

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА  
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

На I редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 14.10.2016. године, прихваћен је извештај ментора др Бранке Вуковић-Гачић и др Момира Пауновића о урађеној докторској дисертацији Маргарете Крачун-Коларевић, истраживача сарадника на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић” Универзитета у Београду, под насловом **„Примена акватичних олигохета (*Tubificidae*) у *in situ* и *ex situ* екогенотоксиколошким истраживањима”**, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Бранка Вуковић-Гачић, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, др Момир Пауновић, научни саветник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић”, Универзитет у Београду и др Зоран Гачић, научни саветник, Институт за мултидисциплинарна истраживања, Универзитет у Београду, Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

**ИЗВЕШТАЈ**

**Општи подаци о докторској дисертацији:**

Докторска дисертација Маргарете Крачун-Коларевић, под насловом **“Примена акватичних олигохета (*Tubificidae*) у *in situ* и *ex situ* екогенотоксиколошким истраживањима”**, обухвата 190 страна и садржи 8 поглавља: Увод (22 стране), Циљеви (2 страна), Материјал и методе (26 стране), Резултати (69 страна), Дискусија (21 страна), Закључци (3 стране), Литература (21 страна) и Прилог (22 стране). На почетку дисертације приложен је сажетак на српском и енглеском језику. Дисертација садржи: 45 табела и 43 слика. Поглавље литература садржи 189 библиографских јединица.

## Анализа докторске дисертације:

У докторској дисертацији кандидаткиња Маргарета Крачун-Коларевић је приказала различите аспекте примене акватичних олигохета (*Tubificidae*) у *in situ* и *ex situ* екогенотоксиколошким истраживањима. У поглављу **УВОД**, у оквиру шест подпоглавља дат је детаљан приказ савремених истраживања која се односе на различите категорије загађивача који могу представљати опасност по акватичне екосистеме. Међу загађивачима акватичних екосистема дата је је важност једној групи фармацеутика, цитостатицима који могу имати цитотоксични и генотоксични потенцијал. Посебна пажња је посвећена биомониторингу, акватичним олигохетама као биоиндикаторским организмима и оштећењу ДНК молекула као биомаркером.

У оквиру подглавља **ЦИЉЕВИ** кандидаткиња је поставила неколико циљева: процена квалитета воде на локалитетима Дубоко на Сави и Вишњица на Дунаву на основу микробиолошких и физичко-хемијски параметара; испитивање корелација између микробиолошких и физичко-хемијских параметара квалитета воде; утврђивање састава заједнице акватичних олигохета; оцена еколошког потенцијала на наведених локалитета на основу заједнице акватичних олигохета; успостављање лабораторијске културе *Branchiura sowerbyi* и *Limnodrilus udekemianus*; оптимизацију комет теста за примену на ћелијама целомске течности и крвног система олигохета из фамилије *Tubificidae*; одређивање базалног нивоа оштећења ДНК молекула врсте *B.sowerbyi* и *L. udekemianus*; испитивање осетљивости целоцоита и хемоцита изолованих из врсте *B. sowerbyi* и из мешовитог узорка акватичних олигохета (Mix узорак) у детекцији оштећења ДНК молекула у *in situ* условима; утврђивање корелације нивоа оштећења ДНК молекула са микробиолошким и физичко-хемијским параметрима квалитета воде у истраживањима *in situ*; утврђивање корелације нивоа оштећења ДНК молекула код врсте *B. sowerbyi* и мешовитог узорка са саставом заједнице олигохета; одређивање токсичног ефекта кадмијум хлорида, 5-флуороурацила и етопозидна на адулте *L. udekemianus* и целоцоите и хемоците исте врсте у истраживањима *ex situ*; одређивање ефекта кадмијум хлорида, 5-флуороурацила и етопозидна на ниво оштећења ДНК молекула целоцоита и хеммоцита *L. udekemianus* у истраживањима *ex situ*.

Поглавље **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** организовано је у четири потпоглавља. Дат је опис подручја и локалитета на којима је рађено *in situ* истраживање. Описани су поступци прикупљања и лабораторијске обраде узорака у циљу процене састава заједнице макроинвертебрата и оцене еколошког потенцијала на основу заједнице акватичних олигохета. За процену еколошког потенцијала водених екосистема од индекса који су развијени за групу макроинвертебрата коришћени су: разноврсност, Шенонов индекс диверзитета, сапробни индекс по методи Зелинка – Марван (1961), BMWP индекс и учешће фамилије Tubificidae у заједници макроинвертебрата. Описана је методологија узорковања целоцитата и хемочита, утврђивања вијабилности ћелија диференцијалним бојењем, као и методологија алкалног комет теста. Такође, описани су поступци успостављања лабораторијских култура и одржавања јединки у лабораторијским условима, као и поступци *ex situ* третамена. У статистичкој обради података коришћене су параметријске и непараметријске статистичке анализе (Колмогоров-Смирнов тест, Крушкар-Валис тест, Ман Витни У-тест, Студентов тест, Спирманова и Пирсонова корелација) у програму Statistica 6.0 (StatSoft, UK) и SPSS 20.0 (Inc., Chicago, IL, USA).

Поглавље **РЕЗУЛТАТИ** је организовано у 4 потпоглавља. У првом и другом потпоглављу су представљени резултати истраживања у оквиру *in situ* студија биомониторинга на локалитетима Дубоко и Вишњица. Утицај поплава које су погодиле сливе реке Саве током 2014. године је био евидентан на оба локалитета. На локалитету Дубоко, детектована је корелација водостаја са концентрацијом органских загађивача који се могу довести у везу са околним пољопривредним земљиштем као и са концентрацијом тешких метала карактеристичним за пепелишта термоелектране. На оба локалитета су микробиолошки индикатори фекалног загађења (*E. coli* и фекалне ентерококе) указали на константан утицај отпадних вода на квалитет воде који се најчешће кретао у оквиру III класе. На локалитету Дубоко на Сави током 2014. и 2015. године забележено је присуство истог броја таксона акватичних олигохета који се могу сврстати у седам родова, односно две фамилије, Tubificidae и Lumbriculidae. Већа разноврсност олигохетне фауне је забележена 2015. године када је детектовано присуство 11 врста, за разлику од 2014. године када је идентификовано девет врста. У узорцима Oligochaeta доминантна је била фамилија Tubificidae (заступљеност >90 %) са врстама *L. hoffmeisteri* и *L. claparedeanus*. На Дунаву, локалитет Вишњица се карактерисао већим диверзитетом олигохетне фауне него локалитет Дубоко. На овом локалитету је забележено присуство 17 врста које се могу сврстати у 11 родова из три фамилије, Naididae, Tubificidae и Enchytraidae. Као и у

Дубоком, и у Вишњици је удео фамилије Tubificidae био висок, скоро у свим узорцима >90 %, а доминантне врсте су *L. hoffmeisteri* и *L. claparedeanus*, праћене са *B. sowerbyi*, *T. tubifex* и *L. udekemianus*. На основу коришћених индекса, оба локалитета се карактеришу лошим/врло лошим еколошким потенцијалом.

На оба локалитета је забележено варирање у нивоу оштећења ДНК у проучаваним врстама олигохета током различитих месеци у години али је одговор код различитих врста имао сличан тренд. На локалитету Дубоко, забележена је позитивна корелација нивоа оштећења ДНК молекула са микробиолошким индикаторима фекалног загађења, раствореним кисеоником и концентрацијом хлорида, као и негативна корелација са концентрацијом раствореног олова, калијума и цинка у води, UV-екстинкцијом и хемијском потрошњом кисеоника. На локалитету Вишњица, детектована је позитивна корелација ДНК оштећења са концентрацијом гвожђа и алуминијума. Осим поменутих значајних корелација, битно је нагласити да су на овом локалитету и концентрације цинка, бакра, хрома, кадмијум и никла у води биле изнад границе препоручених вредности.

Диверзитет олигохетне фауне се није мењао са променом притисака (поплаве, испуштање отпадних вода, спирање земљишта), те се може рећи да у овом случају стресори нису утицали на разноврсност њихових популација, с друге стране евидентан је утицај стресора на оштећење ДНК молекула.

У трећем потпоглављу дати су резултати корелација између састава заједнице акватичних Oligochaeta и нивоа оштећења ДНК молекула код врсте *B. sowerbyi* и Mix узорака на локалитетима Дубоко и Вишњица. Уочена је позитивна корелација између параметра TI *B. sowerbyi* и TI Mix.

У четвртном потпоглављу приказани су резултати *in vivo* третмана врсте *L. udekemianus* у оквиру *ex situ* биомониторинга. Детектован је генотоксични потенцијал 5-флуороурацила, етопозида, као и модел мутагена кадмијум хлорида.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** кандидаткиња компетентно дискутује добијене резултате поредећи их са подацима других аутора. Дискусија је груписана у два потпоглавља. Прво потпоглавље је посвећено резултатима *in situ* истраживања. У овом потпоглављу кандидаткиња се бави стресорима присутним на локалитетима Дубоко и Вишњица са акцентом на специфичне хидролошке промене које су се дешавале током 2014. и 2015 године. На основу заједница олигохета дата је оцена еколошког потенцијала локалитета. Одабране врсте акватичних олигохета су показале одговор на присуство

генотоксичног загађења у животној средини који се може детектовати и квантификовати применом алкалног комет теста, при чему је примећен сличан тренд у одговору код испитиваних група. Дискутована је веза између нивоа оштећења ДНК молекула и микробиолошких и физичко-хемијских параметара одређиваних на испитиваним локалитетима.

Друго потпоглавље је посвећено генотоксичном ефекту тестирани цитостатика, 5-флуороурацила и етопозиде, и модел мутагена кадмијум хлорида на врсти *L. udekemianus* у истраживању *ex situ*. Добијени ефекти су дискутовани са аспекта молекуларног механизма деловања тестираних супстанци и њихове концентрације у акватичним екосистемима. Поред тога, направљена је компарација осетљивости црва са подацима из савремене литературе о осетљивости других акватичних организама.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ**, кандидаткиња сумира добијене резултате из докторске дисертације. Изводи закључке на основу резултата добијених у истраживањима *in situ* о утицају стресора присутних на проучаваним локалитетима на 1. оцену еколошког потенцијала базираних на заједници акватичних олигохета, и 2. ниво оштећења ДНК молекула проучаваних врста. Изведени су закључци и на основу резултата *ex situ* истраживања који се односе на ефекат кадмијум хлорида као модел мутагена и детектоване ефекте проучаваних цитостатика у *in vivo* третманима. Генерални закључак донесен на основу свих резултата презентованих у дисертацији, кандидаткиња сумира да акватичне олигохете могу бити поуздани биоиндикаторски организми у процени стреса и да примена комет теста на проучаваним врстама представља значајан експериментални систем у екогенотоксиколошкој студији акватичних екосистема.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи 189 библиографских јединица. Литературни извори су адекватно и на одговарајућим местима цитирани у тексту докторске дисертације.

У поглављу **ПРИЛОГ** приказани су подаци анализа физичко-хемијских параметара који су преузети од Агенције за заштиту животне средине, Министарство пољопривреде и заштите животне средине, Републике Србије, као и број анализираних индивидуа, нуклеоида и преживљавање ћелија врсте *B. sowerbyi* и мешовитов узорка акватичних олигохета на локалитетима Дубоко, током 2014. и 2015. године, и Вишњица, током 2014. године.

Истраживања обухваћена у овој докторској дисертацији урађена су у оквиру једног националног и три међународна пројекта. Добијени резултати, приказани у докторској дисертацији, као и они који ту нису укључени, штампани су у 2 рада у истакнутим међународним часописима категорије М21 и М22, што указује на добар приступ у екотоксиколошким истраживањима.

### **Радови и конгресна саопштења који чине део докторске дисертације:**

#### Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **М21** Aborgiba, M., Kostić, J., Kolarević, S., **Kračun-Kolarević, M.**, Elbahi, S., Knežević-Vukčević, J., Lenhardt, M., Paunović, M., Gačić, Z., Vuković-Gačić, B. (2015). Flooding modifies the genotoxic effects of pollution on a worm, a mussel and two fish species from the Sava River. *Science of The Total Environment*. 540, 258-367. (ИФ 4,099)  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25861862>
3. **М22** **Kračun-Kolarević, M.**, Kolarević, S., Atanacković, A., Marković, V., Gačić, Z., Paunović, M., Vuković-Gačić, B. (2015). Effects of 5-Fluorouracil, Etoposide and CdCl<sub>2</sub> in Aquatic Oligochaeta *Limnodrilus udekemianus* Claparede (Tubificidae) Measured by Comet Assay. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226, 1-9. (ИФ 1,554)  
<http://link.springer.com/article/10.1007/s11270-015-2511-6>

#### Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **М34** **Kračun, M.**, Kolarević, S., Atanacković, A., Marković, V., Gačić, Z., Paunović, M., Vuković-Gačić, B. (2013) Effects of 5-Fluorouracil and CdCl<sub>2</sub> in freshwater oligochete *Limnodrilus udekimianus claperede* (Tubificidae) measured by comet assay. *Pharmaceuticals in the environment: Is there a problem?*, Nimes, France, Book of abstracts, 63.

2. **M34** **Kračun-Kolarević, M.**, Kolarević, S., Atanacković, A., Kostić, J., Gačić, Z., Paunović, M., Vuković-Gačić, B. (2014) Detection of genotoxicity *in situ* in freshwater worm *Branchiura sowerbyi* Beddard, 1982 (Oligocheta: Tubificidae). V Congress of the Serbian Genetic Society, Belgrade, Serbia. Book of abstracts 143.
  
3. **M34** **Kračun-Kolarević, M.**, Atanacković, A., Ilić, M., Marković, V., Kolarević, S., Gačić, Z., Paunović, M., Vuković-Gačić, B. (2014) Usage of freshwater worms (*Limnodrilus udekemianus* Claparede) for detection of genotoxic effects of 5-fluorouracile, etoposide and cisplatin. The Central & Eastern Europe Conference on Health and the Environment, Cluj – Napoca, Romania, Book of abstracts 46-47.
  
4. **M34** **Kračun-Kolarević M.**, Kolarević S., Atanacković A., Kostić J., Gačić Z., Paunović M., Vuković-Gačić B. (2014). *In situ* assessment of DNA damage in *Branchiura sowerbyi* Beddard, 1892 (Oligochaeta: Tubificidae) from the Sava River using comet assay, Pharmaceuticals in wastewaters and surface waters under multistressors situation: Fate, Adverse effects, Risk and Removal Technologies, Barcelona, Spain, Book of abstracts, p. 61.

Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **M63** **Kračun, M.**, Ilić, M., Tomović, J., Atanacković, A., Zorić, K., Vasiljević, B., Tubić, B., Marković, V., Paunović, M., (2013). Ocena stanja manjih vodotoka i kanala na teritoriji grada Beograda na osnovu zajednice makrobeskičmenjaka. The 42nd Annual Conference of the Serbian Water Pollution Control Society „Water 2013“, Perućac, Serbia, Proceedings, 53-58.

## Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација Маргарете Крачун-Коларевић, под насловом „Примена акватичних олигохета (*Tubificidae*) у *in situ* и *ex situ* екогенотоксиколошким истраживањима” представља свестрано и савремено урађену студију из области екогенотоксикологије.

По свом обиму, садржају, оригиналности резултата, начину њиховог представљања и интерпретацији, уз осврт на обимну и релевантну литературу, поднети текст има све одлике докторске дисертације. Кандидаткиња је на примерен начин представила истраживачку област у којој је радила и резултате до којих је дошала. Треба истаћи да је кандидаткиња, на основу резултата сопствених вишегодишњих истраживања и прегледа веома обимне литературе, формулисао правце даљих истраживања који су, судећи по савременим литературним подацима, веома перспективни.

Комисија сматра да докторска дисертација Маргарете Крачун-Коларевић по свом приступу и интерпретираним резултатима представља значајан допринос у познавању акватичних олигохета као биоиндикаторских организама. Поред одговора на постављене непосредне циљеве истраживања, добијени резултати представљају основу за будућа мултидисциплинарна истраживања, уз сарадњу са иностраним експертима, тимовима и институцијама.

Комисија са посебним задовољством истиче да је кандидаткиња до сада, из резултата који представљају део докторске дисертације, публиковала 2 рада у истакнутим међународним часописима од чега један у категорији M21 и један у категорији M22 и да је на једном од два рада први аутор. У припреми су још два рада из области докторске дисертације. Такође, учествовала је четири саопштења на међународним научним скуповима и једном на скупу од домаћег значаја.

Маргарете Крачун-Коларевић је у току израде докторске дисертације добро оспособљена за самосталан научни рад, што се може закључити на основу увида у досадашње научне активности, као и публикованих резултата у истакнутим научним часописима.



На основу свега изложеног, комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитиван Извештај и одобри јавну одбрану ове докторске дисертације.

Београд, 23. XI 2016.

Комисија:

---

др Бранка Вуковић-Гачић,  
ментор, редовни професор,  
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

---

др Момир Пауновић,  
ментор, научни саветник,  
Институт за биолошка истраживања „Синиша  
Станковић”, Универзитет у Београду

---

др Зоран Гачић,  
члан комисије, научни саветник,  
Институт за мултидисциплинарна истраживања,  
Универзитет у Београду