

ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ НОВИ САД

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

-обавезна садржина- свака рубрика мора бити попуњена

(сви подаци уписују се у одговарајућу рубрику, а назив и место рубрике не могу се мењати или изоставити)

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
<p>1. Датум и орган који је именовао комисију Дана 05.07.2019. на 35. седници Наставно-научног већа Технолошког факултета Нови Сад именована је Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата MSc Ане Видаковић под насловом „Денитрификатор <i>Pseudomonas stutzeri</i> – изоловање, оптимизација биопроцесних параметара и примена”.</p> <p>2. Састав комисије са знаком 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> <ol style="list-style-type: none"> 1. др Јоњауа Рангајец, редовни професор; ужа научна област: Инжењерство материјала; изабрана у звање: 19.11.1996.; Технолошки факултет Нови Сад, председник 2. др Сениша Марков, редовни професор; ужа научна област: Биотехнологија; изабран у звање: 15.10.2012.; Технолошки факултет Нови Сад, ментор 3. др Јована Граховац, ванредни професор; ужа научна област: Биотехнологија; изабрана у звање: 01.10.2017.; Технолошки факултет Нови Сад, члан 4. др Александра Ранитовић, доцент; ужа научна област: Биотехнологија; изабрана у звање: 01.10.2017.; Технолошки факултет Нови Сад, члан 5. др Наташа Ђурчић, научни сарадник; ужа научна област: Биотехничке науке – Прехрамбено инжењерство; изабрана у звање 26.09.2018.; Научни институт за прехрамбене технологије у Новом Саду, члан
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
<ol style="list-style-type: none"> 1. Име, име једног родитеља, презиме: Ана, Миленко, Видаковић 2. Датум рођења, општина, држава: 26.01.1989., Зрењанин, Република Србија 3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив Технолошки факултет Нови Сад, мастер академске студије студијског програма Биотехнологија, мастер инжењер технологије 4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија 2013. година, докторске академске студије, студијског програма Биотехнологија 5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: / 6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: /

III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ: „Денитрификатор <i>Pseudomonas stutzeri</i> – изоловање, оптимизација биопроцесних параметара и примена”
IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ: Навести кратак садржај са знаком броја страна, поглавља, слика, шема, графикона и сл.
Докторска дисертација се састоји из 8 поглавља написаних на 123 странице, са 35 слика и 22 табеле и 125 литературних навода. Кључна документацијска информација је написана на српском и енглеском језику и приложена је на крају докторске дисертације. Списак поглавља: <ol style="list-style-type: none">1. Увод (стр. 1-2)2. Циљеви истраживања (стр. 3-4)3. Преглед литературе (стр. 5-39)4. Материјал и методе (стр. 40-59)5. Резултати и дискусија (стр. 60-104)6. Закључци (стр. 105-108)7. Литература (стр. 109-117)8. Прилози (стр. 118-123)
V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:
<p>У Уводном делу докторске дисертације истиче се важност изоловања и карактеризације нових сојева који припадају групи потпуних денитрификатора. С обзиром на то да стопа акумулације нитрата у земљишту и подземним водама експоненцијално расте, чиме се ремети равнотежа у циклусу кружења азота, посебно је наглашена потреба за производњом активне биомасе денитрификатора која била коришћена у биоремедијационим третманима земљишта, воде, као и за уклањање наслага соли са грађевинских материјала.</p> <p>У поглављу Циљеви истраживања дефинисан је основни циљ истраживања докторске дисертације који подразумева изоловање и карактеризацију денитрификатора уз оптимизацију биотехнолошких услова производње његове биомасе и испитивање ефикасности произведене биомасе у погледу биочишћења различитих грађевинских материјала. Испуњење основног циља истраживања реализовано је сукцесивним решавањем специфичних циљева: (1) изоловање, селекција и идентификација денитрификатора из водених екосистема, (2) оптимизација састава хранљивих подлога за производњу биомасе денитрификатора, (3) испитивање утицаја одабраних параметара култивације на производњу биомасе денитрификатора, (4) валидација оптимизованих параметара култивације у лабораторијским биореакторима, (5) испитивање стабилности биомасе денитрификатора ресуспендоване у одговарајућој течности у погледу задовољавајуће вијабилности и виталности ћелија приликом складиштења и (6) испитивање ефикасности одабраног денитрификујућег бактеријског изолата у циљу уклањања нитрата са различитих грађевинских материјала у лабораторијским условима.</p> <p>На почетку поглавља Преглед литературе детаљно је описан азотни циклус као основа за разумевање предмета докторске дисертације. Посебна пажња посвећена је прегледу актуелне литературе и досадашњих достигнућа у проучавању денитрификатора, а посебно аеробних денитрификатора. Истакнут је значај испитивања постојања денитрификујућих гена у геному денитрификатора као и неопходност коришћења савремених метода за идентификацију микроорганизама. Од свих познатих потпуних денитрификатора издвојен је <i>Pseudomonas stutzeri</i> који је детаљно описан и анализиран као модел микроорганизам за проучавање процеса денитрификације. Поред тога, систематично су наведене досадашње примене денитрификатора у уклањању нитрата из земљишта, воде и са различитих грађевинских материјала уз наглашавање потребе за изоловањем нових сојева са потенцијално већом ефикасношћу. Такође, дати су основи појмови и кораци у биотехнолошкој производњи биомасе укључујући дефинисање састава хранљиве подлоге, избор процесних параметара од значаја, производња биомасе у увећаним размерама и моделовање и оптимизација биотехнолошких процеса. Свеобухватним прегледом</p>

релевантне литературе указано је на чињеницу да производња биомасе денитрификатора уз претходну оптимизацију биопроцесних параметара до сада није била предмет истраживања.

Поглавље **Материјал и методе** је конципирано тако да обухвати све примењене методе, технике, хемикалије и лабораторијске уређаје коришћене у свим сегментима докторске дисертације. Ово поглавље подељено је на пет основних потпоглавља, што је и шематски приказано: (1) изоловање, селекција и идентификација денитрификатора, (2) амплификација денитрификујућих гена, (3) оптимизација састава хранљивих подлога и одабраних биопроцесних параметара, (4) производња биомасе денитрификатора у лабораторијским биореакторима, (5) примена денитрификатора. Сви подаци у оквиру овог поглавља су детаљно приказани осигуравајући поновљивост експеримената.

У поглављу **Резултати и дискусија** приказани су резултати експеримената постављених у овој докторској дисертацији. Резултати истраживања су приказани табеларно или на сликама и образложени на јасан, методолошки разумљив и прегледан начин. Поглавље Резултати и дискусија подељено је на пет основних потпоглавља:

- У потпоглављу **Резултати изоловања, селекције и идентификације денитрификатора** приказани су резултати изоловања денитрификатора из Дунава и канала Дунав-Тиса-Дунав. Осим тога, наведени су резултати селекције и идентификације одабраних денитрификатора помоћу уређаја VITEK®2 Compact System и MALDI TOF масене спектрометрије. У оквиру овог потпоглавља приказани су резултати испитивања кинетике денитрификације референтног соја и природног изолата *P. stutzeri* D1, као и безбедности примене денитрификатора у поступцима биоремедијације.
- У потпоглављу **Резултати амплификације денитрификујућих гена** приказани су резултати амплификације четири кључна денитрификујућа гена *narA*, *nirS*, *norB* и *nosZ* из генома *P. stutzeri* ATCC 17588 и *P. stutzeri* D1. У овом сегменту је укључена опширна дискусија на основу резултата добијених Lab-on-chip електрофорезом PCR продуката на основу чега је претпостављен пут одвијања процеса аеробне денитрификације у ћелијама испитиваних денитрификатора.
- У потпоглављу **Дефинисање састава медијума и оптимизација одабраних биопроцесних параметара за умножавање биомасе денитрификатора** представљени су резултати испитивања утицаја иницијалних концентрација C и N на кинетику раста денитрификатора и формулације састава медијума за производњу биомасе применом Бокс-Бенкеновог експерименталног дизајна и методе одзивне површине. Такође, приказани су резултати испитивања утицаја температуре, иницијалне pH вредности култивационе течности и величине инокулума на садржај биомасе *P. stutzeri*.
- У оквиру потпоглавља **Валидација оптимизованих параметара култивације у лабораторијским биореакторима** приказани су резултати нове серије огледа у лабораторијским биореакторима укупне запремине 3 и 7 L, а који су изведени на основу резултата приказаних у претходном потпоглављу. Осим приказаног броја ћелија током култивације, приказани су и резултати анализе култивационе течности у погледу садржаја глукозе и укупног азота у циљу праћења укупне ефикасности изведеног биопроцеса и оптерећености отпадног тока. Такође, представљени су и анализирани резултати испитивања стабилности произведене биомасе денитрификатора у погледу одржавања виталности и вијабилности ћелија ресуспендованих у стерилном физиолошком раствору или стерилној дестилованој води током складиштења на температури фрижидера (4 °C) и температури замрзивача (-20 °C).
- У потпоглављу **Примена денитрификатора** дати су резултати испитивања ефикасности денитрификатора на модел супстратима опеке помоћу индиректне FTIR методе, то јест интеграцијом површине пика на 1380 cm⁻¹, који је карактеристичан за нитрате. Осим тога, након приказа резултата минералоских и текстуралних карактеристика стенског материјала представљени су и резултати испитивања ефикасности денитрификатора на стенском материјалу добијени јонском хроматографијом.

- У поглављу **Закључци** су јасно и концизно формулисани закључци који су проистекли из истраживања спроведених у оквиру докторске дисертације. Сви изведени закључци су у складу са постављеним циљевима истраживања и утемељени су на приказаним резултатима.
- Поглавље **Литература** представља преглед библиографских јединица које су коришћене у свим поглављима докторске дисертације. Ово поглавље садржи 125 литературна навода, а коришћена литература је адекватна, актуелна и у потпуности обухвата релевантне изворе везане за тематику истраживања.
- У поглављу **Прилози** дат је протокол за екстракцију ДНК, која је коришћена приликом амплификације денитрификајућих гена. Такође, приказане су и две табеле са детаљним карактеристикама 140 изолата из Дунава и канала Дунав-Тиса-Дунав.

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.

М21а- Рад у међународном часопису изузетних вредности

1. Вучетић С., Раногајец Ј., Марков С., **Видаковић А.**, Хиршенбергер Х., Бера О. (2017): Development and modeling of the effective bioactive poultices for reducing the nitrate content in building materials. *Construction and Building Materials* 142: 506-513.

М23- Рад у међународном часопису

1. **Видаковић А.**, Шовљански О., Вучуровић Д., Рацић Г., Ђилас М., Ђурчић Н., Марков С. (2019): Novel denitrifying bacteria *Pseudomonas stutzeri* strain D1 – from isolation to the biomass production, *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, <https://doi.org/10.2298/CICEQ190111018V>

М24- Рад у часопису међународног значаја верификован посебном одлуком

1. **Ана М. Видаковић**, Оља Љ. Шовљански, Александра С. Ранитовић, Драгољуб Д. Цветковић, Сениша Ј. Марков (2017): Determination of culture medium composition for maximizing the biomass production of *Pseudomonas stutzeri*, *Acta Periodica Technologica* 48: 295-305, <https://doi.org/10.2298/APT1748295V>

М33- Саопштење са међународног скупа штампано у целини

1. Вучетић С., Раногајец Ј., Хиршенбергер Х., van der Bergh J.M., **Видаковић А.**, Марков С. (2018): Cleaning and protection of historic objects – biotechnology and nanotechnology approach, *International Conference Florence Heri-Tech The Future of Heritage Science and Technologies*, 16-18.05.2018. Firenca, Italija. IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering 364, 012071, doi: 10.1088/1757-899X/364/1/012071

М34- Саопштење са међународног скупа штампано у изводу

1. Вучетић С., Раногајец Ј., Марков С., **Видаковић А.**, Хиршенбергер Х., Пашалић С. (2016): Novel desalination biocleaning systems for the reduction of nitrate salts in building materials, *American Advanced Materials Congress, Royal Caribbean Ship, Мајами, САД, 04-09.12.2016.*, Књига апстраката 79.

М62- Предавање по позиву са скупа националног значаја штампано у изводу

1. Марков С., Видаковић А., Шовљански О. (2018): Application of bacteria for salt removal from cultural heritage objects, , 10-12.05.2018. Београд, Србија, Књига апстраката, 173-174.

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Добијени резултати у оквиру ове докторске дисертације се могу сумирати кроз следеће закључке:

- Оригиналом процедуром изоловања денитрификатора из водених средина издвојено је укупно 140 изолата (74 из Дунава и 66 из канала Дунав-Тиса-Дунав). На основу макроморфолошких, микроморфолошких и културабилних особина у поступку селекције денитрификатора издвојено је 10 изолата који по својим особинама одговарају *Pseudomonas stutzeri* ATCC 17588, соју који представља модел микроорганизам у проучавању процеса денитрификације.
- Потврда процедуре изолације добијена је применом Vitek 2® Compact System, тј. уређајем који припада другој генерацији метода идентификације. Од 10 селектованих изолата један је идентификован као *Pseudomonas stutzeri* који је у даљим анализама означен као *P. stutzeri* D1. Изолат D1 и референтни сој *P. stutzeri* су додатно идентификовани методом четврте генерације, најсавременијим уређајем MALDI-TOF MS, чиме је несумњиво потврђено да претходно идентификован сој припада врсти *Pseudomonas stutzeri*.
- Потентност денитрификације изолата D1 је доказана праћењем њене кинетике. Овај сој успешно редукује 3 g/L калијум-нитрата у култивационој течности у временском интервалу од 34 до 48 h, а референтни соја *P. stutzeri* редукује исту концентрацију калијум-нитрата у интервалу од 48 до 60 h. Додатан квалитет изолованог соја је што је једнако сензитиван према свим антибиотицима као и референтни сој. Способност адхезије ћелија је минимална за оба соја и на основу ових резултата доказано да је потенцијална примена D1 безбедна за животну средину.
- Амплификацијом четири кључна денитрификујућа гена: *narA*, *nirS*, *norB* и *nosZ* у геному *P. stutzeri* ATCC 17588 и *P. stutzeri* D1 помоћу PCR методе чиме је показано да изоловани сој има способност да врши потпуну аеробну денитрификацију као и референтни сој према следећим редукционим корацима:
нитрат→нитрит→азот-моноксид→азот-субоксид→молекулски азот
- Следећа група оригиналних и вредних резултата добијена је одређивањем састава хранљиве подлоге за максималну производњу биомасе испитиваних сојева помоћу статистичких техника. Да би се остварила максимална производња биомасе соја D1 хранљива подлога се мора састојати од 1 g/L глукозе, 3 g/L KNO₃ и 4 g/L пептона, а у случају референтног соја хранљива подлога мора да садржи 2 g/L KNO₃ и 4 g/L пептона.
- Испитивањем утицаја одабраних процесних параметара утврђено је да се максимални садржај биомасе оба соја од приближно 9 log CFU/mL постиже за 24 h при температури од 30 °C, почетној pH вредности култивационог медијума од 7 јединица и уз величину инокулума од 5 % (v/v).
- Трећа група релевантних резултата добијена је валидацијом оптимизованих параметара култивације кроз scale-up процеса добијања максималног садржаја биомасе. Под претходно утврђеним условима у два биореактора укупних запремина 3 L и 7 L, уз карактеризацију отпадног тока биопроцеса. Резултати валидације оптимизованих параметара култивације указују на стабилност биопроцеса приликом увећања запремине култивационе течности за 20 (биореактор од 3 L) и 50 пута (биореактор од 7 L), при чему је садржај биомасе оба соја износио приближно 9 log CFU/mL. Анализом култивационих течности, на крају биопроцеса, доказано је да се са референтним сојем током култивације у биореактору укупне запремине 3 L се постиже конверзија укупног азота од 81,76%, а у биореактору веће запремине 71,14%. Ефикасније искоришћење нутријената запажено је код *P. stutzeri* D1 јер је током производње биомасе у биореактору од 3 L конвертовано 95,79% укупног азота и 70% глукозе, док је у биореактору од 7 L искоришћено 90,60% укупног азота и 60% глукозе. Карактеризацијом ефлуената, тј. отпадних токова ових биопроцеса показан је мали утицај на загађење животне средине.
- За полуиндустријску производњу су значајни и резултати испитивања утицаја температуре складиштења суспензија на вијабилност одабраних денитрификатора. Доказана је могућност чувања свеже припремљених суспензија денитрификатора на температури фрижидера у стерилној дестилованој води и стерилном физиолошком раствору током 30 дана уз потпуно очување вијабилности и виталности ћелија. Ово је веома значајно из угла

примене денитрификатора у поступку биочишћења грађевинских материјала, јер чување денитрификатора у дестилованој води омогућава њихову директну инкорпорацију у глинене пулпе током формирања биоактивних система за поступак биочишћења, без уношења додатних јона који могу изазвати даље оштећење материјала.

- Од изузетне важности су и резултати добијени у завршној фази докторске дисертације, а која се односи на практичну примену произведене биомасе денитрификатора. Резултати указују да ефикасност биоактивних система, који су сачињени од минералне пулпе и суспензије денитрификатора, на површини вештачки контаминираних модел супстрата опеке (2 mm) износи приближно 70% у случају оба соја *P. stutzeri*, док је у дубини материјала (20 mm) ефикасност биочишћења износила 72% применом референтног соја и 95% употребом природног изолата. Ефикасност биоактивних система у уклањању нитрата потврђена је и на узорцима природног стенског материјала, код којих је доказана ефикасност биоактивног система са референтном културом 47,7%, а са *P. stutzeri* D1 чак 89,2%. Резултати примене денитрификатора у лабораторијским условима указују на велики потенцијал за примену ових микроорганизама у поступцима биочишћења различитих грађевинских материјала у реалним условима.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.

Кандидаткиња **Ана Видаковић** је успешно и у потпуности спровела истраживања која су била предвиђена планом датим у пријави ове докторске дисертације. Кандидаткиња је резултате докторске дисертације представила на јасан и свеобухватан начин. Дисертација је адекватно структурирана на логичне целине. Резултати су систематично и детаљно протумачени и критички упоређени са релевантним литературним подацима. Као резултат дискусије изведени су закључци који дају директне одговоре на постављене циљеве докторске дисертације.

IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме

Да. Докторска дисертација је у целини урађена и написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе

Да. Докторска дисертација садржи све битне елементе.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци

Истраживања која су обухваћена овом докторском дисертацијом су проистекла из потребе за решавањем проблема акумулације нитрата у природи кроз изоловање и карактеризацију денитрификатора, оптимизацију биотехнолошких параметара за производњу биомасе и процену могућности примене активне биомасе одабраних денитрификатора у циљу уклањања нитрата са различитих грађевинских материјала. Свеобухватан приказ процеса од изоловања до производње биомасе денитрификатора се не може пронаћи у доступној литератури, а од изузетне је важности у процесима биоремедијације у којима је неопходно уклонити акумулиране нитрате са великих површина, за шта је потребно обезбедити довољну количину активне биомасе. У оквиру докторске дисертације карактеризацијом високо ефикасног денитрификатора *P. stutzeri* D1 и детаљним приказом поступка оптимизације биопроцесних параметара и валидације оптимизованих биопроцесних параметара у лабораторијским биореакторима начињени су први кораци ка дефинисању идејног решења и увећању размера предложеног биопроцеса.

Осим тога, висока ефикасност одабраних денитрификатора у поступцима биочишћења различитих грађевинских материјала, која је постигнута у лабораторијским условима представља добар основ за наставак истраживања у реалним условима, како на грађевинским материјалима, тако и у третманима земљишта и отпадних вода.

4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања
Нису уочени недостаци у овој докторској дисертацији.

X ПРЕДЛОГ:

На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:

Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију маг. инж. технол. Ане Видаковић, под насловом „Денитрификатор *Pseudomonas stutzeri* – изоловање, оптимизација биопроцесних параметара и примена” и предлаже да се докторска дисертација прихвати, а кандидаткињи одобри одбрана.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

председник

др Јоњауа Раногојец, редовни професор
Технолошки факултет Нови Сад,
Универзитет у Новом Саду

ментор

др Синиша Марков, редовни професор
Технолошки факултет Нови Сад,
Универзитет у Новом Саду

члан

др Јована Граховац, ванредни професор
Технолошки факултет Нови Сад,
Универзитет у Новом Саду

члан

др Александра Ранитовић, доцент
Технолошки факултет Нови Сад,
Универзитет у Новом Саду

члан

др Наташа Ђурчић, научни сарадник
Научни институт за прехранбене
технологије у Новом Саду

НАПОМЕНА: Члан комисије који не жели да потпише извештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извештај образложење односно разлоге због којих не жели да потпише извештај.