

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU HEMIJSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno-naučnog veća, Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu održanoj 11. decembra 2014. godine izabrani smo za članove Komisije za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata mr Jelene S. AVDALOVIĆ, (rođene Jekić) dipl. ing. tehnologije, istraživača saradnika Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju (IHTM), pod naslovom: "NASTANAK ZEMLJIŠTA U PROCESIMA BIOREMEDIJACIJE". Na osnovu pregledane disertacije, podnosimo sledeći:

I Z V E Š T A J

A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija Jelene Avdalović sadrži 113 strana teksta sa 40 slika i 19 tabela i čine je: Uvod (2 strane), Pregled literature (47), Materijal i metode (13), Rezultati i diskusija (38), Zaključak (4) i Literatura (9) sa 111 navoda. Doktorat ima Sadržaj, Izvod, Abstract, Zahvalnicu, Biografiju autora, Izjavu o autorstvu, Izjavu o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada i Izjavu o korišćenju.

U **Uvodu** autor ističe problem zagađenja životne sredine naftom i njenim derivatima, kao mogućnost upotrebe konzorcijuma zimogenih mikroorganizama kao „bioloških agenasa“ u remedijaciji, zaštiti i očuvanju životne sredine, koja je sagledana kroz dva procesa od suštinskog značaja za nastanak zemljišta. Prvi podrazumeva primenu zimogenog aktivnog konzorcijuma mikroorganizama za *ex situ* bioremedijaciju složenog naftnog kontaminanta u sloju veštačkog zemljišnog supstrata, sa rečnim peskom kao matičnom stenom, kao i praćenje procesa humifikacije, pošto su huminske supstance jedan od ključnih elemenata plodnosti zemljišta. Mobilizacija fosfora posredstvom mikroorganizama je druga grupa procesa, koja je proučavana u ovom doktoratu, tako što su korišćeni fosfatna ruda i koncentrat pirita kao supstrat, uz dodatak kulture acidofilne tionske-gvožđe(II)-oksidujuće bakterije *Acidithiobacillus sp. B2* kao biološkog agensa solubilizacije.

Naučni cilj u okviru prvog procesa, je bio ispitivanje bioremedijacije složenog naftnog kontaminanta uz pomoć aktivnog konzorcijuma zimogenih mikroorganizama kao i biodegradaciju i transformacije najrezistentnijih komponenti (npr. PAH) u kompleksne polimerne strukture analogne huminskim supstancama. Cilj istraživanja drugog procesa je bio ispitivanje dinamike i količine izluženog-mobilizovanog fosfata iz fosfatne rude dejstvom sopstvenog soja bakterijske kulture *Acidithiobacillus sp. B2* (deponovan u GenBank).

U **Pregledu literature** je prikazan proces nastanka zemljišta, faktori koji utiču na njegov nastanak kao i komponente od kojih se sastoji, sa akcentom na organsku fazu, zbog njenog velikog značaja za plodnost zemljišta. Navedni su izvori zagađenja zemljišta, među kojima su istaknuti nafta i naftni derivati. Takođe su opisane tehnike bioremedijacije zagađenih zemljišta, njihovo planiranje, i realizacija. Objasnjeni su mehanizmi razgradnje organskih zagađivača uz pomoć mikroorganizama kao bioloških agenasa. Isaknuta je sličnost mehanizma mikrobiološke degradacije PAH sa mehanizmima koji zauzimaju mesto u prirodnoj humifikaciji lignina.

Materijal i metode sadrže navode svih materijala koji su upotrebljeni u doktoratu, kao i primenjene metode za rad na terenu i u laboratorijskim uslovima. Za praćenje procesa simultana

bioremedijacija i humifikacija, kao i procesa mikrobiološko rastvaranje fosfatnih ruda upotrebljene su klasične tehnike i instrumentalne metode.

U delu doktorske disertacije **Rezultati i diskusija**, kandidat daje pregled i diskusiju dobijenih rezultata. Detaljno su opisani eksperimenti iz oba ispitivana procesa U okviru ispitivanja procesa simultana bioremedijacija i humifikacija su izvedena tri eksperimenta. U svim eksperimentima je dokazana je validnost upotrebe konzorcijuma zimogenih mikroorganizama kao efikasnih „bioloških agenasa“ za simultanu bioremedijaciju i humifikaciju. Razgradnja pojedinih komponenti ugljovodoničnih polutanata je svestrano objašnjena, kao i dinamika transformacija i važnost huminskih supstanci u zagađenom zemljištu i veštačkim supstratima sličnim zemljištu. U okviru ispitivanja procesa mikrobiološka mobilizacija fosfora, je dokazano da gvožđe-oksidujuća *Acidithiobacillus* sp. B2 bakterija može oksidovati pirit do sumporne kiseline, pri čemu kreira kiselo okruženje koje pomaže rastvaranje fosfora iz nerastvornih fosfatnih ruda.

U delu doktorske disertacije **Zaključci**, kandidat sumira dobijene rezultate i njihovu diskusiju.

B. KRATKI OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Prvi proces: Sinteza i transformacija huminskih supstanci tokom bioremedijacije naftnih zagađivača

Prvi eksperiment

- Bioremedijacijom je nivo ukupnih naftnih ugljovodonika (TPH) smanjen sa 30 g/kg suve supstance na 2 g/kg suve supstance, što ukazuje na smanjenje od 93%. Uspešnosti bioremedijacije je doprineo pravilan izbor mikroorganizama upotrebljenih za reinokulaciju halde.
- Udeo mikroorganizama sposobnih da kao jedini izvor ugljenika koriste dizel D2 u ukupnom broju mikroorganizama na početku bioremedijacije je bio manji od 20% a na kraju procesa preko 80%, što takođe ukazuje na uspešnost bioremedijacije.
- Tokom procesa bioremedijacije dolazi do porasta huminskih kiselina za 47%, što je veoma značajno sa aspekta izlečenja zemljišta.
- Strukturna analiza huminskih kiselina iz ispitivanih uzoraka pokazuje porast stepena aromatičnosti tokom bioremedijacije što ukazuje na simultani proces bioremedijacije i humifikacije.

Drugi esperiment

- Bioremedijacijom je nivo ukupnih naftnih ugljovodonika smanjen sa 22,35 g/kg suve supstance na 7,12 g/kg suve supstance, što ukazuje na smanjenje od 68%. Uspešnosti bioremedijacije je doprineo pravilan izbor mikroorganizama upotrebljenih za reinokulaciju halde.
- Porast sadržaja huminskih kiselina od 0,23% do 0,70% je primećen tokom bioremedijacionog procesa. Analiza FT-IR spektara i atomskog odnosa C/H ekstrahovanih huminskih kiselina na početku i na kraju bioremedijacionog procesa, ukazuju na povećanje aromatičnih struktura u molekulima huminskih kiselina. Povećanje odnosa E4/E6 ukazuje na obogaćivanje huminskih kiselina kiseonikovim funkcionalnim grupama. Rezultati potenciometrijskih analiza pokazuju da huminske kiseline na kraju procesa bioremedijacije imaju veći puferski kapacitet nego huminske kiseline, na početku, što znači da je došlo do povećanja broja funkcionalnih grupa koje su odgovorne za ukupnu kiselost, tj. hidroksilnih i karboksilnih grupa u molekulima huminskih kiselina. Rezultati merenja EMS u titracionim rastvorima huminskih kiselina ukazuju da se redoks kapacitet huminskih kiselina povećava

tokom procesa bioremedijacije. Dakle, grupe odgovorne za ukupnu kiselost mogu biti i odgovorne za redoks kapacitet huminskih kiselina.

- Rezultati parametara humifikacije pokazuju povećanje sadržaja ugljenika u huminskim kiselinama na kraju procesa, dok je ugljenik sadržan u fulvo kiselinama redukovana za 44%. Ovo je verovatno posledica transformacije fulvo u huminske kiseline. Parametri, stepen ekstrakcije i indeks polimerizacije, pokazuju da se humifikacija dešava tokom procesa bioremedijacije.

Treći eksperiment

- Svi parametri bioremedijacije (aeracija, biostimulacija, aeracija+biostimulacija, aeracija+biostimulacija+inokulacija) doprinose razgradnji naftnih ugljovodonika, čak i u uzorcima koji nisu inokulisani, jer podstiču rast i potentnost mikroorganizama prisutnih u samom zagađenju. Posebno je uočljivo udruženo dejstvo aeracije i biostimulacije u haldi IV, koje dovodi do značajnog porasta mikroorganizama (sa 1×10^3 do $2,4 \times 10^6$) što rezultira stepenom razgradnje naftnih ugljovodonika od 33,66 % za period od 170 dana.
- Proces bioremedijacije najuspešnije je izveden u haldi V, koja predstavlja aerisanu, biostimulisanu i bioaugmentovanu haldu, pri čemu uočavamo pad TPH vrednosti od 64,64% u odnosu na početnu koncentraciju. Uspešnosti bioremedijacije je doprineo pravilan izbor mikroorganizama upotrebljenih za inokulaciju halde.
- Analize huminskih kiselina iz halde V pokazuju da dolazi do porasta koncentracije huminskih kiselina nakon 170 dana eksperimenta za 21% u odnosu na početak eksperimenta.
- U huminskim kiselinama izolovanim iz halde V nultog dana bioremedijacionog procesa, udeo frakcije velike molekulske mase (veće od 100 kDa) iznosio je 72,67% dok je nakon 170 dana od početka procesa udeo navedene frakcije iznosio 76,17% što je verovatno posledica toga, što se organske komponente najrezistentnije na biorazgradnju, transformišu i uključuju u složene polimerne strukture analogne huminskim supstancama.
- Spektrofluorimetrijske analize huminskih kiselina izolovanih iz halde V pokazuju porast fluorofora tokom bioremedijacionog procesa. Porast broja fluorofora ukazuje na porast aromatičnosti uzoraka huminskih kiselina.
- Potenciometrijske titracije rastvora huminskih kiselina pokazuju, da su one na kraju procesa bioremedijacije kvalitetnije, tj. da imaju bolji puferski i redoks kapacitet nego na početku. Povećanje puferskog i redoks kapaciteta, sugerise da huminske kiseline iz procesa bioremedijacije mogu delovati kao terminalni akceptori elektrona u anaerobnim mikrobiološkim respiracijama, u privremeno beskiseoničnim sistemima.

Drugi proces: Mikrobiološka mobilizacija fosfata

- Hemolitaototrofna gvoždje i sumpor oksidujuća acidofilna bakterija roda *Acidithiobacillus* je izolovana iz tečnog uzorka uzorkovanog iz jezera Robule (Bor, Srbija). Molekulska karakterizacija ukazuje da izolovana vrsta pripada rodu *Acidithiobacillus* sa 99,28% sličnosti sa *Acidithiobacillus ferrivorans*, 98,54% sa *Acidithiobacillus ferridurans* i 98,21% sličnosti sa *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Sekvenca gena 16S rRNK uzorka *Acidithiobacillus* sp. B2 je deponovana u genskoj banci NCBI, GenBank, Holandija, pod brojem KC691309.
- Tokom procesa rastvaranja fosfora iz mešavine fosfatne rude i pirita dejstvom *Acidithiobacillus* sp. B2, vremenom se broj mikroorganizama povećavao sa početnih $1,7 \times 10^6$ CFU/mL, tako da je sedmog dana iznosio 4×10^6 CFU/mL, četrnaestog 1×10^7 CFU/mL, dvadesetprvog 4×10^7 CFU/mL, a dvadesetosmog 10^8 CFU/mL, što potvrđuje da je ispitivana mešavina ruda pogodan supstrat za rast mikroorganizama.

- Ispitivanja pokazuju da je rastvaranje fosfora povezano sa smanjenjem pH vrednosti, tj. povećanjem koncentracije bakterijski generisane sumporne kiseline i $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, što je posledica mikrobiološke oksidacije piritu u reakcionoj suspenziji.
- Dobijeni rezultati pokazuju da je u suspenziji sa gvožđe-oksidujućim *Acidithiobacillus* sp. B2 rastvoreno 34,5% neorganskog P_2O_5 , dok je za isto vreme u kontrolnoj suspenziji procenat rastvaranja P_2O_5 bio 3,8%. Procenat izluženja P_2O_5 koji se može pripisati dejstvu *Acidithiobacillus* sp. B2 je 30,7%.

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA KANDIDATA SA REZULTATIMA IZ LITERATURE

Zagađenje životne sredine organskim zagađivačima je uvek prisutan problem. Njihova biodegradacija je veoma važan transformacioni proces. Pod određenim uslovima, neke vrste mikroorganizama mogu da razlože organske zagađujuće supstance, koristeći ih kao izvor ugljenika ili kao energetski supstrat, što kao krajnji efekat ima smanjenje njihove koncentracije u životnoj sredini. Postoji obimna literatura o procesima bioremedijacije naftnog zagađenja, kao i o procesima humifikacije tokom kompostiranja, tretmana raznovrsnog organskog otpada, a takodje i o humifikaciji koja se dešavaju tokom tretmana komunalnih otpadnih voda. Međutim, skoro da nema naučnih informacija vezanih za simultanu bioremedijaciju naftom kontaminiranog zemljišta i humifikaciju. Značaj generisanja huminskih supstanci u biološki tretiranom kontaminiranom zemljištu rezultira oporavkom zemljišta, sa jedne strane dovodeći do porasta plodnosti, uz istovremenu imobilizaciju toksičnih supstanci koji dospevaju u zemljište (npr. toksične metale, pesticide...).

Mikrobiološka mobilizacija fosfora, kao jedan od ključnih procesa za plodnost zemljišta, pa tako i iz fosfatnih ruda, u cilju dobijanja prirodnog fosfatnog đubriva možda i *in situ*, u svetu je poznat i priznat metod. Rezultati istraživanja su uporedivi sa rezultatima drugih autora. Bitno je naglasiti da su ovo prva istraživanja sa fosfatnom rudom sa naših prostora i sopstvenim sojem bakterijske kulture *Acidithiobacillus* sp. B2. Mobilizacija fosfora u zemljištu je jedan od ključ

D. OBJAVLJENI RADOVI I SAOPŠTENJA KOJA ČINE DEO DISERTACIJE

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M₂₁)

1. S. Miletić, S. Spasić, **J. Avdalović**, V. Beškoski, M. Ilić, G. Gojgić-Cvijović, M.M. Vrvić, The effect of humic acids on zymogenous microbial consortia growth, Clean-Soil, Air, Water, **42** (2014) 1280-1283 (SCI IF₂₀₁₃=1,838, Water Resources 24/81).
2. **J. Avdalović**, V. Beškoski, G. Gojgić-Cvijović, M.-L. Mattinen, M. Stojanović, S. Zildžović, M.M. Vrvić, Microbial solubilisation of phosphorus from phosphate rock by iron-oxidizing *Acidithiobacillus* sp. B2, Miner. Eng. **72** (2015) 17-22 (SCI IF₂₀₁₃=1,714, Mining and Mineral Processing 3/21).

Predavanje po pozivu sa međunarodnog skupa štampano u celini (M₃₁)

1. **Jelena Avdalović**, Jelena Milić, Mila Ilić, Srđan Miletić, Vladimir Beškoski, Gordana-Gojgić Cvijović, Snežana Spasić, Branislav Potkonjak, Dragica Jakovljević, Miroslav M. Vrvić: Simultaneous bioremediation and soilification-new technology for recovery ash dump of thermoelectric power plants, Proceedings (Editors: Miroslav Vrvić, Zorica Cokić, Ljiljana Tanasijević), Planning and land use and landfills in terms of sustainable

development and new remediation technologies "Siol 2014", 12-13 May 2014. Zrenjanin, p. 11-15.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini (M₃₃)

1. **Jelena Avdalović**, Vladimir Beškoski, Snežana Zildžović, Mirjana Stojanović, Srđan Miletić, Mila Ilić, Miroslav M. Vrvic: Bacterially generated H₂SO₄ from pyrite, as a leaching agent for phosphorus from phosphate ore, Proceedings (Editors: Nada Štrbac, Dragana Živković, Svetlana Nestorović), The 45th International October Conference on Mining and Metallurgy, 16-19 October 2013, Bor Lake, Bor (Serbia), p. 503-506.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M₃₄)

1. T. Jednak, **J. Avdalović**, S. Miletić, V. Beškoski, M. Ilić, G. Gojgić-Cvijović, M.M. Vrvic; Green chemistry and bioremediation: Investigation of metal influence from catalysts on microorganism consortia which is used in bioremediation. 1st EuCheMS Congress on Green and Sustainable Chemistry, Budapest, Hungary, October 13-15, 2013, Programme & Book of Abstracts, p. 91.
2. **Jelena Avdalović**, Srđan Miletić, Vladimir Beškoski, Mila Ilić, Gordana Gojgić-Cvijović, Miroslav Vrvic; Humic Acid – ability to use as natural surfactants; Abstracts of the International Conference Newenviro, Novi Sad, Serbia, May 28-30 2012, p. 69

Rad u vodećem časopisu nacionalnog značaja (M₅₁)

1. **Jelena Avdalović**, Vladimir Beškoski, Danijela Randelović, Mirjana Stojanović, Snežana Zildžović, Miroslav Vrvic, Ispitivanje mogućnosti bioluženja fosfora iz fosfatne rude sa ležišta Lisina, Zaštita materijala, **53** (2012) 225-230.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M₆₄)

1. Vladimir P. Beškoski, Maija-Lisa Mattinen, Jelena Milić, **Jelena Avdalović**, Mila Ilić, Srđan Miletić, Gordana Gojgić-Cvijović; MALDI-TOF-MS Characterization of Environmental Bacterial Isolates; 6. Simpozijum Hemija i zaštita životne sredine »Envirochem 2013«, Srpsko hemijsko društvo, Knjiga izvoda, Vršac 21-24. maj 2013, st. 72-73
2. **Jelena Avdalović**, Latinka Slavković-Beškoski, Srđan Miletić, Tanja Jednak, Mila Ilić, Gordana Gojgić-Cvijović, Vladimir P. Beškoski; Ispitivanje humifikacionih transformacija tokom bioremedijacije ugljovodonika na pilot postrojenju; 6. Simpozijum Hemija i zaštita životne sredine »Envirochem 2013«, Srpsko hemijsko društvo, Knjiga izvoda, Vršac 21-24. maj 2013, st. 364-365.

E. ZAKLJUČAK

U doktorskoj disertaciji mr Jelene S. AVDALOVIĆ, diplomiranog inženjera tehnologije, prikazani su i diskutovani dobijeni rezultati ispitivanja promena u količini i strukturi huminskih supstanci tokom procesa bioremedijacije, kao i dobijeni rezultati mikrobiološke mobilizacije fosfata iz fosfatne rude, uz pirit kao pomoćni supstrat, koji oksiduje *Acidithiobacillus sp.* B2.

Kandidat je u doktorskoj disertaciji došao do rezultata i zaključaka koji predstavljaju značajan i originalan naučni doprinos u razumevanju i primeni konzorcijuma zimogenih

mikroorganizama kao „bioloških agenasa“ kroz dva procesa od suštinskog značaja za nastanak zemljišta: humifikacija, koja se dešava simultano u toku bioremedijacije i mikrobiološka obezbeđivanje dostupnih ključnih biogenih elemenata, kao što je fosfor. Ovi rezultati osim fundamentalnog značaja iz domena mikrobiološke hemije, biogehemije i biotehnologije životne sredine, važni su i za primenu, što ima direktne pozitivne ekonomske efekte. Deo rezultata je publikovan u dva rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M_{21}) (u jednom je kandidat prvi i koresponding autor). Kandidat ima i 7 drugih naučnih rezultata, što je taksativno navedeno u spisku koji sadrži ovaj Izveštaj u delu D.

Na osnovu svega prikazanog, a u skladu sa Statutom Hemiskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Komisija sa iskrenim zadovoljstvom svesrdno predlaže Nastavno-naučnom veću da predatu doktorsku disertaciju kandidata mr Jelene S. AVDALOVIĆ, diplomiranog inženjera tehnologije, pod naslovom: “NASTANAK ZEMLJIŠTA U PROCESIMA BIOREMEDIJACIJE ”, prihvati i odobri odbranu za sticanje akademskog zvanja DOKTORA BIOHEMIJSKIH NAUKA.

K o m i s i j a

Dr Miroslav M.VRVIĆ, dipl. hem., mentor
Redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Branimir JOVANČIĆEVIĆ, dipl. hem.
Redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Vladimir P. BEŠKOSKI, dipl. biohem.
Docent
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Mila ILIĆ, dipl. hem., mentor
Naučni saradnik
Centar za hemiju, IHTM, Beograd

Beograd, 14. 04. 2015.