

OCJENA PODOBNOSTI DOKTORSKE TEZE I KANDIDATA

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	MSc Ana Manović
Fakultet	Prirodno-matematički fakultet
Studijski program	Biologija
Broj indeksa	1/21
Podaci o magistarskom radu	Filogenetska analiza određenih taksona Hydrachnidia basena Ohridskog jezera, Zoologija, Univerzitet Crne Gore, Prirodno-matematički fakultet, Studijski program – Biologija, 2021, A (10.00)
NASLOV PREDLOŽENE TEME	
Na službenom jeziku	Ekotoksikološko-histološka studija transporta mikroplastike u sistemu predator-plijen između vodenih grinja (Acariformes, Hydrachnidia) i hironomida (Diptera, Chironomidae)
Na engleskom jeziku	Ecotoxicological-histological study of microplastic transport in the predator-prey system between water mites (Acariformes, Hydrachnidia) and chironomids (Diptera, Chironomidae)
Datum prihvatanja teme i kandidata na sjednici Vijeća organizacione jedinice	12.07.2023. godine
Naučna oblast doktorske disertacije	Ekologija, ekotoksikologija, zoologija
Za navedenu oblast matični su sljedeći fakulteti	
Prirodno-matematički fakultet	
A. IZVJEŠTAJ SA JAVNE ODBRANE POLAZNIH ISTRAŽIVANJA DOKTORSKE DISERTACIJE	
<p>U utorak, 05.09.2023. godine u 15h u Sali A3 na Studijskom programu za biologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, doktorantkinja Ana Manović pristupila je odbrani polaznih istraživanja doktorske disertacije pod nazivom „Ekotoksikološko-histološka studija transporta mikroplastike u sistemu predator-plijen između vodenih grinja (Acariformes, Hydrachnidia) i hironomida (Diptera, Chironomidae)“ pred komisijom u sledećem sastavu:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Prof. dr Vesna Vukašinović Pešić, vanredni profesor Metalurško-tehnološkog fakulteta, Univerzitet Crne Gore (predsjednica komisije); 2. Prof. dr Đurađ Milošević, vanredni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerzitet u Nišu, Srbija (član komisije) i . 3. Prof. dr Vladimir Pešić, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerzitet Crne Gore (mentor). <p>U svom izlaganju, kandidatkinja je predstavila: dosadašnja istraživanja u ovoj oblasti, materijale, metode i plan istraživanja, ciljeve i hipoteze i očekivani naučni doprinos svojih polaznih istraživanja. Nakon izlaganja članovi komisije su kandidatkinji postavili pitanja. Nakon što je kandidatkinja pružila odgovore na postavljena pitanja, komisija je ocijenila da je kandidatkinja uspješno odbranila polazna istraživanja.</p>	

B. OCJENA PODOBNOSTI TEME DOKTORSKE DISERTACIJE**B1. Obrazloženje teme**

Sve veća upotreba sintetičkih materijala izaziva zabrinutost na globalnom nivou u vezi sa pojavom novih zagađivača poput mikroplastike (MP). Međutim, naše razumijevanje izvora mikroplastike, transporta i uticaja MP u kraškim izvorima i sa njima povezanim podzemnim vodama još uvijek je veoma ograničeno što predstavlja veliki rizik za životnu sredinu i javno zdravlje, posebno zbog velikog značaja ovih ekosistema kao izvora vode za piće u Crnoj Gori.

Najbolji pokazatelji zdravlja izvorskih ekosistema jesu stalni stanovnici izvora (krenobiontne vrste), na koje je u ovom radu stavljen poseban akcenat. Ova studija je pionir u istraživanju prisutnosti mikroplastike (MP) u kraškim izvorima, uključujući ispitivanje njenih transportnih mehanizama i uticaja na organizme koji naseljavaju ove ekosisteme.

Po prvi put će se istraživati brzina trofičkog prenosa MP u kraškim izvorima. U tom cilju će biti postavljen biotest sa standardnim model organizmom *Chironomus riparius* (plijen) koji je prethodno hranjen česticama MP i sa krenobiontnim vrstama vodenih grinja (predatori). Hironomide i vodene grinje su grupe organizama koje su prepoznate kao značajne za monitoring vodenih ekosistema, grade asocijaciju parazit-domaćin.

Asocijacije koje grade vodene grinje i hironomide predmet su mnogih naučnih radova. Ipak, još uvijek nije vršeno temeljnije praćenje crijevnog sadržaja vodenih grinja na molekularnom i histološkom nivou. U ovom radu će akcenat biti i na razvijanju novih biomarkera vodenih grinja u akvatičnoj ekotoksikologiji na različitim nivoima ekološke i biološke organizacije.

B2. Cilj i hipoteze

Generalni cilj ovog istraživanja je proširiti saznanja o transportu mikroplastike (MP) u sistemu predator-plijen u vodenim ekosistemima. Kao model organizmi koristiće se: vodene grinje (Acariformes, Hydrachnidia) kao predatori i larve hironomida (Diptera, Chironomidae) kao plijen. Za postizanje primarnog cilja postavljeni su sledeći ciljevi:

Cilj 1: Mjerenje koncentracija MP i identifikacija MP u vodi i sedimentu izvorskih ekosistema.

Cilj 2: Definisane obrasci osjetljivosti zajednice vodenih grinja (Acariformes, Hydrachnidia) na prisustvo i koncentraciju MP u lotičkim ekosistemima.

Cilj 3: Analiza zajednice hironomida (Diptera, Chironomidae) praćenjem crijevnog sadržaja vodenih grinja na molekularnom i histološkom nivou.

Cilj 4: Objašnjenje transportnih mehanizama mikroplastike unutar biote koja naseljava kraške izvore u sistemu između predatora (Acariformes, Hydrachnidia) i plijena (Diptera, Chironomidae) kroz analiziranje standardnih životnih parametara populacionog fitnesa.

Glavna hipoteza (**H₀₁**) je da su izvorska staništa i organizmi koji ih naseljavaju izloženi uticaju mikroplastike.

H₀₂ – Organizmi koji su stalni stanovnici izvora (krenobionti) su bolji bioindikatori zagađenja mikroplastikom u odnosu na organizme koji nijesu stalni stanovnici izvora (krenofilne i krenoksene vrste).

H₀₃ – Transfer mikroplastike u sistemu predator – plijen utiče na karakteristike životnog ciklusa vrsta predatora (Hydrachnidia) i plijena (larve Chironomidae) u kraškim izvorima.

B3. Metode i plan istraživanja

Istraživanje obuhvata terenski rad, rad u laboratoriji i analizu podataka.

Terenski rad sastoji se iz:

- uzorkovanje vodenih grinja na istraživanom području,
- transportovanja materijala u laboratoriju radi identifikacije do nivoa morfo-vrsta prema dostupnoj literaturi i odabira materijala za DNK ekstrakciju i COI kodiranje,

- fiksiranja cjelokupnog materijala u 96% etanolu kako bi se omogućila dalja molekularna analiza. Ekstrakcija genomske DNK izvodi se po standardnom laboratorijskom postupku za vodene grinje (Dabert et al., 2008; Stryjecki et al., 2016). Amplifikacija i sekvencioniranje vrše se nad kompletno planiranih molekularnih markera koji uključuju mitohondrijski COI marker, skup od četiri nezavisna nuklearna markera (28S rDNA, 18S rDNA, ITS1, eEF1a1 ili H3), kao i dodatnim mitohondrijskim markerom 16S rDNA koji dopunjuje COI (Pešić et al., 2017). Željeni DNK barkod region biće amplifikovan lančanom reakcijom polimeraze (PCR reakcija) korišćenjem odgovarajućih prajmera. Za poduzorak svakog produkta amplifikacije biće urađena vizuelizacija pomoću UV-transiluminatora i fotografisanje gela. Produkti PCR reakcije koji budu odabrani za sekvencioniranje biće podvrgnuti procesu prečišćavanja uz pomoć Exo-FastAP protokola. Sanger sekvencioniranje će se obaviti od strane Kanadskog Centra za DNK Barkoding (Canadian Center for DNA Barcoding). Za uređivanje i obradu dobijenih sekvenci koristiće se BioEdit/Geneious softver. U javnoj bazi podataka BOLD (Barcode of Life Data System) biće sačuvani barkodovi.

Eksperimentalni dio doktorske teze radiće se u laboratorijama Prirodno-matematičkog fakulteta u Podgorici i Nišu. Molekularna, ekotoksikološka i histološka istraživanja biće sprovedena u Laboratoriji za ekotoksikologiju na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu za vrijeme istraživačke posjete.

Korišćenjem model organizma, larve vrste *Chironomus riparius*, koji je zastupljen u standardnim biološkim testovima, iz referentne populacije sa Prirodno-matematičkog fakulteta u Podgorici, uz praćenje OECD protokola biće sprovedeni ekotoksikološki bioeseji na hironomidama.

Postupak histološke analize

Nakon fiksiranja potrebno je izvršiti dehidraciju uzoraka i to povećavanjem koncentracije etanola (70%, 80%, 90%, i 96%), a zatim ih prebaciti u toluen na 10 min i preko noći ostaviti u parafin za ugradnju tkiva. Sledećeg dana, nakon hlađenja, uzorci su pripremljeni za rezanje. Na mikrotomu Leica® RM 2125RT napraviće se uzdužni presjeci i nakon toga obojiti kombinacijom hematoksilina i ezina (H&E). Pomoću Leica® DM 2500 svjetlosnog fotomikroskopa će biti posmatrani i fotografisani.

Mjerenje koncentracija MP i identifikacija MP u vodi i sedimentu izvorskih ekosistema

Kako bi se utvrdilo porijeklo MP, istovremeno će se uzorkovati voda, sediment i vazduh. Na svakoj lokaciji uzorkovanja kantama od nerđajućeg čelika zahvatiće se 100 l vode i profiltrirati kroz sito od 64 µm. Prije uzorkovanja vode prikupiće se najviše 100 grama sedimenta (mokra težina). Za potrebe kontrolnih proba potrebno je uzeti „slijepi“ uzorak na terenu na svakom izvoru. Budući da mrežasto sito skuplja MP u vodenom stubu na iznad opisani način, zajedno sa drugim organskim supstancama, uzorak je prije dalje analize potrebno digestirati sa kalijum hidroksidom (KOH) i 30 ml 95% etanolom. Uzorci vode i sedimenta filtriraće se sljedeći dan kroz filter od aluminijumovog oksida. Filtrat će se zatim analizirati pod Bruker LUMOS II FT-IR mikroskopom.

Praćenje ingestovane MP u odabranim model organizmima makrobeskičmenjaka

Ovaj dio temelji se na određivanju unosa mikroplastike od strane odabranih grupa makrobeskičmenjaka. Kako bi se izbjegla degradacija čestica plastike ili nedovoljna digestija tkiva, koristiće se alkalna metoda za izolaciju MP iz bioloških uzoraka i za kasniju identifikaciju (Stanković et al., 2021). Protokol se temelji na korišćenju 10% rastvora kalijum hidroksida (KOH) kao medijuma za uzorke i inkubaciji na 60°C tokom 24 sata. To dovodi do efikasne razgradnje bioloških tkiva bez značajne degradacije na svim testiranim polimerima, osim celuloznog acetata. Nakon primjene alkalnih metoda uzorci će se filtrirati kroz filter od aluminijumovog oksida. Filtrat će se zatim analizirati pod Bruker LUMOS II FT-IR mikroskopom.

Istraživanje transportnih mehanizama mikroplastike unutar kraške izvorske biote putem proučavanje interakcije predator (Acariformes, Hydrachnidia) - plijen (Diptera, Chironomidae)

Kako bi se istražila trofička brzina prenosa mikroplastike u kraškim izvorima, biće postavljen *indoor* biotest sa standardnim model organizmom *Chironomus riparius* (plijen), koji će prethodno biti

hranjen česticama mikroplastike, i sa krenobiontnim vrstama vodenih grinja (predatori). Ovaj dio uključuje: postavljanje laboratorijskih mikrokozma, unošenje različitih koncentracija mikroplastike u jedinke plijena (larve hironomida), a zatim davanje jedinki plijena njihovim predatorima (krenobiotske vodene grinje), određivanje unosa mikroplastike od strane plijena i predatora bojenjem i posmatranjem fluorescentnim mikroskopom.

B4. Naučni doprinos

Ovim radom će se analizirati brzina trofičkog prenosa mikroplastike u sistemu predator-plijen. Dobiće se podaci o tome kako se vrši transfer mikroplastike u sistemu parazit-domaćin, o čemu nema sličnih studija. Budući da do sada nisu vršena temeljnija proučavanja crijevnog sadržaja vodenih grinja, očekuje se da će tome doprinijeti istraživanje na molekularnom i histološkom nivou.

Disertacija će imati za cilj uticaj mikroplastike na ekosisteme izvorskih i podzemnih voda u Crnoj Gori. Samim tim, unaprijediće naše znanje o uticaju mikroplastike na organizme koji naseljavaju pomenute ekosisteme. Ova disertacija predstavlja pionirski korak u korišćenju FTIR spektromikroskopije za efikasno praćenje zagađenja mikroplastikom kraških izvora, sa ciljem otkrivanja, kvantifikacije i identifikacije mikroplastike.

B5. Finansijska i organizaciona izvodljivost istraživanja

Predstavljeno istraživanje je finansijski zahtjevno, ali će se veći dio istraživanja realizovati kroz projekat Horizon-MSCA-2021-DN-01 „PlasticUnderground“.

Popis literature:

1. Dabert, J., Ehrnsberger, R. & Dabert, M. (2008). *Glaucoalgae tytonis* sp. n. (Analgoidea, Xolalgidae) from the barn owl *Tyto alba* (Strigiformes, Tytonidae): compiling morphology with DNA barcode data for taxon descriptions in mites (Acari). *Zootaxa*, 1719, 41–52.
2. Koelmans, A.A. (2015). Modeling the Role of Microplastics in Bioaccumulation of Organic Chemicals to Marine Aquatic Organisms. A Critical Review. In: Bergmann, M., Gutow, L. & Klages, M. (eds.) *Marine Anthropogenic Litter*. Springer, 309-324. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3>
3. Koelmans, A.A., Besseling, E. & Shim, W.J. (2015). Nanoplastics in the Aquatic Environment. Critical Review. In: Bergmann, M., Gutow, L. & Klages, M. (eds.) *Marine Anthropogenic Litter*. Springer, 325-340. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3>
4. Martin, P., Koester, M., Schynawa, L. & Sahn, R. (2015). First detection of prey DNA in *Hygrobates fluviatilis* (Hydrachnidia, Acari): a new approach for determining predator-prey relationships in water mites. *Experimental and Applied Acarology*, online first (3). DOI: <https://doi.org/10.1007/s10493-015-9956-6>
5. Pešić, V., Asadi, M., Cimpean, M., Dabert, M., Esen, Y., Gerecke, R., Martin, P., Savić, A., Smit, H. & Stur, E. (2017). Six species in one: Evidence of cryptic speciation in the *Hygrobates fluviatilis* complex (Acariformes, Hydrachnidia, Hygrobatidae). *Systematic and Applied Acarology*, 22, 1327–1377. DOI: <https://doi.org/10.11158/saa.22.9.4>
6. Pešić, V., Dmitrović, D., Savić, A., Milošević, Đ., Zawal, A., Vukašinović-Pešić, V. & Von Fumetti, S. (2019a). Application of macroinvertebrate multimetrics as a measure of the impact of anthropogenic modification of spring habitats. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 29. DOI: <https://doi.org/10.1002/aqc.3021>
7. Pešić, V., Savić, A., Jablonska, A., Mićhoński, G., Grabowski, M., Bańkowska, A. &

- Zawal, A. (2019b). Environmental factors affecting water mite assemblages along eucrenon-hypocrenon gradients in Mediterranean karstic springs. *Experimental and Applied Acarology*, 77, 471-486. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00360-w>
8. Pozojevic, I., Pešić, V., Goldschmidt, T. & Gottstein, S. (2020). Crenal Habitats: Sources of Water Mite (Acari: Hydrachnidia) Diversity. *Diversity*, 12, 316. DOI: <https://doi.org/10.3390/d12090316>
 9. Rocha-Santos, T., Costa, M. & Mouneyrac, C. (2020). Handbook of Microplastics in the Environment. Springer Cham, 1332. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-10618-8>
 10. Stanković, J., Raković, M., Paunović, M., Atanacković, A., Tomović, J. & Milošević, Đ. (2021). Isolation of microplastics from freshwater macroinvertebrates in the Danube River. *Facta Universitatis Series Medicine and Biology*, 23: 21-27. DOI: <https://doi.org/10.22190/FUMB211101006S>
 11. Stryjecki, R., Bańkowska, A., Gryzińska, M., Sarnacka, E., Rutkowska, M. & Zawal, A. (2016). The use of molecular techniques in the taxonomy of water mites (Hydrachnidia, Acari). *Acta Biologica*, 23: 117-126. DOI: <https://doi.org/10.18276/ab.2016.23-10>
 12. Thompson, R., Olsen, Y., Mitchell, R., Davis, A., Rowland, S., John, A., Mcgonigle, D.F. & Russell, A. (2004). Lost at Sea: Where Is All the Plastic?. *Science*, 304: 838. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1094559>
 13. Wahl, A., Juge, C., Davranche, M., El Hadri, H., Grassl, B., Reynaud, S. & Gigault, J. (2020). Nanoplastic occurrence in a soil amended with plastic debris. *Chemosphere*, 262(4): 127784. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127784>
 14. Winkel, T.E., Davids, C. & Nobel, J.G. (1988). Food and Feeding Strategies of Water Mites of the Genus *Hygrobates* and the Impact of Their Predation On the Larval Population of the Chironomid *Cladotanytarsus mancus* (Walker) in Lake Maarsseveen. *Netherlands Journal of Zoology*, 39: 246-263. DOI: <https://doi.org/10.1163/156854289X00147>

Mišljenje i prijedlog komisije

Tokom odbrane polaznih istraživanja, kandidatkinja MSc Ana Manović je predstavila ideje, ciljeve, metode i očekivane rezultate doktorske disertacije. Komisija za ocjenu prijave doktorske disertacije smatra da je predlog istraživanja u potpunosti odgovarajući i da predstavljeno istraživanje ima značajan naučni doprinos, kao i da je tema istraživanja aktuelna.

Na osnovu vrednovanja polaznih istraživanja, komisija predlaže Vijeću Prirodno-matematičkog fakulteta, Centru za doktorske studije i Senatu Univerziteta Crne Gore da odobri dalji rad na izradi doktorske disertacije kandidatkinje MSc Ane Manović.

Prijedlog izmjene naslova

/

Prijedlog promjene mentora i/ili imenovanje drugog mentora

/

Planirana odbrana doktorske disertacije

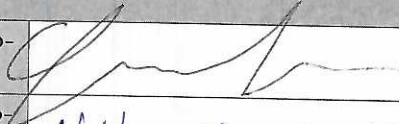
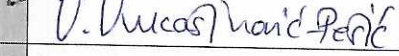
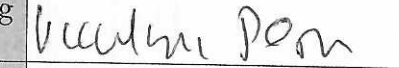


Ljetnji semestar 2025. godine

Izdvojeno mišljenje

/

Napomena

/

ZAKLJUČAK		
Predložena tema po svom sadržaju odgovara nivou doktorskih studija.	DA	
Tema je originalan naučno-istraživački rad koji odgovara međunarodnim kriterijumima kvaliteta disertacije.	DA	
Kandidat može na osnovu sopstvenog akademskog kvaliteta i stečenog znanja da uz adekvatno mentorsko vođenje realizuje postavljeni cilj i dokaže hipoteze.	DA	
Komisija za ocjenu podobnosti teme i kandidata		
Prof. dr Đurađ Milošević, vanredni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerzitet u Nišu, Srbija (član komisije)		
Prof. dr Vesna Vukašinić Pešić, vanredni profesor Metalurško-tehnološkog fakulteta, Univerzitet Crne Gore (član komisije)		
Prof. dr Vladimir Pešić, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerzitet Crne Gore (mentor)		
U Podgorici, 12.09.2023. godine	 DEKAN 	

PRILOG

PITANJA KOMISIJE ZA OCJENU PODOBNOSTI DOKTORSKE TEZE I KANDIDATA	
Prof. dr Vesna Vukašinić Pešić, (predsjednica komisije)	Da li ste odabrali vrstu vodene grinje koja će biti model organizam?
Prof. dr Đurađ Milošević, (član komisije)	Da li postoje razvijeni biomarkeri na histopatološkom nivou za vodene grinje i da li će biti pogodni za determinaciju potencijalnih toksičnih efekata mikroplastike na vodene grinje?
Prof. dr Vladimir Pešić, (član komisije)	Koji su problemi koji se mogu očekivati prilikom identifikacije mikroplastike u hemolimfi predatora i domaćina?
PITANJA PUBLIKE DATA U PISANOJ FORMI	
(Ime i prezime)	/ / /
(Ime i prezime)	/ / /
(Ime i prezime)	/ / /
ZNAČAJNI KOMENTARI	