

**НАУЧНО-НАСТАВНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

Предмет: Оцена урађене докторске дисертације мр Бојане Вујовић

Одлуком Научно-наставног већа Пољопривредног факултета - Универзитета у Београду бр. 33/6-5.2. од 19.02.2016. именована је комисија за оцену и одбрану урађене докторске дисертације мр Бојане Вујовић под насловом: „Бактериофаги као агенси у контроли формирања биофилмова *Pseudomonas aeruginosa*“. Комисија у саставу др Драгослава Радин, редовни професор, Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду, др Вера Раичевић, редовни професор, Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду, др Смиља Теодоровић, доцент, Криминалистичко полицијска академија, Београд, др Миомир Никшић, редовни професор, Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду, др Петар Кнежевић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду на основу прегледа докторске дисертације, подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација **мр Бојане Вујовић**, написана је на 198 страна текста и укључује 19 табела, 20 графикана, 33 слике и 35 прилога. Испред основног текста написан је резиме са кључним речима на српском и енглеском језику. Докторска дисертација садржи осам поглавља, и то: Увод (стр. 1-2), Преглед литературе (стр. 3-45), Циљеви истраживања (стр. 46), Материјал и методе (стр. 47-66), Резултати и Дискусија (стр. 67-137), Закључци (стр. 138-144), Литература (стр. 145-165) и Прилози (166-194). 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 истакнуто да *Pseudomonas aeruginosa* спада у групу опортунистичких хуманих патогених бактерија која због велике вируленције и високе резистенције на антибиотике представља велику претњу по јавно здравље становништва. Једна од компетитивних предности у преживљавању *Pseudomonas aeruginosa* је способност формирања биофилмова. Присуство биофилмови у животној средини, различитим системима за транспорт воде као и у прехранбеној индустрији може претстављати значајан фактор ризика у безбедној производњи хране. Елиминација бактеријских биофилмова је изузетно тежак посао, због чега постоји потреба за развијањем алтернативних начина за спречавање и контролу формирања биофилмова, као што је употреба специфичних бактериофага.

Преглед литературе. У *Прегледу литературе*, који има четири потпоглавља детаљно су обрађени доступни литературни подаци из области која је предмет проучавања дисертације. У првом потпоглављу *Pseudomonas aeruginosa*–*распрострањеност, морфолошке, биохемијске и молекуларне карактеристике*, истакнуто је да је ово бактерија широко распрострањена у различитим срединама, аспорогена, облигатни аероб са способношћу и анаеробне респирације, а једна од основних таксономских карактеристика је продукција пигмената растворљивих у води, као што су пијоцијанин, пиовердин и пиорубин. Такође, ова бактерија поседује један циркуларни хромозом као и више плаزمида, геном величине 5,2 до 7.1 Мбп у коме је заступљеност гуанина и

цитозина око 65%. У другом потпоглављу, *Биофилмови Pseudomonas aeruginosa*, истакнуто је да су биофилмови добро организоване заједнице микроорганиза као и да постоје различите теорије о формирању биофилмова. Указано је, да према досадашњим истраживањима, већина изолата *Pseudomonas aeruginosa* има способност продукције биофилмова (97%). У оквиру овог потпоглавља посебно је разматрана покретљивост ових бактерија и истакнуто да поред два типа кретања помоћу ћелијских структура, постоји и тзв. "ројење". У овом делу посебно је разматран значај биофилмова. У трећем потпоглављу *Мogućност примене бактериофага као антимикуробних агенаса*, указано је на особине фага којима успевају да делују на биофилмове. Такође, истакнуто је да проблеми везани за резистенцију сојева *P. aeruginosa* на различите антибиотике, утиче на повећање интересовања за применом фага. Четврто потпоглавље, *Бактериофаги*, описује ове, свеприсутне, организме истичући њихов значај у биосфери али, истовремено указујући да њихова класификација и даље остаје изазов, као и да се мало зна о њиховој филогенији и биолошкој разноврсности. У оквиру овог потпоглавља посебно су разматрани бактериофаги *Pseudomonas aeruginosa*, при чему је истакнуто да већина описаних бактериофага *P. aeruginosa* су *Caudovirales*, имају главу и реп, садрже двоструку ДНК (dsDNA) и припадају фамилијама *Siphoviridae*, *Myoviridae* и *Podoviridae*.

Циљеви истраживања. Полазећи од чињенице да је елиминација бактеријских биофилмова изузетно тежак процес, због њихове отпорности на средства за дезинфекцију и антибиотике, циљ дисертације је испитивање утицаја на формирање и уклањање створених биофилмова, деловањем специфичних бактериофага *P. aeruginosa*. Основни научни циљ ове докторске дисертације је сагледавање могућности примене бактериофага у контроли формирања биофилмова, као и утицаја на већ формиране биофилмове сојева *P. aeruginosa*, при дефинисаним еколошким условима у погледу температуре, рН и концентрације NaCl. Научни циљ докторске дисертације је и испитивање диверзитета сојева врсте *P. aeruginosa* пореклом из животне средине и њихове способности да формирају биофилм, али и утицај неких еколошких фактора на формирање биофилмова. Важан циљ дисертације је формирање колекције сојева врсте *P. aeruginosa* из животне средине као и формирање колекције фага. Формиране колекција створиће добру основу за будућа научна истраживања али претстављају и важан биотехнолошки изазов у практичној примени.

Материјал и методе. Дисертација обухвата теренска и лабораторијска истраживања а методе које су коришћене у дисертацији су представљене у десет потпоглавља.

У делу изолација и идентификација, истакнуто је да је изолација *P. aeruginosa* извршена из различитих животних средина, методом обогаћења. Чисте културе су добијене методом исцрпљивања а чистоћа култура је проверавана микроскопирањем. Примарна идентификација је извршена на основу морфолошких карактеристика колонија, ћелија, биохемијских карактеристика добијених применом API теста (20NE, Veimereux, Francuska) и читавања на API WEB-у. Културе су чуване у 20% глицеролу на -80°C.

Способност формирања биофилмова испитана је применом статичког модел раста биофилмова, колориметријски са кристал виолетом у микротитар плочама са 96 отвора. Абсорбанца је читана на читачу микротитар плоча ELx808, BioTek (SAD), на таласној дужини $\lambda=630\text{nm}$. Експерименти су урађени три пута у три понављања. Тумачење је вршено у односу на биофилм-непродукујући сој *P. aeruginosa* ATCC 27853. Класификација на основу формираних биофилмова током 24сата извршена је према препорукама Perez i sar., (2011).

Покретљивост бактерија испитана је на ЛБ медијуму са 0,1, 0,3, 0,5 и 1% агара и М8 медијуму са 0,5% агара. Концентрација рамнолипида је одређена методом Fang i sar. (2005). Концентрација пиоцијанина је мерена при абсорбанци од $\lambda=520\text{nm}$.

Својства формираних биофилмова испитана су на Раман спектрометру (XploRA, произвођача Horiba, Јапан) при условима: екситација CLS ласером 532 nm, детектор 1024 x 256 TE sciCCD,

објектив: 100x дуже радне дистанце, спектрални опсег 200-2500cm⁻¹. Раман спектрометријом је извршено снимање узорка биофилмова насталих након инкубације од 24h на 37 и 22°C у ЛБ бујону стандардног састава (pH 7, NaCl 1%), као и модификованом бујону: ЛБ pH 7, NaCl 2% и LB pH 6, NaCl 1%. Рамански спектри узорка пре поређења су обрађени у „R“ статистичком softveru (R Development Core Team, 2014) уз коришћење hyperSpec пакета (Beleites i Sergio, 2014).

Геномска идентификација и диференцијација 30 изолата извршена је модификованом MLST шемом за *P.aeruginosa* (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>) помоћу пет housekeeping gena: *acsA*, *guaA*, *mutL*, *ppsA* и *trpE*.

Изолација ДНК вршена је употребом кита за изолацију QIAamp DNA Mini (Qiagen, SAD), према протоколу произвођача. Изолована ДНК је складиштена на -20°C. Квантитет и чистоћа ДНК је одређен употребом Нанофотометра (Implen P300, САД), а вредности су изражене у ng/μl.

Унутрашњи фрагменти пет одабраних housekeeping gena величине 800-950 bp су амплификовани PCR техником и коришћени су Forward (F) и Reverse (R) прајмери (Curran i sar., 2004). Провера успешности PCR реакција извршена је гел електрофорезом на 1% агарозном гелу у 1xTBE пуферу. За поређење дужине коришћена је DNK познате дужине (MassRulerTMDNA ladder, Mix, Fermentas Life Sciences GmbH, Litvanija).

За пурификација и секвенцирање PCR продуката су коришћене услуге комерцијалног центра Macrogen Europe, Холандија (www.macrogen.com).

Анализа секвенци, F и R секвенце локуса *ppsA*, *guaA*, *acsA*, *mutL* и *trpE* су визуализоване помоћу софтвера Finch TV, (Верзија 1.4.0., Geospiza Inc), након чега је извршена детаљна визуелна инспекција свих појединачних секвенци. Све појединачне секвенце су упоређене са постојећим секвенцама у бази података NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), користећи BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). За сваки локус сваког од изолата, F и R секвенце су обједињене у консенсус секвенци, употребом BLAST апликације “align two sequences”. Појединачна непреклапања су мануално исправљена. За сваки од пет анализираних локуса, извршено је вишеструко поравнање (*alignment*) секвенци свих изолата, користећи хијерархијски метод за вишеструко поравнање, имплементиран у ClustalW алату у програмском пакету MEGA, верзија 8 (Tamura i sar., 2013).

У делу Типизација изолата помоћу MLST (*Multi locus sequence typing*) шеме, објашњено је да су различите DNK секвенце на сваком од пет анализираних gena означене бројевима који представљају различите алеле, независно од тога да ли се разликују у појединачном нуклеотиду или на многим позицијама у секвенци. Бројеви су додељени на основу постојећих бројева – алела у *P. aeruginosa* MLST бази података. Алели који се нису поклапали са постојећим алелима у бази података су означени као “нови”. На овај начин, сваки изолат је окарактерисан скупом од пет бројева. Добијени алелни профили су поређени са онима који су доступни у MLST бази података (<http://pubmlst.org/general.shtml>).

За филогенетске анализе је коришћен програмски пакет MEGA, верзија 8 (Tamura i sar., 2013). Добијене нуклеотодне секвенце су депоноване у централну базу података *GenBank*.

Изолација бактериофага је урађена методом двоструког агара којој је претходила метода накупљања фага. Након хомогенизацијае узорка центрифугирањем на 8000 x g, 15мин, узорци су инкубирани у ЛБ бујону са 0,1 мл бактеријске ћелије у току 24h, на 35°C у орбитарном шејкеру. Дезинтеграција домаћина и сепарација је извршена додавањем хлороформа и центрифугирањем 11000 x g, 10 мин., након чега су ослобођени фаги изоловани методом плака. Овај метод подразумева примену два слоја хранљивих агара: доњи слој, са 1,5-2% агара на који је нанет горњи слој („soft“ или „top“ agar) са 0,7% агара. Инкубација је вршена на 37°C у току 24 сата, након чега је регистрована појава “плакова” којима је потврђено присуство бактериофага. Умножавање фага је урађено засејавањем фага у 30-50 понављања, концентрисање фага преципитацијом у PEG8000 и NaCl а пречишћавање изопикничким ултрацентрифугирањем у градијенту густине CsCl (Sambrook

i Russell, 2001). Одређивање концентрације фага (титар фага) је урађено „*spot test*“ методом двоструког агара.

Карактеризација изолованих бактериофага базирана је на морфологији плакова (облику, прозирности и величини) и морфологији фага базираних на трансмисиој електронској микроскопији (Philips CM12). Молекуларна детерминација одабраних бактериофага урађена је након екстракције ДНК према протоколу Sambrook i Russell, 2001. Екстраховане ДНК су изложене рестрикционим ендонуклеазама, EcoR I, EcoR V, BamH I, Dra I, Hind III и Xba I. Такође је урађена анализа протеинских профила капсида одабраних фага. Литичка способност фага према различитим изолатима *P.aeruginosa* је тестирана „*spot testom*“. Резултати су изражени симболима: ++ бистра зона лизе, + мутна зона лизе, 0 није дошло до лизе. Сви експерименти су поновљени три пута. Крива раста бактериофага је урађена методом „*one step growth*“ са бактеријама у експоненцијалној фази раста ($\approx 10^9$ cfu/ml).

Испитивање деловања бактериофага на формирање биофилмова урађено је колориметријском методом у микротитар плочама, према делимично модификованој процедури Кнежевић и Петровић (2008). Тестиран је утицај фага на формирање биофилмова и на већ формиране биофилмове у различитим условима средине: рН 7/NaCl 1%; рН 6/NaCl 1% и рН 7/NaCl 2%, при температуре од 37 и 22°C у току 24 сата. Као медијум кориштен је ЛБ бујон.

У бунариће микротитар плоче је истовремено аплицирано 100 μ l суспензије одабраног изолата бактерије ($\approx 10^9$ cfu/ml) у експоненцијалној фази раста и 100 μ l суспензије (у СМ пуферу) одабраног фага ($\approx 10^9$ pfu/ml), док су за испитивање фага на већ формиране биофилмове бактеријски изолати инкубирани 24h у микротитар плочама, након чега је садржај из бунарића избачен, формиран биофилм испран са 250 μ l PBS пуфера, а у бунариће је додата суспензија фага (200 μ l, $\approx 10^9$ pfu/ml) и плоче враћене на инкубацију. Паралелно је праћен раст и формирање биофилмова у бунарићима, као контрола. Након завршетка инкубације, извршено је испирање, сушење, фиксирање, бојење и мерење формиране биомасе. Експеримент је поновљен три пута у три понављања. Резултати делеовања бактериофага су изражени процентуално.

Основна статистичка обрада података и утврђивање корелативних односа је урађено у софтверском пакету Microsoft Office Excell 2013. За утврђивање статистичке разлике је коришћен непараметарски тест Kruskal-Wallis.

Резултати и Дискусија Резултати истраживања обрађени су у оквиру седам потпоглавља и приказани су уз текстуална тумачења, прегледне табеле, графиконе који илуструју истраживања а добијени резултати су дискутовани уз концизна тумачења. Прво потпоглавље *Изолација и детерминација Pseudomonas aeruginosa* је претстављено кроз два дела. У првом делу истакнуто је порекло добијених 30 изолата: три из узорака воде за пиће, 16 из површинских вода, по један из сирове и пречишћене отпадне воде, један из земљишта и четири из седимента акумулације вода за пиће. Након примарне идентификације и читавања вредности на API Web-у, констатовано је да изолати припадају врсти *Pseudomonas aeruginosa*, са тачношћу од 96,5 до 99,9%.

Друго потпоглавље *Типизација и структура популације изолованих изолованих Pseudomonas aeruginosa* обрађено је кроз више делова. Полазећи од тога, да до сада у Србији, није урађена анализа и типизација *P. aeruginosa* из животне средине и клиничких изолата, гени 30 изолата *P. aeruginosa* поређени су са резултатима доступним у бази података. Изолавана је ДНК 30 изолата *P. aeruginosa*, након чега је извршена амплификација пет одабраних гена (*acsA*, *guaA*, *ppsA*, *mutL* и *trpE*). PCR продукти су послати на даљу обраду ДНК, пречишћавање и секвенцирање. Укупно је добијено 144 секвенци: 30 *acsA*, 28 *guaA*, 28 *mutL*, 29 *ppsA* и 29 *trpE*, које су појединачно прегледане у програмском пакету FinchTV.

За сваки локус сваког од изолата, F и R секвенце су обједињене у консенсус секвенци, формирану поравнањем ове две секвенце помоћу BLAST апликације на NCBI web страници, а за сваки од пет

локуса су секвенце груписане и вишеструко поравнане у програмском пакету MEGA, употребом ClustalW алата. Показано је да је већина анализираних секвенци иста са депонованим секвенцама, због чега им је додељен постојећи алелни број. Од 30 анализираних локуса *acsA*, 4 секвенце су до сада непостојеће у MLST бази, а нађено је и 4 нове секвенце локуса *guaA*, 1 нова секвенца на локусу *mutL* и 2 нове на локусу *trpE*.

Међу анализираним изолатима *P. aeruginosa*, нађено је пет нових алелних профила (НОВ 1, 2, 3, 4 и 5), док три изолата имају исти профил са постојећим изолатима у бази: KPL_V_4 (СТ 487), MIP_V_14 (СТ 555) и TC_PV_3 (СТ 198), а секвенце још два изолата се уклапају у већи број алелних профила. Подаци су показали да изолат KPL_V_4, из воде канала Палић-Лудаш има исти алелни профил као 0,03 % изолата из спутума, односно 0,03 % изолата из Холандије и Аустралије као што изолат *P. aeruginosa* изолован из воде Миријевског потока, MIP_V_14 има истоветан профил као 0,03 % изолата из спутума и бронхоскопа и да је исти профил констатован у Холандији, САД и Аустралији. Анализом учесталости појединих алела (у %) уочљива је значајна разлика у фреквенцији алела испитиване популације *P. aeruginosa* у односу на податке депоноване у бази података, што може навестити велику разлику у фреквенцији алела изолата из Србије у односу на глобалну популацију бактерија. Међутим, резултати не представљају репрезентативан однос због малог броја изолата испитаних на терену Србије и релативно малог обима MLST базе.

За утврђивање филогенетских односа употребљене су генске секвенце, (*ppsA*, *guaA*, *trpE*, *acsA*, *mutL*) и секвенце добијене повезивањем појединачних локуса у ланац тестираних изолата *P. aeruginosa*. У филогенетску анализу су укључени и (NCBI) секвенце клиничких изолата (PAO1 и P14), *P. aeruginosa* сој 1206 из воде океана, *P. aeruginosa* сој 1303 из приобалне зоне океана, сој из воде језера у Јапану, *P. aeruginosa* 1540 и сој *P. aeruginosa* M18 из ризосфере диње у Мексику.

На основу појединачних генских секвенци формирано је пет филогенетских стабала и три стабла на основу обједињених података свих секвенци. Филогенетска стабла су показала да тестирани изолати нису груписани на основу станишта где су изоловани, географског положаја као ни према доказаној вируленцији. Слаба дивергентност *P. aeruginosa* је уочљива на стаблу креираном на основу података добијених из свих пет локуса.

MLST анализом се уочава велика филогенетска сличност међу изолатима, као и да не постоји груписање у односу на станиште и географско подручје.

У трћем потпоглављу *фенотипске карактеристике P. aeruginosa* претстављена је способност формирања биофилмова, покретљивост, продукција рамнолипида и пиоцијанина. Приказани су резултати способности продукције биофилмова 30 изолата при различитим условима температуре (37°C и 22°C), рН (7 и 6) и салинитета (концентрација NaCl 1 % и 2 %). Показало се да тестирани изолати у току 24 сата успешније формирају биофилм на 22°C ($\bar{x}_{(OD630)}=0,20$) него на 37°C ($\bar{x}_{(OD630)}=0,13$).

Од 30 изолата *P. aeruginosa*, на 37°C, 67 % је окарактерисано као слабо биофилм продукујуће а 13 % као средње биофилм продукујући изолати. Али ако се категоризација изолата изврши у односу на способност формирања биофилмова на 22°C, 40 % је биофилм непродукујућих, 27 % слабо биофилм продукујућих, 30 % средње продукујућих а само 3 % високо продукујућих изолата.

Применом Kruskal-Wallis теста показало се да не постоји статистички значајна разлика у продукцији биофилмова ($p>0,05$) на 37°C и 22°C међу изолатима *P. aeruginosa* који потичу из различитих средина.

У раду је указано да је код изолата који су означени са средњим потенцијалом у формирању биофилмова продужавањем инкубације до 48 сати биомаса била висока, односно дуплирана у односу на вредности након 6 сати мерења.

Ранија истраживања указују да је примарна особина, значајна за формирање биофилмова код *P. aeruginosa*, способност транслокације и да је покретљивост флагелама и пилима типа IV неопходна за иницијацију формирања биофилмова, али немају улогу у расту иницијално формиране микроколоније. Просечне, средње вредности измерених колонија насталих флагеларним кретањем („пливајућих“) колонија су $x(\emptyset) = 83$ mm на 22°C и $x(\emptyset) = 90$ mm на 37°C, на медијуму са 0,1% агара, док је средња величина колонија на медијуму са 0,3% агара $\overline{x(\emptyset)} = 19$ mm на 22°C и $x(\emptyset) = 38$ mm на 37°C.

У раду је указано да су се испитивани изолати кретали гibaјућим покретима формирајући карактеристичне колоније „ројења“ и тендрила на подлогама са нижим процентом агара, некарактеристичним за испољавање ових особина. Испитивани изолати су формирали колоније најмањег пречника користећи кретање помоћу пила типа IV („трзајуће креатње“), а највећи при „пливајућем“ кретању и „ројењем“ на нисконутритивном медијуму. Тестирани изолати су показали бољу покретљивост при вишој температури инкубације (37°C) у односу на 22°C. Концентрација рамнолипида код тестираних изолата *P. aeruginosa*, је износила од 23,8 mg/l (ТЋ_PV_3) до 68 mg/l (D_V_8), а просечна вредност за све изолате је 39,4 mg/l. Концентрације пиоцијанина код тестираних изолата *P. aeruginosa*, је од 0,92 µg/ml (S_V_1) до 6,28 (JS_V_13).

Резултати снимања биофилмова раманспектроскопијом одвојени су у посебном потпоглављу *Испитивање својстава биофилмова Раман спектроскопијом*, полазећи од тога да су ово прва истраживања ове врсте код нас. У раду су представљени резултати снимања биофилмова 11 изолата (SU_I_1, S_V_12, SU_AM_2, KSE_V_11, ЃА_SE_5, ЃА_SE_8, ЃА_SE_1, JS_V_13, B_V_7, B_PV_1 и B_V_6) и једног референтног соја (ATCC 27853) *P. aeruginosa*.

Спектри свих изолата осим (B_PV_1) имају четири карактеристична пика: један на око 1571-1580 cm^{-1} који означава нуклеинске киселине А, Г, протеине амиде и угљене хидрате, а који потичу из хроматина, затим пик око 1294-1306 cm^{-1} , који означава C-H везу и односи се на липиде и угљене хидрате, вероватно из ћелијске мембране, пик на око 1110-1122 cm^{-1} специфичан за гликозидну везу и пик на око 735-743 cm^{-1} , који такође означава аденин и угљене хидрате пореклом из нуклеусног дела (Jung и сар., 2014.). Пик у зони око 1124 cm^{-1} , претпоставља се, означава вибрацију услед гликозидне везе C-O-C, осцилације прстена код полисахарида или вибрације услед C-C истезања.

У потпоглављу *Изолација бактериофага* истакнуто је да је изолација фага извршена из различитих животних средина и локација и у даља истраживања је укључено 9 бактериофага. За изолацију бактериофага као бактерије домаћини кориштени су изолати бактерија *P. aeruginosa* ЃА_SE_8, P_V_2, ЃА_SE_9, TOP_V_16 и ТЋ_PV_3. Након три узастопне реизолације појединачних плака, добијене чисте културе бактериофага су умножене, и суспензија фага у обогаћеном Триптон бујону која садржи 10^8 - 10^{10} pfu/ml је чувана на 4°C и кориштена за даља истраживања. Испитивани бактериофаги се одликују уједначеном морфологијом плакова (ситни, дијаметра од 1-3 mm), прозачни, осим фага означеног као ф8 који има мутне плаке. Трансмисина електронска микроскопија је прихваћена као основ за добијање базичних података у класификацији фага. Сви тестирани фаги имају икозаедарну главу и дугачак неконтрактилан реп што их сврстава у Morfotip B1 у оквиру фамилије *Siphoviridae* (ред *Caudovirales*). У делу *молекуларна детерминација изолованих бактериофага* уочена је разлика у рестрикционој мапи међу тестираним фагима ф4, ф5 и ф11 што указује на генетички диверзитет изолованих фага. Протеински профили тестираних фага су били уједначени, што говори да су тестирани фаги међу собом морфолошки веома слични, али се разликују на генетичком нивоу.

У раду је указано да изоловани фаги имају способност лизе од 40 до 60% тестираних изолата *P. aeruginosa*. Најшири литички потенцијал имају фаги ф1 и ф5, који су лизирали 18 од 31 тестираних

изолата, док су фаги $\phi 4$ и $\phi 9$ имали способност лизе 13/31 домаћина. Шест тестираних изолата *P. aeruginosa* (око 20%) није показао осетљивост ни према једном тестираном фагу. У раду, праћењем појединих фаза животног циклуса, у трајању од 60 минута је, запажено да тестирани фаги имају кратак латентни период и да број ослобођених честица након 10 минута инкубације варира од 44 pfu/ml ($\phi 11$) до 4560 pfu/ml ($\phi 4$). Литературни подаци указују да дужина латентног периода варира од 13 минута код колифаг Т1, па и до 17 часова фага бактерије *Halobacterium salinarum* (Calendar и Inman, 2005). Истакнуто је да параметри криве раста немају пресудан значај у литичком потенцијалу фага и да је процес лизе сложен и зависи од бројних фактора.

У десетом потпоглављу *Испитивање деловања бактериофага на формирање биофилмова*, истакнуто је да тестирани фаги $\phi 4$, $\phi 5$, $\phi 8$ и $\phi 11$ имају различит утицај на формирање биофилмова. Сви тестирани фаги су довели до умањења биомасе биофилмова тестираних изолата *P. aeruginosa*, а такође су били способни да превентивно утичу на процес формирања биофилмова. $\phi 11$ (изолован из воде за пиће, са литичким деловањем на 42% тестираних изолата) је тестиран и под различитим условима средине, а резултати показују да је утицао на умањење биомасе формираних биофилмова свих тестираних изолата и под свим тестираним условима средине у погледу рН и концентрације NaCl. При рН 7, NaCl 1%, деловањем фага биомаса биофилмова је смањена за 5 до 25%, а при сниженој рН вредности умањење је износило од 3 до 27%, док је при повишеној концентрацији NaCl износило од 15 до 46%. Најмањи утицај на смањење биофилмова констатован је код изолата *P. aeruginosa* P_V_2 (3% при рН 6/NaCl 1%), а највећи код изолата SU_AM_4. Утицај бактериофага на двадесетчетворо часовне биофилмове при 37°C је био слаб а у условима рН 7/NaCl 1% фаг је утицао на смањење биофилмова за 15% само код референтног соја *Pseudomonas aeruginosa*. Смањење биофилмова у услова рН 6/NaCl 1% је забележено код изолата BV_7 (20%) и ATCC 27853 16%. При повећаном салинитету, сви формирано биофилмови су показали осетљивост према фагу и констатовано је смањење биомасе у просеку од 28%.

Закључак. Закључци су правилно изведени и у потпуности произилазе из добијених резултата. Бактериофаги $\phi 5$ и $\phi 8$ су довели до умањења биофилмова за просечно 20 %, док је фаг $\phi 4$ довео до умањења за просечно 14 % на 37°C. Ови фаги су показали деловање на 50 % тестираних *P. aeruginosa*. Најбољи ефекат је постигнут деловањем $\phi 8$ на BV_7 од 56 %. Ефекат умањења биофилма на 22°C је био бољи. Фаги $\phi 5$ и $\phi 8$ су спречили формирање биофилма за око 40 %, док је $\phi 4$ довео до умањења за око 24 %.

На свим тестираним изолатима, и под свим условима у погледу рН и концентрације NaCl фаг $\phi 11$ је утицао на смањење формирања биофилмова у односу на контролне биофилмове. При рН 7, NaCl 1%, деловањем фага биомаса биофилмова је смањена до 25%, а при сниженој рН вредности умањење је износило до 27%, док је при повишеној концентрацији NaCl износило до 46%. При повећаном салинитету, сви формирано биофилмови су показали осетљивост према фагу и констатовано је смањење биомасе у просеку од 28%. Деловањем бактериофага на већ формиране биофилмове на температури од 37°C при рН 7 и 1% NaCl дошло је до смањења биомасе биофилмова само код референтног соја *P. aeruginosa* за 15%.

Из узорак из животне средине (седимент, активни муљ, површинске воде, воде за пиће и земљиште) са различитих локалитета изоловано је више изолата а након примарне идентификације утврђено је да 30 изолата са прецизношћу од 95,8 до 99,9 припада врсти *Pseudomonas aeruginosa*. Помоћу MLST шеме и филогенетске анализе показано је да три изолата (KPL_V_4 (СТ 487), MIP_V_14 (СТ 555) и TC_PV_3 (СТ 198) имају исти профил са постојећим изолатима у бази. У изолатима са територије Србије пронађене су сасвим нове комбинације алелних варијанти какве до сада нису описане MLST шемом. Утврђено је пет нових ST профила (НОВ 1, 2, 3, 4, и 5), од којих је НОВ 1 најзаступљенији у узоркованим популацијама *Pseudomonas aeruginosa*. Садржај G+C парова је висок и креће се од 63,6% (*ppsA*) до 67,2% (*acsA*).

У раду је креирано пет филогенетских стабала на основу појединачних генских секвенци и три стабла користећи обједињене податке свих секвенци. Добијени резултати сугеришу високу сличност нуклеотидних секвенци изолата MIP_V_14 и мексичког изолата M 18 из ризосфере диње, као и њихово груписање са TČ_PV_3, TOP_V_16, P_V_2, KPL_V_5 и изолатима из океана у PA14 комплекс. Изолати ČA_SE_5, ČA_SE-8, ČA_SE-9, SU_AM_4 и D_V_8 заједно са приобалним и језерским изолатима из Јапана припадају PAO1 групи. Изолати SO_M_7, SO_AM_6, B_V_6, VI_Z_3, KTR_V_9, S_V_1, SU_I_1 и B_V_7 чине засебну групу, док преостале три групе укључују следеће чланове: 1) KSE_V_11 и B_V_10, 2) S_V_12 и SO_E_2 3) B_PV_2. Уочава се одсуство груписања изолата на основу микро и макро географског положаја и не може се јасно детектовати утицај станишта на међусобни однос тестираних изолата, осим у случају изолата из седимента који се заједно групишу.

Од 30 испитаних изолата 73% припада групи слабо-биофилмпродукујућих при температури од 37°C док на темп. од 22°C 27% су слабо биофилмпродукујући. При температури од 37°C нису констатовани сојеви са високом продукцијом биофилмова а при температури од 22°C један изолат је окарактерисан као биофилм-високопродукујући. Према Kruskal-Wallis тесту не постоји статистички значајна разлика у продукцији биофилмова на 37°C и 22°C међу изолатима *P. aeruginosa* који потичу из различитих средина што указује да станиште нема значајну улогу у продукцији биофилмова. Не постоји статистички значајна разлика у формирању биофилмова при pH 6 и pH 7, као и при повишеној концентрацији NaCl (2%), на 37°C и 22°C. Показало се да време од 6 сати није добар параметар за процену потенцијала у формирању биофилмова.

Констатовано је да постоји слаба корелација између кретања на ЛБ медијуму са 0,1, 0,3, и 0,5 % агара, а већи степен корелације постоји између кретања на ЛБ медијуму са 0,3 % агара и ројења на M8. Концентрација рамнолипида код изолата *P. aeruginosa* је од 23,8 mg/l (TČ_PV_3) до 68 mg/l (D_V_8), а просечна вредност за све изолате је 39,4 mg/l. Не постоји статистички значајна ($p > 0,05$) разлика у концентрацији рамнолипида у зависности од станишта са кога потиче тестирани изолат. Концентрације пиоцијанина код тестираних изолата *P. aeruginosa*, је од 0,92 $\mu\text{g/ml}$ (S_V_1) до 6,28 (JS_V_13). Између продукције пиоцијанина и способности формирања биофилмова на 37°C је утврђена ниска корелација ($r=0,25$, $p \leq 0,05$), док је однос између продукције пиоцијанина и формирања биофилмова на 22°C у негативној корелацији ($r=-0,06$, $p \leq 0,05$).

Изглед спектра и распоред добијених Раманових пикова наводе на претпоставку да су биофилмови испитиваних изолата квалитативно слични и да нема разлика у квалитету биофилмова у односу на услове средине у којима се формирају. На основу Раман сигнала у биофилму који потичу од протеина: 1002 cm^{-1} (фенилаланин), 1243 cm^{-1} (амид III) и 1658 cm^{-1} (амид I), амид III, фенилаланин и триптофан на који указује и пик на 1207 cm^{-1} и 1169 cm^{-1} (уз тирозин и фенилаланин, указује и на C-H) који су слабог интензитета (знатно нижи од пикова који се односе на градивне елементе ћелија) може се закључити да постоји квантитативно мали садржај ових молекула у биофилму.

Са пет изолата *P. aeruginosa* (ČA_SE_8, ČA_SE_8, P_V_2, ČA_SE_8, ČA_SE_8, ČA_SE_9, ČA_SE_9, TOP_V_16, TČ_PV_3) изоловано је девет бактериофага. Испитивани бактериофаги су уједначене морфологије плакова, плакови су ситни, дијаметра између 1-3mm, а на основу снимка ТЕМ извршено је одређивање таксономске припадности одабраних фага који су сврстани у Морфотип В1 у оквиру фамилије *Siphoviridae* (ред *Caudovirales*). Изоловани фаги имају способност литичког деловања на већи број тестираних изолата а успешност инфекције се кретала од 40-60%. Тестирани фаги су морфолошки, као и на основу састава протеина капсида веома слични, међутим тестирани фаги се међу собом генетички разликују, што их сврстава у различите сојеве.

Литература. У дисертацији је на правилан начин наведено 216 референци. Избор референци је актуелан и одговара предмету проучавања.

3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација мр Бојане Вујовић под насловом: „Бактериофаги као агенси у контроли формирања биофилмова *Pseudomonas aeruginosa*“ представља самостални научни рад који је у потпуној сагласности са планом предвиђеним пријавом дисертације. Кандидаткиња је у експерименталном делу истраживања успешно применила савремене методе, резултате је правилно тумачила и коментарисала у складу са расположивим литературним подацима и извела правилне и научно доказане закључке. Дисертација представља оригиналан научни рад са фундаменталним и практичним значајем. Научни допринос дисертације огледа се у филогенетској и молекуларно еволуционој анализи и типизацији изолата *Pseudomonas aeruginosa* пореклом из животне средине а резултати добијени MLST анализом у овом раду први пут описују генетску структуру популације *Pseudomonas aeruginosa* из Србије. Посебно треба истаћи значај ове дисертације у обогаћењу MLST базе података која је на самом зачетку у погледу изолата из животне средине. Колекција фенотипски и молекуларно окарактерисаних сојева *P. aeruginosa*, пореклом из животне средине (површинске воде, сирове, пречишћена вода, активни муљ, отпадни муљ, седимент, земљиште) представља велики потенцијал за будућа истраживања. Такође, колекција бактериофага *P. aeruginosa*, настала током ових истраживања даје добру основу за даља истраживања. Резултати ове дисертације указују да примена бактериофага у контроли формирања биофилмова *P. aeruginosa*, представља велики биотехнолошки изазов који захтева наставак истраживања. Имајући у виду све изнето, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију кандидаткиње мр Бојане Вујовић под насловом: „Бактериофаги као агенси у контроли формирања биофилмова *Pseudomonas aeruginosa*“ 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, 27.02.2016.

Чланови комисије:

Др Драгослава Радин, редовни професор
Ужа научна област: технолошка микробиологија
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду

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

Др Смиља Теодоровић, ванредни професор
Ужа научна област: биолошко инжењерство
Криминалистичко полицијска академија, Београд

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

Др Петар Кнежевић, ванредни професор
Ужа научна област: микробиологија
Природно-Математички факултет, Универзитет у Новом Саду

Прилог: Објављен рад са SCI листе аутора Бојане Вујовић:

Бојана Вујовић, Жељка Рудић, Игор Кљујев, Добрица Рајковић, Миле Божић, Вера Раичевић: Потенцијал формирања биофилмова *Pseudomonas aeruginosa* из животне средине, Заштита материјала (потврда у прилогу).