

УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
ФАКУЛТЕТ: ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ



РЕПУБЛИКА РПСКА
УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
Број: 19-2191/14
Датум: 14. 07. 2014. год.
БАЊА ЛУКА

ИЗВЈЕШТАЈ
о оцјени урађене докторске тезе

ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ

На основу члана 149. Закона о високом образовању („Слажбени гласник РС“ број 73/10, 104/11 и 84/12) и члана 54. Статута о Универзитета у Бањој Луци, Наставно-научно вијеће на сједници одржаној 19.06.2014. године именовало је Комисију за преглед, оцјену и одбрану докторске дисертације под називом "Карактеризација антиоксидативног метаболизма водених макрофита *Phragmites communis* (Trin.), *Utricularia vulgaris* (L.) и *Salvinia natans* (L.) All. " кандидаткиње мр Тање Максимовић, (Одлука број:19/3.1460/2014) у сљедећем саставу:

1. др Живко Станковић, редовни професор, Државни Универзитет у Новом Пазару, ужа научна област : Физиологија биљака - председник
2. др Биљана Кукавица, ванредни професор, Природно - математички факултет, Универзитет у Бањој Луци, ужа научна област: Биохемија и молекуларна биологија, члан, ментор
3. др Нина Јањић, доцент, Природно - математички факултет, Универзитет у Бањој Луци, ужа научна област: Биљне науке, ботаника, члан

1. УВОДНИ ДИО ОЦЈЕНЕ ДОКТОРСKE ТЕЗЕ

Докторска дисертација је написана на 350 страна А4 формата, садржи 33 табеле, 160 слика, 360 рефернци. Дисертација се састоји од сљедећих поглавља: Увод, Преглед литературе, Циљ рада, Опште карактеристике истраживаног подручја, Материјал и методе, Резултати рада, Дискусија, Закључци, Литература и Прилог.

2. УВОД И ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

У Уводном дијелу докторске дисертације, написаном на 3 странице, кандидаткиња је навела основне поставке и проблематику свог рада који се односе на испитивање и карактеризацију антиоксидативног метаболизма водених макрофита *Phragmites communis* (Trin.), *Utricularia vulgaris* (L.) и *Salvinia natans* (L.) All. на подручју

рибњака Бардача (базени Нецик и Сињак). Поглавље Преглед литературе је написано на 52 странице и у оквиру њега дат је преглед релевантне литературе кроз који су описане основне карактеристике водених макрофита, њихова улога, значај и адаптивне особине у акватичним екосистемима. Утицаји животне средине на биљке у воденим екосистемима су веома сложени јер је ријеч о утицају више различитих абиотичких фактора, а у раду је посебан нагласак дат утицају тешких метала (Fe, Zn, Mn, Cu, Pb) на метаболизам акватичних макрофита. Објашњени су механизми усвајања тешких метала као и механизми толерантности акватичних макрофита на присуство тешких метала. Једна од последица утицаја различитих врста абиотичког стреса на биљке је повећана производња реактивних врста кисеоника (ROS): супероксид анијон радикал, водоник пероксид, хидроксилни радикал. Реактивне врсте кисеоника су производи нормалног метаболизма биљака међутим у условима изложености биљака неповољним условима животне средине долази до њихове повећане производње и стања које се назива оксидативни стрес. Да би преживјеле повећану производњу ROS биљке су развиле антиоксидативни метаболизам кога чине ензимске и неензимске компоненте. У оквиру поглавља Преглед литературе дат је јасан преглед литературе који се односи на структуре и функције ензимских и неензимских антиоксиданата. Пошто су праћене промјене у антиоксидативном метаболизму акватичних макрофита током цијелог вегетационог периода (мај-октобар) описане су и промјене у антиоксидативном метаболизму које настају како последица природног старења биљака.

У оквиру поглавља Циљ рада кандидаткиња је на 2 странице навела основне циљеве докторске дисертације: испитивање антиоксидативног метаболизма водених макрофита различитих по начину живота и адаптацијама на живот у воденој средини. Један од основних циљева рада био је испитивање присуства тешких метала (Fe, Mn, Cu, Zn, Pb) у рибњачким базенима и њихов утицај на ензиме антиоксидативне одбране, као и на улогу истраживаних акватичних макрофита у биоакумулацији тешких метала.

У оквиру поглавља Опште карактеристике истраживаног подручја који обухвата 10 страница наведени су подаци о географском положају, клими, хидрогеолошким, педолошким и климатским карактеристикама истраживаног подручја. Ово

поглавље је попраћено картама и фотографијама истраживаног подручја, као и климадијаграмом урађен на основу података добијених од хидрометеоролошког завода у Бањој Луци.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

У оквиру поглавља Материјал и методе које је написано на 15 страница дат је опис биљних врста које су кориштене у истраживању: *Phragmites communis* (Trin.), *Utricularia vulgaris* (L.) и *Salvinia natans* (L.) All.

Описане су методе које су кориштете у раду за анализу садржаја тешких метала у води, седименту и биљном материјалу. Све анализе су урађене по стандардним методама које се користе за анализу воде (АПХА, 1995). Детаљно су описане методе екстракције протеина из биљног материјала, као и спектрофотометријске методе одређивања концентрације протеина, фенола, фотосинтетичких пигмената, одређивање активности ензима: каталазе, пероксидаза, аскорбат пероксидазе.

Такође су наведене методе припреме гелова за нативну електрофорезу као и методе за прављење и бојење пресека биљног ткива. Објашњен је начин на који је кориштен програм за анализу резултата добијених нативном електрофорезом и наведено је на који начин је урађена статистичка обрада података.

4. РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ИСТРАЖИВАЊА

Поглавље Резултати је написано на 138 страница, обухвата 28 потпоглавља, и у оквиру њега су табеларно, графички и сликама гелова презентовани добијени резултати. Промјене у антиоксидативном метаболизму водених макрофита као и физичко - хемијске карактеристике воде и садржај тешких метала у води, седименту и биљном материјалу су праћене током 2010. и 2011. на два локалитета, Нецик и Сињак. Садржај протеина, фотосинтетичких пигмената, фенола као и активност ензима пероксидаза, аскорбат пероксидаза, каталазе и полифенол оксидаза поређени су у односу на локалитет као и између истраживаних биљних врста.

Наведени су резултати који се односе на физичко-хемијску анализу воде, седимента и акватичних макрофита, током сезоне, посебно за сваки локалитет и за сваку годину. Извршена је компаративна анализа добијених података како би се

утврдило стање квалитета воде, седимента као и степен биоакумулације тешких метала код истраживаних макрофитских врста. Приказани резултати показују да су испитивани параметри варирали и зависили како од локалитета и биљне врсте тако и времена анализе током вегетационог периода. Уопштено, подаци о садржају тешких метала (Fe, Mn, Cu, Zn и Pb) у води и седменту указују да је њихова концентрација у дозвољеним границама и да подручје Бардача као екосистем још увијек није оптерећено овим полутантима. Хемијске анализе биљног материјала и биоакумулације појединих елемената указују на то да се истраживане макрофите могу користити као биоиндикатори квалитета воде, као и на могућност њиховог коришћења у техникама фиторемедијације.

Промјене у концентрацији протеина током вегетационог периода су повезане са абиотичким факторима и нивоом доступности хранљивих материја. Такође, на садржај протеина је утицао и развојни стадијум биљака током вегетационог периода: млађе биљке су имале већи садржај протеина у односу на период старења када је услјед повећаних оксидационих процеса дошло до њихове деградације и смањења концентрације.

Компаративном анализом података утврђене су значајне разлике у садржају пигмената међу различитим врстама макрофита (емерзне, субмерзне и флотантне) на истраживаним базенима, а које су резултат смањења интензитета и квалитета свјетлости, промјена нивоа воде, као и повећања степена мутноће, а што је вјероватно условило повећан садржај хлорофила почетком сезоне односно смањен крајем вегетационог периода. Обзиром да је водена средина комплексан медијум, водене макрофите су развиле различите стратегије и адаптације на стресне факторе, а једна од њих је и производња биоактивних секундарних метаболита тј. фенолних једињења. Добијени резултати су показали да је садржај фенола био највећи код *Phragmites communis*, 2,5-4 пута нижи је измјерен у ткиву *Salvinia natans*, док је најнижи измјерен у ткиву *Utricularia vulgaris*. Такође, добијени резултати указују и на то да повећање активности пероксидаза код *Phragmites communis* је у корелацији са повећањем садржаја фенола, што указује да је повећање садржаја фенола повезано са процесом лигнификације, односно умрежавањем фенолних компоненти

(фелурична и кумарична киселина) у ћелијски зид. Резултати рада указују на то да су различити стресни фактори (висока температура, смањена освјетљеност, тешки метали, еутрофикација, хипоксија) у великој мјери утицали на активност пероксидаза, али и да велики утицај има биљна врста, при чему се активност мијењала у зависности од утицаја спољашње средине као и од дужине трајања утицаја.

Утврђено је да млади листови имају мању активност пероксидаза (мај), а код старијих листова, нарочито током репродуктивне фазе, активност се повећавала (август-септембар) па се овај ензим може посматрати као индикатор старења. Повећана активност пероксидаза у том периоду указује и на висок антиоксидативни капацитет *Phragmites communis* изазван оксидативним стресом у условима када су повећане концентрације тешких метала (Fe и Mn) на истраживаним локалитетима. Генерално се може рећи да је пероксидазна активност током сезоне показала значајне варијације 2010. и 2011. године, али да су те разлике биле израженије у односу на врсту. Највећа активност је констатована за *Phragmites communis* (лист, затим коријен и ризом испитиване врсте), слиједи *Utricularia vulgaris*, па *Salvinia natans*. Може се предпоставити да су значајне промјене у абиотичким факторима довеле до повећане производње ROS и промјене у изоензиматском профилу пероксидазних изоформи. Да се промјене у активности гвајакол пероксидаза могу користити као потенцијални биомаркер за процјену интензитета стреса показали су резултати овог рада. Активност гвајакол пероксидаза је била највећа код *Phragmites communis*, слиједи *Utricularia vulgaris* па *Salvinia natans*.

Познато је да старење изазива читав низ метаболичких промјена, који укључује промјене у активностима ензима антиоксидативне одбране, што је овим радом и потврђено. Већа активност полифенол оксидаза (2-6 пута) измјерена је током 2011. код све три испитиване макрофитске врсте у односу на 2010. годину, а што је вјероватно резултат измјерених већих температура у том периоду. Обзиром на чињеницу да је улога полифенол оксидаза првенствено одбрамбена предпоставља се да је до повећања њихове активности током максималне фазе раста (јул-август) дошло због улоге полифенол оксидаза у повећању толеранције на

стресне услове. Активност полифенол-оксидаза се повезује и са садржајем фенола односно са повећањем концентрације фенола повећавала се и активност испитиваног ензима. У раду је показано да се активност аскорбат пероксидазе, као једног од главних ензима за уклањање водоник пероксида у биљним ћелијама, повећава у одговору на различите врсте стреса изазване промјенама у животној средини. Највећа активност аскорбат пероксидаза измјерена је код *Phragmites communis* а значајно нижа, за 80 %, код *Utricularia vulgaris* и *Salvinia natans*. Повећана активност аскорбат пероксидаза утврђена је почетком вегетационог периода, са одређеним специфичностима везаним за врсту. Већа активност је забиљежена на локалитету Нецик у односу на Сињак. У поређењу са другим ензимима каталаза има врло високу активност и највишу стопу измјене супстрата али врло низак афинитет за H_2O_2 те је веома осјетљива на фотоинхибицију и деградацију у условима повећања интензитета свјетлости. Активност каталазе у листовима *Salvinia natans* била је за 94-97 % нижа у односу на *Phragmites communis*, а слична са *Utricularia vulgaris*. Супероксид дисмутаза (SOD) се сматра првом линијом одбране од реактивних врста кисеоника.

Резултати за изоензимске профиле SOD су показали да је код SOD детектован различит број изоформи током истраживаног периода. На локалитету Нецик у листовима *Phragmites communis* утврђена је једна SOD изоформа током маја, а двије током септембра, док је у коријену и ризому утврђена једна SOD изоформа. У листовима *Salvinia natans* на истраживаним локалитетима утврђена је једна SOD изоформа током јуна, а двије током септембра, па се може предпоставити да је старење индуковало повећање SOD изоформи.

Хистохемијским методама (бојење флороглуцином) у стаблу и ризому *Phragmites communis* доказано присуство лигнина у дијелу склеренхимског прстена и подручју око проводних снопића (механички елементи), док је бојењем нафтолом доказана пероксидазна активност у зони примарне коре, у зони склеренхимског прстена и у зони око проводних елемената.

Добијени резултати у овом раду представљају снажан допринос како за

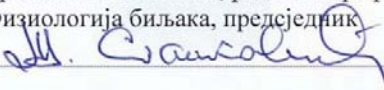
истраживано подручје тако и за науку, тим прије што се већина истраживања одвија у лабораторијама, у контролисаним условима, а нема довољно података и доказа како се биљке понашају у природној околини у неконтролисаним условима. У дисертацији је приказана узрочно-последична повезаност различитих стресних фактора (повишена температура са високим интензитетом свјетлости, тешки метали, еутрофикација, хипоксија) са промјенама нивоа активности испитиваних ензима па се закључује да се ниво њихове активности и сезонска варирања налазе у позитивној корелацији. Резултати приказани у овој тези су показали да истраживане макрофитске врсте имају способност да контролишу ниво ћелијског ROS те могу бити корисне у будућности да се превазиђу стресни услови који долазе из животне средине.

5. ЗАКЉУЧАК И ПРИЈЕДЛОГ

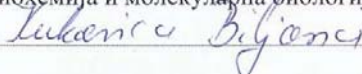
Сматрамо да је кандидаткиња мр Тања Максимовић у потпуности испунила задатке који су предвиђени постављеним циљевима ове докторске дисертације. Оригинални приступ проблематици антиоксидативног метаболизма акватичних макрофита кандидаткиња је овим темељним истраживањима проширила и употпунила досадашња сазнања о истраживаним врстама. Комисија такође констатује да је ова докторска дисертација написана у складу са образложењима и циљевима наведеним у пријави теме, да садржи све битне елементе и да даје оригиналан допринос науци. Узимајући у обзир постигнуте резултате, на основу укупне оцјене рада Комисија сматра да ова докторска дисертација представља оригинални научни допринос и са особитим задовољством предлаже Наставно-научном вијећу ПМФ-а у Бања Луци да прихвати извештај Комисије за преглед, оцјену и одбрану докторске дисертације мр Тање Максимовић под насловом "Карактеризација антиоксидативног метаболизма водених макрофита *Phragmites communis* (Trin.), *Utricularia vulgaris* (L.) и *Salvinia natans* (L.) All."

ПОТПИС ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

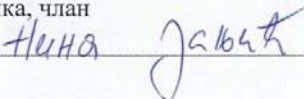
1. Др Живко Станковић, редовни проф., ужа научна област:
Физиологија биљака, председник



2. Др Биљана Кукавица, ванредни проф., ужа научна област:
Биохемија и молекуларна биологија, члан, ментор



3. Др Нина Јањић, доцент, ужа научна област: Биљне науке,
ботаника, члан



ИЗДВОЈЕНО МИШЉЕЊЕ: Члан комисије који не жели да потпише извјештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извјештај образложење, односно разлог због којих не жели да потпише извјештај.