

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА

ПРЕДМЕТ: Извештај комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Ратка Павловића, мастер биохемичара

На редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Хемијског факултета, одржаној 14. Новембра 2024. године, одређени смо у Комисију за оцену и одбрану докторске дисертације коју брани кандидат **Ратко (Петко) Павловић**, мастер биохемичар, под називом:

„ Испитивање утицаја одабраних замена за полен и нектар у исхрани медоносне пчеле (*Apis mellifera* L.) на профил дигестивних ензима, варење, дужину живота и масу радилица”

Комисија је докторску дисертацију прегледала и подноси Наставно-научном већу Хемијског факултета следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација Ратка Павловића написана је на 101 страна А4 формата (фонт Cambria; величина 12 pt, проред 1, маргине 2 cm) и садржи 32 слике и 2 табеле. Рад обухвата следећа поглавља: Увод (1 страна), Општи део (21 страна), Наши радови (38 страна), Експериментални део (21 страна) и Литература (20 страна). Поред наведеног дисертација садржи Захвалницу, Сажетак на српском и енглеском језику (по 1 страна), Садржај (3 стране), Биографију кандидата (1 страна), Изјаву о ауторству (1 страна), Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада (1 страна) и Изјаву о коришћењу (2 стране).

УВОД образлаже предмет и циљ истраживања ове докторске тезе, истакнут је значај медоносне пчеле и њене правилне исхране као и потреба за развојом нове замене за полен уз употребу савремених хемијских метода.

ОПШТИ ДЕО даје преглед литературе који описује најзначајнија истраживања која се тичу исхране медоносне пчеле као и повезаности пчелиње исхране са пчелињим болестима. Описане су особености биологије медоносних пчела важне за прераду и складиштење хране са нагласком на најважније пчелиње дигестивне ензиме (протеазе, амилазе и α -глукозидазе). Посебно је дат преглед литературе везан за замене за нектар и полен у пчелињој исхрани. На крају је описан значај испитивања пчелиње хране у лабораторијским условима.

НАШИ РАДОВИ приказују резултате који су добијени при изради ове дисертације, они су при томе дискутовани и поређени са резултатима који су објављени у научној литератури. Описане су нове замене за полен на бази јестивих инсеката које су први пут у свету приказане у овој дисертацији. Приказан је њихов утицај на развој пчела и продукцију дигестивних ензима и упоређен са уобичајено коришћеним заменама за полен, при чему су поређене маса тела и

делова тела током исхране, испољавање различитих ензима у дигестивном тракту и морталитет.

Упоредан је утицај на способност пчела да искористе инвертни и сахарозни сируп, при чему су анализирани састави сирупа пре и након су га пчеле прерадиле у мед. Такође је поређен и ензимски састав прерађених сирупа и присуства ензима у дигестивном тракту, при чему је α -глукозидаза биохемијски окарактерисана. На крају су приказани резултати поређења елементарног састава здравог и оболелог пчелињег легла као и поређење елементарног састава предложених нових замена за полен и полена. У оквиру НАШИХ РАДОВА је и закључак који садржи преглед најважнијих резултата добијених током израде ове докторске дисертације.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО приказује које технике и методе су коришћене за добијене резултати који су описани у делу НАШИ РАДОВИ, као и попис коришћене опреме. У овом делу је детаљно описано како су извођени експерименти и које хемикалије су коришћене.

Описани су ензимски есеји, електрофорезе (SDS, нативна и ИЕФ) и зимограми, као и начин гајења пчела, припрема хране и праћење промене маса пчела. Коришћене хроматографске технике су такође описане (Гел хроматографија, TLC и HPLC) као и поступак одређивања елементарног састава помоћи ICP-MS-a.

ЛИТЕРАТУРА се састоји од укупно 269 референци наведених по редоследу појављивања у тексту.

Б. КРАТАК ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА

Резултати овог истраживања показали су да медоносне пчеле могу успешно користити храњиве супстанце из брашна великог брашнара као замену за полен. Ова замена пружа пчелама одговарајуће хранљиве супстанце. Поред тога, уочено је да телесна маса пчела и њихових појединачних делова варира у зависности од врсте хране, али није директно условљена количином унете хране. Испитивања су такође показала да пчеле производе различите изоформе протеаза и амилаза у зависности од исхране, што указује на адаптивну природу њиховог ензимског система. Дигестивни ензими, као што су амилазе и протеазе, показују промене у активности током живота пчела.

Када су се пчеле храниле различитим врстама сирупа, утврђено је да пчеле различито прерађују сахарозни и инвертни сируп. Мед добијен од сахарозног сирупа разликује се у саставу шећера и садржају ензима у поређењу са медом добијеним од инвертног сирупа. Утврђено је да пчеле додају више амилазе у сахарозни сируп него у инвертни.

У експериментима спроведеним у кавезима, прекомерна количина воде у храни довела је до повећања масе црева и целокупне телесне масе пчела, што је резултирало дефекацијом унутар кавеза код пчела храњених погачама са квасцем или престанком храњења код пчела храњених погачама са поленом, што је повећало морталитет. Из тог разлога, препоручује се да се пчеле, у случајевима када немају могућност пролетног лета, добијају храну са што мање несварљивих честица и смањеним садржајем воде, као што је нпр. инвертни сируп који је сличне густине као мед. Код пчела које су храњене инвертним сирупом не долази до појаве кристала у саћу, што овај сируп чини бољом опцијом за прихрану пчела у поређењу са сахарозним сирупом, под условом да је густина сирупа максимална. Ензим α -глукозидаза је детектована у главама пчела, при чему је изоелектрична тачка α -глукозидазе III утврђена на 6,63.

Утврђено је да је недостатак микроелемената у исхрани пчела повезан је са појавом болести кречног легла, што наглашава важност уравнотежене исхране за одржавање здравља пчела. У том контексту, брашно добијено од трutowског легла показало се као супериорно у односу на брашно великог брашнара, јер је његов елементарни састав разноврснији. Овај резултат оправдава даља истраживања употребе трutowског легла као потенцијалне замене за полен у исхрани пчела.

На крају, поређење ензимских профила у средњем цреву пчела и елементарног састава хране указује да би ови параметри могли бити корисни за убрзавање процеса избора нових замена за полен у исхрани пчела.

В. УПОРЕДНА АНАЛИЗА РЕЗУЛТАТА КАНДИДАТА СА РЕЗУЛТАТИМА ИЗ ЛИТЕРАТУРЕ

Резултати истраживања приказани у овој дисертацији могу се сместити у шири контекст постојеће литературе, која се бави исхраном пчела и различитим заменама за полен. Успешна примена брашна од великог брашнара као замене за полен, коју су приказани експерименти потврдили, у сагласности је са запажањем (Wright et al. 2018), који истичу да је потребан рационалнији приступ базиран на физиологији и екологији пчела да би се формулисала замена за полен која је нутритивно одговарајућа, а истовремено и приступачна. Показано је да пчеле могу да користе хранљиве састојке из брашна од великог брашнара што је у складу са подацима приказаним у раду Вебстера и сарадника (Webster et al. 1987).

Резултати који показују да се ензимска активност мења са уносом хране различитог састава су у складу са подацима које су приказали Ли и сарадници (Li et al., 2012), а показано је и да се ензимска активност и маса пчела мења у зависности од старости пчела је у складу са литературним подацима који показују да способност варења полена и искоришћења нутријената зависи од старосне доби и функције пчела у колонији (Crailsheim et al., 1992). Присуство различитих изоформи протеаза и амилаза указује на адаптивну природу ензимског система, што је такође у сагласности са радом где је проучаван утицај нивоа протеина на активност дигестивних ензима (Li et al., 2012).

Конкретно, разлике у преради сахарозног и инвертног сирупа и повећано лучење амилазе у сахарозном сирупу су у складу са претходно описаним резултатима где је показано да пчеле различито метаболишу угљене хидрате, што утиче на њихов метаболизам и енергетску употребу. (Hrassnigg et al., 2005). Проблеми са прекомерним садржајем воде у храни, који су довели до повећања телесне масе пчела и дефекације у кавезима, у складу су са експериментима који су показали да услови храњења у затвореном могу узроковати сличне проблеме (Huang et al. 2014). Ови налази наглашавају важност контроле нутритивног састава хране у лабораторијским условима како би се избегли негативни ефекти на здравље и преживљавање пчела.

Запажање да недостатак микроелемената у исхрани може бити повезан са појавом болести као што је кречно легло подржава закључке који су указали на важност адекватне исхране у спречавању ослабљеног имунолошког одговора колонија и појаву болести (vanEngelsdorp et al., 2011). А добијени резултати елементарног састава полена су у сагласности са претходно објављеним (Campos et al., 2008).

Коначно, истраживање употребе брашна од инсеката као замене за полен има додатну подршку у радовима који су истраживали потенцијал употребе инсеката у прехранбеној

индустрији, укључујући и њихове функционалне особине и могућности за одрживу употребу (Pippinato et al., 2020) (Zhao et al., 2016). Ово је посебно релевантно у контексту испитивања нутритивне вредности и функционалности замена за полен, где брашно од трутова показује потенцијал као изузетно обећавајућа опција.

Уопштено, резултати овог истраживања проширују већ постојећа сазнања из литературе, посебно у контексту потенцијалних алтернативних извора хране (што је новитет у литератури на тему исхране пчела) за пчеле који могу побољшати њихово здравље и продуктивност.

Литература:

1. vanEngelsdorp, D., Hayes, J., Underwood, R. M., Caron, D., & Pettis, J. (2011). A survey of managed honey bee colony losses in the USA, fall 2009 to winter 2010. *Journal of Apicultural Research*, 50(1), 1–10. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.50.1.01>
2. Wright, G. A., Nicolson, S. W., & Shafir, S. (2018). Nutritional physiology and ecology of honey bees. *Annual Review of Entomology*, 63, 327–344. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043423>
3. Pippinato, L., Gasco, L., Di Vita, G., Mancuso, T. (2020). Current scenario in the European edible-insect industry: a preliminary study. *Journal of Insects as Food and Feed* 6, 371–381. <https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0008>
4. Webster, T. C., Peng, Y.-S., & Duffey, S. S. (1987). Conservation of nutrients in larval tissue by cannibalizing honey bees. *Physiological Entomology*, 12(2), 225–231. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1987.tb00745.x>
5. Campos, M.G.R., Bogdanov, S., de Almeida-Muradian, L.B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C., & Ferreira, F. (2008). Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research*, 47(2), 154–161. <https://doi.org/10.1080/00218839.2008.11101443>
6. Zhao, X., Vazquez-Gutierrez, J. L., Johansson, D. P., Landberg, R., & Langton, M. (2016). Yellow mealworm protein for food purposes – Extraction and functional properties. *PLOS One*, 11(2), e0147791. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147791>
7. Huang, S.K., Csaki, T., Doublet, V., Dussaubat, C., Evans, J.D., Gajda, A.M., Gregorc, A., Hamilton, M.C., Kamler, M., Lecocq, A., Muz, M.N., Neumann, P., Özkirim, A., Schiesser, A., Sohr, A.R., Tanner, G., Tozkar, C.Ö., Williams, G.R., Wu, L., Zheng, H., Chen, Y.P. (2014). Evaluation of Cage Designs and Feeding Regimes for Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Laboratory Experiments. *Journal of Economic Entomology* 107, 54–62. <https://doi.org/10.1603/EC13213>
8. Li, C., Xu, B., Wang, Y., Feng, Q., Yang, W. (2012). Effects of dietary crude protein levels on development, antioxidant status, and total midgut protease activity of honey bee (*Apis mellifera ligustica*). *Apidologie* 43, 576–586. <https://doi.org/10.1007/s13592-012-0126-0>
9. Crailsheim, K., Schneider, L.H.W., Hrassnigg, N., Bühlmann, G., Brosch, U., Gmeinbauer, R., Schöffmann, B. (1992). Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): Dependence on individual age and function. *Journal of Insect Physiology* 38, 409–419. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(92\)90117-V](https://doi.org/10.1016/0022-1910(92)90117-V)

10. Hrassnigg, N., Brodschneider, R., Fleischmann, P.H., Crailsheim, K. (2005). Unlike nectar foragers, honeybee drones (*Apis mellifera*) are not able to utilize starch as fuel for flight. *Apidologie* 36, 547–557. <https://doi.org/10.1051/apido:2005042>

Г. ОБЈАВЉЕНИ И САОПШТЕНИ РАДОВИ КОЈИ ЧИНЕ ДЕО ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ратко Павловић је до сада презентовао резултате свог научног рада у 5 радова са SCI листе, од којих три чине део дисертације. Радови се налазе у следећим категоријама: четири рада у врхунском међународном часопису (категирија M21) и један рад у међународном часопису (категирија M23). Кандидат је резултате презентовао у 16 саопштења на скуповима од међународног и националног значаја од којих 4 чине део ове дисертације.

Радови у часописима међународног значаја проистекли из дисертације:

Радови у врхунским међународним часописима (M21)

1. Pavlović, R., Šokarda Slavić, M., Margetić, A., Božić, N., Vujčić, M., Dojnov, B., Vujčić, Z. (2024). Exploring the connection between food and midgut digestive enzymes to improve honey bee (*Apis mellifera*) nutrition. *Journal of Apicultural Research*, 1–12. <https://doi.org/10.1080/00218839.2024.2395188>
2. Pavlović, R., Brodschneider, R., Goessler, W., Stanisavljević, Lj., Vujčić, Z., Zarić, N. M. (2024). Micronutrient Deficiency May Be Associated with the Onset of Chalkbrood Disease in Honey Bees. *Insects* 15(4), 269. <https://doi.org/10.3390/insects15040269>
3. Pavlović, R., Dojnov, B., Šokarda Slavić, M., Pavlović, M., Slomo, K., Ristović, M., & Vujčić, Z. (2022). In pursuit of the ultimate pollen substitute (insect larvae) for honey bee (*Apis mellifera*) feed. *Journal of Apicultural Research*, 62(5), 1007–1016. <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2080950>

Саопштења на скуповима од међународног значаја проистекли из дисертације:

Саопштења са међународног скупа штампано у изводу (M34)

1. Zarić, N., Pavlović, R., Brodschneider, R., Stanisavljević, Lj., Ilijević, K., Steiner, L., Schuhmacher, R., Goessler, W. (2024). Honeybees as effective biomonitors of spatial and temporal pollution. 2nd conference of the International Association for the Biomonitoring of Environmental Pollution (IABEP2024). Lisbon, Portugal. Book of Abstracts, 49
2. Zarić, N., Brodschneider, R., Stanisavljević, Lj., Goessler, W., Pavlović, R. (2024). Selenium in honey bees. The 10th European Congress of Apidology (EurBee10). Book of Abstracts, 185.
3. Pavlović, R., Dojnov, B., Šokarda Slavić, M., Pavlović, M., Tomić, N., Mišić, M., Vujčić, Z.; Expression of protease in adult honey bees fed with different patties. 9th European Congress of Apidology (EurBee9) Belgrade, Serbia (2022) p.172, ISBN 978-86-7078-173-3
4. Pavlović, R., Dojnov, B., Šokarda Slavić, M., Slomo, K., Ristović, M., Vujčić, Z. Expression of amylases in adult honey bees fed with different patties. 2nd UNIFood International Conference –UNIFood2021 (2021), p. 196, ISBN 978-86-7522-066-4

Остали научни радови:

Рад у врхунском међународном часопису (M21)

1. Dojnov B., Pavlović R., Božić N., Margetić A., Nenadović V., Ivanović J., Vujčić Z. (2013). Expression and distribution of cellulase, amylase and peptidase isoforms along the midgut of *Morimus funereus* L. (Coleoptera: Cerambycidae) larvae is dependent on nutrient substrate composition. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 164, 259-267. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.02.001>

Рад у међународном часопису (M23)

1. Pavlović, R., Grujić, M., Dojnov, B., Vujčić, M., Nenadović, V., Ivanović, J. and Z. Vujčić (2012). Influence of nutrient substrates on the expression of cellulases in *Cerambyx cerdo* L. (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. *Archives of Biological Sciences, Belgrade*, 64 (2), 757-765. <http://dx.doi.org/10.2298/ABS1202757P>

Саопштења са међународног скупа штампано у целини (M33)

1. Zarić, N. M., Petrović, M., Pavlović, R. (2024). Recycling honey bee drone brood. *International Conference XXV YuCorr, Divčibare, Serbia, Proceedings*, 134.

Саопштења са међународног скупа штампано у изводу (M34)

1. Zarić, N., Pavlović, R., Brodschneider, R., Stanisavljević, Lj., Ilijević, K., Steiner, L., Schuhmacher, R., Goessler, W. (2024). Honeybees as effective biomonitors of spatial and temporal pollution. 2nd conference of the International Association for the Biomonitoring of Environmental Pollution (IABEP2024). Lisbon, Portugal. *Book of Abstracts*, 49
2. Zarić, N., Brodschneider, R., Stanisavljević, Lj., Goessler, W., Pavlović, R. (2024). Selenium in honey bees. The 10th European Congress of Apidology (EurBee10). *Book of Abstracts*, 185.
3. Pavlović, R., Dološević, S., Stanisavljević, Lj., Zarić, N. (2024). Analyzing the elemental makeup of honey: a comparative study of bee diets. The 10th European Congress of Apidology (EurBee10). *Book of Abstracts*, 337.
4. Pavlović, R., Petrović, M., Stanisavljević, Lj., Zarić, N. (2024). Drone brood flour: a sustainable approach to enhancing honey bee nutrition and combating varroa mites. The 10th European Congress of Apidology (EurBee10). *Book of Abstracts*, 338.
5. Zarić, N., Brodschneider, R., Stanisavljević, Lj., Pavlović, R., Schuhmacher, R., Goessler, W. (2024). Honey bees as biomonitors of environmental pollution. *Junganalytikerforum, Graz, Austria. Book of Abstracts, OP5, 22.*
6. Zarić, N., Goessler, W., Brodschnider, R., Stanisavljević, Lj., Pavlović, R. (2023). Micronutrient effect on the onset of chalkbrood disease in honey bees. 23rd European Meeting on Environmental Chemistry, Budva, Montenegro. *Book of Abstracts*, 121.
7. Zarić, N., Stanisavljević, Lj., Pavlović, R., Brodschneider, R., Goessler, W. (2023). Honey bee element accumulation: Workers Vs Drones. *BeeCon 2023, Toronto, Canada. Full program, #3, 6.*
8. Dojnov, B., Pavlović, R., Grujić, M., Nenadović, Vera., Vujčić, Z. Expression of cellulase isoforms along the midgut of *Morimus funereus* larvae during captive breeding, 7th Symposium and Workshop on the Conservation of Saproxyllic Beetles, Granada (2012).

Радови саопштени на скуповима националног значаја штампани у целини (M63)

1. Dolašević, S., Pavlović, R., Primena apiterapije uz upotrebu inovativne košnice za enterijer. Zbornik radova i kratkih sadržaja, 34. Savetovanje veterinarara Srbije, 505-508 (2023) ISBN 978-86-83115-50-1.
2. Кулинчевић Ј., Стојановић П., Брчин Р., Павловић Р., Станисављевић Љ. Селекција медоносних пчела у Србији: Апицентар, Научни скуп „Унапређење пчеларства у Србији”, Српска академија науке и уметности, Београд (2016) Одељење хемијских и биолошких наука књ. 9, vol. CLX, 59-71.

Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M64)

1. Pavlović, M., Margetić, A., Šokarda Slavić, M., Ristović, M., Pavlović, R., Nikolić, S., Vujčić, Z. Production and application of pectinases in the liquefaction of apricot and blueberry juice. XI Konferencija Biohemijskog društva Srbije “Amazing Biochemistry” (2022), Novi Sad, ISBN 978-86-7220-124-6 (FOC).

Д. ПРОВЕРА ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Оригиналност докторске дисертације под називом „Испитивање утицаја одабраних замена за полен и нектар у исхрани медоносне пчеле (*Apis mellifera* L.) на профил дигестивних ензима, варење, дужину живота и масу радилица”, аутора Ратка Павловића, проверена је на начин прописан Правилником о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду, бр. 204/22.06.2018).

Помоћу програма “iThenticate” утврђено је да количина подударача текста износи 4%. Приказани степен подударности је последица описа експерименталних поступака, ознака хемијских стандарда, латинских назива као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, Комисија сматра да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Ђ. ЗАКЉУЧАК

На основу приказаних резултата, Комисија је закључила да је у поднетој докторској дисертацији под називом „Испитивање утицаја одабраних замена за полен и нектар у исхрани медоносне пчеле (*Apis mellifera* L.) на профил дигестивних ензима, варење, дужину живота и масу радилица”, кандидат, Ратко Павловић, мастер биохемичар, успешно одговорио на задате циљеве.

У овој дисертацији је испитан утицај различите исхране медоносне пчеле (*Apis mellifera* L.) на производњу дигестивних ензима, здравље, дужину живота и масу пчела радилица. Различите замене за полен изазивају производњу различитих изоформи амилаза и протеаза у средњем цреву, при чему се ензимска активност мења током времена. Различите замене за нектар утичу на способност пчела да прераде храну, а пчеле додају више амилазе у сахарозни него у инвертни сируп, што доводи до различитог шећерног састава меда. Пчеле у кавезима, са условима сличним зимским у кошници, дуже живе када се хране гушћим сирупом, док мања количина несварљивих честица у храни смањује оптерећење црева и масу пчела. Превелико нагомилавање течности и честица може довести до угинућа или дефекације унутар кавеза.

Нове замене за полен, на бази јестивих инсеката, еколошки су прихватљивије и одрживије. Пчеле храњене брашном од ларви великог брашнара (*Tenebrio molitor* L.) одржавале су масу тела, нису дефецирале, имале су највећу масу абдомена, и користиле најмање хране, што указује на висок нутритивни потенцијал ових замена. Такве замене могу допринети сузбијању болести попут варозе и кречног легла, а нове замене имају разноврстан елементарни састав, посебно трутовско брашно.

На основу свега наведеног, а у складу са Законом о високом образовању, Статутом Универзитета у Београду – Хемијског факултета, Комисија сматра да су испуњени сви услови за одбрану докторске дисертације и са задовољством предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Хемијског факултета да поднету докторску дисертацију Ратка Павловића, под насловом „ Испитивање утицаја одабраних замена за полен и нектар у исхрани медоносне пчеле (*Apis mellifera* L.) на профил дигестивних ензима, варење, дужину живота и масу радилица”, прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктора биохемијских наука.

У Београду, 05.12. 2024. године

Чланови комисије:

Др Биљана Дојнов, научни саветник, Универзитет у Београду - Институт за хемију, технологију и металургију, Институт од националног значаја за Републику Србију

Др Јелена Радосављевић, доцент, Универзитет у Београду - Хемијски факултет

Др Љубиша Станисављевић, редовни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет

Др Радивоје Продановић, редовни професор, Универзитет у Београду - Хемијски факултет
