

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ КАНДИДАТА ДАЈАНЕ КОВАЧ

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
<p>1. Датум и орган који је именовео комисију 13.07.2017. год., седница Наставно-научног већа Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду</p> <p>2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:</p> <p>1. др Зорица Свирчев, редовни професор, ужа научна област Хидробиологија, датум избора: 01.01.2005. год., Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, председник.</p> <p>2. др Сениша Марков, редовни професор, ужа научна област Биотехнологија, датум избора: 15.10.2012. год., Технолошки факултет, Универзитет у Новом Саду, члан.</p> <p>3. др Јелица Симеуновић, ванредни професор, ужа научна област Микробиологија, датум избора: 15.05.2015. год., Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, ментор.</p>
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
<p>1. Име, име једног родитеља, презиме: Дајана, Јарослав, Ковач</p> <p>2. Датум рођења, општина, држава: 14.02.1984. год., Нови Сад, Република Србија</p> <p>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив</p> <p>Природно-математички факултет Универзитета у Новом Саду, Департман за биологију и екологију, дипломске академске – мастер студије, мастер биолог, модул: Микробиологија</p> <p>4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија</p> <p>2010. год., Доктор наука – Биолошке науке</p> <p>5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране:–</p> <p>6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука:–</p>
III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ: „Биотехнолошки потенцијал филamentозних сојева цијанобактерија са подручја Војводине“

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

С обзиром да су цијанобактерије (модрозелене алге) идентификоване као једна од најперспективнијих група организама за изолацију нових и биолошки активних природних продуката, у овој тези одређен је биотехнолошки потенцијал аутохтоних филаментозних сојева цијанобактерија који припадају родовима *Nostoc*, *Anabaena* и *Spirulina*, у смислу продукције биомасе, фикобилипротеинских пигмената, масних киселина, фенолних једињења, антиоксиданата, антибактеријских и антиканцерогених агенаса. Испољени биотехнолошки потенцијал анализираних сојева цијанобактерија указује на њихову потенцијалну употребу као извора нутритивно важних (нутрацеутика) и биолошки активних једињења (фармацеутика) који би могли наћи практичну примену у различитим областима људске делатности.

Докторска дисертација „Биотехнолошки потенцијал филаментозних сојева цијанобактерија са подручја Војводине“ написана је на српском језику, латиничним писмом, а извод је дат на српском и енглеском језику. Теза је написана на 126 страна, садржи 8 поглавља, 39 слика (овим бројем су обухваћене фотографије, графикони и шеме), 28 табела, 3 прилога и 233 литературних навода. Докторска дисертација је подељена у 8 поглавља: 1. Увод – 2 стране, 2. Преглед литературе – 43 стране, 3. Циљеви докторске дисертације – 2 стране, 4. Материјал и методе – 16 страна, 5. Резултати и дискусија – 42 стране, 6. Заључак – 3 стране, 7. Литература – 12 страна и 8. Прилог – 4 стране.

Поред тога, у докторској тези се налазе и захвалница, садржај, биографија кандидата и кључна документацијска информација на српском и енглеском језику.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Наслов

Наслов докторске дисертације је јасно формулисан и у потпуности одговара садржају којим се ова докторска дисертација бави.

Увод

У овом поглављу представљен је значај цијанобактерија као извора различитих примарних и секундарних метаболита са нутритивном вредношћу и/или биолошком активношћу, у циљу апликације у различитим гранама индустрије, првенствено прехранбене и биофармацеутске. Такође се наглашавају проблеми који ограничавају ширу примену ових микроорганизама – присуство цијанотоксина у биомаси и генерално низак принос биомасе. Кандидаткиња истиче значај испитивања различитих сојева цијанобактерија и услова култивације којима се може повећати продукција биомасе код сојева са биотехнолошким потенцијалом.

Комисија сматра да је уводни део написан разумљиво са јасним циљем да се читаоц упозна са проблематиком истраживања и његовим значајем.

Преглед литературе

Ово поглавље је подељено у 8 потпоглавља. Садржи опште карактеристике цијанобактерија са обрађеном проблематиком продукције биомасе и истакнутим значајем употребе одређених фактора култивације у циљу повећања продукције. Детаљно информише о терапеутском и нутритивном потенцијалу цијанобактерија, при чему се цијанобактерије истичу првенствено као продуценти природних колораната и биолошки активних метаболита попут антиканцерогених и антибактеријских агенаса, али и других метаболита са здравственим бенефитима. Такође се истиче потенцијал ових организама за продукцију различитих токсичних метаболита.

Комисија оцењује да је преглед литературе ове дисертације изузетно добар приказ савремених резултата. Поглавље је написано систематично, са великим бројем информација које обухватају све неопходне аспекте за спроведена истраживања.

Циљеви докторске дисертације

Имајући у виду претходно наведене литературне податке, општи циљ ове дисертације је утврђивање биотехнолошког потенцијала десет аутохтоних цијанобактеријских сојева. Реализацију општег циља кандидаткиња је спровела кроз остваривање 10 јасно дефинисаних специфичних циљева који су наведени у поглављу циљеви.

Комисија оцењује да су циљеви докторске дисертације јасно и коректно формулисани.

Материјал и методе

У овом поглављу је детаљно и прегледно описана експериментална поставка свих изведених тестова. Описани су услови култивације испитиваних цијанобактеријских сојева (родови *Nostoc*, *Anabaena*, *Spirulina*), методе за одређивање продукције биомасе и фикобилипротеинских пигмената, поступак припреме цијанобактеријских екстраката за анализе биолошке активности, методе за анализе биолошке активности (антиоксидативна, антиканцерогена, антибактеријска, токсичност), методе за хемијску карактеризацију анализираних сојева (HPLC-MS/MS, GC-FID), као и методе за одабир цијанобактеријских сојева са највећим биотехнолошким потенцијалом на основу анализираних критеријума. Примењене методе статистичке обраде података у потпуности су адекватне и примерене постављеним циљевима. Методе коришћене за анализу добијених резултата су дате заједно са свим формулама неопходним за израчунавања.

Комисија оцењује да су коришћене методе довољно детаљно описане, савремене и адекватне за добијање валидних резултата.

Резултати и дискусија

Поглавље које обухвата резултате и дискусију се састоји од 9 потпоглавља у којима су поред текстуалног описа добијени резултати презентовани путем слика и табела. У првом потпоглављу су приказани резултати продукције биомасе применом различитих услова култивације: у стандардним

условима култивације, под континуалним осветљењем, у условима миксотрофне исхране са додатком глукозе, глицерола, а код азотофиксирајућих сојева и са додатком NaNO_3 као извора азота. Потом следе резултати садржаја фикобилипротеинских пигмената фикоцијанина, алофикоцијанина, фикоеритрина и фикоеритроцијанина, такође у свим наведеним условима култивације. Затим су приказани резултати хемијске карактеризације биомасе испитиваних сојева цијанобактерија - садржај фенолних једињења и масних киселина, након којих су приказани резултати испитивања биолошке активности. Антиоксидативна активност етанолних екстраката је одређена тестовима DPPH и FRAP, антибактеријска активност применом диск-дифузионе и микродилуционе методе према 8 референтних сојева бактерија, док је антиканцерогена активност одређена *in vitro* применом есеја са ћелијском линијом хуманог хепатоцелуларног карцинома, HepG2. Токсичност сојева је детектована у биоесејима *Artemia salina*, *Daphnia magna*, DaГТ тесту, ћелијској линији RTL-W1 и есејима инхибиције ензима PP1 и AChE. На крају су на основу добијених резултата одређени сојеви са највећим биотехнолошким потенцијалом применом метода вишекритеријумске анализе ANP и SAW. Сви добијени резултати су упоређени са резултатима других истраживања, у највећем броју случајева реализованих у протеклој деценији. Дискусија је базирана генерално на подацима за цијанобактерије, нарочито доступним за сојева испитиваних родова. Посебан значај резултата ове докторске дисертације огледа се у сазнањима о биотехнолошки значајним својствима аутохтоних сојева цијанобактерија са подручја Војводине (Република Србија).

Комисија оцењује да су резултати адекватно обрађени, јасно приказани и успешно систематизовани у логичке целине. Добијени резултати су такође објективно продискутовани и упоређени са резултатима других истраживања.

Закључак

У оквиру овог поглавља на основу добијених резултата јасно и систематично су приказани закључци који указују на значајан биотехнолошки потенцијал анализираних сојева цијанобактерија. Комисија сматра да су закључци коректно изведени, утемељени на добијеним резултатима и да представљају адекватан одговор на постављене циљеве.

Литература

У овом поглављу дат је списак цитиране литературе који садржи укупно 233 литературна навода. Литература је цитирана на одговарајући начин и највећи број литературних навода подразумева радове објављене у току последњих 15 година у међународним часописима, који су везани за продукцију различитих метаболита цијанобактерија.

Комисија сматра да је литература адекватно поређана абecedним редом, одговарајућа, са најрелевантнијим светским научним резултатима који су у вези са предметом истраживања ове докторске дисертације.

Прилози

Ово поглавље садржи слике (графиконе) са приказом резултата антиоксидативне активности у DPPH тесту, као и резултата добијених у тестовима коришћеним за детекцију токсичности.

Комисија сматра да прилози садрже податке који су неопходни за детаљан увид у резултате коришћене у дисертацији, без непотребног оптерећивања основних поглавља дисертације.

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

Таксативно навести називе радова, где и када су објављени. Прво навести најмање један рад објављен или прихваћен за објављивање у часопису са ISI листе односно са листе министарства надлежног за науку када су у питању друштвено-хуманистичке науке или радове који могу заменити овај услов до 01.јануара 2012. године. У случају радова прихваћених за објављивање, таксативно навести називе радова, где и када ће бити објављени и приложити потврду о томе.

**Радови и саопштења проистекли из истраживања
у оквиру рада на докторској дисертацији**

Рад у врхунском међународном часопису M21

1. Babić O., **Kovač D.**, Rašeta M., Šibul F., Svirčev Z., Simeunović J. (2015): Evaluation of antioxidant activity and phenolic profile of filamentous terrestrial cyanobacterial strains isolated from forest ecosystem. *Journal of Applied Phycology* 28: 2333–2342.
2. Simeunović J., Bešlin K., Svirčev Z., **Kovač D.**, Babić O. (2013): Impact of nitrogen and drought on phycobiliprotein content in terrestrial cyanobacterial strains. *Journal of Applied Phycology* 25: 597-607

Рад у међународном часопису M23

1. **Kovač D.**, Babić O., Milovanović I., Mišan A., Simeunović J. (2017): The production of biomass and phycobiliprotein pigments in filamentous cyanobacteria: the impact of light and carbon sources. *Applied Biochemistry and Microbiology* 53: 539–545. DOI: 10.1134/S000368381705009X.
2. Milovanović I., Mišan A., Simeunović J., **Kovač D.**, Jambrec D., Mandić A. (2015): Determination of volatile organic compounds in selected strains of cyanobacteria. *Journal of Chemistry*, Volume 2015, 6 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/969542>.

Рад у водећем часопису националног значаја M51

1. **Kovač D.**, Babić O., Simeunović J., Milovanović I., Mišan A. (2014): Determination of fatty acid profile and effects of mixotrophic growth in selected cyanobacterial strains. *Contemporary Agriculture - The Serbian Journal of Agricultural Sciences - 5th CASEE Conference “Healthy food production and environmental preservation - The role of agriculture, forestry and applied biology “*. Spec. issue 63: 184-192.
2. Babić O., Simeunović J., **Kovač D.** (2014): Effect of nitrogen on phycobiliprotein content in nitrogen-fixing cyanobacteria isolated from Serbian forest ecosystems. *Contemporary Agriculture - The Serbian Journal of Agricultural Sciences - 5th CASEE Conference “Healthy food production and environmental preservation - The role of agriculture, forestry and applied biology “*. Spec. issue 63: 291-300.
3. **Kovač D.**, Simeunović J., Babić O., Mišan A., Milovanović I. (2013): Algae in food and feed. *Food and Feed Research* 40: 21-31.
4. Babić O., Simeunović J., Škrbić N., **Kovač D.**, Svirčev Z. (2013): Detection of phosphatase activity in aquatic and terrestrial cyanobacteria. *Zbornik Matice Srpske za Prirodne Nauke* 125: 31-42.

Рад у часопису националног значаја M52

1. Simeunović J., Marković S., **Kovač D.**, Mišan A., Mandić A., Svirčev Z. (2012): Filamentous cyanobacteria from Vojvodina region as source of phycobiliprotein pigments as potential natural colorants. *Food and Feed research* 39: 23-32.

Саопштење са међународног скупа штампано у целини M33

1. Milovanović I., Mišan A., Šarić B., Kos J., Mandić A., Simeunović J., **Kovač D.**: Evaluation of protein and lipid content and determination of fatty acid profile in selected species of cyanobacteria. Proceedings of the 6th Central European Congress on Food, Novi Sad, Serbia, 23-26 May, 2012., pp. 13-17.

Саопштење са међународног скупа штампано у изводу М34

1. **Kovač D.**, Babić O., Simeunović J.: Screening of cyanobacterial toxicity in various in vitro bioassays. Final program and abstract book of the 19th International Congress on In vitro toxicology ESTIV2016, Juan-les-Pins, France, 17-20 October, 2016. pp. 167.

2. **Kovač D.**, Babić O., Simeunović J.: Phosphatase activity in filamentous cyanobacteria. Proceedings of the 5th "Aquatic Biodiversity" International Conference, Sibiu, Romania, 7-10 October, 2015, pp. 22.

3. Babić O., **Kovač D.**, Čučak D., Simeunović J., Radnović D.: The influence of mixotrophic growth on the pigment production in cyanobacterial strains. Proceedings of the 5th "Aquatic Biodiversity" International Conference, Sibiu, Romania, 7-10 October, 2015, pp. 21.

4. **Kovač D.**, Babić O., Simeunović J.: Impact of glycerol on biomass production in *Nostoc* strains isolated from Vojvodina region. III Simpozijum biologa i ekologa Republike Srpske (SBERS 2015), Banja Luka, BiH, 12-14 Novembar, 2015, pp. 66.

5. Babić O., **Kovač D.**, Simeunović J.: The influence of mixotrophic growth on the biomass production in cyanobacterial strains originating from Serbian forest ecosystems. III Simpozijum biologa i ekologa Republike Srpske (SBERS 2015), Banja Luka, BiH, 12-14 Novembar, 2015, pp. 68.

6. Tešanović K., **Kovač D.**, Karaman M., Matavulj M., Simeunović J.: The influence of nitrogen on the production of toxic substances in terrestrial cyanobacterial strains. III Simpozijum biologa i ekologa R. Srpske (SBERS 2015), B. Luka, BiH, 12-14 Novembar, 2015, pp. 63.

7. Milovanović I., Mišan A., Simeunović J., **Kovač D.**, Jambrec D., Jovanov P., Janić Hajnal E., Mandić A.: Characterization of cyanobacterial strains regarding their profile of volatile organic compounds. Book of Abstracts of the 7th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prague, Czech Republic, 3-6 November, 2015, pp. 241.

8. **Kovač D.**, Babić O., Rašeta M., Simeunović J.: Antioxidant activity of filamentous cyanobacterial strains. The book of abstracts of the 6th Congress of European Microbiologists, Maastricht, The Netherlands, 7 –11 June, 2015, pp. 2485-2486.

9. Babić O., **Kovač D.**, Simeunović J.: Toxicity of terrestrial cyanobacterial strains originated from forests of the Serbian mountains. The book of abstracts of the 6th Congress of European Microbiologists, Maastricht, The Netherlands, 7 –11 June, 2015, pp. 1315.

10. Simeunović J., Babić O., **Kovač D.**, Svirčev Z.: Toxicity and antibacterial activity of cyanobacterial strains isolated from Serbian freshwaters. The book of abstracts of the 6th Congress of European Microbiologists, Maastricht, The Netherlands, 7 –11 June, 2015, pp. 1125.

11. Babić O., **Kovač D.**, Simeunović J.: Antibacterial activity of cyanobacterial strains isolated from fresh water ecosystems of Vojvodina region. The book of abstracts of 5th Congress of Macedonian

microbiologists with international participation, Ohrid, R. Macedonia, 28 – 31 May, 2014, pp. 135.

12. **Kovač D.**, Babić O., Simeunović J., Tešanović K.: The influence of nitrogen on the production of toxic and antibacterial substances in cyanobacteria. Abstract book of the 9th European Workshop on the Molecular Biology of Cyanobacteria, Texel, The Netherlands, 7-11 September, 2014, pp. 152.

13. Babić O., **Kovač D.**, Rašeta M., Simeunović J.: Antioxidant activity of cyanobacterial strains isolated from Serbian forest ecosystems. Abstract book of the 9th European Workshop on the Molecular Biology of Cyanobacteria, Texel, The Netherlands, 7-11 September, 2014, pp. 123.

14. **Kovač D.**, Babić O., Simeunović J.: Screening of filamentous cyanobacterial strains for antibacterial activity. Programme and Abstracts of Workshop “Novel antimicrobial agents and strategies for pathogen control”. Novi Sad, Serbia, 25-26 July, 2014, pp. 43.

15. Simeunović J., **Kovač D.**, Babić O., Svirčev Z.: Antibacterial activity and toxicity of water blooming cyanobacterial strains. Programme and Abstracts of Workshop “Novel antimicrobial agents and strategies for pathogen control”, Novi Sad, Serbia, 25-26 July, 2014, pp. 48.

16. Milovanović I., Mišan A., Simeunović J., **Kovač D.**, Jambrec D.: Determination of volatile odour compounds in selected species of microalgae. Book of abstracts of the 15th European Meeting on Environmental Chemistry EMEC15, Brno, Czech Republic, 3-6 December, 2014 pp. 124.

17. **Kovač D.**, Simeunović J., Babić O.: The influence of light and glucose on biomass production of the aquatic cyanobacterial strain *Spirulina* spp. Proceedings of the 4th "Aquatic Biodiversity" International Conference, Sibiu, Romania, 8-11 October, 2013, pp. 82.

18. Babić O., Simeunović J., **Kovač D.**: The influence of nitrogen on the toxicity of cyanobacterial strain *Microcystis* PCC7806. Proceedings of the 4th "Aquatic Biodiversity" International Conference, Sibiu, Romania, 8-11 October, 2013, pp. 77.

19. Babić O., Simeunović J., Rašeta M., Karaman M., **Kovač D.**: Detection of antioxidant activity of cyanobacterial strains by FRAP method. The book of abstracts of 47 Days of preventive medicine – International Congress, Niš, Republika Srbija, 24 – 27 Septembar, 2013, pp. 66.

20. Babić O., Simeunović J., **Kovač D.**, Svirčev Z.: The influence of phosphorus on toxicity of the cyanobacterial strain *Microcystis* PCC7806. Abstract book of the 4th Congress of Ecologists of The Republic of Macedonia, with International Participation, Ohrid, Macedonia, 12-15 October, 2012, pp. 159.

21. Simeunović J., Svirčev Z., **Kovač D.**, Babić O.: Occurrence of toxic cyanobacterial blooms in lakes and reservoirs of Vojvodina region (Serbia). Abstract book of the 4th Congress of Ecologists of The Republic of Macedonia, with International Participation, Ohrid, Macedonia, 12-15 October, 2012, pp. 157.

22. **Kovač D.**, Simeunović J., Babić O., Svirčev Z.: Toxicity detection of water cyanobacterial strains. using *Artemia salina* bioassay. Abstract book of the 4th Congress of Ecologists of The Republic of Macedonia, with International Participation, Ohrid, Macedonia, 12-15 October, 2012, pp. 160

23. Milovanović I., Mišan A., Beljkaš B., Mandić A., Simeunović J., **Kovač D.**: Species of cyanobacteria as potential components of functional foods. Abstract book of the 4th International Congress on Food and

Nutrition together with the 3rd SAFE Consortium International Congress on Food Safety, Istanbul, Turkey, 12-14 October, 2011, pp. 65.

24. Simeunović J., Škrbić N., Kovač D., Bešlin K., Svirčev Z.: Extracellular phosphatase activity of cyanobacterial strains from Vojvodina region. Proceedings of the 7th Balkan Congress of Microbiology together with the 8th Congress of Serbian Microbiologists, ISBN 978-86- 914897-0-01, Belgrade, Serbia, 25-29 October, 2011.

Саопштење на домаћим научним скуповима штампано у изводу М64

1. Kovač D., Babić O., Simeunović J.: The influence of mixotrophy and light regime on phycobiliproteins in nitrogen-fixing cyanobacteria. Programme & Abstracts of the 3rd Balkan Scientific Conference on Biology, Plovdiv, Bulgaria, 30 May – 1 June, 2014, pp. 44-45.

2. Babić O., Kovač D., Simeunović J.: The influence of mixotrophy and light regime on phycobiliproteins in nitrogen-fixing cyanobacteria. Programme & Abstracts of the 3rd Balkan Scientific Conference on Biology, Plovdiv, Bulgaria, 30 May – 1 June, 2014, pp. 44-45.

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Производња биомасе код свих испитиваних цијанобактеријских сојева зависила је од примењених услова култивације. Међу испитаним факторима, у правцу стимулације производње биомасе нарочито су деловали континуално осветљење и глицерол, при чему је код сојева рода *Spirulina* производња биомасе била јаче стимулирана континуалним осветљењем, а код азотофиксирajuћих сојева родова *Nostoc* и *Anabaena* органским изворима угљеника. Као сој са највећим потенцијалом за производњу биомасе издваја се *Spirulina* S1, код ког је регистрована највећа производња од 4,4 мг/мл у условима континуалног осветљења, што је било око 4,5 пута више у односу на биомасу добијену у контроли.

Тестирани сојеви цијанобактерија представљају значајан извор фикобилипротеинских пигмената, на чији квалитативни и квантитативни садржај су велики утицај имали услови култивације. Код већине сојева у тестираним условима првенствено су регистровани РС и АРС. Највећи садржај ових пигмената утврђен је у условима континуалног осветљења код сојева *Spirulina* S1 са 103,9 µг/мл РС и 197,45 µг/мл АРС (повећани 12 и 16 пута у поређењу са контролом) и *Nostoc* 2S1 са 100,5 µг/мл РС и 33,5 µг/мл АРС. Применом глукозе садржај фикобилипротеина је повећан код шест сојева, а применом глицерола код седам сојева. Као сојеви са највећим потенцијалом за производњу ових пигмената издвајају се *Spirulina* S1, *Nostoc* 2S1, *Anabaena* С2 и *Spirulina* S2.

Масно киселински садржај цијанобактеријских сојева варирао је у зависности од соја и од услова култивације. Масне киселине са 16 и 18 угљеникових атома су доминирале код свих испитиваних сојева, од којих су најзаступљеније биле палмитинска, палмитолеинска, олеинска, линолна, α-линолеинска и γ-линоленска. Код свих сојева изузев *Nostoc* LC1В садржај полинезасићених масних киселина био је већи у односу на садржај засићених и мононезасићених масних киселина, и кретао се у опсегу од 25,58% код соја *Nostoc* 2S9В до 57,55% код соја *Nostoc* 2S3В. Оба испитана соја рода *Spirulina* су продуковала γ-линоленску киселину, док су сви испитани азотофиксирajuћих сојеви родова *Nostoc* и *Anabaena* продуковали γ-линолеинску киселину, при чему резултати указују на значај азотофиксирajuћих услова култивације у циљу повећања производње α-линолеинске киселине. Само код два соја *Nostoc* 2S1 и *Nostoc* S8 детектована је еикозапентаенска киселина. Добијени резултати указују на то да би тестирани сојеви цијанобактерија могли представљати значајан извор есенцијалних супстанци типа масних киселина.

Квалитативни и квантитативни садржај фенолних једињења разликовао се међу родовима, али и међу сојевима истог рода. Код испитиваних цијанобактеријских сојева детектовано је укупно 8

фенолних једињења: хинска киселина, хлорогена киселина, гална киселина, катехин, епикатехин, рутин, кемферол и апиин, при чему су најзаступљеније компоненте биле хинска киселина и катехин. Највећи садржај детектованих фенолних једињења забележен је код соја *Nostoc* 2S7B са 701,69 $\mu\text{g/g}$ суве масе и садржајем хинске киселине од 594,43 $\mu\text{g/g}$ суве масе, док је највише фенолних једињења (7) детектовано код соја *Nostoc* 2S9B. Добијени резултати такође показују значајан утицај азотних услова култивације на продукцију фенолних једињења код тестираних сојева цијанобактерија.

Сви испитивани сојеви цијанобактерија су испољили антиоксидативну активност. IC_{50} вредности испитаних етанолних екстраката у DPPH тесту биле су у опсегу од 0,04 мг/мл за сој *Nostoc* LC1B који је испољио највећу способност „хватања“ DPPH радикала, до 9,47 мг/мл за сој *Nostoc* 2S9B који је испољио најнижу активност. Редукциони потенцијал одређен применом FRAP теста се статистички значајно разликовао међу припадницима различитих родова и био је највећи код сојева рода *Spirulina*. Највећи редукциони потенцијал је регистрован код екстракта соја *Spirulina* S1 са 21,01 мг ААЕ/г, док је најмањи редукциони потенцијал регистрован у екстракту соја *Nostoc* 2S3B са 8,36 мг ААЕ/г. Статистичком анализом показано је да детектовани феноли нису били главни носиоци антиоксидативне активности тестираних екстраката цијанобактерија, осим у случају сојева култивисаних у неазотофиксирајућим условима у FRAP тесту. Релативним поређењем резултата регистроване антиоксидантне активности у два коришћена теста, као сојеви са највећим антиоксидантним потенцијалом издвајају се *Spirulina* S1 и *Spirulina* S2.

Антибактеријска активност интрацелуларних метанолних екстраката детектована је код 6 цијанобактеријских сојева: *Nostoc* 2S7B, *Nostoc* 2S1, *Anabaena* Č2, *Anabaena* Č5, *Spirulina* S1 и *Spirulina* S2. Сојеви *Anabaena* Č2, *Nostoc* 2S7B и *Nostoc* 2S1 су испољили најјачу активност, делујући инхибиторно на четири бактеријска соја (*S. enteritidis* ATCC 13076, *E. faecalis* ATCC 19433, *P. aeruginosa* ATCC 9027 и *B. subtilis* ATCC 6633). Метанолни екстракти показали су већу ефикасност у односу на ДМСО екстракте. Најосетљивији на деловање екстраката били су бактеријски сојеви *S. enteritidis* ATCC 13076 и *E. faecalis* ATCC 19433 на које је антибактеријску активност испољило шест цијанобактеријских сојева.

Применом МТТ теста показано је да сви испитани цијанобактеријски сојеви испољавају антиканцерогену активност *in vitro* према ћелијској линији хуманог хепатоцелуларног карцинома, HepG2. Уочена је дозно-зависна цитотоксична активност јер се вијабилност ћелија смањивала са повећањем концентрације тестираних екстраката. Регистроване LC_{50} вредности су биле у опсегу од 37,76 $\mu\text{g/ml}$ за сој *Nostoc* LC1B који је показао највећу активност до 534 $\mu\text{g/ml}$ за сој *Nostoc* 2S9B који је испољио најслабију антиканцерогену активност. Код свих тестираних сојева изузев *Nostoc* 2S9B, LC_{50} вредност је била испод 200 $\mu\text{g/ml}$, што у поређењу са позитивном контролом ($\text{LC}_{50}=19,49$ $\mu\text{g/ml}$) указује на значајан цитотоксичан ефекат и потенцијал продукције антиканцерогених супстанци.

Испитивањем акутне токсичности интрацелуларних екстраката у биоесејима (*A. salina*, *D. magna* и *D. rerio*) констатован је мали број сојева који су испољили токсичност на тест организме, што са аспекта потенцијалне биотехнолошке примене сојева има велики значај. Биоесеј *A. salina* показао се као најмање осетљив, док су се биоесеј *D. magna* и DarT тест показали као осетљивије методе за детекцију укупне токсичности цијанобактеријских узорака. У случају детектоване токсичности уочена је дозна-зависност, као и временска зависност у испољавању активности. Добијени резултати указују на највећу токсичност сојева *Nostoc* LC1B и *Nostoc* S8, који су испољили токсичност у сва три биоесеја. Испитивањем токсичности *in vitro* у ензимским есејима констатовано је да је мањи број сојева (2) инхибирао активност ензима PP1 у односу на активност ензима AChE (6 сојева) указујући на могућност ових сојева да продукују неуротоксине и/или инхибиторе AChE. Специфична осетљивост датих ензима према тестираним екстрактима сојева може да укаже на различит садржај токсичних компоненти цијанобактеријских сојева. У циљу биотехнолошке примене токсичних једињења потребно је извршити специфичније хемијске анализе присуства и

идентификације токсичних продуката сојева. Тестирани сојеви цијанобактерија нису испољили цитотоксичност *in vitro* на ћелијску линију RTL-W1.

Применом метода вишекритеријумске анализе (АНР и SAW) које су коришћене за одређивање сојева цијанобактерија са највећим биотехнолошким потенцијалом у групном контексту, највећу тежину је добио критеријум Антикандерогена ативност (KANC) (0,191), на другом месту је критеријум Продукција биомасе (X_{max}) са тежином 0,153, док је последње рангиран критеријум Укупан садржај фенолних једињења (TPC) са тежином 0,050. Највећу тежину 0,192 је добио сој *Spirulina* S1 који је у вишекритеријумском контексту најбоље рангирана алтернатива (сој). На другом месту је сој *Spirulina* S2 (0,144), на трећем сој *Nostoc* LC1B (0,131) док је сој *Nostoc* 2S9B на последњем (десетом) месту са тежином 0,041.

Комисија оцењује да су добијеним резултатима и изведеним закључцима испуњени постављени циљеви овог истраживања.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Кандидаткиња Дајана Ковач је експерименте добро испланирала и правилно извела. Докторска дисертација је добро конципирана и урађена у складу са темом дисертације, планом и циљевима предвиђеним у пријави теме. Резултати истраживања су адекватно обрађени, јасно приказани и успешно систематизовани у логичке целине. Добијени резултати су објективно продискутовани и упоређени са резултатима других истраживања. Кроз дискусију остварених резултата изведени су закључци који дају одговоре на постављене циљеве докторске дисертације. На основу наведеног, Комисија позитивно оцењује начин приказа и тумачења резултата истраживања.

IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме
Комисија оцењује да је докторска дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе
Комисија оцењује да ова докторска дисертација садржи све битне елементе.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци
Комисија сматра да ова докторска дисертација представља оригиналан допринос науци. Подаци о продукцији одређених биоактивних агенаса и хемијских компонената аутохтоних сојева цијанобактерија, првенствено оних испитаним у овој дисертацији, раније нису били доступни. Штавише, о продукцији фенолних једињења код цијанобактерија постоји свега неколико литературних навода, а у овој дисертацији утврђена је продукција фенолних једињења код свих анализираних сојева, при чему посебан значај има резултат о продукцији катехина и хинске киселине код азотофиксирајућих сојева родова *Nostoc* и *Anabaena*. За све испитане сојеви по први пут је утврђена цитотоксична активност према ћелијама канцера, односно регистрован је цитотоксичан ефекат на ћелије хепатоцелуларног карцинома, указујући на значајан ресурс потенцијалних антиканцерогених агенаса. Одређени сојеви су идентификовани као изузетни продуценти антиоксиданата и фикобилипротеинских пигмената, при чему посебан допринос представља утврђивање утицаја различитих фактора у циљу повећања продукције ових једињења. Свеукупно, ова докторска дисертација представља допринос досадашњим сазнањима у области, у циљу ширег сагледавања потенцијала цијанобактерија као ресурса различитих природних продуката - пигмената, антиоксиданата, антибактеријских и антиканцерогених агенаса и других једињења са здравственим бенефитима у циљу њихове употребе првенствено у прехранбеној и биофармацеутској индустрији.

4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања
Комисија оцењује да ова докторска дисертација не садржи било какве недостатке који би битно утицали на реализацију постављених циљева и резултате истраживања.

X ПРЕДЛОГ:

На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:

Комисија предлаже да се докторска дисертација под насловом „Биотехнолошки потенцијал филаментозних сојева цијанобактерија са подручја Војводине“ **прихвати** и да се **кандидаткињи Дајани Ковач одобри одбрана.**

У Новом Саду, 24.07.2017.

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

др Зорица Свирчев, редовни професор, председник

др Срниша Марков, редовни професор, члан

др Јелица Симеуновић, ванредни професор, ментор