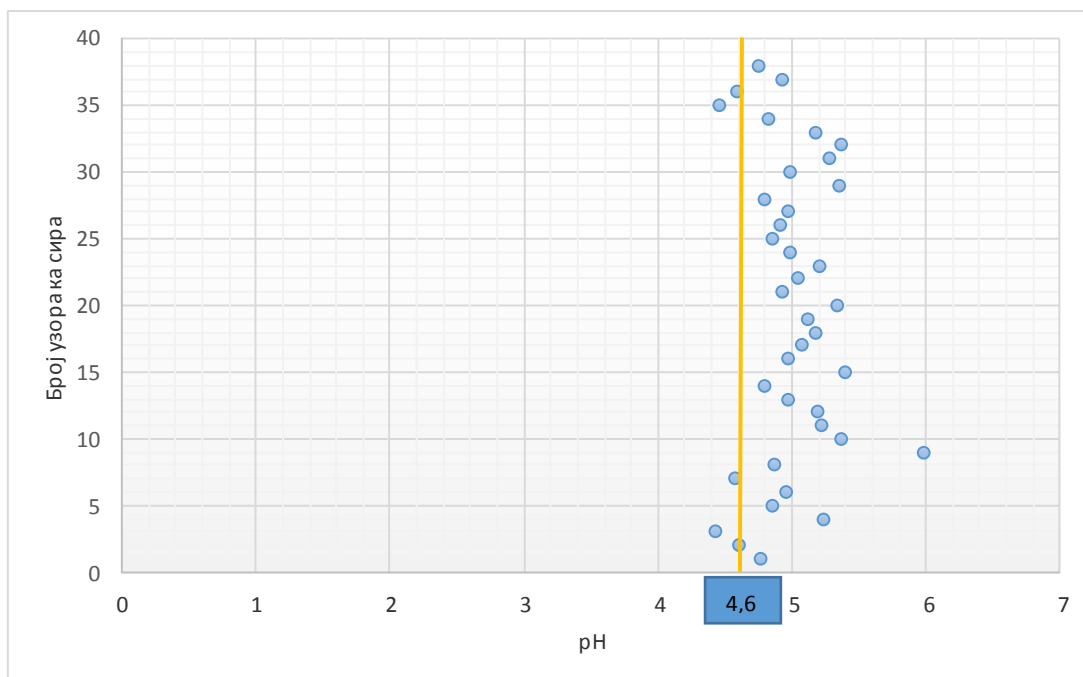
Дистрибуција узорака киселокоагулишућих сирева са различитим рН вриједностима, приказана је у графикону 5.1.3.



**Графикон 5.1.3. Дистрибуција узорака киселокоагулишућих сирева са различитим рН вриједностима**

Вриједност рН већа од изоелектричне тачке казеина ( $\text{pH} > 4,60$ ), утврђена је у 6 (16,67%) киселокоагулишућих сирева.

Дистрибуција узорака сиришнокоагулишућих сирева са различитим рН вриједностима приказана је у графикону 5.1.4.



**Графикон 5.1.4. Дистрибуција узорака сиришнокоагулишућих сирева са различитим рН вриједностима**

Вриједност рН већа од изоелектричне тачке казеина ( $\text{pH} > 4,60$ ), утврђена је у 34 (89,47%) сиришнокоагулишућа сира.

## 5.2. Утврђивање ентеротоксогеног потенцијала сојева коагулаза позитивних стафилокока

Ентеротоксогени потенцијал *Staphylococcus aureus* приказан је у табели 5.2.1.

Табела 5.2.1 Ентеротоксогени потенцијал *Staphylococcus aureus*

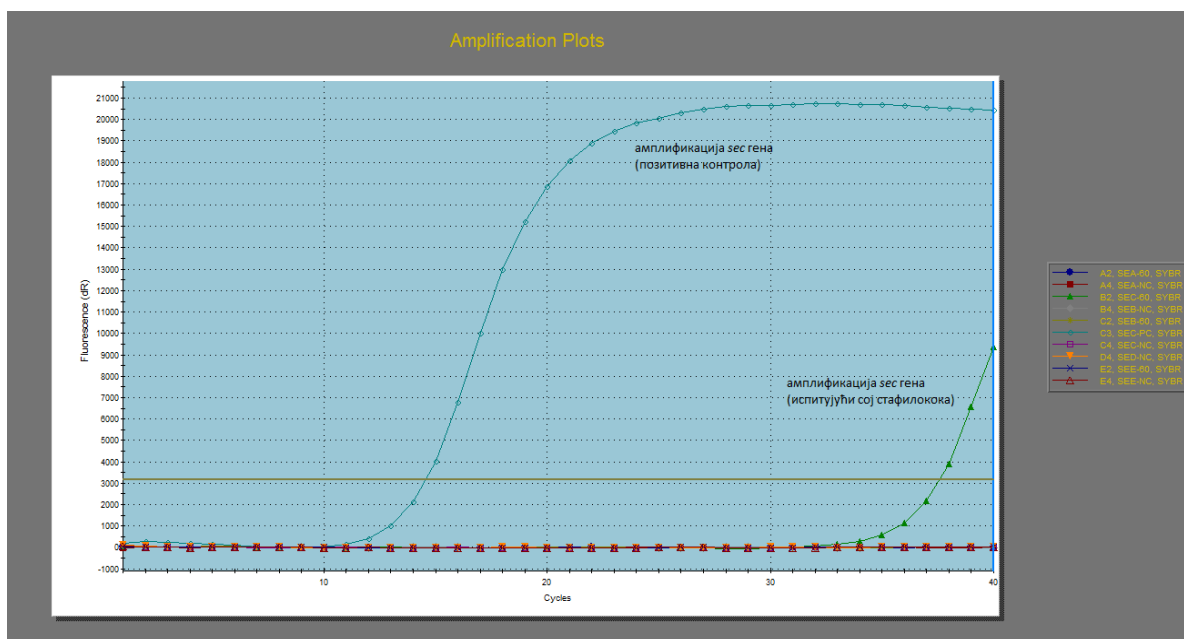
Укупно изолованих КПС	Ентеротоксогени <i>Staphylococcus aureus</i>	
	Број	%
215	58	26,98

Од 215 коагулаза позитивних стафилокока изолованих из сира, примјеном ELISA технике, доказано је да 58 изолата ствара ентеротоксине (SEA-SEE), што износи 26,98%. Свих 58 изолата који су стварали ентеротоксин, идентификовани су, на основу присуства *sra* гена, као *Staphylococcus aureus*.

### 5.3. Резултати испитивања утицаја фактора средине и услова производње на динамику развоја популације коагулаза позитивних стафилокока у сиру

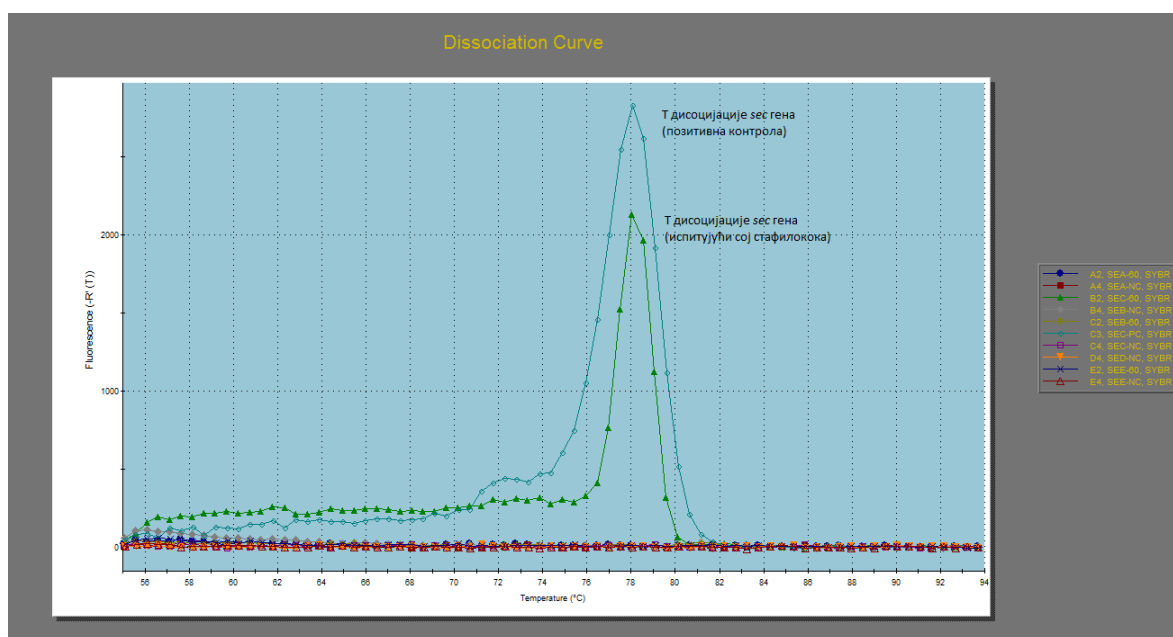
Будући да је ELISA техником утврђено да 58 изолата ствара ентеротоксине SEA-SEE, а како, према подацима из литературе, *Staphylococcus aureus* изолован из субклиничких маститиса најчешће ствара SEC, за испитивање стварања ентеротоксина у симулираним условима производње сира, изабрали смо изолат за који је, примјеном Real Time PCR технике, доказано да ствара SEC.

Амплификација *sec* гена приказана је у графикаону 5.3.1.



Графикон 5.3.1. Амплификација *sec* гена

Температура дисоцијације *sec* гена приказана је у графикаону 5.3.2.



Графикон 5.3.2. Дисоцијација *sec* гена

### 5.3.1. Резултати испитивања утицаја фактора средине и услова производње на динамику развоја популације коагулаза позитивних стафилокока у киселокоагулишућем сиру

У експерименталном протоколу производње киселокоагулишућих сирева, ентеротоксogene коагулаза позитивне стафилококе додате су у три различита медијума, у почетном броју  $10^1$ CFU/ml и  $10^2$ CFU/ml.

Просјечан раст ентеротоксogenicих коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml и  $10^2$ CFU/ml, са дескриптивним статистичким параметрима, приказан је у табели 5.3.1.1.

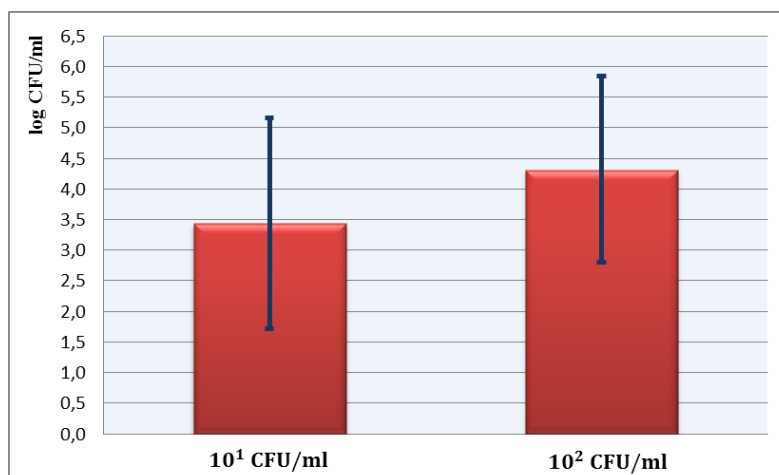
Табела 5.3.1.1. Просјечан раст ентеротоксogenicих коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml и  $10^2$ CFU/ml, са дескриптивним статистичким параметрима

Почетни број стафилокока	n	$\bar{x}$	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
$10^1$ CFU/ml	105	3,44 <sup>a</sup>	1,72	0,1677	49,91	0,50	7,34
$10^2$ CFU/ml	105	4,32 <sup>a</sup>	1,52	0,1480	35,13	2,30	7,72

Статистичка значајност приказана је истим словима: a, b, c -  $p < 0,01$

Установљен је статистички значајно већи раст стафилокока при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml ( $p < 0,01$ ). Код оба почетна броја стафилокока установљено је велико варирање, коефицијенти корелације су релативно високи.

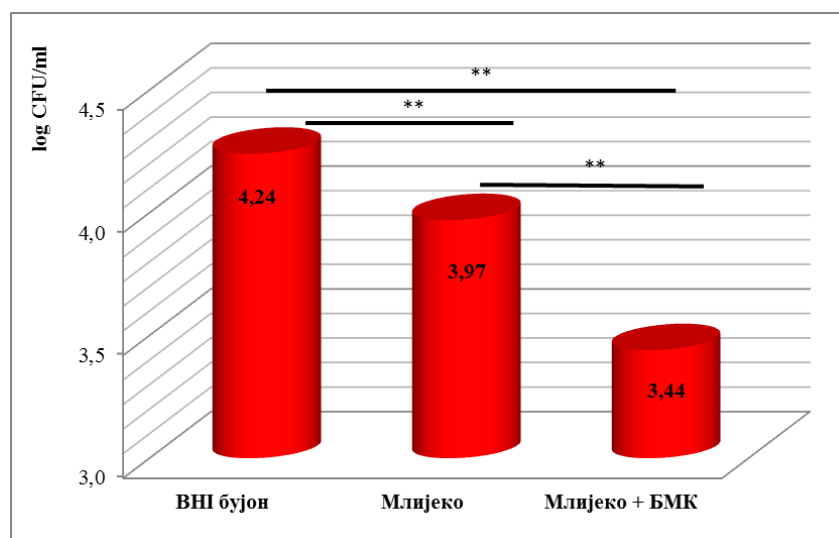
Просјечан раст ентеротоксogenicих коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml и  $10^2$ CFU/ml, приказан је у графикаону 5.3.1.1.



Графикон 5.3.1.1. Просјечан раст ентеротоксogenicих коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева



Значајност разлика између медијума кориштених у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева, у односу на раст стафилокока, приказана је у графикаону 5.3.1.2.



\*\* значајна разлика ( $p < 0,01$ )

**Графикон 5.3.1.2.** Значајност разлика између кориштених медијума у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева, у односу на раст стафилокока

У односу на раст стафилокока, у зависности од врсте медијума, установљене су значајне разлике ( $p < 0,01$ ). Највећи раст забиљежен је у ВНИ бујону ( $4,24 \pm 1,94$  log CFU/ml), затим у млијеку ( $3,97 \pm 1,88$ ), а најмањи раст забиљежен је у млијеку+БМК ( $3,44 \pm 0,95$  log CFU/ml) (графикон 5.3.1.2.).

У табели 5.3.1.2. приказани су статистички параметри раста стафилокока анализираних фаза производње киселокоагулишућих сирева.

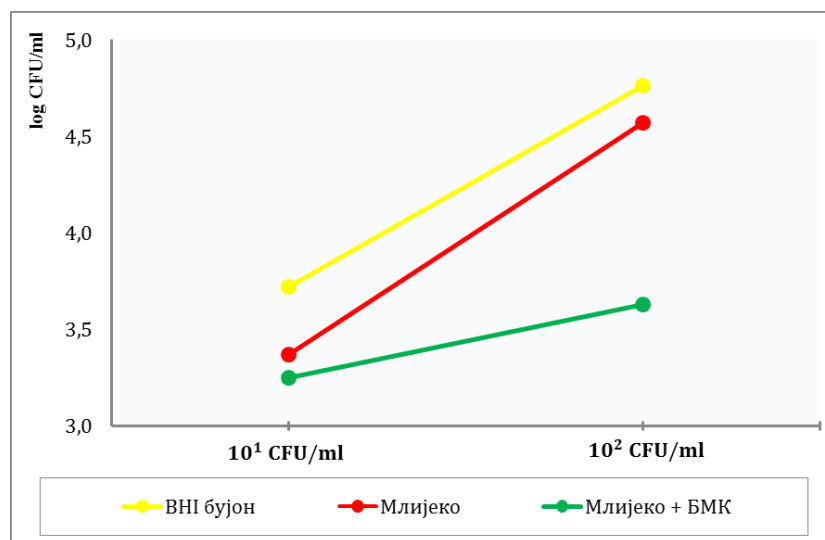
**Табела 5.3.1.2.** Статистички параметри раста стафилокока анализираних фаза производње киселокоагулишућих сирева

Фаза производње	n	$\bar{x}$	SD
Медијум на 32-33°C	30	1,96 <sup>abcde</sup>	0,75
Хлађење на 27°C 30 минута	30	2,02 <sup>fghij</sup>	0,76
Ферментација 12 часова на 22°C	30	3,26 <sup>afklmn</sup>	0,70
Ферментација 24 часа на 22°C	30	4,36 <sup>bgkopr</sup>	0,82
Ферментација 36 часова на 22°C	30	5,07 <sup>chlo</sup>	0,91
Ферментација 48 часова на 22°C	30	5,28 <sup>dimp</sup>	0,34
Обрада груша 30 минута на 35°C	30	5,21 <sup>ejnr</sup>	1,39

Статистичка значајност приказана је истим словима: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, r -  $p < 0,01$

Између свих фаза производње установљене су значајне разлике ( $p < 0,01$ ), осим између медијума на 32-33°C и хлађења на 27°C 30 минута ( $p > 0,05$ ), као и између ферментације 36 часова на 22°C, ферментације 48 часова на 22°C и обраде груша 30 минута на 35°C ( $p > 0,05$ ) (N=30) (табела 5.3.1.2.).

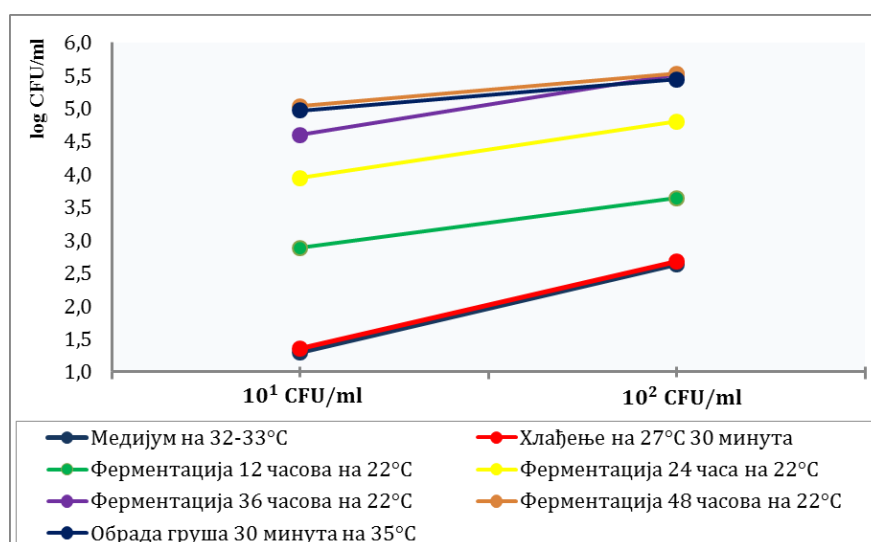
Утицај медијума на раст стафилокока, у зависности од почетног броја, приказан је у графикану 5.3.1.3.



Графикон 5.3.1.3. Утицај медијума на раст стафилокока у зависности од почетног броја

Утврђена је значајна разлика ( $p < 0,05$ ) у расту стафилокока у зависности од врсте медијума и њиховог почетног броја (графикон 5.3.1.3.).

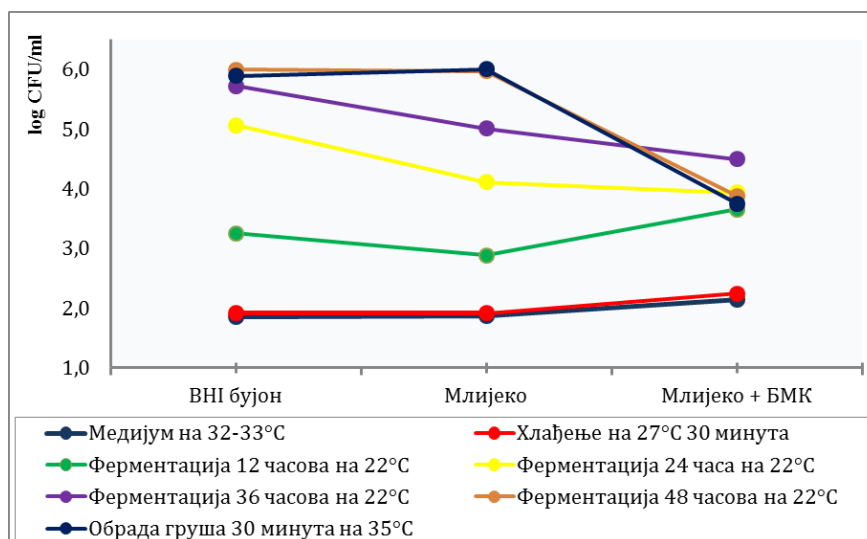
Утицај фаза производње на раст стафилокока, у зависности од почетног броја, приказан је у графикану 5.3.1.4.



Графикон 5.3.1.4. Утицај фаза производње на раст стафилокока у зависности од почетног броја

Раст стафилокока се статистички значајно разликује у односу почетни број кроз анализирание фазе производње ( $p < 0,01$ ) (графикон 5.3.1.4.).

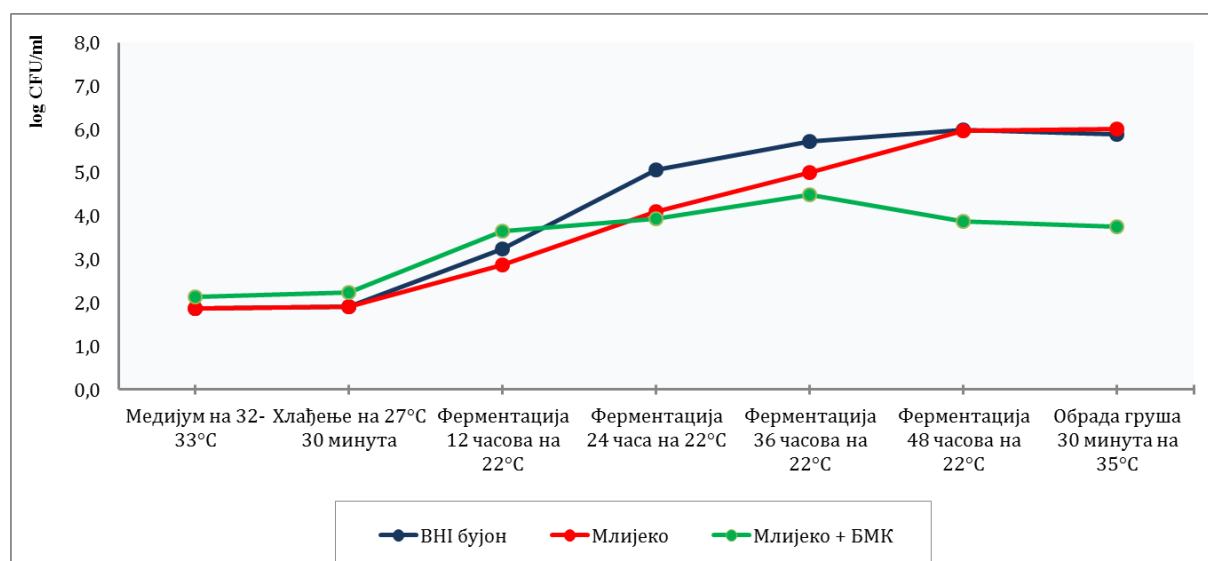
Утицај фаза производње на раст стафилокока, у зависности од медијума, приказан је у графикаону 5.3.1.5.



Графикон 5.3.1.5. Утицај фаза производње на раст стафилокока у зависности од медијума

Утврђена је значајна разлика ( $p < 0,01$ ) у расту стафилокока у зависности од врсте медијума кроз анализираним фазе производње (графикон 5.3.1.5.).

Раст стафилокока у медијумима, у зависности од фаза производње, приказан је у графикаону 5.3.1.6.



Графикон 5.3.1.6. Раст стафилокока у медијумима у зависности од фаза производње

Нису установљене статистички значајне разлике између сва три медијума ( $p > 0,05$ ).

Раст ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева у ВНИ бујону као медијуму, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml, приказан је у табели 5.3.1.3.

**Табела 5.3.1.3. Раст ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева у ВНИ бујону као медијуму, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml**

Фаза производње	n	$\bar{x}$	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
Медијум на 32-33°C	5	1,04 <sup>abcd</sup>	0,35	0,1565	33,52	1,65	0,77
Хлађење на 27°C 30 минута	5	1,12 <sup>efgh</sup>	0,35	0,1550	30,95	1,60	0,80
Ферментација 12 часова на 22°C	5	2,53 <sup>ijkl</sup>	0,46	0,2052	18,14	3,09	2,00
Ферментација 24 часа на 22°C	5	4,47 <sup>aei</sup>	0,54	0,2435	12,18	5,39	3,98
Ферментација 36 часова на 22°C	5	5,30 <sup>bfj</sup>	0,61	0,2720	11,48	5,93	4,58
Ферментација 48 часова на 22°C	5	5,86 <sup>cgk</sup>	1,07	0,4780	18,25	7,34	4,80
Обрада груша 30 минута на 35°C	5	5,73 <sup>dhl</sup>	1,19	0,5341	20,84	7,25	4,51

Статистичка значајност приказана је истим словима: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l -  $p < 0,01$

При почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml, установљене су значајне разлике ( $p < 0,01$ ) између медијума на 32-33° С, хлађења на 27°C 30 минута и ферментације 12 часова на 22°C и свих осталих фаза производње.

Раст ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева у млијеку као медијуму, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml, приказан је у табели 5.3.1.4.

**Табела 5.3.1.4. Раст ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева у млијеку као медијуму, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml**

Фаза производње	n	$\bar{x}$	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
Медијум на 32-33°C	5	1,08 <sup>abcd</sup>	0,21	0,0939	19,37	1,41	0,89
Хлађење на 27°C 30 минута	5	1,15 <sup>efgh</sup>	0,45	0,033	39,39	1,58	0,50
Ферментација 12 часова на 22°C	5	2,43 <sup>Aij</sup>	0,42	0,1882	17,31	3,17	2,18
Ферментација 24 часа на 22°C	5	3,46 <sup>aeB</sup>	0,39	0,1747	11,28	3,70	2,77
Ферментација 36 часова на 22°C	5	4,42 <sup>bfAk</sup>	0,36	0,1602	8,10	4,79	4,04
Ферментација 48 часова на 22°C	5	5,47 <sup>cgIB</sup>	0,94	0,4199	17,17	6,32	3,95
Обрада груша 30 минута на 35°C	5	5,53 <sup>dhjk</sup>	1,02	0,4567	18,46	6,42	3,87

Статистичка значајност приказана је истим словима: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k -  $p < 0,01$ ; A, B,  $p < 0,05$

При почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml установљене су значајне разлике ( $p < 0,01$ ) између медијума на  $32-33^\circ\text{C}$ , хлађења на  $27^\circ\text{C}$  30 минута и ферментације 12 часова на  $22^\circ\text{C}$  и свих осталих фаза производње. Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) установљене су између ферментације 12 часова на  $22^\circ\text{C}$  и ферментације 36 часова на  $22^\circ\text{C}$ , као и између ферментације 24 часа на  $22^\circ\text{C}$  и ферментације 48 часова на  $22^\circ\text{C}$ .

Раст ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева у млијеку+БМК као медијуму, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml, приказан је у табели 5.3.1.5.

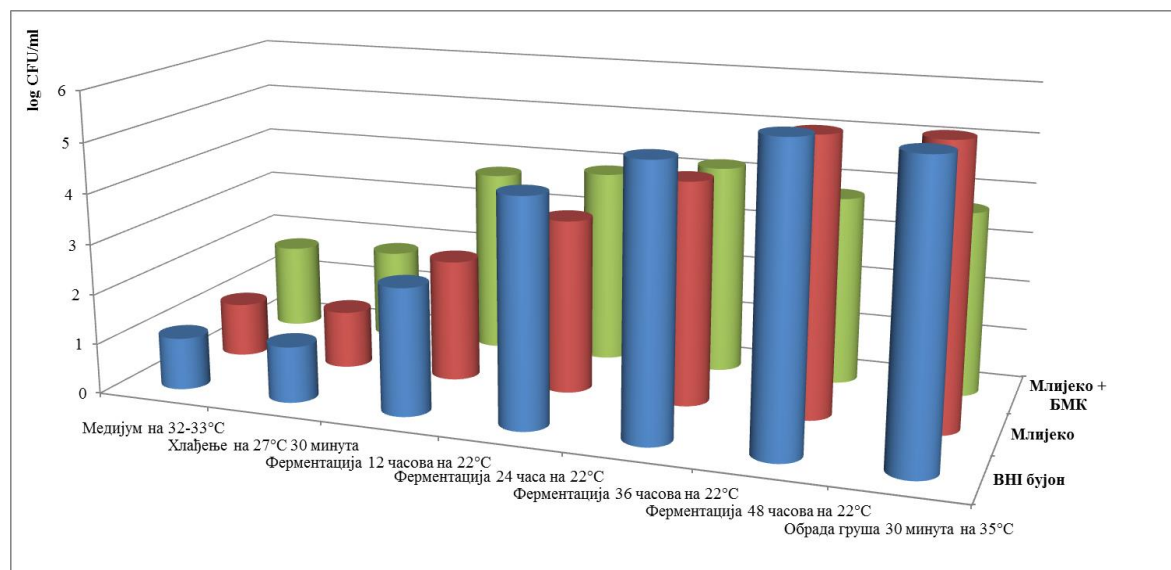
**Табела 5.3.1.5. Раст ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева у млијеку+БМК као медијуму, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml**

Фаза производње	n	$\bar{x}$	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
Медијум на $32-33^\circ\text{C}$	5	1,71 <sup>abcde</sup>	0,15	0,0667	8,70	1,96	1,57
Хлађење на $27^\circ\text{C}$ 30 минута	5	1,81 <sup>ghij</sup>	0,9	0,1312	16,19	2,22	1,45
Ферментација 12 часова на $22^\circ\text{C}$	5	3,69 <sup>af</sup>	0,45	0,2010	12,18	4,20	3,11
Ферментација 24 часа на $22^\circ\text{C}$	5	3,89 <sup>bg</sup>	0,61	0,2710	15,58	4,53	3,04
Ферментација 36 часова на $22^\circ\text{C}$	5	4,19 <sup>ch</sup>	0,59	0,2622	14,00	4,18	3,29
Ферментација 48 часова на $22^\circ\text{C}$	5	3,76 <sup>di</sup>	0,32	0,1416	8,43	4,08	3,36
Обрада груша 30 минута на $35^\circ\text{C}$	5	3,67 <sup>ej</sup>	0,34	0,1507	9,19	4,04	3,30

Статистичка значајност приказана је истим словима: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, -  $p < 0,01$

При почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml, установљене су значајне разлике ( $p < 0,01$ ) између медијума на  $32-33^\circ\text{C}$ , хлађења на  $27^\circ\text{C}$  30 минута и свих осталих фаза производње.

Раст стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућег сира при почетном броју  $10^1$ CFU/ml, приказан је у графикону 5.3.1.7.



**Графикон 5.3.1.7. Раст стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућег сира при почетном броју  $10^1$ CFU/ml**

Раст ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева у ВНИ бујону као медијуму, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml, приказан је у табели 5.3.1.6.

**Табела 5.3.1.6. Раст ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева у ВНИ бујону као медијуму, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml**

Фаза производње	n	$\bar{x}$	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
Медијум на 32-33°C	5	2,67 <sup>abcd</sup>	0,17	0,0776	6,51	2,78	2,36
Хлађење на 27°C 30 минута	5	2,73 <sup>efgh</sup>	0,17	0,074	6,13	2,92	2,52
Ферментација 12 часова на 22°C	5	3,96 <sup>Aijk</sup>	0,14	0,0609	3,43	4,14	3,84
Ферментација 24 часа на 22°C	5	5,65 <sup>aeA</sup>	0,32	0,1438	5,69	6,06	5,26
Ферментација 36 часова на 22°C	5	6,14 <sup>bfi</sup>	0,94	0,4214	15,35	7,50	5,20
Ферментација 48 часова на 22°C	5	6,11 <sup>cgj</sup>	0,99	0,4470	16,35	7,67	5,04
Обрада груша 30 минута на 35°C	5	6,02 <sup>dhk</sup>	1,07	0,4804	17,83	7,72	5,00

Статистичка значајност приказана је истим словима: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, -  $p < 0,01$ ; A, B,  $p < 0,05$

При почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml, установљене су значајне разлике ( $p < 0,01$ ) између медијума на 32-33° C, хлађења на 27°C 30 минута и ферментације 12 часова на 22°C и свих осталих фаза производње. Између ферментације 12 часова на 22°C и ферментације 24 часа на 22°C установљена је значајна разлика ( $p < 0,05$ ).

Раст ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева у млијеку као медијуму, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml, приказан је у табели 5.3.1.7.

**Табела 5.3.1.7. Раст ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева у млијеку као медијуму, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml**

Фаза производње	n	$\bar{x}$	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
Медијум на 32-33°C	5	2,62 <sup>abcd</sup>	0,22	0,1002	8,41	2,95	2,42
Хлађење на 27°C 30 минута	5	2,66 <sup>efgh</sup>	0,25	0,1094	9,20	2,97	2,31
Ферментација 12 часова на 22°C	5	3,32 <sup>ijk</sup>	0,53	0,2352	15,83	3,95	2,58
Ферментација 24 часа на 22°C	5	4,76 <sup>aeAB</sup>	0,32	0,1447	6,79	5,33	4,52
Ферментација 36 часова на 22°C	5	5,06 <sup>bk</sup>	0,87	0,3883	15,50	6,47	4,40
Ферментација 48 часова на 22°C	5	6,48 <sup>cgIA</sup>	1,20	0,5353	18,48	7,30	4,41
Обрада груша 30 минута на 35°C	5	6,48 <sup>dhjB</sup>	1,17	0,5236	18,08	7,37	4,49

Статистичка значајност приказана је истим словима: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k -  $p < 0,01$ ; A, B,  $p < 0,05$

При почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml, установљене су значајне разлике ( $p < 0,01$ ) између медијума на 32-33°C, хлађења на 27°C 30 минута и ферментације 12 часова на 22°C и свих осталих фаза производње. Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) установљене су између ферментације 12 часова на 22°C и ферментације 48 часова на 22°C и обраде груша 30 минута на 35°C.

Раст ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева у млијеку+БМК као медијуму, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml, приказан је у табели 5.3.1.8.

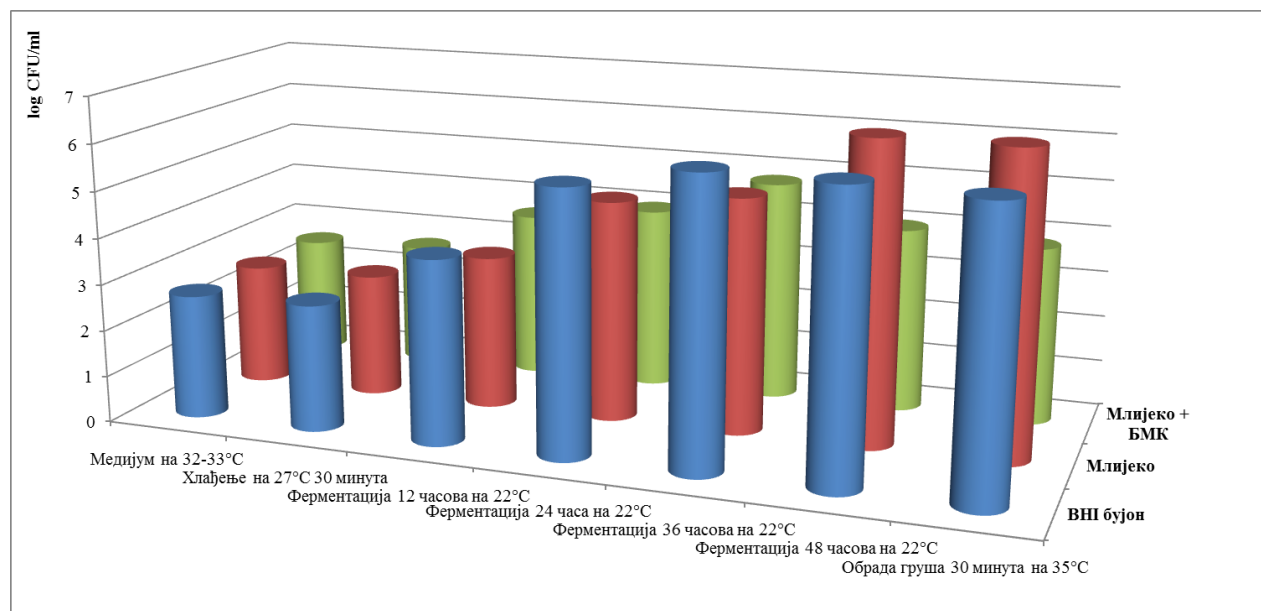
**Табела 5.3.1.8. Раст ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева у млијеку+БМК као медијуму, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml**

Фаза производње	n	$\bar{x}$	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
Медијум на 32-33°C	5	2,57 <sup>a</sup>	0,26	0,1173	10,20	2,91	2,30
Хлађење на 27°C 30 минута	5	2,66 <sup>b</sup>	0,26	0,1158	9,73	3,01	2,42
Ферментација 12 часова на 22°C	5	3,62	0,37	0,1644	10,16	4,18	3,24
Ферментација 24 часа на 22°C	5	3,96	0,26	0,1140	6,43	4,24	3,72
Ферментација 36 часова на 22°C	5	4,78 <sup>ab</sup>	0,30	0,1339	6,26	5,08	4,40
Ферментација 48 часова на 22°C	5	3,99	0,54	0,2421	13,56	4,61	3,41
Обрада груша 30 минута на 35°C	5	3,82	0,55	0,2449	14,31	4,33	3,22

Статистичка значајност приказана је истим словима: a, b, -  $p < 0,01$

При почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml, установљене су значајне разлике ( $p < 0,01$ ) између медијума на  $32-33^\circ\text{C}$ , хлађења на  $27^\circ\text{C}$  30 минута и ферментације 36 часова на  $22^\circ\text{C}$ .

Раст стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућег сира при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml, приказан је у графикану 5.3.1.8.



**Графикон 5.3.1.8. Раст стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућег сира при почетном броју  $10^2$ CFU/ml**

У експерименталном протоколу који смо поставили, код киселокоагулишућих сирева пратили смо промјену рН у зависности од почетног броја стафилокока, кориштеног медијума за раст и фазе производње.

Просјечан рН медијума у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml и  $10^2$ CFU/ml, са дескриптивним статистичким параметрима, приказан је у табели 5.3.1.9.

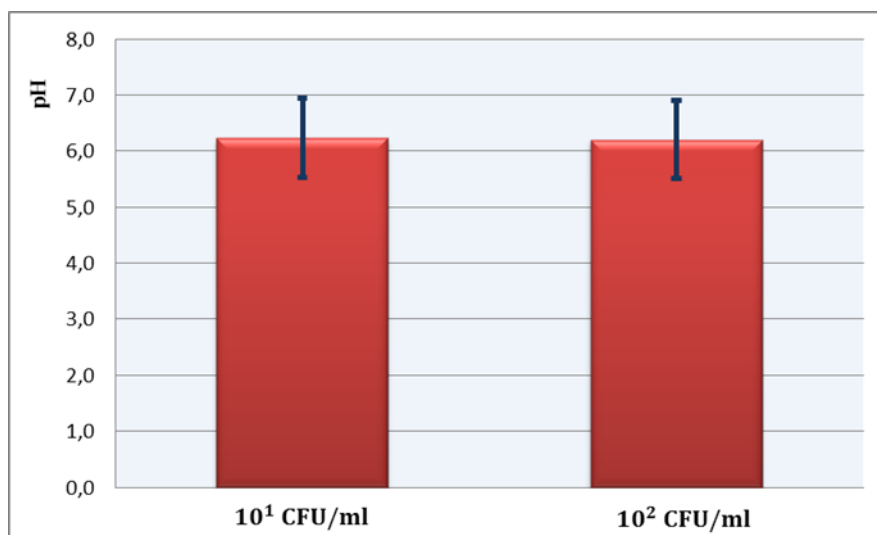
**Табела 5.3.1.9. Просјечан рН медијума у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml и  $10^2$ CFU/ml, са дескриптивним статистичким параметрима**

Почетни број стафилокока	n	$\bar{x}$	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
$10^1$ CFU/ml	105	6,24	0,71	0,0687	11,30	7,15	4,85
$10^2$ CFU/ml	105	6,21	0,69	0,0674	11,13	7,15	4,83

Установљено је да не постоји статистички значајна разлика ( $p > 0,05$ ) у рН вриједности у односу на почетни број стафилокока.

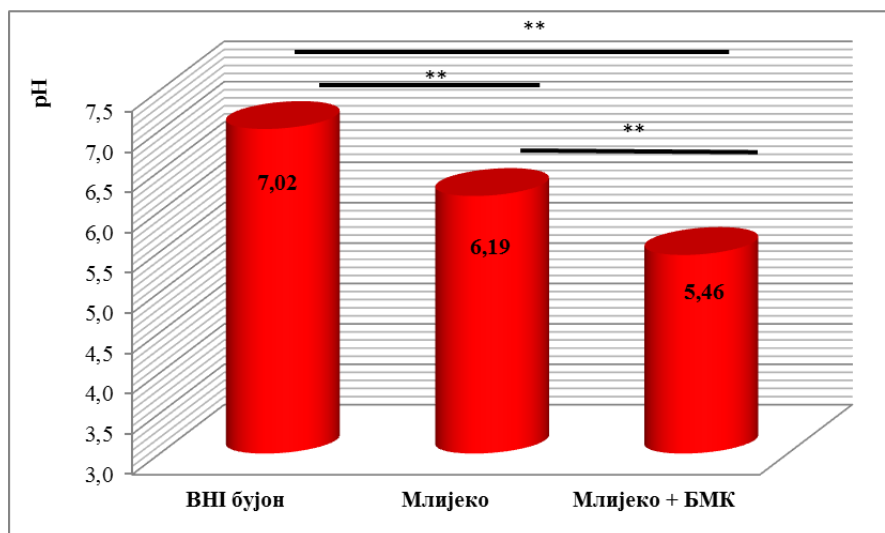


Просјечан рН медијума у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^1$  CFU/ml и  $10^2$  CFU/ml, приказан је у графикаону 5.3.1.9.



Графикон 5.3.1.9. Просјечне вриједности рН медијума у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева

Значајност разлика између кориштених медијума у односу на рН, приказана је у графикаону 5.3.1.10.



Графикон 5.3.1.10. Значајност разлика између кориштених медијума у односу на рН

Утврђене су значајне разлике ( $p < 0,01$ ) између сва три медијума међусобно, у односу на рН вриједност.

У табели 5.3.1.10. приказани су статистички параметри рН вриједности, анализираних кроз фазе производње киселокоагулишућих сирева.

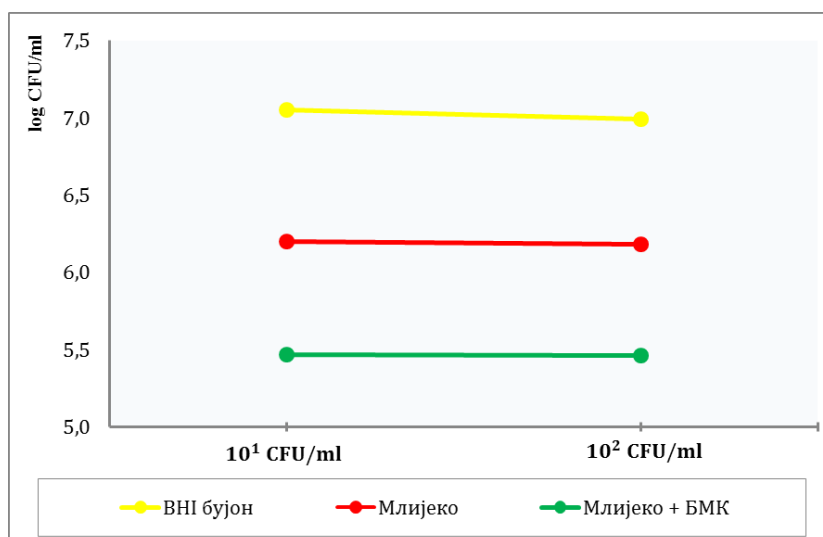
**Табела 5.3.1.10. Статистички параметри рН вриједности анализираних кроз фазе производње киселокоагулишућих сирева**

Фаза производње	n	$\bar{x}$	SD
Медијум на 32-33°C	30	6,46 <sup>abcde</sup>	0,46
Хлађење на 27°C 30 минута	30	6,45 <sup>fghij</sup>	0,46
Ферментација 12 часова на 22°C	30	6,37 <sup>afklmn</sup>	0,52
Ферментација 24 часа на 22°C	30	6,18 <sup>bgkopr</sup>	0,72
Ферментација 36 часова на 22°C	30	6,09 <sup>chlos</sup>	0,80
Ферментација 48 часова на 22°C	30	6,01 <sup>dimps</sup>	0,84
Обрада груша 30 минута на 35°C	30	5,98 <sup>ejnr</sup>	0,82

Статистичка значајност приказана је истим словима: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, r, s -  $p < 0,01$

Између свих фаза производње установљене су значајне разлике ( $p < 0,01$ ), сем између медијума на 32-33°C и хлађења на 27°C 30 минута ( $p > 0,05$ ), као и између ферментације 48 часова на 22°C и обраде груша 30 минута на 35°C ( $p > 0,05$ ) (N=30) (табела 5.3.1.10.).

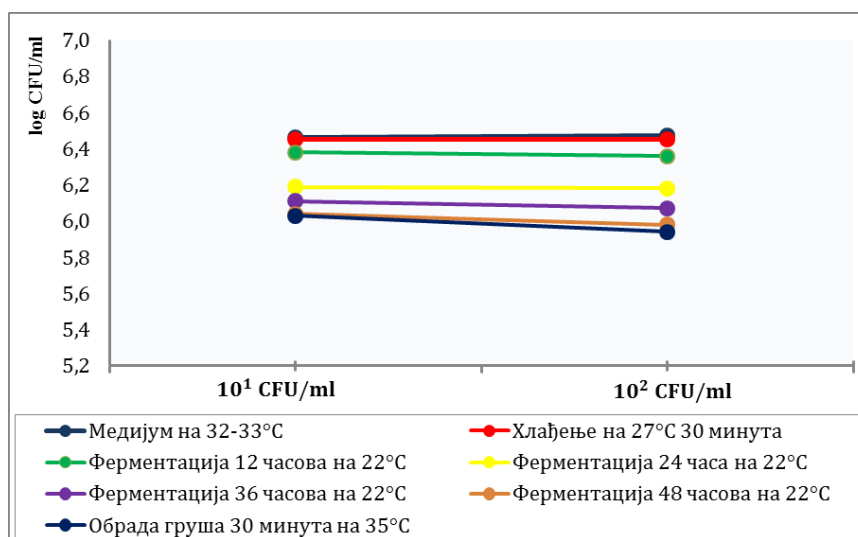
Утицај медијума на рН, у зависности од почетног броја стафилокока, приказан је у графикону 5.3.1.11.



**Графикон 5.3.1.11. Утицај медијума на рН у зависности од почетног броја стафилокока**

Установљено је да не постоје значајне разлике ( $p > 0,05$ ), што указује да различит почетни број стафилокока нема значајан утицај на рН, у односу на медијуме (графикон 5.3.1.11.).

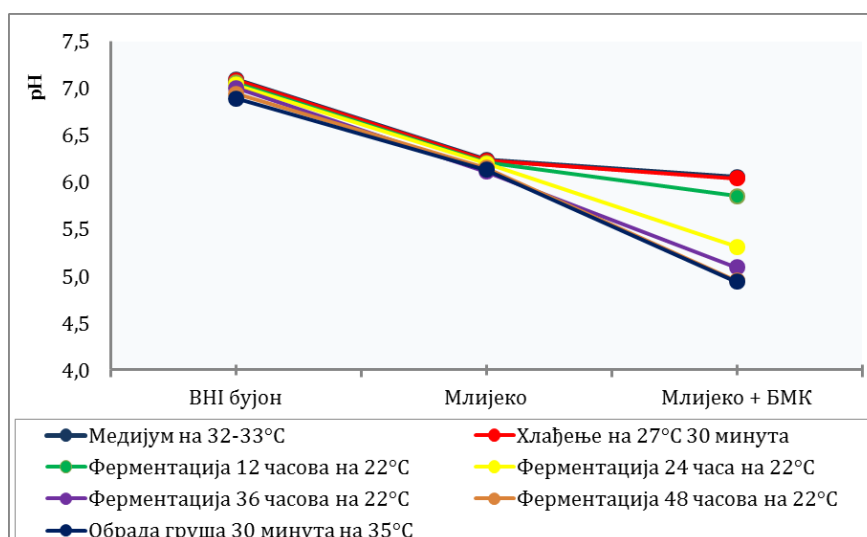
Утицај фаза производње на рН, у зависности од почетног броја стафилокока, приказан је у графикону 5.3.1.12.



**Графикон 5.3.1.12.** Утицај фаза производње на рН у зависности од почетног броја стафилокока

Установљене су значајне разлике ( $p < 0,01$ ) рН вриједности, у зависности од почетног броја стафилокока и фаза производње (графикон 5.3.1.12.).

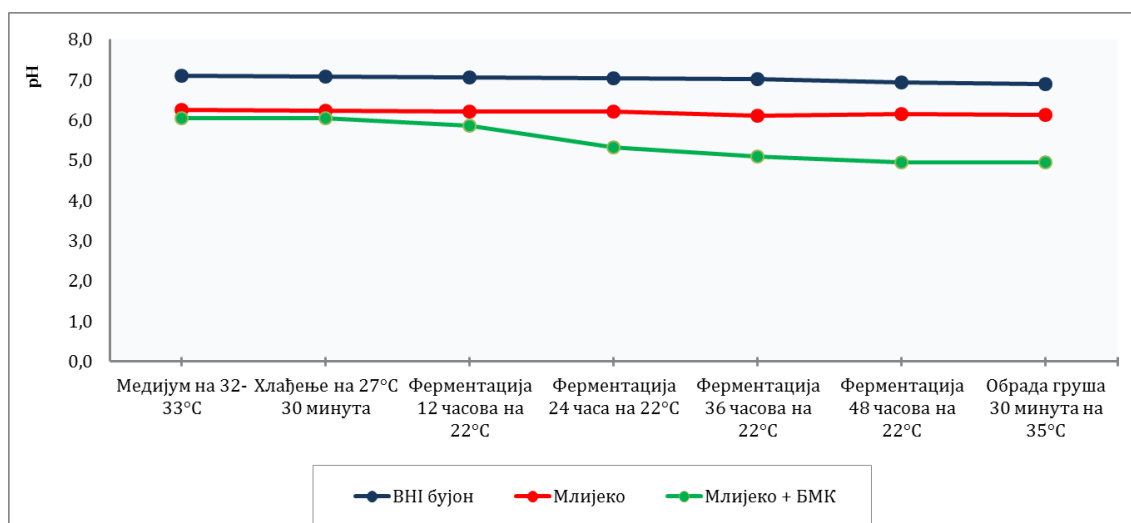
Утицај фаза производње на рН, у зависности од медијума, приказан је у графикону 5.3.1.13.



**Графикон 5.3.1.13.** Утицај фаза производње на рН у зависности од медијума

У медијуму млијеко+БМК утврђена је значајна разлика ( $p < 0,01$ ) у рН, у зависности од фаза производње (графикон 5.3.1.13.).

Вриједности рН у испитиваним медијумима, у зависности од фаза производње, приказане су у графикану 5.3.1.14.



Графикон 5.3.1.14. Вриједности рН у испитиваним медијумима у зависности од фаза производње

Нису установљене статистички значајне разлике у промјени рН у сва три медијума, током различитих фаза производње ( $p > 0,05$ ).

Промјена рН у ВНИ бујону као медијуму, током раста ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml, приказана је у табели 5.3.1.11.

Табела 5.3.1.11. Промјена рН у ВНИ бујону као медијуму, током раста ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml

Фаза производње	n	$\bar{x}$	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
Медијум на 32-33°C	5	7,09	0,05	0,0206	0,65	7,15	7,03
Хлађење на 27°C 30 минута	5	7,08	0,03	0,0153	0,48	7,11	7,03
Ферментација 12 часова на 22°C	5	7,06	0,04	0,0169	0,54	7,10	7,02
Ферментација 24 часа на 22°C	5	7,05	0,04	0,0163	0,52	7,09	7,01
Ферментација 36 часова на 22°C	5	7,04	0,04	0,0170	0,54	7,08	7,00
Ферментација 48 часова на 22°C	5	7,01	0,02	0,0108	0,34	7,01	6,98
Обрада груша 30 минута на 35°C	5	6,99	0,03	0,0112	0,36	6,99	6,97

При почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml, нису установљене значајне разлике ( $p > 0,05$ ) у рН вриједности.

Промјена рН у млијеку као медијуму, током раста ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml, приказана је у табели 5.3.1.12.

**Табела 5.3.1.12. Промјена рН у млијеку као медијуму, током раста ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml**

Фаза производње	n	$\bar{x}$	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
Медијум на 32-33°C	5	6,23	0,03	0,0116	0,42	6,27	6,20
Хлађење на 27°C 30 минута	5	6,23	0,03	0,0112	0,04	6,27	6,20
Ферментација 12 часова на 22°C	5	6,21	0,02	0,0108	0,39	6,24	6,18
Ферментација 24 часа на 22°C	5	6,22	0,03	0,0128	0,46	6,25	6,18
Ферментација 36 часова на 22°C	5	6,18	0,05	0,0242	0,80	6,24	6,10
Ферментација 48 часова на 22°C	5	6,17	0,05	0,0244	0,89	6,22	6,08
Обрада груша 30 минута на 35°C	5	6,15	0,05	0,0216	0,78	6,21	6,08

При почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml, нису установљене значајне разлике ( $p > 0,05$ ) у рН вриједности.

Промјена рН у млијеку+БМК као медијуму, током раста ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml, приказана је у табели 5.3.1.13.

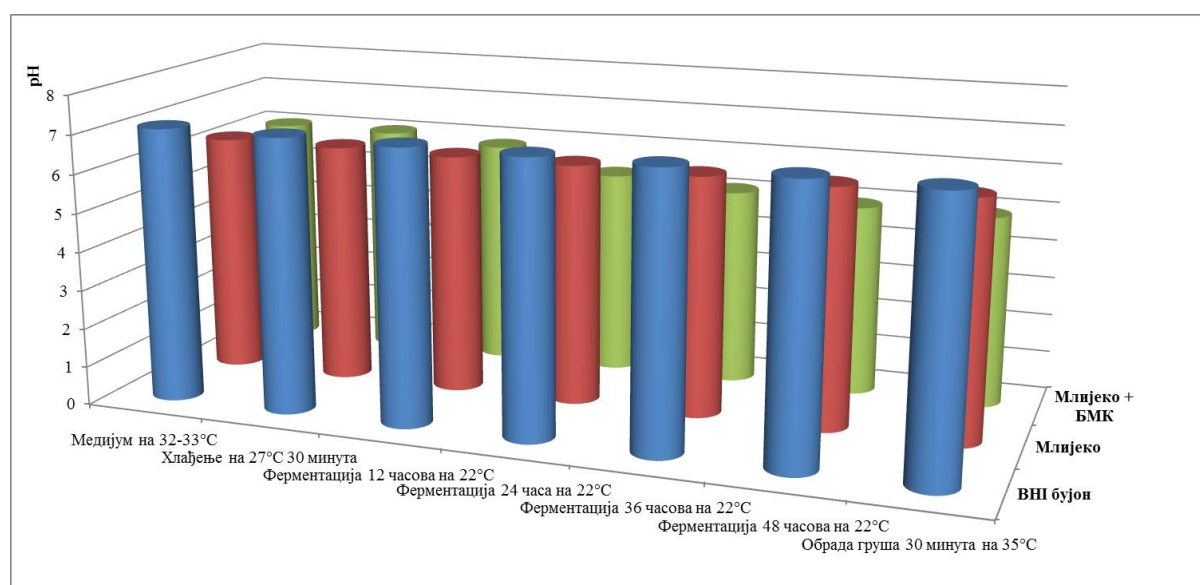
**Табела 5.3.1.13. Промјена рН у млијеку+БМК као медијуму, током раста ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml**

Фаза производње	n	$\bar{x}$	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
Медијум на 32-33°C	5	6,05 <sup>abcde</sup>	0,08	0,0364	1,35	6,19	6,00
Хлађење на 27°C 30 минута	5	6,05 <sup>fghij</sup>	0,08	0,0364	1,35	6,19	6,00
Ферментација 12 часова на 22°C	5	5,87 <sup>afklmn</sup>	0,07	0,072	1,23	5,98	5,80
Ферментација 24 часа на 22°C	5	5,31 <sup>bgkopr</sup>	0,07	0,0740	1,39	5,40	5,21
Ферментација 36 часова на 22°C	5	5,09 <sup>chlos</sup>	0,03	0,0305	0,60	5,13	5,05
Ферментација 48 часова на 22°C	5	4,95 <sup>dimp</sup>	0,07	0,0304	1,37	5,03	4,85
Обрада груша 30 минута на 35°C	5	4,94 <sup>ejnrs</sup>	0,06	0,0260	1,18	5,00	4,85

Статистичка значајност приказана је истим словима: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, r, s -  $p < 0,01$ ;

При почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml, установљене су значајне разлике ( $p < 0,01$ ) рН вриједности. Значајне разлике установљене су између медијума на  $32-33^\circ\text{C}$ , хлађења на  $27^\circ\text{C}$  30 минута и свих осталих фаза производње. Такође, значајне разлике су установљене између свих осталих фаза производње ( $p < 0,01$ ), сем између ферментације 36 часова на  $22^\circ\text{C}$  и ферментације 48 часова на  $22^\circ\text{C}$ , као и ферментације 48 часова на  $22^\circ\text{C}$  и обраде груша 30 минута на  $35^\circ\text{C}$  ( $p > 0,05$ ). У односу на вриједности рН у ВНИ бујону и млијеку, оне су ниже. Коефицијенти варијације су изузетно ниски, што указује да су анализирани серије биле хомогене и да су све вриједности биле приближно једнаке.

Промјена рН у симулираним условима производње киселокоагулишућег сира, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml, приказана је у графикону 5.3.1.15.



**Графикон 5.3.1.15. Промјена рН у симулираним условима производње киселокоагулишућег сира, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml**

Промјена рН у ВНИ бујону као медијуму, током раста ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml, приказана је у табели 5.3.1.14.

**Табела 5.3.1.14. Промјена рН у ВНИ бујону као медијуму, током раста ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml**

Фаза производње	n	$\bar{x}$	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
Медијум на 32-33°C	5	7,09 <sup>ab</sup>	0,04	0,0169	0,53	7,15	7,05
Хлађење на 27°C 30 минута	5	7,08 <sup>cd</sup>	0,02	0,0107	0,34	7,11	7,05
Ферментација 12 часова на 22°C	5	7,06 <sup>ef</sup>	0,03	0,0138	0,44	7,10	7,02
Ферментација 24 часа на 22°C	5	7,03 <sup>gA</sup>	0,03	0,0154	0,49	7,08	7,00
Ферментација 36 часова на 22°C	5	6,97 <sup>h</sup>	0,05	0,0222	0,71	7,03	6,90
Ферментација 48 часова на 22°C	5	6,88 <sup>aseA</sup>	0,10	0,0435	1,41	7,00	6,80
Обрада груша 30 минута на 35°C	5	6,78 <sup>bd fgh</sup>	0,13	0,0586	1,93	6,99	6,65

Статистичка значајност приказана је истим словима: a, b, c, d, e, f, g, h, -  $p < 0,01$ ; A,  $p < 0,05$

При почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml, установљене су значајне разлике ( $p < 0,01$ ) у рН вриједности. Значајне разлике установљене су између медијума на 32-33°C, хлађења на 27°C 30 минута, ферментације 12 часова на 22°C, ферментације 24 часа на 22°C и ферментације 36 часова на 22°C у односу на ферментацију 48 часова на 22°C и обраду груша 30 минута на 35°C. Између ферментације 24 часа на 22°C и ферментације 48 часова на 22°C установљена је значајна разлика ( $p < 0,05$ ).

Промјена рН у млијеку као медијуму, током раста ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml, приказана је у табели 5.3.1.15.

**Табела 5.3.1.15. Промјена рН у млијеку као медијуму, током раста ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml**

Фаза производње	n	$\bar{x}$	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
Медијум на 32-33°C	5	6,24	0,04	0,0166	0,59	6,29	6,20
Хлађење на 27°C 30 минута	5	6,23	0,04	0,0159	0,57	6,27	6,20
Ферментација 12 часова на 22°C	5	6,21	0,04	0,0171	0,62	6,28	6,19
Ферментација 24 часа на 22°C	5	6,19	0,02	0,0089	0,32	6,22	6,17
Ферментација 36 часова на 22°C	5	6,15	0,04	0,0172	0,63	6,20	6,10
Ферментација 48 часова на 22°C	5	6,13	0,04	0,0181	0,66	6,17	6,07
Обрада груша 30 минута на 35°C	5	6,10	0,03	0,0129	0,47	6,13	6,05

При почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml, нису установљене значајне разлике ( $p > 0,05$ ) у рН вриједности.

Промјена рН у млијеку+БМК као медијуму, током раста ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml, приказана је у табели 5.3.1.16.

**Табела 5.3.1.16. Промјена рН у млијеку+БМК као медијуму, током раста ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml**

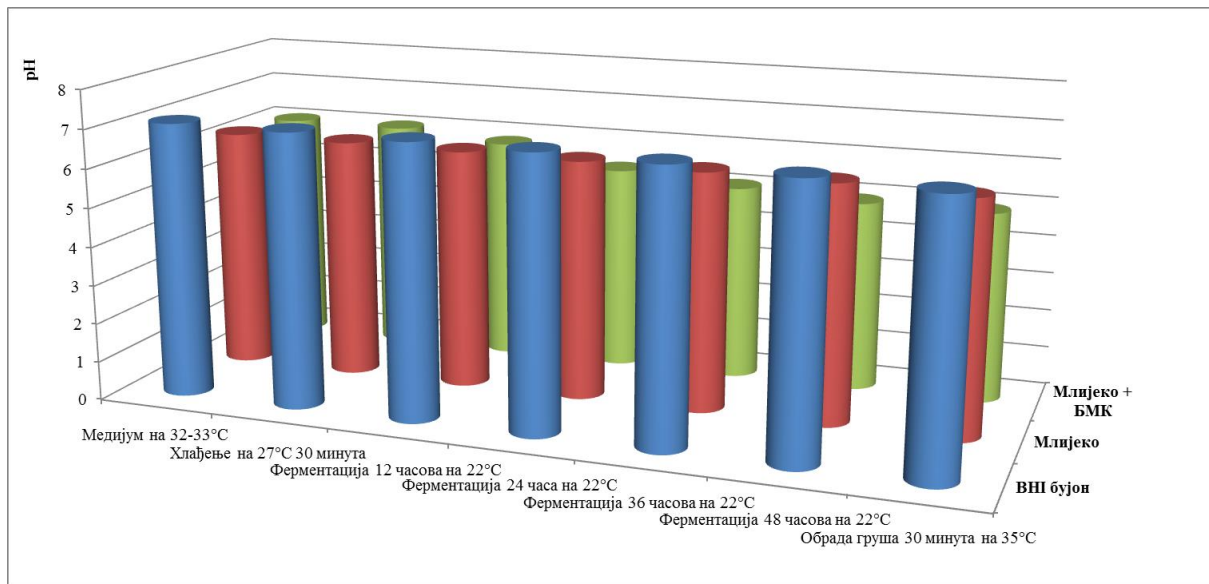
Фаза производње	n	$\bar{x}$	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
Медијум на 32-33°C	5	6,06 <sup>absde</sup>	0,12	0,0526	1,94	6,27	6,00
Хлађење на 27°C 30 минута	5	6,05 <sup>fghij</sup>	0,10	0,0464	1,72	6,23	5,98
Ферментација 12 часова на 22°C	5	5,82 <sup>afklmn</sup>	0,12	0,0545	2,09	5,98	5,65
Ферментација 24 часа на 22°C	5	5,32 <sup>bgkopr</sup>	0,06	0,0278	1,17	5,38	5,24
Ферментација 36 часова на 22°C	5	5,08 <sup>chlosA</sup>	0,03	0,0116	0,51	5,11	5,04
Ферментација 48 часова на 22°C	5	4,94 <sup>dimps</sup>	0,05	0,0238	1,08	4,98	4,5
Обрада груша 30 минута на 35°C	5	4,93 <sup>ejnra</sup>	0,06	0,0267	1,21	4,97	4,83

Статистичка значајност приказана је истим словима: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, r, s, -  $p < 0,01$ ; A,  $p < 0,05$

При почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml, установљене су значајне разлике ( $p < 0,01$ ) у рН вриједности између свих фаза производње. Значајне разлике установљене су између ферментације 36 часова на 22°C и обраде груша 30 минута на 35°C ( $p < 0,05$ ). Нису установљене значајне разлике ( $p > 0,05$ ) између медијума на 32-33°C и хлађења на 27°C 30 минута, као и између ферментације 36 часова на 22°C и ферментације 48 часова на 22°C, и између ферментације 48 часова на 22°C и обраде груша 30 минута на 35°C.

Промјена рН у симулираним условима производње киселокоагулишућег сира, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml, приказана је у графикону 5.3.1.16.





**Графикон 5.3.1.16. Промјена рН у симулираним условима производње киселокоагулишућег сира, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml**

### 5.3.2. Резултати испитивања утицаја фактора средине и услова производње на динамику развоја популације коагулаза позитивних стафилокока у сиришнокоагулишућем сиру

У експерименталном протоколу производње сиришнокоагулишућих сирева, ентеротоксogene коагулаза позитивне стафилоке додате су у медијуме у почетном броју  $10^1$ CFU/ml и  $10^2$ CFU/ml.

Просјечан раст ентеротоксogenicих коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње сиришнокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml и  $10^2$ CFU/ml, са дескриптивним статистичким параметрима, приказан је у табели 5.3.2.1.

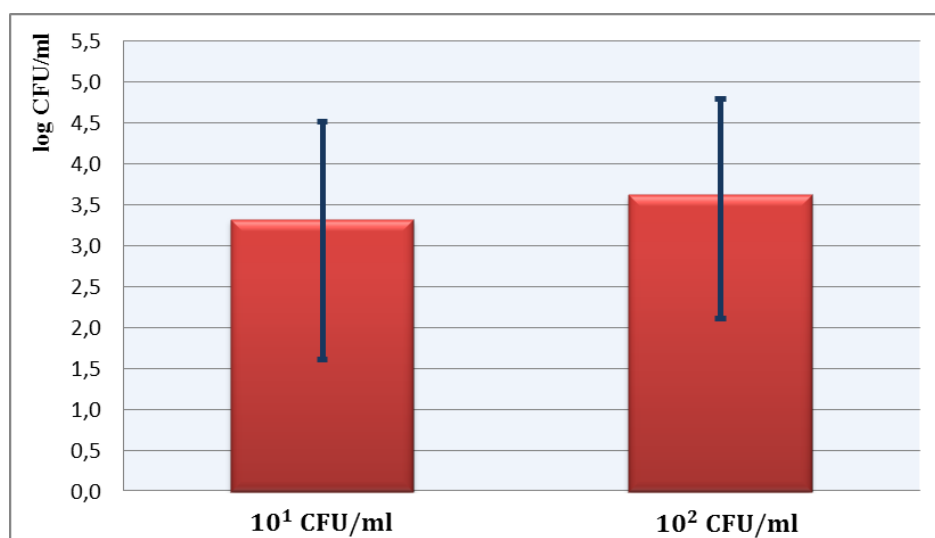
**Табела 5.3.2.1. Просјечан раст ентеротоксogenicих коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње сиришнокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml и  $10^2$ CFU/ml, са дескриптивним статистичким параметрима**

Почетни број стафилокока	n	$\bar{x}$	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
$10^1$ CFU/ml	80	3,33 <sup>a</sup>	1,18	0,1361	35,40	5,50	1,38
$10^2$ CFU/ml	80	3,60 <sup>a</sup>	1,16	0,1300	32,03	5,90	2,00

Статистичка значајност приказана је истим словима: a, b, c -  $p < 0,01$

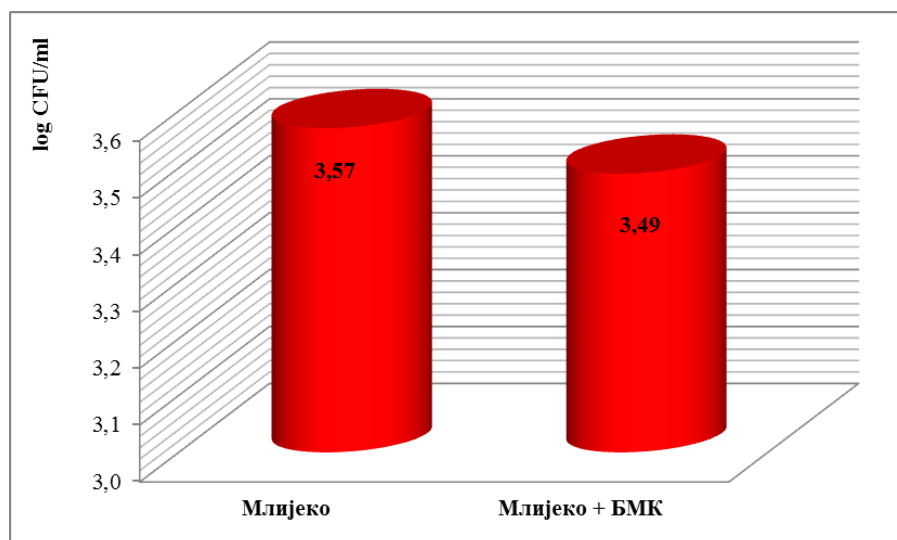
Установљено је да је статистички значајно већи раст при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml ( $p < 0,01$ ).

Просјечан раст ентеротоксogenicих коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње сиришнокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml и  $10^2$ CFU/ml приказан је у графикону 5.3.2.1.



**Графикон 5.3.2.1. Просјечан раст ентеротоксogenicих коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње сиришнокоагулишућих сирева**

Значајност разлика између кориштених медијума у симулираним условима производње сиришнокоагулишућих сирева, у односу на раст стафилокока, приказана је у графикону 5.3.2.2.



**Графикон 5.3.2.2. Значајност разлика између кориштених медијума у симулираним условима производње сиришнокоагулишућих сирева, у односу на раст стафилокока**

Анализом утицаја медијума (млијеко, млијеко+БМК) (80 узорака) на раст стафилокока, установљено је да не постоје значајне разлике ( $p > 0,05$ ) између ових медијума.

У табели 5.3.2.2. приказани су статистички параметри раста стафилокока анализираних фаза производње сиришнокоагулишућих сирева.

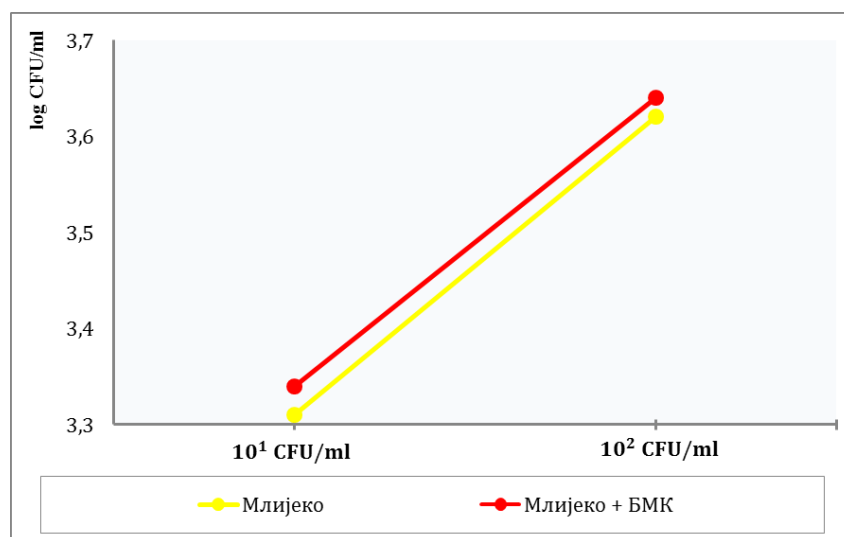
**Табела 5.3.2.2. Статистички параметри раста стафилокока анализираних фаза производње сиришнокоагулишућих сирева**

Фаза производње	n	$\bar{x}$	SD
Млијеко на 30°C	20	1,88 <sup>abcdefg</sup>	0,32
Коагулација 60 минута на 30°C	20	2,29 <sup>ahijkl</sup>	0,20
Обрада груша 30 минута на 30°C	20	2,41 <sup>bmnoqr</sup>	0,20
Цијеђење 12 часова на 22°C	20	3,38 <sup>chmstwq</sup>	0,25
Пресовање 12 часова на 22°C	20	3,76 <sup>dinsyx1</sup>	0,22
Сољење 12 часова на 22°C	20	4,19 <sup>ejoty23</sup>	0,28
Сир из саламуре стар 12 часова на 22°C	20	4,52 <sup>fkpwx24</sup>	0,22
Сир из саламуре стар 36 часова на 22°C	20	5,40 <sup>glrq134</sup>	0,30

Статистичка значајност приказана је истим словима: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, r, s, t, u, s, x, z, y, q, w, 1, 2, 3, 4 -  $p < 0,01$

Између свих фаза производње установљене су значајне разлике ( $p < 0,01$ ) у расту стафилокока, осим између коагулације 60 минута на 30°C и обраде груша 30 минута на 30°C ( $p > 0,05$ ), ( $n = 20$ ) (табела 5.3.2.2.).

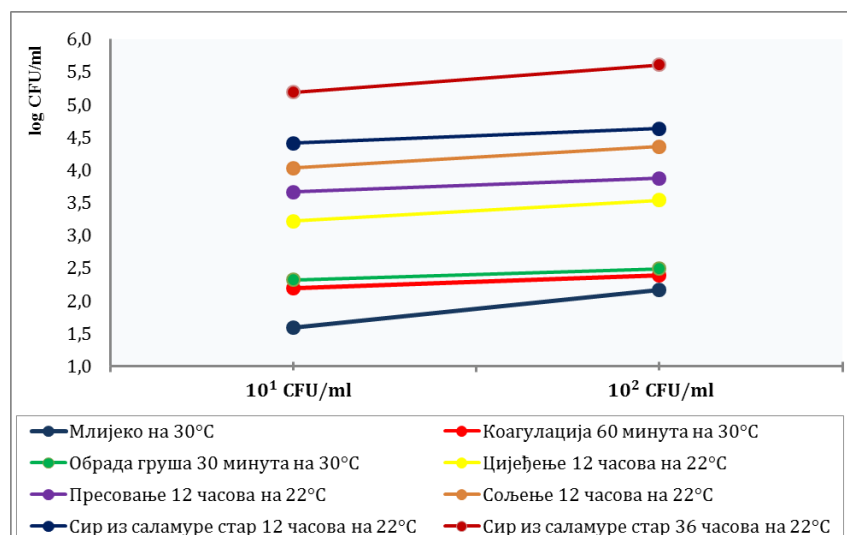
Утицај медијума на раст стафилокока, у зависности од почетног броја, приказан је у графикану 5.3.2.3.



Графикон 5.3.2.3. Утицај медијума на раст стафилокока у зависности од почетног броја

Нису установљене значајне разлике у расту стафилокока код поређења међусобног утицаја почетног броја стафилокока и медијума ( $p > 0,05$ ).

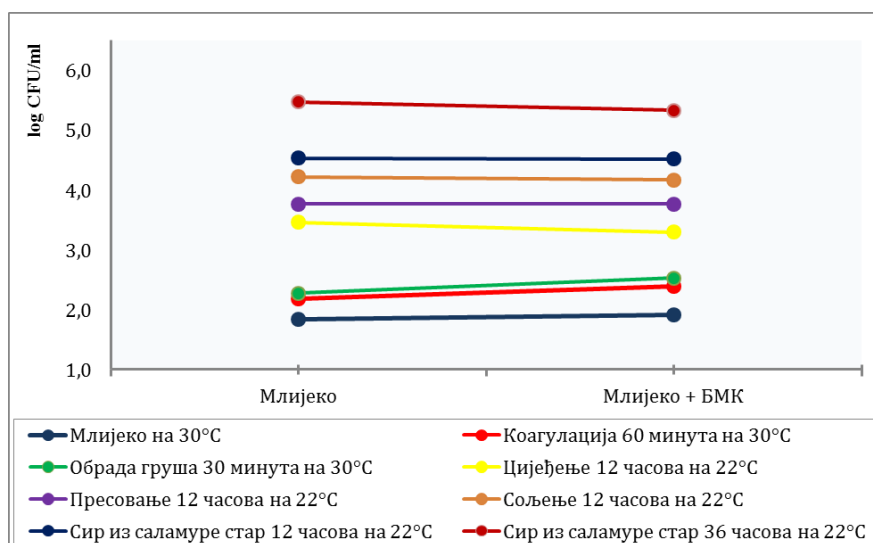
Утицај фаза производње на раст стафилокока, у зависности од почетног броја, приказан је у графикану 5.3.2.4.



Графикон 5.3.2.4. Утицај фаза производње на раст стафилокока у зависности од почетног броја

Раст стафилокока значајно је зависио од фаза производње у односу на почетни број стафилокока ( $p < 0,01$ ) (графикон 5.3.2.4.).

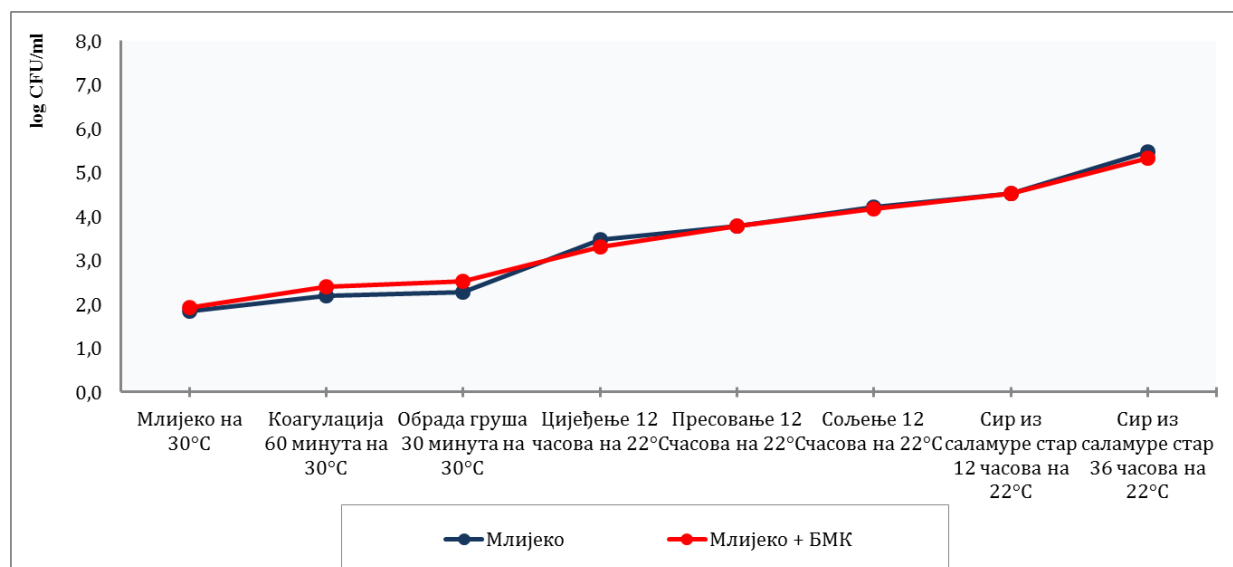
Утицај фаза производње на раст стафилокока, у зависности од медијума, приказан је у графикаону 5.3.2.5.



**Графикон 5.3.2.5. Утицај фаза производње на раст стафилокока у зависности од медијума**

Утврђено је да не постоји значајна разлика ( $p > 0,05$ ) у расту стафилокока кроз анализиране фазе производње у односу на медијуме (графикон 5.3.2.5.).

Раст стафилокока у медијумима, у зависности од фаза производње, приказан је у графикаону 5.3.2.6.



**Графикон 5.3.2.6. Раст стафилокока у медијумима у зависности од фаза производње**

Статистичком анализом нису установљене статистички значајне разлике између медијума ( $p > 0,05$ ).

Раст ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње сиришнокоагулишућих сирева, у млијеку као медијуму, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml, приказан је у табели 5.3.2.3.

**Табела 5.3.2.3. Раст ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње сиришнокоагулишућих сирева, у млијеку као медијуму, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml**

Фаза производње	n	$\bar{x}$	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
Млијеко на 30°C	5	1,53 <sup>abcdefg</sup>	0,15	0,0668	9,37	1,76	1,38
Коагулација 60 минута на 30°C	5	2,06 <sup>ahijkl</sup>	0,07	0,0319	3,45	2,18	2,00
Обрада груша 30 минута на 30°C	5	2,17 <sup>bmnopr</sup>	0,10	0,0446	4,60	2,33	2,09
Цијеђење 12 часова на 22°C	5	3,26 <sup>chmstz</sup>	0,24	0,1065	7,31	3,54	3,00
Пресовање 12 часова на 22°C	5	3,66 <sup>dinyx</sup>	0,27	0,1011	7,41	3,88	3,21
Сољење 12 часова на 22°C	5	4,03 <sup>ejosq</sup>	0,33	0,1465	8,10	4,21	3,47
Сир из саламуре стар 12 часова на 22°C	5	4,48 <sup>fkptyw</sup>	0,26	0,1150	5,73	4,78	4,14
Сир из саламуре стар 36 часова на 22°C	5	5,28 <sup>glrzyqw</sup>	0,17	0,0768	3,25	5,50	5,14

Статистичка значајност приказана је истим словима: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, r, s, t, u, s, x, z, y, q, w, -  $p < 0,01$

При почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml, установљене су значајне разлике ( $p < 0,01$ ) између свих фаза производње. Значајне разлике нису установљене између коагулације 60 минута на 30°C и обраде груша 30 минута на 30°C, цијеђења 12 часова на 22°C и пресовања 12 часова на 22°C, пресовања 12 часова на 22°C и сољења 12 часова на 22°C и сољења 12 часова на 22°C и сира из саламуре старог 12 часова на 22°C.

Раст ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње сиришнокоагулишућих сирева, у млијеку+БМК као медијуму, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml, приказан је у табели 5.3.2.4.

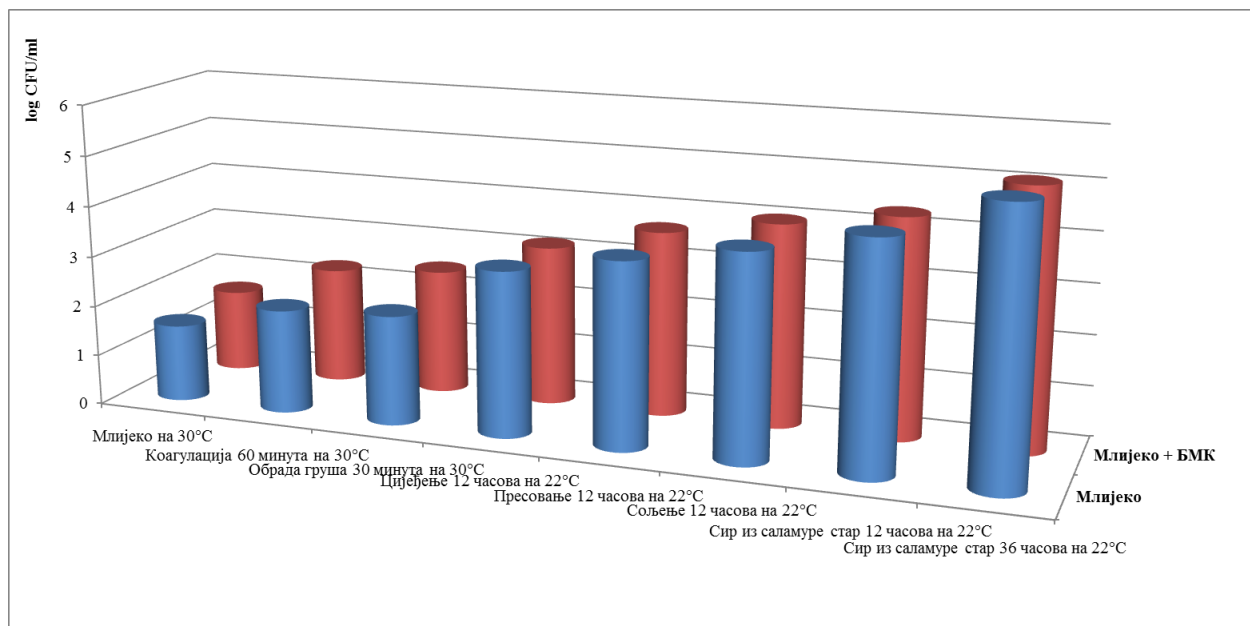
**Табела 5.3.2.4. Раст ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње сиривнокоагулишућих сирева, у млијеку+БМК као медијуму, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml**

Фаза производње	n	$\bar{x}$	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
Млијеко на 30°C	5	1,64 <sup>abcdefg</sup>	0,13	0,0601	8,21	1,76	1,47
Коагулација 60 минута на 30°C	5	2,31 <sup>ahijkl</sup>	0,14	0,0611	5,92	2,45	2,13
Обрада груша 30 минута на 30°C	5	2,48 <sup>bmnoqr</sup>	0,08	0,0360	3,24	2,56	2,35
Цијеђење 12 часова на 22°C	5	3,17 <sup>chmstz</sup>	0,17	0,0753	5,29	3,40	3,04
Пресовање 12 часова на 22°C	5	3,67 <sup>dinyx</sup>	0,19	0,0867	5,28	3,89	3,42
Сољење 12 часова на 22°C	5	4,02 <sup>ejosq</sup>	0,31	0,1422	7,91	4,31	3,58
Сир из саламуре стар 12 часова на 22°C	5	4,34 <sup>fkptyw</sup>	0,26	0,1160	5,98	4,58	3,99
Сир из саламуре стар 36 часова на 22°C	5	5,10 <sup>glrzyqw</sup>	0,29	0,1278	5,60	5,34	4,63

Статистичка значајност приказана је истим словима: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, r, s, t, u, s, x, z, y, q, w, -  $p < 0,01$

При почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml, установљене су значајне разлике ( $p < 0,01$ ) између свих фаза производње. Значајне разлике нису установљене између коагулације 60 минута на 30°C и обраде груша 30 минута на 30°C, цијеђења 12 часова на 22°C и пресовања 12 часова на 22°C, пресовања 12 часова на 22°C и сољења 12 часова на 22°C и сољења 12 часова на 22°C и сира из саламуре старог 12 часова на 22°C.

Раст стафилокока при почетном броју  $10^1$ CFU/ml, у симулираним условима производње сиривнокоагулишућег сира, приказан је у графикону 5.3.2.7.



**Графикон 5.3.2.7. Раст стафилокока при почетном броју  $10^1$ CFU/ml, у симулираним условима производње сиршнокоагулишућег сира**

Раст ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње сиршнокоагулишућих сирева, у млијеку као медијуму, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml, приказан је у табели 5.3.2.5.

**Табела 5.3.2.5. Раст ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње сиршнокоагулишућих сирева, у млијеку као медијуму, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml**

Фаза производње	n	$\bar{x}$	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
Млијеко на 30°C	5	2,14 <sup>abcde</sup>	0,09	0,0409	4,27	2,24	2,00
Коагулација 60 минута на 30°C	5	2,29 <sup>ghijk</sup>	0,21	0,0931	9,09	2,62	2,06
Обрада груша 30 минута на 30°C	5	2,40 <sup>lmnop</sup>	0,15	0,0689	6,24	2,66	2,27
Цијеђење 12 часова на 22°C	5	3,67 <sup>aglrst</sup>	0,12	0,0555	3,38	3,86	3,56
Пресовање 12 часова на 22°C	5	3,86 <sup>bhmzyx</sup>	0,11	0,0489	2,83	3,98	3,71
Сољење 12 часова на 22°C	5	4,41 <sup>cinrztq</sup>	0,11	0,0478	2,42	4,56	4,27
Сир из саламуре стар 12 часова на 22°C	5	4,57 <sup>djosyw</sup>	0,06	0,0269	1,32	4,67	4,52
Сир из саламуре стар 36 часова на 22°C	5	5,65 <sup>ekptxqw</sup>	0,22	0,0979	3,88	5,90	5,35

Статистичка значајност приказана је истим словима: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, r, s, t, u, s, x, z, y, q, w, -  $p < 0,01$



При почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml, установљене су значајне разлике ( $p < 0,01$ ) између свих фаза производње. Значајне разлике нису установљене између млијека на  $30^\circ\text{C}$  са коагулацијом 60 минута на  $30^\circ\text{C}$  и обрадом груша 30 минута на  $30^\circ\text{C}$ , затим цијеђења 12 часова на  $22^\circ\text{C}$  и пресовања 12 часова на  $22^\circ\text{C}$ , као и између сољења 12 часова на  $22^\circ\text{C}$  и сира из саламуре старог 12 часова на  $22^\circ\text{C}$  ( $p > 0,05$ ).

Раст ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње сиришнокоагулишућих сирева, у млијеку+БМК као медијуму, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml, приказан је у табели 5.3.2.6.

**Табела 5.3.2.6. Раст ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње сиришнокоагулишућих сирева, у млијеку+БМК као медијуму, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml**

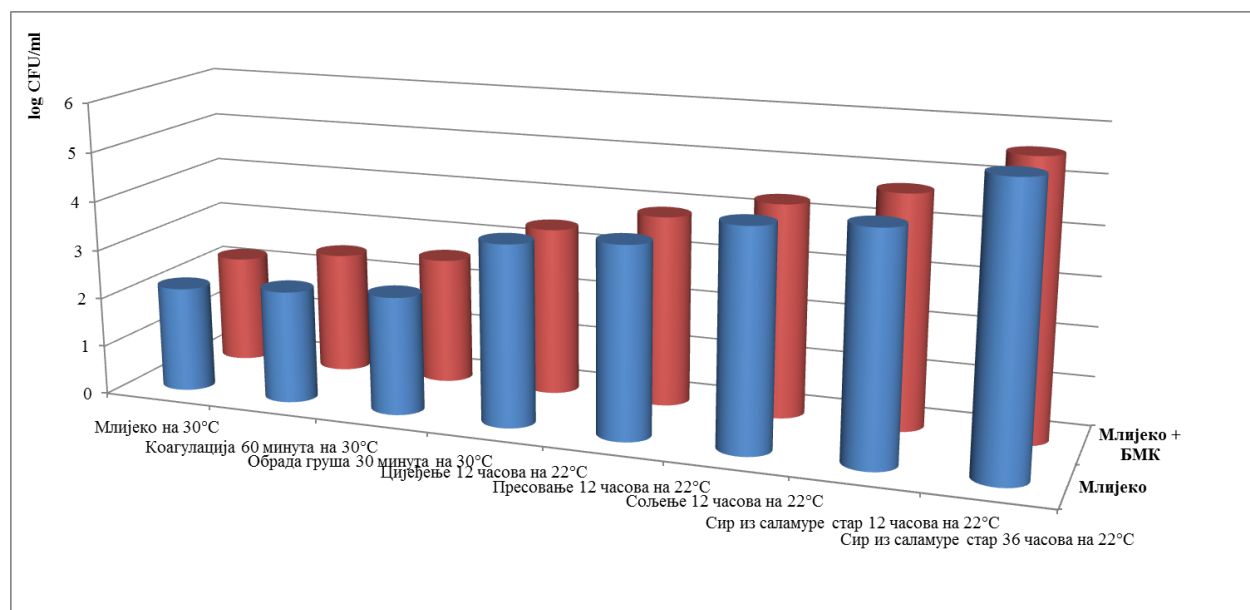
Фаза производње	n	$\bar{x}$	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
Млијеко на $30^\circ\text{C}$	5	2,20 <sup>absde</sup>	0,08	0,0370	3,76	2,32	2,09
Коагулација 60 минута на $30^\circ\text{C}$	5	2,48 <sup>fg hij</sup>	0,15	0,0655	5,91	2,67	2,30
Обрада груша 30 минута на $30^\circ\text{C}$	5	2,58 <sup>klmno</sup>	0,17	0,0743	6,45	2,77	2,38
Цијеђење 12 часова на $22^\circ\text{C}$	5	3,42 <sup>afkprs</sup>	0,16	0,0712	4,66	3,67	3,24
Пресовање 12 часова на $22^\circ\text{C}$	5	3,87 <sup>bgltu</sup>	0,21	0,0951	5,49	4,7	3,60
Сољење 12 часова на $22^\circ\text{C}$	5	4,31 <sup>chmpz</sup>	0,12	0,0555	2,88	4,45	4,11
Сир из саламуре стар 12 часова на $22^\circ\text{C}$	5	4,70 <sup>dinrtq</sup>	0,09	0,0396	1,89	4,81	4,59
Сир из саламуре стар 36 часова на $22^\circ\text{C}$	5	5,57 <sup>ejosuzq</sup>	0,18	0,0805	3,23	5,74	5,28

Статистичка значајност приказана је истим словима: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, r, s, t, u, s, x, z, y, q, w, -  $p < 0,01$

При почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml, установљене су значајне разлике ( $p < 0,01$ ) између свих фаза производње. Значајне разлике нису установљене између млијека на  $30^\circ\text{C}$  са коагулацијом 60 минута на  $30^\circ\text{C}$  и обрадом груша 30 минута на  $30^\circ\text{C}$ , затим цијеђења 12 часова на  $22^\circ\text{C}$  и пресовања 12 часова на  $22^\circ\text{C}$ , као и између сољења 12 часова на  $22^\circ\text{C}$  и сира из саламуре старог 12 часова на  $22^\circ\text{C}$  ( $p > 0,05$ ).

На основу добијених резултата раста стафилокока, може се установити да међу различитим фазама производње сиришнокоагулишућих сирева нема никаквих разлика у односу на медијум (млијеко или млијеко+БМК).

Раст стафилокока при почетном броју  $10^2$ CFU/ml, у симулираним условима производње сиришнокоагулишућег сира, приказан је у графикону 5.3.2.8.



**Графикон 5.3.2.8. Раст стафилокока при почетном броју  $10^2$ CFU/ml, у симулираним условима производње сиршнокоагулишућег сира**

У односу на киселокоагулишуће сиреве, гдје механизам коагулације подразумијева интензиван развој киселости, код сиршнокоагулишућих сирева, динамика промјене рН вриједности је успорена.

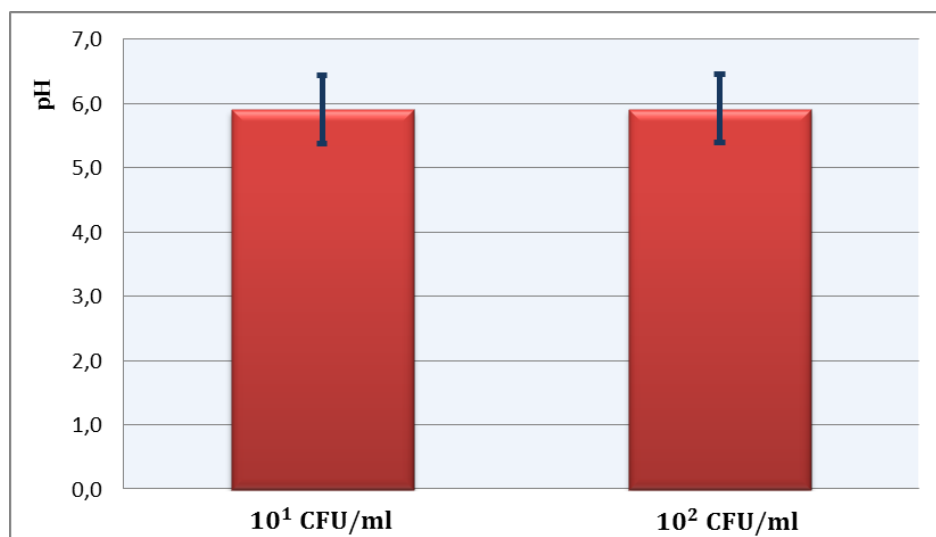
Просјечан рН медијума у симулираним условима производње сиршнокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml и  $10^2$ CFU/ml, са дескриптивним статистичким параметрима, приказан је у табели 5.3.2.7.

**Табела 5.3.2.7. Просјечан рН медијума у симулираним условима производње сиршнокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^1$  CFU/ml и  $10^2$  CFU/ml, са дескриптивним статистичким параметрима**

Почетни број стафилокока	n	$\bar{x}$	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
$10^1$ CFU/ml	80	5,91	0,53	0,0589	8,91	6,76	6,28
$10^2$ CFU/ml	80	5,92	0,53	0,0590	8,92	6,75	6,29

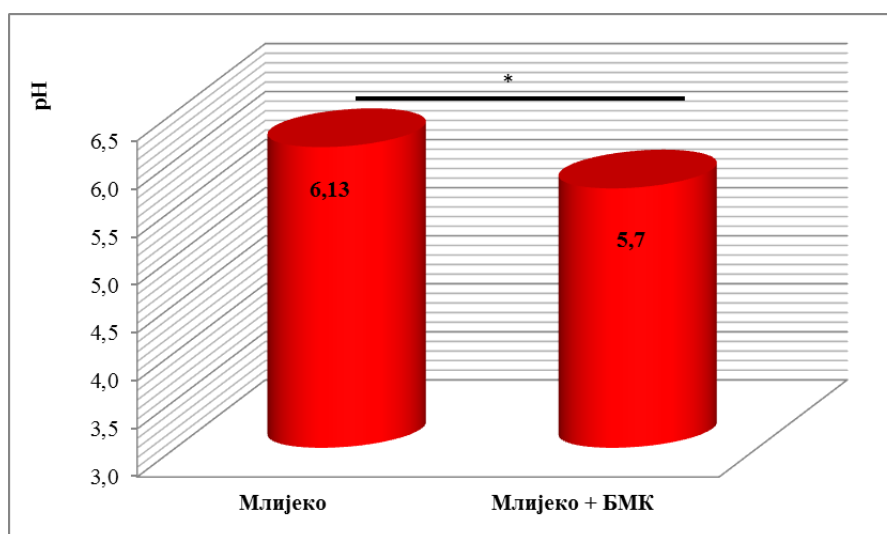
Нису установљене статистички значајне разлике ( $p > 0,05$ ) рН вриједности. Код оба почетна броја стафилокока установљено је мало варирање рН.

Просјечан рН медијума у симулираним условима производње сиршнокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml и  $10^2$ CFU/ml, приказан је у графикону 5.3.2.9.



**Графикон 5.3.2.9.** Просјечне вриједности рН медијума у симулираним условима производње сиришнокоагулишућих сирева

Значајност разлика између кориштених медијума у односу на рН, приказана је у графикону 5.3.2.10.



**Графикон 5.3.2.10.** Значајност разлика између кориштених медијума у односу на рН

Утврђено је да постоје значајне разлике ( $p < 0,05$ ) у рН вриједности између оба медијума.

У табели 5.3.2.8. приказани су статистички параметри рН вриједности анализираних кроз фазе производње сиришнокоагулишућих сирева.

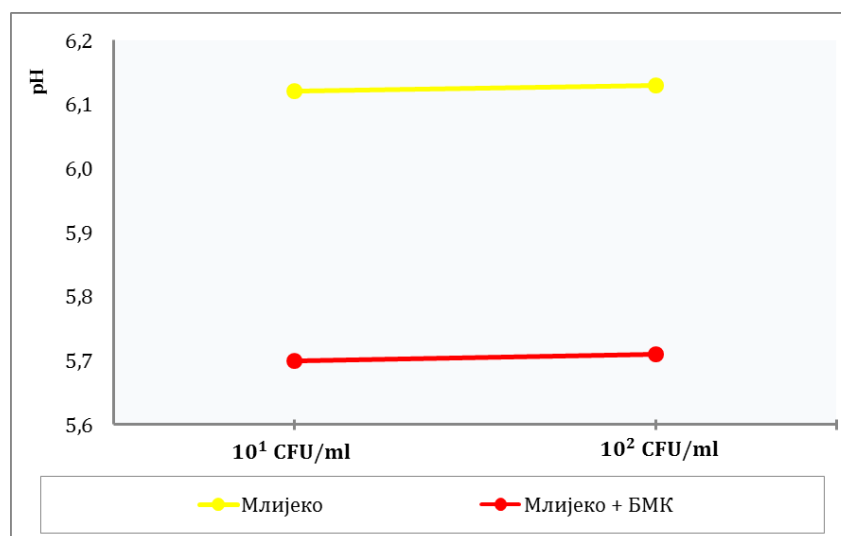
Табела 5.3.2.8. Статистички параметри рН вриједности анализираних кроз фазе производње сиришнокоагулишућих сирева

Фаза производње	n	$\bar{x}$	SD
Млијеко на 30°C	20	6,68 <sup>abcdefg</sup>	0,05
Коагулација 60 минута на 30°C	20	6,30 <sup>ahijkl</sup>	0,07
Обрада груша 30 минута на 30°C	20	6,20 <sup>bmnop</sup>	0,09
Цијеђење 12 часова на 22°C	20	6,05 <sup>chrstz</sup>	0,21
Пресовање 12 часова на 22°C	20	5,57 <sup>dimr</sup>	0,44
Сољење 12 часова на 22°C	20	5,43 <sup>ejns</sup>	0,41
Сир из саламура стар 12 часова на 22°C	20	5,54 <sup>fkot</sup>	0,43
Сир из саламура стар 36 часова на 22°C	20	5,54 <sup>glpz</sup>	0,40

Статистичка значајност приказана је истим словима: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, r, s, t, z, -  $p < 0,01$

Између свих фаза производње установљене су значајне разлике ( $p < 0,01$ ), осим између коагулације 60 минута на 30°C и обраде груша 30 минута на 30°C ( $p > 0,05$ ), (N=20) (Табела 5.3.2.8.).

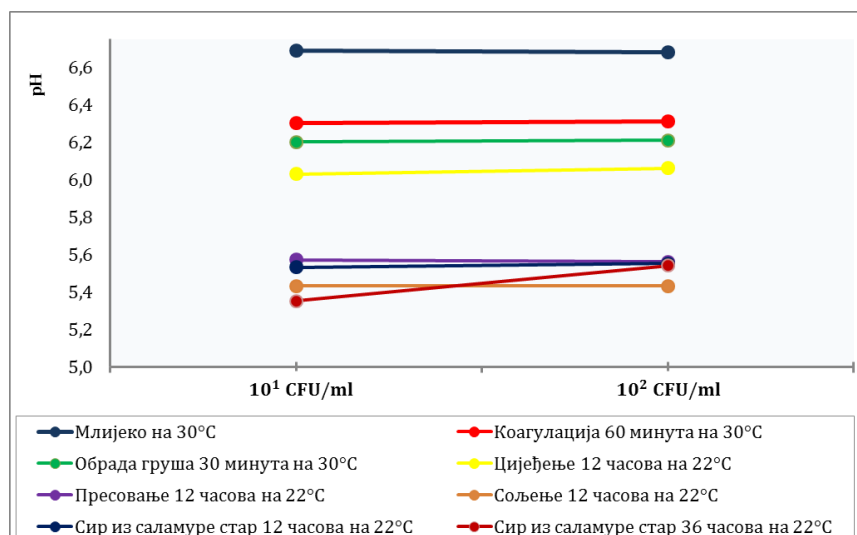
Утицај медијума на рН, у зависности од почетног броја стафилокока, приказан је у графикону 5.3.2.11.



Графикон 5.3.2.11. Утицај медијума на рН у зависности од почетног броја стафилокока

Нису установљене значајне разлике ( $p > 0,05$ ) у рН вриједности, што указује да различит почетни број стафилокока нема статистички значајан утицај на рН у различитим медијумима (графикон 5.3.2.11.).

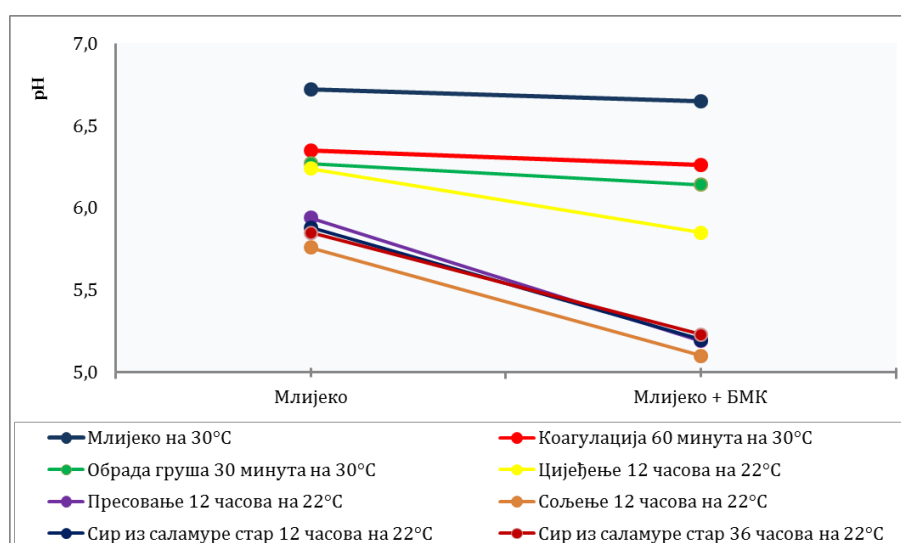
Утицај фаза производње на рН, у зависности од почетног броја стафилокока, приказан је у графикону 5.3.2.12.



**Графикон 5.3.2.12. Утицај фаза производње на рН у зависности од почетног броја стафилокока**

Вриједност рН значајно је зависила од фаза производње ( $p < 0,01$ ).

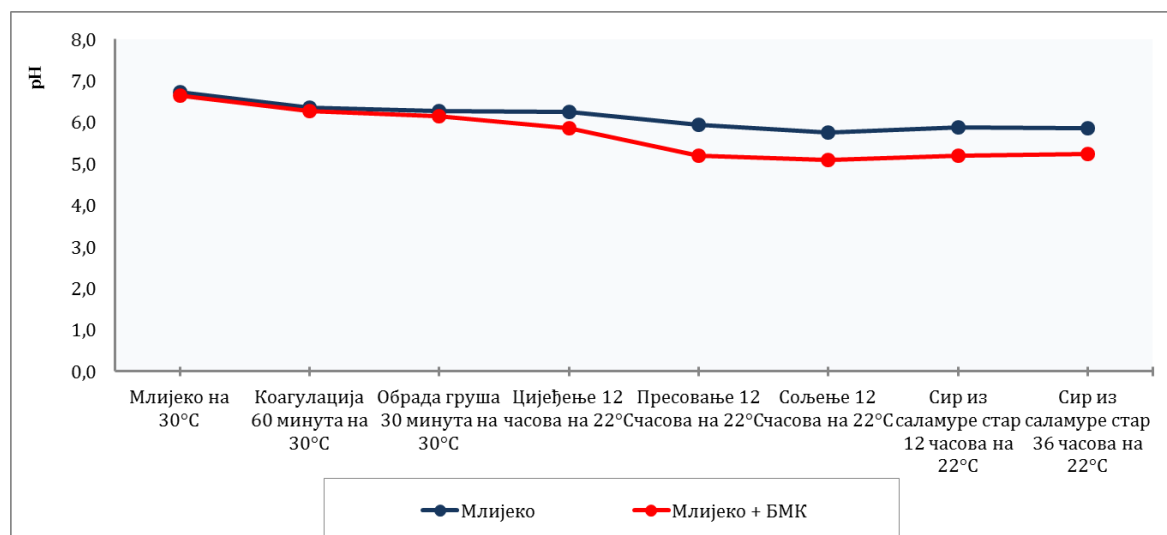
Утицај фаза производње на рН, у зависности од медијума, приказан је у графикону 5.3.2.13.



**Графикон 5.3.2.13. Утицај фаза производње на рН у зависности од медијума**

Установљене су статистички значајне разлике ( $p < 0,01$ ), што говори да постоји директна зависност рН од медијума.

Вриједности рН у испитиваним медијумима, у зависности од фаза производње, приказане су у графикону 5.3.2.14.



**Графикон 5.3.2.14. Вриједности рН у испитиваним медијумима у зависности од фаза производње**

Нису установљене статистички значајне разлике у промјени рН у медијумима, кроз фазе производње ( $p > 0,05$ ).

Промјена рН у млијеку као медијуму, током раста ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње сиришнокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^1$  CFU/ml, приказана је у табели 5.3.2.9.

**Табела 5.3.2.9. Промјена рН у млијеку као медијуму, током раста ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње сиришнокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^1$  CFU/ml**

Фаза производње	n	$\bar{x}$	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
Млијеко на 30°C	5	6,72 <sup>ABabcd</sup>	0,04	0,0163	0,54	6,76	6,68
Коагулација 60 минута на 30°C	5	6,34 <sup>eCf</sup>	0,04	0,0194	0,68	6,38	6,28
Обрада груша 30 минута на 30°C	5	6,26 <sup>AD</sup>	0,07	0,0296	1,06	6,37	6,19
Цијеђење 12 часова на 22°C	5	6,23 <sup>BE</sup>	0,04	0,0183	0,66	6,28	6,18
Пресовање 12 часова на 22°C	5	5,95 <sup>a</sup>	0,30	0,01381	5,91	6,26	5,54
Сољење 12 часова на 22°C	5	5,77 <sup>beDE</sup>	0,30	0,1525	5,91	6,15	5,37
Сир из саламура стар 12 часова на 22°C	5	5,87 <sup>cC</sup>	0,37	0,1665	6,34	6,28	5,41
Сир из саламура стар 36 часова на 22°C	5	5,82 <sup>df</sup>	0,37	0,1639	6,27	6,27	5,36

Статистичка значајност приказана је истим словима: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k -  $p < 0,01$ ; A, B, C, D,  $p < 0,05$

Утврђена је статистички значајна разлика ( $p < 0,05$ ) између почетне фазе (млијеко на  $30^{\circ}\text{C}$ ) и фазе обраде груша, између почетне фазе и цијеђења груша после 12 часова, између коагулације млијека и сира у саламури старог 12 часова. Статистички значајна разлика ( $p < 0,01$ ) утврђена је између почетне фазе (млијеко на  $30^{\circ}\text{C}$ ), фазе пресовања, фазе сољења и зрења сира у саламури.

Посматрајући свих осам фаза производње установљава се да се рН смањује од прве фазе-млијеко на  $30^{\circ}\text{C}$  ( $6,72 \pm 0,04$ ) до последње фазе-сир из саламуре стар 36 часова или 72 часа од почетка производње на  $22^{\circ}\text{C}$  ( $5,82 \pm 0,37$ ).

Промјена рН у млијеку+БМК као медијуму, током раста ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње сиришнокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^1\text{CFU/ml}$ , приказана је у табели 5.3.2.10.

**Табела 5.3.2.10. Промјена рН у млијеку+БМК као медијуму, током раста ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње сиришнокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^1\text{CFU/ml}$**

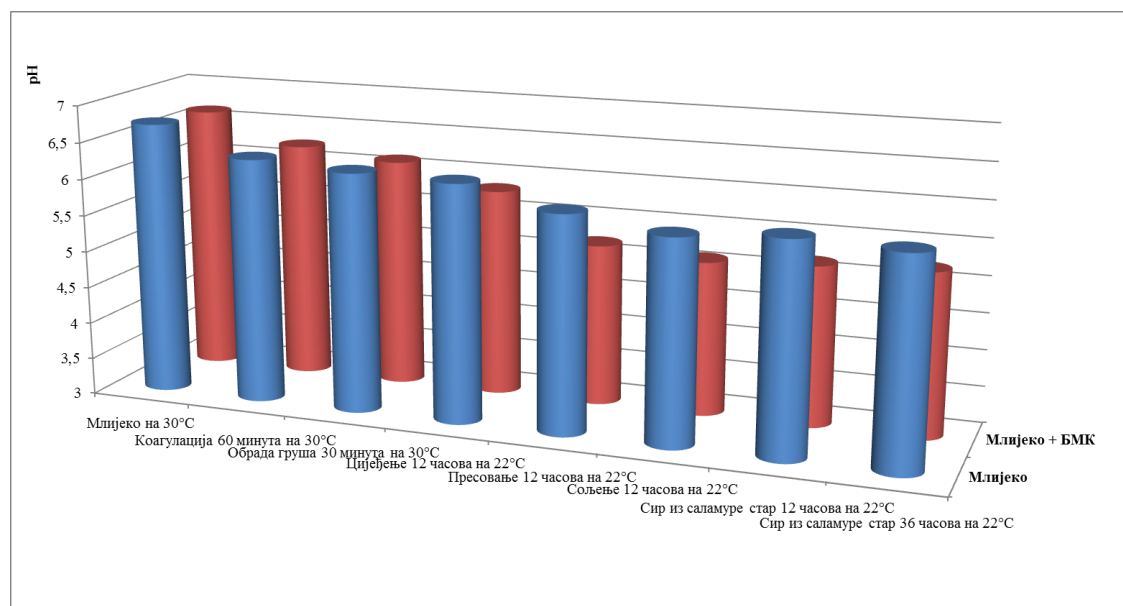
Фаза производње	n	$\bar{x}$	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
Млијеко на $30^{\circ}\text{C}$	5	6,65 <sup>abcdef</sup>	0,03	0,0133	0,45	6,68	6,60
Коагулација 60 минута на $30^{\circ}\text{C}$	5	6,25 <sup>ghij</sup>	0,06	0,0256	0,92	6,31	6,17
Обрада груша 30 минута на $30^{\circ}\text{C}$	5	6,13 <sup>aklmn</sup>	0,07	0,0268	0,98	6,22	6,06
Цијеђење 12 часова на $22^{\circ}\text{C}$	5	5,83 <sup>boprs</sup>	0,09	0,0383	1,47	5,92	5,71
Пресовање 12 часова на $22^{\circ}\text{C}$	5	5,20 <sup>cgko</sup>	0,06	0,0264	1,14	5,25	5,11
Сољење 12 часова на $22^{\circ}\text{C}$	5	5,10 <sup>dhlp</sup>	0,08	0,0363	1,59	5,22	5,00
Сир из саламуре стар 12 часова на $22^{\circ}\text{C}$	5	5,18 <sup>eimr</sup>	0,07	0,0293	1,26	5,24	5,08
Сир из саламуре стар 36 часова на $22^{\circ}\text{C}$	5	5,23 <sup>fjnc</sup>	0,11	0,0505	2,15	5,33	5,06

Статистичка значајност приказана је истим словима: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, r, s -  $p < 0,01$

При почетном броју стафилокока  $10^1\text{CFU/ml}$ , установљене су значајне разлике ( $p < 0,01$ ) између почетне фазе (млијеко на  $30^{\circ}\text{C}$ ) и свих осталих фаза производње.

Посматрајући свих осам фаза производње установљава се да се рН смањује од прве фазе-млијеко на  $30^{\circ}\text{C}$  ( $6,65 \pm 0,03$ ) до последње фазе-сир из саламуре стар 36 часова или 72 часа од почетка производње на  $22^{\circ}\text{C}$  ( $5,23 \pm 0,11$ ).

Промјена рН у медијумима у симулираним условима производње сиришнокоагулишућег сира, при почетном броју стафилокока  $10^1\text{CFU/ml}$ , приказана је у графикону 5.3.2.15.



**Графикон 5.3.2.15.** Промјена рН у медијумима у симулираним условима производње сиршнокоагулишућег сира, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml

Промјена рН у млијеку као медијуму, током раста ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње сиршнокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml, приказана је у табели 5.3.2.11.

**Табела 5.3.2.11.** Промјена рН у млијеку као медијуму, током раста ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње сиршнокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml

Фаза производње	n	$\bar{x}$	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
Млијеко на 30°C	5	6,72 <sup>ABabcd</sup>	0,03	0,0127	0,42	6,75	6,69
Коагулација 60 минута на 30°C	5	6,36 <sup>eC</sup>	0,06	0,0244	0,86	6,43	6,29
Обрада груша 30 минута на 30°C	5	6,27 <sup>Af</sup>	0,06	0,0247	0,88	6,35	6,21
Цијеђење 12 часова на 22°C	5	6,25 <sup>BD</sup>	0,03	0,0136	0,49	6,29	6,21
Пресовање 12 часова на 22°C	5	5,94 <sup>a</sup>	0,30	0,01321	4,97	6,26	5,56
Сољење 12 часова на 22°C	5	5,76 <sup>beD</sup>	0,33	0,1485	5,77	6,12	5,34
Сир из саламуре стар 12 часова на 22°C	5	5,89 <sup>cC</sup>	0,36	0,1608	6,10	6,30	5,45
Сир из саламуре стар 36 часова на 22°C	5	5,86 <sup>d</sup>	0,36	0,1627	6,21	6,24	5,39

Статистичка значајност приказана је истим словима: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k -  $p < 0,01$ ; A, B, C, D,  $p < 0,05$

При почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml, установљене су значајне разлике ( $p < 0,05$ ) у рН вриједности између почетне фазе (млијеко на 30°C) и обраде груша, као и између почетне фазе и цијеђења груша, затим између фазе цијеђења и фазе сољења.



Статистички значајне разлике ( $p < 0,01$ ) установљене су између почетне фазе производње и фазе пресовања, између почетне фазе и фазе сољења, као и између почетне фазе и фазе сољења сира у саламури.

Посматрајући свих осам фаза производње установљава се да се рН смањује од прве фазе-млијеко на 30°C ( $6,72 \pm 0,03$ ) до последње фазе-сир из саламуре стар 36 часова или 72 часа од почетка производње на 22°C, (рН  $5,86 \pm 0,36$ ).

Промјена рН у млијеку+БМК као медијуму, током раста ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње сиришнокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml, приказана је у табели 5.3.2.12.

**Табела 5.3.2.12. Промјена рН у млијеку+БМК као медијуму, током раста ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње сиришнокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml**

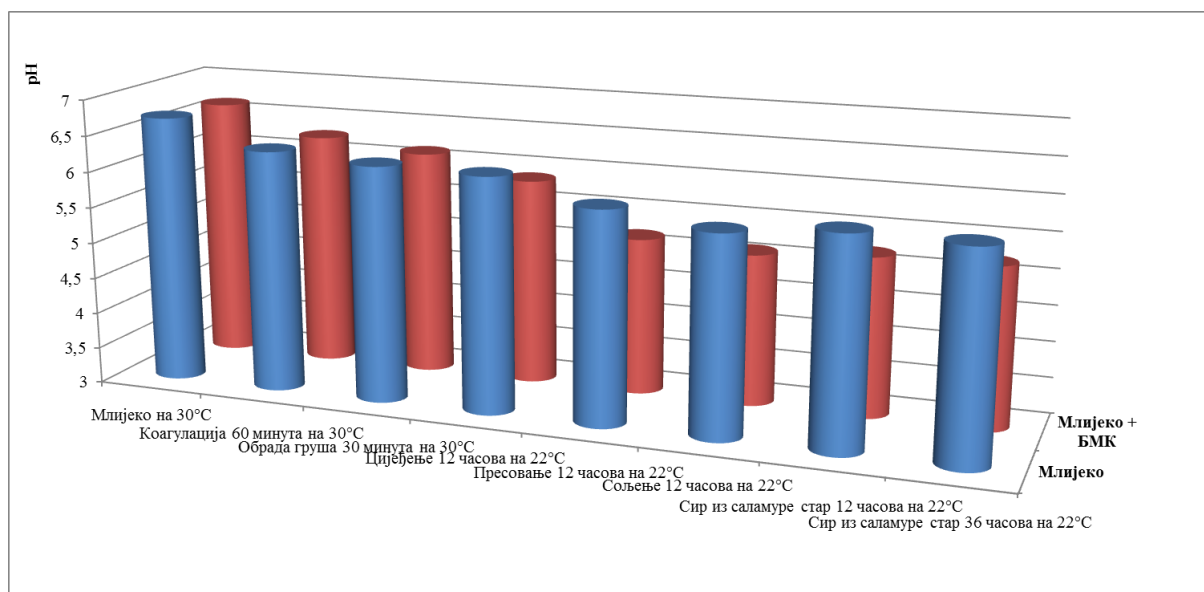
Фаза производње	n	$\bar{x}$	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
Млијеко на 30°C	5	6,65 <sup>abcdef</sup>	0,03	0,0117	0,39	6,67	6,10
Коагулација 60 минута на 30°C	5	6,27 <sup>ghij</sup>	0,07	0,0317	1,13	6,34	6,17
Обрада груша 30 минута на 30°C	5	6,14 <sup>aklmn</sup>	0,07	0,0328	1,19	6,27	6,08
Цијеђење 12 часова на 22°C	5	5,87 <sup>oprs</sup>	0,08	0,0344	1,31	5,93	5,74
Пресовање 12 часова на 22°C	5	5,18 <sup>cgko</sup>	0,05	0,0204	0,88	5,22	5,11
Сољење 12 часова на 22°C	5	5,10 <sup>dhip</sup>	0,06	0,0244	1,07	5,19	5,04
Сир из саламуре стар 12 часова на 22°C	5	5,21 <sup>eimr</sup>	0,07	0,0317	1,36	5,33	5,15
Сир из саламуре стар 36 часова на 22°C	5	5,23 <sup>fjns</sup>	0,11	0,0480	2,05	5,39	5,13

Статистичка значајност приказана је истим словима: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, r, s -  $p < 0,01$

При почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml, установљене су значајне разлике ( $p < 0,01$ ) у рН вриједности између почетне фазе (млијеко на 30°C) и свих осталих фаза производње.

Посматрајући свих осам фаза производње установљава се да се рН смањује од прве фазе-млијеко на 30°C ( $6,65 \pm 0,03$ ) до последње фазе-сир из саламуре стар 36 часова или 72 часа од почетка производње на 22°C ( $5,23 \pm 0,11$ ).

Промјена рН у симулираним условима производње сиришнокоагулишућег сира, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml, приказана је у графикону 5.3.2.16.



**Графикон 5.3.2.16.** Промјена рН у симулираним условима производње сиришнокоагулишућег сира, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml

На основу добијених резултата рН, утврђено је да међу различитим фазама производње сиришнокоагулишућих сирева нема статистички значајне разлике у односу на медијум (млијекo и млијекo+БМК).

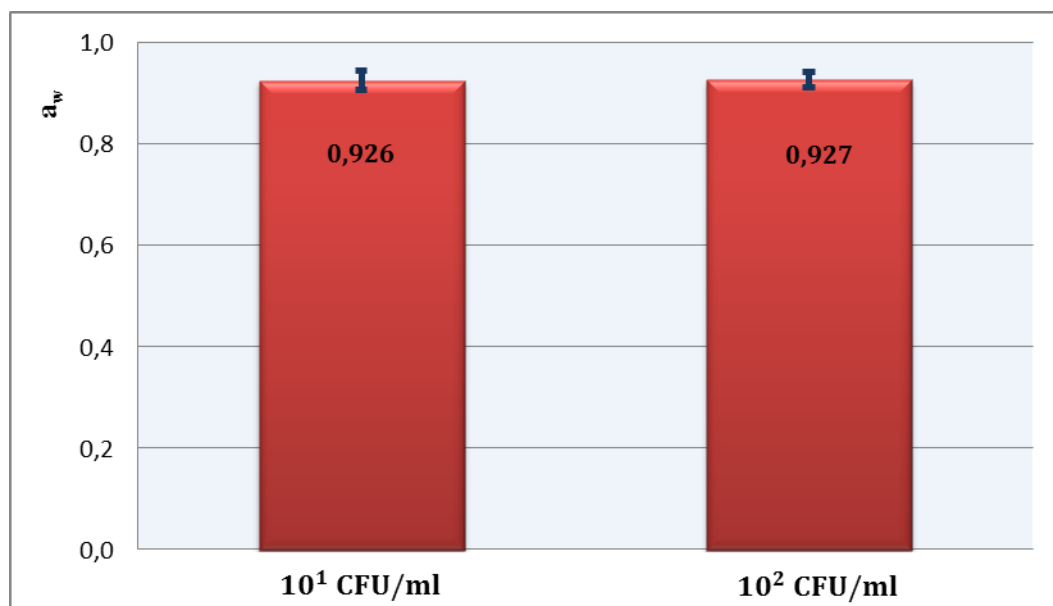
Дескриптивни статистички параметри за  $a_w$  вриједност у сиришнокоагулишућем сиру, у зависности од почетног броја ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока, приказани су у табели 5.3.2.13.

**Табела 5.3.2.13.** Дескриптивни статистички параметри за  $a_w$  вриједност у сиришнокоагулишућем сиру, у зависности од почетног броја ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока

Почетни број стафилокока	n	$\bar{x}$	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
$10^1$ CFU/ml	20	0,926	0,021	0,0047	2,26	0,947	0,874
$10^2$ CFU/ml	20	0,927	0,017	0,0036	1,74	0,946	0,895

Установљено је да не постоји статистички значајно већа промјена  $a_w$  вриједности у односу на почетни број ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока ( $p > 0,05$ ). Коefицијент варијације за промјену  $a_w$  вриједности је уједначен, што говори о хомогеној статистичкој серији.

Просјечне  $a_w$  вриједности, у односу на почетни број ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока, приказане су у графикону 5.3.2.17.



Графикон 5.3.2.17. Просјечне  $a_w$  вриједности у односу на почетни број ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока

Статистички параметри анализе  $a_w$  вриједности, у зависности од фаза производње сирешнокоагулишућих сирева, приказани су у табели 5.3.2.14.

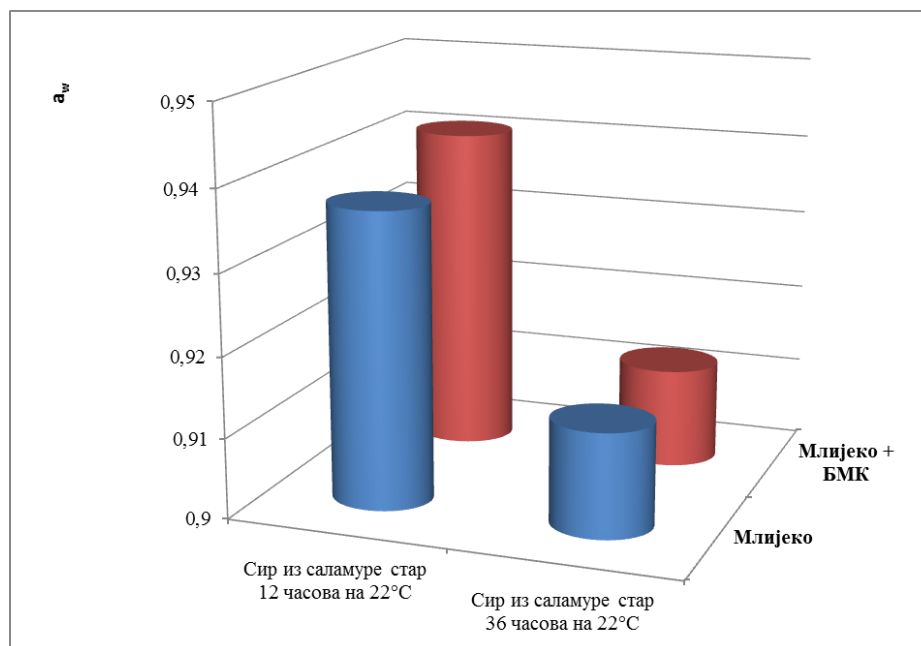
Табела 5.3.2.14. Статистички параметри анализе  $a_w$  вриједности, у зависности од фаза производње сирешнокоагулишућих сирева

Фазе производње	n	$\bar{x}$	SD
Сир из саламуре стар 12 часова на 22°C	20	0,9384 <sup>a</sup>	0,006
Сир из саламуре стар 36 часова на 22°C	20	0,9148 <sup>a</sup>	0,019

Статистичка значајност приказана је истим словима: a,  $p < 0,01$

У фази саламурења установљене су значајне разлике ( $p < 0,01$ ).

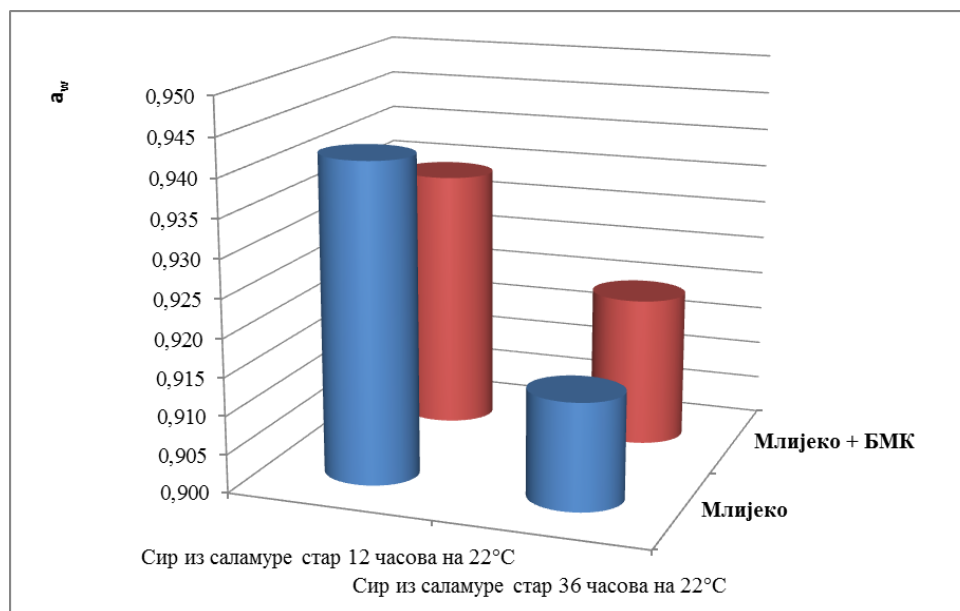
Промјена  $a_w$  вриједности у сиру из саламуре послје 12 и 36 часова, у медијумима млијеко и млијеко+БМК, при почетном броју стафилокока  $10^1$  CFU/ml, приказана је у графикону 5.3.2.18.



**Графикон 5.3.2.18. Промјена  $a_w$  вриједности у сиру из саламуре при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml**

Статистичком анализом није установљена значајна разлика ( $p > 0,05$ ) у  $a_w$  вриједности између фаза производње, у односу на медијуме.

Промјена  $a_w$  вриједности у сиру из саламуре послје 12 и 36 часова, у медијумима млијеко и млијеко+БМК, при почетном броју стафилокока  $10^2$  CFU/ml, приказана је у графикону 5.3.2.19.



**Графикон 5.3.2.19. Промјена  $a_w$  вриједности у сиру из саламуре при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml**

Статистичком анализом није установљена значајна разлика ( $p > 0,05$ ) у  $a_w$  вриједности између фаза производње, у односу на медијуме.

#### 5.4. Утицај фактора средине и услова производње на синтезу ентеротоксина коагулаза позитивних стафилокока у производњи традиционалних сирева

##### 5.4.1. Утицај фактора средине и услова производње на синтезу ентеротоксина коагулаза позитивних стафилокока у производњи киселокоагулишућег сира

Доказ ентеротоксина коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева, у зависности од медијума, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml, приказан је у табели 5.4.1.1.

Табела 5.4.1.1. Доказ ентеротоксина коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева у зависности од медијума, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml

Фазе производње	ВНІ бујон	Млијeko	Млијeko + БМК
Медијум на 32-33°C	-	-	-
Хлађење на 27°C 30 минута	-	-	-
Ферментација 12 часова на 22°C	-	-	-
Ферментација 24 часа на 22°C	-	-	-
Ферментација 36 часова на 22°C	+	-	-
Ферментација 48 часова на 22°C	НР	-	-
Обрада груша 30 минута на 35°C	НР	-	-

+ утврђено присуство ентеротоксина; - није утврђено присуство ентеротоксина; НР – није рађено

Присуство ентеротоксина доказано је у медијуму ВНІ бујон после 36 часова раста ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока, при почетном броју  $10^1$ CFU/ml. У медијумима млијeko и млијeko+БМК, ентеротоксин није доказан у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева.

Доказ ентеротоксина коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева, у зависности од медијума, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml, приказан је у табели 5.4.1.2.

Табела 5.4.1.2. Доказ ентеротоксина коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева, у зависности од медијума, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml

Фазе производње	ВНІ бујон	Млијeko	Млијeko + БМК
Медијум на 32-33°C	-	-	-
Хлађење на 27°C 30 минута	-	-	-
Ферментација 12 часова на 22°C	-	-	-
Ферментација 24 часа на 22°C	+	-	-
Ферментација 36 часова на 22°C	НР	-	-
Ферментација 48 часова на 22°C	НР	-	-
Обрада груша 30 минута на 35°C	НР	-	-

Присуство ентеротоксина доказано је у медијуму ВНІ бујон после 24 часа раста ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока, при почетном броју  $10^2$ CFU/ml. У медијумима млијeko и млијeko+БМК, ентеротоксин није доказан у симулираним условима производње киселокоагулишућих сирева.

#### 5.4.2. Утицај фактора средине и услова производње на синтезу ентеротоксина коагулаза позитивних стафилокока у производњи сиришнокоагулишућег сира

Доказ ентеротоксина коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње сиришнокоагулишућих сирева, у зависности од медијума, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml, приказан је у табели 5.4.2.1.

Табела 5.4.2.1. Доказ ентеротоксина коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње сиришнокоагулишућих сирева, у зависности од медијума, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml

Фаза производње	Млијeko	Млијeko + БМК
Млијeko на 30°C	-	-
Коагулација 60 минута на 30°C	-	-
Обрада груша 30 минута на 30°C	-	-
Цијеђење 12 часова на 22°C	-	-
Пресовање 12 часова на 22°C	-	-
Сољење 12 часова на 22°C	-	-
Сир из саламуре стар 12 часова на 22°C	-	-
Сир из саламуре стар 36 часова на 22°C	+	+

Присуство ентеротоксина доказано је у сиру из саламуре старом 36 часова, односно 72 часа од почетка производње сиришнокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^1$ CFU/ml и није зависило од медијума (млијeko и млијeko+БМК).

Доказ ентеротоксина коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње сиришнокоагулишућих сирева, у зависности од медијума, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml, приказан је у табели 5.4.2.2.

Табела 5.4.2.2. Доказ ентеротоксина коагулаза позитивних стафилокока у симулираним условима производње сиришнокоагулишућих сирева, у зависности од медијума при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml

Фаза производње	Млијeko	Млијeko + БМК
Млијeko на 30°C	-	-
Коагулација 60 минута на 30°C	-	-
Обрада груша 30 минута на 30°C	-	-
Цијеђење 12 часова на 22°C	-	-
Пресовање 12 часова на 22°C	-	-
Сољење 12 часова на 22°C	-	-
Сир из саламуре стар 12 часова на 22°C	-	-
Сир из саламуре стар 36 часова на 22°C	+	+

Присуство ентеротоксина доказано је у сиру из саламуре старом 36 часова, односно 72 часа од почетка производње сиришнокоагулишућих сирева, при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml и није зависило од медијума (млијeko и млијeko+БМК).

## 6. ДИСКУСИЈА

Традиционални сиреви се, по правилу, производе од сировог млијека, по два основна поступка. Први је кисељењем, када је коагулација резултат активности бактерија млијечне киселине. Добијени груш представља свјеж сир, који се конзумира одмах послје производње, а ови сиреви се означавају као сиреви без зрења. Створена млијечна киселина обара рН млијека до изоелектричне тачке, када је казеин нестабилан и коагулише се. Други тип традиционалних сирева добија се коагулацијом ензимом, а послје формирања груде, груда се соли сувом сољу, слаже у посуде и налива саламуром. Овај тип сира зри у саламури до 60 дана. Овај начин производње сира захтијева период зрења, тако да се ови сиреви означавају као сиреви са зрењем.

**European Commission (2003)** је предложила да производи који се производе од сировог млијека не треба да садрже висок број *Staphylococcus aureus*, јер ако сирово млијеко садржи висок број *Staphylococcus aureus*, ентеротоксин може бити произведен у току процеса производње. Ако је омогућен интензиван раст ентеротоксогених стафилокока, током првих 48 часова производње настаће довољна количина ентеротоксина да изазове алиментарна обољења. Обично се сматра да ентеротоксогене стафилококе морају достићи ниво од најмање  $10^5$ - $10^6$ CFU/g или ml за производњу детектабилне количине ентеротоксина. Такође, познато је из литературе да се током процеса зрења, а потом и складиштења сирева, број стафилокока може смањити, али ентеротоксин остаје у наведеном производу током рока употребе.

За ентеротоксогене сојеве стафилокока, и поред тога што имају ген за продукцију ентеротоксина, не мора значити да ће продуковати ентеротоксин током производње и чувања сира, јер услови производње сира утичу на експресију продукције ентеротоксина. Код већине сирева, прва 2-3 дана у производњи су критичан период за продукцију ентеротоксина. У том периоду број стафилокока може достићи максимум, а потом да почне опадати. Постизање високог броја стафилокока на самом почетку производње сира, може имати за последицу и продукцију ентеротоксина у датом производу.

У докторској дисертацији анализирали смо налаз стафилокока у два традиционална сира. Традиционална производња сирева подразумева употребу сировог млијека, као полазног супстрата за производњу сира. Испитивања великог броја аутора (**Boynukara и сар., 2008; Mørk и сар., 2010; Pelisser и сар., 2008; Medved'ová и Valík, 2012**), показују да учесталост *Staphylococcus aureus* у сировом млијеку варира од 6-28%, са бројем стафилокока у просјеку  $2,2 \log$  CFU/ml. Налаз *Staphylococcus aureus* у сировом млијеку представља ризик за његов налаз у сиревима који се праве од тог млијека. **Kousta и сар. (2010)** наводе податак да је код 4% сирева од непастеризованог млијека *Staphylococcus aureus* доказан у броју већем од  $4 \log$  CFU/ml.

Испитивани сиреви припадају групи киселокоагулишућих сирева без зрења, односно групи сиришнокоагулишућих сирева са зрењем. Испитано је укупно 100 узорака, по 50 узорака обе врсте сира. Коагулаза позитивне стафилококе доказане су у 72% киселокоагулишућих и у 76% сиришнокоагулишућих сирева. Коагулаза позитивне стафилококе код киселокоагулишућих сирева утврђене су у просјечној вриједности  $2,91 \pm 0,67 \log$  CFU/g, док је максимална вриједност износила  $5,15 \log$  CFU/g. Код сиришнокоагулишућих сирева коагулаза позитивне стафилококе утврђене су у

просјечној вриједности  $3,00 \pm 0,82 \log \text{CFU/g}$ , а максимална вриједност износила је  $4,54 \log \text{CFU/g}$ . Поређењем рН вриједности ова два сира, утврђено је да су киселокоагулишући сиреви имали у просјеку рН  $4,46 \pm 0,32$ , док је сиришнокоагулишући сир имао виши просјечни рН који је износио  $5,01 \pm 0,30$ . Код свјежих киселокоагулишућих сирева  $a_w$  вриједност просјечно је износила  $0,978 \pm 0,004$ , док је значајно мања  $a_w$  вриједност ( $0,913 \pm 0,019$ ) утврђена код сиришнокоагулишућих сирева. Значајно је нагласити да су се варијације  $a_w$  вриједности кретале у опсегу од 0,855 до 0,951, а према подацима из литературе (**Adams и Moss, 2008**), овај опсег  $a_w$  вриједности омогућава стварање ентеротоксина стафилокока.

\*\*\*

У току испитивања изоловано је 215 сојева коагулаза позитивних стафилокока. Ентеротоксин је доказиван код свих коагулаза позитивних стафилокока и утврђено је да 58 сојева (26,98%) ствара ентеротоксин. Ентеротоксин продукујући сојеви су, на основу генетске идентификације, утврђивањем гена *sra* PCR методом, потврђени као *Staphylococcus aureus*. Према литературним подацима (**European Commission, 2003; Bergdoll, 1989**) SEC ентеротоксин најчешће се потврђује код сојева *Staphylococcus aureus* изолованих у случајевима маститиса крвава и оваца, те је за експериментални протокол симулације производње традиционалних сирева, изабран сој стафилокока који продукује SEC ентеротоксин. **Rall и сар. (2008)** су утврдили да је преваленца ентеротоксогених сојева стафилокока у узорцима сировог млијека износила од 25,5 до више од 72%, а као доминантни ентеротоксини утврђени су SEA и SEC. Познато је да SEA доминантно продукују хумани сојеви стафилокока, те је налаз SEA продукујућих стафилокока у сировом млијеку највјероватније посљедица контаминације приликом обраде и прераде млијека (**Akineden и сар., 2008; Rosengren и сар., 2010**), а поред тога SEA је најчешћи узрок стафилококног тровања храном (**Balaban и Rasooly, 2000**). Преваленца ентеротоксогених сојева међу изолатима стафилокока из сирева, сурутке, маслаца и неких других производа од меса и јаја, била је већа од 30%, а најчешће доказани гени били су *sea* и *sec* (**Medved'ová и Valík, 2012; Kousta и сар., 2010; Kérouanton и сар., 2007; Normanno и сар., 2007; Ertas и сар., 2010; Ayidin и сар., 2011; Trn  ikov , 2010; Akineden и сар., 2008; Pelisser и сар., 2008; Morandi и сар., 2007; Pereira и сар., 2009**). У производњи сирева, физичко-хемијске карактеристике матрикса сира (рН,  $a_w$  вриједност, концентрација NaCl, компетитивна улога БМК), као и услови процесне средине (температура), утичу на експресију продукције ентеротоксина (**Ertas и сар., 2010; Morandi и сар., 2007; Ayidin и сар., 2011; Pereira и сар., 2009**), тако да је корелација између присуства одређеног гена и стварне продукције ентеротоксина између 70 и 80%. Исти аутори су закључили да је неопходно познавати кључне вриједности интринзик (рН и  $a_w$  вриједност) и екстринзик (температура) фактора, који омогућавају или спречавају раст *Staphylococcus aureus* током производње сирева од сировог млијека.

\*\*\*

Експерименталним протоколом симулирали смо производњу традиционалних киселокоагулишућих и сиришнокоагулишућих сирева. Обе врсте припадају групи меких сирева. Карактеристика ових сирева је да се производе од сировог млијека, а ферментација се заснива на аутохтоним бактеријама млијечне киселине. Стафилококе које могу да се нађу у млијеку као посљедица лоше хигијене муже или субклиничких маститиса, могу се у тим сиревима размножавати до броја који је означен као ризик за стварање ентеротоксина.



**Dengreameont и сар. (1995)** су током експерименталне производње меких сирева утврдили да стафилококе могу да достигну број од  $10^7$ CFU/g. **Vernozy-Rozand и сар. (1998)** су, при инокулуму стафилокока, који је био већи од  $10^5$ CFU/ml, утврдили присуство ентеротоксина у сиру од козјег сировог млијека.

Експериментални протокол производње за киселокогулишуће и сиришнокогулишуће сиреве, постављен је у циљу утврђивања како почетни број стафилокока, медијуми и фазе производње утичу на раст стафилокока и стварање ентеротоксина. Киселокогулишући и сиришнокогулишући сир производе се искључиво од сировог млијека, бактерије млијечне киселине су поријеклом из процесног окружења, а производња сира је на температурама од  $22\pm 1^\circ\text{C}$ . Киселокогулишући сир припада свјежим сиревима без зрења, производња траје од 24 до 48 часова, рок употребе је 10 дана на температури до  $8^\circ\text{C}$ . Сиришнокогулишући сир је сир из групе сирева са зрењем, зри у саламури до 60 дана, на температури амбијента ( $22\pm 1^\circ\text{C}$ ). Утврђено је да током процеса производње рН млијека код киселокогулишућих сирева пада до 4,46, а код сиришнокогулишућих сирева просјечно износи 5,01. Код испитиваних сирева  $a_w$  вриједности значајно се разликују, тако да киселокогулишући сиреви, са мањом количном суве материје (18-22%), имају  $a_w$  у просјеку 0,979, а сиришнокогулишући сиреви, са мањом количном воде, имају нижу просјечну  $a_w$  вриједност од 0,913. Температура при којој се одвија производња киселокогулишућих и сиришнокогулишућих сирева, као и утврђене рН и  $a_w$  вриједности, и поред тога што не представљају оптималне услове (**Adams и Moss, 2008**) ипак омогућавају раст стафилокока и стварање ентеротоксина.

У симулираним условима производње киселокогулишућих и сиришнокогулишућих сирева, статистички значајно већи раст стафилокока утврђује се при почетном броју стафилокока  $10^2$ CFU/ml ( $p < 0,01$ ) (табела 5.3.1.1. и 5.3.2.1).

У испитивању утицаја медијума (ВН1 бујон, млијеко и млијеко+БМК) на раст ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока, током производње киселокогулишућих сирева, утврђене су статистички значајне разлике ( $p < 0,01$ ) између сва три медијума (графикон 5.3.1.2.). Током производње сиришнокогулишућих сирева, утврђено је да нема значајне разлике (графикон 5.3.2.2.) у односу на кориштене медијуме (млијеко и млијеко+БМК). Подаци из литературе потврђују утицај састава медијума на раст стафилокока и стварање ентеротоксина (**Ertas и сар., 2010; Morandi и сар., 2007; Ayidin и сар., 2011; Pereira и сар., 2009**).

У производњи киселокогулишућих сирева, млијеко послије muže, температуре  $32-33^\circ\text{C}$ , оставља се на хлађење до  $27^\circ\text{C}$ . Процес производње састоји се у ферментацији тог млијека на температури амбијента ( $22\pm 1^\circ\text{C}$ ) током 24-48 часова. На крају ферментације, груш се обрађује тако што се загрије на температуру  $35^\circ\text{C}$  30 минута, како би дошло до појачаног издвајања сурутке. Даљи процес производње сира карактерише ферментација, која се одвија на амбијенталној температури  $22\pm 1^\circ\text{C}$ . Добијени резултати (табела 5.3.1.2.) показују да број стафилокока расте првих 36 часова ферментације, што представља значајан раст у односу на почетни број стафилокока. Процес производње сиришнокогулишућег сира подразумијева следеће фазе: подсиравање млијека при температури  $30^\circ\text{C}$ , коагулација у трајању 60 минута, обрада груша на истој температури у трајању од 30 минута, одвајање сурутке цијеђењем на температури амбијента ( $22\pm 1^\circ\text{C}$ ), пресовање, суво сољење, слагање сира у посуде у које се долијева саламура и одвија зрење на температури амбијента. Од млијека до фазе сувог сољења пролази 36 часова, сир је чуван у саламури још 36

часова, те је мониторинг подразумијевао 72 часа процеса производње сиришнокоагулишућег сира. Утврђено је да не постоји значајна разлика у расту ентеротоксогенних коагулаза позитивних стафилокока у млијеку послије коагулације од 60 минута и обраде груша од 30 минута, док је између осталих фаза производње утврђена значајна разлика ( $p > 0,001$ ) (табела 5.3.2.2.).

Традиционалну производњу киселокоагулишућих и сиришнокоагулишућих сирева карактерише активност аутохтоне микрофлоре бактерија млијечне киселине. **Smith и сар. (1983)** и **Genigeorgis (1989)** испитивали су утицај конкурентне микрофлоре бактерија млијечне киселине на раст стафилокока. Утврдили су да метаболички производи бактерија млијечне киселине, као што су млијечна и друге органске киселина, водоник пероксид и ниже масне киселине, могу да инхибишу раст стафилокока. Традиционална производња сирева одвија се на температурама које погодују расту бактерија млијечне киселине (мезофили). Изостанком раста и метаболичке активности ових бактерија, медијум млијеко се не мијења односно рН вриједност не опада и тиме неактивне културе бактерија млијечне киселине омогућавају раст стафилокока у млијеку. У експерименталном протоколу производње сира, млијеку смо додали бактерије млијечне киселине и кроз фазе производње пратили раст стафилокока. У производњи киселокоагулишућих сирева запазили смо да се, при почетном броју стафилокока  $10^1$  CFU/ml, највећи број стафилокока постиже након 36 часова ферментације и износи  $4,19 \log$  CFU/g (табела 5.3.1.5.), а потом се број стафилокока смањује. При почетном броју стафилокока  $10^2$  CFU/ml током производње киселокоагулишућих сирева, популација стафилокока свој максимум достиже послије 36 часова ( $4,78 \log$  CFU/g), а потом долази до супресије раста (табела 5.3.1.8.). Подаци показују да у производњи киселокоагулишућих сирева, активност бактерија млијечне киселине представља фактор инхибиције раста стафилокока и умањује ризик од настанка ентеротоксина.

Током производње сиришнокоагулишућег сира, и поред додавања бактерија млијечне киселине у млијеко, њихов инхибиторни ефекат изостаје, па се, независно од почетног броја стафилокока ( $10^1$  CFU/ml и  $10^2$  CFU/ml), у последњој контролисаној фази производње (сир из саламуре стар 36 часова) ентеротоксогене коагулаза позитивне стафилококе утврђују у броју већем од  $5 \log$  CFU/g (табела 5.3.2.4. и 5.3.2.6.).

Према подацима из литературе, снижавање рН вриједности у матриксу ствара рестриктивне услове за раст стафилокока. Резултати добијени испитивањем промјене рН у различитим матриксама, при симулираним условима производње сира и брзине размножавања коагулаза позитивних стафилокока, показали су да постоји зависност између промјене рН вриједности и броја коагулаза позитивних стафилокока. Вриједност рН спорије се мијењала у условима производње сиришнокоагулишућих сирева, што је имало за посљедицу брже размножавање коагулаза позитивних стафилокока. У симулираним условима производње киселокоагулишућег сира, рН вриједност се брже снижавала, што је имало за посљедицу спорије размножавање коагулаза позитивних стафилокока. Утврђена је значајна статистичка разлика у брзини промјене рН вриједности у зависности од поступка производње сира. Бржа промјена рН вриједности током производње киселокоагулишућих сирева посљедица је активности бактерија млијечне киселине, што потврђују и резултати добијени у нашим испитивањима, када је, као медијум за праћење броја стафилокока и рН вриједности, кориштено млијеко+БМК. Добијени резултати броја стафилокока, у симулираним условима производње киселокоагулишућих и сиришнокоагулишућих сирева, у

зависности од почетног броја стафилокока и промјене интринзик и екстринзик фактора, у складу су с резултатима које су добили **Adams и Moss (2008)**.

\*\*\*

Аутохтони сиреви, будући да се производе од сировог млијека, слатком и киселом коагулацијом, могу да представљају опасност од налаза коагулаза позитивних стафилокока. У циљу процјене да ли коагулаза позитивне стафилококе могу да се умноже током производње аутохтоних сирева до броја  $\geq 5 \log \text{CFU/g}$ , праћена је промјена популације коагулаза позитивних стафилокока као и њихова способност да стварају ентеротоксине током производње аутохтоних сирева.

Коагулаза позитивне стафилококе у условима производње сиришнокоагулишућих сирева достижу вриједност  $\geq 5 \log \text{CFU/g}$  после 72 часа од производње сира, када су доказани и ентеротоксини. Током процеса производње сиришнокоагулишућих сирева, који обухвата одвајање сурутке, пресовање и саламурије, у првих 72 часа долази до успоравања активности бактерија млијечне киселине. Ово потврђују резултати добијени праћењем рН вриједности у различитим медијумима током симулиране производње сира.

Према резултатима више аутора (**Márta и сар., 2011; Barber LE и Deibel, 1972; Scheusner и сар., 1973; Notermans и Heuvelman, 1973; Regassa и Betley, 1992; Domenech, 1992; Genigeorgis, 1976**), опсег стварања ентеротоксина је у распону рН 5-9,6. Ови резултати потврђују наше резултате, гдје је рН у медијуму са бактеријама млијечне киселине, при крају процеса производње, био испод 4,9.

Други важан параметар за размножавање коагулаза позитивних стафилокока је активност воде. Просјечна вриједност активности воде у испитиваним узорцима сира је била 0,979 код киселокоагулишућих сирева, а код сиришнокоагулишућих 0,913. Вриједности добијене у нашим истраживањима нису успоравале размножавање коагулаза позитивних стафилокока. Добијени резултати у сагласности су с резултатима више аутора (**Adams и Moss, 2008; Regassa и Betley, 1993; Sakai и сар., 2008; Bang и сар., 2008; Tatini, 1973; Genigeorgis, 1976; Onoue и Mori, 1997; Qi и Miller, 2000; Troller, 1971; Troller, 1972; Lee и сар., 1981**).

За испитивање стварања ентеротоксина током производње сира, кориштен је одабрани изолат коагулаза позитивног стафилокока, који ствара SEC ентеротоксин. На стварање SEC ентеротоксина утиче смањење активности воде, које је незнатно на  $a_w$  0,93 (**Ewald и Notermans, 1988; Qi и Miller, 2000**). Током праћења стварања ентеротоксина, установљено је стварање ентеротоксина SEC у сиру из саламурије старом 36 часова, односно 72 часа од почетка производње сиришнокоагулишућег сира.

## 7. ЗАКЉУЧЦИ

На основу добијених резултата, изводе се следећи закључци:

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

## 8. ЛИТЕРАТУРА

1. Adams M.R., Moss M.O. 2008. Bacterial agents of foodborne illness—*Staphylococcus aureus*. Food Microbiology. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
2. Adesiyun A.A., Tatini S.R., Hoover D.G. 1984. Production of enterotoxins by *Staphylococcus hyicus*. Vet. Microbiol., 9, 487-495.
3. Akineden O., Hassan A., Scheider E., Usleber E. 2008. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated goats' milk cheese. Int. j. food microbiol. 124: 211-216.
4. Altekruze S.F., Timbo B.B., Mowbray J.C., Bean N.H., Potter M.E. 1998. Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: sanitary manufacturing practices protect consumers. J. Food Prot. 61, 1405-1407.
5. Anunciacao L.L.C., Linardi W.R., Docarnco L.S., Bergdoll M.S. 1994. Production of Staphylococcal enterotoxin in a white cheese. Revista de Microbiologia 25:68-71.
6. Asao T., Kumeda Y., Kawai T., Shibata T., Oda H., Haruki K., Nakazawa H., Kozaki S. 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. Epidemiol. Infect., 130, 33-40.
7. Asperger H., Zangerl P. 2003. *Staphylococcus aureus*. In: Roginski H, Fuquay J, Fox P, editors. Encyclopedia of Dairy Science. San Diego: Academic Press pp. 2563-2569.
8. Ayidin A., Sudagidan M., Muratoglu K. 2011. Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. Int. j. food microbiol. 148: 99-106.
9. Baird-Parker AC. 1971. Symposium on microbial changes in foods. Factors affecting the production of bacterial food poisoning toxins. J Appl Bacteriol. 34:181-97; PMID:4327570.
10. Baird-Parker T. 2000. *Staphylococcus aureus*. In: Lund B., Baird-Parker T., Gould G., editors. The Microbiological Safety and Quality of Food. Gaithersburg: Aspen Publishers. pp. 1317-1330.
11. Baker-Austin C., Dopson M. 2007. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. Trends microbiol. 15: 165-171.
12. Balaban N., Rasooly A. 2000. Review - Staphylococcal enterotoxins, Int. J. Food Microbiol., 61, 1-10.
13. Bang W., Hanson D.J., Drake M.A. 2008. Effect of salt and sodium nitrite on growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the production of airdried fresh pork sausage. J Food Prot. 71:191-5; PMID:18236683.
14. Barber L.E., Deibel R.H. 1972. Effect of pH and oxygen tension on staphylococcal growth and enterotoxin formation in fermented sausage. Appl. Microbiol., 24, 891-8; PMID:4631103.
15. Barrett N.J. 1986. Communicable disease associated with milk and dairy products in England and Wales: 1983-1984. J. Infect., 12, 265-272.
16. Bayles K.W., Iandolo J.J. 1989. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. J. Bacteriol., 171, 4799-806.
17. Becker K., Keller B., von Eiff C., Bruck M., Lubritz G., Etienne J., Peters G. 2001. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. Appl Environ Microbiol 67, 12, 5551-5557.
18. Belay N., Rasooly A. 2002. *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin A production in an anaerobic environment. J Food Prot. 65, 199-204; PMID:11808796.

19. Bennett R.W. 1996. Atypical toxigenic *Staphylococcus* and non-*Staphylococcus aureus* species on the horizon? An update. *J. Food Protect.*, Vol.59, 10, 1123-1126.
20. Bergdoll M. S. 1970. Enterotoxins in *Microbiol Toxins*, Vol. 3, Montie, T.C., Kadis, S., Ajl, S.J., (Eds.), Academic Press, New York, NY, pp. 265-326.
21. Bergdoll M.S. 1983. Enterotoxins. In: Easmon, C.S.F., Adlam, C. (eds). *Staphylococci and staphylococcal infections*. Vol. 2, pp. 560-98. Academic Press, London.
22. Bergdoll M.S. 1989. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle, M.P. (ed.). *Foodborne bacterial pathogens*. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, pp. 463-523.
23. Bergdoll M.S., Crass B.A., Reiser R.F., Bobbins R.N., Davis P.D. 1981. A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet I*, 1017-21, 1118.
24. Betley M.J., Mekalanos J.J. 1985. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. *Science*, 229, 185-7.
25. Betley M.J., Borst D.W., Regassa L.B. 1992. Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology. *Chem. Immunol.*, 55, 1-35.
26. Betley M.J., Schlievert P.M., Bergdoll M.S., Bohach G.A., Iandolo J.J., Khan S.A., Pattee P.A., Reiser R.F. 1990. Staphylococcal gene nomenclature. *ASM News*, 56, 182.
27. Bone F.J., Bogie D., Morgan-Jone S.C. 1989. Staphylococcal food poisoning from sheep milk cheese. *Epidemiol. Infect.* 103, 449-458.
28. Boynukara B., Gulhan T., Alisarli M. et al. 2008. Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. *Int. j. food microbiol.* 125: 209-211.
29. Bremer P., Fletcher G., Osborne C. 2004. *Staphylococcus aureus*. Christchurch: New Zealand Institute for Crop and Food Research Limited. 6 p.
30. Carpenter D.F., Silverman G.J. 1974. Staphylococcal enterotoxin B and nuclease production under controlled dissolved oxygen conditions. *Appl Microbiol.* 28:628-37; PMID:4213939.
31. Carpenter D.F., Silverman G.J. 1976. Synthesis of staphylococcal enterotoxin A and nuclease under controlled fermentor conditions. *Appl Environ Microbiol.* 31:243-8; PMID:11744.
32. Charlier C., Cretenet M., Even S., LeLoir Y. 2009. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *Int. j. food microbiol.* 131: 30-39.
33. Cretenet M., Nouaille S., Thouin J., Rault L., Stenz L., Francois P. et al. 2011. *Staphylococcus aureus* virulence and metabolism are dramatically affected by *Lactococcus lactis* in cheese matrix. *Environ Microbiol Rep.* 3:340-51; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00230.x>.
34. Daminelli P. 1999. Dinamica della sopravvivenza di *Staphylococcus aureus* in fromaggi tipo crescenza ed Italico artificialmente contaminati. *Le Selezione Veterinaria*, 11/815-829.
35. De Buyser M.L., Dufour B., Maire M., Lafarge V. 2001. Implication of milk and milk products in foodborne diseases in France and in different industrialised countries, *Int. J. Food Microbiol.*, 67, 1-17, PMID:11482557; [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00443-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00443-3).
36. De Buyser M.L., Janin F., Dilasser F. 1985. Contamination of ewe cheese with *Staphylococcus aureus*: study of an outbreak of food poisoning. In: Jelkaszewicz, J.,

- (Ed), The Staphylococci, Zbl. Bakt. Suppl. 14, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, pp. 677-678.
37. De la Fuente R., Suarez G., Schleifer K.H. 1985. *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* subsp. nov., the causal agent of abscess disease of sheep. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35, 99-102.
  38. Dengremon E., Vincent J.P., Catteau M. 1995. Comportement de souches de *Staphylococcus aureus* en expérimentation planifiée. Croissance et production de toxins. In "Compte-rendu de la journée Thématique Staphylocoques". ARILAIT-Recherches, 30 Mars 1995. Paris. pp.73-87.
  39. Devriese L.A., Hajek V., Oeding P., Meyer S.A., Schleifer K.H. 1978. *Staphylococcus hyicus* (Sompolinsky 1953) comb. nov. and *Staphylococcus hyicus* subsp. *chromogenes* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 28, 482-90.
  40. Dietrich G.G., Watson R.J., Silverman G.J. 1972. Effect of shaking speed on the secretion of enterotoxin B by *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol.* 24:561-6; PMID:4628794.
  41. Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 13, 16-34.
  42. Domenech A., Hernandez F.J., Orden J.A., Goyache J., Lopez B., Suarez G. et al. 1992. Effect of six organic acids on staphylococcal growth and enterotoxin production. *Z Lebensm Unters Forsch.* 194:124- 8; PMID:1561842; <http://dx.doi.org/10.1007/BF01190181>.
  43. Donnelly C.B., Leslie J.E., Black L.A. 1968. Production of enterotoxin A in milk. *Appl Microbiol.* 16:917-24; PMID:5695066
  44. Dudříková E., Pořáková L., Pukáčová J. 2010. Health and hygienic conditions of ewes' milk processing from the aspect of food safety. *Potr.* 4: 14-18.
  45. Ertas N., Gonulalan Z., Yildirim Y., Kum E. 2010. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. *Int. j. food microbiol.* 142: 74-77.
  46. European Commission. 2003. Health&Consumer Protection Directorate-General. Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on staphylococcal enterotoxins in milk products, particularly cheeses. 26-27. March 2003.
  47. Even S., Charlier C., Nouaille S., Ben Zakour N.L., Cretenet M., Cousin F.J. et al. 2009. *Staphylococcus aureus* virulence expression is impaired by *Lactococcus lactis* in mixed cultures. *Appl Environ Microbiol.* 75:4459-72; PMID:19429556; <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02388-08>.
  48. Evenson M.L., Hinds M.W., Berstein R.S., Bergdoll M.S. 1988. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 7, 311-316.
  49. Ewald S., Notermans S. 1988. Effect of water activity on growth and enterotoxin D production of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.*, 6, 25-30.
  50. Foster G., Ross H.M., Hutson R.A., Collins M.D. 1997. *Staphylococcus lutrae* sp. nov., a new coagulase-positive species isolated from otters. *Int. J. Syst. Bact.*, 47, 724-6.
  51. Fraser J., Arcus V., Kong P., Baker E., Proft T. 2000. Superantigens – powerful modifiers of the immune system. *Mol. Med. Today*, 6, 125-32.
  52. Garzoni C., Kelley W. 2009. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends microbiol.* 17: 59-65.
  53. Genigeorgis C., Foda M.S., Mantis A., Sadler W.W. 1971. Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin C production. *Appl Microbiol.* 21:862-6; PMID:5574320.

54. Genigeorgis C., Riemann H., Sadler W.W. 1969. Production of Enterotoxin-B in Cured Meats. *J Food Sci.* 34:63-8; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1969.tb14363.x>.
55. Genigeorgis C., Sadler W.W. 1966. Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin B production. *J Bacteriol.* 92:1383-7; PMID:5924269.
56. Genigeorgis C.A. 1976. Quality control for fermented meats. *J Am Vet Med Assoc.* 169:1220-8; PMID:187566.
57. Genigeorgis C.A. 1989. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *Int J Food Microbiol.* 9:327-60; PMID:2701861; [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(89\)90100-1](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(89)90100-1).
58. Gilmour A., Harvey J. 1990. Staphylococci in milk and milk products. *J. Appl. Bact. Symp. Suppl.*, 19, 147S-66S.
59. Gómez-Lucía E., Goyache J., Orden J.A., Domenech A., Javier Hernandez F., Ruiz-Santa Quiteria J.A. et al. 1992. Growth of *Staphylococcus aureus* and synthesis of enterotoxin during ripening of experimental Manchego-type cheese. *J Dairy Sci.* 75:19-26; PMID:1541730; [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77733-9](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77733-9).
60. Gross E.M., Weizman Z., Picard E., Mates A., Sheiman R., Platzner N., Wolff A. 1988. Milkborne gastroenteritis due to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B from a goat with mastitis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39 (1), 103-104.
61. Gutierrez C., Abee T., Booth I.R. 1995. Physiology of the osmotic stress response in microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.*, 28, 233-444.
62. Hajek V. 1976. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 26, 401-8.
63. Hamama A., El Hankouri N., El Ayadi M. 2002. Fate of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the presence of nisin producing *Lactococcus lactis* strain during manufacture of Iben, Moroccan traditional fresh cheese. *Int. Dairy J.* 12:933-938.
64. Holmberg S.D., Blake P.A. 1984. Staphylococcal food poisoning in the United States. New facts and old misconceptions. *J. Am. Med. Assoc.*, 251, 487-9.
65. Hughes A., Hurst A. 1980. The effect of NaCl on the upper temperature limit for growth of and enterotoxin synthesis by *Staphylococcus aureus*. *Can J Microbiol.* 26:507-10; PMID:7378945; <http://dx.doi.org/10.1139/m80-085>.
66. Igimi S., Takahashi E., Mitsuoka T. 1990. *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov., isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. *Int. J. Syst. Bact.*, 40, 409-11.
67. Jay J. 2000. Staphylococcal gastroenteritis. In: Jay J, editor. *Modern Food Microbiology*. Gaithersburg: Aspen Publishers. pp. 441-459.
68. Kérouanton A., Hennekinne J., Letertre C. et al. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int. j. food microbiol.* 115: 369-375.
69. Khambaty F. M., Bennett R. W., Shah D. B. 1994. Application of pulse field gel electrophoresis to the epidemiological characterisation of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. *Epidemiol. Infect.*, 113, 75-81.
70. Kousta M., Mataragas M., Skandamis P., Drosinos E. 2010. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing level. *Food control* 21: 805-815.
71. Lawrynovicz-Paciorek M., Kochman M., Piekarska K. et al. 2007. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples. *Int. j. food microbiol.* 117: 319-323.



72. Le Loir Y., Baron F., Gautier M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet Mol Res. 2:63-76; PMID:12917803.
73. Lee R.Y., Silverman G.J., Munsey S.T. 1981. Growth and enterotoxin A production by *Staphylococcus aureus* in precooked bacon in the intermediate moisture range. J Food Sci. 46:1687-92; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1981.tb04464.x>.
74. Letondeur-Lafarge V., Lahellec C. 1997. Aspects hygiénique. (In "Le Fromage". Techn. Et Doc. Lavoisier, Paris, pp. 741-755.
75. Lindqvist R., Sylvén S., Vågsholm I. 2002. Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. Int. j. food microbiol. 78: 155-170.
76. Lodi R., Malaspina P., Brasca M. 1994. Lactic acid bacteria: a quality parameter for fresh cheese. Industria del latte. 30:3-16.
77. Maguire H.C.F., Boyle M., Lexis M.J., Pankhurst J., Wieneke A.A., Jacob M., Bruce J., O'Mahony M. 1991. A large outbreak of food poisoning of unknown aetiological associated with Stilton cheese. Epidemiol. Infect. 106, 497-505.
78. Mantis A. 1973. Production of staphylococcal enterotoxins in white-brined cheese feta. Docent-Doctoral Thesis. School of Vet. Med. Univ. Thessaloniki (In Greek).
79. Markus Z., Silverman G.J. 1969. Enterotoxin B synthesis by replicating and nonreplicating cells of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol.; 97:506-12; PMID:4886280.
80. Márta D., Wallin-Carlquist N., Schelin J., Borch E., Radstrom P. 2011. Extended staphylococcal enterotoxin D expression in ham products. Food Microbiol. 28:617-20; PMID:21356473; <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.11.013>.
81. Martin S.E., Myers E.R., Iandolo J.J. 2001. *Staphylococcus aureus* In: Hui Y. H., Pierson M. D., Gorham J. R. (eds) Foodborne disease handbook Vol. 1 – Bacterial pathogens. New York Basel : Marcel Dekker Inc., 345-381.
82. McLean R.A., Lilly H.D., Alford J.A. 1968. Effects of meatcuring salts and temperature on production of staphylococcal enterotoxin B. J Bacteriol. 95:1207-11; PMID:4967190.
83. Medved'ová A., Valík L., Studeničová A. 2009. The effect of temperature and water activity on the growth of *Staphylococcus aureus*. Czech j. foods sci. 27: S2-28-S2-35.
84. Medved'ová A., Valík L. 2012. *Staphylococcus aureus*: Characterisation and Quantitative Growth Description in Milk and Artisanal Raw Milk Cheese Production. Structure and Function of Food Engineering. InTech. 4: 71-102.
85. Meyrad A., Boutrand-Loei S., Ray-Gueniot S., Mazuy C., Gaspard C.E., Jaubert G., Perrin G., Lapeyre C., Vernory-Rozand C. 1998. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert type cheeses from raw goat's milk. J. Appl. Microbiol. 85:537-544.
86. Meyrand A., Vernozy-Rozand C. 1999. Croissance et enterotoxinogenese de *Staphylococcus aureus* dans différents fromages. Revue Med. Vet. 150:601-616.
87. Minor T.E., Marth E.H. 1976. Staphylococci and their significance in foods. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
88. Morandi S., Brasca M., Lodi R. et al. 2007. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. Vet. microbiol. 124: 66-72.
89. Mørk T., Kvitle B., Mathisen T., Jorgensen H. 2010. Bacteriological and molecular investigations of *Staphylococcus aureus* in diary goats. Vet. microbiol. 141: 134-141.
90. Mossel D.A.A., Corry J.E.L., Struijk C.B., Baird R.M. 1995. Essentials of the microbiology of foods. A textbook for advanced studies. John Wiley and Sons (eds), Chichester, England, 146-150.

91. Mueller M., Hahn G., Heeschen W. 1996. Multiplication and production of enterotoxin by *Staphylococcus aureus* during the experimental manufacture of Camembert cheese. *Kieler Milchwirtschaftliche-forschungsberichte*, 48:195-207.
92. Normanno G., LaSalandra G., Dambrosio A. et al. 2007. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *Int. j. food microbiol.* 115: 290-296.
93. Notermans S., Heuvelman C.J. 1983. Combined effect of water activity, pH and sub-optimal temperature on growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. *J Food Sci.* 48:1832-5; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb05096.x>.
94. Notermans S., van Hoeij K. 2008. The food safety file: *Staphylococcus aureus*. Woerden: Food Doctors, 39 p.
95. Notermans S., Dufrenne J., In't Veld P. 1991. Feasibility of a reference material for staphylococcal enterotoxin A. *Int. J. Food Microbiol.*, 14, 325-331.
96. O'Byrne C., Booth I.R. 2002. Osmoregulation and its importance to food-borne microorganisms. *Int. j. food microbiol.* 74: 203-216.
97. Onoue Y., Mori M. 1997. Amino acid requirements for the growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* in chemically defined media. *Int J Food Microbiol.* 36:77-82; PMID:9168317; [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)01250-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(97)01250-6).
98. Papageorgiou A.C., Acharya K.R. 2000. Microbial superantigens: from structure to function. *Trends Microbiol.*, 8, 369-75.
99. Peles F., Wagner M., Varga L., Hein I., Rieck P., Gutser K., Keresztúri P., Kardos G., Turcsányi I., Béri B., Szabó A. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 118, 186-193 p.
100. Pelisser M., Klein C., Ascoli K. et al. 2008. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. *Braz. j. microbiol.* 40: 145-148.
101. Pereira V., Lopes C., Castro A. et al. 2009. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food microbiol.* 26: 278-282.
102. Pereira M.L., Simeao do Carmo L., José dos Santos E., Pereira J.L., Bergdoll M.S. 1996. Enterotoxin H in staphylococcal food poisoning. *J. Food. Prot.* 59, 559-61
103. Правилник о микробиолошким критеријумима за храну (Службени гласник Републике Српске 109/12)
104. Provent C. 1986. Contribution a l' étude de l' origine et de la maîtrise de la contamination du fromage Mont d' Or par *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Lyon, 1986.
105. Qi Y., Miller K.J. 2000. Effect of low water activity on staphylococcal enterotoxin A and B biosynthesis. *J Food Prot.* 63:473-8; PMID:10772212.
106. Rall V., Vierira F., Rall R. et al. 2008. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Vet. microbiol.* 132: 408-413.
107. Regassa L.B., Betley M.J. 1992. Alkaline pH decreases expression of the accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 174:5095-100; PMID:1629166.
108. Regassa L.B., Betley M.J. 1993. High sodium chloride concentrations inhibit staphylococcal enterotoxin C gene (sec) expression at the level of sec mRNA. *Infect Immun.* 61:1581-5; PMID:8454367.

109. Rosenbach F.J. 1884. Micro-organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. Bergmann, Wiesbaden, pp. 1-122.
110. Rosengren A., Fabricius A., Guss B. et al. 2010. Occurrence of food-borne pathogens and characterizations of *Staphylococcus aureus* in cheese produced in farm-dairies. Int. j. food microbiol. 144: 263-269.
111. Sakai F., Ihara H., Aoyama K., Igarashi H., Yanahira S., Ohkubo T. et al. 2008. Characteristics of enterotoxin H-producing *Staphylococcus aureus* isolated from clinical cases and properties of the enterotoxin productivity. J Food Prot. 71:1855-60; PMID:18810869.
112. Santos E.C., Genigeorgis C. 1981. Survival and growth of *Staphylococcus aureus* in commercially manufactured Minas cheese. J. Food Prot. 44:177-184.
113. Schelin J., Wallin-Carlquist N., Cohn M. T., Lindqvist R., Barker, G. C., Rådström P. 2011. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*, vol. 2, 580-592 p.
114. Scheusner D.L., Hood L.L., Harmon L.G. 1973. Effect of temperature and pH on growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus*. J Milk Food Technol. 36:249-52.
115. Schmidt K.A, Donegan N.P., Kwan W.A. Jr, Cheung A. 2004. Influences of sigmaB and agr on expression of staphylococcal enterotoxin B (seb) in *Staphylococcus aureus*. Can J Microbiol. 50:351-60; PMID:15213743; <http://dx.doi.org/10.1139/w04-017>.
116. Schmitt M., Schuler-Schmidt U. Schmidt-Lorenz W. 1990. Temperature limits of growth, TNase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. Int. J. Food Microbiol., 11, 1-20.
117. Scott R. 1986. Cheesemaking practice. 2<sup>nd</sup> Edition. Elsevier Appl. Sci. Publisher. London, 1986.
118. Scybert S., Pechous R., Sitthisak S. et al. 2003. NaCl-sensitive mutant of *Staphylococcus aureus* has a *Tn917-lacZ* insertion in its *ars* operon. FEMS microbiol. lett. 222: 171-176.
119. Sharp J.C.M. 1989. Milk-borne infection. J. Med. Microbiol. 29, 239-242.
120. Smith J.L., Buchanan R.L., Palumbo S.A. 1983. Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: a review. J. Food Prot., 46, 545-55.
121. Stephan R., Senczek D., Dorigoni V. 2001. Enterotoxin production and other characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from human nasal carriers. Arch Lebensmittelhyg., 52, 7-9.
122. Su Y.C., Wong A.C.L. 1995. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. Appl. Environ. Microbiol., 61,1438-43.
123. Sutherland J.P., Bayliss A.J., Roberts T.A. 1994. Predictive modelling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. Int. j. food microbiol. 21: 217-236.
124. Tatini S.R. 1973. Influence of food environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins. J. Milk Food Technol., 36, 559-63.
125. Tatini S.R. 1976. Thermal stability of enterotoxins in food. J. Milk Food Technol., 39, 432-38.
126. Tham W.A., Hadju L.J., Danielson-Tham V. 1990. Bacteriological quality of farm manufactured goat cheese. Epidemiol. Infect. 104:87-100.
127. Thota H., Tatini S.R., Bennett R.W. 1973. Effects of temperature, pH and NaCl on production of staphylococcal enterotoxins E and F. Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol., E1, p. 1.

128. Todd E., Szabo R., Gardiner M.A., Aktar M., Delorme L., Tourillon, P., Rochefort J., Roy D., Loit T., Lamontagne Y., Gosselin L., Martineau G., Breton J.P. 1981. Intoxication staphylococcique liée à du caillé de fromagerie – Québec. Rapport hebdomadaire des maladies au Canada, 7 (34), 171-172, 22 août.
129. Trnčíková T., Piskernik S., Kačíková E. et al. 2010. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food produced in Slovakia and Slovenia with regard to the presence of genes encoding for enterotoxins. J. food nutr. res. 49: 215-220.
130. Troller J.A. 1971. Effect of water activity on enterotoxin B production and growth of *Staphylococcus aureus*. Appl Microbiol. 21, 435-9; PMID:4928601.
131. Troller J.A. 1972. Effect of water activity on enterotoxin A production and growth of *Staphylococcus aureus*. Appl Microbiol. 24:440-3; PMID:4562480.
132. Troller J.A. 1986. The water relations of foodborne bacterial pathogens – an updated review. J. Food Prot., 49, 656-70.
133. Ulrich R.G. 2000. Evolving superantigens of *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 27, 1-7.
134. Valero A., Perez-Rodriguez F., Carrasco E., Fuentes-Alventosa J.M., Garcia-Gimeno R.M., Zurera G. 2009. Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. Int J Food Microbiol. 133:186-94; PMID:19523705; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.023>.
135. Varaldo P.E., Kilpper-Bälz R., Biavasco F., Satta G., Schleifer K.H. 1988. *Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase-positive species isolated from dolphins. Int. J. Syst. Bact., 38, 436-9.
136. Vernozy-Rozand C., Meyrand A., Mazuy C., Delignette-Muller M.L., Jaubert G., Perrzin G., Lapeyre C., Richard Y. 1998. Behaviour and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of raw goat's milk lactic cheeses. J. Dairy Res. 65:273-281.
137. Wallin-Carlquist N., Marta D., Borch E., Radstrom P. 2010. Prolonged expression and production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in processed pork meat. Int J Food Microb. 141, 69-74; PMID: 20406714;
138. Wieneke A.A. 1974. Enterotoxin production by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods and human beings. J. Hyg. Camb., 73, 255-62.
139. Woodburn M., Morita T.N., Venn S.Z. 1973. Production of staphylococcal enterotoxins A, B and C in colloidal dispersions. Appl Microbiol. 25:825-33; PMID:4197641.
140. Yang S.E., Yu R.C., Chou C.C. 2001. Influence of holding temperature on the growth and survival of *Salmonella* spp and *Staphylococcus aureus* and the production of staphylococcal enterotoxin in egg products. Int J Food Microbiol. 63:99-107; PMID:11205959; [http:// dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00416-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00416-5).
141. Yarwood J.M., McCormick J.K., Paustian M.L., Orwin P.M., Kapur V., Schlievert P.M. 2002. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. J. Biol. Chem., 277, 13138-47.
142. Zarate V., Belda F., Perez C., Cardell E. 1997. Changes in the microbial flora of Tenerife goats milk cheese during ripening. Int. Dairy J. 7:635-641.
143. Zigo F., Vasil' M., Kadáši M. et al. 2011. Bacteria *Staphylococcus* spp. isolated from mastitis of sheep and their enterotoxigenic properties. Potr. 5: 70-72.

## БИОГРАФИЈА АУТОРА

Бојан Голић рођен је 27.11.1977. године у Градишци, Република Српска, БиХ.

Основну и средњу школу (гимназију) завршио је у Градишци. Дипломирао је 2003. године на Факултету ветеринарске медицине Универзитета у Београду. На истом факултету одбранио је магистарски рад 2010. године под насловом „Испитивање утицаја пробиотика и пребиотика на поствакцинални одговор бројлерских пилића после пероралне вакцинације атенуираним сојем *Salmonella Enteritidis*“, а 2013. године одбранио је специјалистички рад под насловом „Микробиолошки критеријуми у производњи термички обрађеног млека“.

Од 01.12.2003. године запослен је у Јавној установи Ветеринарски институт Републике Српске „Др Васо Бутозан“ Бања Лука, на радном мјесту руководиоца квалитета и руководиоца лабораторије за микробиологију намирница и испитивање резидуа, руководећи пословима увођења и имплементације система управљања квалитетом и акредитације лабораторија према стандарду *BAS EN ISO/IEC 17025:2006*.

Члан је техничког комитета за храну Института за стандардизацију БиХ (BAS/ТС 43 Комитет за храну). Као технички експерт ангажован је од стране Института за акредитовање БиХ (БАТА) за подручје ветеринарске микробиологије, серолошка, вирусолошка и патолошка испитивања у ветеринарству и микробиолошке анализе хране, хране за животиње и воде.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Бојан Голић

број уписа \_\_\_\_\_

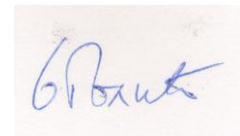
### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај фактора средине и услова производње традиционалних сирева на динамику развоја и синтезу ентеротоксина код популације коагулаза позитивних стафилокока

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**



У Београду, 27.01.2016.

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Бојан Голић

Број уписа: \_\_\_\_\_

Студијски програм: \_\_\_\_\_

Наслов рада: Утицај фактора средине и услова производње традиционалних сирева на динамику развоја и синтезу ентеротоксина код популације коагулаза позитивних стафилокока

Ментор: проф. др Зора Мијачевић

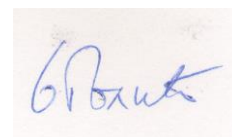
Потписани Бојан Голић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**



У Београду, 27.01.2016.

---

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај фактора средине и услова производње традиционалних сирева на динамику развоја и синтезу ентеротоксина код популације коагулаза позитивних стафилокока

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

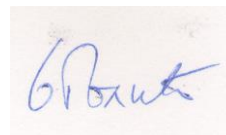
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда



У Београду, 27.01.2016.

---



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.