

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Број захтева: 32/8-7.1.

Датум: 29.05.2019.

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. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 186/15-пречишћени текст и 189/16), дате сагласност на одлуку о усвајању извештаја Комисије за оцену докторске дисертације:

Кандидат **ДОРА (Сава) ИЛИЋ**, студент докторских студија на студијском програму Пољопривредне науке, модул Мелиорације земљишта, пријавила је докторску дисертацију под називом: „Микробни конзорцијум хром-редукујућих микроорганизама у биоремедијацији земљишта загађеног тешким металима“

из научне области Мелиорације земљишта.

Универзитет је дана 14.05.2013. године, својим актом 02 Број: 61206-1249/2-13 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила: « **ХРОМ-РЕДУКУЈУЋИ МИКРООРГАНИЗМИ У БИОРЕМЕДИЈАЦИЈИ ЗЕМЉИШТА ЗАГАЂЕНОГ ТЕШКИМ МЕТАЛИМА** ».

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 26.03.2019. године, одлуком Факултета број 32/6-5.1. у саставу:

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

1. др Блажо Лалевић, ванредни професор, Еколошка микробиологија, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
2. др Вера Раичевић, редовни професор, Еколошка микробиологија, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
3. др Драган Киковић, редовни професор у пензији од 30.09.2018. године, Микробиологија, Универзитет у Приштини-(Косовска Митровица) – Природно-математички факултет,
4. др Гордана Гојгић-Џвијовић, научни саветник, Хемија, Универзитет у Београду - Институт за хемију, технологију и металургију,
5. др Игор Кљујев, ванредни професор, Еколошка микробиологија, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет.

Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 29.05.2019. године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Душан Живковић

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 32/8-7.1.
Датум: 29.05.2019. године
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 44. Статута Пољопривредног факултета, Наставно-научно веће Факултета на седници одржаној 29.05.2019. године, донело је

О Д Л У К У

I ПРИХВАТА СЕ извештај о позитивној оцени урађене докторске дисертације коју је поднела **мр ДОРА ИЛИЋ** и одобрава јавна одбрана дисертације по добијању сагласности од Универзитета, под насловом: **«ХРОМ-РЕДУКУЈУЋИ МИКРООРГАНИЗМИ У БИОРЕМЕДИЈАЦИЈИ ЗЕМЉИШТА ЗАГАЂЕНОГ ТЕШКИМ МЕТАЛИМА».**

II Универзитет је дана 14.05.2013. године, актом 02 број 61206-1249/2-13 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.

III Сепарат објављеног рада кандидата у научном часопису на SCI листи:

Ћић, D.S., Dimkić, I.Z., Waisi, H.K., Gkorezis, P.M., Hamidović, S.R., Raičević, V.B., Lalević, B.T. (2019): Reduction of hexavalent chromium by *Bacillus* spp. isolated from heavy metals-polluted soil. Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly 2019 OnLine-First Issue 00, Pages: 3-3, <https://doi.org/10.2298/CICEQ180607003I>

**ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
ДЕКАН**

(Проф. др Душан Живковић)

Доставити: кандидату, ментору, Институту за земљиште и мелиорације, Студентској служби и архиви.

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**
Датум: 06.03.2019.

Предмет: Извештај Комисије за оцену урађене докторске дисертације магистра Доре Илић

Одлуком Наставно-научног већа факултета број 32/6-5.1. од 26.03.2019. год, именовани смо у Комисију за оцену и одбрану урађене докторске дисертације под насловом: »Хром-редукујући микроорганизми у биоремедијацији земљишта загађеног тешким металима«, кандидаткиње магистра Доре Илић.

Након детаљног проучавања урађене докторске дисертације, Комисија подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација магистра Доре Илић, написана је на 144 стране текста и укључује 41 табелу, 21 слику и 2 дијаграма. Докторска дисертација садржи седам поглавља, и то: Увод (стр. 1-3), Преглед литературе (стр. 4-28), Циљеви истраживања (стр. 29-30), Материјал и методе (стр. 31-55), Резултати и Дискусија (стр. 56-107), Закључак (стр. 108-111) и Литература (стр. 112-144). 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 негативан утицај индустријализације и неадекватног коришћења природних ресурса на квалитет животне средине, посебно на локацији бивше фабрике „Рог“ (Љубљана, Република Словенија), где је присутно историјско загађење. Кандидаткиња истиче значај микробних популација резистентних на тешке метале и примене биоремедијационих технологија у редукцији хрома(VI).

Преглед литературе. У *Прегледу литературе* који има једанаест потпоглавља, детаљно су обрађени доступни литературни подаци из области која је предмет проучавања дисертације. У првом потпоглављу *Порекло хрома у животној средини* кандидаткиња наводи изворе и облике хрома у животној средини и указује на изражену токсичност хрома(VI) у односу на тровалентни. Такође, кандидаткиња истиче и високу растворљивост оба облика хрома, што представља опасност по квалитет земљишта,

подземних и површинских вода. У другом потпоглављу *Биолошки значај хрома* истакнут је значај хрома у исхрани људи, док је у трећем потпоглављу *Токсичност хрома за живе организме* кандидаткиња указала на токсичност хрома(VI) за живи свет, као и механизам транспорта и трансформације овог облика у бактеријској ћелији. У овом потпоглављу истакнуто је да високе концентрације хрома у животној средини утичу на редукцију бројности и активности микробних популација у земљишту, на смањење клијавости семена и оштећења коренова. У четвртом потпоглављу *Толерантност микроорганизама на тешке метале* описани су механизми толеранције и резистенције микроорганизама на присуство тешких метала, као и начини везивања (уклањања) тешких метала помоћу микроорганизама. У петом потпоглављу *Механизми микробне детоксификације хрома* кандидаткиња истиче значај неензимске и ензимске ремедијације, као и аеробне и анаеробне редукције хрома(VI), док је у шестом потпоглављу *Хром-редукујуће бактерије у процесима биоремедијације* истакнута ефикасност различитих врста бактерија у редукцији хрома(VI). Утицај допунских извора енергије и других тешких метала на редукцију хрома(VI) описан је у потпоглављу *Микробиолошка редукција Cr(VI) у присуству стимулатора и инхибитора редукције*, док су у осмом потпоглављу *Оптимизација услова за микробну редукцију Cr(VI)* приказани оптимални услови за редукцију хрома код различитих бактеријских врста. У деветом (*Хром-редукујуће гљиве у процесима биоремедијације*) и десетом (*Толерантност биљака према присуству хрома у супстрату*) потпоглављу, кандидаткиња истиче улогу гљива у редукцији хрома(VI), односно ефикасност биљних врста у акумулацији хрома у биомаси. У последњем потпоглављу *Биљно-микробне интеракције у редукцији Cr(VI)* истакнут је значај бактерија стимулатора биљног раста у адаптацији биљака на присуство и редукцију хрома(VI) у супстрату.

Циљеви истраживања. Циљеви ове докторске дисертације полазе од хипотезе да микроорганизми учествују у биотрансформацијама тешких метала и да највећу ефикасност показују аутохтоне микробне популације, изоловане са контаминираних локалитета. Због тога је циљ дисертације изолација и идентификација земљишних бактерија резистентних на присуство хрома(VI) и редукције овог облика хрома у лабораторијским условима. На овај начин формирана је колекција аутохтоних микробних популација са високом ефикасношћу редукције хрома(VI). Посебан циљ дисертације је испитивање ефекта инокулације контаминираног земљишта сојевима са највећим потенцијалом редукције хрома(VI) и бактерија стимулатора биљног раста на садржај хрома у супстрату и биљном материјалу.

Материјал и методе. Методе које су коришћене у докторској дисертацији су представљене у четрнаест потпоглавља. Узорци земљишта за ова истраживања су узети са четири локалитета бивше фабрике за производњу бицикала „Рог“ (Љубљана, Република Словенија). Испитивана локација се одликује историјском контаминацијом, с обзиром да је на истом месту крајем 19. века подигнута радионица за штављење коже, која је била активна све до средине 20. века када је делатност преусмерена на производњу бицикала. Узорци су узети из погона за галванизацију (два композитна узорка), поред самог објекта (један композитни узорак) и између објекта и реке Љубљанице (један композитни узорак). У потпоглављу *Климатске карактеристике* кандидаткиња приказује податке о просечној годишњој температури ваздуха, количини падавина, релативној влажности ваздуха и облачности за 30-огодишњи период и пореди их са подацима за 2010. годину када је и извршено узорковање. *Хемијска карактеризација узорака земљишта* извршена је одређивањем рН вредности земљишта потенциометријски, у суспензији земљишта са водом и 1N KCl, CaCO₃ волуметријски, хумуса по Kottmann-у, укупног садржаја азота по Kjeldahl-у, приступачног садржаја фосфора и калијума AL методом и садржаја метала

ICP-OES методом. *Микробиолошка карактеризација узорака brownfield земљишта* извршена је методом разређења на стандардним микробиолошким подлогама. Заступљеност хром-резистентних бактерија и гљива одређена је на Lauria-Bertani (LB) подлози, односно розе бенгал стрептомицин агару. *Изолација и добијање чистих култура хром-резистентних бактерија и гљива* извршени су применом методе исцрпљивања на LB подлози. *Испитивање морфолошких особина хром-резистентних бактеријских изолата* обављено је одређивањем макроморфолошких и микроморфолошких особина колонија после раста на подлози хранљиви агар. *Морфолошка карактеризација гљива* извршена је после раста на подлогама розе бенгал стрептомицин агар и Czapek-ов агар. У потпоглављу *Испитивање толерантности бактеријских изолата на присуство хрома* коришћени су морфолошки различити изолати хром-резистентних бактерија и испитана је толерантност на различите концентрације хрома(VI) (100-1500 mg/l) у LB подлози. У потпоглављу *Одређивање минималних инхибиторних концентрација (МИК) хрома(VI)* испитан је раст преконоћних култура хром-резистентних бактерија на LB подлози уз додатак различитих концентрација хрома(VI) (100-2000 mg/l), односно гљива (25-2000 mg/l). *Идентификација микроорганизама* обављена је применом API и APIWEB технике (BioMérieux, Француска), као и методе полимераза ланчана реакција (PCR). За идентификацију применом API и APIWEB технике коришћен је API 50 CH, док су за ланчану реакцију полимеразе коришћена четири прајмера; за амплификацију 16S rDNK гена коришћени су прајмери UN1_{16S}F и UN1_{16S}R, а за амплификацију *tuf* гена *tuf*GPF и *tuf*GPR прајмери. Продукти PCR реакције (1500 базних парова за 16S rDNK и 791 за *tuf*) пречишћени су коришћењем колоне QIAquick PCR Purification KIT/250 и послати на секвенционирање у MacroGen Sequencing Service (Холандија). Добијене секвенце су депоноване у GenBank бази података. Секвенце су сложене применом CrustalW програма а филогенетско стабло је направљено помоћу MEGA 7. Топологија стабала је оцењена методом поновног узорковања (bootstrap resampling method) са 1000 репликата а *Clostridium botulinum* је укључен као спољашња група. У потпоглављу *Морфолошка идентификација гљива* извршено је поређење добијених резултата о морфолошким особинама гљива са кључем за идентификацију. У потпоглављу *Редукација хрома(VI) помоћу бактеријских изолата и праћење раста бактерија* праћена је способност раста бактеријских изолата 270-9R, 342-9, 212-9, 351-9 и 270-9C у присуству различитих концентрација хрома(VI) (50, 100, 200, 300, 5000 и 1000 mg/l) у течной LB подлози, као и способност редукције хрома(VI) помоћу бактеријских изолата. Раст бактерија праћен је спектрофотометријски на таласној дужини од 600 nm, док је садржај преосталог хрома у супернатанту одређен DPC методом (Park et al., 2000) на таласној дужини од 540 nm. У потпоглављу *Раст биљака на земљишту контаминираном тешким металима* извршен је прелиминарни тест клијања семена различитих биљних врста и установљено да су семена сунцокрета, босиљка, естрагона и уљане репице показала бољу клијавост у односу на друга испитивана семена, због чега су коришћена у даљим истраживањима. Као супстрат су коришћени супстрати добијени мешањем контаминираног и контролног земљишта у односима 10:80 (третман 10), 20:70 (третман 20) и 30:60% (третман 30). Контролу је представљало неконтаминирано земљиште из парка. Инокулација коришћених супстрата је извршена са чистим културама бактеријских изолата 212-9 и 342-9 (најефикаснији изолати у редукцији хрома(VI)) и бактеријских изолата 12/2 и 17/6 који се одликују карактеристикама стимулисања раста биљака (5%, w/w). Супстратима је додат и компост произведен у ЈКП „Стари град“ Шабац у количини од 5% (w/w). Инкубација је трајала три недеље. На крају огледа одређени су проценат клијавости семена и биомаса клијанаца свих биљних врста.

Код сунцокрета, код кога су биомаса клијанаца и проценат клијавости били највећи, AAS методом је одређен садржај хрома(VI) на почетку и крају огледа у супстратима и биљном материјалу. У последњем потпоглављу приказана је *Статистичка обрада података*. У оквиру истраживања микробног диверзитета контаминираниог земљишта коришћен је непараметарски Kruskal-Wallis тест ($p > 0,05$). Анализа варијансе је урађена помоћу Колмогоров-Смирновог теста за испитивање нормалности и Левеновог теста за хомогеност варијансе. Тестирање најмање значајних разлика између редукције хрома(VI) и бактеријског раста при различитим концентрацијама хрома(VI) извршено је помоћу Tuckey HSD теста. Ниво значајности је процењен на $p > 0,05$. Статистичке анализе су изведене по општим процедурама Statistica v. 7 и IBM SPSS Statistic v. 20.

Резултати и дискусија. Резултати истраживања обрађени су у оквиру једанаест потпоглавља и приказани су уз текстуална тумачења, слике, табеле и графиконе, а тумачења и дискусија добијених резултата су приказана концизно и прецизно. У првом и другом потпоглављу *Хемијске карактеристике испитиваног земљишта* и *Садржај метала у испитиваним узорцима земљишта* приказани су резултати хемијских анализа. Резултати указују да је земљиште неутралне до благо алкалне рН вредности (рН у води се креће од 6,88 до 7,73, односно 7,52-8,03 у KCl), високог садржаја органског угљеника (1,84 у узорку 1 до 4,87 у контроли) и добро обезбеђено приступачним калијумом (24,00-30,50 mg/100 g). Садржај укупног азота је највећи у контроли (0,42%) а најмањи у узорку 1 (0,16%), док је садржај приступачног фосфора највећи у узорку 4 (48,10 mg/100 g) а најмањи у узорку 1 (15,93 mg/100 g). Према препорученим вредностима Министарства грађевинарства, просторног планирања и животне средине Холандије (2000), у свим узорцима (осим у контролном) садржај Cd, Mo, Zn, Ba, Cr, Cu, Pb и Ni су изнад максимално дозвољених вредности. Према препорученим вредностима Канадског савета министара за животну средину (2007), садржаји Cr, Cu, Pb, Ni, Zn, Sb, Co, Mo, Sn, V и S су изнад максимално дозвољених вредности. Ови резултати се могу повезати са вишедеценијском контаминацијом локалитета услед активности у кожарској радионици и погонима за хромирање бицикала. Посебно су високи садржаји Cr (од 9457,8 mg/kg у узорку 1 до 12144,2 mg/kg у узорку 4) и Ni (од 19536,3 mg/kg у узорку 2 до 25219,1 mg/kg у узорку 4), што је свакако последица активности у фабрици „Рог“. Контролни узорак се може окарактерисати као неконтаминирани, јер, осим ванадијума (46,8 mg/kg), садржај других елемената не прелази максимално дозвољене концентрације. У трећем потпоглављу *Микробни диверзитет узорака земљишта контаминираних тешким металима* утврђено је да је контаминација утицала на микробни диверзитет земљишта (код укупног броја бактерија је микробни диверзитет смањен за 60,6-93,0%, код гљива за 43,9-98,0% и код актиномицета за 20,8-37,3%). У контролном узорку укупан број бактерија био је највећи ($17,45 \times 10^6$ CFU/g), док се у контаминираним узорцима кретао од $1,21 \times 10^6$ CFU/g у узорку 3 до $6,88 \times 10^6$ CFU/g у узорку 2. Бројност гљива је била највећа у контролном узорку ($54,02 \times 10^3$ CFU/g), док се у контаминираним узорцима кретала од $2,23 \times 10^3$ CFU/g у узорку 4 до $30,3 \times 10^3$ CFU/g у узорку 1. Бројност актиномицета је такође била највећа у контролном узорку ($481,91 \times 10^3$ CFU/g), док се у контаминираним узорцима кретала од $302,15 \times 10^3$ CFU/g у узорку 4 до $381,82 \times 10^3$ CFU/g у узорку 1. Код свих група микроорганизама постоје статистички значајне разлике између испитиваних локација (код бактерија $H=12,433$, $p > 0,05$; код гљива $H=15,1665$, $p > 0,05$; код актиномицета $H=10,83$, $p > 0,05$). У четвртном потпоглављу *Бројност хром-резистентних микроорганизама* утврђено је да је бројност хром-резистентних бактерија била највећа у узорку 2 при рН=7 и концентрацији од 1000 mg/l хрома(VI) ($127,1 \times 10^4$ CFU/g) и при рН=9 и концентрацији од 1500 mg/l хрома(VI) ($126,3 \times 10^4$ CFU/g) а најмања у узорку 1 где су бактерије детектоване само при концентрацијама од 500 и 1000 mg/l хрома(VI) при рН=7 (0,4 и

$0,7 \times 10^4$ CFU/g) и pH=9 ($2,9$ и $2,6 \times 10^4$ CFU/g). Бројност хром-резистентних гљива била је највећа у узорку 1 при pH=5 ($11,8 \times 10^3$ CFU/g) а најмања у узорку 4 при истој pH ($0,2 \times 10^3$ CFU/g). При pH=9 није забележен раст гљива. Укупно су изолована 53 изолата хром-резистентних бактерија, који су морфолошки окарактерисани у петом потпоглављу *Изолација и морфолошка карактеризација хром-резистентних бактерија*. Већина бактерија су Грам-позитивни (36 изолата), штапићасти (28 изолата), спорогени (20 изолата) штапићи. У шестом потпоглављу *Толерантност бактерија на присуство хрома* испитана је толеранција хром-резистентних бактерија на концентрације од 100, 500, 750, 1000 и 1500 mg/l хрома(VI) и утврђено да се са порастом концентрације хрома(VI) у подлози смањује број толерантних изолата. У односу на укупан број хром-резистентних бактерија, толерантни изолати при концентрацији од 100 mg/l хрома(VI) чине 47,1-78,6%, при концентрацији од 500 mg/l хрома(VI) чине 29,4-38,5%, при 750 mg/l хрома(VI) чине 5,9-30,8% и при 1000 и 1500 mg/l хрома(VI) чине 0-23,1%. Само неколико изолата је имало способност толеранције при концентрацијама хрома(VI) вишим од 1000 mg/l: изолати 270-9C, 270-9R и 342-9 из узорка 2, изолат 351-9 из узорка 3 и изолат 212-9 из узорка 4. Ови изолати су морфолошки окарактерисани и сврстани у групу грам-позитивних штапићастих спорогених бактерија. У седмом поглављу одређене су *Минималне инхибиторне концентрације (МИК) хром-резистентних бактерија и гљива*. У овим експериментима коришћени су изолати који су показали способност резистенције и толеранције на концентрације од 1000 и 1500 mg/l хрома(VI), као и изолати хром-резистентних гљива. Утврђено је да сви изолати најбоље расту у контроли (без додатог хрома) и да способност раста опада са повећањем концентрације хрома у подлози. Код већине изолата раст је окарактерисан као слаб при концентрацији од 1500 mg/l хрома(VI) док при концентрацији од 2000 mg/l хрома(VI) раст бактерија и гљива није детектован. У осмом поглављу извршена је *Идентификација изолованих микроорганизама*. Применом API и APIWEB технике, констатовано је да су изолати 270-9R и 342-9 најсличнији врсти *Bacillus pumilus* (степен сличности 99,7%), док су изолати 351-9 и 270-9C најсличнији врсти *Bacillus subtilis* (степен сличности 95,3%). Изолат 212-9 показује највећу сличност са бактеријском врстом *Bacillus thuringiensis* (степен сличности 67,1%). Методом полимераза ланчане реакције и амплификацијом 16S rDNK гена идентификација није била довољно дискриминаторна. Секвенце изолата 270-9R и 342-9 показале су сличност од 99,87% са врстама *Bacillus safensis*, *Bacillus pumilus* и *Bacillus zhangzhouensis*. Секвенце изолата 351-9 и 270-9C су показале идентичност од 99,89% са врстама *Bacillus subtilis*, и врстом *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (идентичност 99,78%), док је секвенца изолата 212-9 најсличнија (идентичност 99,34%) са врстама *Bacillus thuringiensis* и *Bacillus toyonensis*. Међутим, секвенционирање *tuf* гена показало се високо дискриминаторним, јер су бактерије идентификоване до врсте, па и испод нивоа врсте. За изолате 270-9R и 342-9 је доказано да имају високу *tuf* bootstrap вредност и да су повезане са *Bacillus safensis* (CP018100), док су изолати 351-9 и 270-9C идентификовани као *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (CP02921). Изолат 212-9 је најсличнији врсти *Bacillus thuringiensis* (CP003687). Секвенце након *tuf* амплификације за изолате 212-9, 342-9, 270-9R, 351-9 и 270-9C су депоноване у базу NCBI GenBank са приступним бројевима MH122621, MH122622, MH122623, MH122624 и MH122625. Поређењем добијених резултата о морфолошкој карактеризацији гљива са кључем за идентификацију (Samson et al., 2004) изолат 248-7 је идентификован као *Alternaria* spp., изолат 121-7 као *Fusarium verticillioides*, изолат 101-7 као *Penicillium* spp. и изолат 222-7 као *Penicillium digitatum*. У деветом потпоглављу праћен је *Утицај бактеријских изолата на редукцију Cr(VI)* и установљено да је степен редукције хрома зависио од почетне концентрације хрома(VI), врсте бактеријских изолата и времена инкубације. Почетне концентрације од 50 и 100 mg/l хрома(VI) су комплетно

редуковане помоћу свих изолата, осим 270-9C, код кога степен редукције износи више од 99%. Сличан резултат за овај изолат је утврђен и при почетној концентрацији од 200 mg/l хрома(VI). При овој концентрацији, ни изолат 351-9 није имао способност комплетне редукције, док је за остале изолате потврђена комплетна редукција након 24 h (изолати 342-9 и 270-9R) и 48 h (изолат 212-9). При вишим концентрацијама хрома, степен редукције се смањивао. Код већине бактерија, при почетним концентрацијама од 300 и 500 mg/l хрома(VI), почетка слаба редукција је након 6 h праћена наглим падом оптичке густине. Са друге стране, изолат 342-9 је показао максималнију ефикасност у редукцији свих проучаваних почетних концентрација хрома(VI), као и изолат 212-9 при концентрацији од 300 mg/l хрома(VI). У највећем броју узорака констатована је статистички значајна разлика између абиотичке контроле и биотичке редукције хрома(VI). У десетом потпоглављу *Кинетика раста бактеријских изолата током редукције Cr(VI)* утврђено је да степен раста опада са повећањем концентрације хрома(VI) у подлози. Спорији раст у односу на остале изолате примећен је код изолата 270-9C: у већини узорака лаг-фаза је трајала до 18 h (осим при почетној концентрацији од 200 mg/l хрома(VI)), након чега је наступила лог-фаза и трајала до краја инкубационог периода, осим код почетних концентрација од 200 и 1000 mg/l хрома(VI), где је стационарна фаза детектована на крају инкубационог периода. Код изолата 342-9, стационарна фаза је детектована само при високим концентрацијама хрома(VI) након 24 h инкубације а код изолата 212-9 након 48 h инкубације. Хистограми раста изолата 270-9R и 351-9 показују да концентрације хрома(VI) од 300 и 1000 mg/l нису утицале на смањење оптичке густине. Ови резултати потврђују податке из светске литературе да се врсте из рода *Bacillus* sp. могу користити за редукцију различитих почетних концентрација хрома(VI) и да показују способност раста у овим условима. Посебну вредност експерименталних резултата ове докторске дисертације представља изолат *Bacillus safensis* 342-9, који је показао способност редукције свих почетних концентрација хрома(VI). Ефикасност овог бактеријског изолата је знатно већа у поређењу са ефикасношћу до сада јединог описаног изолата ове бактерије MX-3 у редукцији хрома (Shafique et al., 2016), што оправдава примену изолата 342-9 у биоремедијационим технологијама и редукцији хрома из контаминираних животне средине. У једанаестом потпоглављу испитани су *Клијавост семена, биомаса и дужина клијанаца у супстрату са контаминираним земљиштем*. Утврђено је да је највећи степен клијавости семена естрагона (*Artemisia dranunculus*) био у контроли (88%), као и код уљане репице (*Brassica napus*) и износио је 77,8%. Повећањем удела контаминираних земљишта у супстрату долази до смањења процента клијавости, тако да је у третману 10 код естрагона износио 46,7%, у третману 20 4,4% а у третману 30 клијање није забележено. Код уљане репице, степен клијавости у третману 10 износио је 68,9%, у третману 20 17,8%, док у третману 30 клијање није забележено. Код сунцокрета (*Helianthus annuus*) и босиљка (*Ocimum basilicum*) констатовани су идентични проценти клијавости у контроли и третману 10 (код сунцокрета 100%, код босиљка 84,4%), док је повећање удела контаминираних земљишта у супстрату утицало на смањење процента клијавости. Биомаса биљака била је највећа код сунцокрета у свим третманима и кретала се од 20,70 g у третману 30 до 127,92 g у контроли. Најмању биомасу клијанаца имао је естрагон у свим третманима. Просечна дужина репрезентативних клијанаца је била највећа код сунцокрета у свим третманима и кретала се од 1,58 cm у третману 30 до 14,1 cm у контроли.

Резултати указују да је дошло до смањења садржаја хрома у супстратима и акумулације хрома у клијанцима сунцокрета. У контроли је забележено незнатно смањење садржаја хрома (на почетку огледа 28,7 mg/kg, на крају 24,8 mg/kg). Садржај хрома у супстрату је највише редукован у третману 30 (на почетку огледа 1901,23 mg/kg, на крају 1147,77

mg/kg) и износио је 39,6%. У третману 20, степен редукције био је 33,7% (са почетних 1357,79 mg/kg до 899,49 mg/kg) а у третману 10 био је 17,4% (са почетних 723,44 на 597,35 mg/kg). Садржај хрома у контролним биљкама био је незнатан (1,23 mg/kg), док је у третману 10 износио 20,50 mg/kg, у третману 20 21,50 mg/kg и у третману 30 26,71 mg/kg. Овај експеримент потврђује податке из светске литературе да се сунцокрет може користити у циљу ремедијације земљишта контаминираних хромом.

У поглављу **Закључак** кандидаткиња је у кратким тезама изнела најважније закључке до којих је дошла на основу експерименталних резултата. Резултати хемијских анализа указују да се узорци земљишта на локацији бивше фабрике „Рог“ (Љубљана, Република Словенија) могу сматрати контаминираним, јер су садржаји Ba, Cr, Cu, Pb, Ni, B и S изнад ремедијационих вредности. Ови резултати се могу повезати са поступцима галванизације и хромирања у фабрици, што је довело до погоршања квалитета животне средине и наметнуло потребу за ремедијационим технологијама. Узорци земљишта су неутрално до благо алкалне реакције средине, са високим садржајем органског угљеника, добро обезбеђено приступачним калијумом. Узорци се разликују по садржају укупног азота и приступачног фосфора.

У односу на контролни неконтаминирани узорак, у контаминираним узорцима је заступљеност укупног броја бактерија мања за 60,6-93,0%, гљива за 43,9-98,0% и актиномицета за 20,8-37,3%. Између локација постоје статистички значајне разлике у бројности свих група микроорганизама. Број хром-резистентних бактерија био је највећи у узорку 2, при концентрацији хрома од 1000 mg/l и pH вредности 7 ($127,1 \times 10^4$ CFU/g) и концентрацији од 1500 mg/l и pH вредности 9 ($126,3 \times 10^4$ CFU/g). Бактеријски раст при pH вредности од 5 углавном није констатован. Највећа бројност хром-резистентних гљива била је у узорку 1 ($11,8 \times 10^3$ CFU/g) а најмања у узорку 4 ($10,2 \times 10^3$ CFU/g). Из контаминираних узорка земљишта укупно су изолована 52 бактеријска изолата, међу којима доминирају грам позитивне штапићасте спорогене бактерије.

Са порастом концентрације Cr(VI) у подлози, број хром-толерантних бактеријских изолата опада. У односу на контролу, 47,1-78,6%, односно 29,4-38,5% изолата је било способно за раст у присуству 100, односно 500 mg/l Cr(VI). При концентрацији од 750 mg/l Cr(VI) свега 5,9-30,8% изолата имало је способност раста у односу на контролу. Свега 5 изолата (270-9C, 270-9R, 342-9, 351-9 и 212-9) имало је способност раста при концентрацијама од 1000 и 1500 mg/l Cr(VI). Сви изолати били су грам позитивни и спорогени штапићи. Морфолошка, физиолошка и молекуларна идентификација показала је да сви изолати припадају роду *Bacillus* sp. Секвенцирање 16S rDNK није се показало довољно дискриминаторним, док је секвенцирање *tuf* гена показало да су изолати 270-9R и 342-9 најсличнији врсти *Bacillus safensis*, изолати 270-9C и 351-9 врсти *Bacillus subtilis subsp. subtilis* а изолат 212-9 врсти *Bacillus thuringiensis*. Филаментозне гљиве су сврстане у родове *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. и *Penicillium* sp.

Раст хром-толерантних бактерија био је израженији при концентрацијама од 100 и 500 mg/l Cr(VI) у подлози. При концентрацији од 2000 mg/l Cr(VI) раст хром-резистентних бактерија и гљива није забележен.

Степен редукције Cr(VI) зависио је од почетне концентрације Cr(VI), бактеријских изолата и времена инкубације. Од пет бактеријских изолата, четири су имала способност комплетне редукције почетних концентрација 50 и 100 mg/l Cr(VI). При вишим концентрацијама степен редукције је углавном био мањи. Врста *Bacillus safensis* 342-9 имао је способност комплетне редукције свих почетних концентрација Cr(VI), док је врста

Bacillus thuringiensis 212-9 показала способност комплетне редукције концентрације 300 mg/l Cr(VI). Овај изолат је показао најбржи раст, док је најспорији раст био код врсте *Bacillus subtilis subsp. subtilis* 270-9C.

Сунцокрет (*Helianthus annuus* L.), босиљак (*Ocimum basilicum* L.), естрагон (*Artemisia dracunculus* L.) и уљана репица (*Brassica napus* L.) имају способност раста на супстрату који садржи земљиште контаминирано металима. Уљана репица и естрагон су имали највећи степен клијавости у контроли (77,8, односно 88,0%), док је у третманима 10 и 20 клијавост знатно мања. У третману 30, семена ових биљака нису клијала. Сунцокрет, односно босиљак, имали су идентичну клијавост у контроли и третману 10 (100,0, односно 84,4%), док је у третманима 20 и 30 степен клијавости смањен. Свежа биомаса клијанаца била је највећа код сунцокрета (од 20,70 g у третману 30 до 127,92 g у контроли). Најмању биомасу у свим третманима имао је естрагон. Дужина клијанаца је била највећа код сунцокрета (од 1,58 cm у третману 30 до 14,1 cm у контроли). У контроли и третманима 10 и 20 најмању дужину клијанаца имао је босиљак.

Резултати указују да је дошло до смањења садржаја хрома у супстратима и акумулације хрома у клијанцима сунцокрета. Садржај хрома у супстрату је највише редукован у третману 30 (за 39,6%), затим у третману 20 (33,7%), и третману 10 17,4%. Садржај хрома у контролним биљкама био је незнатан (1,23 mg/kg); у третману 10 20,50 mg/kg, у третману 20 21,50 mg/kg и у третману 30 26,71 mg/kg. Овај експеримент потврђује податке из светске литературе да се сунцокрет може користити у циљу ремедијације земљишта која су контаминирана хромом.

3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација мр Доре Илић под насловом: „Хром-редукујући микроорганизми у биоремедијацији земљишта загађеног тешким металима“ представља самостални научни рад који је у потпуности сагласан са планом пријаве докторске дисертације. Докторска дисертација мр Доре Илић даје допринос бољем разумевању диверзитета микроорганизма у контаминираним земљиштима као потенцијала за примену у биоремедијационим технологијама. Кандидаткиња је током експерименталног рада успешно применила већи број различитих савремених метода које су јој омогућиле добијање релевантних резултата. У складу са доступним литературним подацима, кандидаткиња је добијене резултате правилно тумачила и коментарисала. Закључци су концизни, јасни, добро формулисани и правилно изведени и у потпуности произилазе из добијених резултата. Докторска дисертација мр Доре Илић представља оригиналан, актуелан и значајан научни рад, с обзиром да је једна од последица индустријских активности и погоршање квалитета животне средине. Колекција хром-редукујућих микроорганизма, који су изоловани из земљишта загађеног тешким металима, представља основу за даља истраживања и практичну примену на локацијама које су загађене тешким металима. Посебну вредност ове докторске дисертације представља изолат *Bacillus safensis* 342-9, који је показао способност редукције различитих почетних концентрација Cr(VI) чија ефикасност је знатно већа у поређењу са ефикасношћу, до сада у литератури јединог описаног изолата ове бактерије МХ-3 у редукцији хрома.

Ова докторска дисертација доприноси разумевању улоге и значаја микроорганизама у контаминираним земљишту и њиховог потенцијала у побољшању квалитета животне средине и ремедијационим технологијама.

Имајући у виду све изнето, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију кандидаткиње мр Доре Илић, под насловом: „Хром-редукујући микроорганизми у биоремедијацији земљишта загађеног тешким металима“ 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,
25.03.2019.

Чланови комисије:

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

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

Др Драган Киковић, редовни професор (у пензији)
Ужа научна област: Микробиологија
Природно-математички факултет у Косовској
Митровици

Др Гордана Гојгић-Џвијовић, научни саветник
Научна област: Хемија
Универзитет у Београду, Институт за хемију,
технологију и металургију

Др Игор Кљујев, ванредни професор
Ужа научна област: Еколошка микробиологија
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

Прилог:

Сепарат објављеног рада мр Доре Илић у научном часопису на SCI листи

Ћић, D.S., Dimkić, I.Z., Waisi, H.K., Gkorezis, P.M., Hamidović, S.R., Raičević, V.B., Lalević, B.T. (2019): Reduction of hexavalent chromium by *Bacillus* spp. isolated from heavy metals-polluted soil. Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly 2019 OnLine-First Issue 00, Pages: 3-3, <https://doi.org/10.2298/CICEQ180607003I>

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

Датум: 04.04.2019. год.

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације **„Хром-редукујући микроорганизми у биоремедијацији земљишта загађеног тешким металима**, аутора Доре Илић, констатујем да утврђено подударање текста износи 20%. Овај степен подударности последица је цитата, личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података, коришћене методологије, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације), што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Ментор:

др Блажо Лалевић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет
(ужа научна област Еколошка микробиологија)