

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број захтева: 461/6-5.1.
Датум: 29.03.2017.

ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ
БИОТЕХНИЧКИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

**за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији
за кандидата на докторским студијама**

Молимо да, сходно члану 47. став. 5. тачка 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 162/11-пречишћени текст, 167/12 и 172/13), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији:

Кандидат **ДАНКА (Станислав) РАДИЋ**, студент докторских студија на студијском програму Пољопривредне науке, модул Мелиорације земљишта, пријавила је докторску дисертацију под називом: "Биодиверзитет и значај квасаца у одрживој пољопривреди"

из научне области Мелиорације земљишта.

Универзитет је дана 11.4.2013. године, својим актом број 61206-1248/2-13 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила: **"Биодиверзитет квасаца у земљишту и њихов значај у одрживој пољопривреди"**.

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 25.01.2017. године, одлуком Факултета број 461/4-5.1., у саставу:

име и презиме члана комисије, звање, научна област, установа у којој је запослен

1. др Вера Раичевић, редовни професор, Еколошка микробиологија, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
2. др Блажо Лалевић, ванредни професор Еколошка микробиологија, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
3. др Мирослав Врвић, редовни професор, Микробиолошка хемија, Универзитет у Београду - Хемијски факултет,
4. др Миомир Никшић, редовни професор, Технолошка микробиологија, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
5. др Вера Павловић, доцент, Физика, Универзитет у Београду - Машински факултет.

Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 29.03.2017. године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Милица Петровић

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 461/6-5.1.
Датум: 29.03.2017. године
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 38. Правилника о правилима академских студија другог и трећег степена, Наставно-научно веће Факултета на седници одржаној 29.03.2017. године, донело је

О Д Л У К У

I ПРИХВАТА СЕ извештај о позитивној оцени урађене докторске дисертације коју је поднела **ДАНКА РАДИЋ, дипл. инж.** и одобрава јавна одбрана дисертације по добијању сагласности од Универзитета, под насловом: **«БИОДИВЕРЗИТЕТ КВАСАЦА У ЗЕМЉИШТУ И ЊИХОВ ЗНАЧАЈ У ОДРЖИВОЈ ПОЉОПРИВРЕДИ».**

II Универзитет је дана 11.4.2013. године, својим актом број 61206-1248/2-13 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.

III Рад кандидата у часопису међународног значаја:

Радић Д., Гујаничић В., Петричевић Ј., Раичевић В., Лалевић Б., Рудић Ж., Божић М., (2013): Macrophytes as remediation technology in improving Luda lake sediment, Fresenius Environmental Bulletin, 22 (6), 1787-1791.

**ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
ДЕКАН**

(Проф. др Милица Петровић)

Доставити: кандидату, ментору др Вери Раичевић, редовном професору, Институту за земљиште и мелиорације, Студентској служби и архиви.

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**
Датум: 31.01.2017.

Предмет: Извештај Комисије за оцену урађене докторске дисертације Данке Радић, дипл. инж.

Одлуком Наставно-научног већа факултета број 461/4-5/1 од 19.01.2017., именовани смо у Комисију за оцену урађене докторске дисертације под насловом: »Биодиверзитет квасаца у земљишту и њихов значај у одрживој пољопривреди«, кандидаткиња Данке Радић, дипл. инж. Након што смо детаљно проучили урађену докторску дисертацију, подносимо следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација дипл. инж. Данке Радић, написана је на 168 страна текста и укључује 37 табела, 36 слика и 6 графикана. Испред основног текста написан је резиме са кључним речима на српском и енглеском језику. Докторска дисертација садржи седам поглавља, и то: Увод (стр. 1 - 2), Преглед литературе (стр. 3 - 23), Циљеви истраживања (стр. 24 - 25), Материјал и методе (стр. 26 - 44), Резултати и Дискусија (стр. 45 - 128), Закључак (стр. 129 - 133) и Литература (стр. 134 - 168). На крају текста дисертације налази се Биографија кандидата и обавезне изјаве. Поглавља Преглед литературе, Материјал и методе, Резултати и Дискусија садрже више потпоглавља.

2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Увод. У уводу је истакнут значај микробног биодиверзитета у земљишту за одржавање стабилности и продуктивности природних и агроекосистема али и утицај конвенционалне пољопривредне производње на нарушавање микробног биодиверзитета. Општем микробном биодиверзитету значајно доприносе и квасци, једноћелијски еукариотни микроорганизми који имају значајне улоге у земљишту али њихов потенцијал у одрживој пољопривреди још увек није довољно искоришћен.

Преглед литературе. У *Прегледу литературе* који има три потпоглавља детаљно су обрађени доступни литературни подаци из области која је предмет проучавања дисертације. У првом потпоглављу *Биодиверзитет квасаца у земљишту* кандидаткиња истиче значај квасаца у земљишту као једном сложенем и динамичном систему где се бројност креће до 10^6 ћелија/граму земљишта. Типични земљишни квасци припадају родовима: *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Lindnera*, *Lipomyces*, *Rhodotorula* и *Schizoblastosporion*. У другом потпоглављу *Земљишни квасци у одрживој пољопривреди и биоремедијацији оштећених земљишта* истакнуто је да се одрживи развој мора базирати

на примени еколошки оправданих агротехничких пракси и ефикасној експлоатацији корисних микробиолошких процеса. На овај начин микробне популације постају инструменти у фундаменталним процесима одговорним за стабилност и продуктивност агроекосистема. У овом потпоглављу истакнуто је да квасци, могу на веома различите начине и различитим механизмима стимулирати раст биљака и на основу тих особина се сврставају у групу микроорганизама стимулатора биљног раста (PGP). Квасци имају значајну улогу у третману контаминираних вода и земљишта и на тај начин квасци постају снажни алати у биоремедијационим технологијама контаминираних екосистема. У потпоглављу *Савремене методе карактеризације квасаца у земљишту* истиче се значај молекуларних техника којима се обезбеђује бољи увид у специфичне интеракције и активности земљишних квасаца. Захваљујући PCR-DGGE методи омогућено је проучавање микробиолошких заједница у животној средини без култивације, као и одговор микроорганизама на различите промене. Савремени приступ биохемијској карактеризацији, као и брзу и прецизну класификацију великог броја прокариотских и еукариотских микроорганизама омогућава и Раман спектроскопија.

Циљеви истраживања. Циљеви ове дисертације полазе од хипотезе да великом микробном диверзитету у земљишту доприносе и квасци, који учествују у великом броју процеса. Циљ дисертације је стварање колекције идентификованих и окарактерисаних земљишних квасаца као и одређивање директних и индиректних механизма којима стимулишу раст биљака (солубилизација фосфата, трансформације азотних једињења, продукције индол - сирћетне киселине (IAA), антагонизма према фитопатогеним гљивама *Botrytis cinerea* и *Pythium aphanidermatum*).

Потенцијал примене квасаца у одрживој пољопривреди испитаће се инокулацијом семена различитих биљних врста. Научни циљ докторске дисертације је и испитивање способности биоаккумуляције бакра од стране изабраних изолата.

Материјал и методе. Методе које су коришћене у дисертацији су представљене у осам потпоглавља. Изолација квасаца извршена је из: земљишта са високим садржајем органских загађивача (дечији парк Тиват, Република Црна Гора); земљишта из винограда (подрум Радовановић, Крњево, Република Србија), земљишта са огледног школског добра Радмиловац (Пољопривредни факултет, Република Србија) из ризосфере трске (плитко језеро, насеље Трешња, Београд, Република Србија). *Микробиолошка карактеризација* земљишта извршена је методом разређења и накупљања на стандардним микробиолошким подлогама. Диверзитет квасаца и гљива у узорцима земљишта са огледног школског добра Радмиловац извршена је PCR-DGGE методом. Екстракција земљишне DNK је извршена помоћу кита ZR Soil Microbe DNA MiniPrep (Zymo Research, USA). Помоћу ланчане реакције полимеразе са универзалним ITS1/ITS4 прајмерима утврђено је присуство гљива, а универзалним прајмерима NL1 и NL4 присуство квасаца. DGGE анализа добијених PCR продуката са прајмерима ITS1/ITS4 и NL1/NL4 урађена је на Bio-Rad Dcode System. *Изолација квасаца* извршена је методом накупљања на подлози са 1 % квашчевог екстракта, 2 % пептона и 2 % декстрозе (YPD) уз додатак 80 µg/ml стрептомицина.

У трећем потпоглављу *Идентификација и карактеризација квасаца одређене су макроморфолошке* (боја, облик и текстура колонија) на YPD подлози и микроскопске карактеристике (облик и величина ћелије и стварање лажне мицелије и псеудомицелије) помоћу обојених и фикираних препарата (Nikon Eclipse 50i, Јапан). Одгајивачке карактеристике су одређене праћењем раста изолата на косом слатком агару и течном слатком бујону. Од еколошких карактеристика испитан је раст изолата на различитим

температурама (4°C, 10°C, 20°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C и 50°C), pH вредности (од 1,5 до 11) и концентрацијама натријум - хлорида (3, 5 и 7 %) на YPD подлози. Интеракција изолата квасаца са *Candida albicans* и бактеријским сојевима (*Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus*) одређен је помоћу дифузионе методе са бунарчићима. Идентификација изолата на основу биохемијских карактеристика је извршена помоћу API AUX 20C система (BioMérieux, Француска). Молекуларна идентификација изолата је подразумевала секвенционирање продукта добијених након амплификације универзалним прајмерима (NL1 и NL4) и поређење добијених секвенци са секвенцама доступним у GenBank Bazi података. Ензимска карактеризација изолата је извршена API ZYM тестом (bioMérieux, Француска) према упутству произвођача. За карактеризацију квасаца који припадају различитим родовима коришћен је Раман микроскоп XploRA (Horiba Jobin Yvon, Јапан). У четвртном потпоглављу *Директни механизми стимулације биљног раста*, способност продукције индол - сирћетне киселине је одређена колориметријском методом по Xin et al. (2009). Растворљивост фосфата од стране изолата је одређена методом *in vitro* по Al-Falih-y (2005). У оквиру трансформације азотних једињења утврђена је продукција амонијака (NH₃) и трансформација амонијум - сулфата. Продукција амонијака је утврђена засејавањем изолата квасаца у пептонску воду, док је трансформација амонијум - сулфата одређена методом *in vitro* по Al-Falih-y (2006). У петом потпоглављу *Антифугалана активност изолата* утврђен је антагонизам изолата према фитопатогеним гљивама (*Botrytis cinerea* и *Pythium aphanidermatum*) помоћу теста двојних култура на кромпир - декстрозном агару (PDA; Merck, Немачка).

У шестом потпоглављу *Утицај одабраних изолата на раст биљака* изабрана су четири изолата (BK0302D, SK2404I, 2TD2912B и 3TD0905L) и конзорцијум ових изолата за праћење њиховог утицаја на раст биљака: слачице (*Sinapis alba* L.), пшенице (*Triticum vulgare* L.), црвене детелине (*Trifolium pretense* L.), сунцокрета (*Helianthus annuus* L.) и зелене салате (*Lactuca sativa*). У седмом потпоглављу *Квасци и биоакумулација бакра* утврђен је укупан садржај бакра (Cu²⁺) акумулираног у ћелијама квасаца (Avin1312L, BK0302D, 3TD0905L и 4TD1101S) помоћу оптичке емисионе спектрометрије са индукованом спрегнутом плазмом (ICP-OES). Након ICP-OES методе, извршена је и анализа ћелија квасца (4TD1101S) у медијуму без и са додатком 2 mM Cu²⁺ помоћу Раман спектроскопије. У осмом потпоглављу *Статистичка обрада резултата*, је наведено да је обрада резултата извршена применом statistica software 8.0 једнофакторске анализе варијансе, док је Tukey-ев тест коришћен како би се одредила статистички значајна разлика ($\alpha=0.05$) између средњих вредности. За одређивање корелације између променљивих коришћен је Pearson Correlation Coefficient Calculator.

Резултати и Дискусија. Резултати истраживања обрађени су у оквиру осам потпоглавља и приказани су уз текстуална тумачења, слике, прегледне табеле и графиконе који илуструју истраживања, а добијени резултати су дискутовани уз концизна тумачења. У првом потпоглављу *Микробиолошка карактеризација земљишта* приказана је микробиолошка анализа узорака земљишта, која је показала високу бројност укупних и спорогених бактерија, амонификатора и актиномицета. Највећа бројност укупних бактерија ($5,80 \times 10^8$ CFU/g), гљива ($8,00 \times 10^4$ CFU/g), амонификатора ($3,86 \times 10^7$ CFU/g), спорогених бактерија ($4,00 \times 10^6$ CFU/g) и азотофиксатора ($5,00 \times 10^4$ CFU/g) је утврђена у ризосфери трске (SK). Ради утврђивања диверзитета гљива и квасаца без претходне култивације у узорцима земљишта (Cvin и Avin) огледног школског добра Радмиловац коришћена је DGGE метода. DGGE профил PCR продукта добијених умножавањем гена

за 18S rRNA из укупне DNK указао је на разлике између узорак земљишта. У земљишту Avin уочене су четири траке са појачаним интезитетом које нису присутне у узорку Cvin. DGGE профил PCR продуката добијених умножавањем ITS из укупне DNK указао је на присуство три траке слабијег интезитета у узорку Cvin, које нису уочене у узорку Avin. За даља истраживања и утврђивања диверзитета до нивоа рода и врста неопходна је примена додатних метода. У другом потпоглављу *Изолација квасаца из земљишта* представљено је порекло једанаест изолата квасаца, шест изолата (2TD2912B, 3TD0905L, 4TD1101S, BK0302D, EK1605T и SK2404I) изоловано је из градског земљишта (Тиват, Црна Гора), два изолата (Avin и Cvin) из земљишта огледног школског добра Радмиловац (Београд, Србија), два изолата (1KD1983V и 2KD3007J) из земљишта из винограда Радовановић (Крњево, Србија) и један изолат (SK0809R) из ризосфере трске (Тршња, Србија). У трећем потпоглављу *Идентификација и карактеризација квасаца из земљишта* утврђено је да постоје разлике у морфолошким карактеристикама испитиваних изолата. Одрађивачким карактеристикама на косом сладном агару и сладном бујону утврђена је појава ружичастог прстена у сладном бујону код изолата (SK0809R) и појава тзв. крпица код изолата (BK0302D). Сви изолати квасаца су расли на температурама од 20°C и 30°C, док ниједан изолат није испољио раст на 4°C. На температурама 35°C и 45°C расли су изолати: 2TD2912B, 3TD0905L, 4TD1101S и Avin1312L. Најнижа pH при којој је испољен слаб раст је 2 (EK1605T), а највиша 10,5. Сви изолати су испољили раст при садржају натријум-хлорида од 3 %, док ниједан изолат није растао при концентрацији натријум - хлорида од 7 %. У интеракцијским односима изолата квасаца са различитим бактеријским сојевима: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* и *Bacillus subtilis* је утврђено да је у 60 % интеракцијских односа дошло до раста обе културе. Изолати квасаца Avin1312L и SK0809R су инхибирали раст *P. mirabilis*, односно *B. cereus*, при чему је изолат Avin1312L довео до инхибиције раста *P. mirabilis* и појаве зоне пречника 34 mm. У четвртном потпоглављу утврђена је биохемијска карактеризација и идентификација изолата помоћу API 20C AUX система (BioMerieux, Француска). Изолат 1KD1983V је показао највећи степен сличности са две врсте рода *Candida* и то са *Candida utilis* (54,7 %) и *Candida spherica* (45,3 %). Изолат 2KD3007J је показао највећи степен сличности са *Candida utilis* (92,3 %). Изолат 2TD2912B је показао највећи степен сличности са три врсте рода *Candida*: *Candida albicans* (32,5 %), *Candida tropicalis* (25 %) и *Candida parapsilosis* (17 %). Изолат 3TD0905L је показао највећи степен сличности са две различите врсте и то са *Candida tropicalis* (52,8 %) и *Trichosporon uncinoides* (35,2 %). Изолат 4TD1101S је показао највећи степен сличности са три врсте рода *Candida*: *Candida famata* (41 %), *Candida tropicalis* (26,5 %) и *Candida lusitanae* (23,2 %). Изолат SK0809R је показао највећи степен сличности са *Rhodotorula mucilaginosa* (99,9 %). Изолат EK1605T је показао највећи степен сличности са *Kloeckera spp.* (99,2 %). Изолат BK0302D је показао највећи степен сличности са две врсте рода *Candida* и то са *Candida guilliermondii* (68,7 %) и *Candida famata* (31,2 %). Изолат SK2404I је показао највећи степен сличности са *Candida* (*Candida guilliermondi* 77,9 %) и родом *Cryptococcus* (*Cryptococcus laurentii* 11,2 %). Изолат Avin1312L је показао највећи степен сличности са *Candida famata* (98,9 %). Изолат Cvin1610M је показао највећи степен сличности са *Candida utilis* (99 %). BLAST анализом секвенци амплификованих продуката сви изолати су успешно идентификовани до нивоа врсте. Изолати: 2TD2912B, 3TD0905L, 4TD1101S и Avin1312L као *Candida tropicalis*; изолати: SK2404I, 1KD1983V, 2KD3007J и Cvin1610M као *Cyberlindnera saturnus*; BK0302D као *Schwanniomyces occidentalis*; EK1605T као *Hanseniaspora uvarum* и

SK0809R као *Rhodotorula mucilaginosa*. Ензимском карактеризацијом изолата утврђена је продукција N-ацетил- β -глюкозаминидаза код изолата 2TD2912B, 3TD0905L и Avin1312L. Способност продукције β -глюкозидазе која учествује у деградацији ћелијског зида је утврђена код шест изолата, а најјачу ензимску активност је показао изолат *C. saturnus* (1KD1983V). Продукција липазе (C14) и цистин ариламидазе је утврђена само код изолата Avin1312L и Cvin1610M. Кисела и алкална фосфатаза су детектоване код изолата *S. occidentalis* (BK0302D), *C. saturnus* (CK2404I) и *C. tropicalis* (2TD2912B). Ниједан изолат није имао позитивну реакцију на α -химотрипсин, α и β -галактозидазу, β -глюкуронидазу и α -манозидазу. Раман спектроскопијом су анализирани и спектри изолата 1KD1983V, BK0302D, 4TD1101S, EK1605T, SK0809R и Cvin1610M. Поређењем спектра изолата 1KD1983V, 4TD1101S и BK0302D утврђено је да је садржај липида највећи у BK0302D, а најмањи код изолата 1KD1983V. При поређењу Раман спектра изолата SK0809R са спектрима изолата 1KD1983V, 4TD1101S и BK0302D, најупечатљивије промене се односе на појаву Раман пикова каротеноида у спектру SK0809R. Основна разлика која се примећује у спектру изолата EK1605T у односу на спектре изолата 1KD1983V, 4TD1101S и BK0302D се односи на знатан пораст интензитета пикова на следећим положајима: $\sim 738 \text{ cm}^{-1}$ (триптофан и хемотрипсин), $\sim 1120 \text{ cm}^{-1}$ (протеини и гликозидна веза) и $\sim 1576 \text{ cm}^{-1}$ (ароматичне аминокиселине и нуклеотидне базе, као и хемопротеини). У петом потпоглављу *Директни механизми стимулације биљног раста* утврђена је продукција индол - сирћетне киселине (IAA) код шест изолата: *C. tropicalis* (3TD0905L, 6,00 $\mu\text{g/ml}$), а затим и код преостала три изолата ове врсте квасца и то: 2TD2912B (3,70 $\mu\text{g/ml}$), 4TD1101S (3,02 $\mu\text{g/ml}$) и Avin1312L (2,80 $\mu\text{g/ml}$). Способност продукције IAA је утврђена и код *S. occidentalis* (BK0302D, 1,09 $\mu\text{g/ml}$) и *C. saturnus* (Cvin1610M, 1,08 $\mu\text{g/ml}$). Продукцијом IAA микроорганизми позитивно утичу на раст и дужину корена, што доводи до повећања његове површине, а самим тим и до већег приступа хранљивим материјама из земљишта. Солубилизација фосфата, након четири недеље инкубације је код *Schwanniomyces occidentalis* (BK0302D) износила 220,4 mg P/l, код *Candida tropicalis* (2TD2912B) 205,0 mg P/l, *Cyberlindnera saturnus* (CK2404I) 202,7 mg P/l и најмања код *C. tropicalis* (Avin1312L), 70,1 mg P/l. Процес солубилизације праћен је и смањењем pH вредности и повећањем биомасе. Сви испитивани изолати осим *R. mucilaginosa* (SK0809R) су имали способност продукције NH_3 , док је највећа количина нитрата (NO_3^-) забележена код изолата: *R. mucilaginosa* (SK0809R) и износила је 27,6 mg/l. У шестом потпоглављу *Антагонизам квасаца према фитопатогеним гљивама* утврђена је антифугална способност изолата квасаца према *Pythium aphanidermatum* и *Botrytis cinerea*. Проценат инхибиције *H. uvarum* (EK1605T) према *P. aphanidermatum* је износио 46,06 %, а код два изолата *C. saturnus* (CK2404I и Cvin1610M) 31,81 %, односно 35,31 %. Проценат инхибиције раста *B. cinerea* у односу на контролу се кретао од 18,04 % до 66,47 %, а највиши је био при расту фитопатогена са изолатима *C. tropicalis* (3TD0905L, 66,47 % и Avin1312L, 61,96 %). Према Sookchaouy et al. (2009) *C. tropicalis* (3TD0905L и Avin1312L) се сврставају у групу са високом антагонистичком активношћу, док се два изолата *C. saturnus* (2KD3007J, 55,55 % и Cvin1610M, 52,94 %), *C. tropicalis* (4TD1101S, 56,27 %) и *S. occidentalis* (BK0302D) сврставају у групу са умереном антагонистичком активношћу. У седмом потпоглављу *Ефекти инокулације семена биљака изолатима квасаца* испитана је могућност примене изолованих и идентификованих земљишних квасаца у одрживој пољопривредној производњи инокулацијом семена различитих биљака. Селекција изолата је извршена на основу различитих PGP механизма. Највећи утицај инокулације на суву

биомасу (0,31 g), дужину корена (4,45 cm) и висину (7,87 cm) црвене детелине постигнут је применом инокулације са *C. saturnus* (CK2404I). Највећи утицај инокулације на суву биомасу (3,74 g), дужину корена (13,33 cm) и висину (22,42 cm) пшенице постигнут је инокулацијом са *C. tropicalis* (3TD0905L). Инокулација сунцокрета са изолатима квасаца није имала значајног утицаја на суву биомасу, док је највећи утицај на дужину корена (10,28 cm) и висину (21,98 cm) сунцокрета постигнут применом конзорцијума. Највећи утицај на суву биомасу (2,02 g) и висину слачице (9,70 cm) је постигнут применом инокулације са *C. saturnus* (CK2404I), док је највећи утицај на дужину корена (3,12 cm) постигнут применом конзорцијума. Инокулација зелене салате са изолатима квасаца није имала значајног утицаја на суву биомасу, док је највећи утицај на дужину корена (3,53 cm) и висину (5,08 cm) зелене салате постигнут применом конзорцијума. У осмом потпоглављу *Биоремедијациони потенцијал квасаца* утврђена је способност биоакумулације 2 mM Cu^{2+} изолата и то *S. occidentalis* (BK0302D) и три изолата *C. tropicalis* (3TD0905L, 4TD1101S и Avin1312L). Највећи проценат биоакумулације Cu^{2+} је утврђен код изолата *C. tropicalis* 4TD1101S, (94,37 %), а најмањи код *S. occidentalis* (BK0302D). Анализом ћелија квасаца са највећим процентом биоакумулације (*C. tropicalis*, 4TD1101S) пре и после третирања са 2 mM бакар сулфат пентахидрата помоћу Раман спектроскопије, утврђено је присуство CuS и/или Cu_{2-x}S ($0 < x < 1$) минералног комплекса као и металотионеина у виду Cu -тионеина уз пораст удела цистинског садржаја услед делимичне оксидације тог протеина у третираним квасцима. Висок проценат биоакумулације изолата *C. tropicalis* (4TD1101S, 94,37 %) указује на могућност примене у биоремедијацији оштећених екосистема.

У поглављу **Закључак** кандидаткиња је у кратким тезама изнела најрелевантније закључке до којих је дошла на основу експерименталних истраживања. Применом стандардних микробиолошких техника уочена је добра биогеност земљишта која су одабрана у овим истраживањима. Укупан број бактерија у испитиваним узорцима кретао се од $0,047 \times 10^8$ CFU/g до $5,80 \times 10^8$ CFU/g. DGGE профил PCR фрагмената добијених умножавањем гена за 18S rRNA и ITS региона из укупне ДНК изоловане из земљишта је указао на разлике у диверзитету између испитиваних узорака земљишта. Изоловано је и применом биохемијских и молекуларних метода идентификовано једанаест изолата.

Изолати 2TD2912B, 3TD0905L, 4TD1101S и Avin1312L су идентификовани као *Candida tropicalis*; изолати CK2404I, 1KD1983V, 2KD3007J и Cvin1610M као *Cyberlindnera saturnus*, изолат BK0302D као *Schwanniomyces occidentalis*, изолат SK0809R као *Rhodotorula mucilaginosa* и EK1605T као *Hanseniaspora uvarum*.

Ензимска карактеризација је указала на разлике између испитиваних ензима у продукцији екстрацелуларних ензима. Тако најјачу β -глюкозидазну активност је показао изолат *C. saturnus* 1KD1983V, док је продукција липазе (C14) и цистин ариламидазе утврђена само код изолата Avin1312L и Cvin1610M, док ниједан изолат није имао позитивну реакцију на α -химотрипсин, α и β -галактозидазу, β -глукуронидазу и α -манозидазу. Поређењем Раман спектра изолата квасаца утврђено је да је садржај липида највећи код изолата BK0302D, а најмањи код изолата 1KD1983V. Пик на $1147\text{--}1155\text{ cm}^{-1}$ који првенствено потиче од полифосфата и може да служи као маркер за вакуоле, је најизраженији код изолата BK0302D. Испитивани изолати се разликују у директним и индиректним PGP механизмима. Највећа вредност IAA је измерена код *Candida tropicalis* (3TD0905L) и износи $6,00\text{ }\mu\text{g/ml}$, а пет изолата нема способност продукције IAA. Највећа количина фосфата је утврђена код *Schwanniomyces occidentalis* (BK0302D) и износи $220,4\text{ mg P/l}$.

Способност продукције амонијака имали су сви испитивани изолати, осим *R. mucilaginosa* (SK0809R), док је највећа количина NO_3^- забележена код *R. mucilaginosa* (SK0809R, 27,6 mg/l), *C. tropicalis* (3TD0905L 27,5 mg/l) и *C. saturnus* (СК2404I, 27,1 mg/l). Истраживања везана за индиректне PGP механизме показала да међу испитиваним квасцима постоје потенцијални биоконтролни агенси. Проценат инхибиције изолата *H. uvarum* (ЕК1605Т) према *Pythium aphanidemraturum* износи 46,06 %, док је проценат инхибиције према *Botrytis cinerea*, изолата *Candida tropicalis* (3TD0905L и Avin1312L) износио 66,47 %, односно 61,96 %. Одабрани сојеви имали су различите ефекте на раст биљака, што указује да успех инокулације зависи од обе компоненте, биљке и изолата квасца. Тако је инокулација са *C. saturnus* (СК2404I) највише утицала на повећање суве биомасе (0,31 g), црвене детелине (*Trifolium pretense* L.), док је највећи утицај на суву биомасу (3,74 g), дужину корена (13,33 cm) и висину (22,42 cm) пшенице (*Triticum vulgare* L.) имала инокулација са *C. tropicalis* (3TD0905L).

Највећи проценат биоакумулације Cu^{2+} има изолат *C. tropicalis*-4TD1101S (94,37 %) што указује на потенцијал изолата земљишних квасаца у биоремедијационим технологијама. Анализом Раман спектроскопије спектра изолата 4TD1101S (*C. tropicalis*) уочава се присуство CuS и/или Cu_{2-x}S ($0 < x < 1$) минералног комплекса, као и индукована синтеза металотионеина у виду Cu - тионеина уз пораст удела цистинског садржаја услед делимичне оксидације тог протеина. Запажене су и извесне промене у Раман пиковима нуклеобаза и ароматичних аминокиселина, што је одраз специфичног одговора дате врсте на стрес.

Литература. У дисертацији је на правилан начин наведено 366 референци. Избор референци је актуелан и одговара предмету проучавања.

3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација дип. инж. Данке Радић под насловом: „Биодиверзитет квасаца у земљишту и њихов значај у одрживој пољопривреди“ представља самостални научни рад који је у потпуној сагласности са планом предвиђеним пријавом дисертације. Докторска дисертација дип. инж. Данке Радић даје значајан допринос бољем разумевању диверзитета микроорганизама у земљишту као потенцијала за примену у одрживој пољопривредној производњи. Кандидаткиња је у експерименталном делу истраживања успешно применила више различитих савремених метода које су јој омогућиле добијање релевантних резултата које је правилно тумачила и коментарисала у складу са расположивим литературним подацима. Закључци су добро формулисани и правилно изведени и у потпуности произилазе из добијених резултата. Дисертација представља оригиналан научни рад актуелан и значајан, с обзиром да истраживања у Србији, везана за искоришћавање и примену земљишних квасаца нису до сада вршена. Формирана колекција изолованих, идентификованих и окарактерисаних квасаца, пореклом из земљишта даје добру основу за даља истраживања, али указује и да примена квасаца у одрживој пољопривреди и биоремедијацији оштећених екосистема представља велики биотехнолошки изазов. Полазећи од тога да су и у свету, знања о микробном биодиверзитету у земљишту још увек ограничена, ова дисертација доприноси бољем разумевању значаја квасаца у обављању кључних екосистемских функција.

Имајући у виду све изнето, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију кандидаткиње Данке Радић, дипл. инж. под насловом: „Биодиверзитет квасаца у земљишту и њихов значај у одрживој пољопривреди“ и предлаже Научно-наставном већу Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду, да ову позитивну оцену усвоји и тиме омогући кандидаткињи да пред истом Комисијом јавно брани докторску дисертацију.

У Београду,
31.01.2017.

Чланови комисије:

Др Вера Раичевић, редовни професор
Ужа научна област: еколошка микробиологија
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

Др Блажо Лалевић, ванредни професор
Ужа научна област: еколошка микробиологија
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

Др Мирослав Врвић, редовни професор
Ужа научна област: микробиолошка хемија
Универзитет у Београду, Хемијски факултет

Др Миомир Никшић, редовни професор
Ужа научна област: технолошка микробиологија
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

Др Вера Павловић, доцент
Ужа научна област: физика
Универзитет у Београду, Машински факултет

Прилог:

Сепарат објављеног рада дипл. инж. Данке Радић у научном часопису на SCI листи

Радић Д., Гујаничић В., Петричевић Ј., Раичевић В., Лалевић Б., Рудић Ж., Божић М., (2013): Macrophytes as remediation technology in improving Luda lake sediment, Fresenius Environmental Bulletin, 22 (6), 1787-1791.