

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ-
РУДАРСКО-ГЕОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ**

11120 Београд 35, ул. Ђушина 7
Тел: (011) 3219-101, Факс: (011) 3235-539



**UNIVERSITY OF BELGRADE,
FACULTY OF MINING AND GEOLOGY**

Republic of Serbia, Belgrade, Djusina 7
Phone:(381 11) 3219-101, Fax:(381 11) 3235-539

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
- Веће научних области техничких наука-

Београд
Студентски трг бр. 1

Достављамо вам:

- Образац захтева за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији Срђана Станковића, дипломираног молекуларног биолога и физиолога.
- Одлуку Наставно-научног већа Рударско-геолошког факултета Универзитета у Београду о усвејању извештаја Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације.
- Реферат Комисије
- Један укоричен штампани примерак докторске дисертације
- Електронска верзија докторске дисертације

Шеф Одељења за студентска
и наставна питања

Љиљана Колоња, дипл. инж. рударства

Факултет: Рударско-геолошки

(Број захтева)

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
Веће научних области техничких наука
(Назив већа научних области коме се захтев упућује)

(Датум)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији

Молимо да, сходно члану 46. ст.5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду („Гласник Универзитета“, бр.131/06), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата

Срђана (Борисав) Станковића, дипломираног молекуларног биолога и физиолога
(име, име једног од родитеља и презиме)

КАНДИДАТ Срђан (Борисав) Станковић, дипломирани молекуларни биолог и физиолог
(име, име једног од родитеља и презиме)

пријавио је докторску дисертацију под називом:

„МИКРОБИОЛОШКИ ДИВЕРЗИТЕТ КИСЕЛОГ ЈЕЗЕРА РОБУЛЕ И УТИЦАЈ ЈЕЗЕРСКЕ ВОДЕ НА ОКСИДАЦИЈУ

СУЛФИДНИХ МИНЕРАЛА “

Научна област: Геологија

Универзитет је дана 08.06.2015. год. својим актом под бр. 02 број:61206-2511/2-15 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

„МИКРОБИОЛОШКИ ДИВЕРЗИТЕТ КИСЕЛОГ ЈЕЗЕРА РОБУЛЕ И УТИЦАЈ ЈЕЗЕРСКЕ ВОДЕ НА ОКСИДАЦИЈУ

СУЛФИДНИХ МИНЕРАЛА “

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата:

Срђана (Борисав) Станковића, дипломираног молекуларног биолога и физиолога
(име, име једног од родитеља и презиме)

образована је на седници одржаној 24.03.2016. год. одлуком факултета под бр. 1/107, у саставу:

Име и презиме члана комисије

звање

научна област

- др Владица Цветковић, ред. проф. Геологија
- др Ивана Морић, научни сарадник Универзитета у Београду-Институт за молекуларну генетику и генетски инжењеринг Микробиологија
- Др Веселин Драгишић, ред. проф. Хидрогеологија
- др Бранка Васиљевић, научни сарадник Универзитета у Београду-Институт за молекуларну генетику и генетски инжењеринг Микробиологија
- _____

Наставно-научно веће факултета прихватило је извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној дана 19.05.2016. год.

ДЕКАН
Рударско-геолошког факултета

Прилог: 1. Извештај комисије са предлогом
2. Акт Наставно-научног већа факултета о усвајању извештаја
3. Примедбе дате у току стављања извештаја на увид јавности, уколико је таквих примедба било.

Проф. др Душан Полочић

На основу члана 30. Закона о високом образовању, члана 111. Статута Рударско-геолошког факултета Универзитета у Београду и члана 26. Правилника о студирању на докторским студијама и стицању звања доктора наука – пречишћен текст, Наставно-научно веће Рударско-геолошког факултета Универзитета у Београду, на својој седници одржаној 19.05.2016. године, донело је

О Д Л У К У

1. Усваја се извештај комисије за оцену и одбрану докторске дисертације **Срђана Станковића**, дипл. инж. молекуларне биологије, под насловом „*Микробиолошки диверзитет киселог језера Робуле и утицај језерске воде на оксидацију сулфидних минерала*“, на који није било примедба.
2. Универзитет у Београду је дана 08.06.2015. године дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.
3. Радови из научних часописа са листе која је утврђена као релевантна за вредновање научне компетенције у одређеном научном пољу:
 - S. Stanković, I. Morić, A. Pavić, B. Vasiljević, D.B. Johnson, V. Cvetković (2014) Investigation of the microbial diversity of an extremely acidic metal-rich water body (Lake Robule, Bor, Serbia), *Journal of the Serbian Chemical Society* 79 (6): 729-741 (IF=0,871; ISSN 0352-5139)
 - S. Stanković, I. Morić, A. Pavić, S. Vojnović, B. Vasiljević, V. Cvetković (2015) Bioleaching of copper from samples of Old flotation tailings (Copper mine Bor, Serbia), *Journal of the Serbian Chemical Society* 80 (3): 391-405 (IF=0,871; ISSN 0352-5139)
4. Именовани ће бранити докторску дисертацију пред комисијом у саставу: др Владица Цветковић, ред. проф.; др Ивана Морић, научни сарадник Универзитета у Београду – Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство; др Веселин Драгишић, ред. проф.; др Бранка Васиљевић, научни саветник Универзитета у Београду – Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство.
5. Докторска дисертација из става 1. ове одлуке подобна је за одбрану након добијања сагласности од Већа научних области техничких наука.
6. О термину одбране благовремено се обавештава стручна служба ради обављања претходних активности.

Д Е К А Н

др Душан Полоччић, ред. проф.

Достављено:

- Већу научних области техничких наука
- Комисији
- Именованом
- Одељењу за студентска питања

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата

Срђана Станковића, дипломираног молекуларног биолога и физиолога.

Одлуком Наставно-научног већа Рударско-геолошког факултета Универзитета у Београду бр. 1/107 од 29.3.2016. одређени смо за чланове комисије за оцену и одбрану докторске дисертације „**Микробиолошки диверзитет киселог језера Робуле и утицај језерске воде на оксидацију сулфидних минерала**” кандидата Срђана Станковића, дипломираног молекуларног биолога и физиолога. После прегледа достављене дисертације и других пратећих материјала и разговора са кандидатом, комисија је сачинила следећи

РЕФЕРАТ

1. Увод

1.1. Хронологија одобравања теме докторске дисертације

- Срђан Станковић је уписао докторске студије на студијској групи Геологија Рударско-геолошког факултета Универзитета у Београду школске 2010/2011 године. Све испите предвиђене акредитованим програмом докторских студија кандидат је положио са просечном оценом 10.
- Кандидат је 03. децембра 2014. поднео захтев за формирање комисије за оцену подобности кандидата, теме и ментора докторске дисертације (број 1/353).
- На основу члана 30. Закона о високом образовању и члана 117. Статута Рударско-геолошког факултета, Наставно-научно веће Рударско-геолошког факултета Универзитета у Београду је сходно члану 175. став 4 Статута факултета 29. јануара 2015. (број 1/29 од 30. јануара 2015. године) донело одлуку о именовању комисије за оцену подобности кандидата и теме докторске

дисертације у следећем саставу: проф. др Владица Цветковић, редовни професор Рударско-геолошког факултета Универзитета у Београду, др Ивана Морић, научни сарадник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, проф. др Веселин Драгишић, редовни професор Рударско-геолошког факултета Универзитета у Београду и др Бранка Васиљевић, научни саветник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду.

- Извештај комисије којим је дато позитивно мишљење о кандидату и теми докторске дисертације усвојен је на седници Наставно-научног већа Рударско-геолошког факултета, која је одржана 21. маја 2015. (број 1/203 од 25. маја 2015). Овом одлуком је кандидату одобрена израда докторске дисертације под називом „Микробиолошки диверзитет киселог језера Робуле и утицај језерске воде на оксидацију сулфидних минерала”, а за менторе су именовани проф. др Владица Цветковић, редовни професор Рударско-геолошког факултета Универзитета у Београду и др Ивана Морић, научни сарадник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду.
- На основу члана 47. став 5. тачка. 3. Статута Универзитета у Београду („Гласник Универзитета у Београду”, број 162/11- пречишћени текст, 167/12 и 172/13) и чл. 14. – 21. Правилника о већима научних области на Универзитету у Београду („Гласник Универзитета у Београду”, број 134/07, 150/09, 158/11, 164/11 и 165/11) а на захтев Рударско-геолошког факултета број 1/217 од 25. маја 2015. Веће научних области техничких наука Универзитета у Београду је 8. јуна 2015. године усвојило предложену тему докторске дисертације (број 61206-2511/2-15 ЛД).
- Почетком фебруара 2016. године кандидат је поднео захтев за именовање комисије за оцену и одбрану докторске дисертације
- На основу члана 30. Закона о високом образовању, члана 117. Статута Рударско-геолошког факултета Универзитета у Београду и члана 26. Правилника о студирању на докторским студијама и стицању звања доктора наука, Наставно-научно веће Рударско-геолошког факултета је на седници одржаној 29. марта 2016. (број 1/107) усвојило одлуку о формирању комисије за оцену и одбрану докторске дисертације у следећем саставу: проф. др Владица Цветковић, редовни професор Рударско-геолошког факултета Универзитета у Београду, др Ивана Морић, научни сарадник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, проф. др Веселин Драгишић, редовни

професор Рударско-геолошког факултета Универзитета у Београду и др Бранка Васиљевић, научни саветник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду.

1.2. Научна област дисертације

Докторска дисертација кандидата Срђана Станковића је сврстана у научну област геологија и ужу научну област геохемија, за које је Рударско-геолошки факултет Универзитета у Београду матичан. Ментори докторске дисертације су:

1. проф. др Владица Цветковић, редовни професор, ужа научна област петрологија и геохемија
2. др Ивана Морић, научни сарадник, ужа научна област микробиологија.

1.3. Биографски подаци о кандидату

Срђан (Борисав) Станковић је рођен 1975. године у Ливну, Босна и Херцеговина. Основну школу је похађао у Купресу (Босна и Херцеговина), а затим је у Панчеву похађао Гимназију „Урош Предић”. Дипломирао је 2001. године на Биолошком факултету Универзитета у Београду, на студијској групи Молекуларна биологија и физиологија, са просечном оценом 8,89. Након што је кратко волонтерски радио у Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић”, кандидат се 2002. године запослио у предузећу „Божих и синови” у Панчеву, на месту предавача у школи рачунара, да би касније, у истом предузећу, прешао на место менаџера продаје рачунарске опреме. У јулу 2005. године С. Станковић оснива предузеће „Кубит” које се бавило развојем садржаја за мобилне телефоне и интернет презентација, као и имплементацијом пословног софтвера. Од 2008. године ради као наставник биологије, екологије и заштите животне средине у Електротехничкој школи „Никола Тесла” у Панчеву, а од 2009. године и као наставник биологије у Основној школи „Борисав Петров Браца”, такође у Панчеву. Од 2010. године Срђан Станковић је студент докторских студија Рударско-геолошког факултета Универзитета у Београду на студијској групи Геологија. Срђан Станковић је до сада објавио три научна рада у међународним часописима, као и једну научну полемику. Учествовао је са презентацијом постера на Конгресу микробиолога Србије „Микромед 2013”. Два рада објављена у часопису *Journal of the Serbian Chemical Society* су проистекла из рада на докторској дисертацији. Одлуком Научног већа Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство од 03. септембра 2015. (број 285) Срђан Станковић је изабран у звање истраживач сарадник.

2. Опис докторске дисертације

2.1. Садржај докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата Срђана Станковића, дипломираног молекуларног биолога и физиолога, под насловом „**Микробиолошки диверзитет киселог језера Робуле и утицај језерске воде на оксидацију сулфидних минерала**” је написана у складу са Упутством за формирање репозиторијума докторских дисертација, донетог на седници Сената Универзитета у Београду одржаној 14. децембра 2011. године. Дисертација је написана на 123 странице А4 формата и садржи 17 табела и 37 слика. Текст дисертације је подељен на седам поглавља:

1. Увод
2. Циљеви
3. Материјал и методе
4. Резултати
5. Дискусија
6. Закључци
7. Литература

На почетку дисертације се налазе сажетак на српском и енглеском језику, пет кључних појмова и УДК број, док се на крају рада налазе биографија аутора и обавезни прилози (изјава о ауторству, изјава о истоветности штапане и електронске верзије и изјава о коришћењу). У литератури је наведено 119 библиографских јединица.

2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

У уводном делу докторске дисертације аутор описује хемијске и биолошке механизме који доводе до настанка природних и антропогених екстремно киселих водених станишта, при чему је језеро Робуле детаљније описано на основу доступних података у литератури. Затим је дат преглед физиолошких особина најзначајних родова ацидофилних бактерија и еколошких односа међу овим микроорганизмима. Описане су класичне микробиолошке методе као и савремене молекуларно-биолошке методе које се користе у процени микробиолошког диверзитета. Посебна пажња је посвећена метагеномској методи - анализи полиморфизама терминалних рестрикционих фрагмената (*енг.* Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism – T-RFLP), која је коришћена у процени микробиолошког диверзитета и релативне заступљености ацидофилних бактерија у узорцима узетих из киселог језера Робуле.

Поред тога, описане су примене ацидофилних бактерија у биотехнологији: у процесу биолужења бакра из руда и минералних концентрата и биоремедијацији киселих рудничких вода. Објашњени су механизми биолужења и примена ове технологије у биохидрометалуршким процесима за производњу бакра. Такође, представљене су и технологије која омогућују биоремедијацију киселих рудничких вода уз селективну преципитацију сулфида метала применом бактерија које редукују сулфате.

Аутор је на крају уводног дела дисертације представио и теоријске принципе метода квалитативне и семи-квантитативне рендгенске дифракционе анализе.

У поглављу „Материјал и методе” детаљно је описан начин узимања узорка површинске воде језера Робуле и биомасе за анализу, методе аналитичке хемије, које су коришћене за одређивање концентрације бакра, феро и фери јона, потом микробиолошке методе микроскопирања и култивације ацидофилних бактерија на селективним двослојним чврстим подлогама, као и молекуларно-биолошке методе које су коришћене приликом процене микробиолошког диверзитета узорка (изолација молекула ДНК из бактеријских колонија, изолација метагеномске ДНК из узорка узетих из животне средине, умножавање гена за 16S рРНК PCR методом, агарозна електрофореза и T-RFLP метода). Поред тога, у овом поглављу су описани и експерименти биолужења минералног концентрата и флотацијске јаловине, као и метода квалитативне и семи-квантитативне рендгенске структурне анализе узорка флотацијске јаловине, пре и након експеримента биолужења.

У поглављу „Резултати” приказани су резултати испитивања микробиолошког диверзитета воде узете са површине језера Робуле и узорка биомасе из приобалне зоне језера применом класичних метода микробиологије (микроскопирање и култивација бактерија на селективним чврстим подлогама) и молекуларно-биолошке метагеномске T-RFLP методе. Поред тога, приказани су резултати поређења приноса бакра и гвожђа након биолужења минералног концентрата помоћу аутохтног конзорцијума микроорганизама из језера Робуле и конзорцијума ацидофилних бактерија направљеног у лабораторији, као и резултати експеримента биолужења флотацијске јаловине коришћењем воде из језера Робуле као раствора за лужење.

Позивајући се на обимне литературне податке, аутор у поглављу „Дискусија” објашњава разлоге због којих су хетеротрофне ацидофилне бактерије *Acidiphillum cryptum* и гвожђе-оксидујуће хемолитоаутотрофне бактерије *Leptospirillum ferrooxidans* најзаступљенији ацидофилни микроорганизми у површинској води језера Робуле. На основу података добијених T-RFLP методом, анализиран је микробиолошки диверзитет

узорка биомасе узетог из литоралне зоне језера. На основу расположивих података, предложени су хипотетички биогеохемијски модели језера и биомасе у приобалној зони језера.

На основу механизма биолужења описаних у литератури, објашњен је статистички значајно већи принос гвожђа и бакра након лужења узорка минералног концентрата у раствору који је био инокулисан бактеријским конзорцијумом направљеним у лабораторији, у поређењу са приносом ових метала након лужења узорка минералног концентрата у раствору инокулисаним аутохтоним бактеријским конзорцијумом из језера Робуле.

Детаљно су анализирани подаци добијени током експеримента биолужења узорака старе флотацијске јаловине Рудника бакра Бор, који су узети са дубина од 10, 15 и 20 метара. Приказани су резултати мерења концентрације Cu , Fe(II) и Fe(III) током експеримента биолужења, као и резултати квалитативне и семи-квантитативне рендгенске структурне анализе узорака флотацијске јаловине, пре и након биолужења. Рендгенска структурна анализа је показала да је заступљеност сулфидних минерала, првенствено пирита, знатно мања у слојевима ближим површини јаловишта. Садржај пирита расте са дубином и највећи је у узорку узетом са дубине од 20 метара. С друге стране, у узорку узетом са дубине од 5 метара детектована је највећа количина лангита, секундарног минерала насталог вишедеценијским таложењем бакар(II)сулфата, као резултат хемијских процеса који су довели до лужења бакра из сулфидних минерала присутних у флотацијској јаловини. На основу ових података објашњен је скоро стопроцентан принос бакра израчунат након биолужења узорка узетог са дубине од 5 метара, и нешто нижи принос који је израчунат након биолужења узорака узетих са дубина од 15 и 20 метара. Добијени подаци су упоређени са подацима о киселинском лужењу узорака флотацијске јаловине. На основу поређења ових података, изведен је очекиван закључак да је биолужење ефикаснији метод за третирање узорака који садрже веће количине сулфидних минерала бакра.

3. Оцена докторске дисертације

3.1. Савременост и оригиналност

Киселе рудничке воде су предмет интензивних проучавања у свету, јер представљају једног од највећих загађивача животне средине. Оваква станишта су релативно ретка у свету и представљају фокус интересовања научника који изучавају физиолошке механизме опстанка живог света у екстремним условима. Интензивнија

проучавања екстремно киселих језера врше се протеклих неколико година у Шпанији, где на релативно малом простору у области Иберијског пиритског појаса постоји око двадесет киселих језера насталих у површинским коповима, након престанка експлоатације руде бакра. Слична језера постоје и у Пољској, Аустралији и Сједињеним Америчким Државама. Бројна јаловишта рудничког отпада у Србији јесу примарни извор киселих рудничких вода, а језеро Робуле код Бора представља можда најдрастичнији пример загађивања животне средине киселим водама у Србији. То је 450 метара дугачка и у просеку око 100 метара широка акумулација екстремно киселе воде са веома високом концентрацијом метала (гвожђа, бакра, цинка, мангана и других хемијских елемената). Са аспекта фундаменталних научних истраживања, изучавање микробиолошког диверзитета екстремно киселог језера Робуле у потпуности је у складу са савременим трендовима у овој области науке. Испитивања микробиолошког диверзитета киселих станишта у Србији су рађена спорадично, искључиво применом класичних метода микробиологије које пружају ограничен увид у микробиолошки диверзитет ових станишта, с обзиром да огромну већину микроорганизама присутних у животној средини није могуће култивисати у лабораторијским условима. Савремена испитивања микробиолошког диверзитета срединских узорака заснивају се на комбиновању класичних метода микробиологије и молекуларно-биолошких метода које не захтевају култивацију микроорганизама. Приступ у испитивању микробиолошког диверзитета екстремно киселог станишта, који подразумева комбинацију микробиолошких и молекуларно-биолошких метода, први пут је примењен код нас, што је резултирало до сада најпотпунијим увидом у микробиолошки диверзитет једног киселог станишта у Србији.

Поред тога, кисела станишта привлаче пажњу истраживача због могућности култивације и изолације ацидофилних микроорганизама који се примењују у процесу биолужења метала – технологији у којој кључну улогу имају ацидофилне гвожђе-оксидујуће бактерије које својом метаболичком активношћу катализују процес оксидације атома метала који се након тога ослобађају из кристалне решетке у облику катјона растворљивих у киселој средини. Након биолужења метали се издвајају из обогаћеног лужног раствора помоћу хидрометалуршких поступака солвентне и електролитичке екстракције. Култивација и изолација ацидофилних микроорганизама са различитим физиолошким особинама је од суштинског значаја за развој биохидрометалургије. Ова технологија ће вероватно имати важну улогу у успостављању одрживе производње метала, пошто у поређењу са конвенционалном пирометалуршком технологијом мање утиче на животну средину, захтева знатно мање

енергије и може се применити у производњи бакра из секундарних минералних сировина са веома ниским процентуалним уделом овог метала. Истраживања усмерена ка развоју и примени биохидрометалургије од изузетног су значаја за Републику Србију, јер се рудничка јаловишта у борском рударском басену и даље у довољној мери не препознају као значајан секундарни извор бакра. Примена биохидрометалуршких процеса претвара јаловишта у минералне ресурсе из којих је могућа профитабилна производња бакра и других метала уз релативно мала улагања у поређењу са конвенционалним технологијама које се примењују у металургији обојених метала.

У протеклих неколико деценија више пута је рађена валоризација бакра из узорака старе флотацијске јаловине Рудника бакра Бор, методом киселинског лужења. У овој дисертацији је први пут испитана могућност добијања бакра из овог материјала применом методе биолужења. Иако су експерименти спроведени у лабораторијској размери, добијени подаци су добра полазна основа за даља истраживања, с обзиром да је показано да биолужење даје значајно боље резултате приликом екстракције бакра из сулфидних минерала у односу на киселинско лужење.

Ова докторска дисертација представља значајан научни допринос и подстицај за даља истраживања у области изучавања ацидофилних бактерија, њихове интеракције са стенама у горњим деловима Земљине коре и примене ових микроорганизама у биотехнологији.

3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

У списку коришћене литературе аутор наводи 119 библиографских јединица, претежно научних радова новијег датума, као и зборника радова, универзитетских уџбеника и монографија. У литератури су најзаступљенији радови који се баве микробиолошким диверзитетом екстремно киселих станишта, настанком, особинама и екологијом ових станишта, као и физиолошким особинама ацидофилних микроорганизама. Значајан део литературе чине научни радови који се баве применом ацидофилних бактерија у процесу биолужења бакра.

Део наведених радова се бави методама које су примењене током истраживања (култивација ацидофилних бактерија, T-RFLP, рендгенска структурна анализа и друге). Списак литературе је обиман и релевантан за тему ове докторске дисертације.

3.3. Опис и адекватност примењених научних метода

За одређивање концентрације укупног бакра, Fe(II) и Fe(III) у води језера Робуле и у лужним растворима током експеримената биолужења коришћене су

спректофотометријске методе: одређивање укупног бакра помоћу бицинхониничне киселине, одређивање укупног гвожђа ферозинским тестом, одређивање концентрације Fe(II) и Fe(III) јона фенантролинским и тиоцијанатним тестом.

Квалитативна и семи-квантитативна анализе кристалних фаза у узорцима флотацијске јаловине урађене су методом реднгенске структурне анализе.

Бактерије су култивисане на двослојним чврстим подлогама. Ово су специфичне микробиолошке подлоге развијене искључиво за гајење ацидофилних бактерија које су врло осетљиве на присуство органских молекула који делују инхибиторно на раст ових микроорганизама. Први слој хранљиве подлоге који се излива у петри шоље инокулише се хетеротрофним ацидофилним бактеријама врсте *Acidihpillum cryptum* које метаболишу алифатичне органске киселине које су производ метаболизма ацидофилних бактерија, а које делују инхибиторно на раст ових микроорганизама. Двослојне подлоге омогућују култивацију већег броја врста ацидофилних бактерија као и раст већег броја колонија у односу на класичне медијуме који се користе за култивацију ацидофилних бактерија. У зависности од састава медијума, изоловане су хемолитоаутотрофне гвожђе-оксидујуће и сумпор-оксидујуће бактерије, као и хемоорганохетеротрофне ацидофилне бактерије.

Изолација ДНК из узорака узетих из животне средине рађена је помоћу MoBio Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, САД). За процену микробиолошког диверзитета узорака, поред култивације бактерија у Петри шољама на двослојним чврстим подлогама, коришћена је и метагеномска метода анализе полиморфизама терминалних рестрикционих фрагмената (*енг.* Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP). Ова метода омогућује релативно једноставну и брзу идентификацију микроорганизама у узорцима узетим из животне средине, као и процену релативне заступљености микроорганизама у узорку. Ова метода се заснива на амплификацији гена за 16S рНК методом ланчане реакције полимеризације (*енг.* Polymerase Chain Reaction – PCR) коришћењем метагеномске ДНК као матрице и флуоресцентно обележених прајмера. Након амплификације гена врши се дигестија фрагмената ДНК помоћу ензима - рестрикционих ендонуклеаза - које секу молекул ДНК на тачно одређеном месту препознајући кратки низ нуклеотида карактеристичан за сваку ендонуклеазу. Као производ дигестије настају флуоресцентно обележени терминални рестрикциони фрагменти различитих дужина. Ова метода се заснива на претпоставци да ће, услед малих разлика у редоследу нуклеотида гена за 16S рНК различитих врста бактерија, ендонуклеазе сећи молекул ДНК на различитим местима, што ће довести до настанка рестрикционих фрагмената различитих дужина,

карактеристичних за сваку врсту. На основу дужине рестрикционих фрагмената и интензитета флуоресцентног зрачења које су емитовали фрагменти, теоријски је могуће идентификовати врсте микроорганизама у узорку, као и њихову релативну заступљеност.

Резултати добијени T-RFLP анализом метагеномске ДНК у случају узорка воде из језера Робуле потврђени су и ензимском дигестијом гена за 16S рРНК умножених из молекула ДНК изолованих из бактеријских колонија. Употребом T-RFLP методе процењена је и релативна заступљеност ацидофилних бактерија пре и након биолужења узорака минералног концентрата помоћу бактеријског конзорцијума из језера Робуле и бактеријског конзорцијума направљеног у лабораторији.

3.4. Оцена примењивости добијених резултата

Као што је поменуто у претходним поглављима, добијени резултати могу бити искоришћени у даљим истраживањима микробиолошког диверзитета и екологије екстремно киселих станишта у околини Бора, а поред тога резултати приказани у овој дисертацији могу наћи практичну примену у биохидрометалуршким поступцима за производњу бакра и других метала из примарних и секундарних минералних сировина. Резултати овог истраживања су верификовани објављивањем два рада у међународном часопису са SCI листе.

3.5. Оцена способности кандидата за самостални научни рад

Током израде докторске дисертације кандидат је показао самосталност, одговорност и посвећеност научном раду. Почевши од дефинисања теме докторске дисертације, осмишљавања и спровођења експеримената, решавања проблема са којима се суочавао и успостављања сарадње са установама, лабораторијама и појединцима који су помогли у изради ове дисертације, кандидат је показао да поседује особине које га квалификују да буде самосталан истраживач. Израдом семинарских радова, писањем научних радова и докторске дисертације, кандидат је доказао да поседује коректан писани и усмени стил изражавања и умешност у коришћењу научне литературе.

Током рада на изради докторске дисертације кандидат Срђан Станковић се суочио са одређеним изазовима које је успешно савладао. Први покушаји гајења ацидофилних бактерија и изолације метагеномске ДНК из узорака нису били успешни. Ацидофилне бактерије су екстремофили који захтевају специфичне услове за култивацију. Посебан изазов представља изолација метагеномске ДНК из узорака узетих из киселих станишта. Због киселости средине и присуства високих концентрација

гвожђа и других метала, изолација укупне ДНК из таквих узорака је тешка. С обзиром да у Србији не постоји истраживачка група која се бави ацидофилним микроорганизмима, кандидат је ступио у контакт са професором Баријем Џонсоном са Универзитета у Бангору (Уједињено Краљевство), који спада у водеће истраживаче у овој области микробиологије. На позив професора Џонсона, кандидат је током јула и августа 2012. године боравио као гост истраживач на Универзитету у Бангору, где је под супервизијом професора Џонсона овладао методама за култивацију и молекуларно-биолошку идентификацију ацидофилних бактерија. Професор Џонсон је био изузетно задовољан истраживачким радом кандидата, што је и потврдио у личном контакту с члановима комисије. Треба напоменути и да је кандидат током израде докторске дисертације био запослен као наставник биологије у две панчевачке школе и да се успешно изборио са изазовом усклађивања редовних обавеза на послу са израдом докторске дисертације. И поред наведених изазова, кандидат је завршио израду дисертације за мање од пет година.

Сматрамо да је, на основу свега наведеног, кандидат Срђан Станковић у потпуности спреман за самостални научно-истраживачки рад.

4. Остварени научни допринос

4.1. Приказ остварених научних доприноса

У опште научне доприносе ове дисертације можемо сврстати увођење нових микробиолошких и молекуларно-биолошких метода у испитивање микробиолошког диверзитета екстремно киселих станишта, као и боље разумевање процеса оксидације сулфидних минерала под утицајем ацидофилних микрорганизама. Као најбитније остварене научне доприносе представљене у овој докторској дисертацији можемо издвојити:

- Боље познавање микробиолошког диверзитета екстремно киселог језера Робуле.
- Увид у екологију екстремно киселог језера Робуле и биогеохемијске процесе који омогућују функционисање овог екосистема.
- Употребу молекуларно-биолошке метагеномске методе (T-RFLP) у процени микробиолошког диверзитета киселог станишта.
- Овладавање новим микробиолошким техникама култивације и изолације ацидофилних бактерија на двослојним чврстим микробиолошким подлогама.

- Валоризацију бакра из узорака Старог флотацијског јаловишта Рудника бакра Бор методом биолужења.
- Квалитативну и семи-квантитативну рендгенску структурну анализу узорака флотацијске јаловине пре и иакон експеримента биолужења, која је показала смањен процентуални удео сулфидних минерала који садрже бакар након експеримента биолужења флотацијске јаловине, а поред тога и смањен удео пирита који је основни узрочник настанка киселих рудничких вода.

4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Узимајући у обзир да су секундарни извори метала у Србији фактички и даље неискоришћени, резултати добијени током израде ове дисертације би могли бити снажан подстицај за наставак истраживања која би могла довести и до комерцијалне производње бакра из старе флотацијске јаловине Рудника бакра Бор, као и других секундарних минералних сировина, применом савремених биохидрометалуршких поступака. За развој и примену ове технологије непоходно је, помоћу метода описаних и усавршених током израде ове дисертације, изоловати, култивисати и идентификовати ацидофилне бактерије које имају кључну улогу у развоју и оптимизацији процеса биолужења бакра и других метала.

4.3. Верификација научних доприноса

Научни доприноси ове докторске дисертације су верификовани објављивањем два рада у међународном часопису и презентацијом постера на Конгресу микробиолога Србије „Микромед 2013”

M23 рад у међународном часопису:

1. S. Stanković, I. Morić, A. Pavić, B. Vasiljević, D.B. Johnson, V. Cvetković (2014)
Investigation of the microbial diversity of an extremely acidic metal-rich water body (Lake Robule, Bor, Serbia), *Journal of the Serbian Chemical Society* 79 (6): 729-741 (IF=0,871; ISSN 0352-5139)
2. S. Stanković, I. Morić, A. Pavić, S. Vojnović, B. Vasiljević, V. Cvetković (2015)
Bioleaching of copper from samples of Old flotation tailings (Copper mine Bor, Serbia), *Journal of the Serbian Chemical Society* 80 (3): 391-405 (IF=0,871; ISSN 0352-5139)

5. Закључак и предлог

Комисија сматра да докторска дисертација кандидата Срђана Станковића, дипломираног молекуларог биолога и физиолога, под насловом „**Микробиолошки диверзитет киселог језера Робуле и утицај језерске воде на оксидацију сулфидних минерала**” представља значајан и оригиналан научни допринос и да је кандидат Срђан Станковић у потпуности оспособљен за самосталан научно-истраживачки рад. У складу са овим закључцима, комисија предлаже Наставно-научном већу Рударско-геолошког факултета да усвоји овај извештај, стави дисертацију на увид јавности и да упути извештај Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду, ради коначног усвајања извештаја, након чега би кандидат приступио усменој одбрани дисертације пред комисијом за одбрану докторске дисертације, која ће бити у истом саставу као и комисија за оцену дисертације.

Чланови комисије:

др Владица Цветковић, редовни професор
Универзитета у Београду - Рударско-геолошког факултета

др Ивана Морић, научни сарадник
Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство

др Веселин Драгишић, редовни професор
Универзитета у Београду - Рударско-геолошког факултета

др Бранка Васиљевић, научни саветник
Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство
