

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

ПРЕДМЕТ: Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације Марије Љешевић, мастер биохемичара

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду, одржаној 12.09.2019. године, одређени смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидаткиње Марије Љешевић, мастер биохемичара, истраживача приправника Института за хемију, технологију и металургију, под називом:

„Микробна деградација сложених ароматичних загађујућих супстанци и анализа производа биодеградације свеобухватном дводимензионалном гасном хроматографијом са масеном спектрометријом”

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 (број одлуке: 61206-4168/2-19).

Комисија је докторску дисертацију прегледала и подноси Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Марије Љешевић написана је на 126 страна, А4 формата (фонт 12, проред 1,5) и садржи 37 слика и 10 табела. Подељена је на поглавља: 1. Увод (2 стране), 2. Преглед литературе (29 страна) 3. Материјал и методе (10 страна), 4. Резултати и дискусија (36 страна), 5. Закључак (3 стране), 6. Литература (20 страна, 151 цитат). Поред наведеног, дисертација садржи извод на српском и енглеском језику (по једна страна), Садржај (4 стране), Листу скраћеница (2 стране), Захвалницу (1 страна) и Прилоге у којима се налази Биографија кандидата, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјаву о коришћењу.

У Уводу је описан предмет истраживања ове докторске дисертације, као и њени циљеви. Кандидаткиња истиче проблем загађења животне средине различитим сложеним смешама загађујућих супстанци, а посебна пажња посвећена је микроорганизмима и

њиховој примени у санацији загађења. Такође, описује значај свеобухватне дводимензионалне гасне хроматографије у анализи смеша загађујућих супстанци и њихове разградње. Циљ ове дисертације је био испитивање микробне деградације ароматичне фракције дизел горива и комине грозђа, сложених смеша ароматичних једињења, која доводе до загађења животне средине, и анализа биодградације употребом свеобухватне дводимензионалне гасне хроматографије. Након дефинисања циља, кандидаткиња је таксативно навела задатке истраживања, који су детаљно разрађивани у наредним поглављима дисертације.

Преглед литературе обухвата четири целине. У првој целини описана је улога микроорганизама у екосистему, као и у процесима биодградације загађујућих супстанци. Описани су неки од највећих изазова у животној средини, а посебна пажња је посвећена угљоводоницима нафте и пољопривредном отпаду. Друга целина посвећена је кретању угљоводоника нафте у животној средини, њиховој токсичности, механизмима микробиолошке разградње као и процесу биоремедијације. У трећој целини описано је добијање, састав и токсичност комине грозђа, механизми микробиолошке разградње, као и могуће примене овог отпадног материјала. У четвртном делу објашњени су принципи свеобухватне дводимензионалне гасне хроматографије (GCxGC), модулатори и детектори који се најчешће употребљавају, као и могуће примене ове методе.

У оквиру материјала и метода наведен је детаљан опис експерименталних метода, процедура и узорака који су коришћени у овој дисертацији. Подаци у вези са идентификацијом и карактеризацијом микроорганизама, експериментима биодградације, као и условима хроматографске анализе јасно и прегледно су написани.

Поглавље Резултати и дискусија подељено је на две целине у којима је кандидаткиња детаљно приказала и продискутовала добијене резултате. Прва целина посвећена је биодградацији ароматичне фракције дизела Д2. Приказана је детаљна карактеризација и идентификација микроорганизама коришћених у експериментима, као и резултати респирометријског теста на Мисго-Охутах респирометру. Објашњен је начин софтверске анализе хроматограма добијених употребом свеобухватне дводимензионалне гасне хроматографије са масеном спектрометријом високе резолуције са анализатором који раздваја на основу времена прелета (GCxGC-(HR)TOFMS), као и резултати процеса биодградације. У другој целини приказане су промене у физичко-хемијском саставу (рН, садржај амонијачног азота, обојених супстанци, укупних фенола и редукујућих шећера) комине грозђа након 90 дана третмана чистим културама гљива. У овом делу описани су и резултати добијени употребом свеобухватне дводимензионалне гасне хроматографије са квадруполном масеном спектрометријом (GCxGC-qMS) као и резултати теста фитотоксичности нетретиране и третиране комине на семена зелене салата и парадајза.

У поглављу Закључак кандидаткиња је на основу детаљно продискутованих резултата, систематски резимирала закључке који су проистекли из ове дисертације.

У делу Литература (151 цитат) обухваћене су публикације релевантне за област истраживања и покривени су сви делови дисертације.

Б. Кратак приказ резултата

У оквиру ове докторске дисертације испитивана је деградација ароматичне фракције дизела и ароматичних једињења комине грожђа помоћу микроорганизама.

У првом делу експеримената изоловане су, окарактерисане и идентификоване бактерије из земљишта контаминираниог нафтом. Утврђено је да сојеви идентификовани као *Oerskovia* sp. СНР-ZН25 и *Rhodococcus* sp. СНР-NR31 најбоље расту на ароматичној фракцији дизела, као и да су резистентни на високе концентрације никла (50 mmol/L). Респирометријски тест на Micro-Охумах респирометру показао је да долази до повећања потрошње кисеоника и продукције угљен-диоксида код оба соја у присуству ароматичне фракције дизела, што је потврдило да ови сојеви успешно користе ароматичну фракцију дизела као извор угљеника.

Како би се олакшала анализа података добијених употребом GCxGC-(HR)TOFMS, развијена је једначина за визуелизацију само деградованих једињења, уместо свих једињења која преостају након деградације.

Утврђено је да сој *Oerskovia* sp. СНР-ZН25 након 30 дана најефикасније разграђује деривате дибензотиофена (97,9 %) и бензотиофена (72,7 %), а сој *Rhodococcus* sp. СНР-NR31 деривате нафталена (75,8 %) и аценафтена/бифенила (70,7 %).

Други део експеримената посвећен је деградацији паром третиране комине грожђа помоћу чистих култура гљива. Третман свим испитиваним сојевима довео је до смањења масе комине и пораста рН вредности. Садржај укупних фенола је смањен у свим узорцима осим у узорку инокулисаним сојем *G. sepiarium* LPSC 735. Садржај амонијачног азота свих инокулисаних узорака је повећан, осим у узорку инокулисаним сојем *U. botrytis* LPSC 813. Садржај обојених супстанци је сличан у свим узорцима, осим у узорку третираном сојем *U. botrytis* LPSC 813 где долази до значајног пораста. Садржај укупних редукујућих шећера је значајно нижи код узорака инокулисаних сојевима *Pe. albobadia* LPSC 285, *C. rigida* LPSC 232, *U. botrytis* LPSC 813 и *T. harzianum* FALH 18, а значајно повећан код *G. sepiarium* LPSC 735 и *Py. sanguineus* LPSC 163.

Резултати GCxGC-qMS анализе показују да је количина свих моноароматичних структура смањена у свим узорцима комине, а овај ефекат је најизраженији код узорка инокулисаним сојем *U. botrytis* LPSC 813.

Тестовима фитотоксичности утврђено је да неинокулисана комина и комина инокулисана сојем *G. sepiarium* LPSC 735 инхибирају герминацију семена зелене салате и парадајза, док третман комине свим осталим сојевима доводи до смањења фитотоксичности, а овај ефекат је највећи у узорку са *U. botrytis* LPSC 813.

Третман комине сојем *U. botrytis* LPSC 813 доводи до највећих промена у саставу и фитотоксичности. Након 90 дана долази до значајног пораста рН, садржаја обојених супстанци, губитка масе као и до значајног смањења садржаја амонијачног азота и укупних фенола, као и количине моноароматичних једињења. Све ово указује да након

третмана сојем *U. botrytis* LPSC 813, комина грожђа од отпада који оптерећује животну средину може постати значајан ресурс чиме ова дисертација доприноси и важној области циркуларне економије и помаже остварењу дела циљева одрживог развоја.

В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Нафтни угљоводоницима су једни од најчешћих загађујућих супстанци у животној средини, а до загађења долази услед прекомерне потрошње фосилних горива. Полициклични и хетероциклични ароматични угљоводоници представљају посебно опасност по животну средину јер су токсични, мутагени и карциногени, а изразито су липофилна и тешко се деградују [1-3]. Осим употребе фосилних горива, до загађења долази и услед интензивне пољопривредне производње, где настају велике количине лигноцелулозног отпада. Пример је комина грожђа, лигноцелулозни отпад који настаје у производњи вина, а има фитотоксична својства [4]. Микроорганизми се сматрају идеалним решењем за санацију загађења, због присуства многобројних метаболичких путева која омогућавају деградацију различитих органски једињења. Међутим, услед постојања ограничења у ефикасности микроорганизама у биоремедијацији загађења, неопходно је пронаћи стратегије за превазилажење ових ограничења [5], стога је идентификација нових сојева микроорганизама-деградера, као и биодеградационих процеса и нових начина за њихову примену веома актуелно.

У овој дисертацији утврђено је да сојеви *Oerskovia* sp. СНР-ZH25 и *Rhodococcus* sp. СНР-NR31 могу да успешно деградују ароматичну фракцију дизел горива. Оба соја припадају класи *Actinobacteria*, а у литератури се могу пронаћи бројни припадници ове класе који успешно деградују полицикличне ароматичне угљоводонике. Одавно је познато да род *Rhodococcus* одликује огромна катаболичка разноврсност и присуство бројних ензима који омогућавају деградацију смеша ароматичних угљоводоника, док је ово први пут да је показано да припадници рода *Oerskovia* могу да деградују смеше ароматичних једињења [6].

Сви сојеви гљива коришћени у овом раду за трансформацију комине грожђа су били донекле успешни у овом процесу. Ово је било очекивано с обзиром на то да су коришћени сојеви припадали углавном гљивама беле и браон трулежи за које је показано да имају лигнолитичке способности. Као најуспешнији се показао сој *U. botrytis* LPSC 813, што је било изненађујуће, пошто не поседује лигнолитички већ само целулолитички комплекс [7,8].

Свеобухватна дводимензионална хроматографија се врло често користи за испитивање састава нафтне и њених деривата, јер због високе резолуције омогућава раздвајање бројних једињења ове комплексне смеше. Међутим, употреба ове технике у праћењу микробних деградација нафте или неких других нафтних деривата још увек није заживела. У литератури је описана употреба GCxGC у праћењу промена у саставу нафте током

времена у реалним условима, док веома мали број радова испитује биоремедијационе процесе овом методом [9,10]. Још мањи број радова посвећен је испитивању састава грозђа, а у литератури нема података о испитивању састава комине грозђа. С обзиром на то да комина има потенцијално велику могућност примене која зависи од њеног састава и претретмана, јасно је да анализа GCxGC може значајно да доприне процесу валоризације овог супстрата.

1. Czarny J, Staninska-Pięta J, Piotrowska-Cyplik A, Juzwa W, Wolniewicz A, Marecik R, et al. *Acinetobacter* sp. as the key player in diesel oil degrading community exposed to PAHs and heavy metals. *J Hazard Mater.* 2020; 383: 121168.
2. Xu P, Yu B, Li FL, Cai XF, Ma CQ. Microbial degradation of sulfur, nitrogen and oxygen heterocycles. *Trends Microbiol.* 2006; 14 (9): 398–405.
3. Varjani SJ, Gnansounou E, Pandey A. Comprehensive review on toxicity of persistent organic pollutants from petroleum refinery waste and their degradation by microorganisms. *Chemosphere.* 2017; 188: 280–91
4. Yu J, Ahmedna M. Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. *Int J Food Sci Technol.* 2013; 48 (2): 221–37
5. de Lorenzo V. Seven microbial bio-processes to help the planet. *Microb Biotechnol.* 2017; 10 (5): 995–8
6. Zampolli J, Zeaiter Z, Di Canito A, Di Gennaro P. Genome analysis and -omics approaches provide new insights into the biodegradation potential of *Rhodococcus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019;103 (3): 1069–80.
7. Sharma RK, Arora DS. Fungal degradation of lignocellulosic residues: An aspect of improved nutritive quality. *Crit Rev Microbiol.* 2015; 41 (1): 52–60.
8. Saparrat MCN, Rocca M, Aulicino M, Arambarri AM, Balatti PA. *Celtis tala* and *Scutia buxifolia* leaf litter decomposition by selected fungi in relation to their physical and chemical properties and lignocellulolytic enzyme activity. *Eur J Soil Biol.* 2008; 44 (4): 400–7.
9. Adahchour M, Beens J, Vreuls RJJ, Brinkman UAT. Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC). III. Applications for petrochemicals and organohalogenes. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2006; 25 (7): 726–41.
10. Vasilieva V, Scherr KE, Edelmann E, Hasinger M, Loibner AP. Comprehensive GC2/MS for the monitoring of aromatic tar oil constituents during biodegradation in a historically contaminated soil. *J Biotechnol.* 2012; 157 (4): 460–6.
11. Carlin S, Vrhovsek U, Franceschi P, Lotti C, Bontempo L, Camin F, et al. Regional features of northern Italian sparkling wines, identified using solid-phase micro extraction and comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *Food Chem.* 2016; 208: 68–80.

Г. Објављени радови и саопштења који чине део дисертације

1. Радови у часописима међународног значаја:

M21a, Раd у врхунском међународном часопису

1. **M. Lješević**, G. Gojgić-Cvijović, T. Ieda, S. Hashimoto, T. Nakano, S. Bulatović, M. Ilić, V. Beškoski. Biodegradation of the aromatic fraction from petroleum diesel fuel by *Oerskovia sp.* followed by comprehensive GC×GC-TOF MS, J. Hazard. Mater. (2019) 363: 227-232 (ISSN 0304-3894) (IF₂₀₁₈ =7.650; Environmental Sciences 12/250)
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.10.005>

M21, Раd у врхунском међународном часопису

1. M. I. Troncozo, **M. Lješević**, V. P. Beškoski, B. Anđelković, P. A. Balatti, M. C. N. Saparrat. Fungal transformation and reduction of phytotoxicity of grape pomace waste, Chemosphere (2019) 237: 124458 (ISSN 0045-6535) (IF₂₀₁₈ =5,108; Environmental Sciences 32/250)
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124458>

M23, Раd у међународном часопису (M23 = 3)

1. **M. Lješević**, J. Milić, G. Gojgić-Cvijović, T. Šolević-Knudsen, M. Ilić, J. Avdalovic, M. M. Vrvic. Evaluation of assays for screening polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading potential of bacteria, Chem. Ind. Chem. Eng. Q. (2019) DOI: 10.2298/CICEQ190220023L (ISSN 1451-9372) (IF₂₀₁₇; 0.944; Chemistry, Applied 54/72)
<https://doi.org/10.2298/CICEQ190220023L>

2. Саопштења са домаћих и међународних скупова

M34, Саопштење са међународног скупа штампано у изводу

1. **M. Ljesevic**, G. Gojgic-Cvijovic, J. Milic, V. Beskoski, M. M. Vrvic; Molecular and biochemical characterization of five Actinobacteria strains isolated from hydrocarbon-contaminated soil samples; XVII International Symposium on the biology of Actinomycetes (ISBA '17) & Applications and Biotechnology of Actinomycetes, Izmir, Turkey (8-12 October 2014)
2. **M. Ljesevic**, S. Bulatovic, M. Ilic, G. Gojgic-Cvijovic, S. Hashimoto, T. Ieda, T. Nakano, V. Beskoski, M. M. Vrvic; Microbial degradation of various aromatic compounds-evaluation by comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-

- of-flight mass spectrometry (GCxGC-TOFMS); 26th Symposium on Environmental Chemistry Program and Abstracts, June 7-9, 2017, Shizuoka, Japan
3. **M. Lješević**, B. Kekez, G. Gojgić-Cvijović, V. Beškoski, M. M. Vrvic. Monitoring of lignin biodegradation using respirometric test and GCxGC-MS. II International and XIV National Congress of Soil Science Society of Serbia; Solutions and Projections for Sustainable Soil Management, Book of abstracts; September 25-28; Novi Sad, Serbia

M64, Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу

1. **M. Љешевић**, Б. Кекез, Г. Гојгић-Цвијовић, В. Бешкоски; Осетљивост на тешке метале и раст на ароматичним једињењима бактеријских сојева изолованих из земљишта контаминираног нафтним дериватима; 6. Симпозијум Хемија и заштита животне средине „Envirochem 2013”, Српско хемијско друштво, Књига извода стр. 362-363, 21-24. мај 2013. Вршац, Србија
2. S. Bulatovic, **M. Ljesevic**, M. Ilic, G. Gojgic-Cvijovic, V. Beskoski, M.M. Vrvic. Biodegradation of diesel aromatic fraction by Oerskovia sp. CNP-ZH25; 2nd Belgrade International Molecular Life Science Conference for Students; Abstract book & Program; February 10-13, 2016; Belgrade, Serbia
3. **M. Љешевић**, Ђ. Петрић, Ј. Филиповић, В. Бешкоски, Г. Гојгић-Цвијовић, М. М. Врвић. Испитивање биодеградације лигнина употребом свобухватне дводимензионалне гасне хроматографије са масеним спектрометром. XI Конгрес микробиолога Србије, Удружење микробиолога Србије, Микромед 2017, Зборник радова, стр. 152-153, 11-13. мај 2017. Београд, Србија (ISBN 978-86-914897-4-8)

Д. Провера оригиналности докторске дисертације

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација којесе бране на Универзитету у Београду и налазе у извештају из програма „iThenticate” којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „**Микробна деградација сложених ароматичних загађујућих супстанци и анализа производа биодеградације свеобухватном дводимензионалном гасном хроматографијом са масеном спектрометријом**”, аутора **Марије Б. Љешевић**, констатујемо да утврђено подударане текста износи **6 %**. Овај степен подударности последица је цитата, личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из њене дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

Стога сматрамо да је утврђено да је докторска дисертација **Марије Љешевић** у потпуности оригинална, као и да су у потпуности поштована академска правила цитирања.

Б. Закључак

Комисија је на основу детаљног прегледа докторске дисертације под насловом „Микробна деградација сложених ароматичних загађујућих супстанци и анализа производа биодеградације свеобухватном дводимензионалном гасном хроматографијом са масеном спектрометријом” закључила да је кандидаткиња Марија Љешевић успешно одговорила на постављене задатке везане за испитивање биодеградације ароматичне фракције дизел горива Д2 и ароматичних једињења комине грожђа као и употреби свеобухватне дводимензионалне гасне хроматографије са масеном спектрометријом за испитивање биодеградационих процеса.

Научно-истраживачки рад кандидаткиње је публикован у оквиру три научна рада која су директно проистекла из докторске дисертације: један рад у врхунском међународном часопису (категорија М21а), један рад у врхунском међународном часопису (категорија М21) и један рад у међународном часопису (категорија М23). Такође, резултати истраживања проистекли из ове дисертације су саопштени у три саопштења на скупу од међународног значаја штампаних у изводу (категорија М34) и три саопштења на скупу националног значаја штампаних у изводу (категорија М64). Комисија је мишљења да резултати објављени у поднетој докторској дисертацији представљају значајан допринос анализи биодеградационих процеса ароматичних једињења и биотехнологији животне средине.

На основу свега изложеног, а у складу са Законом о Универзитету и Статутом Хемијског факултета, Комисија сматра да су испуњени услови за одбрану докторске дисертације и са задовољством предлаже Наставно-научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду да поднету докторску дисертацију Марија Б. Љешевић, мастер биохемичара, под насловом „Микробна деградација сложених ароматичних загађујућих супстанци и анализа производа биодеградације свеобухватном дводимензионалном гасном хроматографијом са масеном спектрометријом” прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктора биохемијских наука.

Комисија:

др Владимир Бешкоски, ванредни професор

Универзитет у Београду -Хемијски факултет, ментор

др Јелена Милић, научни сарадник

Институт за хемију, технологију и металургију, Универзитет у Београду, ментор

др Љубодраг Вујсић, доцент

Универзитет у Београду -Хемијски факултет

др Јелена Трифковић, ванредни професор

Универзитет у Београду -Хемијски факултет

др Гордана Гојгић-Цвијовић, научни саветник

Институт за хемију, технологију и металургију, Универзитет у Београду

У Београду,

12.11.2019. године