

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА

ПРЕДМЕТ: Извештај комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидаткиње Александре Н. Жерађанин, мастер биохемичара

На редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Хемијског факултета, одржаној 12.09.2019. године, одређени смо у Комисију за оцену и одбрану докторске дисертације (одлука бр. 871/2) кандидаткиње **Александре Н. Жерађанин**, мастер биохемичара, под називом:

„Биохемијска карактеризација бактерија изолованих из нафтом загађених локалитета и њихова примена за биоремедијацију и производњу егзополисахарида”

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је на својој седници одржаној дана 31. 10. 2019. године, на захтев Хемијског факултета, дало сагласност на предлог теме докторске дисертације (евиденциони број 61206-4172/2-19). Комисија је докторску дисертацију прегледала и подноси Наставно-научном већу Хемијског факултета следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација Александре Н. Жерађанин (рођене Ђурић) написана је на 109 страна А4 формата (фонт Times New Roman; величина 12 pt, проред 1, маргине 2 cm) и садржи 41 слику и 15 табела. Рад обухвата следећа поглавља: Увод (3 стране), Преглед литературе (37 страна), Материјал и методе (16 страна), Резултати и дискусија (35 страна), Закључак (5 страна) и Литература (13 страна). Поред наведеног дисертација садржи

Захвалницу, Сажетак на српском и енглеском језику (по 2 стране), Садржај (4 стране), Листу скраћеница (2 стране), Биографију кандидата (1 страна), Списак објављених и саопштених радова проистеклих из дисертације и списак осталих радова (2 стране), Изјаву о ауторству (1 страна), Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада (1 страна) и Изјаву о коришћењу (2 стране).

У **УВОДУ** су образложени предмет и циљ истраживања ове докторске тезе, истакнут значај микроорганизама изолованих из загађеног земљишта, за поступке биоремедијације и производњу егзополисахарида.

У **ПРЕГЛЕДУ ЛИТЕРАТУРЕ**, из углавном новијих ревијских радова, дат је преглед литературе која описује загађење животне средине различитим полутантима и њихов утицај на живи свет. Приказане су биодеградационе путање нафтних угљоводоника на којима се заснивају биоремедијациони поступци, а наведене су и биоремедијационе технике. У оквиру прегледа литературе објашњена је веза биоремедијације и процеса хумификације.

У сврху карактеризације појединачних микроорганизама и конзорцијума микроорганизама изолованих из загађене животне средине који учествују у биоремедијацији или производе различите производе, наведене су нове технике молекуларне биологије за карактеризацију појединачних микроорганизама, микробних заједница и одређивање микробне активности.

У трећем делу овог поглавља је описана синтеза микробних производа - егзополисахарида, детаљна биосинтеза и употреба левана, као и технике за испитивање способности микроорганизама за продукцију егзополисахарида и структурно-инструменталне технике за карактеризацију чистог егзополисахарида.

У **МАТЕРИЈАЛУ И МЕТОДАМА** су приказане методе коришћене за анализу земљишта и седимента као супстрата за ремедијацију. Наведене и детаљно описане и методе коришћене за карактеризацију бактерије СН-KOV3, продукцију и оптимизацију продукције егзополисахарида помоћу испитиване бактерије, као и методе употребљене за структурну карактеризацију егзополисахарида.

У **РЕЗУЛТАТИМА И ДИСКУСИЈИ** кандидаткиња је представила све резултате постигнуте у изради докторске дисертације. Описан је поступак изоловања микробних

конзорцијума деградера угљоводоника из загађених локалитета. У наставку докторске дисертације описани су поступци биоремедијације, резултати добијени анализом укупних угљоводоника током поступка биоремедијације, а одређен је и састав микробних заједница. Током *ex situ* поступка биоремедијације потврђена је хипотеза о истовременом одвијању процеса хумификације и биоремедијације, а добијене хуминске киселине су окарактерисане. У последњем делу ове дисертације, представљен је поступак изоловања микроорганизама који производи егзополисахариде, оптимизован је поступак производње полисахарида, а изолован егзополисахарид је детаљно окарактерисан хемијским и структурно инструменталним методама.

ЗАКЉУЧАК садржи преглед најважнијих резултата добијених током израде ове докторске дисертације.

У делу **ЛИТЕРАТУРА** налази се укупно 180 референци наведених по абecedном реду.

Б. КРАТАК ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА

У овој докторској дисертацији су приказани резултати добијени тестирањем биодеградационе способности изолованих конзорцијума микроорганизама деградера угљоводоника на примеру исплачне јаме и *ex situ* поступка биоремедијације земљишта. У обе студије је уочено је снижење концентрације нафтних угљоводоника, у третману исплачне јаме за 95,3% од укупне количине угљоводоника, за 180 дана, односно 86,6% у поступку *ex situ* биоремедијације контаминираног земљишта у току 150 дана. Велики значај овој докторској дисертацији дала је и метагеномска анализа узорка са почетка биоремедијације локалитета исплачне јаме која пружа увид у састав и структуру микробне заједнице. На овај начин су идентификовани и некултурабилни аутохтони микроорганизми који такође доприносе процесима биодеградације.

У дисертацији је потврђена хипотеза о паралелном одвијању поступка биоремедијације са процесом хумификације, при чему је током биоремедијације земљишта контаминираног нафтом укупна количина хуминских киселина порасла за 26,5%, а изоловане хуминске киселине су биле богатије кисеоничним групама и ароматичним структурама. Овакав резултат указује да је након биоремедијације квалитет

земљишта побољшан и као такво оно може постати станиште разноврсним биљкама и микроорганизмима, што доприноси очувању биодиверзитета.

Бактерија CH-KOV3 је изолована из канала отпадних вода индустријске зоне Панчева и молекуларно идентификована као врста рода *Brachybacterium*, а парцијална секвенца 16 sRNK гена је заведена у NCBI (National Center for Biotechnology Information) базу података под приступним бројем KC881303.1. Морфолошке карактеристике ове бактерије, њене физиолошко-биохемијске особине и маснокиселински састав су одређени током дисертације, а урађена је и MALDI-TOF MS карактеризација рибозомалних протеина. Током студије проучаван је утицај услова ферментације и уочено да је највећи принос изолованог егзополисахарида добијен на 28 °C при pH вредности 7 и концентрацији сахарозе у подлози од 500 g/l. Након испитивања и оптимизације продукције егзополисахарида, део докторске дисертације је био фокусиран на испитивање структуре добијеног егзополисахарида. Елементарна органска микроанализа је показала да је изоловани полисахарид неутралан и пречишћен од протеина и нуклеинских киселина. Хидролиза и папирна хроматографија и негативна вредност оптичке ротације су указали да је изоловани егзополисахарид фруктан, а његовом парцијалном хидролизом помоћу трифлуорсирћетне киселине добијени су фруктоолигосахаридни производи који се због својих својстава могу употребљавати у исхрани. Метилационом анализом је утврђен тип везе у изолованом фруктану (2,6) и степен супституције (око 11%). FTIR, 1D и 2D NMR спектроскопијама је утврђено да изоловани егзополисахарид показује хемијска померања слична онима у литератури за леване, а анализом његове молекулске масе је утврђено да спада у високо-молекулске леване. Добијене вредности за вискозитет егзополисахарида указују да он у раствору заузима сферичан и компактан облик што омогућава његову примену у козметици и фармацији. Приказани резултати, везани за производњу егзополисахарида су наставак истраживања којима се кандидаткиња бавила током израде свог завршног и мастер рада на Хемијском факултету.

В. УПОРЕДНА АНАЛИЗА РЕЗУЛТАТА КАНДИДАТА СА РЕЗУЛТАТИМА ИЗ ЛИТЕРАТУРЕ

У две одвојене студије биоремедијације исплачне јаме и контаминираног земљишта употребом изолованих конзорцијума микроорганизама деградера угљоводоника дошло је до смањења 95,3% односно 86,6% од укупне количине угљоводоника. Овако висок проценат деградације је добијен деловањем микроорганизама у конзорцијуму који имају склоност ка специфичним супстратима (1), а на процесе биодеградације је позитивно утицао и додатак хранљивих супстанци, што је у складу и са резултатима других истраживача (2). Метагеномском анализом узорка исплачне јаме са почетка поступка биодеградације је одређено присуство бројних родова, од којих је доминантан био род *Gordonia* (26,9%). Литературни подаци показују да микроорганизми ове класе са високом ефикасношћу разграђују угљоводонике (3).

Током *ex situ* поступка биоремедијације земљишта показано је да се паралелно са биоремедијацијом одвија и хумификација. Слични закључци су описани у литератури (4). Укупна количина хуминских киселина је порасла за 26,5%, при чему су изоловане хуминске киселине биле богатије кисеоничним групама и ароматичним структурама. У литератури је раније истакнут позитиван утицај хуминских киселина на биљке и микроорганизме у земљишту услед њихових карактеристика. Хуминске киселине позитивно утичу на микробни метаболизам и њихов раст, индукујући синтезу ензима, а представљају једињења која делују као електрон акцептори/донори (5). Због свега наведеног земљиште које је било контаминирано, након поступка биоремедијације не само да је очишћено, него је и обогаћено хуминским киселинама и представља средину погодну за живи свет.

У оквиру тезе је из загађене животне средине изолована бактерија која има способност продукције егзополисахарида. Изолована бактерија припада роду *Brachy bacterium*, класи *Actinobacteria*. Бактерије ове класе се могу често изоловати из контаминираног земљишта, при чему имају способност да као извор угљеника користе загађујуће супстанце. Као одговор на раст на угљоводонцима оне могу производити различите производе, биосурфактанте, који им олакшавају разградњу и употребу угљоводоника. Актинобактерије могу уклонити полутанте и другим процесима попут апсорпције и адсорпције (6,7).

Изолована бактерија СН-KOV3 у високом приносу производи егзополисахариде. Оптимални услови продукције (28 °C, рН 7, концентрација сахарозе у подлози од 500 g/L) су слични другим микроорганизмима продуцентима левана раније описаним у литератури. Изоловани полисахарид је након хемијске и структурно-инструменталне анализе окарактерисан као високо-молекулски фруктан у коме је главни тип везе $\beta(2,6)$ са (2,1) рачвањем. Добијени резултати у поређењу са литературом јасно показују да је изоловани егзополисахарид леван (8-13).

Литература:

- (1) **Naap**, A. P., Allebrandt, S. R., Pereira, J. E. S., Streit, R. S. A., Bückner, F., Scale-up treatment of petroleum hydrocarbon-contaminated soil using a defined microbial consortium. *International Journal of Environmental Science and Technology* (2021). <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03467-z>
- (2) **Feng**, L., Jiang, X., Huang, Y., Wen, D., Fu, T., et al, Petroleum hydrocarbon-contaminated soil bioremediation assisted by isolated bacterial consortium and sophorolipid. *Environmental Pollution* **273** (2021) 116476. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116476>
- (3) **Rathore**, D. S., Sheikh, M., Singh, S. P., Marine Actinobacteria: New horizons in bioremediation. In: Prasad, R., Kumar, V., Singh, J., Upadhyaya, C. P. (eds.), Recent developments in microbial technologies. Springer Nature, Singapore, 2021, pp. 425. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-4439-2>
- (4) **Jednak**, T., Avdalović, J., Miletić, S., Slavković-Bešković, L., Stanković, D., et al, Transformation and synthesis of humic substances during bioremediation of petroleum hydrocarbons. *International Biodeterioration and Biodegradation* **122** (2017) 47. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.04.009>
- (5) **Lipczynska-Kochany**, E., Humic substances, their microbial interactions and effects on biological transformations of organic pollutants in water and soil: A review. *Chemosphere* **202** (2018) 420. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.104>
- (6) **Colin**, V. L., Pereira, C. E., Villegas, L. B., Amoroso, M. J., Abate, C. M., Production and partial characterization of bioemulsifier from a chromium-resistant actinobacteria. *Chemosphere* **90** (2013) 1372. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.08.002>
- (7) **Sineli**, P. E., Tortella, G., Dávila Costa, J. S., Benimeli, C. S., Cuozzo, S. A., Evidence of α -, β - and γ -HCH mixture aerobic degradation by the native actinobacteria *Streptomyces* sp. M7. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **32** (2016) 81–89. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2037-0>
- (8) **Kekez**, B. D., Gojic-Cvijovic, G. D., Jakovljevic, D. M., Stefanovic Kojic, J. R., Markovic, M. D., et al, High levan production by *Bacillus licheniformis* NS032 using ammonium chloride as the sole nitrogen source. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **175** (2015) 3068. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1475-8>
- (9) **Liu**, J., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., Lu, Z., et al, Production, characterization and antioxidant activities *in vitro* of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa*

EJS-3. *Carbohydrate Polymers* **78** (2009) 275. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.03.046>
(10) **Moussa**, T. A. A., Al-Qaysi, S. A. S., Thabit, Z. A., Kadhem, S. B., Microbial levan from *Brachy bacterium phenoliresistens*: characterization and enhancement of production. *Process Biochemistry* **57** (2017) 9. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.03.008>

Г. ОБЈАВЉЕНИ И САОПШТЕНИ РАДОВИ КОЈИ ЧИНЕ ДЕО ДИСЕРТАЦИЈЕ

Александра Жерађанин је до сада презентовала резултате свог научно-истраживачког рада у 7 радова са SCI листе од којих три чине део дисертације. Радови се налазе у следећим категоријама: рад у врхунском међународном часопису (категирија M21a), рад у врхунском међународном часопису (категирија M21), рад у истакнутом међународном часопису (категирија M22) и четири рада у међународном часопису (категирија M23). Кандидаткиња је резултате проистекле из тезе презентовала и у виду 9 саопштења на скуповима од међународног и националног значаја.

Радови у часописима међународног значаја који чине дисертацију:

M21, Рад у врхунском међународном часопису

1. **Djurić, A.**, Gojgić-Cvijović, G., Jakovljević, D., Kekez, B., Stefanović Kojić, J., Mattinen, M.-L., Harju, I.E., Vrvic, M.M., Beškoski, V., *Brachy bacterium* sp. CH-KOV3 isolated from an oil-polluted environment—a new producer of levan, *International Journal of Biological Macromolecules*, **104**, 2017, 311-321 (DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.034, IF₂₀₁₇ 3.909, Polymer Science 10/87)
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.034>

M22, Рад у истакнутом међународном часопису

1. Avdalović, J., **Đurić, A.**, Miletić, S., Ilić, M., Milić, J., Vrvic, M.M., Treatment of a mud pit by bioremediation, *Waste Management & Research*, **34**, 2016, 734-739 (DOI: 10.1177/0734242X16652961, IF₂₀₁₆ 1.803, Environmental Sciences 117/229)
<https://doi.org/10.1177/0734242X16652961>

M23, Рад у међународном часопису

1. **Žeradanin, A.**, Avdalović, J., Lješević, M., Tešić, O., Miletić, S., Vrvic, M. M., Beškoski, V., Evolution of humic acids during ex situ bioremediation on a pilot level – an added value of the microbial activity, *Journal of Serbian Chemical Society*, **85**(6), 2020, 821-830 (DOI: 10.2298/JSC190916131Z, IF₂₀₂₀ 1.240, Chemistry, Multidisciplinary 141/179)
<https://doi.org/10.2298/JSC190916131Z>

Остали научни радови:

M21a, Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu

1. Joksimović, K., **Žerađanin, A.**, Randjelović, D., Avdalović, J., Miletić, S., Gojgić-Cvijović, G., Beškoski, V., Optimization of microbial fuel cell operation using Danube River sediment; *Journal of Power Sources* **475**, 2020, 228739 (DOI: [10.1016/j.jpowsour.2020.228739](https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2020.228739), IF₂₀₂₀ 9.127, Material Science, Multidisciplinary 45/334)

<https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2020.228739>

M23, Rad u međunarodnom časopisu

1. **Žerađanin, A.**, Joksimović, K., Avdalović, J., Gojgić-Cvijović, G., Nakano, T., Miletić, S., Ilić, M., Beškoski, V., Bioremediation of river sediment polluted with polychlorinated biphenyls: A laboratory study. *Journal of the Serbian Chemical Society* **87**(1), 2022, 95-107 (DOI: [10.2298/JSC211217113Z](https://doi.org/10.2298/JSC211217113Z), IF₂₀₂₀ 1.240, Chemistry, Multidisciplinary 141/179)

<https://doi.org/10.2298/JSC211217113Z>

2. Marić, N., Štrbački, J., Polk, J., Beškoski Slavković, L., Avdalović, J., Lješević, M., Joksimović, K., **Žerađanin, A.**, Beškoski, V.P. Spatial-temporal assessment of hydrocarbon biodegradation mechanisms at a contaminated groundwater site in Serbia. *Chemistry and Ecology* **38**, 2022 (DOI: [10.1080/02757540.2021.2017903](https://doi.org/10.1080/02757540.2021.2017903), IF₂₀₂₀ 2.244, Environmental Sciences 188/274, Ecology 95/166)

<https://doi.org/10.1080/02757540.2021.2017903>

3. Miletić, S., Avdalović, J., Milić, J., Ilić, M., **Žerađanin, A.**, Joksimović, K., Spasić, S., Oxidized humic acids from the soil of heat power plant. *Journal of Serbian Chemical Society*, **85**(3), 2020, 421-426 (DOI: [10.2298/JSC190726099M](https://doi.org/10.2298/JSC190726099M), IF₂₀₂₀ 1.240, Chemistry, Multidisciplinary 141/179)

<https://doi.org/10.2298/JSC190726099M>

Д. ПРОВЕРА ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Оригиналност докторске дисертације под називом „Биохемијска карактеризација бактерија изолованих из нафтом загађених локалитета и њихова примена за биоремедијацију и производњу егзополисахарида”, аутора **Александре Жерађанин**, 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 подударана текста износи 12%. Подударност од 2% са докторском дисертацијом Бранке Лончаревић под називом „Оптимизација продукције левана бактерије *Bacillus licheniformis* и примена у синтези кополимера” је последица употребе истих личних имена, афилијација, сличних метода употребљених за изоловање

левана и његову карактеризацију. Подударност од 2% са докторском дисертацијом Јелене Авдаловић под називом „Настанак земљишта у процесима биоремедијације” и 1% са докторском дисертацијом Срђана Милетића под називом „Испитивање загађених станишта као извора микроорганизама за биоремедијацију” је последица употребе истих личних имена, афилијација, сличних наслова и метода употребљених за изоловање микроорганизама и припрему конзорцијума као и хемијску анализу и карактеризацију земљишта. Подударност од 1% са докторском дисертацијом Марије Љешевић под називом „Микробна деградација сложених ароматичних загађујућих супстанци и анализа производа биодеградације свеобухватном дводимензионалном гасном хроматографијом са масеном спектрометријом” је искључиво последица употребе истих личних имена и афилијација, као и сличног садржаја захвалнице. Такође је уочена сличност од 1 % са радом „Djurić, A., Gojgić-Cvijović, G., Jakovljević, D., Kekez, B., Stefanović Kojić, J., Mattinen, M.-L., Harju, I.E., Vrvic, M.M., Beškoski, V., *Brachybacterium* sp. CH-KOV3 isolated from an oil-polluted environment—a new producer of levan, *International Journal of Biological Macromolecules*” што је последица претходно публикованих резултата докторандових истраживања. Горе поменути проценти и проценат подударности мањи од 1% даљих референци се могу једном реченицом описати као: последица цитата, личних имена, афилијација, назива једињења и скраћеница, метода и њиховог начина извођења и навођења уређаја који се користе у лабораторији Групе за микробиолошку хемију и биотехнологију Хемијског факултета у Београду, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података, као и навођења података о карактеризацији једињења и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из њене дисертације. Аргументи поменути раније су у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, Комисија сматра да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Б. ЗАКЉУЧАК

На основу приказаних резултата, Комисија је закључила да је у поднетој докторској дисертацији под називом „Биохемијска карактеризација бактерија изолованих из нафтом загађених локалитета и њихова примена за биоремедијацију и производњу егзополисахарида”, кандидаткиња, Александра Н. Жерађанин, мастер биохемичар, успешно одговорила на задате циљеве. У оквиру тезе кандидаткиња је изоловала конзорцијуме микроорганизама деградера угљоводоника и са успехом испитала њихов биодеградациони капацитет у одвојеним студијама биоремедијације, при чему је концентрација укупних угљоводоника смањена за више од 85%. У наставку докторске дисертације, метагеномском анализом утврђен је састав микробне заједнице употребљене за биоремедијацију исплачних јама, док су у студији *ex situ* биоремедијације контаминираног земљишта окарактерисани доминантни културабилни родови. Испитивана хипотеза о истовременом одвијању поступка биоремедијације и хумификације је потврђена, при чему је количина хуминских киселина порасла за 26,5%, а изоловане хуминске киселине су биле богатије ароматичним структурама и кисеоничним групама. У последњем делу дисертације је из канала отпадних вода индустријске зоне Панчева изолован микроорганизам који производи егзополисахариде у значајној количини, а применом оптимизованих реакционих услова, добијен је егзополисахарид у високом приносу (45,2 g/l). Изоловани егзополисахарид је окарактерисан као леван, високо-молекулски фруктан са главним низом у коме је главни тип везе $\beta(2,6)$ са (2,1) гранањем.

На основу свега наведеног, а у складу са Законом о високом образовању, Статутом Универзитета у Београду – Хемијског факултета, Комисија сматра да су испуњени сви услови за одбрану докторске дисертације и са задовољством предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Хемијског факултета да поднету докторску дисертацију Александре Н. Жерађанин, под насловом **„Биохемијска карактеризација бактерија изолованих из нафтом загађених локалитета и њихова примена за биоремедијацију и производњу егзополисахарида”**, прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктора биохемијских наука.

У Београду, 06.06.2022.

Чланови комисије:

др Владимир Бешкоски, редовни професор, ментор
Универзитет у Београду - Хемијски факултет

др Јелена Авдаловић, виши научни сарадник, ментор
Универзитет у Београду,
Институт за хемију, технологију и металургију,
Институт од националног значаја за Републику
Србију

др Гордана Гојгић-Цвијовић, научни саветник
Универзитет у Београду,
Институт за хемију, технологију и металургију,
Институт од националног значаја за Републику
Србију

др Љубодраг Вујисић, ванредни професор
Универзитет у Београду - Хемијски факултет

др Бранимир Јованчићевић, редовни професор
Универзитет у Београду - Хемијски факултет