

Crna Gora
UNIVERZITET CRNE GORE
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Broj 3574
Podgorica, 25.12.2017.

UNIVERZITET CRNE GORE
VIJEĆU PRIRODNO-MATEMATIČKOG FAKULTETA
PODGORICA

Predmet: Izvještaj Komisije o podobnosti teme za izradu magistarskog rada, pod nazivom „Upotreba bioloških testova za procjenu uticaja antropogenih faktora u vodama Bokokotorskog zaliva na dagnji *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819.)” Kandidata Milice Minić.

Na osnovu člana 40 Statuta Univerziteta Crne Gore, a u vezi sa članovima 9, 10 i 11 Pravilnika o studiranju na Postdiplomskim studijama, na sjednici Vijeća Prirodno-matematičkog fakulteta održanoj **24.10.2017 god.** imenovani smo za članove Komisije za ocjenu teme magistarskog rada, pod nazivom „Upotreba bioloških testova za procjenu uticaja antropogenih faktora u vodama Bokokotorskog zaliva na dagnji *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819.)” kandidata Milice Minić, biologa specijaliste eksperimentalne biologije i biotehnologije. Na osnovu uvida u dostavljeni materijal Komisija podnosi sljedeći

IZVJEŠTAJ

1. Podaci o kandidatu

Ime: Milica
Prezime: Minić
Datum rođenja: 05.03.1993.
Mjesto rođenja: Mojkovac, Crna Gora

Obrazovanje:

2015-2016: Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet Crne Gore Specijalističke akademske studije- studijski program Eksperimentalna biologija i biotehnologija.
2011-2015: Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet Crne Gore, Osnovne akademske studije- studijski program Biologija.
2007-2011: Gimnazija u Mojkovcu JUSMŠ, Vuksan Đukić”
1999-2007: Osnovna škola “Aleksa Đilas Bećo” Mojkovac

Studijski boravci

20.02.2017.- 20.04.2017. – Univerzitet u Ljubljani, Biotehnički fakultet – Odsjek za Biologiju . Boravak ostvaren preko CEEPUS projekta CIII-SI-0905-03-1617 Training and research in environmental chemistry and toxicology.

Radno iskustvo:

15.01.2016. – 15.10.2016. – Pripravnički staž. Univerzitet Crne Gore - Prirodno matematički fakultet - studijski program Biologija.

2. *Obrazloženje teme*

a) *Naučna oblast*

Predložena tema istraživanja obuhvata oblasti Genotoksikologije, Ekofiziologije i Zaštite životne sredine.

b) *Predmet rada*

Predmet istraživanja je potencijalni uticaj antropogenih faktora u vodama Bokokotorskog zaliva na dagnju (*Mytilus galloprovincialis*). U ovom radu uz standardne fizičko-hemijske parametre, poseban akcenat će se staviti na biološko testiranje (Komet test, Test aktivnosti acetilholinesteraze i Morfometrijska mjerenja izražena kroz kondicijski indeks) kao metode koje obezbjeđuju nove značajane parametre u procjeni zagađenja vodenih ekosistema.

c) *Cilj istraživanja*

Cilj istraživanja je razvoj tj. adaptacija efikasne, brze i relativno jednostavne kombinacije testova, pogodnih za određivanje potencijala uticaja zagađivača ili drugih prirodnih ili antropogenih faktora prisutnih u morskoj vodi i procijena mogućih rizika kojima su izloženi organizmi na lokacijama uzorkovanja na području Bokokotorskog zaliva.

U Crnoj Gori urađen je mali broj ovakvih istraživanja, pa je cilj istraživanja, takođe, pokazati značaj bioloških testova za unapređenje postojećeg monitoringa vodenih ekosistema u Crnoj Gori.

d) *Aktuelnost problematike*

Upotreba bioloških testova u posljednje vrijeme dobija sve više na značaju u savremenom monitoringu životne sredine, naročito u monitoringu vodenih ekosistema. U razvijenim državama ali i zemljama u okruženju biološki testovi se već duže vrijeme, uspješno koriste za procjenu stanja životne sredine. Biotestovi se konstruišu i primjenjuju da bi otkrili specifična dejstva zagađenja na organizam, te omogućili rani uvid u promjene koje mogu dovesti do oštećenja ćelija, tkiva, jedinki određene vrste ili čitave populacije, a takođe, mogu da otkrivaju pogoršanje stanja ekosistema u cjelini. Znamo da je svrha biomonitoringa životne sredine, da se na vrijeme otkriju negativne promjene koje uzrokuje zagađenje ili drugi antropogeni faktori. Specijalno konstruisani i adaptirani testovi na živim organizmima, sa posebnom senzitivnošću na zagađenje, značajno doprinose postizanju efikasnosti biomonitoringa.

Dagnje su izabrane kao pogodan test organizam za ovo istraživanje, jer je preko njih veoma jednostavno testirati vodeni ekosistem, s obzirom na njihovu veliku brojnost, sesilan način života, filtracioni način ishrane i veliki značaj kao bioindikatora. Pored navedenog, bitno je naglasiti značaj dagnje kao organizma koji se široko koristi u ishrani ljudi i zato ima izuzetno važan ekonomski značaj za populaciju Boke.

Smatramo da bi upotrebom biotestova mogao značajno unaprijediti monitoring stanja životne sredine u Crnoj Gori, čineći ga kako efikasnijim, takoo i vremenski i finansijski ekonomičnijim i isplativijim, jer sem opšteg stanja životne sredine zahvata i toksikološki aspekt u posmatranju i prepoznavanju zagađenja koje može biti i kompleksne prirode.

e) *Naučne metode*

Ovo istraživanje radiće se u specijalizovanoj laboratoriji za fiziologiju, mikrobiologiju i ekotoksikologiju, Univerzitet Crne Gore - Prirodno-matematički fakultet – Odsjek za biologiju, a koristi će se i rezultati mjerenja Centra za ekotoksikološka ispitivanja Crne Gore i Instituta za biologiju mora u которu.

Uzorkovanje dagnji

Dagnje će se uzorkovati iz Bokokotorskog zaliva, sa pet lokacija: Dobrota, Tivat, Orahovac, Bijela i Stoliv. Uzorkovanje će se vršiti zaronom.

Morfometrija i kondicijski indeks

Dagnje će se vagati, mjeriće im se dužina, širina i visina. Takođe će se vagati meso odvojeno od ljuštore i masa ljuštore. Uzorci će se zamrzavati na -80°C i sušiti u liofilizatoru 24 časa do potpune suvoće i ponovo biti izvagani.

Kondicijski indeks će se određivati prema (Mann, 1978), a indeks mesa računati po formuli (IFREMER, 2003).

Komet test

Komet test je metoda koja se temelji na pokretljivosti oštećenih dijelova DNK u električnom polju, pri čemu dolazi do njihovog odvajanja od nukleoida imobiliziranih u agaroznom gelu. Komet test radiće se na hemocitama dagnji, prema metodi koju je opisao Singh et al., 1988. uz manje modifikacije (Rojas et al., 1999).

Preparati se fiksiraju i boje fluorescentnom bojom etidijum bromid (EtBr). Jedra se fotografiraju na uvećanju 400x pomoću digitalne kamere. Mjerenja dužine repa i postotka DNA u repu kometa sprovediće se pomoću kompjuterskog programa Komet 5 Kinetic Imaging Ltd. Rezultati komet-testa biće prikazani kao srednja vrijednost ($\pm$ st. greška) svih jedinki po pojedinačnom mjestu sakupljanja, a podaci će biti obrađeni neparametarskim Mann-Whitney U-testom.

Mjerenje koncentracije proteina

Koncentraciju proteina u homogenim škragama mjeriće se po metodi koju je opisao Lowry (1951.) spektrofotometrijski na mikrotitarskim pločama 96 u kontrolisanim uslovima. Koncentracija proteina će se koristiti za izračunavanje enzimске aktivnosti.

Mjerenje aktivnosti acetilholinesteraze

AChE mjeriće se po metodi koju je opisao Ellman et al., 1961. koja je prilagođena mjerenjima u mikrotitarskim pločama na mikročitačima (Mancini et al., 2004).

Mjerenje će se vršiti u spektrofotometru TECAN SUNRISE na mikrotitarskim pločama 96, na talasnoj dužini 405 nm. Rezultati mjerenja koncentracije proteina i aktivnosti enzima će biti izračunati u exelu, prikazati tabelarno i grafički, i statistički obraditi.

f) *Hipoteza sa obrazloženjem*

Dagnje će se uzorkovati sa pet lokacija: Bijela, Dobrota, Tivat, Orahovac i Stoliv. Odabrane lokacije su interesantne zbog različitosti nivoa antropogenog uticaja, hidrobioloških karakteristika i važnosti za turizam i ekonomske valorizacije akvakulture u Bokotorskom zalivu. Bijela se smatra umjereno zagađenom lokacijom zbog brodogradilišta i prisustva otpadnih materijala, np. teških metala ali organskih polutanata, prisustvo kojih je utvđeno u ranijim istraživanjima. Za Tivat i Stoliv ne postoji dovoljno podataka o uticaju antropogenih faktora. Na tim lokacijama se nalaze uzgajališta školjki, pa su odabrane imajući u vidu značaj školjki u ishrani i njihovu ekonomsku valorizaciju. Dobrota je bila aktuelna zbog neriješenog pitanja kanalizacionih ispusta koji su sprovedeni direktno u more, pa će zato biti predmet istraživanja ovog rada uz ostale lokacije. Referentna lokacija Orahovac, prema do sada dostupnim informacijama nije bila opterećena antropogenim djelovanjem.

Sva istraživanja koja su do sada urađena u ovom području, baziraju se pretežno na fizičko-hemijskim analizama, a u ovom radu uz hemijske analize poseban akcenat će se staviti na biološko testiranje, tj. biotestove (Komet test, Mikronukleus test i test aktivnosti Acetilholinesteraze) kao nove značajane parametre u procjeni zagađenja vodenih ekosistema.

Za oblast obuhvaćenu istraživanjem ne postoji dovoljno podataka o uticaju zagađivača prisutnih u životnoj sredini na živi svijet.

Nulta hipoteza je da će postojati statistički mjerljiva razlika uticaja na dagnje, sakupljenih sa odabranih lokacija u odnosu na potencijalno prisustvo antropogenih faktora odnosno stepen zagađenja okoline.

Da bi se pratila genotoksičnost u morskom ekosistemu u ovom radu biće urađen komet test na hemocitama dagnji (Singh et al., 1988.). Komet test je prikladan u preliminarnim istraživanjima genetičke toksikologije i ekotoksikologije. Očekuju se rezultati koji ukazuju na različit stepen oštećenja DNK u zavisnosti od lokacija uzorkovanja i stepena izloženosti tj. uticaja različitih faktora.

U cilju korištenja *Mytilus galloprovincialis* acetilholinesterazne aktivnosti na škragama (Ellman et al., 1961.) kao biomarkera zagađenja životne sredine u vodama Bokotorskog zaliva upoređivaće se polazne vrijednosti enzimskih aktivnosti i

vrijednosti u kontaminiranim područjima kao i odgovor indikatora izloženosti kontaminiranoj životnoj sredini.

Poželjno bi bilo napraviti korelaciju između rezultata dobijenih biotestovima sa hemijskim analizama tkiva školjki (biće urađena u akreditovanoj hemijskoj laboratoriji) kako bi se utvrdio konkretan uzrok potencijalnog negativnog djelovanja, ako pronađemo da takav postoji, kao i moguće porijeklo toksikanata. Na ovaj način pokušaćemo da testiramo upotrebljivost i senzitivnost biotestova u ispitivanju zagađenja voda u Crnoj Gori, a ovo istraživanje takođe može biti smjernica za buduća ispitivanja na području Bokokotorskog zaliva.

Na kraju istraživanja dobijeni podaci će biti adekvatno statistički obrađeni i prikazani.

3. Zaključak

Nakon pregleda dostavljenog materijala, Komisija je utvrdila da kandidat Milica Minić, biolog specijalista, ispunjava sve Zakonom predviđene uslove, neophodne za početak magistarskog rada. Predložena tema počiva na naučnoj osnovi i ima jasno definisane ciljeve i metode istraživanja, na osnovu kojih se mogu očekivati odgovarajući naučni rezultati. Stoga Komisija predlaže Vijeću Prirodno-matematičkog fakulteta, da odobri izradu magistarskog rada pod nazivom „Upotreba bioloških testova za procjenu uticaja antropogenih faktora u vodama Bokokotorskog zaliva na dagnji *Mytilus galloprovincialis* (Lamarek, 1819.)”, kandidata Milice Minić.

Podgorica,
22. 12. 2017.

KOMISIJA

1. Dr Andrej Perović, van. profesor PMF-a- mentor

A Perović

2. Dr Slađana Krivokapić, van. profesor PMF-a- član

Slađana Krivokapić

3. Dr Svetlana Perović, van. profesor PMF-a- član

S. Perović