

Универзитет у Београду-Хемијски факултет

Наставно-научно веће

Предмет: Извештај о оцени научне заснованости и оправданости предложене теме за израду докторске дисертације мастер хемичара Мире Станковић, истраживача-приправника Института за мултидисциплинарна истраживања Универзитета у Београду

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду, одржаној 14. септембра 2017. године, одређени смо у Комисију за подношење извештаја о оцени научне заснованости и оправданости предложене теме за израду докторске дисертације Мире Станковић, истраживача-приправника Института за мултидисциплинарна истраживања Универзитета у Београду, пријављене под називом:

„Развој и примена аналитичких поступака за одређивање везе између хемијског састава меда и заражености пчелињих заједница паразитима *Varroa destructor* и *Nosema ceranae*“

На основу увида у предложену тему и биографију кандидата подносимо следећи извештај:

А. Биографски подаци о кандидату

Мира М. Станковић (девојачки Мугавцић) рођена је у Ужицу, 11. фебруара 1983. године. Основну школу и касније Медицинску школу завршила је у Ужицу. Године 2003. уписала се на Хемијски факултет Универзитета у Београду, смер дипломирани хемичар. Дипломирала је у јулу 2011. године са просечном оценом 7,68. Завршни испит под насловом: „Расподела микро и макроелемената у различитим типовима меда са територије Србије“ одбранила је са оценом 10. Мастер академске студије уписала је 2011. године на Катедри за аналитичку хемију Хемијског факултета Универзитета у Београду, а завршила 2012. са просечном оценом 9,50 и оценом 10 на одбрани мастер рада. Докторске студије на Катедри за аналитичку хемију Хемијског факултета

Универзитета у Београду уписала је 2013. године и положила са највишим оценама све испите који су предвиђени планом и програмом.

Од новембра 2013. године запослена је као истраживач-приправник у Институту за мултидисциплинарна истраживања Универзитета у Београду на одсеку Наука о живим системима на пројекту бр. 173017 Министарства просвете, науке и технолошког развоја под називом: „Испитивања односа структура-функција у ћелијском зиду биљака и измене структуре зида ензимским инжењерингом“ под руководством Др. Ксеније Радотић Хаџи-Манић.

Б. Објављени научни радови и саопштења

Досадашње резултате истраживања кандидат је публиковао у следећим научним радовима и саопштењима.

Рад објављен у истакнутом међународном часопису (M22)

1. Campos V.B., Mutavdžić D., **Stanković M.**, Radotić K., Lazaro-Martinez J.M., Esteves da Silva J.C.G., Contreras-Caceres R., Pino-Gonzalez M. S., Rodriguez-Castellone E. and Algarra M., (2017) Thermo-responsive microgels based on encapsulated carbon quantum dots. *New Journal of Chemistry*, vol. 41 br.12, str 4835-4842

Рад објављен у часопису националног значаја (M52)

1. **Mutavdžić M.**, Mutavdžić D., Milojković Opsenica D., Radotić K., (2013) Differentiation between commercial wine samples using fluorescence spectroscopy and multivariate analysis. *Acta Agriculturae Serbica*, Vol. XVIII br.36, p. 169-177

Рад саопштен на скупу међународног значаја штампан у изводу (M34)

1. Prokopijević M., Prodanović O., Spasojević D., **Stanković M.**, Stojanović Ž., Radotić K., Prodanović R., (2015) Characterization of soybean hull peroxidase immobilized on glycidyl methacrylate copolymers. *Druga међународна конференција билне физиологије*, Jun 17-20, Petnica, Srbija, p.17
2. Djikanović D., **Stanković M.**, Simonovic J., Kalauzi A., Paliја T., Jeremić M., Radotić K., (2015) Study of inter- and intra-molecular OH-bonds and cellulose crystallinity in the cell walls of different plant species by FTIR spectroscopy. *Druga међународна конференција билне физиологије*, Jun 17-20, Petnica, Srbija, p.47

3. **Stanković M.**, Bartolić D., Šikoparija B., Spasojević D., Mutavdžić D., Natić M., Radotić K., (2017) Fluorescence of bio-molecules a simple and quick method: What honey emission speaks about bee society state and honey quality. Šesta međunarodna škola i konferencija fotonike, 28 Avgust-1 Septembar, Beograd, Srbija, p. 218

V. Образложење теме

1. Научна област: Хемија-Аналитичка хемија

2. Предмет рада

Предмет рада ове докторске дисертације је развој аналитичких поступака за праћење релативног садржаја укупних протеина и укупних фенола у различитим узорцима меда у једном кораку, као и за одређивање разлике у садржајима протеина биљног и пчелињег порекла у меду за процену утицаја биотичког стреса на пчелиња друштва (зараженост пчелињих заједница паразитима *Varroa destructor* и *Nosema ceranae*).

3. Научни циљ истраживања

Општи циљ ове тезе је развој и валидација аналитичких поступака за одређивање укупних фенола, као и укупних и специфичних протеина у меду као потенцијалних индикатора заражености пчелињим крпељом *Varroa destructor* и микроспоридијама *Nosema ceranae*.

За постизање наведеног формулисани су следећи задаци:

- Развој нове методе за одређивање релативног садржаја протеина и фенола у узорцима меда, која се заснива на флуоресцентној спектроскопији, и њена валидација у односу на стандардне спектрофотометријске методе које се користе за одређивање укупних фенола (*Folin Ciocalteu*) и укупних протеина (*Bradford*), чиме ће се потврдити да је предложена аналитичка процедура поуздана и да се може применити за предвиђена мерења.

- Како су протеини у меду биљног и пчелињег порекла (2/3 од укупних протеина меда је пчелињег порекла, а 1/3 од укупних протеина потиче од полена), додатно ће се испитати варијације садржаја биљних маркер протеина и пчелињих маркер протеина,

применом различитих биохемијских метода као што су одређивање активности ензима, електрофоретска анализа и пептидно мапирање.

- Коначно, како биосинтеза пчелињих протеина може да варира под утицајем биогених и абиогених фактора, биће испитана присутност и садржај укупних и пчелињих маркер протеина у меду из пчелињих заједница различитог степена заражености паразитима *Varroa destructor* и *Nosema ceranae*.

4. Методе истраживања

Одабир пчелињих заједница из којих ће се узорковати мед обухватиће неколико корака. Процена јачине пчелињих заједница према броју одраслих јединки, количине легла (отвореног и затвореног) и хране (перге и меда) обавиће се стандардним методама. Клинички преглед пчелињих друштава као и утврђивање присуства паразита, *Varroa destructor* и *Nosema ceranae*, односно одсуство свих других пчелињих патогена и паразита обавиће се према препорукама *Office International Des Epizooties* (ОИЕ, 2017) и Правилнику о утврђивању програма мера здравствене заштите животиња за 2017. годину. У експеримент ће бити укључене уједначене пчелиње заједнице, како незаражене тако и оне у којима се клиничким прегледом и стандардним лабораторијским методама утврди присуство и процена степена заражености са само два паразита, *Varroa destructor* и *Nosema ceranae*. Да би се минимизирао утицај сезонских варијација узорковање меда биће урађено у кратком временском периоду са исте географске локације.

За одређивање садржаја укупних фенола и укупних протеина у узорцима меда биће примењене валидоване спектрофотометријске методе (*Folin–Ciocalteu* и *Bradford* метода, појединачно). Такође, нова метода базирана на флуоресцентној спектроскопији за истовремену процену садржаја укупних протеина, укупних фенола и њиховог односа ће бити оптимизирана и валидована. Додатно, прикупљеним узорцима меда биће одређени одабрани физичко-хемијски параметри (електрична проводљивост, киселост, садржај влаге, активност дијастазе, садржај шећера и оптичка ротација) применом стандардних аналитичких метода препорученим од стране Међународне комисије за мед (*Harmonised methods*, ИНС 2009).

Идентификација маркер протеина биљног порекла и пчелињег порекла биће урађена методом отиска прста, након електрофоретске анализе узорка меда и дигестије протеина у гелу трипсином, на основу специфичних пептида идентификованих масеном спектрометријом. Процена релативног садржаја различитих

протеинских фракција биће урађена дензитометријски и на основу специфичних активности биљних и пчелињих маркер ензима.

Статистичке методе анализе биће употребљене да се испита да ли је могућа процена степена заражености пчелињих заједница паразитима *Varroa destructor* и *Nosema ceranae* на основу односа протеинске и фенолне фракције у меду и варијације садржаја маркер протеина.

5. Актуелност проблематике

У протеклих неколико деценија интензивна су научна истраживања у области састава и квалитета меда. Спектрофлуориметрија је позната аналитичка метода која се вишедеценијски успешно користи у аналитици како макромолекула тако и малих молекула. Развој брзих, осетљивих и једноставних метода које би могле да се користе за одређивање релативног садржаја минорних компоненти у меду (као што су протеини и феноли) је од великог значаја за стандардну аналитику меда. Како сахариди, који нису флуоресцентно активни, као главна компонента меда не интерферирају у емисионим спектрима са протеинима и фенолима, нова спектрофлуориметријска метода би могла представљати значајан искорак у карактеризацији узорака меда.

Са друге стране, у основи губитака пчелињих друштава, који се интензивирају последњих година, налази се хронична изложеност вишеструким факторима стреса који делују синергистички - патогени микроорганизми, паразити и штеточине пчела, изложеност пестицидима, смањена пчелиња паша и лоша пчеларска пракса. Као најчешћи узроци губитака пчелињих друштава у већини европских земаља наводе се паразити *V. destructor* и *N. ceranae* и вирусне инфекције. Доступни подаци за нашу земљу показују да је присуство наведених паразита, као и са њима удружених инфекција у сагласности са европским трендовима са инциденцом до чак 98%.

У последњих 5 година истраживања показују да присуство паразита *V. destructor* лимитира биосинтезу протеина у пчелама и изазива смањење садржаја протеина у абдомену и лимфи, док зараженост *N. ceranae* доводи до поремећаја у метаболизму протеина пчела и упућују на смањење раста и губитак пчелињих друштава. Стога, од значаја је развој аналитичких поступака који би могли да се употребе за процену промена концентрације пчелињих маркер протеина у меду под утицајем фактора стреса на пчелиња друштва.

6. Очекивани резултати

Резултати испитивања ће показати да је нова спектрофлуориметријска метода супериорнија у односу на постојеће методе које се користе за квантификацију протеина и фенола у меду у погледу осетљивости и брзине (паралелно одређивање без претходне припреме узорака). Релативно су ограничене студије о протеинима у узорцима меда углавном због ниске количине протеина у меду (0,1-0,5%), тешкоће у екстракцији протеина меда из окружења богатог шећером и због препрека у карактеризацији протеина конвенционалним поступцима. Bradford-ова метода за мерење укупних протеина има недостатке у погледу различитог афинитета везивања реагенса *Comasie brilliant blue* (СВВ) за протеине различитих својстава, док се нова спектрофлуориметријска метода ослања на емисију специфичне аминокиселинске флуорофоре (триптофан, Trp). *Folin Ciocalteu*-ова метода за одређивање укупних фенола није у потпуности селективна. Истраживања показују да осим фенола реагују бројна органска и неорганска једињења укључујући протеине. С друге стране, пик који потиче од фенолних једињења у емисионим спектрима јасно је одвојен од протеинског дела спектра, што омогућава паралелно одређивање протеина и фенола у меду.

Резултати ће показати да ли је могућа процена степена заражености пчелињих заједница паразитима *Varroa destructor* и *Nosema ceranae* на основу односа протеинске и фенолне фракције у меду и варијације садржаја маркер протеина.

Г. Закључак

Предложена тема је научно заснована и актуелна у свету, а истраживања која су планирана у току израде овог докторског рада прате савремене научне трендове у области аналитичке хемије, посебно у домену развоја савремених аналитичких поступака. Очекује се да ће нови аналитички поступак за одређивање односа протеинске и фенолне фракције у меду, као и варијабилност у садржају и саставу биљних и пчелињих маркер протеина, омогућити унапређење поступака за процену утицаја фактора стреса (зараженост паразитима *V. destructor* и *N. ceranae*) на стање пчелињих друштава.

Стога предлажемо Наставно-научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду да Мири Станковић, мастер хемичару, одобри израду докторске дисертације под измењеним насловом:

„Одређивање релативног садржаја протеина и фенола у узорцима меда као индикатора утицаја фактора стреса на пчелиња друштва“

Комисија за менторе предлаже др Мају Натић, ванредног професора Хемијског факултета Универзитета у Београду и Ксенију Радотић Хаџи-Манић, научног саветника, Института за мултидисциплинарна истраживања, Универзитета у Београду.

Београд, 02.10.2017.

Комисија:

др Маја Натић, ванредни професор,
Хемијски факултет, Универзитет у Београду

др Ксенија Радотић Хаџи-Манић, научни саветник,
Институт за мултидисциплинарна истраживања,
Универзитет у Београду

др Драган Манојловић, редовни професор,
Хемијски факултет, Универзитет у Београду

др Наталија Половић, ванредни професор,
Хемијски факултет, Универзитет у Београду

др Јевросима Стевановић, ванредни професор,
Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у
Београду