

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ФАКУЛТЕТА

Предмет: *Извештај Комисије за оцену докторске дисертације кандидата Милице Драгојевић, мастер биолога-специјалисте*

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду број 32/6-6.2. од 26.03.2025. године именована је Комисија за оцену урађене докторске дисертације под насловом „Халотолерантне микробне заједнице - диверзитет и способност стимулације биљног раста“ кандидаткиње Милице Драгојевић, мастер биолога-специјалисте. На основу прегледа и анализе докторске дисертације, Комисија у саставу др Блажо Лалевић, редовни професор, Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду, др Вера Карличић, виши научни сарадник, Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду, др Стева Левић, ванредни професор, Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду, др Нада Станковић, виши научни сарадник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду и др Јелица Новаковић, виши научни сарадник, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, подноси Наставно-научном већу Пољопривредног факултета следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Основни подаци о кандидату и дисертацији

Основни подаци о кандидату. Милица Ј. Драгојевић је рођена 06.11.1988. године у Ваљеву, Република Србија, где је завршила Ваљевску гимназију. Основне академске студије завршила је на Биолошком факултету, Универзитета у Београду, модул Биологија. Мастер академске студије завршила је 2013. године на истом факултету, модул Биологија микроорганизама, са просечном оценом 9,5, одбравивши мастер рад под називом: „Одређивање антимикубног ефекта прополиса из различитих региона Србије на одабране Грам-негативне бактерије“. Специјалистичке академске студије студијског програма Микробиологија завршила је 2015. године, такође на Биолошком факултету, са просечном оценом 10, одбравивши специјалистички рад под називом: „Изолација и карактеризација врста *Azotobacter* из различитих типова земљишта“. Докторске академске студије уписала је 2016/2017. године на Пољопривредном факултету, Универзитета у Београду, студијски програм Пољопривредне науке, ужа научна област Еколошка микробиологија.

Основни подаци о дисертацији. Докторска дисертација Милице Ј. Драгојевић, мастер биолога-специјалисте, под називом „Халотолерантне микробне заједнице - диверзитет и способност стимулације биљног раста“ писана је у складу са Упутством за обликовање

докторске дисертације Универзитета у Београду, као и у складу са пријавом теме која је одобрена од стране Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду и Већа научних области биотехничких наука Универзитета у Београду. Докторска дисертација садржи: насловну страницу на српском и енглеском језику, страницу са подацима о ментору и члановима Комисије, страницу са изјавама захвалности, резиме на српском и енглеском језику, садржај и текст дисертације организован по поглављима. Дисертација садржи укупно 198 страна писаног текста, укључујући 22 слике, 43 табеле и 420 цитираних литературних извора.

Докторска дисертација садржи осам основних поглавља: Увод (стр. 1-2), Преглед литературе (стр. 3-32), Циљеви рада (стр. 33), Материјал и методе (стр. 34-51), Резултати (стр. 52-102), Дискусија (стр. 103-133), Закључак (134-136) и Литература (стр. 137-165). На крају текста дисертације налазе се Прилози (стр. 166-193), Биографија (стр. 194), Изјава о ауторству (стр. 195), Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторске дисертације (стр. 196) и Изјава о коришћењу (стр. 197-198). Поглавља Преглед литературе, Материјал и методе, Резултати и Дискусија садрже више потпоглавља.

2. Предмет и циљ дисертације

Једна од последица антропогеног утицаја, прерасла у глобални проблем, је секундарна салинизација земљишта, која у Европи захвата 3,8 милиона хектара. Очекује се да ће до 2050. године 50% обрадивог земљишта на Земљи бити под утицајем повишених концентрација соли. Повећана акумулација соли у земљишту негативно утиче на његове физичко-хемијске и биолошке особине, што се одражава на раст и диверзитет организама који га насељавају и нарушава еколошку равнотежу у станишту. Заслањивање земљишта доводи до губитка плодности, смањења биодиверзитета и деградације екосистема, што угрожава одрживост пољопривредне производње.

Халофите, биљке које су способне да расту и размножавају се на сланим земљиштима, чине око 1% укупне флоре. Поред генетски детерминисаних адаптација, способност биљака да се прилагоде специфичним условима станишта, посебно у условима стреса, повезана је са сложеним еколошким процесима који су под утицајем разноврсних микробних заједница које насељавају биљна ткива и органе и чине биљну микробиоту. Колективни геном асоцираних микробних заједница, микробиом, вишеструко превазилази геном биљке домаћина и посматра се као његов продужетак или други биљни геном, који у великој мери утиче на преживљавање биљке у специфичним условима станишта. Захваљујући коеволуцији са биљком, микробиота халофита је прилагођена сланом станишту и сматра се кључним фактором за преживљавање халофита у условима повишених концентрација соли. Микроорганизми способни да живе у широком распону концентрација соли означавају се као халотолерантни, а уколико имају капацитет да стимулишу биљни раст могу се означити као халотолерантне бактерије стимулатори биљног раста (*Halotolerant Plant Growth Promoting Bacteria*, НТ PGP бактерије). НТ PGP бактерије су истакнута група микробиоте халофита које насељавају околну земљиште, ризосферу и ендоризосферу халофита. Успостављајући блиску везу са биљком, НТ PGP бактерије различитим механизмима побољшавају њен раст кроз повећање доступности нутријената, продукцију фитохормона, повећање отпорности на абиотички стрес и нападе патогена, истовремено обнављајући плодност земљишта на агроеколошки прихватљив начин. Полазећи од утицаја који микробиота има на раст и развој биљака, јавља се потреба за испитивањем могућности искоришћавања НТ PGP бактерија пореклом из природних слатина за унапређење раста и гајења усева на секундарно заслањеним земљиштима.

Проблеми са којима се пољопривредна производња суочава услед заслањивања земљишта повећавају интерес за изучавањем микроорганизама заслањених станишта, посебно оних асоцираних са халофитама. Клијање и рани развој клијанаца су фазе развоја биљке које су најосетљивије на абиотички стрес. Третман семена корисним микроорганизмима је еколошки прихватљива и економична техника која може позитивно утицати на параметре герминације и јачање биљке у земљиштима лоших особина и условима стреса. Примена НТ PGP бактерија као биоинокуланата представља одрживу методу за побољшање продуктивности сланих агроекосистема, због чега је одабир формулације од суштинског значаја. Примена техника инкапсулације може допринети ефикаснијем преживљавању у земљишту, а постепено ослобађање обезбеђује продужено деловање инокуланта.

Полазећи од претходно поменутог, за основни научни циљ овог истраживања је постављено проучавање диверзитета бактеријских заједница земљишта, ризосфере и ендоризосфере биљака природне слатине. Са тим у вези дефинисани су следећи циљеви: 1) таксономско профилисање бактеријских заједница применом метабаркодирања; 2) формирање колекције окарактерисаних и идентификованих НТ PGP изолата који имају потенцијал примене у циљу ублажавања ефеката стреса проузрокованог солима на усева; 3) утврђивање ефеката инокулације одабраним НТ PGP бактеријама на герминационе параметре и рани развој клијанаца одабраних усева; 4) испитивање могућности инкапсулације одабраних бактеријских сојева као и утицаја процеса инкапсулације на очување вијабилности ћелија током дужег времена складиштења, како би се добили инкапсулати погодни за примену у пољопривредној производњи.

3. Основне хипотезе од којих се полазило у истраживању

На основу података о сложености биљно-микробних интеракција и великог таксономског и функционалног диверзитета ризомикробних заједница у заслањеним земљиштима, микробна заједница асоцирана са биљкама може представљати кључни фактор за разумевање адаптације биљака на услове који владају у одређеном станишту. Стога основу за постављање програма истраживања у оквиру ове дисертације представља општа хипотеза да се ризосфера биљака из природних слатина може искористити као извор НТ PGP бактерија које имају потенцијал за примену у пољопривредној производњи. Истраживање је спроведено у четири основне фазе које су засноване на следећим појединачним хипотезама:

- Савремене молекуларне методе могу бити корисне да се на начин независан од култивације упозна свеукупни микробиом заслањених земљишта, ризосферних и ендоризосферних микробних заједница.
- С обзиром на значај заједнице микроорганизама повезане са биљкама, циљана изолација и идентификација микробних изолата из ризосфере и ендоризосфере може пружити увид у механизме стимулације биљног раста у условима повишеног салинитета, а и резултовати креирањем колекције мултифункционалних сојева НТ PGP.
- Идентификовани и окарактерисани бактеријски сојеви из добијене колекције могу имати потенцијалну примену као биоинокуланти у условима повишеног салинитета.
- Последња хипотеза је да на вијабилност бактеријских инокуланата током складиштења може утицати примена адекватних техника инкапсулације.

Ова дисертација по први пут даје увид у диверзитет и састав микробних заједница повезаних са биљкама и природним слатинама у Србији. Анализе микробиома ризосфере, ендоризосфере и околног земљишта халофита потврђују прву хипотезу, при чему се ризосфера истиче као место највећег бактеријског диверзитета. Карактеризација изолата показала је да својства стимулације биљног раста (*Plant growth promoting*, PGP) зависе од појединачног соја а не од врсте, стога изолација и идентификација микробних изолата повезаних са халофитама расветљава улогу микробних заједница у прилагођавању биљке специфичним условима станишта, чиме се потврђује друга хипотеза. Одабрани халотолерантни PGP сојеви, *Bacillus megaterium* 6Z3 и *Halomonas songnenensis* 14KX2 показали су позитиван утицај на клијање и рани раст клијанаца одабраних усева у условима повећаних концентрација соли, чиме се потврђује трећа хипотеза о употреби најефикаснијих сојева као биоинкуланата. Инкапсулација у алгинатно-скробном матриксу показала се као поуздана метода за очување вијабилности бактерија током годину дана, што потврђује четврту хипотезу.

4. Кратак опис садржаја дисертације

Увод. У овом поглављу указује се на проблем заслањивања земљишта и потребу за проналажењем еколошки прихватљивих решења за ублажавање његовог негативног ефекта на раст биљака. Истиче се значај халотолерантних бактерија стимулатора биљног раста (НТ PGP) пореклом из природних сланих станишта као алата за ублажавње негативних ефеката стреса изазваног солима на неадаптиране усева, при чему развој стабилних формулација микробиолошких препарата представља предуслов за ефикасну примену.

Преглед литературе. Ово поглавље се састоји од шест потпоглавља и даје свеобухватан преглед литературних података о НТ PGP бактеријама које насељавају земљиште, ризосферу и ендоризосферу халофита, својствима стимулације биљног раста у условима повишених концентрација соли и могућностима примене у одрживој пољопривредној производњи као компонентама микробиолошких формулација.

У првом потпоглављу, *Заслањеност као вид деградације земљишта*, описани су процеси природне и секундарне салинизације земљишта, као и утицај повишених концентрација соли на биљке и земљишне микроорганизме. Друго потпоглавље, *Биљне заједнице сланих станишта*, истиче разноврсност биљака које се развијају на природним слатинама као и њихових адаптација. Треће потпоглавље *Халотолерантни/халофилни земљишни микроорганизми* описује микроорганизме адаптиране на живот у условима повишених концентрација соли, са акцентом на механизме халотолеранције као кључне за преживљавање у променљивим условима сланих земљишта. Четврто потпоглавље, *Бактеријске заједнице асоциране са халофитама*, описује биљно-микробне интеракције у сланим земљиштима, као и значај микробних заједница за раст и преживљавање биљке у специфичним условима станишта. Следеће потпоглавље *Халотолерантне бактерије стимулатори биљног раста (НТ PGP)* истиче НТ PGP бактерије као кључну компоненту микробиома халофита, описујући улоге, диверзитет и механизме којима ове бактерије доприносе расту и развоју биљака у условима повишених концентрација соли. Последње потпоглавље *Примена НТ PGP бактерија за ублажавање ефекта стреса изазваног повећањем концентрације соли* разматра корисне ефекте третмана семена НТ PGP бактеријама као и технике инкапсулације ових бактерија са циљем добијања ефикаснијих формулација за примену.

Циљеви истраживања. Основни научни циљ овог истраживања је проучавање диверзитета бактеријских заједница земљишта, ризосфере и ендоризосфере биљака природне слатине. С тим у вези, даљи циљеви ове дисертације били су: 1) таксономско профилисање бактеријских заједница применом метабаркодирања; 2) формирање колекције окарактерисаних и идентификованих НТ PGP изолата који имају потенцијал примене у циљу ублажавања ефеката стреса проузрокованог солима на усева; 3) утврђивање ефеката инокулације одабраним НТ PGP изолатима на герминационе параметре и рани развој клијанаца одабраних усева; 4) испитивање могућности инкапсулације одабраних бактеријских сојева као и утицаја процеса инкапсулације на очување вијабилности ћелија током дужег времена складиштења како би се добили инкапсулати погодни за примену у пољопривредној производњи.

Материјал и методе. Ово поглавље подељено је у девет потпоглавља, од којих нека садрже већи број мањих потпоглавља. У првом поглављу, **Биљни материјал и земљиште**, наведене су локације подручја природне слатине Слано Копово где је вршено узорковање земљишта и биљних врста коришћених у истраживању. Узоркована су по три примерка од укупно осам биљних врста и то: *Artemisia santonicum* L., *Limonium gmelinii* (Willd.) Kuntze, *Plantago schwarzenbergiana* Schur, *Agrimonia eupatoria* L., *Hordeum geniculatum* All. (sin *Hordeum hystrix* Roth), *Suaeda maritima* (L.) Dum., *Camphorosma annua* Pall., *Salicornia europaea* L. Такође, дат је и детаљан опис припреме узорака земљишта, ризосфере и ендоризосфере који су коришћени за изолацију бактерија. Друго потпоглавље, **16S rDNA анализа микробиома**, описује процедуру и алате коришћене приликом комерцијалног секвенцирања 16S rDNA ампликона из узорака помоћу ZymoBIOMICS® Targeted Sequencing Service for Microbiome Analysis у Zymo Research (Ирвин, Калифорнија, САД). Треће потпоглавље, **Изолација и формирање колекције бактерија**, подељено је на два потпоглавља која описују две стратегије коришћене приликом изолације бактерија из узорака земљишта, ризосфере и ендоризосфере. Прва стратегија подразумевала је изолацију халотолерантних бактерија, HAL колекција, док је друга подразумевала изолацију бактерија које продукују ензим 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат (ACC) деаминазу, ACC колекција. Четврто потпоглавље, **Карактеризација изолата**, детаљно описује поступке коришћене за испитивање морфолошких, еколошких као и својстава стимулације биљног раста. Капацитет изолованих бактерија да стимулативно делују на раст и развој биљака испитана је серијом тестова који обухватају продукцију индол-3-сирћетне киселине (IAA), ACC деаминазе, амонијака, сидерофора, егзополисахарида (EPS), способност формирања биофилмова као и повећање доступности нутријената путем солубилизације фосфата, калијума и цинка. Тестови карактеризације PGP својстава, покретљивост и продукција пигмената су поновљени уз додатак 3% и 7% NaCl у подлогама, са циљем провере утицаја соли на испољавање ових својстава, што је наглашено у петом потпоглављу **Испитивање утицаја NaCl на испољавање својстава стимулације биљног раста, покретљивост и продукцију пигмената**. У шестом потпоглављу, **Молекуларна идентификација изолата**, детаљно су приказани кораци коришћени током изолације DNA као и даље молекуларне идентификације одабраних и окарактерисаних ендоризосферних, ризосферних и земљишних изолата. Седмо потпоглавље, **Испитивање утицаја бактеријске инокулације на параметре герминације одабраних биљних врста у условима различите концентрације NaCl**, састоји се од два потпоглавља при чему се прво односи на поступке коришћене за припрему и инокулацију семена три одабрана усева (јечам - *Hordeum vulgare* L., пшеница - *Triticum vulgare* L. и сунцокрет – *Helianthus annuus* L.), а друго на извршене герминацијске тестове. Герминацијски тестови су урађени према модификованим протоколима ISTA (*International Seed Testing Association*, 2014) на филтер папиру, праћењем следећих параметара герминације: проценат герминације (GP), герминацијски индекс (GI), просечно време герминације (MGT), вигор I (VI) и вигор II (VII) у условима 0, 100 mM и 200 mM NaCl. Осмо потпоглавље, **Инкапсулација одабраних халотолерантних бактерија**, састоји се од неколико

потпоглавља која дају преглед поступака коришћених приликом инкапсулације одабраних бактерија у алгинатно-скробном матриксу и одређивања броја ћелија у инкапсулатима са циљем праћења вијабилности инкапсулисаних бактерија током годину дана чувања. Последње поглавље, **Методe статистичке обраде података**, описује статистичке методе које су коришћене у анализи добијених података, употребом SPSS 26.0 софтвера.

Резултати. Резултати овог истраживања систематично су представљени кроз шест потпоглавља са више подналова, са одговарајућим текстуалним тумачењима, табелама и сликама које илуструју добијене резултате. Прво потпоглавље, **Диверзитет бактеријских заједница у заслањеном земљишту**, се односи на резултате анализа микробиома. Ово потпоглавље подељено је на три подналова који одговарају резултатима анализа земљишних, ризосферних и ендоризосферних микробиома, при чему су одвојено представљени резултати анализе индекса диверзитета и таксономски профил анализираних микробне заједнице. Највећи бактеријски диверзитет забележен је у ризосфери већине анализираних биљака, док је најнижи у ендоризосфери. Што се тиче структуре заједница, доминантни раздели у анализираним узорцима микробиома су *Proteobacteria* и *Actinobacteria*, док се присуство и релативни удели представника нижих таксономских категорија разликују у зависности од биљне врсте. Друго потпоглавље, **Колекција бактерија**, односи се на резултате добијене техникама заснованим на гајењу и приказује микро и макроморфолошке одлике изолата HAL и ACC колекције. Треће потпоглавље, **Карактеризација изолата**, садржи више потпоглавља: *Еколошке карактеристике изолата*, *Својства стимулације биљног раста (PGP својства) колекције одабраних изолата*, *Тест патогености*, *Испитивање утицаја NaCl на покретљивост и продукцију пигмената халотолерантних бактерија стимулатора биљног раста (HT PGP)*, кроз која су систематично представљени резултати карактеризације 15 изолата ACC колекције и 43 изолата HAL колекције. Однос изолата према испитиваним еколошким факторима температуре, pH вредности и повишеној концентрацији NaCl се разликују. Међу изолатима HAL колекције је осам слабо халотолерантних, 27 умерено и осам екстремно толерантних бактерија од којих две могу да расту при 25% NaCl у подлози. Изолати ACC колекције су показали слабију способност халотолеранције (максимално 5% NaCl). Карактеризацијом је показано да 7% халотолерантних изолата показује свих осам тестираних PGP својстава, 30% седам, док 12% испољава шест од тестираних осам PGP својстава. Најзаступљенија PGP својства у HAL колекцији су продукција амонијака (93% изолата), ектополисахарида (EPS) (95%) и формирање биофилма (91%). Поред тога, скоро половина изолата испољава способност продукције IAA. Насупрот томе, продукција ACC дезаминазе утврђена је код 9,7% халотолерантних изолата, што показује да ово својство није често међу испитиваним PGP бактеријама. Изолати из ACC колекције поседују изузетна PGP својства, при чему је 53% испољило седам од осам, а 13% свих осам тестираних својстава. Способност формирања биофилма утврђена је код свих изолата ACC колекције. Поред тога, продукција EPS, сидерофора и амонијака представљају доминантна својства ове групе, будући да су присутне код 93% изолата. Способност солубилизације калијума и фосфата показало је 86%, солубилизација цинка потврђена је код 80% ACC изолата. Док је способност солубилизације присутна код већег броја изолата у односу на HAL колекцију, продукција IAA је својство које је у мањој мери заступљено само код петине изолата. Повишене концентрације соли су углавном негативно утицале на испољавање PGP својстава, међутим 12 халотолерантних изолата испољавају PGP својства само у присуству повишених концентрација соли (нпр. *Kushneria indalini* 6.1. и *K. pakistanensis* 7.3). Истраживање је показало да NaCl има значајан утицај на покретљивост и продукцију пигмената тестираних изолата. Већина сојева HAL колекције (89,2%) задржава способност кретања и у присуству соли, међутим, повећање концентрације NaCl у подлози доводи до смањења пречника колонија код већине тестираних изолата (81,1%). Истовремено, неки сојеви показују супротан ефекат – повећан раст на 3% или чак 7% NaCl. Ефекат соли на продукцију пигмената је варијабилан и зависи од изолата. Док су неки сојеви показали повећану продукцију пигмената у условима без соли и при

највишој тестираној концентрацији (7% NaCl), други су реаговали статистички значајним променама у интервалу од 3% до 7% NaCl. Четврто потпоглавље, **Молекуларна идентификација одабраних изолата**, приказује резултате прецизне идентификације одабраних изолата секвенцирањем гена за 16S rRNA. Међу идентификованим изолатима HAL колекције су представници типичних халотолерантних/халофилних родова (*Halomonas*, *Kusheria*, *Halobacillus*, *Mammalicoccus*, *Planococcus*) као и родова *Serratia* и *Priestia* (*Bacillus*). Изолати ACC колекције су идентификовани као представници родова *Acinetobacter*, *Pseudomonas* и *Klebsiella*. Након извршене карактеризације и молекуларне идентификације, одабрани су 6Z3 *Bacillus megaterium* и 14KX2 *Halomonas songnenensis* за испитивање утицаја на параметре клијања семена и ране фазе раста јечма (*Hordeum vulgare* L.), пшенице (*Triticum aestivum* L.) и сунцокрета (*Helianthus annuus* L.) у условима одсуства и присуства NaCl. У петом потпоглављу, **Испитивање утицаја бактеријске инокулације на параметре герминације одабраних биљних врста у условима повишене концентрације NaCl**, представљени су резултати герминацијских тестова. Третман *H. songnenensis* 14KX2 је довео до статистички значајног побољшања код две трећине параметара клијања јечма, при чему су ефекти инокулације били израженији у присуству соли. При концентрацији од 200 mM NaCl, забележено је повећање процента клијања (GP), герминацијског индекса (GI), параметара вигор 1 и вигор 2, као и суве масе, уз истовремено смањење просечног времена клијања (MGT) инокулисаних семена јечма. Код пшенице, инокулација са *H. songnenensis* 14KX2 довела је до статистички значајног повећања 11 од 24 испитивана параметра клијања, при чему није утврђен утицај на просечно време клијања и влажну масу пшенице. Код сунцокрета, инокулација овим сојем имала је најизраженије ефекте при 200 mM NaCl, са позитивним утицајем на све испитиване параметре. Третман сојем *B. megaterium* 6Z3 је довео до статистички значајног утицаја на 15 од 24 испитана параметра код сунцокрета, при чему је већина ефеката на клијање постајала израженија са повећањем концентрације соли. Код јечма, инокулација са *B. megaterium* 6Z3 довела је до статистички значајног ефекта на једнак број герминацијских параметара, док је код пшенице ефекат инокулације био слабији у поређењу са осталим биљкама. У присуству максималне тестиране концентрације соли, инокулација са *B. megaterium* 6Z3 имала је израженије ефекте код јечма и сунцокрета, док је у случају пшенице статистички значајне ефекте испољила само на вигор I (63%), дужину (45%) и суву масу клијанаца (8%). Последње, шесто потпоглавље, **Инкапсулација одабраних халотолерантних бактерија**, описује својства и преживљавање инкапсулата сојева *B. megaterium* 6Z3 и *H. songnenensis* 14KX2 који су показали позитивне ефекте на клијавост одабраних усева. Праћењем вијабилности инкапсулисаних бактерија током годину дана, показано је да је одабрана техника инкапсулације у алгинатно-скробном матриксу омогућила преживљавање највећем броју ћелија (више од 90%). Температура чувања је имала статистички значајан утицај на преживљавање *H. songnenensis* 14KX2 током првих седам дана, док након шест месеци и годину дана температура није имала значајан утицај. У случају *B. megaterium* 6Z3 температура је имала статистички значајан утицај током шест месеци, при чему је већи број бактерија преживео током чувања на 4°C.

Дискусија. Добијени резултати су дискутовани у пет потпоглавља. У првом потпоглављу, **Биљке природне слатине Слано Копово као потенцијал за изолацију HT PGP бактерија**, дискутује се о слатинским биљкама које су коришћене за анализу у овом истраживању, а које насељавају Слано Копово, као одабрани локалитет природне слатине, са акцентом на њихове адаптације и однос према соли у земљишту. Друго потпоглавље, **Бактеријски микробиом заслањеног земљишта и ризосфере**, је подељено на поднасловe који дискутују о микробном диверзитету сланог земљишта, ризосфере и ендоризосфере халофита, анализирајући добијене резултате употпуњене са актуелним литературним подацима. Поглавље се бави анализом фактора који утичу на микробни диверзитет повезан са сланим земљиштима и халофитама, доминантним групама бактерија у анализираним нишама, као и њиховим улогама у екосистему. Треће поглавље, **Колекција HT PGP бактерија**, представља свеобухватну анализу резултата који се односе на колекцију бактерија формирану у овом

истраживању, укључујући утицај повишених концентрација соли на преживљавање изолат, покретљивост, продукцију пигмената као и својства стимулације биљног раста и њихово испољавање при повишеним концентрацијама соли. У четвртом потпоглављу, **Утицај бактеријске инокулације на параметре герминације одабраних биљних врста у условима повишене концентрације NaCl**, разматрани су резултати герминацијских тестова одабраних усева након бактеријске инокулације HT PGP и поређени са доступним подацима из литературе. Последње, пето потпоглавље, **Инкапсулација одабраних халотолерантних бактерија**, дискутује одабрану технику инкапсулације коришћењем природних, биоразградивих полимера, алгината и скроба, у формулацији микробног биоинокуланта у контексту преживљавања бактерија у инкапсулату током времена.

Закључак. У овом поглављу изведени су закључци који потпуно произилазе из резултата спроведених истраживања. Показано је да биљна врста у комбинацији са спољашњим факторима обликује бактеријске заједнице што доводи до разлика у саставу бактеријских заједница ендоризосфере, ризосфере и околног земљишта исте биљке, као и међу истим нишама различитих биљака. На нивоу раздела, Actinobacteria и Proteobacteria су доминантне компоненте микробиома земљишта, ризосфере и ендоризосфере анализираних биљака, док присуство и релативни удели представника нижих таксономских категорија варирају у зависности од биљне врсте. Диверзитет ризосферних заједница већине анализираних биљака је већи од околног земљишта, са порастом удела Bacilli и Gammaproteobacteria код свих анализираних биљака. Са друге стране, диверзитет у ендоризосфери је нижи у поређењу са ризосфером и земљиштем. Бактеријске заједнице ризосфере и ендоризосфере сукулентних биљака су међусобно сличне и разликују се од заједница осталих анализираних несуккулентних биљака. Одабране стратегије за изолацију су биле успешне и резултовале су колекцијом мултифункционалних PGP сојева који комбинацијом више својстава могу деловати на биљни раст и адаптацију на специфичне услове сланог станишта. Утврђено је да PGP својства нису одлика врсте, већ појединачног соја. Већина изолат губи PGP својства у присуству повишених концентрација соли. Истовремено, показано је да код појединих представника халотолерантних изолат, као што су *K. indalinina* 6.1. и *K. pakistanensis* 7.3, PGP својства се испољавају искључиво у присуству соли. Показано је да ефекти бактеријске инокулације на испитиване параметре клијања зависе од соја, биљне врсте и концентрације соли. *H. songnenensis* 14KX2 значајно је побољшао две трећине параметара клијавости јечма при чему су ефекти били израженији у присуству соли (200 mM). Код пшенице, исти сој је позитивно утицао на 11 од 24 параметра, али није имао ефекта на просечно време клијања (MGT) ни влажну масу. Код сунцокрета, најизраженији ефекти на свим испитиваним параметрима забележени су при 200 mM. Други одабрани сој, *B. megaterium* 6Z3 повећао је 15 од 24 параметра клијање код сунцокрета, при чему су ефекти постајали израженији са порастом концентрације соли. Код јечма је уочен сличан ефекат, док је код пшенице ефекат био слабији. У условима највише тестиране концентрације соли, *B. megaterium* 6Z3 је значајније утицао на клијање јечма и сунцокрета, док је код пшенице побољшао само вигор I, дужину и суву масу клијанаца. Показано је да инокулација семена *B. megaterium* 6Z3 и *H. songnenensis* 14KX2, изолованим из земљишта и корена сукулентних халофита, представља ефикасну стратегију за унапређење клијања и раног развоја клијанаца у условима повишене концентрације соли. Инкапсулација ових сојева у алгинатно-скробном матриксу, показала се као поуздана метода за добијање стабилних бактеријских инокуланата, омогућавајући очување високог процента вијабилности (>90%) током годину дана складиштења на 4 °C и собној температури.

Литература. У дисертацији су на правилан начин наведена 420 литературна извора. Референце су актуелне и релевантне за предмет истраживања.

Прилози. Ово поглавље садржи два потпоглавља од којих потпоглавље **Прилог 1. Анализа и диверзитет микробиома** садржи табеле са додатним приказима бактеријских раздела, класа, редова, фамилија и врста детектованих метабаркодингом у макар једном

анализираном микробиому без обзира на релативну учесталост. У другом потпоглављу, **Прилог 2**, приказана је стандардна крива потрошње ACC 0,05-0,3 mmol/L добијена нинхидринским тестом.

5. Остварени резултати и научни допринос дисертације

Истраживања о халотолерантним микробним заједницама, која су предмет ове дисертације, су прва истраживања ове врсте у нашој земљи, чиме се доприноси ширењу фундаменталног знања о микробним заједницама природних слатина као фрагилних екосистема. Мултидисциплинарни приступ коришћен у анализи диверзитета халотолерантних микробних заједница, уз примену савремених молекуларних и класичних микробиолошких метода, омогућио је упознавање диверзитета микробних заједница заслањених земљишта као и расветљавање њихове улоге у пружању потпоре биљкама са којима деле станиште. Истраживања у оквиру ове дисертације резултовала су формирањем колекције окарактерисаних и идентификованих НТ PGP бактерија са значајним потенцијалом за примену у пољопривредној производњи. Сојеви из колекције показују различит степен халотолеранције и поседују вишеструка својства стимулације биљног раста које на различит начин могу допринети бољој отпорности биљака у условима абиотичког стреса. Примена НТ PGP бактерија у микробиолошком третману семена уз савремене методе инкапсулације микробних инокуланата, пружа могућност за даљи развој биотехнолошких решења којима се може значајно допринети развоју специјализованих производа заснованих на микроорганизмима који би потенцијално нашли примену у земљиштима повишеног салинитета. Узимајући у обзир наведене аспекте, ова студија има важан научни и практични допринос у области еколошке микробиологије и биотехнологије, постављајући темеље за даља истраживања у области микробних заједница екстремних станишта и одрживе пољопривреде.

6. Објављени и саопштени резултати

Dragojević, M., Raičević, V., Jovičić-Petrović, J. (2020). Microbiome of the halophyte *Hordeum hystris* Roth. As a source of the halophilic PGP bacteria. FEMS Online Conference on Microbiology. <https://doi.org/10.26226/morressier.5f3392ca9d1718ca4c8b2f4c>

Dragojević, M., Djokić, L., Stanković, N., Raičević, V., Karličić, V., Lalević, B., Jovičić-Petrović, J. (2023). In I. Dimkić & V. Venturi (Eds.), Abstracts from the Workshop “Trends in Microbial Solutions for Sustainable Agriculture” (p). University of Belgrade. ISBN: 978 -86-7078-178-8.

Dragojević, M., Stankovic, N., Djokic, L. Raičević, V., Jovičić-Petrović, J. (2023): Endorhizosphere of indigenous succulent halophytes: a valuable resource of plant growth promoting bacteria. Environmental Microbiome, 18(20). <https://doi.org/10.1186/s40793-023-00477-x>

7. Закључак и предлог комисије

Докторска дисертација под називом „Халотолерантне микробне заједнице - диверзитет и способност стимулације биљног раста“ кандидаткиње Милице Драгојевић, мастер биолога-специјалисте, представља оригинални и самостални научни рад из области еколошке

микробиологије. Ова докторска дисертација је спроведена у складу са планом и програмом који је одобрен приликом пријаве теме дисертације. Кандидаткиња Милица Драгојевић је на правилан начин дефинисала циљеве и хипотезе, применила савремене и адекватне методе и успешно обавила експериментални део истраживања. Постављене хипотезе су потврђене добијеним резултатима, који су правилно и прегледно приказани, детаљно анализирани и адекватно поређени са подацима из доступне литературе.

Добијени резултати у овој докторској дисертацији представљају допринос развоју еколошке микробиологије као науке. Ова докторска дисертација даје свеобухватни приказ халотолерантних микробних популација и њихове потенцијалне примене у стимулацији биљног раста. Такође, ова дисертација представља прва истраживања ове врсте у нашој земљи и доприноси ширењу фундаменталног знања о микробним заједницама природних слатина. Имајући у виду све наведено, а посебно постигнуте резултате истраживања и њихов научни и апликативни значај, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију кандидаткиње Милице Драгојевић, мастер биолога-специјалисте, под називом „Халотолерантне микробне заједнице - диверзитет и способност стимулације биљног раста“ и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да ову позитивну оцену усвоји и омогући кандидаткињи јавну одбрану докторске дисертације.

Земун, 27.03.2025.

Чланови комисије

др Блажо Лалевић, редовни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет
УНО Еколошка микробиологија

др Вера Карличић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет
Ужа научна дисциплина Микробиологија

др Стева Левић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет
УНО Биохемија

др Нада Станковић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду, Институт за
молекуларну генетику и генетичко инжењерство
Ужа научна дисциплина Молекуларна биологија

др Јелица Новаковић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду, Биолошки факултет
Ужа научна дисциплина Морфологија,
фитохемија и систематика биљака

ПРИЛОГ

Објављен рад мастер биолога-специјалисте Милице Драгојевић у научном часопису на SCI листи који квалификује кандидата за одбрану дисертације:

Dragojević, M., Stankovic, N., Djokic, L. Raičević, V., Jovičić-Petrović, J. (2023): Endorhizosphere of indigenous succulent halophytes: a valuable resource of plant growth promoting bacteria. *Environmental Microbiome*, 18(20). <https://doi.org/10.1186/s40793-023-00477-x>

(M21, IF (2023) 6.3)

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ**
Датум: 10.03.2025.

Предмет: Изјава о оригиналности докторске дисертације „Халотолерантне микробне заједнице – диверзитет и способност стимулације биљног раста”, аутора Милице Драгојевић

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и Извештаја из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације: „Халотолерантне микробне заједнице – диверзитет и способност стимулације биљног раста”, аутора Милице Драгојевић, константујем да утврђено подударање износи 2%. Овај степен подударности последица је личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података и цитата, као и претходно публикованих резултата истраживања докторанда, који су проистекли из њене дисертације, што је у складу са чланом 9. овог 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. Београд, 10.03.2025. године

Ментор:

др Јелена Јовичић-Петровић, редовни професор
Универзитет у Београду – Пољопривредни факултет