

## ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

## ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Токсичне цијанобактерије са територије Републике Србије

Кандидата Нада Ј. Токоди

<b>I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ</b>
<p>1. Датум и орган који је именовао комисију 10 Седница Наставно научног већа Природно-математичког факултета, 31.03.2016.</p> <p>2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:</p> <p>- Др Зорица Свирчев, редовни професор, ужа научна област Хидробиологија, датум избора 1.01.2005., ПМФ, Нови Сад, ментор  - Др Јелица Симеуновић, ванредни професор, ужа научна област Микробиологија, датум избора 26.03.2015., ПМФ, Нови Сад, председник  - Др Едита Стокић, редовни професор, ужа научна област Интерна медицина (Ендокринологија и болести метаболизма), датум избора 1.03.2009., Медицински факултет, Нови Сад, члан</p>
<b>II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ</b>
<p>1. Име, име једног родитеља, презиме: Нада (Јашо) Токоди</p> <p>2. Датум рођења, општина, држава: 21.01.1986. Суботица, Р. Србија</p> <p>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив Мастер биолог (Микробиологија) и Мастер професор биологије</p> <p>4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија 2009. година, Доктор наука - Биолошке науке</p> <p>5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: Природно-математички факултет, Департман за биологију и екологију, <i>Мастер рад</i>: Биофилм: Микроорганизми и болести 29.09.2009. <i>Мастер рад</i>: Ефекти цијанобактерија на рибе у животној средини (<i>in vivo</i>) 30.10.2012.</p>
<p>6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: <i>Мастер</i>: Микробиологија и Биолошке науке – настава</p>
<b>III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ</b>
Токсичне цијанобактерије са територије Републике Србије

#### **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

Навести кратак садржај са знаком броја страна, поглавља, слика, шема, графикана и сл.

Цветање цијанобактерија може да представља проблем у екосистемима широм света, укључујући и Републику Србију, због тога што је једна од последица цветања цијанобактерија производња високо активних токсичних метаболита, односно цијанотоксина. Присуство токсичних цијанобактерија на територији Републике Србије веома је битно питање које је приликом израде докторске дисертације истражено и представљено у виду Базе података цијанобактерија у Србији где се налазе сви доступни подаци о присуству и цветању цијанобактерија и њихових метаболита у току последњих 130 година као и њихови негативни ефекти које могу да имају на другу живи свет. Проблем који цијанотоксини стварају у воденим екосистемима представљен је приликом истраживања језера Лудош које константно цвета преко 35 година. Резултати су указали на то да је трофички статус истраживаног воденог екосистема био еутрофан, а да врсте које су цветале током истраживања (*Limnithrix redekei* и *Pseudanabaena limnetica*) могу да производе цијанотоксине. Присуство микроцистина/нодуларина и сакситоксина детектовано је у води језера (ELISA тест) узорковане током 2011. и 2012. године, а користећи методу LC-MS/MS детектована је варијанта микроцистина (MC-RR) у ткивима водених биљака (*Phragmites communis*, *Typha latifolia* и *Nymphaea elegans*) узоркованих 2012. године. Истом методом регистроване су и варијанте MC-LR и MC-RR у ткивима бабушке (*Carassius gibelio*) која је уловљена језеру, а пронађене су и хистопатолошке промене ткива ове рибе. У оквиру дисертације вршено је испитивање узорака земљишта пореклом из различитих терестричних екосистема са територије Републике Србије, првенствено биолошких лесних покорица, али цијанотоксини нису детектовани (ППП есеј), нити су узорци показивали токсичност (*Artemia salina* тест токсичности). Могуће је да су у биолошким лесним покорицама биле присутне нетоксичне врсте цијанобактерија, да су концентрације цијанотоксина веома ниске или да су постојеће методе детекције недовољно осетљиве за такав тип узорака. Подаци добијени истраживањем сојева из Новосадске колекције култура цијанобактерија (NSCCC) који потичу из водених и терестричних екосистема широм Републике Србије, указали су на постојање токсичности (*Artemia salina* тест токсичности) и присуство микроцистина/нодуларина и сакситоксина (ELISA тест) што показује да сојеви са територије Републике Србије имају потенцијал за продукцију токсичних метаболита. Испитивања могућих метода превенције цветања рађена су помоћу рачића *Daphnia pulex* и показано је да се дафнија може хранити већином сојева цијанобактерија из NSCCC што је потврђено и истраживањем на воденом екосистему типа рибњак. Убацивањем дафније пре почетка цветања цијанобактерија може да се смањи биомаса цијанобактерија у рибњаку и самим тим спречи продукција и отпуштање токсина. С обзиром да је детектована и акумулација микроцистина у ткивима дафније, употреба рачића *Daphnia pulex* као биолошки тест организам за тестирање присуства цијанотоксина треба да се преиспита. На основу прикупљених података закључује се да је неопходно наставити са праћењем појаве цветања цијанобактерија и ефеката које имају на различите екосистеме ради боље процене стања и могућности предвиђања могућих проблема које ови микроорганизми могу да проузрокују у будућности.

Докторска дисертација Наде Токоди је написана на 253 страна и садржи: Захвалницу, Садржај, 8 поглавља (Увод, Циљеви истраживања, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци, Литература и Прилог), 45 табела, 16 графикана, 37 слика, 1 шему, 839 литературних навода, Биографију кандидата, Кључну документацију на српском и енглеском језику.

#### **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

САДРЖАЈ- Садржај даје преглед основних поглавља и подпоглавља помоћу којих је могућ брз преглед докторске дисертације. Овако организован садржај омогућава јасан и следив преглед свих битних поглавља дисертације.

УВОД- У уводном делу кандидаткиња јасно описује опште проблеме области којом се дисертација бави. Даје детаљни преглед литературе о досадашњим сазнањима о токсичности цијанобактерија и њиховим негативним ефектима у различитим екосистемима, с посебним нагласком на цијанотоксине. На тај начин кандидаткиња показује познавање проблематике и јасно дефинише проблеме и тематику којом се теза бави.

**ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА-** Циљеви истраживања су дефинисани прецизно и недвосмислено. Сви циљеви су изведени на основу прегледа досадашњих сазнања о токсичности цијанобактерија описаних у прегледу литературе као и на основу информација у односу на стање у Републици Србији. Сви дефинисани циљеви су у складу са циљевима наведеним приликом пријаве теме докторске дисертације.

**МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ-** У овом поглављу, кандидаткиња прецизно описује материјал и методе које користи приликом израде дисертације. Наводи начин формирања Базе података цијанобактерија у Србији, описује начин узорковања на терену, локалитете и спровођење експеримента. Такође, наводи и детаљно објашњава спроведене анализе на сакупљеним узорцима, од њихове припреме до поступка реализације методе. На различитим типовима узорака који су предмет ове тезе урађене су следеће анализе: таксономска анализа цијанобактеријских популација, одређивање концентрације хлорофила *a*, *Artemia salina* тест токсичности, тест храњења са врстом *Daphnia pulex*, ПП1 есеј, ELISA тест, LC-MS/MS метода и хистолошке анализе ткива рибе. На крају поглавља један пасус је посвећен опису статистичких метода обраде података. Све методе којима су обрађивани добијени резултати су савремене и примерене врсти добијених података. Материјал и методе коришћени у дисертацији су наведени веома прецизно и систематично и омогућавају поновљивост анализа и експеримената.

**РЕЗУЛТАТИ-** Резултати су подељени у 6 подпоглавља како би одговарали тематским целинама рада и постављеним циљевима. Оваква подела омогућава једноставан преглед, али и могућност компарације са дискусијом. Прва два поглавља баве се распрострањењем и диверзитетом цијанобактерија широм Републике Србије у различитим екосистемима (воденим и терестричним), а преостала се баве њиховим негативним ефектима, односно производњом цијанотоксина у воденим и терестричним екосистемима, као и начинима елиминисања или спречавања појаве цветања и производње цијанотоксина у воденим екосистемима. Резултати су приказани јасно и недвосмислено, без сувишних коментара. Табеле, графикони и слике јасно прате текст и омогућавају једноставан прелазак са текста на податке приказане кроз њих. Посебном значају резултата ове докторске дисертације доприноси до сада најсвеобухватнији приказ о заступљености и цветању цијанобактерија у Републици Србији, што представља јединствен и оригиналан допринос науци. Добијени резултати доказују мултидисциплинаран и веома широк и зрео приступ кандидаткиње задатој теми.

**ДИСКУСИЈА-** Дискусија је написана таксативно како би пратила добијене резултате, материјал и методе, као и преглед литературе. У дискусији су протумачени добијени резултати и упоређени са резултатима других истраживача на основу обимне обрађене литературе. За тумачење и поређење резултата коришћени су подаци раније добијени за територију Републике Србије, али и света, јер је у доступној литератури ограничен број сличних података за територију наше земље, што додатно доприноси значају ове дисертације. Такође, у сваком подпоглављу је наведен значај добијених резултата, а у подпоглављу дискусије "Превенција цветања цијанобактерија и штетног дејства њихових токсина" и "Елиминација цијанобактерија и цијанотоксина", дате су препоруке и смернице за смањење појаве цветања цијанобактерија и цијанотоксина и њихово уклањање из водених екосистема.

**ЗАКЉУЧЦИ-** Закључци су наведени таксативно како би одговорили на све постављене циљеве и сумирали све добијене резултате.

**ЛИТЕРАТУРА-** Литература је прецизно и уједначено сложена и приказана.

## **VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ**

1. Svirčev, Z., Drobac, D., **Tokodi, N.**, Vidović, M., Simeunović, J., Miladinov-Mikov, M., Baltić, V. (2013): Epidemiology of primary liver cancer in Serbia and possible connection with cyanobacterial blooms. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 31(3):181-200.

- (M21)
2. Svirčev, Z., Drobac, D., **Tokodi, N.**, Lužanin, Z., Munjas, A.M., Nikolin, B., Vuleta, D., Meriluoto, J. (2014): Epidemiology of cancers in Serbia and possible connection with cyanobacterial blooms. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 32(4):319-337. (M21)
  3. Svirčev, Z., Lujčić, J., Marinović, Z., Drobac, D., **Tokodi, N.**, Stojiljković, B., Meriluoto, J. (2015): Toxicopathology induced by microcystins and nodularin: A histopathological review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 33(2):125-167. (M21)
  4. Svirčev, Z., **Tokodi, N.**, Drobac, D., Codd, G.A. (2014): Cyanobacteria in aquatic ecosystems in Serbia: effects on water quality, human health and biodiversity. *Systematics and Biodiversity.* 12(3):261-270. (M22)
  5. Drobac, D., **Tokodi, N.**, Simeunović, J., Baltić, V., Stanić, D., Svirčev, Z. (2013): Human exposure to cyanotoxins and their health effects. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology.* 64(2):305-316. (M23)
  6. Drobac, D., Svirčev, Z., **Tokodi, N.**, Vidović, M., Baltić, V., Božić-Krstić, V., Lazić, D., Pavlica, T. (2011): Microcystins - potential risk factors in carcinogenesis of primary liver cancer in Serbia. *Geographica Pannonica.* 13(3):70-80. (M51)
  7. **Tokodi, N.**, Drobac, D., Svirčev, Z., Lazić, D. (2012): Cyanotoxins in Serbia and water treatment procedures for their elimination. *Geographica Pannonica.* 16(4):152-160. (M51)
  8. **Tokodi, N.**, Drobac, D., Simeunović, J., Svirčev, Z. (2014): Microcystin concentrations in fishpond waters. *J Nat Sci. Matica Srpska Novi Sad.* 127:35-42. (M51)
  9. **Tokodi, N.**, Drobac, D., Simeunović, J., Svirčev, Z. (2013): Assessment of acute cyanotoxicity using *Artemia salina* bioassay in water samples from fishponds. 17th International Eco-Conference, 10th Environmental protection of urban and suburban settlements. 25th- 28th September 2013, Novi Sad, Serbia. (M33)
  10. Drobac, D., **Tokodi, N.**, Dulić, T., Svirčev, Z. (2013): Nutritional aspects of *Daphnia* feeding with cyanobacteria. 17th International Eco-Conference, 10th Environmental protection of urban and suburban settlements. 25th- 28th September 2013, Novi Sad, Serbia. (M33)
  11. Drobac, D., **Tokodi, N.**, Pantelić, D., Krstić, K. (2011): The health risk assessment related to cyanotoxin exposure. 16th Academy of Studenica: Cyanobacteria and human health. Novi Sad, July 1-3. 2011. Abstract book: 13. (M34)
  12. Svirčev, Z., Baltić, V., Simeunović, J., **Tokodi, N.**, Drobac, D. (2011): Cyanotoxin Legislation. 16th Academy of Studenica: Cyanobacteria and human health. Novi Sad, July 1-3. 2011. Abstract book: 13. (M34)
  13. Svirčev, Z., Drobac, D., **Tokodi, N.**, Vidović, M., Simeunović, J., Miladinov-Mikov, M., Baltić, V. (2013): Epidemiology of primary liver cancer in Serbia and possible connection with cyanobacterial blooms. 14th EuCheMS International Conference on Chemistry and the Environment. ICCE 2013, Barcelona, June 25-28, 2013. Book of abstracts. (M34)

Таксативно навести називе радова, где и када су објављени. Прво навести најмање један рад објављен или прихваћен за објављивање у часопису са ISI листе односно са листе министарства надлежног за науку када су у питању друштвено-хуманистичке науке или радове који могу заменити овај услов до 01. јануара 2012. године. У случају радова прихваћених за објављивање, таксативно навести називе радова, где и када ће бити објављени и приложити потврду о томе.

## VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Докторска дисертација имала је за циљ да испита присуство токсичних цијанобактерија и њихових токсина у различитим екосистемима са територије Републике Србије и установи које су могуће негативне последице проузроковане од стране ових микроорганизама. На основу добијених резултата донесено је неколико закључака:

1. Формирана База података цијанобактерија у Србији прилаже велики број битних и корисних информација из преко 70 литературних извора о простирању и учесталости појаве цијанобактерија и њихових токсина у периоду од 130 година, као и њихових ефеката на живи свет у воденим екосистемима, али и шире. Истраживана су 64 водена екосистема где је најчешће цветало пет врста

цијанобактерија и то *Microcystis aeruginosa*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Planktothrix agardhii*, *Microcystis flos-aquae* и *Planktothrix rubescens*, чији ареал распрострањења се шири на територији Републике Србије. У бројним воденим телима детектовани су микроцистини и то у високим концентрацијама. Стога, неопходно је наставити са праћењем и уносом нових информација о овој појави у Базу података цијанобактерија у Србији ради боље процене стања и могућности предвиђања могућих проблема које цијанобактерије могу да проузрокују у будућности.

2. Истраживањима на примеру воденог екосистема Лудош са територије Републике Србије током 2011. и 2012. године потврђено је присуство цијанобактерија и њихових токсина у води и воденим организмима.

2.1. На основу резултата добијених током истраживања, као и на основу ранијих података може се рећи да је трофички статус језера Лудош најчешће еутрофан.

2.2. Цветање цијанобактерија у језеру Лудош континуирано је још од 1970. године, а резултати из докторске дисертације потврђују да су врсте *Limnothrix redekei* и *Pseudanabaena limnetica* нађене у сталном цветању.

2.3. Детектовано је присуство микроцистина/нодуларина и сакситоксина и води језера Лудош са највишим вредностима током летњег периода 2011. године.

2.4. Цијанотоксин MC-RR детектован је у ткивима водених биљака пореклом из језера Лудош узоркованих током пролећа 2012. године.

2.5. Рађена је анализе бабушке (*Carassius gibelio*) уловљене у језеру Лудош при чему је утврђена акумулација две варијанте микроцистина (MC-RR и MC-LR) у ткивима током 2011. и 2012. године, а хистолошким прегледом у 2011. години пронађене су и значајне промене на ткивима.

3. Тестирањем биолошких лесних покорица са територије Војводине нису детектовани микроцистини/нодуларини ПП1 есејем, нити токсичност узорака тестом токсичности *Artemia salina*. Претпоставља се да су концентрације цијанотоксина испод граница детекције или их нема у тестираним биолошким лесним покорицама. Развојем нових метода и оптимизацијом постојећих за детекцију цијанотоксина у биолошким лесним покорицама и другим терестричним екосистемима потребно је проверити добијене резултате.

4. Резултати о токсичности и присуству цијанотоксина добијени проучавањем 84 соја цијанобактерија из NSCCC који потичу из терестричних и водених екосистема указују на потенцијалну опасност појаве ових микроорганизама и њихових токсичних метаболита у различитим екосистемима са територије Републике Србије. Резултати теста храњења дафније послужили су као основ за даља истраживања превенције цветања.

4.1. Тест токсичности са рачићем *Artemia salina* рађен за 78 сојева показује да сојеви пореклом из водених и терестричних екосистема који се налазе у NSCCC могу да делују токсично.

4.2. Сојеви из NSCCC могу да продукују цијанотоксине (микроцистине, нодуларине или/и сакситоксине) што је потврђено ЕЛИСА тестовима који су рађени на 72 соја.

4.3. Могућност употребе рачића *Daphnia pulex* у превенцији цветања цијанобактерија испитивана је тестом храњења дафније сојевима из NSCCC. Закључено је да је велики број јединки дафнија (92,2%) користио је истраживане сојеве за исхрану, односно исхрана је била могућа са свим воденим и са скоро 90% терестричних сојева. Експериментално је потврђена акумулација микроцистина у рачићу *Daphnia pulex* због чега употреба овог организма у извођењу биолошких тестова за тестирање присуства цијанотоксина треба да се преиспита.

5. Комплекс рибњака са територије Републике Србије под шифром БО коришћен је за истраживање потенцијалног начина превенције појаве и цветања цијанобактерија уз помоћ правовременог уношења *Daphnia* sp.

5.1. На основу концентрације хлорофила *a* и трофичког статуса, анализе фитопланктона (цијанобактерија), токсичности воде и присуства цијанотоксина потврђено је смањење цветања цијанобактерија и других негативних ефеката у експерименталним језерима (где је дафнија била убачена) у односу на контролна (није било убацивања дафнија).

5.2. С обзиром на озбиљност појаве и могућих негативних последица по здравље људи, поступци елиминације ћелија цијанобактерија и њихових токсина треба да уђу у праксу при обради отпадних вода и пречишћавања воде из површинских акумулација у Републици Србији.

## **VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА**

Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.

Кандидаткиња је приказала и тумачила резултате у складу са правилима научно - истраживачког рада у домену хидробиологије. Показала је зрелост у анализи, приказивању и тумачењу резултата добијених применом савремених и стандардних метода, као и у извођењу закључака из добијених резултата, чиме заслужује позитивну оцену.

## **IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме

Докторска дисертација је написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе

Докторска дисертација садржи све битне елементе. Кандидаткиња је при изради дисертације показала висок степен познавања проблематике, урадила је обимни преглед литературе, добро је поставила хипотезе и циљеве рада, применила је адекватне и савремене методе истраживања и обраде резултата, које је јасно приказала, критички продискутовала и на основу тога је донела значајне закључке.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци

Дисертација представља оригиналан допринос науци јер је:

-Систематизација података о проблему цветања цијанобактерија и појави њихових токсина у виду Базе података цијанобактерија у Србији је до сада најсвеобухватнији приказ ове појаве и пионирски је на Балканском полуострву и као такав представља пример другим земљама у окружењу;

-Ограничен број доступних података о присуству и дејству цијанотоксина као и о њиховој акумулацији у ткивима водених биљака и животиња у екосистемима са територије Републике Србије, указује на велики допринос и значај резултата ове тезе који су добијени истраживањем воде, биљака и риба из језера Лудош;

- Детекција цијанотоксина у терестричним екосистемима, нарочито у биолошким лесним покорицама, недовољно је развијена методолошки, не само у Републици Србији него и у свету, због чега су први резултати анализа биолошких лесних покорица урађених у оквиру докторске дисертације веома корисни за будућа истраживања;

-Потврђено је присуство токсичности и цијанотоксина у цијанобактеријским сојевима из Новосадске колекције култура које потичу са територије Републике Србије;

-Предложена мера превенције и/или спречавања цветања цијанобактерија биоманипулацијом у виду правовременог уношења дафније које могу да користе у цијанобактерије исхрани има велики потенцијал у циљу побољшања квалитета воде многих водених екосистема широм Републике Србије, али и света.

4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања

Нису уочени недостаци у изради докторске дисертације.

**X ПРЕДЛОГ:**

На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:

На основу укупне оцене дисертације, увида у истраживачки рад кандидата и у сагласности са свим чињеницама изнетим у овом Извештају, Комисија предлаже да се докторска дисертација кандидаткиње Наде Токоди под насловом Токсичне цијанобактерије са територије Републике Србије, **прихвати и кандидату одобри одбрана.**

НАПОМЕНА: Члан комисије који не жели да потпише извештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извештај образложење односно разлоге због којих не жели да потпише извештај.

У Новом Саду, 2016. године

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

\_\_\_\_\_  
Др Зорица Свирчев,  
редовни професор, ПМФ, Универзитет у Новом Саду, ментор

\_\_\_\_\_  
Др Јелица Симеуновић,  
ванредни професор, ПМФ, Универзитет у Новом Саду, председник

\_\_\_\_\_  
Др Едита Стокић,  
редовни професор, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду, члан