

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На IV редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 20.01.2017. године, прихваћен је извештај ментора др Иване Живић о урађеној докторској дисертацији **Катарине З. Стојановић**, истраживача сарадника, Универзитет у Београду – Биолошки факултет, под насловом "**Утицај пастрмских рибака на заједнице макрозообентоса текућица са посебним освртом на ларве рода *Baetis* (Ephemeroptera, Insecta)**" и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Ивана Живић, ванредни професор Универзитет у Београду – Биолошки факултет, др Јасмина Крпо-Ћетковић, ванредни професор Универзитет у Београду – Биолошки факултет, и др Зоран Марковић, редовни професор, Универзитет у Београду – Пољопривредни факултет. Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију Катарине Стојановић и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Катарине Стојановић** под насловом "**Утицај пастрмских рибака на заједнице макрозообентоса текућица са посебним освртом на ларве рода *Baetis* (Ephemeroptera, Insecta)**" је написана према Упутствима за обликовање докторске дисертације Универзитета у Београду. Дисертација обухвата уобичајена поглавља, у оквиру којих су на одговарајућим местима приказане табеле и илустрације. На крају је наведена листа литературних навода који су цитирани у оквиру дисертације. Дисертација је написана на 375 нумерисаних страна. Садржи 55 табела, 77 слика, 325 литературна навода и 4 прилога.

Анализа докторске дисертације:

У својој докторској дисертацији кандидат **Катарина Стојановић** је приказала резултате истраживања утицаја испусних вода 9 пастрмских рибака на заједнице макрозообентоса са 50 локалитета из 9 река (Рашка, Расина, Радованска река, Врла, Црница, Трешњица, Студеница, Рача и Млава), са посебним акцентом на морфолошко-молекуларну анализу ларви рода *Baetis* (Ephemeroptera, Insecta). Истраживања су реализована од априла 2011. до маја 2012. године на свака два месеца (осим реке Трешњице где су узорци зообентоса прикупљени у периоду од децембра 2003. до октобра 2004. године, у двомесечним интервалима).

У поглављу **УВОД**, кандидаткиња указује на чињеницу да су водени екосистеми свакодневно изложени различитим типовима загађења који ремете како изглед самих екосистема тако и састав и структуру заједница акватичних организама. Од свих водених организама који се користе у биомониторингу копнених вода, организми макрозообентоса су најпоузданији у оцени квалитета вода текућица, на шта кандидаткиња јасно указује у уводном делу докторске дисертације истичући читав низ биолошких предности. Посебно ставља акценат на примену ових организама у процени квалитета воде на нивоу биомаркера, праћењем активности ензима антиоксидативног стреса. Такође, детаљно описује ефекат утицаја пастрмских рибака на реципијент и даје преглед литературе о праћењу ефеката кроз хемијски и биолошки мониторинг. У посебном одељку увода, приказане су опште карактеристике реда Ephemeroptera, као и најразноврсније фамилије у

оквиру овог реда, фамилије Baetidae, са посебним акцентом на опште одлике адулта и ларви рода *Baetis*. Кандитакиња у уводном делу указује на то да је због присуства великог броја различитих филогенетских линија, класификација овог рода на подродове врло компликована и да примена молекуларних метода у таксономској карактеризацији врста рода *Baetis* има велики значај.

У оквиру поглавља **ЦИЉЕВИ РАДА**, као основне задатке тезе кандидаткиња наводи анализу интензитета утицаја пастрмских рибњака на реципијент, сагледавање квалитета воде истраживаних текућица коришћењем организама макрозообентоса као биоиндикатора кроз анализу метричких особина заједница и праћењем нивоа ензима антиоксидативног стреса, затим утврђивање фаунистичког састава и диверзитета макрозообентоса у истраживаним текућицама, са акцентом на идентификацију нових таксона за ентомофауну Србије, као и морфолошко-молекуларну анализу ларви рода *Baetis* и израду дескриптивног таксономског кључа за овај род.

У поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** описане су опште карактеристике истраживаних подручја са описом локалитета и пастрмских рибњака. Локалитети на којима је вршено узорковање макрозообентоса одабрани су у односу на положаје пастрмских рибњака на рекама, тако да су 1 или 2 локалитета контролна (лоцирана узводно од рибњака), а преостали се налазе низводно од испусне воде рибњака. Одабир рибњака извршен је на основу њихових производних капацитета и величине реципијента. У истом делу дат је приказ коришћених инструмената и метода за:

а) анализу физичких параметара воде: температура воде мерена је помоћу РСЕ-PHD уређаја, дубина и ширина речног корита коришћењем метра, брзина тока одређивана је брзинометром марке GEOPACKS Stream Flowmeter, проток воде рачунским путем, док су надморска висина, географска ширина и дужина измерени помоћу GPS уређаја.

б) анализу хемијских параметара воде: директно на терену, помоћу преносног РСЕ-PHD уређаја одређивани су количина раствореног кисеоника, рН вредност и електропроводљивост воде, док су у узорцима воде за лабораторијску анализу одређиване концентрације анјона: сулфата (SO_4^{2-}), нитрата (NO_3^-) и хлорида (Cl^-) употребом јонског хроматографа DIONEX 4000i, коришћењем ЕРА метода; укупни фосфор (P_t) и ортофосфати (PO_4^{3-}) анализирани су у складу са АРНА протоколима методом 4500-Р Е; јонизована фракција амонијака (NH_4^+) извршена је применом методе P-V-2/B, а његова нејонизована фракција (NH_3) према методи по Newman-у (1995)¹; тврдоћа воде је утврђена применом ЕРА 130.2 метода.

в) узорковање узорка за биолошку (квантитативне методе сакупљања макрозообентоса на терену, раздвајања материјала и идентификација организама), **еколошку** (индекс диверзитета, индекс доминантности, сапробни индекс, биотички индекси, трофички индекси, индекси засновани на ЕРТ заједницама и RIZI индекс) и **статистичку анализу података** (статистичка поређења вредности физичких и хемијских параметара, као и коришћених индекса заједница макрозообентоса између локалитета, извршено је применом упареног или неупареног т-теста са степеном значајности од $P < 0,05$, помоћу Sigma Plot 11 софтвера; анализа главних компоненти (PCA) помоћу XLSTAT програма, верзија 7.5.2. Addinsoft; Шенонов индекс диверзитета и Симпсонов индекс доминантности помоћу програма BioDiversity professional).

¹ Newman, M. C. (1995). Quantitative Methods in Aquatic Ecotoxicology. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 426 pp.

г) **одређивање активности ензима антиоксидативног стреса:** активност SOD-а вршена је по методи Misra & Fridovich (1972)², а активности CAT-а по методи Beutler-а (1982)³.

д) **морфолошку** (дисекција усног апарата, тергита, екстремитета и парепрокта на којима се налазе 13 праћених меристичких карактера и израда микроскопских препарата према методи Namiotko *et al.* (2011)⁴) и **молекуларну анализу** (екстракција DNK и PCR амплификација баркодинг региона субјединице 1 цитохром оксидазе митохондријалне DNK (COI mtDNK) и секвенцирање) **ларви рода *Baetis***.

У одељку **РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА** подаци су презентовани у неколико логично организованих целина. Детаљна анализа резултата добијених уз примену одговарајуће статистичке обраде представљена је основним текстом који је на адекватан начин допуњен јасно приказаним сликама и табелама. Тиме је омогућено лако праћење редоследа представљања резултата истраживања. Резултати су тумачени, дискутовани и поређени међусобно, као и са подацима из литературе.

Прво потпоглавље се односи на **фаунистички приказ заједница макрзообентоса на локалитетима истраживаних текућица**, који је дат кроз анализу квалитативног и квантитативног састава заједница. Укупно је на свим узоркованим текућицама идентификовано 368 таксона прикупљених методом квантитативног узорковања, од којих је 258 детерминисано до нивоа врсте, 13 до нивоа групе врста, 95 до нивоа рода. Највећи диверзитет макроинвертебрата забележен је на реци Расини (190 таксона), затим Рачи (177), Радованској реци (175), Црници (163), Студеници (154) и Врли (145). Нешто мањи број је регистрован на Трешњици (129) и Млави (119), док је најмањи број таксона пронађен на реци Рашкој (107). Кандидаткиња констатује велику разноврсност заједнице фауне дна истраживаних река и потврђује резултате ранијих истраживања, тј. да су ларве водених инсеката најразноврсније у брдско-планинским текућицама (Chironomidae 102 таксона од тога 71 врста, Trichoptera – 43 врсте, Ephemeroptera – 32 врсте, Plecoptera – 26 врста...). У току реализованих истраживања, забележено је 7 нових таксона водених инсеката за фауну Србије: из реда Ephemeroptera род *Rhithrogena* са врстама *R. cf. hercynia* са река Студенице и Врле, *R. cf. savoiensis* са реке Студенице и *R. cf. braaschi* са Раче и Радованске реке; врста *Symbiocladius rhithrogenae* (Diptera, Chironomidae) из реке Раче, која паразитира представнике водених цветова из рода *Rhithrogena*. Међу новим регистрованим таксонима издвајају се још и акватична врста опнокрилаца *Agriotypus armatus* (Hymenoptera, Ichneumonidae), као и ларве трихoptера *Ithytrichia lamellaris* (Hydroptilidae) и *Ecclisopteryx cf. keroveci* (Limnephilidae).

У следећем потпоглављу кандидаткиња се бави анализом вредности абиотичких и биотичких фактора и интезитета утицаја пастрмских рибака на њих. Када је реч о **абиотичким параметрима**, једна од широко прихваћених мера утицаја рибака на реципијент јесте однос продукције рибака у тонама према протоку воде у сушном делу године, P_r/Q_{\min} . Опсег утицаја рибака на реципијенте изузетно је велики, с обзиром на то да продукција рибака по протоку у сушном периоду варира од 25 t/ ms^{-1} у реци Студеници до 422 t/ ms^{-1} у Радованској реци.

² Misra, H. P., Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 247: 3170–3175.

³ Beutler, E. (1982). Catalase. In: Beutler, E. (ed) *Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods*. 3rd ed. Grune and Stratton, New York. pp: 105-106

⁴ Namiotko, T., Danielopol, D.L., Baltanas, A. (2011). Soft-body morphology, dissection and slide-preparation of Ostracoda: a primer. *Joannea Geologie und Paläontologie* 11: 327-343.

Извршена је квалитативна анализа абиотичких фактора која је представљена бројем река у којима је дошло до статистички значајне промене одговарајућег абиотичког параметра између контролног локалитета и локалитета непосредно низводно од рибњака. Квантитативне анализе, представљене РСА анализом амплитуде промене одговарајућег фактора између ова два локалитета, дале су идентичне резултате у односу на абиотичке факторе који се највише мењају под дејством рибњака. Квантитативна и квалитативна анализа су показале да су најосетљивији параметри (који су се мењали под утицајем рибњака) **нагомилавање муља** у подлози, до којег долази у седам од осам река, и **пораст концентрације недисосованог амонијака**, до којег долази у седам од девет текућица обухваћених истраживањем. Потом следе **пораст концентрације NH_4^+** и **пад концентрације раствореног кисеоника**, који се дешавају у пет од девет река, затим **пораст рН** и **концентрације ортофосфата**, у 3 од 9 река, и **пораст температуре воде** и **укупних фосфата**, у две од девет текућица. Баш као и у односу на осетљивост појединих параметара, квалитативном и квантитативном анализом добијени су усаглашени резултати и у односу на јачину ефекта сваког од рибњака на читав комплекс измерених абиотичких фактора. Тако се, у односу на интензитет ефекта, сви пастрмски рибњаци на истраживаним текућицама могу поређати у следећем опадајућем низу: Радованска река > Млава > Црница = Рашка > Трешњица > Рача = Студеница > Расина > Врла, који готово у потпуности одговара њиховом распореду на основу вредности P_r/Q_{\min} .

У потпоглављу у коме су приказани резултати **биотичких анализа** (метричких особине заједница макрозообентоса), кандидаткиња описује састав и структуру заједница макроинвертебрата помоћу 46 различитих параметара: 12 индекса диверзитета, 5 биотичких индекса, 5 ЕРТ заснованих индекса, 9 трофичких индекса, 11 таксономских индекса (престављених релативним бројностима основних таксономских група макроинвертебрата), укупне бројности макроинвертебрата, индекса сапробности по методи Zelinka & Margana и RIZI индекса. Као и у случају абиотичких фактора, осетљивост коришћених биотичких параметара процењена је квалитативно и квантитативно РСА анализом амплитуде промене одговарајућег фактора између контролног локалитета и локалитета непосредно низводно од рибњака. Обе анализе су дале веома сличне резултате, издвајајући релативну бројност и диверзитет породице Chironomidae и индексе који указују на степен сапробности (Zelinka, FBI и MASPTar) као најосетљивије на дејство рибњака. Што се тиче утицаја рибњака на састав и структуру заједница макрозообентоса у целини, квантитативна анализа је показала да, као и у случају абиотичких фактора, она блиско прати очекивани тренд на основу вредности P_r/Q_{\min} , са значајним изузетком реке Млаве коју карактерише најмања амплитуда промене биотичких фактора, иако је по амплитуди промена абиотичких фактора и вредности P_r/Q_{\min} одмах из Радованске реке (ово одступање је последица специфичног састава изворске заједнице макроинвертебрата на контролном локалитету у реци Млави). Кандидаткиња указује на то да је, имајући у виду сличне резултате квантитативне анализе промена абиотичких и биотичких фактора под дејством рибњака у већини испитиваних водотокова, ко-инерциона анализа потврдила да абиотички фактори који су показали највећу осетљивост на ефекте рибњака истовремено имају и највећи утицај на промене у саставу и структури заједница макроинвертебрата низводно од рибњака.

У потпоглављу у коме су представљени резултати утицаја пастрмских рибњака на антиоксидативну одбрану ларви *Dinocras megacephala*, праћена је активност два главна ензима антиоксидативне одбране, супероксид дисмутазе (SOD) и каталазе (CAT), као биомаркера за процену и праћење загађења под утицајем пастрмског рибњака у реци Рашкој. Утицај пастрмског рибњака огледа се кроз значајан пораст активности супероксид дисмутазе (SOD) на локалитетима испод рибњака у поређењу са првим контролним локалитетом ($R\check{S}1$; $F=10,13$; $p<0,005$). Исти тренд је примећен и у случају

активности ензима каталазе (САТ) ($F = 14,92$; $p < 0,005$), где органско оптерећење пореклом са пастрмског рибака евидентно индукује оксидативни стрес код ларви *D. megacephala*. То се манифестује кроз пораст активности САТ ензима на првом локалитету низводно од рибака (RŠ3), у поређењу са два контролна локалитета (RŠ1 и RŠ2).

У **другој целини** кандидаткиња, у оквиру посебних потпоглавља, приказује и дискутује резултате добијене на основу морфолошке и молекуларне анализе ларви рода *Baetis*.

Морфолошким анализама потврђено је присуство седам врста из девет текућица, унутар три подрода: *Baetis (Baetis) alpinus (alpinus група врста)*, *Baetis (Baetis) melanonyx (alpinus група врста)*, *Baetis (Baetis) scambus (fuscatus група врста)*, *Baetis (Baetis) lutheri (lutheri група врста)*, *Baetis (Baetis) vernus (vernus група врста)*, *Baetis (Nigrobaetis) muticus (gracilis група врста)* и *Baetis (Rhodobaetis) rhodani (rhodani група врста)*. За наведене врсте, кандидаткиња даје оригиналне фотографије (засноване на самостално урађеним микроскопским препаратима) 13 битних морфолошких (меристичких) карактера који су дискриминативни за идентификацију ларви рода *Baetis*. Детаљан опис, дат за сваку врсту, први је дескриптивни таксономски кључ на српском језику, не само за род *Baetis* већ и за целокупну фауну дна река на подручју Србије.

У потпоглављу у коме су представљени резултати молекуларних анализа умножавањем баркодинг региона митохондријалне ДНК екстраховане из 11 ларви (које су на основу морфолошких карактера детерминисане као: *Baetis alpinus*, *B. cf. vernus*, *B. lutheri*, *B. fuscatus* група и *B. melanonyx*) и поређењем са референтним секвенцама из светских база података, потврђен је статус врста *B. alpinus*, *B. lutheri* и *B. melanonyx*. Представници из *fuscatus* и *vernus* групе прво су детерминисани до нивоа група врста. Након детаљније морфолошке анализе, кроз серију препарата, као и молекуларном карактеризацијом баркодинг региона, потврђено је да се ради о врстама *B. scambus (fuscatus група)* и *B. vernus (vernus група)*.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ**, кандидаткиња сумира добијене резултате у виду закључака, при чему су истакнуте основне информације о утицају хладноводних пастрмских рибака на заједнице макрзообентоса, квалитету воде на основу њих и увођењу биомаркера (ензима анитиоксидативног стреса) у биомониторинг копнених вода на подручју Србије. Такође, кандидаткиња указује на неопходност примене методе ДНК баркодинга, поред таксономских анализа, у опису криптичких таксона какав је род *Baetis*.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи 325 библиографске јединице које се односе на области од значаја за урађену дисертацију и које објашњавају и/или потврђују добијене резултате, а које су адекватно и на одговарајућим местима цитиране у тексту докторске дисертације.

У поглављу **ПРИЛОЗИ** приказани су средњи месечни водостаји текућица на којима је вршено узорковање, фотографије локалитета, фотографије техника узорковања организама макрзообентоса на терену и употребљене опреме, као и збирни приказ идентификованих таксона.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Mirčić, D., **Stojanović, K.**, Živić, I., Todorović, D., Stojanović, D., Dolićanin, Z., Perić-Mataruga, V. (2016). Effects of the trout farm on *Dinocras megacephala* larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(7): 1775-1782. **M21**
2. **Stojanović, K.**, Živić, I., Karan-Žnidaršič, T., Živić, M., Žunić, M., Simić, V., Marković, Z. (2015). *Ithytrichia* Eaton, 1873 (Hydroptilidae: Trichoptera): A genus new for the entomofauna of Serbia. *Entomological News*, 125(1): 52-62. **M23**
3. **Bjelanović, K.**, Živić, I., Petrović, A., Đorđević, J., Marković, Z., Žikić, V. (2014). *Agriotypus armatus* Curtis, 1832, a parasitoid of *Silo pallipes* Fabricius, 1781: the first record for the Balkan Peninsula. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 414, 05: 1-9. **M23**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Stojanović, K.**, Karan-Žnidaršič, T, Božanić, M., Novaković, B., Perić, A., Živić, M., Živić, I. (2016). Influence of land-based trout farms on stonefly (Insecta: Plecoptera) larvae assemblage. 5th Congress of ecologists of the Republic of Macedonia with International Participation, October 19-22, 2016, Ohrid, Macedonia. Book of Abstracts: 131. **M34**
2. Žunić, M., **Stojanović, K.**, Marković, Z, Novaković, B., Bojić, D., Živić, I. (2015). Water quality assessment of the Vrla River based on BMWP Score. Proceedings of the 5th Aquatic Biodiversity International Conference, October 7-10, 2015, Sibiu, Romania. Book of Abstracts: 10. **M34**
3. **Bjelanović, K.**, Živić, I., Stojanović, D., Todorović, D., Mirčić, D., Mrkonja, A., Perić-Mataruga, V. (2014). Trout farm effect on antioxidative defense in *Dinocras megacephala* (Plecoptera: Perlidae) larvae. 1st Central European Symposium for Aquatic Macroinvertebrate Research (CESAMIR), April 10-13, 2014, Szarvas, Hungary. Book of Abstracts, 33-34. **M34**
4. Žunić, M., **Bjelanović, K.**, Đuknić, J., Novaković, B., Stojanović, D., Živić, I. (2014). Diversity of stoneflies larvae (Plecoptera) in Serbian streams and brooks. 1st Central European Symposium for Aquatic Macroinvertebrate Research (CESAMIR), April 10-13, 2014, Szarvas, Hungary. Book of Abstracts: 81-82. **M34**
5. **Bjelanović, K.**, Živić, I., Dulić, Z., Živić, M., Đorđević, J., Marinković, S., Marković, Z. (2013). Water quality assessment in the Raška river based on zoobenthos and zooplankton organisms as bioindicators. Conference proceedings VI International conference "Water & Fish", Faculty of Agriculture, University of Belgrade – Serbia, June 12-14, 2013, Belgrade, Serbia. Proceedings: 349-357. **M33**
6. Živić, I., **Bjelanović, K.**, Marinković, S., Jovanović, J., Marković, Z. (2013). Production of macrozoobenthos in the Rača River upstream and downstream from trout farm. Conference proceedings VI International conference "Water & Fish", Faculty of Agriculture, University of Belgrade – Serbia, June 12-14. 2013, Belgrade, Serbia. Proceedings: 364-371. **M33**

Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација **Катарине Стојановић** под насловом: **"Утицај пастрмских рибњака на заједнице макрзообентоса текућица са посебним освртом на ларве рода *Baetis* (Ephemeroptera, Insecta)"** по својој обимности, тематици која се обрађује, избору методологије и начину на који се добијени резултати износе и анализирају представља веома озбиљан самостални рад. Резултати до којих је кандидат дошао представљају значајан допринос познавању фауне слатких вода, као и самих водених екосистема на нашим просторима.

Катарина Стојановић је на адекватан начин представила истраживачку област у којој је радила и резултате до којих је дошла, испитујући утицај хладноводних рибњака на заједнице макрзообентоса, у циљу добијања информација о потенцијалној угрожености брдско-планинских текућица. Добијени резултати истичу да је за таксономску карактеризацију многих група акватичних инсеката, посебно на стадијуму ларве, поред коришћења дефинисаних морфолошких карактера од великог значаја укључити и методу ДНК баркодинга, чиме се може сагледати постојање потенцијалних криптичких таксона, што се и показало код врста рода *Baetis*. Самосталност у планирању и теренској реализацији истраживања, као и у тумачењу и критичком разматрању резултата које је кандидаткиња у раду показала, говоре о добром познавању научне области којој обрађена проблематика припада.

На основу свега изложеног, имајући у виду добијене резултате, њихову интерпретацију и закључке, комисија је сагласна у мишљењу да се рад позитивно оцени и са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитиван Извештај комисије и одобри јавну одбрану ове докторске дисертације.

У Београду, 06.02.2017. године

КОМИСИЈА:

др Ивана Живић, ванредни професор,
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

др Јасмина Крпо-Ћетковић, ванредни професор,
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

др Зоран Марковић, редовни професор,
Универзитет у Београду – Пољопривредни факултет