

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ – ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ

НАСТАВНО – НАУЧНОМ ВЕЋУ

ПРЕДМЕТ: Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације Мире М. Станковић, мастер хемичара

На редовној седници Наставно–научног већа Универзитета у Београду – Хемијског факултета, одржаној 12. октобра 2017. године, именовани смо у Комисију за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације мастер хемичара, **Мире М. Станковић**, истраживача–сарадника Универзитета у Београду – Института за мултидисциплинарна истраживања, под насловом:

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

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је на својој седници одржаној дана 26. октобра 2017. године, на захтев Универзитета у Београду – Хемијског факултета, дало сагласност на предлог теме докторске дисертације. Комисија је докторску дисертацију прегледала и подноси Наставно–научном већу Универзитета у Београду – Хемијског факултета следећи:

ИЗВЕШТАЈ

А. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација кандидата **Мире М. Станковић** написана је на српском језику, на 92 стране А4 формата (фонт „Times New Roman“, величина 12 pt, са проредом 1, маргине 2 cm) и садржи 40 слика (6 слика из постојеће литературе, 34 слике представљају оригиналне резултате кандидата, а од тога 14 слика се налази у Прилогу), 13 табела (3 из постојеће литературе, 10 табела представља оригиналне резултате кандидата) и 234 литературна навода. Дисертација се састоји из 7 поглавља: Увод (2 стране), Општи део (17 страна), Материјали и методе (17 страна), Резултати и дискусија (25 страна), Закључак (2 стране), Литература (16 страна), Прилог (7 страна). Поред тога, дисертација садржи: захвалницу, изводе на српском и енглеском језику, садржај, биографију кандидата, Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјаву о коришћењу.

У поглављу **Увод** дат је краћи осврт на област истраживања и тему рада дисертације. Наглашена је важност проблематике и наведени су узроци нестајања пчелињих друштава последњих година. Посебно је истакнут утицај пчелињег крпеља *Varroa destructor* и микроспориције *Nosema ceranae*, болести варозе односно ноземозе, на пчелиња друштва. Наведен је предмет докторске дисертације - испитивање могућности добијања нових информација о стресу пчелињих заједница анализом меда као пчелињег производа и развој аналитичких поступака за утврђивање потенцијалних индикатора

заражености. Дат је преглед експерименталних и теоријских метода које су до сада примењене у истраживањима, и дефинисани су циљ и задаци докторске дисертације.

Поглавље **Општи део** садржи 7 целина. У првом делу описан је значај пчела, у смислу производње меда и важне улоге коју пчеле имају у опрашивању биљака. Детаљно су описани узроци који доводе до нестајања пчелињих друштава последњих деценија. У другом делу приказани су литературни подаци о губицима пчелињих друштава последњих година у Србији и земљама из окружења. У трећем и четвртном делу су описане методе које се користе за утврђивање степена заражености, као и методе за сузбијање варозе и ноземозе, две најчешће болести пчела које доводе до губитка пчелињих друштава. Пети део општег дела се односи на литературне податке о производњи и приносу меда који потиче од пчелињих заједница изложених овим паразитима. У шестом делу дат је осврт на основне физичкохемијске карактеристике и састав меда и кратак опис различитих ботаничких врста. Седми део се поред појма флуорофоре односи и на флуоресцирајуће компоненте у меду.

У поглављу **Материјал и методе** садржи детаљан приказ коришћених хемикалија и реагенса, описан је поступак припреме узорка, и дат је детаљан опис експерименталних и статистичких процедура за сваку примењену методу у оквиру ове докторске дисертације.

Поглавље **Резултати и дискусија** је подељено на основу постављених циљева рада у пет тематских целина. Кандидаткиња даје приказ главних резултата истраживања, њихову анализу и дискусију, као и поређење са до сада доступном литературом. Први део представља процену варијабилности релативног садржаја протеина и фенола у меду коришћењем флуоресцентне спектроскопије у комбинацији са напредним статистичким методама спектралне анализе, мултиваријационом резолуцијом кривих – наизменични најмањи квадрати (*Multivariate Curve Resolution–Alternating Least Squares, MCR-ALS*). Приказано је поређење са резултатима добијеним спектрофотометријским методама за одређивање укупних фенола (*Folin-Ciocalteu*) и садржаја укупних протеина (*Bradford*). Други део представља праћење годишње варијације протеина и фенола у меду коришћењем флуоресцентне спектроскопије, а током употребе антивароа третмана на пчелиње друштво. У трећем делу су анализирани узорци меда који потичу из кошница различитог степена заражености ноземом и вароом. Одређен је однос емисионих компоненти протеина и фенола применом мултиваријационе анализе (MCR-ALS) на флуоресцентне спектре, са циљем добијања потенцијалних индикатора нивоа заражености пчелињих друштава. Такође, овај део обухвата резултате диференцијалне скенирајуће калориметрије (DSC), чиме је добијена промена у енталпији узорка меда у зависности од заражености одговарајућих кошница. Четврти део се односи на испитивање узорка меда применом флуоресцентне спектроскопије и биохемијских анализа (одређивање садржаја укупних протеина и фенола, одређивање протеинског профила електрофоретском анализом, одређивање активности ензима каталазе и дијастазе), а све у циљу утврђивања везе између ових параметара меда и нивоа заразе пчелињих друштава. Пети део представља резултате основних физичкохемијских параметара меда (електрична проводљивост, киселост, садржај влаге, активност дијастазе, садржај шећера и оптичка ротација), који потиче из кошница различитог степена заразе.

У поглављу **Закључак** сумирани су сви резултати и закључци који су проистекли из ове дисертације.

Поглавље **Литература** (234 цитата) обухвата публикације, радове и књиге које су из области истраживања.

Б. КРАТАК ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА

У испитивањима у оквиру ове докторске дисертације коришћени су узорци меда који потичу из кошница заражених паразитима и контролни узорци меда пореклом из незаражених кошница. Резултати представљени у оквиру ове дисертације су прво систематско истраживање везе између карактеристичних физичкохемијских и биохемијских параметара меда и заразе пчелињих друштава вароом и ноземом. За постизање ових циљева развијен је нов аналитички поступак за истовремену процену садржаја укупних протеина, укупних фенола и њиховог односа применом флуоресцентне спектроскопије.

Применом флуоресцентне спектроскопије и MCR-ALS анализе добијене су протеинске и фенолне компоненте емисионих спектра узорака меда и одређен је њихов однос. Ова нова метода базирана на флуоресцентној спектроскопији за истовремену процену садржаја укупних протеина, укупних фенола и њиховог односа је упоређена са резултатима спектрофотометријских метода које се уобичајено користе за одређивање укупних фенола (*Folin Ciocalteu*) и садржаја укупних протеина (*Bradford*). Показано је да се однос протеинске и фенолне компоненте у различитим узорцима меда смањује са порастом нивоа инфекције у одговарајућим кошницама, било да су заражене паразитима вароом или ноземом. Однос спектралних компоненти које одговарају флуорофорима протеина и фенола у узорцима меда показао се као погодан индикатор за праћење промена квалитета хомогенизације меда и годишње варијабилности узорака. Флуоресценција у комбинацији са савременом хеометријском методом као што је паралелна факторска анализа (*PARAllel FACtor Analysis, PARAFAC*) је дала резултате који су показали да PFC1 PARAFAC компонента, која потиче од фенолних флуорофора у узорцима меда, може бити употребљена за процену нивоа заразе пчелињих колонија.

Спектрофлуориметријска процена релативног садржаја фенола и протеина поред тога што даје врло корисне информације, не захтева претходну припрему узорака, што свакако представља предност у односу на постојеће методе које се користе за квантификацију протеина и фенола у меду. Поред тога, у емисионим спектрима максимуми који потичу од протеина и фенола су јасно раздвојени, те спектрофлуориметријска метода омогућава њихово истовремено одређивање.

Додатно су испитиване варијације садржаја биљних маркер протеина и пчелињих маркер протеина у меду, с обзиром да 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). SDS PAGE електрофорезом није утврђена значајна разлика у протеинском профилу анализираних узорака, те су примењене спектрофотометријске методе одређивања активности специфичних ензима, каталазе и дијастазе. Корелациона анализа је показала да је степен заразе у позитивној корелацији са активношћу каталазе и стога овај ензим може бити индикатор за скрининг меда пореклом из заражених кошница.

Ботаничко порекло узорака меда је одређено коришћењем мелизопалинолошке анализе. Разматрајући све узорке, присуство и концентарција полена у узорцима меда нису у корелацији са зараженошћу друштава паразитима вароа и нозема.

Резултати докторске дисертације указују на разлику између појединих физичкохемијских параметара добијених анализом меда када је у питању различит степен заразе пчелињих друштава од којих мед потиче. Показана је промена у енталпији узорака меда методом диференцијалне скенирајуће калориметрије, при чему је уочено повећање, а затим смањење енталпије са повећањем степена заразе вароом одговарајућих кошница. Са друге стране, постојао је тренд почетног смањења, а затим повећања енталпије у

узорцима меда са повећањем нивоа инфекције ноземом пчелињих друштава. Специфична оптичка ротација, електрична проводљивост, садржај воде, слободна киселост и шећерни профил су одређени ради добијања додатних карактеристика узорака меда и показано је да се на основу разлика у вредностима ових величина може боље разумети утицај заразе на пчелиња друштва. Иако су добијени резултати испитиваних физикохемијских параметара у дозвољеним границама према Правилнику о квалитету меда, резултати до којих се дошло у оквиру ове дисертације показују да са порастом заразе кошница у узорцима меда, расте садржај воде док слободна киселост, апсолутна вредност специфичне оптичке ротације и електрична проводљивост опадају. Примењена анализа главне компоненте је указала да су фруктоза, мелбиоза и мелезитоза шећери који су присутни у већој количини у узорцима меда из кошница вишег степена инфекције, док су глукоза и изомалтоза присутне у већим количинама у узорцима мање заражености. Добијени резултати у овој докторској дисертацији могу бити основа за даља, опсежнија истраживања која би се применила на много већем броју узорака меда, а све у циљу испитивања везе између физикохемијских параметара у узорцима меда и нивоа заразе пчелињих друштава.

В. УПОРЕДНА АНАЛИЗА РЕЗУЛТАТА КАНДИДАТА СА РЕЗУЛТАТИМА

ИЗ ЛИТЕРАТУРЕ

У литератури су описане различите експерименталне методе које се односе на контролу квалитета и утврђивање аутентичности меда, као и истраживања која се односе на проналажење хемијских маркера у меду, односно фитохемикалија које су специфичне за одређене врсте меда како би се омогућила и олакшала систематска карактеризација и класификација меда. Упоредо, стручна и научна јавност посвећена је истраживањима узрока нестајања пчелињих колонија, као и метода за процену врсте и степена заражености пчелињих друштава. Међутим, према нашим сазнањима до сада није извршена свеобухватна анализа меда који потиче од друштава која су изложена различитим факторима стреса. Прегледом одговарајуће литературе примећено је да није објављена ниједна студија која испитује могућност постојања везе између заразе пчелиње колоније и хемијског састава, односно физикохемијских карактеристика меда.

У овој докторској дисертацији су по први пут анализирани узорци меда пореклом из кошница које су биле заражене паразитима вароом и ноземом са циљем да се испитају могући параметри у меду који би се довели у везу са нивоом заражености пчелињих друштава. Развијен је нови аналитички поступак за одређивање релативног садржаја протеина и фенола у узорцима меда, а који се заснива на флуоресцентној спектроскопији. Ова метода је упоређена са спектрофотометријским методама које се користе за одређивање укупних фенола (*Folin-Ciocalteu*) и укупних протеина (*Bradford*). У литератури нема много студија о протеинима у меду због њихове ниске заступљености (0,1-0,5%) и отежане екстракције из меда. Поред тога, недостатак *Bradford*-ове методе за мерење укупних протеина је различит афинитет реагенса *Comasie brilliant blue* (СВВ) за протеине различитих својстава, док се нова спектрофлуориметријска метода ослања на емисију специфичне аминокиселинске флуорофоре (триптофан, Trp). Што се тиче методе за одређивање укупних фенола, *Folin Ciocalteu*, показано је у литератури да није у потпуности селективна, јер осим фенола реагују поједина органска и неорганска једињења, укључујући и 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.

Први пут је примењена хеометријска метода - паралелна факторска анализа (*PARAllel FACtor Analysis*, PARAFAC), на емисионим спектрима узорака меда у циљу процене степена заражености пчелињих друштава. Утврђена је позитивна корелација између степена заражености и прве PARAFAC компоненте (PFC1) која потиче од фенолних једињења, па се PFC1 може сматрати индикатором нивоа заражености.

Такође, у литератури постоје подаци да биосинтеза пчелињих протеина може да варира под утицајем биогених и абиогених фактора, из ових разлога по први пут је испитана присутност и садржај укупних и пчелињих маркер протеина у меду пореклом из пчелињих заједница различитог степена заражености паразитима *V. destructor* и *N. ceranae*.

Према литератури, за одређивање степена заражености пчелињих друштава користе се стандардни поступци који захтевају узорковање живих пчела. Стога, треба истаћи значај неинвазивног аналитичког приступа, који обухвата флуоресцентну спектроскопију узорака меда ради процене степена заражености пчелињих друштава. Аналитички поступак који је примењен у оквиру ове дисертације искључује поступак узорковања пчела и добра је основа за развијање метода за процену степена заражености пчелињих друштава.

Г. РАДОВИ И САОПШТЕЊА КОЈИ СУ ДЕО ДИСЕРТАЦИЈЕ

Резултати испитивања у оквиру ове докторске дисертације објављени су у 3 научна рада. Један научни рад је објављен у врхунском међународном часопису (M21), један рад у истакнутом међународном часопису (M22) и један рад у међународном часопису (M23). Поред тога, резултати су презентовани у облику 1 саопштења на научном скупу од међународног значаја које је штампано у целисти и 2 саопштења на научном скупу од међународног значаја које је штампано у изводу.

M21 - Рад у врхунском међународном часопису

1. **Stankovic Mira**, Bartolic Dragana, Mutavdzic Dragosav, Markovic Smilja, Grubic Sasa, Jovanovic Nemanja, Radotic Ksenija. Estimation of honey bee colony infection with *Nosema ceranae* and *Varroa destructor* using fluorescence spectroscopy in combination with differential scanning calorimetry of honey samples. JOURNAL OF APICULTURAL RESEARCH, (2021), str. 1-7 (M21, IF2020= 2,584; Entomology 22/102) DOI: [10.1080/00218839.2021.1889803](https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1889803).

M22 - Рад у истакнутом међународном часопису

1. **Stankovic Mira**, Nikcevic Miroslav, Radotic Ksenija. Annual variation of proteins and phenols in honey of a bee society using fluorescence spectroscopy: a way to assess effects of antivarroa treatments on honey composition. EUROPEAN FOOD RESEARCH AND TECHNOLOGY, (2020), vol. 246, br. 7, str. 1515-1518 (IF2020=2,988; Food Science & Technology 64/144) DOI: [10.1007/s00217-020-03507-x](https://doi.org/10.1007/s00217-020-03507-x).

M23 - Рад у међународном часопису

1. **Stankovic Mira**, Bartolic Dragana, Sikoparija Branko, Spasojevic Dragica, Mutavdzic Dragosav, Natic Maja, Radotic Ksenija. Variability Estimation of the Protein and Phenol Total Content in Honey Using Front Face Fluorescence Spectroscopy Coupled with MCR-ALS Analysis. JOURNAL OF APPLIED SPECTROSCOPY, (2019), vol. 86 br. 2, str. 256-263 (IF₂₀₁₉= 0,710; Spectroscopy 36/42) DOI: [10.1007/s10812-019-00809-1](https://doi.org/10.1007/s10812-019-00809-1).

M33 - Саопштења са међународних скупова штампана у целости:

1. **Stanković Mira**, Bartolić Dragana, Prokopijević Miloš, Prodanović Olivera, Đikanović Daniela, Simonović Radosavljević Jasna, Radotić Ksenija. Fluorescence spectroscopy and principal component analysis in the honey samples classification, Proceedings: 27th International Conference: Ecological Truth and Environmental Research - EcoTER'19, Proceedings: 27th International Conference: Ecological Truth and Environmental Research - EcoTER'19, pp. 89 - 92, 978-86-6305-097-6, Bor Lake, Serbia, 18. - 21. Jun, 2019.

M34 - Саопштења са скупа међународног значаја штампана у изводу

1. **Stanković Mira**, Bartolić Dragana, Marković Smilja, Maksimović Vuk, Nikčević Miroslav, Radotić Ksenija. Differentiation of the honey samples based on botanic origin using fluorescence spectroscopy, differential scanning calorimetry and HPLC-PAD. The UNIFood Conference, The UNIFood Conference, pp. BKHP73 - FQSP73, 978-86-7522-060-2, Belgrade, Serbia, 5. - 6. Oct, 2018.
2. **Stanković Mira**, Bartolić Dragana, Šikoparija Branko, Spasojević Dragica, Mutavdžić Dragosav, Natić Maja, Radotić Ksenija. 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, pp. 21828, Belgrade, Serbia, 28. Avgust - 1. Septembar, 2017.

Д. ПРОВЕРА ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Оригиналност ове докторске дисертације 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 15%. Овај степен подударности последица је цитата, личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места у вези са темом дисертације, као и претходно публикованих резултата истраживања проистеклих из дисертације, што је у складу са чланом 9. овог Правилника.

На основу свега изложеног Комисија сматра да је докторска дисертација Мире М. Станковић оригинална, као и да су у потпуности поштована академска правила цитирања, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Ђ. ЗАКЉУЧАК КОМИСИЈЕ

На основу прегледа докторске дисертације и свега изложеног у Извештају, Комисија закључује да је докторска дисертација написана у складу са образложењем које је наведено у пријави теме и да је кандидаткиња Мира М. Станковић успешно одговорила на све постављене задатке који се односе на развој аналитичког поступка за процену степена заражености пчелињих друштава. Овај научно истраживачки рад представља прво истраживање узорака меда из кошница у којима је утврђено присуство заразе вароом и ноземом. Применом савремених аналитичких и хеометријских метода дефинисани су параметри који доприносе идентификацији узорака меда пореклом од пчелињих друштава различитог степена заражености. Однос спектралних компоненти које одговарају флуорофорима протеина и фенола, компонента добијена паралелном факторском анализом која потиче од фенолних флуорофора, и активност каталазе у меду идентификовани су као потенцијални индикатори степена заражености пчелињих друштава. Добијени резултати у оквиру ове дисертације могу бити основа за развијање

нових спектроскопско-статистичких метода за процену утицаја фактора стреса на стање пчелињих друштава. Предложен је савремен и неинвазиван приступ за праћење заражености пчелињих друштава, који је од значаја за благовремене активности у циљу спречавања ширења заразе.

Резултати истраживања проистекли из ове докторске дисертације објављени су у оквиру 3 научна рада. Један научни рад је објављен у врхунском међународном часопису (M21), један рад у истакнутом међународном часопису (M22) и један рад у међународном часопису (M23). Поред тога, резултати су презентовани на научним скуповима међународног значаја, од тога је један штампан у целисти и два су штампана у изводу.

На основу изложеног Комисија закључује да резултати кандидата Мире М. Станковић, мастер хемичара, приказани у оквиру докторске дисертације представљају оригиналан и значајан научни допринос области аналитичке хемије. Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију кандидата, мастер хемичара под насловом:

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

и предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Хемијског факултета да дисертацију прихвати и одобри њену јавну одбрану, чиме би били испуњени сви услови да кандидат стекне звање доктор хемијских наука.

Београд, 29.08.2022.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

др Маја Натић, редовни професор, ментор
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

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

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

др Наталија Половић, редовни професор
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

др Јевросима Стевановић, редовни професор,
Универзитет у Београду – Факултет ветеринарске медицине