

OCJENA PODOBNOSTI DOKTORSKE TEZE I KANDIDATA

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	Sandra Jokanović
Fakultet	Prirodno-matematički fakultet
Studijski program	Biologija
Broj indeksa	2/2014
Podaci o magistarskom radu	Procjena brojnosti mikrobioloških zajednica u Bokokotorskom zalivu CARD FISH metodom i epifluorescentnom mikroskopijom, 09. jul 2014 (A).
NASLOV PREDLOŽENE TEME	
Na službenom jeziku	Filogenetska analiza bakterijskih zajednica u sedimentima Crnogorskog primorja i procjena uticaja polutanata na njihovu distribuciju i strukturu
Na engleskom jeziku	Phylogenetic analysis of bacterial communities in the sediments of the Montenegrin coast and assessment of the impact of pollutants on their distribution and structure
Datum prihvatanja teme i kandidata na sjednici Vijeća organizacione jedinice	28.03.2017
Naučna oblast doktorske disertacije	Ekologija, Biologija
Za navedenu oblast matični su sljedeći fakulteti	
Prirodno-matematički fakultet, Biologija	
A. IZVJEŠTAJ SA JAVNE ODBRANE POLAZNIH ISTRAŽIVANJA DOKTORSKE DISERTACIJE	
Javna odbrana polaznih istraživanja organizovana su 03.07.2017godine u Sali za mehatroniku Mašinskog fakulteta. Kandidatkinja je obrazložila temu objasnivši zašto je značajno determinisati bakterijske zajednice u sedimentima Crnogorskog primorja na lokacijama koje su izložene različitim stepenu i vrsti zagađenja. Potom je predstavila ciljeve, hipoteze, pregled istraživanja, detaljno predstavila lokacije na kojima se uzorkuje sediment, ukazala na plan istraživanja, metodologiju kao i očekivani naučni doprinos. Uslijedila su pitanja članova Komisije.	
B. OCJENA PODOBNOSTI TEME DOKTORSKE DISERTACIJE	
B1. Obrazloženje teme Jedan od razloga za determinisanje i analizu bakterijskih zajednica jeste njihov ogroman diverzitet, između 4000 i 10000 različitih genoma u jednom gramu sedimenta (Torsvik et al., 1990). Istraživanja pokazuju da brojnost bakterija u sedimentima značajno zavisi od trofičkog statusa određenog područja i da je gustina bakterija u površinskim slojevima sedimenta za 2 do 1000 puta veća nego u okolnoj morskoj vodi (Sander & Kalff, 1993; Edlund, 2007) Bakterijske grupe sa specifičnim metaboličkim sposobnostima služe kao ekološki relevantni indikatori i biomonitori promjena u funkcionisanju ekosistema. Sedimenti predstavljaju perzistentni izvor zagađenja u akvatičnom ekosistemu zbog akumulacije toksičnih, mutagenih i karcinogenih supstanci koje nisu biorazgradive (Edlund, 2007). Pojedine bakterijske grupe razvijaju određenu otpornost na polutante koristeći ih kao izvore energije i dominiraju	

određenim područjima (Amer & Fattah, 2014). Usled sve većeg razvoja pomorskih i nautičkih aktivnosti kao i ubrzane urbanizacije na Crnogorskom primorju, od velikog je značaja ispitati bakterijsku raznolikost sedimenta, posebno na mjestima podložnim kontaminaciji i utvrditi u kojoj mjeri zagađivači mijenjaju strukturu i funkciju bakterijskih zajednica.

B2 Pregled literature

Da bi ukazala na važnost istraživanja na kojima se temelji doktorska disertacija kandidatkinja je iznijela opsežnu naučnu literaturu koja ukazuje da se istraživanja ove vrste izvode širom svijeta. Takodje je dala i kraći istorijski osvrt na metode u istraživanju mikroorganizama i istakla da se u doktorskoj disertaciji koristi savremeni i aktuelni pristup u izučavanju bakterijskih zajednica u sedimentu.

Prva istraživanja mikroorganizama u 19. vijeku fokusirala su se na uzgoj u čistoj kulturi koji je bio neophodan korak identifikacije. Kasnijim istraživanjima postalo je jasno da je samo mali dio mikrobiološke zajednice u morskim ekosistemima uzgojiv na standardnim podlogama, svega 1%. Navedeni raskorak u broju uzgojivih predstavnika poznat je kao "velika anomalija podloge" (engl. Great Plate Anomaly).

Ograničavajući faktori u konvencionalnim metodama kultivacije su nemogućnost predviđanja sastava i osobina hranljivog medijuma za selekciju nepoznatih mikroorganizama, kao i to da određene podloge diskriminišu rast ćelija prilagođene oligotrofnim uslovima (Staley & Konopka, 1985; Rosselló – Mora & Amann, 2001).

Sa razvojem filogenetskih molekularnih metoda omogućena je identifikacija do tada nepoznatih bakterijskih vrsta pa ekologija mikroorganizama doživljava ogroman razvitak. Većina tih metoda zasniva se na izolaciji DNA (dezoksiribonukleinska kiselina) i kloniranju specifičnih gena markera. Posljednjih nekoliko godina razvoj metoda sekvenciranja nove generacije (gdje je najveću primjenu našla Illumina i 454 pirosekvenciranje) omogućio je dobijanje velikog broja nukleotidnih nizova i time detaljniji uvid u bakterijsku raznolikost (Kozich et al., 2013).

Istraživanja o mikrobiologiji sedimenta su malobrojnija u poređenju sa mikrobiologijom vodenog stuba. Sediment predstavlja složenu sredinu sastavljenu od organskih i neorganskih čestica okruženih intersticijalnom vodom i filogenetski je raznovrstan ekosistem.

U traganju za opisom novih bakterijskih sojeva i razumijevanja mikrobioloških procesa u morskim sedimentima obavljaju se opsežna naučna istraživanja širom svijeta. Urakawa i saradnici (Urakawa et al., 1999) prikazuju rezultate filogenetskih analiza bakterijskih zajednica u sedimentima Japana koji su pod uticajem otpadnih voda. Determinaciju bakterijskih zajednica duž horizontalnog i vertikalnog profila sedimenta Baltičkog mora objašnjava Edlund (2007) i proučava uticaj naftnih derivata na pojavu specifičnih bakterijskih organizama. Koristeći molekularne tehnike, Hewson i saradnici (Hewson et al., 2007) istražuju u kojoj mjeri različiti fizičko-hemijski faktori u sedimentu duž obale Kalifornije diktiraju pojavu određenih bakterijskih zajednica i koliko utiču na funkcionisanje ekosistema. Opsežne studije bavile su se opisom, poređenjem, prednostima i unapređenjem tehnika sekvenciranja među kojima je i Illumina (Caporaso et al., 2011; Degnan & Ochman, 2012). Illumina sekvenciranje primjenjeno je i u analizi sedimenta dubokomorskih staništa Kineske teritorije (Zhang et al., 2015).

Filogenetska ispitivanja bakterijskih zajednica molekularnim metodama kao i uticaj zagađenja na njihovu distribuciju vrši se i u sedimentima Sredozemnog mora. Najviše ispitivanja vršeno je u istočnom basenu Sredozemnog mora, području Krita, Jonskom moru i dijelom u Tirenskom moru.

Polymenakou i saradnici (Polymenakou et al., 2005) ispituju koji hemijski parametri utiču na bakterijsku strukturu istočnog dijela Sredozemnog mora dok Kouridaki i saradnici (Kouridaki et al., 2010) upoređuju oligotrofna dubokomorska staništa (oko 4000m) Sredozemnog mora sa sjevernoistočnim dijelom Pacifika Kalifornijske obale koji je eutrofan. Giovanelli (2013) daje detaljne rezultate istraživanja prokariotskih zajednica sekvenciranjem nove generacije istražujući

hidrotermalne izvore pjeskovitog dna ostrva u Grčkoj i bilježi dominaciju specifičnih grupa bakterija hemolitotrofa. Strukturu bakterijskih zajednica u anoksičnim sedimentima u Južnoj Španiji koji se nalazi pod uticajem netretiranih otpadnih voda opisuju Köchling i saradnici (Köchling et al., 2011). U Jadranskom moru istraživanja ove vrste su takođe prisutna ali u znatno manjoj mjeri. U sedimentima Venecijanske lagune prikazane su grupe metalredukujućih bakterija koje zahvaljujući specifičnim metaboličkim putevima opstaju u oblasti lučkih akvatorijuma (Han et al., 2007). Uticaj zagađenja na distribuciju bakterijskih zajednica u sedimentu objašnjavaju Korlević i saradnici (Korlević et al., 2015) u sjevernom Jadranu. Ispitane lokacije su izložene dugotrajnom zagađenju zbog blizine industrijskih postrojenja. Na tim mjestima detektovane su posebne bakterijske grupe koje imaju mogućnost razlaganja aromatičnih ugljovodoničnih jedinjenja. Što se tiče južnog dijela Jadrana zabilježeni su određeni podaci dubokomorskih staništa od strane Giovanelli (2013). Međutim podaci o bakterijskim zajednicama sedimenta Crnogorskog primorja ne postoje.

B3 Ciljevi i hipoteze

Problematika doktorske disertacije ukazuje nam na sljedeće ciljeve:

1. Istražiti strukturu bakterijskih zajednica u sedimentima na lokacijama izloženim različitom stepenu i vrsti zagađenja i istražiti odnos između bakterijske strukture i funkcije.
2. Napraviti poređenje bakterijskih zajednica na mjestima koja su izložena različitim vrstama zagađivača
3. Odrediti kvalitet sedimenta na osnovu hemijskih parametara.
4. Ukazati na mjere zaštite

Osnovna hipoteza je zasnovana na tome da različiti polutanti koji se akumuliraju u sedimentima morskog dna mijenjaju prirodnu strukturu bakterijskih zajednica usled selektivnog pritiska

B4 Metode i plan istraživanja

Metodologija istraživanja predstavlja kombinaciju terenskog rada (uzorkovanje sedimenata na odabranim lokalitetima), laboratorijskog rada (koji obuhvata analizu bakterijskih i hemijskih parametara) kao i rada na statističkoj analizi dobijenih rezultata i poređenju sa podacima iz literature.

Implementacija molekularne tehnike u istraživanju cjelokupne raznolikosti bakterijskih zajednica je neophodna jer se 99% ovih organizama ne može uzgojiti u čistoj kulturi (Rosselló-Mora & Amann, 2001; Su et al., 2012).

Ekstrakcija DNK iz uzoraka sedimenta vršice se pomoću PowerSoil DNA Isolation Kit. Filogenetska analiza bakterijskih zajednica i uticaj zagađenja na njihov sastav sprovodi se pomoću molekularne tehnike sekvenciranja nove generacije - Illumina (koristeći gen 16S rRNA) koja omogućava nekoliko hiljada do nekoliko stotina hiljada nukleotidnih sekvenci po uzorku što zahtjeva korištenje takozvanih „pipeline“ softverskih programa u analizi i taksonomskoj klasifikaciji. Illumina se zasniva na sekvenciranju sintezom. Koristi tzv. most aplikaciju DNK na protočnoj ćeliji i formiranje klastera. Jedan klaster sadrži i do 1000 kopija originalnog molekula. U svakom ciklusu sekvenciranja dodaje se pojedinačno fluorescentno obilježeni nukleotid (dNTP) koji služi za terminaciju polimerizacije. Velika prednost sekvenciranja nove generacije u odnosu na ostale molekularne metode je mogućnost dobijanja velike količine podataka (npr. 10 000 nukleotidnih nizova u jednom ciklusu sekvenciranja, što je posebno važno u ekologiji mikroorganizama. (Kozich et al., 2013).

Hemijski parametri koji se analiziraju su:

TOC (ukupan organski ugljenik) analizira se računanjem razlike sadržaja ukupnog ugljenika TC i neorganskog ugljenika IC. Analiza će se vršiti TOC analizatorom (ISO/TS 13137:2001).

Ukupan azot analizira se Kjeldal digestijom i Kjeltex analizatorom (Persson et al., 2008).
Ukupan fosfor analizira se ekstrakcijom koristeći mješavinu HNO_3 i HCl pomoću mikrotalasne peći i spektrometra sa indukovano spregnutom plazmom (EPA 3051A, 1997).
Amonijak se analizira ekstrakcijom koristeći KCl , filtriranjem i mjerenjem na spektrofotometru (ISO/TS 14256-1:2003).
PAH (policiklična aromatična ugljovodonična jedinjenja i **PCB** (polihlorovani bifenili) analiziraju se gasnom hromatografijom uz masenospektrometrijski selektivnu detekciju (GC / MS) (EPA 8270, 1996).

Uzorkovanje i odabrane lokacije

Uzorkovanje površinskih uzoraka sedimenata sprovodiće se Ponarovim grabilom dok se uzorkovanje dubinskog profila sedimenata na pozicijama koje se ocjenjuju kao značajne sa aspekta zagađenja i rasprostranjenja bakterijskih zajednica sprovodi gravitacijskim korerom. Uzorci sedimenta čuvaju se na temperaturi – 70°C do obrade.
 Uzorkovanje sedimenta će se vršiti na ukupno 12 lokacija u Bokokotorskom zalivu i otvorenom moru prema proceduri i dinamici UNEP, MED POL (2006). U zavisnosti od prvih rezultata analiza površinskih sedimenata sprovodiće se planiranje i realizacija dubinskog profila sedimenta na dvije „hot spot“ tačke i jednoj referentnoj poziciji.

Predstavljene su lokacije i njihov značaj:

1. **Luka Kotor** – Unutrašnji dio Bokokotorskog zaliva najdublje uvučen u kopno sa velikim prilivom slatkih voda (izvor Gurdić, rijeka Škurda). Uticaj otpadnih voda i rizik od izlivanja nafte usled sve brojnijih pomorskih aktivnosti. U prošlosti su na ovom području postojale fabrike sapuna, gume i prerade metala.
2. **Risan** – Unutrašnji dio Bokokotorskog zaliva sa velikim prilivom slatkih voda (vrela Sopot i rijeka Morinj). Podložno eutrofikaciji; 2013g. potonuo remorker.
3. **Sveta Nedelja** – Tjesnac; opasnost od zagađenja; sve veći broj kružera; prisutno uzgajalište mušulja
4. **Bijela** – Najveće brodogradilište u južnom Jadranu; problem grita; rizik zagađenja PAH –om i PCB-om.
5. **Tivat centar** – Uticaj marine Porto Montenegro i brodogradilišta Bijela
6. **Porto Montenegro** – Na mjestu nekadašnjeg brodogradilišta, sada marina jahti. Opasnost od fekalnog otpada i zagađenja PAH -om
7. **Tivat uvala** – Najbliži dio Tivatskog zaliva. Prisutna dva uzgajališta mušulja; uticaj sa kopna malim rijekama; u zaleđu nekada bila solana
8. **Herceg Novi** – Dio Bokokotorskog zaliva blizu otvorenog mora; uticaji otpadnih voda i moguće zagađenje sa plovila.
9. **Igalo** – Dio Bokokotorskog zaliva blizu otvorenog mora. Uticaji otpadnih voda i moguće zagađenje sa plovila; uticaj rijeke Sutrine. Posjeduje područja sa ljekovitim blatom
10. **Luka Budva** – Otvoreno more; veliki broj jahti i moguće zagađenje sa plovila
11. **Luka Bar** – Otvoreno more. Najveća nacionalna luka teretnih, putničkih i vojnih brodova, a unutar luke već godinama postoji kamenolom i razne vrste skladišta.
12. **Ada Bojana** – Otvoreno more; uticaj rijeke Bojane

B5 Očekivani naučni doprinos

1. Dobijanje prvih rezultata raznolikosti bakterijskih zajednica u sedimentima Crnogorskog primorja u cilju procjene stepena zagađenja i antropogenog uticaja.
2. Karakterizacija bakterijskih grupa koje dominiraju na "hot spot" tačkama i koje su razvile

otpornost ka zagađivačima.

3. Karakterizacija i procjena stepena zagađenja morskih sedimenata na Crnogorskom primorju na osnovu hemijskih parametara.

4. Očekuje se da će ova studija predstavljati značajan doprinos u izučavanju ekološke mikrobiologije i zaštite životne sredine.

Mišljenje i prijedlog komisije

Komisija je saglasna da se radi o uspješnoj odbrani polaznih istraživanja kandidatkinje Sandre Jokanović imajući u vidu ciljeve, hipoteze, kompleksnost, važnost i naučni doprinos njenog istraživanja. Važno je napomenuti da se u doktorskoj disertaciji koristi aktuelna i savremena metodologija. Istraživanje sa ciljem determinacije bakterijskih zajednica u sedimentima, koristeći sekvenciranje nove generacije (NGS) je po prvi put izvedeno u Crnoj Gori. Komisija je utvrdila da kandidatkinja mr Sandra Jokanović ispunjava Zakonom predviđene uslove za rad na doktorskoj tezi pod nazivom „ Filogenetska struktura bakterijskih zajednica u sedimentima Crnogorskog primorja i procjena uticaja polutanata na njihovu distribuciju i strukturu“.

Prijedlog izmjene naslova

Prijedlog promjene mentora i/ili imenovanje drugog mentora

Planirana odbrana doktorske disertacije

2019g

Izdvojeno mišljenje

(popuniti ukoliko neki član komisije ima izdvojeno mišljenje)

Ime i prezime

Napomena

(popuniti po potrebi)

ZAKLJUČAK

Predložena tema posvom sadržaju odgovara nivou doktorskih studija.	DA	NE
Tema je originalan naučno-istraživački rad koji odgovara međunarodnim kriterijumima kvaliteta disertacije.	DA	NE
Kandidat može na osnovu sopstvenog akademskog kvaliteta i stečenog znanja da uz adekvatno mentorsko vođenje realizuje postavljeni cilj i dokaže hipoteze.	DA	NE

Komisija za ocjenu podobnosti teme i kandidata

Dr. Svetlana Perović, vanredni profesor Prirodno-Matematičkog fakulteta Univerziteta Crne Gore, Podgorica	<i>S. Perović</i>
Dr. Sladana Krivokapić, vanredni profesor Prirodno-Matematičkog fakulteta Univerziteta Crne Gore, Podgorica	<i>Sladana Krivokapić</i>
Dr. Sandi Orlić, viši naučni saradnik Instituta "Ruđer Bošković", Zagreb	<i>S. Orlić</i>



U Podgorici, 05.07.2017.

DEKAN

MP